

1 Innledning

1.1 Stamceller, adulte stamceller og hMSC-TERT som objekt for grunnforskning og anvendt forskning

Til enhver tid dør celler i kroppen og disse blir erstattet med nye. De cellene som produserer nye celler er stamceller, altså en form for mor eller opphavscelle. En stamcelle er per definisjon en celle som er selvfornyende, uspesialisert og kan differensieres til spesialiserte celler (1). Det langsiktige målet i stamcelleforskning er fokusert på å lære å bruke stamcellen til å produsere hvilken som helst celletype. Håpet er at stamcellen kan differensiere direkte i en pasient, eller transplanteres som differensierte eller mellomstadieceller. Disse cellene kan erstatte skadet, sykt eller ødelagt vev (1). Stamcellen kan vise seg å åpne opp for effektive behandlingsmetoder for eksempel i behandling av Parkinsons sykdom, diabetes, multippel sklerose, Alzheimers sykdom, nyreskader, leverskader, kroniske hjertesykdommer og kreft. Stamceller kan muligens også brukes til konstruere nye organer og kroppsdelar (1).

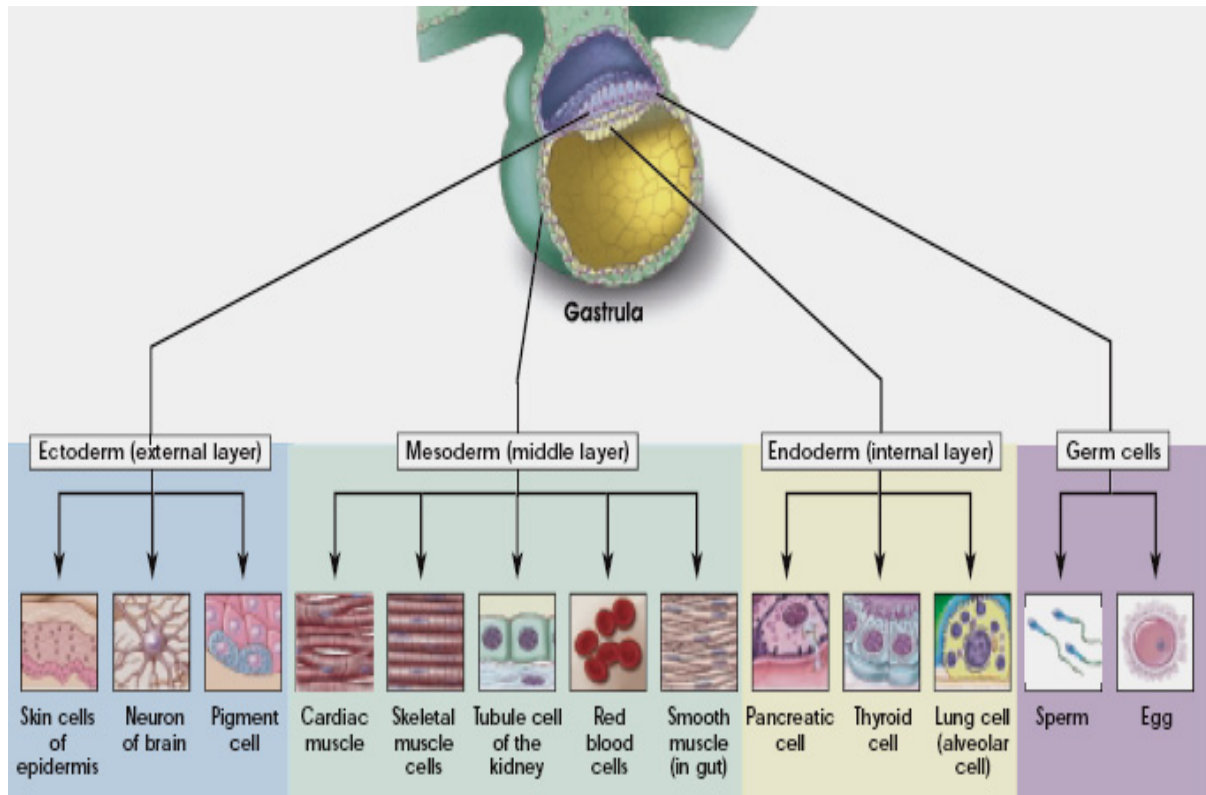
Stamcellene kan opptre i flere former og i forskjellige vev. De deles grovt inn i to grupper: Den første består av stamceller med embryonalt opphav og vil bli beskrevet kort. Den andre gruppen legges det mer vekt og fokus på. Denne gruppen stamceller har opphav i ferdig utviklet vev. Disse kalles adulte stamceller. I avsnitt 1.1.8 beskrives viktige hovedmomenter i forskning på adulte stamceller, som igjen leder mot utgangspunktet for oppgavens målsetning.

1.1.2 Pluripotente embryonale stamceller og embryonal kimceller

I 1998 ble en pluripotent stamcelle for første gang isolert fra et humant embryo og dyrket i kultur (2). En pluripotent stamcelle har evnen til differensiere til celler med opphav fra både endoderm (indre cellelag), mesoderm (midtre cellelag) og ektoderm (ytre cellelag)

(1), se figur 1.1.1 på side 3. Dette er de tre hovedvevene i en gastrula som alle celler springer ut fra i kroppens utvikling. En gastrula er betegnelsen som brukes på et tidlig utviklingsstadium mellom en befruktet celle og et foster. Det eksisterer to kjente former av humane pluripotente stamceller. Den første er den embryonale stamcellen som er derivert fra den indre cellemassen i en 4-5 dager gammel blastocyst. En blastocyst er et enda tidligere utviklingsstadium enn en gastrula. Den andre formen av pluripotente stamceller er den embryonale kimcellen. Den er derivert fra føtalt vev og er isolert fra celler i gonadene til et 5-10 uker gammelt foster (1). Embryonale stamceller og embryonale kimceller er begge pluripotente, men har likevel ikke identiske egenskaper (1). Disse er celler som i utgangspunktet kan differensieres til alle celler i kroppen. Følgelig er kanskje disse stamcellene best skikket til bruk i terapi.

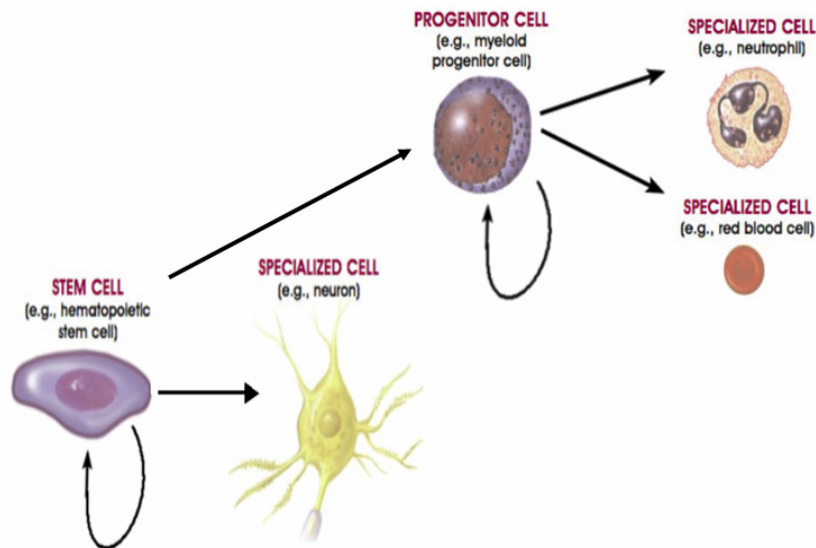
En karakteristikk ved de embryonalt deriverte stamcellene er at de uttrykker genet telomerase (1). Enzymet telomerase har som funksjon å opprettholde lengden på de repeterte endesekvensene i kromosomets telomerer (3). Telomerase uttrykkes ikke i vanlige somatiske celler. Replikasjonmekanismen ved celledeling fører i somatiske celler til et gradvis kortere kromosom (3). Forkorting av DNA medfører på et eller annet tidspunkt til et defekt genom og celledød (3). Denne formen for celledød forekommer derfor ikke i stamceller med embryonalt opphav. (Se mer under mesenkymale stamceller og hMSC-TERT, avsnitt 1.1.7) Imidlertid, i denne oppgaven vil det ikke bli lagt stor vekt på embryonalt deriverte stamceller, av to grunner. For det første fordi forskningen på denne typen celler fortsatt ikke er tillatt i Norge. For det andre er disse ikke av celletypen som blir benyttet som verktøy i oppgaven.



Figur 1.1.1 Figuren viser eksempler på utvikling av celletyper fra de tre opprinnelige hovedlagene av celler (1).

1.1.3 Adulte stamceller

En adult stamcelle er en udiffereinsierte celle som opptrer i differensierte vev i et ferdig utviklet menneske (1). Den fornyer seg eller blir spesialisert til å danne alle typer celler i opphavsvevet (1). Den kan følgelig kalles en multipotent stamcelle. En adult stamcelle kan dele seg og danne identiske kopier av seg selv gjennom hele livet til organismen uten å differensiere (1). Det er oppdaget adulte stamceller i beinmarg, blod, cornea, retina, hjernen, skjelettmuskler, tannkjøtt, lever, hud, fordøyelsessystemet og fettvev (1). I disse vevene fungerer de ved erstatte døde, syke eller gamle celler (1). Til nå er det ikke blitt vist at en populasjon av adulte stamceller har evnen til å danne alle typer celler i kroppen (1). De er vanskelige å identifisere, isolere og rense (1). I de følgende avsnitt 1.1.4-6, vil det bli beskrevet og satt spørsmålsteget ved sentrale forhold i adulte stamcellers biologi.

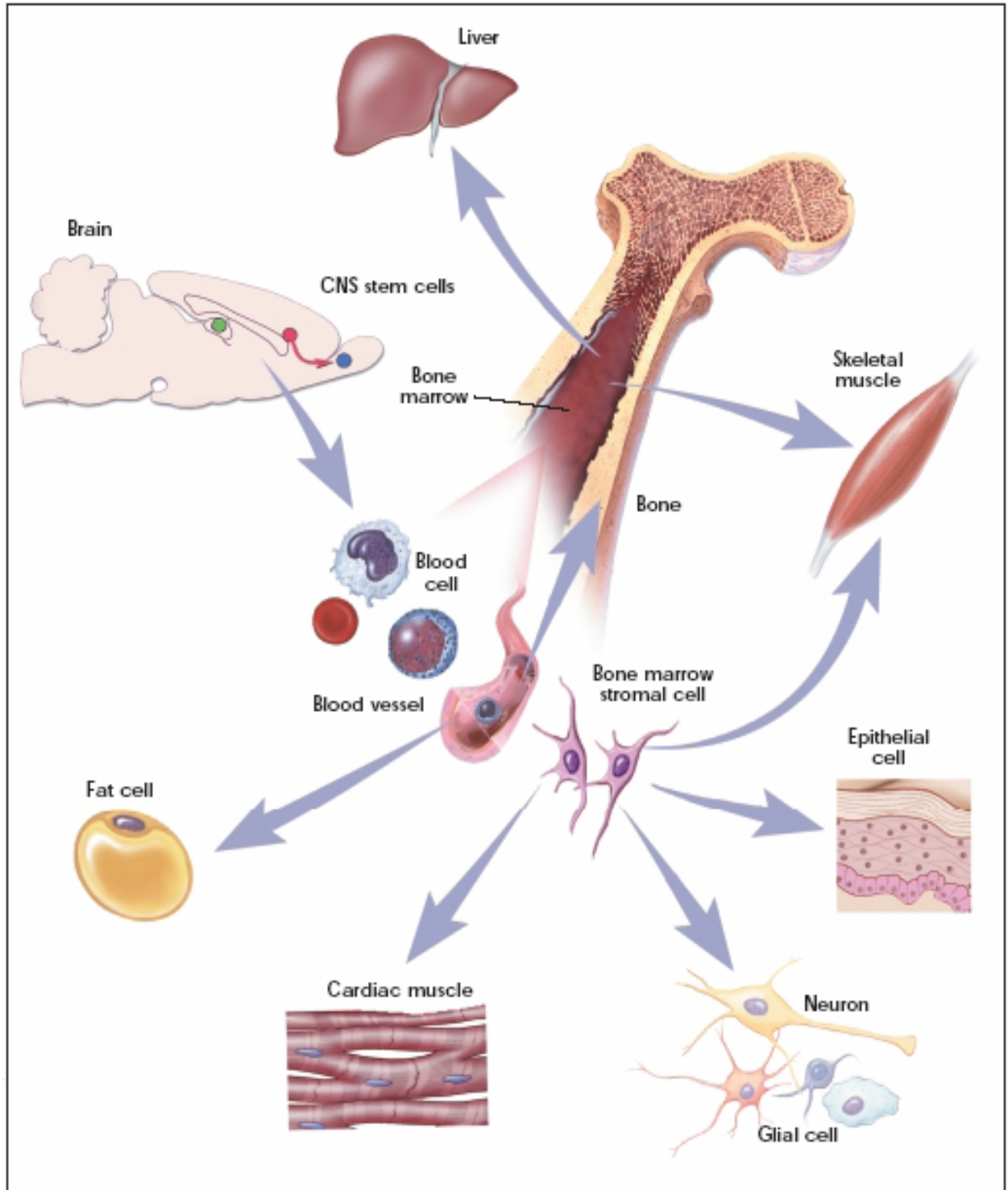


Figur 1.1.2 Modifisert figur (1).

Figurene illustrerer deler av utvikling av adulte stamceller og forløperceller. Som vist til venstre i figuren kan en hematopoetisk stamcelle dele seg og gi opphav til enten en ny stamcelle eller eksempelvis en spesialisert nervecelle (1). En progenitor eller forløpercelle opptrer i føtalt eller ferdig utviklet vev og er delvis spesialiserte. Dette er celler i utviklingsstadier mellom stamceller og ferdig differensierte celler. Den deler seg og gir opphav til differensierte celler, eller nye progenitor eller forløperceller (1).

1.1.4 Plastisitet

Plastisitet er evnen en adult stamcelle har til å danne andre spesialiserte celletyper i annet vev. For eksempel har adulte stamceller fra beinmarg generert celler tilsvarende nevroner og andre celletyper i hjernen (4). Det blir dermed foreslått at noen adulte stamceller skal være i stand til å bli genetisk reprogrammert og generere spesialiserte celler som er karakteristiske for forskjellige vev (4).



Figur 1.1.3 Figuren viser former for plastisitet i adulte stamceller fra beinmarg (1).

1.1.5 Klonalitet eller klonalt derivert stamcelle

Et mål er å kunne bruke adulte stamceller i terapi, og derfor er det viktig å påvise plastisitet i adulte stamceller gjennom forsøk. Selv om en heterogen populasjon av adulte stamceller (eksempelvis fra fettvev) har vist seg å kunne danne andre spesialiserte celler hjemmehørende i annet vev (blodceller, beinceller), har det ikke blitt vist at en enkelt celle er ansvarlig for opphavet til andre celler (5). Resultatet kan være en følge av forurensninger som celler i tidlige forstadier, (eks forløperceller) eller hematopoetiske stamceller eksempelvis i fettvevet (1). Slike usikkerhetsmomenter kan unngås hvis det benyttes klonalt deriverte celler. En celle er klonalt derivert hvis den er resultat av delingen av en enkelt celle og er genetisk identisk med morcellen (1). Dette vil være en homogen populasjon. Hvis en populasjon med klonalt deriverte adulte stamceller med sikkerhet kunne vise plastisitet, vil dette være en svært betydelig oppdagelse. Et slik funn vil da understreke at adulte stamceller virkelig kan differensiere til annet vev enn opphavsvevet uten at resultatet er påvirket av andre forurensende celletyper. Et annet usikkerhetsmoment som ikke på det nåværende tidspunkt er vist, kan være betydningen av interaksjoner mellom de transplanterte stamcellene og cellene i det skadde eller syke vevet. Kan signaler fra de skadde eller syke cellene i fremmedartet vev påvirke og endre utviklingen av stamcellene?

1.1.6 Andre egenskaper ved adulte stamceller

Adulte stamceller viser evnen til å kunne proliferere og spesialisere seg etter transplantasjon i dyr med defekt immunsystem (1). Et virksomt immunsystem kan i noen tilfeller frastøte de transplanterte cellene (1). Etter en slik injeksjon eller transplantasjon i en syk eller skadet modellorganisme, tiltrekkes og vandrer cellene mot det skadde eller syke vevet. Dette fenomenet kalles ”homing”(1).

1.1.7 Mesenkymale stamceller og hMSC-TERT

Hematopoetiske (blodcelledannende) og mesenkymale stamceller inngår begge i gruppen adulte stamceller og isoleres fra beinmarg. I 1991 ble det for første gang isolert differensierende ikke-hematopoetiske stamceller fra beinmargen (6). De ikke-hematopoetiske stamcellene ble på dette tidspunktet kalt stromale beinmargceller. I ettertid har de blitt kalt mesenkymale stamceller (MSC). Tradisjonelt har disse blitt isolert på grunnlag av adherans til plast ved vekst i kultur. Dette skiller dem fra hematopoetiske stamceller som ikke fester seg til plasten (1). Videre har det blitt utført isolering av mesenkymale stamceller med monoklonal antistoffteknikk (7).

Morfologisk er MSC fibroblastliknende celler (8). Veksten i kultur er karakterisert av kolonidannelse, og diverse overflatemarkører har blitt påvist (8). Den viktigste karakteristikken til MSC er evnen til å differensiere til forskjellige celletyper i kultur (8). Disse vev- og celletypene er: Osteoblaster /beinvev (9), adipocytter/fettvev (10), chondrocytter/bruskvev (11) og videre ikke-mesodermatype celler f. eks nevronliknende (4) og endoderm-liknende celler (12).

I kultur med føtalt kalveserum, kan en MSC fra en ung donor gjennomgå 24-40 populasjonsdoblinger (13). Etter en viss tid vil cellen dø som resultat av flere faktorer inkludert progressiv teleomerforkortning (13). Denne fenotypen har blitt unngått ved å transduere humane MSC med en retroviral vektor med genet human telomerase revers transkriptase (hTERT) (14). Det har blitt vist at denne nye cellelinjen har telomeraseaktivitet og at transfeksjonen er stabil (14). Cellelinjen fikk navnet hMSC-TERT (human mesenkymal stamcelle-TERT) og deler seg i teorien i det uendelige (14). Tilleggsforsøk har vist at denne cellelinjen ellers har de samme kjennetegnene som en vanlig MSC (14). Det vil si evnen til å kunne differensiere til flere celletyper og uttrykke celletypenes markører. Det er av betydning å påpeke at hMSC-TERT ikke er derivert fra en populasjon bestående av klonalt deriverte MSC. En heterogen populasjon ble transfektert med hTERT (14). Forsøk i denne oppgaven er utført i hMSC-TERT.

1.1.8 Adulte stamceller som objekt for grunnforskning og anvendt forskning

Det viktigste siktemålet i stamcelleforskning er som tidligere nevnt å lære å anvende cellene i regenerering av skadet eller sykt vev. For at adulte stamceller skal kunne brukes i terapi, er det mange forhold som må besvares først. Disse forholdene er ikke bare viktige i problemstillinger knyttet til eventuell medisinsk bruk. Biologisk grunnforskning på stamceller kan samtidig bidra til å øke den generelle forståelsen av en rekke andre sentrale biologiske systemer og funksjoner. Fenomenet plastisitet i adulte stamceller har allerede blitt beskrevet og er viktig å kunne dokumentere og fastslå. Kan virkelig en klonalt derivert adult stamcelle som i utgangspunktet er determinert til å differensiere til en gruppe celler, bli genetisk reprogrammert til å differensiere til en annen gruppe celler? Et annet spørsmål som må undersøkes for å besvares, er om adulte stamceller kan transplanteres direkte inn i en pasient der de videre vil oppsøke (ved homing) det skadde eller syke vevet. Hvordan kan en eventuell frastøting- og immunreaksjon unngås? Må cellene differensieres til ferdige eller mellomstadiaceller før transplantasjon? Er det i så fall mulig å dyrke og differensiere dem i kultur i stort nok antall? Hvis adulte stamceller skal dyrkes i kultur, oppstår behovet for kunnskap om hva som får dem til å proliferere, differensiere og i tillegg hvilken mekanisme som ligger bak selvfornyelse over tid.

For å kunne besvare noen av disse spørsmålene må stamcellenes grunnleggende biologi først læres å kjenne. Denne oppgavens overordnede siktemål begrenser seg i første rekke til forståelsen av aktiveringen av signalveier i adulte stamceller og hva som får en mesenkymal stamcellelinje til å differensiere og proliferere. De enkle hovedtrekkene er som følger: Adulte stamceller befinner seg i forskjellige vev med et ekstracellulært miljø. I dette vevet foregår det et samspill i form av mangfoldige signaler mellom celletypene som igjen får signaler fra andre celler, vev og organer i kroppen. På et tidspunkt mottar den adulte stamcellen et signal som får den til å avslutte selvfornyelsen. Den begynner isteden å differensiere og proliferere. Signaler og vekstfaktor stimulerer diverse reseptorer i membranen. Reseptorene aktiverer videre signalveier som i sin tur resulterer i aktivering av transkripsjonsfaktorer og gener i cellekjernen. Den samlede proteinsyntesen etter aktivering avgjør i hvilken retning cellene utvikler seg.

Ved å ta utgangspunkt i premissene beskrevet i forrige avsnitt oppstår følgende spørsmål: Hvilke situasjoner i en organisme utløser relevante signaler? Hvilke signaler og hvilke former for signaler er dette og hvilke reseptorer stimulerer de? Hva er mekanismen bak aktiveringen av reseptorene og hvilke signalveier aktiveres? Hva er effekten av de aktiverte signalveiene?

I neste del av oppgaven vil utvalgte kjente aktiveringsmekanismer og signalveier som påvirker proliferasjon og differensiering i adulte stamceller bli belyst.

1.2 Intracellulære signalveier i humane mesenkymale stamceller

Ved vevsskade og ulike sykdommer utløses en betennelsesreaksjon eller inflammasjon. Denne reaksjonen er viktig for å rekruttere flere celletyper som sammen med ulike prosesser er nødvendig for å reparere skader i vev og bekjempe infeksjon. Stamcellene er en type celler som kan bli påvirket av slike reaksjoner. Inflammasjon utløser en rekke substanser som stimulerer reseptorer i cellemembranen. G-protein koblete reseptorer (GPCR) er en veldig stor reseptorfamilie som aktiveres og formidler signaler som påvirker adhesjon, differensiering, proliferasjon og apoptose (15). De fleste inflammatoriske molekyler stimulerer denne typen reseptorer (15). I stamcelleforskning er det en bestemt signalvei som peker seg ut til å være sentral når det gjelder å forstå hvilke funksjoner som regulerer differensiering og proliferasjon i en stamcelle. Dette er Wnt-signalveien. Ved å benytte utvalgte kjente inflammatoriske substanser er målet å identifisere og karakterisere andre komponenter og signalveier som utøver effekt på Wnt-signalveien. Av disse fokuseres det her på PKA aktivering og funksjon, MAPK-signaltransduksjon, og PKB/Akt-funksjon. Verktøy i dette arbeidet er den adulte mesenkymale stamcellelinjen hMSC-TERT.

1.2.1 Generelle prinsipper i signaltransduksjon

Signaltransduksjon i en celle følger i de fleste tilfeller noen generelle prinsipper selv om det eksisterer unntak og variasjoner. En reseptor i membranen blir bundet spesifikt av sin ligand. Interaksjonen mellom liganden og reseptoren fører til endrede intramolekylære egenskaper i reseptoren som fører til en konformasjonsendring.

Konformasjonsendringene fører til at katalytiske eller aktive domener i reseptorene blir tilgjengeliggjort. Proteiner interagerer med hverandre via protein-protein assosiasjoner mellom proteininteraksjonsdomener. Disse domenene kan i ettertid interagere med et nedstrøms målprotein. Interaksjonen fører til en ny konformasjonsendring i målproteinet. Målproteinet kan i sin tur interagere med et nytt nedstrøms signalprotein og føre til

konformasjonsendringer i dette signalproteinet. I mange tilfeller skjer de beskrevne konformasjonsendringene som et resultat av fosforyleringer av bestemte aminosyrer i målproteinet. Et protein som fosforylerer et annet protein har kinaseaktivitet og blir kalt en kinase. Eksempler på aminosyrer som ofte er mål for fosforyleringer er threonin, tyrosin og serin. Fosforyleringer av et nedstrøms signalprotein fører til aktivering eller inaktivering og inhibering. Proteiner som defosforylerer fosforylerte signalproteiner kalles fosfataser. Fosfatasen har derfor den motsatte effekten av kinasene som fosforylerer målproteinene. På denne måten videreføres et signal ved interaksjoner mellom signalproteinene. Når mange proteiner inngår i en kjede av aktiveringer kan denne kjeden beskrives som en kaskade. Det siste eller de siste proteinene i en slik kaskade har i de fleste tilfeller en funksjon i regulering av aktivitet i cytoplasma, eller en direkte eller indirekte funksjon som transkripsjonsfaktorer. Transkripsjonsfaktorene inngår i reguleringen av transkripsjon av spesifikke gener.

1.2.2 Wnt-signalveien

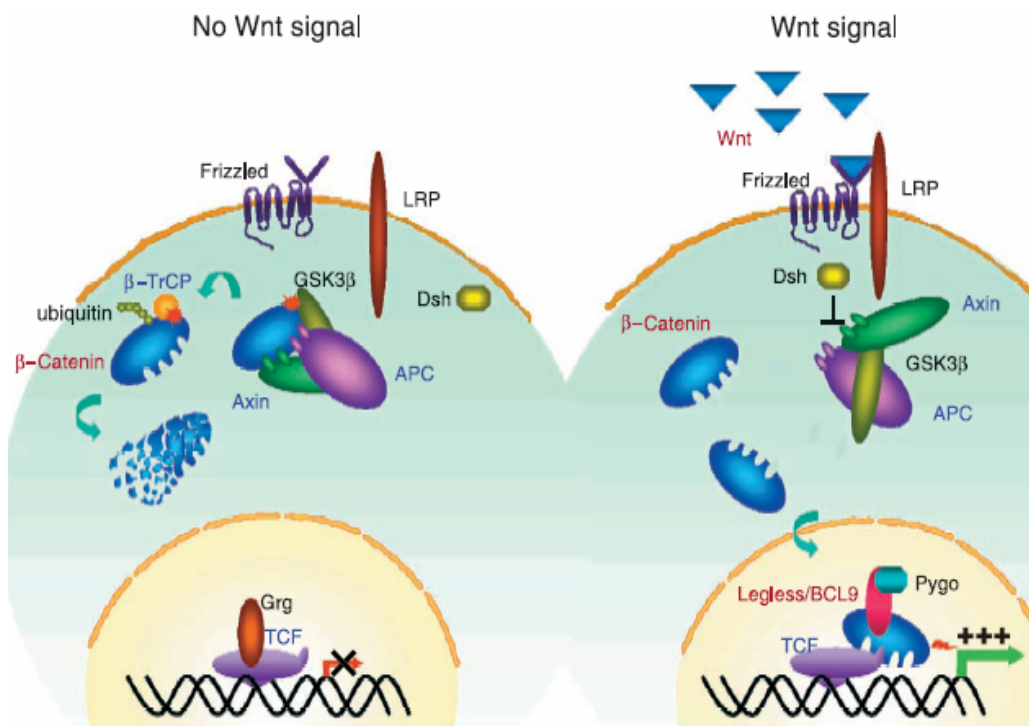
Begrepet Wnt er et sammensmeltet navn på to ortologe gener funnet i *Drosophila* og et protooncogen i mus, henholdsvis Wingless (Wg) (16) og Int-1 (17). I ettertid er Wnt blitt en samlebetegnelse for en gruppe sekreterte cysteinrike glykoproteiner (18). Det eksisterer minst 19 kjente humane varianter og de er beskrevet i en rekke arter (18). Wnt har tidligere vist seg å ha effekt på celledifferensiering, proliferasjon, utvikling av sentralnervesystemet og kontroll av asymmetrisk celledeling (19).

Wnt fungerer som en ligand og danner et aktivt kompleks ved å binde en reseptor i Frizzled-familien (Fz) som interagerer med en ko-reseptor i LRP-familien (low-density lipoprotein receptor related protein family) (18). Fz er et protein av typen som kveiler seg syv ganger gjennom membranen (18). Det finnes flere løselige former av inhibitoriske Fz-liknende proteiner som kan binde Wnt før de rekker å binde membranbundet Fz (18). En annen type inhibering består av Dickkopf-proteiner (Dkk) som binder og maskerer LRP (18).

Ved fravær av aktivert Fz eksisterer det i cytoplasma et kompleks bestående av stillasproteinet axin, APC (adenomatous polyposis coli) og GSK3 β (glykogen syntase kinase 3 β) (18). Dette komplekset binder β -catenin. Både APC og β -catenin blir fosforylert av GSK3 β (18). Fosforylering av β -catenin leder videre til ubiquitinerings og proteasomnedbrytning av dette proteinet (18).

Virksomt β -catenin er et protein som translokeres til nukleus (18). Fraværet av β -catenin i nukleus fører til at TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor-1) binder en gruppe transkripsjonelle repressorer som kalles Groucho proteiner (Grg) (18). Groucho proteinene undertrykker TCF-målgenene ved å rekruttere histon-deacetylasen. Deacetylering fører til heterokromatinisering av DNA (18). (Se mer om heterokromatinisering i avsnitt 1.3.5.2)

En annen situasjon oppstår hvis wnt binder og stimulerer Fz. Aktivert og funksjonelt wnt/Fz/LRP-kompleks kan hyperfosforylere Dishevelled (Dsh) ved en ukjent mekanisme (18). Dsh kan videre inhibere GSK3 β ved en ny ukjent prosess (18). Inhiberingen av GSK3 β hindrer at axin/APC/GSK3 β bidrar til destruksjon av β -catenin (18). Funksjonelt β -catenin blir translokert til nukleus der den inngår som essensiell kofaktor for transkripsjonsfaktorene TCF/LEF (18). I motsetning til undertrykking av gentranskripsjon ved fravær av β -catenin, bidrar TCF/LEF i dette tilfellet til transkripsjon (18). Andre proteiner og kofaktorer bidrar også i transkripsjonsaktiveringen i nukleus uten at disse vil bli beskrevet videre (18). (Se figur 1.2.1 på neste side).



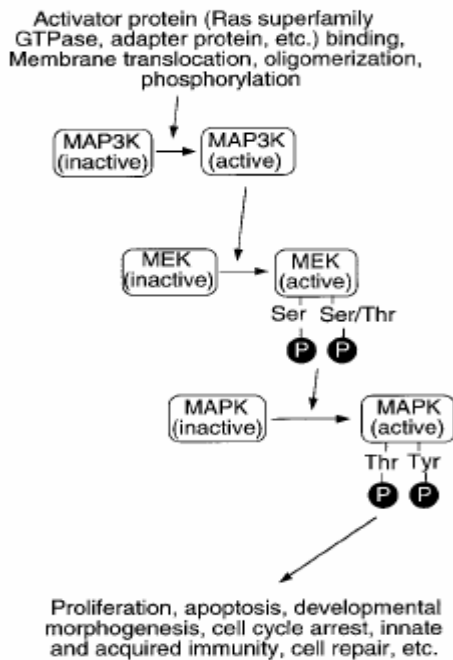
Figur 1.2.1 (18)

1.2.3 MAPK-signaltransduksjon og Ras-Raf-MEK-ERK signalveien

Mitogen-aktivert protein kinase (MAPK)-signaltransduksjon er en utstrakt form for eukaryot celledisignalisering (20). Alle eukaryote celler innehar flere MAPK-signalveier der hver av dem aktiveres som resultat av en rekke forskjellige stimulerings i diverse reseptorfamilier: Reseptor tyrosin kinaser (RTK), cytokin reseptorer, G-protein koblede reseptorer (GPCR) og Ser-Thr kinase reseptorer (20). MAP-kinaser setter siden i gang koordinerte aktiveringer av genutskripsjon, proteinsyntese, cellereparasjon, kontroll av celledyklus-maskineriet, proliferasjon, differensiering eller eventuelt apoptose (20).

MAP-kinasene består av fire undergrupper: ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase), p38, JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase)/SAPK (stress-activated protein kinase) og ERK5 (21). ERK1/2 aktiveres i hovedsak av mitogene stimuli (21). JNK/SAPK og p38 aktiveres stort sett av stress-stimuli og inflammatoriske cytokiner (21). ERK5 aktiveres av vekstfaktorer, osmotisk og oksidativt stress (21).

Alle MAPK signalveier består av tre kinaser som i en rekkefølge blir aktiverte etter en fosforylering (20). De tre kinasene betegnes henholdsvis som MKKK (MAP3K), MKK (MAPK/ (ERK)-kinase, MEK) og MK (MAP-kinase). K er forkortelsen for kinase. Disse tre kinasene holdes sammen av et stillasprotein som fører til effektiv og koordinert signaltransduksjon (20).



Lengst oppstrøms av de tre kinasene er MKKK. MKKK reguleres selv av en rekke oppstrøms aktivatorer og inhibitorer (20). En aktivert MKKK kan fosforylere og aktivere MKK (20). MKK kan til slutt fosforylere og aktivere MK som er lengst nedstrøms. MK blir serin- og threoninfosforylert i konserverte domener (20).

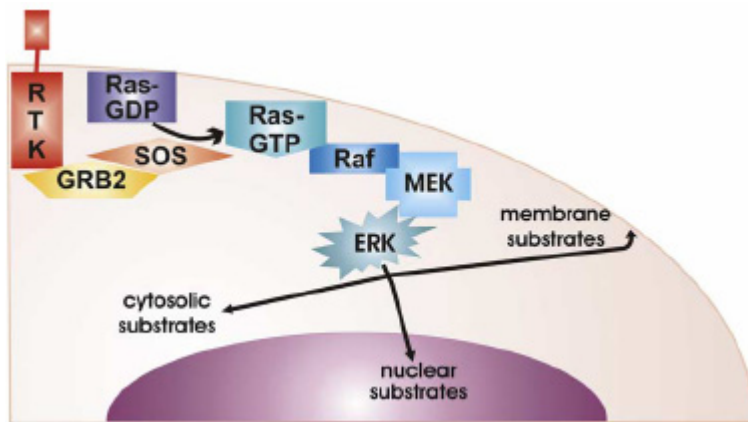
Figur 1.2.2 Figuren viser signaltransduksjon i en MAP-kinase signalvei (20).

1.2.4 Ras-Raf-MEK-ERK signalveien

I det følgende beskrives et eksempel på aktivering av og signalisering i en sentral MAP-kinase signalvei. Aktiveringen av denne signalveien påvirker proliferasjon og apoptose i celler (20).

Stimulering av en reseptor tyrosin kinase (RTK) med vekstfaktor er vist å aktivere MAP-kinasen ERK1/2 (22). En RTK består av to transmembrane monomerer. Ved aktivering av eksempelvis EGF (epidermal vekstfaktor), danner de en dimer som kan autofosforylere tyrosiner i egne regulatoriske regioner (23). Domenene som blir fosforylert, er på den cytoplasmatiske siden av cellemembranen (23). Grb2 (growth factor

receptor bound protein 2) er et cytosolisk adapterprotein som kan binde de regulatoriske regionene i RTK (24). Grb2 kan så videre binde SOS (son of sevenless) som kan assosiere med membranbundet Ras (24). SOS aktiverer Ras ved å katalysere skifte av bundet GDP til GTP (24). Konformasjonsendring i Ras gjør den i stand til å rekruttere Raf-1 fra cytosol og aktivere den (25). Raf-1 er et eksempel på den tidligere nevnte MAP3K. Videre kan Raf fosforylere og aktivere nevnte MEK som igjen fosforylerer og aktiverer ERK1/2 (26). ERK1/2 er en MAPK. Aktivert ERK1/2 har mange substrater i cytosol: cytoskjeletet, fosfolipase A2, andre tyrosin kinase reseptorer, østrogen reseptorer, SOS, STAT og flere (27;28). ERK1/2 kan og translokeres til nukleus og kontrollere genekspressjon ved å fosforylere transkripsjonsfaktorer. Disse fører igjen til transkripsjon av en rekke gener (27;28).



Figur 1.2.3 figuren viser Ras-Raf-MEK-ERK signalveien (29).

1.2.5 GPCR (G-protein koblede reseptorer) og cAMP syntese

I en celle er det veldig mange forskjellige G-protein koblede reseptorer (30). Disse hører til gruppen proteiner som kveiler seg syv ganger gjennom membranen. Effekten medieres gjennom aktiveringen av et heterotrimert guanin-nukleotidbindende G-protein (30).

Denne består av en α , β , og γ -enhet (30). Ved aktivering dissosieres G-proteinet i en α og en β/γ -enhet (30). Dette er resultat av utskifting av GDP med GTP i α -enheten (30). Hver av disse to enhetene har sine aktiverende og inhiberende nedstrøms funksjoner (30). Et RGS- protein (regulator av G-protein signalisering) øker GTPase-aktiviteten til α -enheten

(30). Funksjonen til α -enheten kan enten være stimulerende ($G_{\alpha s}$) eller inhibitorisk ($G_{\alpha i}$) (30). I tillegg eksisterer G-proteinene $G_{\alpha 0}$ og $G_{\alpha q}$ (30).

Den stimulerende α -enheten kan videre aktivere adenylyl cyklase, et protein som sitter i plasmamembranen. Funksjonen til adenylyl cyklase er å katalysere omdannelsen av ATP (adenosin tri fosfat) til syklisk-AMP (3'5'-syklisk-adenosin monofosfat, cAMP) (31). cAMP er ett budbringermolekyl som utøver flere effekter (31).

1.2.6 Stimulering av GPCR i hMSC-TERT

To inflammatoriske substanser som utløses ved vevsskade er adenosin og PGE₂ (prostaglandin E₂). Adenosin finnes naturlig i alle vev og konsentrasjonen kan øke ved blant annet betennelsesreaksjoner (32). Adenosin kan påvirke sentralnervesystemet, immunsystemet, cellevekst, proliferasjon, cellevekst og apoptose (32). PGE₂ syntetiseres under rekke sykdommer, kreft og betennelsesreaksjoner (33).

I denne oppgaven blir det fokusert på aktiveringen av GPCR og hvilke effekter GPCR-stimulering med inflammatoriske substanser har på wnt-signalveien.

Det er påvist fire GPCR adenosin-reseptorer, A₁, A_{2a}, A_{2b} og A₃, og de forskjellige reseptorene er koblet til inhiberende og aktiverende G-proteiner (32). I hMSC-TERT er det påvist mRNA syntese av alle de fire reseptorene (34). Aktivering av reseptorene A₁ og A₃ er vist å føre til en inhibert cAMP syntese og aktivering av reseptorene A_{2a} og A_{2b} er vist å føre til en aktivert cAMP-syntese (32). Ved stimulering (30 min., 37 °C) av reseptorene A₁₋₃ med adenosin, fører den totale aktiveringen av inhiberende og aktiverende G-proteiner til ~10 ganger økt cAMP syntese sammenliknet med kontrollen ustimulerte celler (34).

Det er påvist fire GPCR PGE₂-reseptorer, EP₁, EP₂, EP₃ og EP₄, og de forskjellige reseptorene er koblet til inhiberende og aktiverende G-proteiner (33). I hMSC-TERT er det påvist mRNA syntese av alle de fire reseptorene (34). Aktivering av reseptoren EP₃

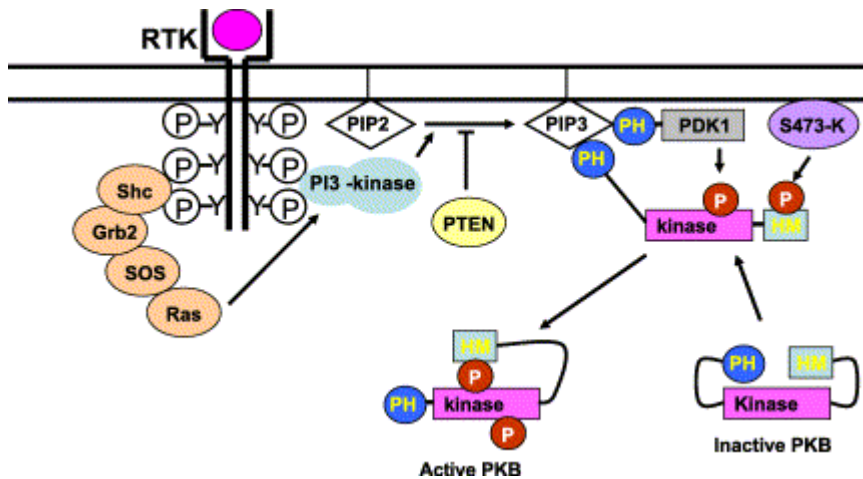
er vist å føre til en inhibert cAMP syntese og aktivering av reseptorene EP2 og EP4 er vist å føre til en aktivert cAMP-syntese (33). Ved stimulering (30 min., 37 °C) av reseptorene EP1-4 med PGE₂, fører den totale aktiveringen av inhiberende og aktiverende G-proteiner til ~40 ganger økt cAMP syntese sammenliknet med kontrollen ustimulerte celler (34).

1.2.7 PKA-aktivering

Det viktigste bindingsproteinet for cAMP er en serin/threonin-kinase kalt PKA (Protein kinase A), eventuelt cAMP-avhengig protein kinase (35). PKA består av et holoenzym med en regulatorisk dimer (R) og to katalytiske monomerer (C) som er inaktive i kompleksform (35). Ved binding av fire cAMP-molekyler til de regulatoriske subenhetene frigjøres de to katalytiske enhetene i aktiv form (35). De aktive katalytiske enhetene i PKA har en rekke funksjoner (35).

I humane celler er det til nå vist at det eksisterer to klasser av PKA, klasse I og II (36). Disse klassene bestemmes av innhold av regulatoriske enheter, enten RI eller RII (36). Siden har det blitt vist ytterligere heterogenitet i form av RI α , RI β , RII α , og RII β -enheter (36). Det har videre blitt vist fire forskjellige subenheter av katalytiske enheter: C α , C β , C γ , og PRKX. Subenhetene forekommer igjen som følgende isoformer av de katalytiske enhetene: CaI, CaII, C β I, C β II og C β III (36). Av isoformene er det igjen vist seg å være underisoformer (36). Det er stor forskjell i uttrykk av de forskjellige isoformene i forskjellig vev og celletyper. Humane T-celler uttrykker CaI og C β II, T-celler fra mus uttrykker CaI, C β II og C β I (37). Den humane T-cellelinjen Jurkat uttrykker CaI og C β II og litt C β I (37).

1.2.8 PKB/Akt-aktivering



Figur 1.2.4 Figuren viser aktiveringen av PKB/Akt (38).

Aktivering av kinasen Akt/PKB (protein kinase B) er en annen signalvei som kanskje kan påvirke Wnt-signalveien. Akt/PKB aktiveres via forskjellige reseptor tyrosin kinaser eller GPCR (38). Aktivering av reseptorene fører til aktivering av PI3K (fosfatidylinositol 3-kinase) som katalyserer PI(3,4)P₂ (fosfatidylinositol-3,4-bisfosfat) til PI(3,4,5)P₃ (fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfat) (38). PI(3,4,5)P₃ organiserer interaksjoner mellom PKB, PDK1 (PH-domain containing protein kinase) og muligens serin-473-kinase (38). PDK1 og serin-473-kinase fosforylerer og aktiverer PKB/Akt (38).

1.2.9 Oppgavens målsetting

Oppgavens målsetting er å identifisere signalveier i hMSC-TERT som stimuleres av forskjellige betennelsesmediatorer (PGE₂ og adenosin) og karakterisere deres effekt på wnt-signalveien. Innledningsvis er målet å teste og etablere molekylærbiologiske metoder som verktøy i dette arbeidet. Den ene av disse metodene er transiente transfeksjoner av hMSC-TERT med plasmider som fører til overuttrykk av selekterte mutanter og konstrukter av Raf-1. Den andre metoden består av målrettet genundertrykking av ulike signalproteiner ved hjelp av RNAi-teknikk. RNAi beskrives utfyllende i avsnitt 1.3.

1.2.10 Sammendrag og sammenføring av aktuelle signaltransduksjoner

I figur 1.2.5 på side 21 er alle de tidligere beskrevne signalveiene illustrert i forenklet form.

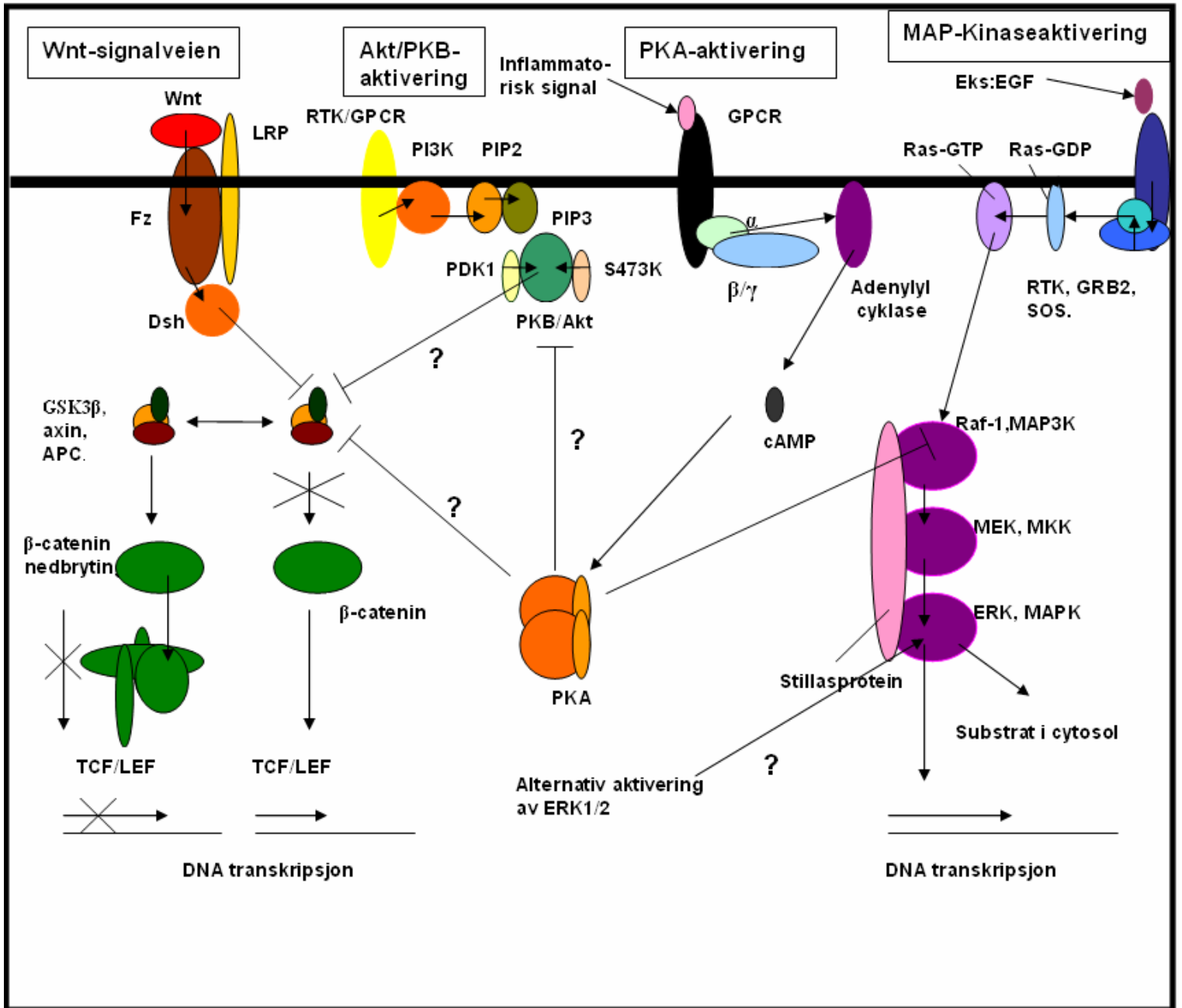
Wnt-signalveien er ført inn til venstre i figuren. Aktivert og funksjonelt Wnt/Fz/LRP-kompleks og Dsh inhiberer GSK3 β . Inhiberingen av GSK3 β fører til at den ikke kan bidra til å bryte ned β -catenin. β -catenin translokeres til kjernen og bidrar i transkripsjonsaktivering. Derimot vil ikke GSK3 β bli inhibert når Fz ikke er aktivert. GSK3 β bidrar til nedbrytingen av β -catenin. Følgelig vil ingen transkripsjonsaktivering forekomme.

Til høyre i figuren vises aktiveringen Ras-Raf-MEK-ERK signalveien og MAP-kinase signalveien. Resultatet av ERK1/2 aktivering/fosforylering kan føre enten til regulering av cytosoliske aktiviteter eller aktivering av transkripsjon. Signalet som er ført inn nederst i midten i figuren merket alternativ aktivering av ERK1/2, antyder en alternativ aktivering av ERK1/2 som vil bli beskrevet på side 66-67 i diskusjonen.

I midten til høyre i figuren vises PKA-aktiveringen. En GPCR aktiveres som resultat av en interaksjon med et inflammatorisk signal. Gas-enheten aktiverer adenylyl cyklase som syntetiserer cAMP. cAMP aktiverer PKA. De aktive katalytiske enhetene i PKA har flere funksjoner. En av de aktuelle funksjonene er fosforylering av Raf-1 i serin-43 i den humane T-cellelinjen Jurkat (39). Denne fosforyleringen er vist å inhibere Raf-1 (39) (se signal som markerer PKA-Raf-1 interaksjonen).

I midten til venstre i figuren illustreres Akt/PKB-aktiveringen etter aktivering av en GPCR eller RTK. Signalet som viser interaksjonen PKA-Akt/PKB antyder at PKA kanskje kan ha en positiv regulatorisk effekt på Akt/PKB. Innledende forsøk utført av andre medlemmer i vår forskningsgruppe har vist at denne aktiveringen kanskje forekommer (34).

De to signalene som viser interaksjon Akt/PKB-GSK3 β og PKA-GSK3 β antyder følgende: Det har blitt vist at fosforylering av Serin-9 i den N-terminale regionen i tidligere nevnte GSK3 β har ført til redusert GSK3 β -kinaseaktivitet (40). PKA og Akt1/PKB α er to kinaser som i teorien kan gjenkjenne og fosforylere denne typen fosforyleringssete som dette serinet og den omsluttende aminosyresekvensen utgjør (40). Dette antyder at GSK3 β kanskje kan bli negativt regulert av PKA og Akt1/PKB α (40).



Figur 1.2.5

1.3 RNA interferens og siRNA

RNA undertrykking er en regulatorisk mekanisme som begrenser transkripsjonsnivået enten ved transkripsjonsundertrykking (transcriptional gene silencing, TGS), eller sekvensspesifikk RNA-nedbryting etter transkripsjon betegnet som PTGS (post transcriptional gene silencing) (41). Begrepet RNA interferens (RNA interference, RNAi) er betegnelsen på sekvensspesifikk mRNA nedbrytingen i dyreriket (41).

Innledningsvis vil oppdagelsene av PTGS og RNAi bli beskrevet. Under dette arbeidet ble det på et tidlig tidspunkt sannsynliggjort at RNAi kunne benyttes som et verktøy i funksjonstapsanalyser (41). Parallelt med grunnforskning på en ny regulatorisk mekanisme, ble RNAi utviklet som en metode i målrettet reduksjon av proteiner og mRNA i en celle (41). I avsnitt 1.3.6 på side 29 blir RNAi beskrevet som metode i funksjonstapsanalyser.

1.3.1 De første RNAi oppdagelsene

PTGS ble først beskrevet i planter (42), og siden ble RNAi oppdaget i *C.elegans* som en respons på dobbelt-trådet RNA (double stranded RNA, dsRNA). I *C.elegans* resulterte RNAi til sekvensspesifikk nedbryting av mRNA som var homolog til sekvensene i dsRNA (43). Transfeksjon av mammalske celler med dsRNA (>38 basepar) førte i tidlige forsøk til problemer der resultatet var aktivering av interferonresponsen (44). Interferonresponsen oppstod i dette tilfellet som resultat av en respons på intracellulært ”virusliknende” RNA (44). Den påviste effekten var proteinsynteseinhibering og apoptose (44). Senere ble problemene ved anvendelse av RNAi i mammalske celler løst etter oppdagelsen av siRNA (small interfering RNA, ~21-25 nukleotider(nt) lang (45). Kortere siRNA er generert av lengre dsRNA. Intracellulære korte syntetiske siRNA-oligoer førte til inhibering av spesifikke målgener og ingen interferonrespons ble aktivert (45). I det videre arbeid har det blitt påvist diverse RNAi fenomener i nesten alle eukaryote organismer (41).

Den naturlige funksjonen til RNAi er under kontinuerlig forskning og mye tyder på at systemet beskytter genomet mot mobile genetiske elementer som virus og transposoner (41). I tillegg har det blitt vist at RNAi-fenomener har effekt på gen/genom-regulering og programmert utvikling av cellen (41). Det er vist at endogent transkriberte micro-RNA har en funksjon i reguleringen av heterokromatinisering av DNA (46-48). Micro-RNA funksjon og regulert heterokromatinisering av DNA blir beskrevet i avsnitt 1.3.5 side 26-. Denne reguleringen er et eksempel på at RNA-oligoer har en funksjon i naturlige RNAi-relaterte prosesser i eukaryote celler.

1.3.2 Identifisering av RNAi proteiner

I en naturlig RNAi prosess blir dsRNA i cytosol først brutt ned til siRNA (~21-25 nt) (41). Det syntetiserte siRNA er en homolog til mål-mRNA som sammen med et maskineri bestående av et sett av proteiner, bryter ned mål-mRNA (41). Proteinene som har en funksjon i RNAi, har en struktur og funksjon som viser store likheter i de fleste organismer (41). Arbeidet med å kartlegge RNAi proteinene ble utført ved biokjemiske tilnærminger og genetisk kartlegging der mutanter viser defekt i effektiv RNA interferens i forskjellige organismer (41). Forsøkene ble utført i soppen *N. crassa*, algen *C. reinhardtii*, nematoden *C. elegans* og planten *A. thaliana* (41). Disse forsøkene har ført til identifikasjon av diverse proteiner som er involvert i genundertrykking og påvisning av essensielle enzymer og faktorer (41). Før RNAi-prosessen blir beskrevet og illustrert, beskrives proteinene og proteinkompleksene som ble påvist å ha en funksjon i RNAi. Det er viktig å understreke at alle elementene som inngår i RNAi fortsatt ikke er beskrevet, og at hele mekanismen på ingen måte er redegjort fullstendig (41).

Amplifisering og systemisk overføring

RNA avhengig RNA polymerase (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) anvender siRNA eller dsRNA som templat for replikasjon og amplifisering av sekundært siRNA (41). Systemisk overføring er vist mellom celler og i tillegg er overføring til neste generasjon vist i *C.elegans* (41). Ingen av disse fenomenene er påvist i humane celler til

nå (41). Et ukjent siRNA -amplifiseringstrinn i humane celler kan likevel være av stor betydning for RNAi-funksjonen, og da uten hjelp av RdRp (41).

Dicer

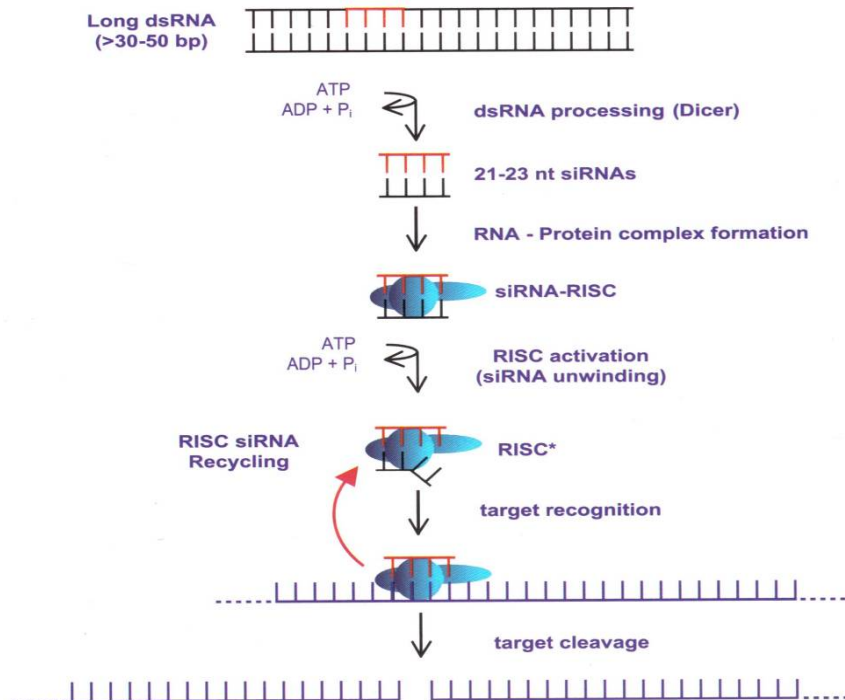
Dicer er et proteinkompleks som bryter ned dsRNA til siRNA (41). Dicer er bygd opp av to enheter av et RNase III-familiemedlem (kutter dsRNA til siRNA), et helikase domene (tvinner opp RNA), et dsRNA bindende domene og vist i *D. melanogaster* et ATP bindende domene (41).

RISC (RNA induced silencing complex)

RISC er ansvarlig for sekvensspesifikk nukleaseaktivitet og nedbryting av mRNA (41). RISC er et kompleks bestående av det aktuelle siRNA i enkelttrådform og et Argonaut familie protein (41). I tillegg er det blitt identifisert flere RNA bindende proteiner og andre proteiner i RISC (f. eks:RNA helikase og ribosomale proteiner)(41).

Flere andre proteiner har blitt satt i sammenheng med fenomenet RNAi ved hjelp av den innledende kartleggingen. De fleste av disse proteinene har ikke foreløpig blitt tillagt en sikker funksjon i RNAi-maskineriet (41).

1.3.4 RNAi



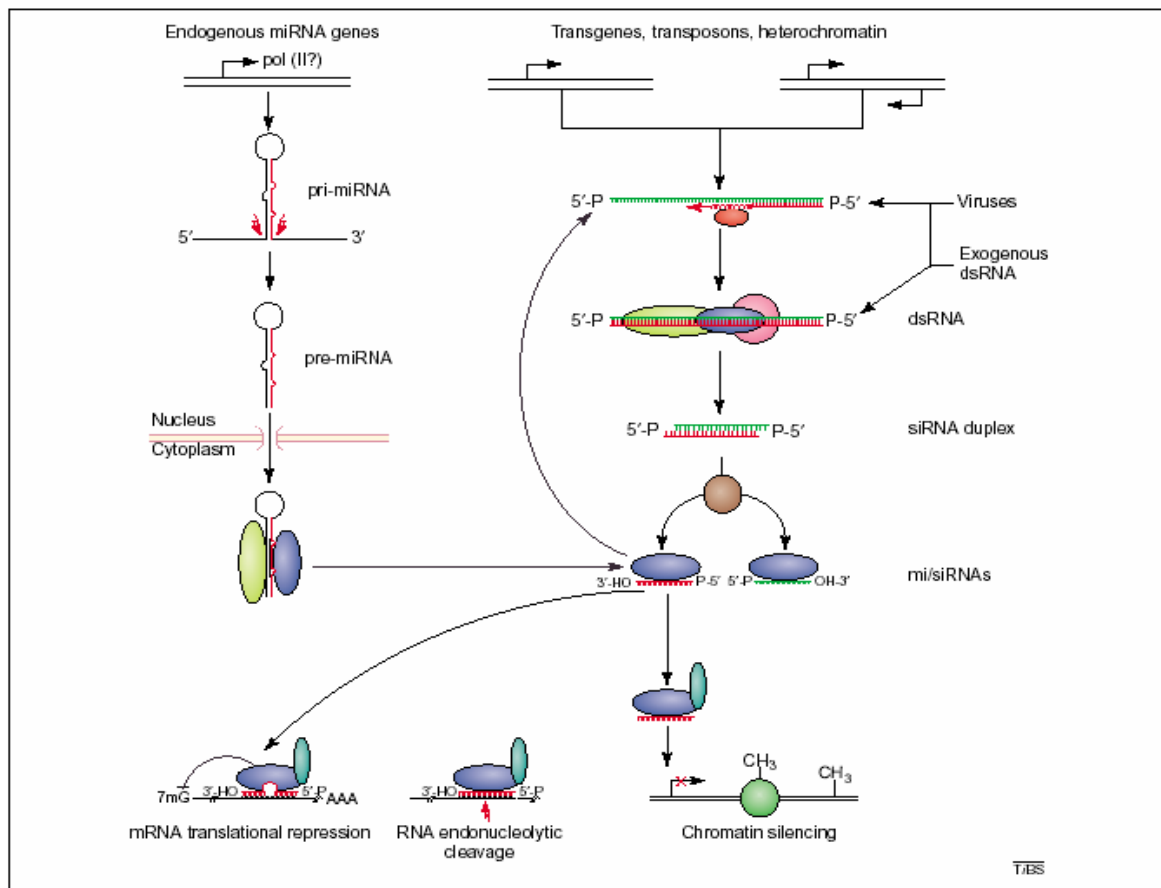
Figur 1.3.1 (49)

Figuren over illustrerer mRNA nedbryting under en RNAi prosess: RNA interferens innledes ved nedbryting av dsRNA til siRNA ved hjelp av dicer med ATP som energikilde. RISC-proteiner binder siRNA og tvinner opp ds-siRNA. Sense siRNA tråden blir spaltet av og RISC-proteinene danner et kompleks med antisense siRNA tråden. Det aktiverte RISC komplekset kan videre lokalisere, binde homologt og kløyve en komplementær sekvens i sense mål-mRNA. mRNA nedbrytingen fører følgelig til redusert proteinsyntese. Etter endt kløyving kan RISC gjenta syklusen og bryte ned flere mRNA molekyler (49).

1.3.5 RNAi relaterte prosesser i eukaryote celler

1.3.5.1 Micro-RNA (miRNA)

Under arbeid med genetisk kartlegging klarte en gruppe å påvise et ~22nt langt stykke ikke-kodende RNA transkribert fra genet lin-4 i *C.elegans* (50). lin-4 RNA viste seg å kunne begrense uttrykket av genet lin-14 ved å binde seg til lin-14 mRNA (50). Dette forsøket var det første eksempelet på en regulatorisk funksjon av endogent transkribert lite RNA (50). De små RNA-oligoene ble kalt micro-RNA (miRNA) og flere hundre har til nå blitt påvist (51). miRNA transkriberes fra både kodende og ikke kodende sekvenser i genomet (51). Fra de ikke kodende sekvensene transkriberes miRNA blant annet fra repeterte sekvenser som centromeren og telomerene (51).



Figur 1.3.2 Figuren viser miRNA-syntese og siRNA-syntese. Resultatet av syntesen kan føre til translasjonell represjon, RNAi eller heterokromatinisering av DNA (51).

En foreslått modell for miRNA syntese er at et ~75nt langt hårnål-liknende pri-miRNA transkriberes og prosesseres i nukleus til et kortere pre-miRNA. Ferdig prosessert pre-miRNA eksporteres til cytoplasma der allerede nevnte dicer genererer ferdige miRNA. Videre kan miRNA danne et kompleks tilsvarende RISC (51). I dette punktet har både miRNA og siRNA med sine forskjellige opphav endt opp med samme funksjon (51). Videre nedstrøms i systemet kan RISC-mi/siRNA komplekset utøve mRNA nedbryting eller eventuelt translasjonell represjon ved å binde delvis homologt mRNA (51). mi/siRNA-effekt på heterokromatinundertrykking beskrives i neste avsnitt. (Se figur 1.3.2 på forrige side)

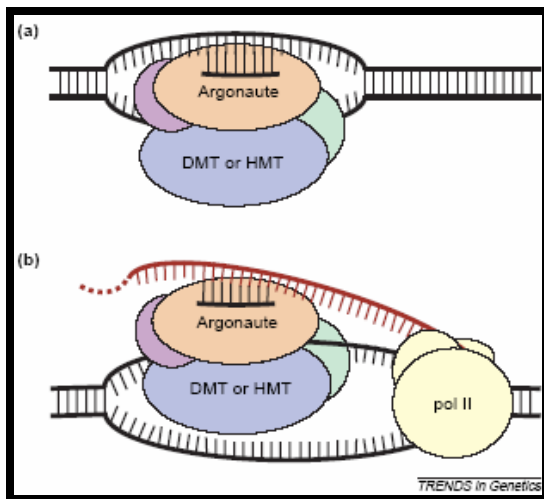
1.3.5.2 RNA-kontrollert transkripsjonell genundertrykking og heterokromatin dannelse

I planter er det vist at RNAi-syntese av siRNA kan føre til transkripsjonell undertrykking av målgener ved hjelp av DNA metylering og påfølgende heterokromatinisering (46). Heterokromatin er den mest kompakte formen en større eller mindre DNA-sekvens kan innta. DNA spoles rundt histoner som videre pakkes tett sammen. I de fleste sammenhenger fører DNA og histon metylering til inaktivering av de aktuelle DNA-sekvensene. Tilsvarende fører acetylering av DNA og histoner til aktivering. Tett pakket DNA gir dermed redusert tilgjengelighet til DNA og hemmet transkripsjon (46).

To separate forsøk antyder at siRNA bidrar til samme funksjon i humane celler. Det har blitt vist at syntetiske siRNA konstruert mot ett utvalgt gen førte til histon3 lysin9 metylering i det aktuelle locus. Som et resultat av metyleringene ble det påvist reduksjon i mål-mRNA og proteinet (47;48). Funksjonen bak siRNA-styrt DNA-metylering i humane celler er fortsatt svært usikker, men modeller kan foreslås med utgangspunkt i andre systemer. I gjær er siRNA inkorporert i et proteinkompleks analogt til RISC kalt RITS (RNA induced initiation of transcriptional gene silencing complex) (52). RITS innehar metyltransferaseaktivitet og er nødvendig for heterokromatindannelsen (52). Som vist i figur 1.3.3 på neste side er to modeller for sekvensspesifikk gjenkjennelse

mulig, enten via en siRNA-DNA interaksjon (a) eller en siRNA-RNA interaksjon (b) (52), (se i tillegg ”Chromatin silencing” i figur 1.3.2 side 26).

I gjæren *C. pombe* har det blitt vist ved mutantkartlegging at DNA-sekvenser i centromeren, telomerene og andre repeterte elementer syntetiserer dsRNA (41). Som resultat av denne syntesen kan dsRNA brytes ned til siRNA. Konsekvensen av siRNA-syntesen var dannelse av heterokromatin i DNA -sekvensene som var homologe med sekvensene i det opprinnelige transkriberte dsRNA (41). (Se i tillegg ”Chromatin silencing” figur 1.3.2 på side 26)



Figur 1.3.3 figuren viser to modeller for sekvensspesifikk gjenkjennelse, enten via en siRNA-DNA interaksjon (a) eller en siRNA-RNA interaksjon (b) (52).

1.3.6 Anvendelse av siRNA/RNAi

Ved siden av grunnforskning og forståelse av mi/siRNA-funksjoner, har oppdagelsen av mi/siRNA flere nåværende og fremtidige praktiske anvendelsesområder. RNAi har vist å være en veldig god metode i funksjons og fenotypeanalyse (41). Innen biomedisin har det blitt lansert nye bruksområder: I tillegg til muligheter innen genterapi har siRNA vist seg i forsøk å være effektiv i å hemme syntese og spredning av HIV, polio og hepatitt C i cellekulturer (41). Videre har siRNA behandling av kreftceller vist redusert ekspresjon av oncoproteiner (41).

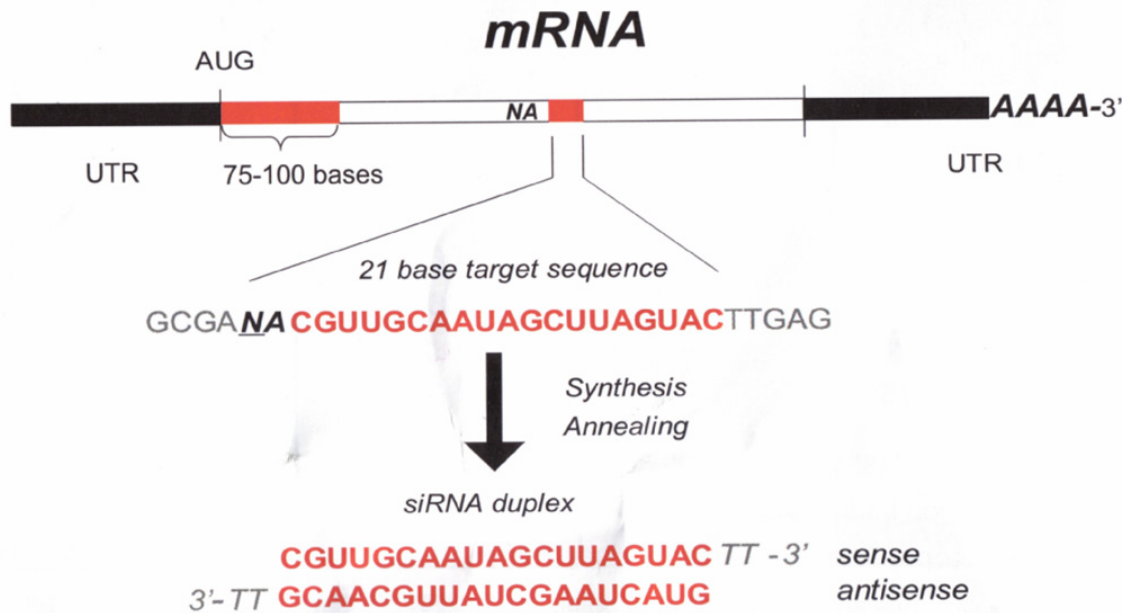
1.3.6.1 Syntese og praktisk anvendelse av syntetiske siRNA i funksjonstapsanalyser

Syntetiske siRNA sekvenser er i dag på vei til å bli ett konvensjonelt molekylærbiologisk verktøy. Ved å utnytte den naturlige RNAi prosessen i cellene kan en tilpasset syntetisk siRNA sekvens bli benyttet i målrettet reduksjon av utvalgte målproteiner (49). En siRNA-oligo er som tidligere beskrevet resultatet av nedbryting utført av dicer. De syntetiske siRNA sekvensene tar følgelig del i RNAi prosessen etter interaksjonen med RISC. I oppgaven ble det benyttet siRNA-oligoer med spesifikk homologi til utvalgte signalprotein-mRNA. Ønsket resultat var å redusere mengden av et signalprotein i så stor grad at dette influerer nedstrøms proteiner i signalveier. I det følgende vil det bli beskrevet kort hvordan syntetiske siRNA-sekvenser konstrueres.

1.3.6.2 Generelle kriterier for syntese av siRNA

Målet for en syntetisk siRNA oligo (2-3nt overheng i 3', 19-25bp) er best mulig mRNA degradering og da er det flere faktorer å ta hensyn til. Et viktig moment er å ikke konstruere en oligo som reagerer med andre gener enn målgenet (49). Egenskaper knyttet til RNA-molekylens bindingsaffiniteter har betydning i forhold til funksjonaliteten. Av bindingsaffinitetene har det blitt utviklet kriterier for en optimal syntetisk siRNA sekvens som har betydning for følgende interaksjoner: Mellom de to trådene i siRNA, mellom siRNA og RISC proteinene og mellom enkelttrådet-siRNA/RISC og mRNA (49).

Kriteriene ble i sin tid utviklet ved hjelp av computere som fikk programmert inn termodynamiske parametere i RNA-bindingsaffiniteter og resultater fra biokjemiske forsøk (49).



Figur 1.3.4 Figuren viser syntese av en siRNA-målsekvens (49).

Følgende kriterier kan benyttes ved konstruksjon av en syntetisk siRNA sekvens (49):

- 1) Identifiser og unngå regionen 75-100 bp nedstrøms for startkodon. Kan bli okkupert av translasjonelle eller regulatoriske proteiner.
- 2) I den gjenværende sekvensen søkes det etter sekvenser med AA(N19)TT (TT-overheng) der N er en hvilken som helst nukleotide.
- 3) Ved evaluering av GC-innhold skal en sekvens inneholde ideelt ~ 50 % (eventuelt 30-70 %)
- 4) Videre er andre nukleotidposisjoner i kodende tråd ønsket: A i posisjon 3, U i posisjon 10, ikke G i posisjon 13, og/eller A (ikke G/C) i posisjon 19.
- 5) Kandidat siRNA sammenliknes med andre kjente gener i f. eks BLASTn. Dette blir gjort for å unngå uspesifikke RNAi reaksjoner.

1.3.6.3 Viktige momenter i anvendelsen av syntetiske siRNA i funksjonstapsanalyser

Alle siRNA oligoene som ble benyttet i denne oppgaven er kjøpt fra Dharmacon RNA Technologies, USA. Spesielt for de kjøpte siRNA oligoene er at de er satt sammen i en komposisjon av fem forskjellige siRNA-sekvenser (SMARTpool) ved hjelp av SMARTselection algoritmen (49). Hensikten er at minst en, om ikke alle, skal utøve ønsket effekt på målgenet (49). Ved førstegangs kjøp blir ikke siRNA-sekvensene opplyst til kjøper. Knockout blir brukt som et begrep der et gen slås ut fullstendig i en celle/organisme. Under RNAi-forsøk kan en sjelden forvente fullstendig knockout av et spesifikt protein i en hel cellepopulasjon. I bestefall kan det forventes undertrykking tett opp mot 100 % (49). Derfor brukes begrepet knock down, slå ned.

Konsentrasjonen av siRNA som brukes under en transfeksjon skal ideelt ligge der maksimal knockdown oppnås (49). Samtidig skal den ikke være så høy at siRNA påvirker cellene i andre funksjoner enn kun slå ned ønsket protein/mRNA (49). Ett ekstremt eksempel på en slik funksjon er vist der 11bp komplementaritet kan utøve effekt (53) Sannsynligheten for slike reaksjoner øker der en konkurransesituasjon oppstår i mangel på korrekt mål mRNA i en celle (49). Toksiske effekter kan bli resultatet av for høye konsentrasjoner (49).

Vanlig tidspunkt for å detektere effekt av en siRNA transfeksjon er 24-48 timer for mRNA (f. eks: kvantitativ RT-PCR) og (48-) 72 timer for proteinnivå (f. eks: Western Blot analyse) (49). Ved knockdown av proteiner med lang halveringstid kan en velge å analysere cellene på et senere tidspunkt.

2 Materialer og metoder

2.1 Løsninger og reagenser

2.1.1 Løsninger anvendt ved agarose gelelektroforese

10 X DNA gel-prøvebuffer: 0,25 % bromfenolblått, 0,25 % xylen cyanol FF (Begge fra Sigma Chemical Co., USA) og 39 % glyserol (Norsk Medisinaldepot) i vann.

TAE-buffer: 0,04 M Trizma base og 1mM EDTA (Begge fra Sigma Chemical Co.)

Agarosegel: 1 % (w/v) agarose (Gibco, Invitrogen Co., Storbritannia) og 0,001 % (w/v) etidiumbromid (Sigma Chemical Co.) i TAE-buffer.

2.1.2 Løsninger anvendt ved gelelektroforese og westernblotting

2 X SDS-prøvebuffer: 4 % (w/v) SDS, 0,125 M Tris-HCl pH 6,7, 2 % (v/v) β -mercaptoetanol, ~0,03 mM bromfenolblått (alle fra Sigma Chemical Co.) og 20 % (v/v) glyserol (Norsk Medisinaldepot), pH 6,8.

SDS-PAGE gelelektroforesebuffer: 0,025 M Trizma base, 0,192 M glysin (Sigma Chemical Co.) og 0,1 % SDS. pH justeres til 8,3.

Protein overføringsbuffer: 25 mM Trizma base pH 10, 192 mM glysin og 20 % (v/v) metanol (Merck, Tyskland).

Vaskeløsning/Trisbufret saltvann (TBS): 20mM Tris-HCl pH 7,6, 0,9 % (w/v) NaCl og 0,1 % (v/v) Tween 20 (Polyoksyetylen sorbitan monolaurat) (Sigma Chemical Co.)

Masteroppgave – Jo Waaler

Tørrmelkblokkeringsløsning: D-PBS (se 2.1.3) med 5 % (w/v) Molico fettfri tørrmelk (NESTLÉ Sveits og Norge) og 0,1 % Tween 20.

BSA-blokkeringsløsning: Vaskeløsning med 5 % (w/v) BSA (Bovint serum albumin) (Bio-Rad Laboratories, USA).

2.1.3 Andre løsninger

Lyseringsbuffer: 10mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl (Prolabo, Merck), 1 mM EDTA, 1 % (v/v) NP-40 (Nonidet P-40 fra Calbiochem-Novabiochem Co., USA), 1mM Na₃VO₄ (Sigma Chemical Co.), 50 mM NaF (Merck) og 10 µg/mL hver av leupeptin, antipain, pepstatin A og chymostatin (alle fra Sigma Chemical Co).

D-PBS: (Dulbeccos phosphate buffered saline), fysiologisk fosfatbufret saltvann. 0,9 % NaCl og 10mM natriumfosfat. (Gibco, Invitrogen co. Storbritannia)

Trypsinløsning: 0,25 % (w/v) trypsin i D-PBS (fra PAA Laboratories, Østerrike)

2.1.4 Medier

RPMI 1640 (+L-glutamin) med 10 % (v/v) inaktivert føtalt kalveserum (Begge Gibco), 1 % (v/v) natriumpyruvatløsning, 1 % (v/v) løsning med ikke-essensielle aminosyrer (Begge Invitrogen Co.), 50 µl/L 1 M monothioglyserol (Sigma Chemical Co) og 20 mg/L Garamycin ® (40mg/mL) (Schering-Plough, Belgia).

LB-medium: 10 g/L Trypton Pepton, 5 g/L gjær ekstrakt (Begge fra Difco, Benton Dickinson, USA), 170 mM NaCl, 1 mM NaOH (Merck). Autoklaveres før bruk.

2.1.5 Antistoffer anvendt ved westernanalyse

Primære antistoffer

anti-Akt1: (PH domene), polyklonalt kanin IgG (Upstate Biotechnology, USA)

anti-Raf-1: polyklonalt kanin IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA)

anti-PKA α : mus IgG_{2b} (BD Transduction LaboratoriesTM, USA)

anti-fosfoGSK3 β : (ser9), polyklonalt kanin IgG (Cell Signalling Technology, USA)

anti-fosfoERK1/2: (Thr202/Tyr204), mus IgG (Cell Signalling Technology, USA)

anti-fosfoAkt: (ser473), polyklonalt kanin IgG (Cell Signalling Technology, USA)

anti-aktin: (Ikke isoform spesifikk), polyklonalt kanin IgG (Sigma)

Sekundære antistoffer

Geit anti-kanin IgG (H+L)-HRP (horseradish peroxidase) (Southern Biotechnology Associates, inc. USA)

Geit anti-mus IgG (H+L)-HRP (Southern Biotechnology Associates, inc. USA)

Andre antistoffer

anti-RI α (PKA regulatorisk enhet I α), (klon 4D7) mus IgG, utviklet ved eget laboratorium.

2.1.6 siRNA og siRNA løsninger

HBS-TB (HEPES bufret saltvanns transfeksjons buffer): 20mM HEPES (N-[2-Hydroksyetyl]piperazin-N'-[2-etansvovelsyre])(Sigma Chemical Co.) og 150mM NaCl, pH 7,4. Løst i autoklavert og destillert vann.

DOTAP Liposomal Transfection Reagent: > 99 % (1 µg/µl)DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloksy) propyl]-N, N, N-trimetylammonium metylsulfat (Roche Diagnostics, Sveits).

siRNA buffer: 20 mM KCl, 6 mM HEPES-pH 7,5 og 0,2 mM MgCl₂ (Dharmacon RNA Technologies, USA). siRNA-sekvensene ble ikke vedlagt ved kjøp av konstrukter.

Raf-1 siRNA: siGENOME SMARTpool RAF1, 0,25 µg/µl i siRNA buffer (Dharmacon RNA Technologies).

PKA katalytisk enhet α siRNA (PKAc α siRNA): siGENOME SMARTpool PRKACA, 0,25 µg/µl i siRNA buffer (Dharmacon RNA Technologies). Konstruert med spesifisitet mot alle isoformer av PKAc α .

PKA katalytisk enhet β siRNA (PKAc β siRNA): siGENOME SMARTpool PRKACB, 0,25 µg/µl i siRNA buffer (Dharmacon RNA Technologies, USA). Konstruert med spesifisitet mot alle isoformer av PKAc β .

Akt1 siRNA: siGENOME SMARTpool AKT1, 0,25 µg/µl i siRNA buffer (Dharmacon RNA Technologies).

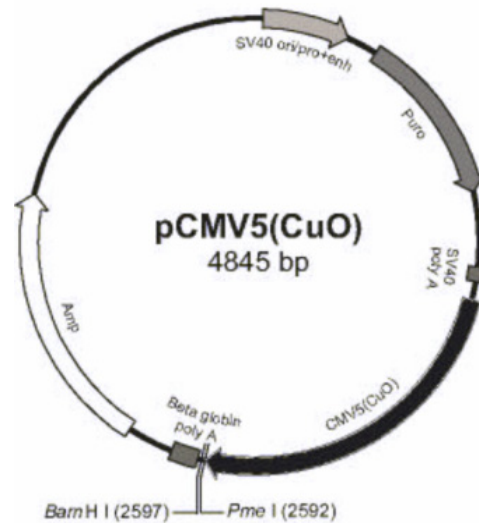
FITC-TNF α siRNA: 2 µg/µl i siRNA buffer, (gave fra Mouldy Sioud, Radiumhospitalet).

Akt1 siRNA: 0,5 µg/µl i siRNA buffer, konstruert mot sekvensen 5'-CCAGGACCAUGAGAAGCUU-3', (gave fra Mouldy Sioud, Radiumhospitalet).

2.2 Metoder

2.2.1 Plasmidkonstrukt

Som utgangspunkt for konstruksjon av vektorer brukt i oppgaven var plasmidet pCMV5 (Se under). Alle de ferdige konstruktene basert på pCMV5 var en gave fra Walther Kolch, Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow UK. Dette plasmidet inneholder den sterke promotoren CMV5(CuO) som skal gi høy transkripsjonsfrekvens. Det inneholder også genet for ampicillinresistens. Følgende gener i pCMV5-konstrukt ble benyttet i oppgaven: GFP (Grønt fluorescerende protein), Raf-1, Raf-1-S43A og en tom pCMV5-vektor. Raf-1-S43A er genet for Raf-1 med punktmutasjon i serin43. Som resultat av denne mutasjonen uttrykkes i stedet alanin i denne posisjonen.



Figur 2.2.1 Figuren viser en pCMV5(CuO) vektor.

2.2.2 Dyrking av transformerte *E.coli* i LB-kultur, og isolering og rensing av plasmid-DNA

Store erlenmeyerkolber med 500 mL LB-løsning ble autoklavert ved 121 °C og inokulert med aktuelle transformerte *E.coli*. 500 µL av en 100 µg/mL ampicilinløsning (sigma) ble tilsatt. Dette medfører seleksjon av plasmidtransformerte *E.coli* under veksten i kultur. Kolbene ble satt på risteinkubator over natt ved 37 °C. Dagen etter ble cellene høstet ved sentrifugering i sentrifugeringskolber.

Innledningsvis ble det benyttet en standard DNA maxi-prep protokoll hentet fra ved isolering og rensing av plasmidkonstruktene (54).

På et senere tidspunkt ble det benyttet kommersielt plasmid-preparasjons sett. Denne isoleringen og rensingen av plasmidene ble utført med bruk av Endofree® Plasmid Mega Kit fra Qiagen, Tyskland. Prosedyrer og løsninger er beskrevet i manualen tilhørende settet (55). Denne metoden skal resultere i høy renhetsgrad. Dette var en forutsetning for effektiv Amaxa elektroporeringsstransfeksjon, (beskrives senere i avsnitt 2.2.4).

2.2.3 Bestemmelse av plasmidrenhet og konsentrasjon

Plasmidløsningenes renhet ble testet ved å måle absorpsjon ved henholdsvis 260 nm og 280 nm i ett spektrofotometer. Forholdet Abs 260:Abs 280 (DNA konsentrasjonen: proteinkonsentrasjonen). skal i følge Amaxa være over 1,8 ved en elektroporering.

For å beregne konsentrasjonen og kvaliteten til plasmidene, ble de applisert og separert på en 1 % agarosegel ved 150 V i et elektroforesekar med TAE-buffer. 0,5 µL prøve ble løst i 8,5 µL destillert vann og 1 µL DNA-prøvebuffer. Etidium bromid bandt seg til DNA og ved UV-belysning av en ferdig separert gel ble ønsket plasmid-DNA visualisert som klare bånd. Lysstyrken i disse båndene ble sammenliknet med en standard med kjente konsentrasjoner. DNA-standard: Lambda DNA-*Hind* III Digest (New England Biolabs, USA). Ut ifra denne sammenlikningen kunne konsentrasjonen i prøvene anslås.

2.2.4 Elektroporering

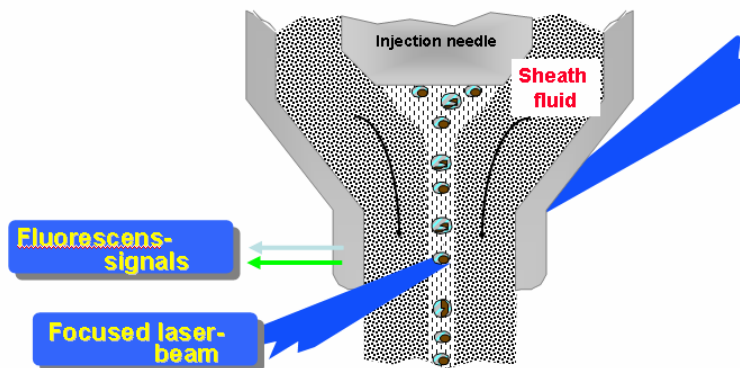
Elektroporering er en vanlig metode ved transfeksjon av celler. Ved elektroporering utsettes cellen for korte elektriske pulseringer som fører til små transiente porer eller brudd i cellemembranen. Gjennom disse åpningene kan i dette tilfellet plasmid -DNA transfekteres inn.

Innledningsvis ble hMSC-TERT elektroporert ved hjelp av Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, USA). Et tilpasset antall celler ($0,5-1 \cdot 10^6$) ble vasket tre ganger i fullstendig RPMI 1640 medium. Cellene ble resuspendert i 400 μ l medium, tilsatt 5 μ g plasmid DNA og overført til en ren kyvette. Kyvetten ble pulset ved 240 V. Cellene ble siden overført fra kyvetten til en klargjort kulturflaske og inkubert over natt i ett varmeskap ved 37 °C og 5 % CO₂.

På et senere tidspunkt ble et annet elektroporeringsystem benyttet. Amaxa Biosystems (USA) har utviklet en optimalisert elektroporeringsmetode for mesenkymale stamceller som skal føre til høy transfeksjonsfrekvens og lite celledød. De legger frem liten eller ingen informasjon om hvordan systemet fungerer eller hva løsningene i settet inneholder. Elektroporeringen blir kalt nucleofection: $0,6 \cdot 10^6$ celler ble løst i 100 μ l romtemperert human MSC Nucleofector™-løsning og blandet med 2 μ g plasmid-DNA. Denne blandingen ble overført til en kyvette og satt i amaxa-elektroporeringsmaskinen. Programmet for høy celleoverlevelse (C-17) ble valgt og cellene ble elektroporert. Løsningen med de elektroporerte cellene ble overført til tjuetjue-brønnersplater med 500 μ l fullstendig RPMI 1640 medium og inkubert over natt i ett varmeskap med 37 °C og 5 % CO₂.

2.2.5 Væskestrømscytometri

Væskestrømscytometri er en automatisert metode som måler egenskaper til enkeltceller i suspensjon (56). Flere parametere kan måles samtidig med stor statistisk sikkerhet. Denne metoden baserer seg på enkeltceller suspendert i en saltholdig væske som passerer gjennom en dyse. Cellene føres videre forbi en lys- eller laserkilde med høy hastighet der målingene gjennomføres. Den vanligste metoden er å merke diverse cellekomponenter med et fluorescerende fargestoff som binder kvantitativt direkte til DNA, RNA, proteiner eller indirekte via et spesifikt antistoff. Disse antistoffene kan eksempelvis binde molekyler i kjernen, cytoplasma eller på celleoverflaten. Når eksitasjonslyset treffer den fluorescensmerkede cellen vil fluorokromet emittere en lypuls med en bølglengde som er noe lengre enn eksitasjonsbølglengden. Denne lypulsen vil være proporsjonal med mengden av fluorescerende komponenter i cellen. Denne lypulsen blir fanget opp av et filter- og linsesystem som leder til en detektor. Denne detektoren overfører dataene til en lagrings- og prosessorenhet. Dataen kan siden settes opp og presenteres med statistiske metoder i ett dataprogram. I tillegg til fluorescens kan lysspredningen måles. Spredningen i forlengelsesretningen til eksitasjonslyset (lavvinkel lysspredning) reflekterer en celles størrelse. Spredning til siden (høyvinkel spredning) sier noe om cellenes indre struktur og granulitet.



Figur 2.2.2 Figuren viser prinsipper ved væskestrømscytometri (57).

Væskestrømscytometri ble benyttet som et verktøy ved flere tilfeller i oppgaven. Apparatet som ble brukt var en FACSCalibur som var koblet opp mot CellQuest™

software program, (begge fra Becton Dickinson, USA). I hovedsak ble metoden benyttet til å bestemme transfeksjonsfrekvenser. Antall celler i en populasjon transfektert med pCMV5-GFP ble målt. Dette ble utført på grunnlag av cellenes varierende grad av GFP-uttrykk. På samme måte kunne transfeksjonsfrekvensen til celler som ble transfektert med FITC-merket siRNA bestemmes. (Transfeksjon med FITC-merket siRNA beskrives senere). Testing av cellenes viabilitet ble i noen tilfeller utført ved propidiumjodidfarging, (1 mg/mL propidiumjodid i vann, Sigma Chemical Co.). Propidiumjodid penetrerer cellemembranene og binder DNA i døde celler. Døde celler ble kvantifisert med hensyn til bølgelengder ved rødt lys.

2.2.6 Stimulering og lysering av hMSC-TERT

Følgende substanser ble benyttet ved stimuleringer: 1mM PGE₂ i etanol og 1mM adenosin løst i vann (Begge fra Sigma Chemical Co.) I ett eller flere eppendorfrør ble et tilpasset antall celler (vanligvis $0,5 \cdot 10^6$ celler) suspendert i 500 µl fullstendig RPMI 1640 medium. Ved en adenosinstimulering ble det tilsatt 15 µl 1mM adenosin for hver stimulering. Dette ga en sluttkonsentrasjon på 30 µM. Ved en PGE₂-stimulering ble det tilsatt 25 µl 1mM PGE₂. Dette ga en sluttkonsentrasjon på 50 µM. Rørene ble vortexet lett og satt på varmebad med 37 °C i 30 minutter. Ved endt inkubasjon ble stimuleringen avsluttet ved tilsetning av 500 µl iskald PBS.

Lysering: Cellene ble videre spunnet ned i 1 minutt på bordsentrifuge. Supernatanten ble sugd av. Til slutt ble cellene tilsatt tilpasset volum lysisbuffer (eksempelvis 100 µl/ 10^6 celler) og satt på is i 30 minutter. Etter endt lysering ble cellekjerner og cellemembranrester spunnet ned i 15 minutter ved 4 °C i høy hastighet. Supernatanten ble overført til ett nytt rør. Dette røret ble tilsatt det samme volumet av 2 X SDS-prøvebuffer som volumet av den tidligere tilsatte lysisbufferen. Rørene ble kokt i 5 minutter på en varmeblokk med 85 °C.

2.2.7 SDS-PAGE gelelektroforese

Cellelysater eller proteiner kokt i 2 X SDS-prøvebuffer ble separert ved 20 mA per gel i en SDS-gelelektroforese. Det ble benyttet Bio-Rad elektroforesesystem med en 4 % (akrylamid) konsentrerende gel og 10 % eller eventuelt en 15 % separerende gel. Gelene ble laget som beskrevet i en standard laemmliprotokoll (58). 20 µl prøve med lik proteinkonsentrasjon ble applisert per brønn og 5 µl av en standardproteinløsning i en brønn, (Protein standard: Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color, Bio-Rad laboratories, USA). Etter endt elektroforese kunne gelene enten sølvfarges (se avsnitt 2.2.11) for å visualisere de separerte båndene, eller brukes videre i Westernanalyse.

2.2.8 Western blotting

Western er en svært følsom analysemetode som benytter seg av separasjon av proteiner i gelelektroforese med hensyn til molekylvekt etterfulgt av identifisering av de ønskede proteinene ved hjelp av spesifikke antistoffer. Etter gelelektroforesen ble proteinene overført til en PVDF-membran ved hjelp av en strømstyrke på 65 mA per gel i en time (se figur på neste side). (PVDF, polyvinyliden difluorid. Amersham Biosciences, UK) Det ble benyttet en halvtørr Westernblotting metode. Etter endt proteinoverføring ble membranen inkubert i en time med tørrmelkblokkeringsløsning eller eventuelt BSA-blokkeringsløsning. Blokkeringen hindrer uspesifikk binding av antistoffer til membranen. Etter endt blokkering ble tilpasset konsentrasjon av monoklonalt eller polyklonalt antistoff løst i en tilpasset inkubasjonsløsning. Disse løsningene kunne være enten tørrmelkblokkeringsløsning, BSA-blokkeringsløsning eller eventuelt vaskeløsning. Membranen ble lagt i et kar med antistoffløsningen og inkubert over natt på en vippeinkubator.

Antistoffene som ble benyttet i oppgaven er skrevet opp i avsnitt 2.1.5. Antistoffene som har prefikset fosfo- er fosfospesifikke antistoffer. Disse antistoffene binder målproteinet kun hvis proteinet er fosforylert. Dette domenet kan bli fosforylert av en oppstrøms kinase. De fosfospesifikke antistoffene brukes til å detektere aktiverte eller inhiberte

signalproteiner. De andre antistoffene har spesifisitet mot ordinære aminosyresekvenser i de aktuelle proteinene.

Dagen etter ble membranen vasket 5-6 ganger i vaskeløsning i løpet av ca 1 time. Membranen ble så inkubert i en polyklonal sekundær antistoffløsning i en time i romtemperatur på vippeinkubator (tilpasset løsning på samme måte som for primært antistoff). Det sekundære antistoffet binder både tung- og lettkjede i det primære antistoffet. Enzymet HRP (horse radish peroxidase) er konjugert med antistoffet og reaksjonen med tilsatt substrat resulterer i ett lyssignal. I tilfeller der det primære antistoffet var utviklet i mus ble det benyttet sekundært antistoff (eks fra geit) som bandt antistoff fra mus. Tilsvarende oppsett ble benyttet ved anvendelse av primært kaninantistoff. Videre ble membranen igjen vasket 5-6 ganger i vaskeløsning i løpet av ca 1 time. Membranen ble i neste runde inkubert med i ca 5 minutter med ca 5 mL HRP-substrat, (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, USA). Til slutt ble lyssignalet fra membranen eksponert mot fotofilm og fremkalt.

2.2.9 DOTAP siRNA transfeksjon

DOTAP er et kationisk lipid som spontant danner liposomer i vandig løsning. I forhold til mange andre tilsvarende liposom-medierte transfeksjonsreagenser har DOTAP vist seg å være lite toksisk og godt egnet for transfeksjon (ev. lipofeksjon). Ved å blande siRNA og DOTAP dannes det spontant stabile komplekser. Disse globulære kompleksene kan siden fusjonere med cellemembranen og frigjøre siRNA på innsiden.

I de innledende forsøkene var ønsket å optimalisere en transfeksjon med hensyn til høyest mulig frekvens og lavest mulig celledød. Dette ble gjort ved å tilpasse mengde tilsatt DOTAP, celleantall og siRNA konsentrasjon. Under dette arbeidet ble det benyttet en syntetisk TNF α spesifikk siRNA-oligo kovalent bundet til FITC i sense 3'. FITC (Fluorescein isothiocyanat) er et lite organisk autofluorescerende molekyl som emitterer grønt lys. Transfeksjonsfrekvensen og viabiliteten (propidiumjodidfarging) ble målt ved hjelp av væskestrømscytometri.

De innledende forsøkene førte til en optimalisert metode for siRNA transfeksjon av hMSC-TERT med DOTAP basert på en protokoll fra Roche Diagnostics:

~24 timer før en transfeksjon ble ~50 000 celler sådd ut i en 24-brønnersplate med 500 µl fullstendig RPMI 1640 medium og inkubert over natt i ett varmeskap med 37 °C og 5 % CO₂. Cellene skulle være adherente, friske og i logaritmisk vekst ved transfeksjon. Alt arbeid ble utført med hansker, i sterilbenk og med RNasefritt utstyr. Dagen etter ble det i ett autoklavert eppendorfrør tilsatt 1 µg siRNA blandet med 5 µl HBS-TB. I ett rør nummer to ble 20 µl DOTAP blandet med 60 µl HBS-TB. Disse to rørene ble slått sammen til ett og inkubert i 30-60 minutter i romtemperatur. Cellene ble vasket 2-3 ganger med PBS for å sørge for at kun levende og adherente celler ble transfektert. DOTAP-siRNA kompleksene i HBS-TB ble overført til eppendorfrør med 500 µl fullstendig RPMI 1640 medium uten garamycin. Denne løsningen ble pipettert over cellene. Skålen ble inkubert i 72 timer i ett varmeskap med 37 °C og 5 % CO₂.

Etter 72 timer ble cellene vasket 2-3 ganger med PBS for å fjerne alle døde celler. Hver brønn ble tilsatt ~100 µl trypsinløsning som førte til at de adherente cellene løsnet fra plasten. Denne cellesuspensjonen ble tilsatt ~500 µl RPMI 1640 medium og overført til ett eppendorfrør. Cellene ble spunnet ned i 1 minutt ved moderat hastighet. Supernatanten ble sugd av før cellene igjen ble resuspendert i 500 µl RPMI 1640 medium. Det totale celleantallet ble beregnet etter telling i en celledellemaskin. Videre ble cellene enten lysert for westernanalyse eller stimulert (se avsnitt 2.2.6).

Ved videre arbeid var ønsket å kun benytte levende celler, derfor ble ca 500 av cellene viabilitetstestet med en løsning med acridin oransje og etidiumbromid. (0,3 mg/ml acridin oransje og 0,001 % (w/V) etidiumbromid, løst i vann. Begge Sigma Chemical Co.). 20 µl cellesuspensjon ble blandet med 20 µl av denne løsningen. Ved fluorescensmikroskopering (Leitz Wetzlar, Tyskland) ble antall levende (grønn fluorescens) og døde (rød fluorescens) celler talt opp. Ut ifra disse tallene ble eventuelt en prosentvis fordeling beregnet.

2.2.10 Immunpresipitasjon av PKA og isolering av katalytiske enheter.

Denne metoden ble utformet med utgangspunkt i en prosedyre mottatt fra forsker Bjørn Skålhegg ved institutt for ernæringsforskning. Immunpresipitasjon er en metode som benytter seg av spesifikke antistoffer som binder målproteiner i løsning eller et cellelysatsat. Antistoffene blir videre bundet til sepharosekuler konjugert med protein A og/eller G. Dette er proteiner som binder sterkt til Fc-delen i IgG. Sepharosekulene kunne bli separert fra løsningen ved moderat sentrifugering. PKA består som tidligere nevnt i avsnitt 1.2.7 side 17 av en regulatorisk dimer (R) og to katalytiske enheter (C). Alle domenene i holoenzymet kan forekomme som isoformer og underisoformer av disse. Målet var å isolere de katalytiske enhetene i PKA for å fastslå hvilke isoformer som ble uttrykt i hMSC-TERT. De katalytiske enhetene ble analysert i western, sølvfarget og i ett tilfelle analysert ved bruk av massespektrometri. Under innledende forsøk ble metoden tilpasset med hensyn til konsentrasjon og volum av cellelysatsat, antistoffkonsentrasjon, mengde tilsatt protein A/G-sepharosekuler og inkubasjonstider.

Ett stort antall celler (Eks $50-400 \cdot 10^6$) ble lysert i lysisbuffer i forholdet ca $6 \cdot 10^6$ per 100 μ l lysisbuffer. Lyseringen foregikk på is i ca 30 minutter. Etter endt lysering ble cellekjerner og cellemembranrester spunnet ned i 15 minutter ved 4 °C i høy hastighet. Supernatanten ble overført til ett nytt rør. Røret ble tilsatt 1 μ g av det monoklonale antistoffet anti-RI α for hver million lyserte celler. Dette antistoffet binder spesifikt til den regulatoriske enheten RI α . Røret ble inkubert med bevegelse i ca 72 timer ved 4 °C, for å sørge for at så mye som mulig av antistoffet skulle binde seg til målproteinet. Videre ble røret tilsatt en sepharosekuleløsning med protein A (50 % (V/V) i D-PBS) og en sepharosekuleløsning med protein G. (50 % (V/V) i D-PBS, begge fra Amersham Pharmacia Biotech AB, Sverige). 100 μ l av hver løsning ble tilsatt per $50 \cdot 10^6$ celler. Røret ble inkubert i 1-2 timer under bevegelse ved 4 °C. Kulene ble spunnet ned og supernatanten ble tatt ut som kontroll. Kulene ble vasket 5-6 ganger med 500 μ l D-PBS. Dette trinnet fjernet proteiner som bandt uspesifikt til kulene og antistoffet. Cyklisk AMP fører som tidligere beskrevet til dissosiasjon av de katalytiske enhetene. Denne egenskapen ble utnyttet til å isolere C. De katalytiske enhetene ble eluert med 1mM

cAMP-løsning (8-CPT, Sigma) i D-PBS. Rørene ble sentrifugert og supernatanten ble overført til ett nytt rør. Prøven ble oppkonsentrert ved inndamping på varmeblokk ved 85 °C. Til slutt ble et tilpasset volum 2 X SDS-prøvebuffer tilsatt og prøven ble kokt i fem minutter ved 85 °C. Etter endt isolering ble prøvene separert ved gelelektroforese med 15 % akrylamid for å gi en god separasjon.

2.2.11 Sølvfarging av polyakrylamidgeler

For å kunne visualisere de separerte båndene etter en gelelektroforese ble det benyttet en svært følsom sølvfargingsmetode utviklet av Bio-Rad med tilhørende reagenser (Bio-Rad Silver stain). Løsningen er beskrevet i den vedlagte manualen (59). Proteinene i gelen ble først fiksert med metanol fikseringsløsning og videre med en etanol fikseringsløsning. Begge ble satt på risteinkubator i 15 minutter. Gelen ble videre inkubert i fem minutter med en oksidasjonsløsning. Etter denne behandlingen ble gelen vasket godt i destillert vann før den ble inkubert med sølvløsning i 20 minutter. Etter en ett minutt lang vask i destillert vann ble fremkallingsløsningen tilsatt. Gelen ble fremkalt frem til båndene var av ønsket styrke. Reaksjonen ble avsluttet med stoppløsning.

3 Resultater

Arbeidet bestod av fire hoveddeler:

- 1) Elektroporering og transiente transfeksjoner av hMSC-TERT med plasmider som uttrykker Raf-1 og mutanter av Raf-1
- 2) Etablering av en siRNA transfeksjonsmetode tilpasset hMSC-TERT
- 3) Adenosin- og PGE2 stimulering av GPCR i siRNA- transfekterte hMSC-TERT
- 4) Isolering og analyse av isoform av PKA katalytisk enhet.

3.1 Etablering av molekylærbiologiske verktøy til studier av signalveier i hMSC-TERT

I forskning på signalveier i cellelinjer er det i hovedsak tre molekylærbiologiske verktøy som blir benyttet. De tre verktøyene er proteinuttrykkende plasmider, RNAi og retrovirale vektorer som uttrykker proteiner eller siRNA. Hensikten var å undersøke hvilke av disse metodene som egnet seg til å påvirke signalisering i hMSC-TERT.

3.1.1 Elektroporering

Innledningsvis ble det undersøkt om elektroporering var en anvendelig metode ved transfeksjon av plasmider hMSC-TERT.

3.1.1.1 Elektroporering med Bio-Rad Gene Pulser

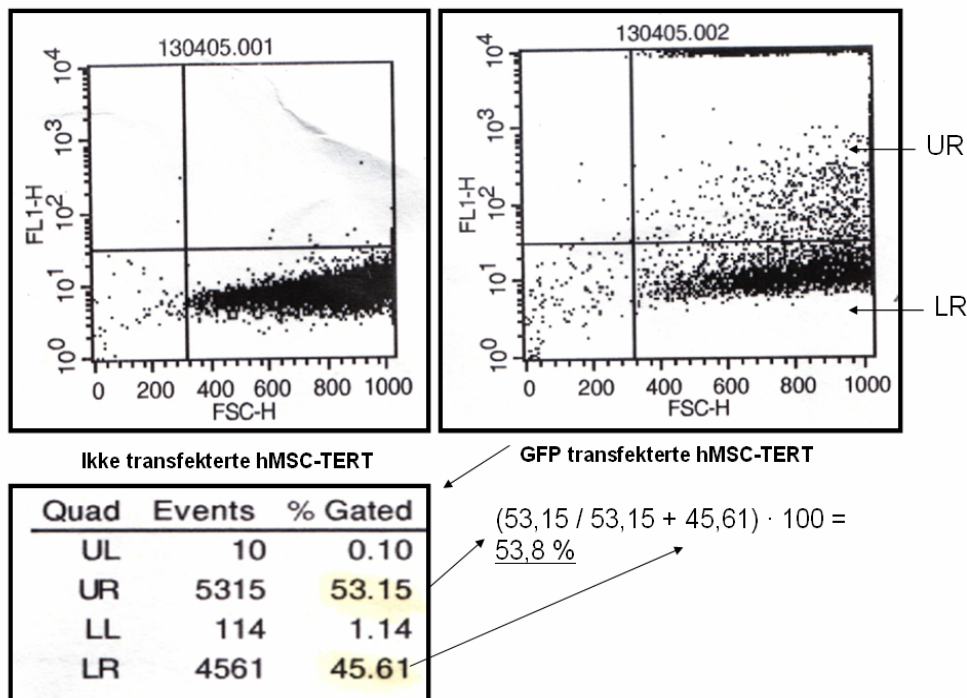
Elektroporering ved bruk av Bio-Rad Gene Pulser har tidligere ført til tilfredsstillende transfeksjonsfrekvenser i vår gruppe ved anvendelse av en protokoll tilpasset de humane T-cellelinjene Jurkat, Jurkat TAG og 293T. Dette var utgangspunktet for å prøve det samme i hMSC-TERT. hMSC-TERT ble elektroporert med pCMV5- GFP i henhold til protokoll (se avsnitt 2.2.4 side 38).

Etter elektroporering ble det påvist GFP-uttrykk i ~ 8 % av cellene ved væskestrømscytometrianalyse.

3.1.1.2 ”Amaza Nucleofection”

Amaza Biosystems har utviklet en metode for elektroporering tilpasset mesenkymale stamceller kalt ”nucleofection”. Selskapet reklamerer med høye transfeksjonsfrekvenser og lite celledød etter elektroporering i andre cellelinjer. Denne metoden ble benyttet for å forsøke og å bedre transfeksjonsfrekvensen. hMSC-TERT ble elektroporert i henhold til protokoll (se avsnitt 2.2.4 side 38) med pCMV5-konstrukter som uttrykker GFP, Raf-1, Raf-1-S43A (mutant av Raf-1) og en tom pCMV5-vektor.

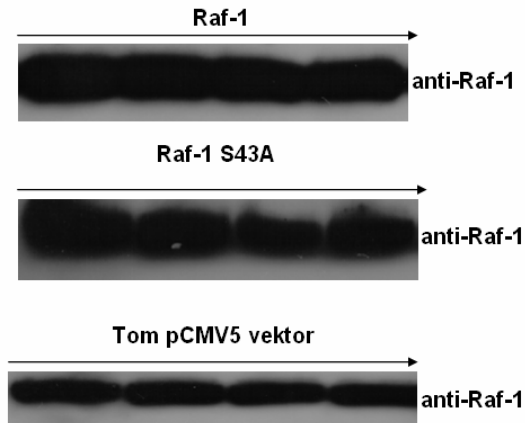
pCMV5-GFP-transfeksjonsfrekvensen ble beregnet ved hjelp av væskestrømscytometri.



Figur 3.1.1.1

Som vist i figur 3.1.1.1 ble GFP-transfeksjonsfrekvensen målt til 53,8 %.

Raf-1 og Raf-1 S43A plasmid transferte celler ble Westernanalysert.



Figur 3.1.1.2

Som vist i figur 3.1.1.2 ble det detektert overuttrykk av Raf-S43A og Raf-1 sammenliknet med kontrollen tom pCMV5 vektor.

Resultatene viste at Amaxa "nucleofection" var et verktøy som kunne anvendes til transiente transfeksjoner av hMSC-TERT.

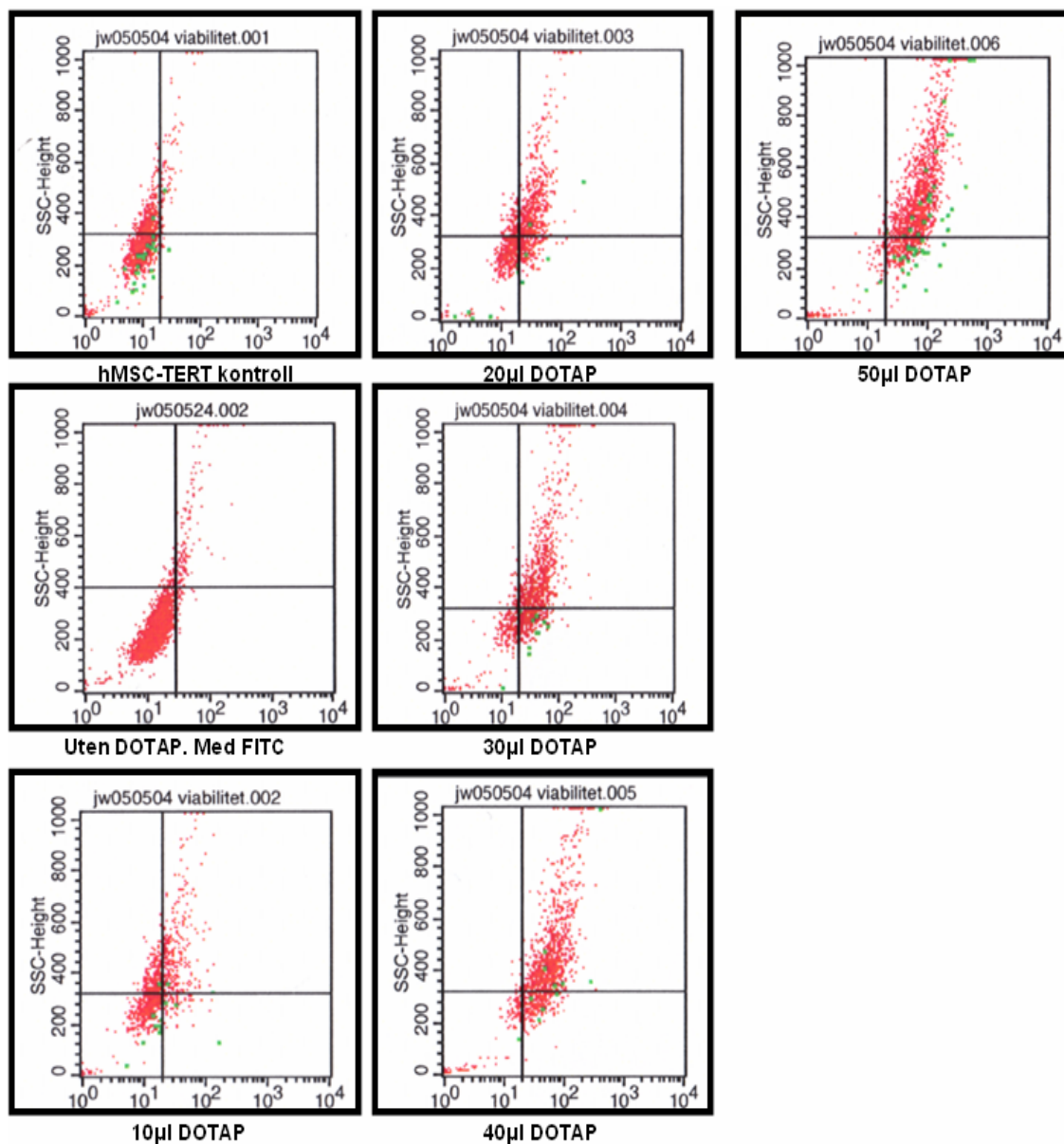
Tilpasningsforsøk der celleantallet og plasmidkonsentrasjonen ble endret, førte kun til lavere transfeksjonsfrekvenser. Celleantallet som ble transfektert kunne derfor ikke økes. I fremtidige forsøk var det nødvendig å anvende et totalt høyt antall celler. Hver elektroporering resulterte i $\sim 0,5 \cdot 10^6$ levende celler der ca halvparten var transfektert.

3.1.2 Etablering av en siRNA transfeksjonsmetode tilpasset hMSC-TERT

RNAi som følge av siRNA transfeksjon har vist seg å være en effektiv metode i undertrykking av genekspressjon i andre celletyper. RNAi har derfor i utgangspunktet forutsetning til å være et godt verktøy i funksjonstapsanalyser av signaltransduksjon i signalveier. Hensikten var å undersøke om siRNA transfeksjon var en metode som kunne anvendes til å spesifikt redusere genekspressjon i hMSC-TERT.

3.1.2.1 Transfeksjon av hMSC-TERT med et FITC-koblet siRNA ved hjelp av det kationiske lipidet DOTAP

Innledningsvis ble det undersøkt om hMSC-TERT lot seg transfektere med et FITC-koblet TNF α (tumor necrose faktor α) siRNA ved hjelp av det kationiske lipidet DOTAP. I det følgende vil denne oligoen bli betegnet som FITC siRNA. Målet var å undersøke om hMSC-TERT lot seg transfektere. Samtidig var målet å optimalisere transfeksjonsfrekvensen og viabiliteten som funksjon av volum tilsatt DOTAP/ mL vekstmedium. Det ble sådd ut ca 10^5 celler i 24-brønnersplater dagen før transfeksjon. Det ble tilsatt 1 μ g FITC siRNA/mL RPMI 1640 vekstmedium. FITC- og propidiumjodid fluorescensen ble målt ved væskestrømscytometrianalyse etter 24 timers vekst for å beregne henholdsvis transfeksjonsfrekvensen og viabiliteten. Kontrollene som ble benyttet var ubehandlede celler, og celler tilsatt kun FITC siRNA og ingen tilsatt DOTAP. Se figur 3.1.2.1.1 på neste side for resultat.



Figur 3.1.2.1.1

Resultatene er vist i figur 3.1.2.1.1. Kontrollpopulasjonene med ubehandlede celler og FITC-tilsatte celler (uten DOTAP) plasserer seg til venstre for diagrammenes populasjonsseparerende kvadrant. Hvert punkt i diagrammene representerer en celle. Økt FITC-fluorescens antyder økt transfeksjon. Punktene og punktpopulasjonene viser en høyreforskyvning som en funksjon av økt FITC-fluorescens og transfeksjon. De FITC-siRNA transfekterte cellene viser økende transfeksjonsfrekvens og høyreforskyvning ved høyere DOTAP konsentrasjon i serien 10-, 20-, 30-, 40- og 50 µl DOTAP tilsatt per 1mL

RPMI 1640 medium. Høyreforskyvningen er tilnærmet total og lik i prøvene tilsatt 40 og 50 μ l DOTAP. Døde propidiumjodid-fargede celler visualiseres som grønne punkter. Celledøden tiltar i prøven tilsatt 50 μ l DOTAP. Ingen transfeksjon ble detektert i celler tilsatt FITC siRNA og uten DOTAP.

3.1.2.2 Transfeksjon av hMSC-TERT med Akt1 siRNA

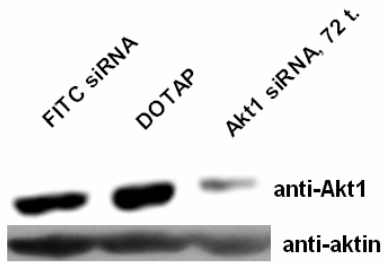
Med bakgrunn i ~100 % transfeksjonsfrekvens ved transfeksjon med FITC siRNA, var det neste målet å undersøke om det var mulig å påvise reduksjon av et målprotein etter transfeksjon med en genspesifikk siRNA-oligo. hMSC-TERT ble transfektert med en siRNA-sekvens reaktiv mot Akt1/PKB α . Akt1/PKB α er et signalprotein som teoretisk kan fosforilere og inhibere GSK3 β (se avsnitt 1.2.4 og 1.2.9). Denne interaksjonen var ønsket å belyse ved å undersøke effekten av å redusere Akt1-uttrykket.

Med utgangspunkt i resultatene i figur 3.1.2.1.1 på side 50, ble cellene transfektert med 1 μ g Akt1 siRNA og 40 μ l DOTAP /mL RPMI 1640 vekstmedium. Ubehandlete hMSC-TERT og hMSC-TERT tilsatt kun transfeksjonsløsningen med DOTAP, ble benyttet som kontroller. Celler transfektert med TNF α siRNA (FITC) ble benyttet som kontroll for å vise at en ikke-målgenspesifikk siRNA-oligo ikke fører til endret proteinsyntese. I alle følgende siRNA-forsøk vil kontrollene bli betegnet som henholdsvis ubehandlet eller ustimulert hMSC-TERT, DOTAP og FITC siRNA.

Det ble utført titeringsforsøk med hensyn til inkubasjonstider etter transfeksjon. 72 timers inkubasjonstid viste seg å gi tilfredsstillende redusert proteinsyntese. I figur 3.1.2.2 på neste side er resultatet av en transfeksjon med 72 timers inkubasjonstid vist.

Det ble ikke påvist en ytterligere reduksjon av proteinsyntese når det ble foretatt repeterte transfeksjoner av cellepopulasjonene.

Prøvene ble analysert i Western med et Akt1 spesifikt antistoff.

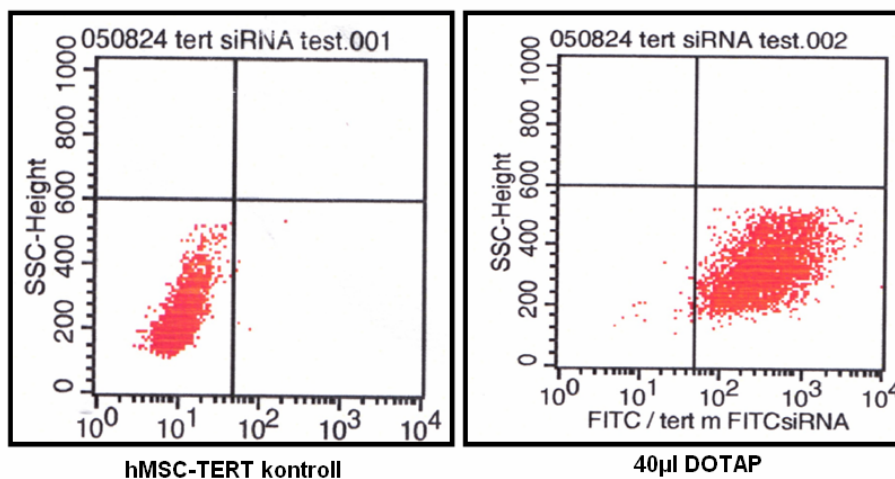


Figur 3.1.2.2

Resultatet viser reduksjon i uttrykk av Akt1 sammenliknet med kontrollene. Anti-aktin-blottet viser lik proteinkonsentrasjon i alle prøver.

Under arbeidet med Akt1 siRNA ble antall celler som ble sådd ut dagen før transfeksjon justert fra 100 000 celler ned til 50 000. Dette ble endret for at cellene ikke skulle vokse seg for tette etter 72 timers vekst.

For å vise at resultatene i figur 3.1.2.1.1 på side 50 også gjaldt et lavere antall celler, ble 50 000 celler sådd ut 24 timer før transfeksjon med FITC siRNA. 40 μ l DOTAP ble tilsatt per 1mL RPMI 1640 medium. Cellene ble analysert ved hjelp av væskestrømscytometri.



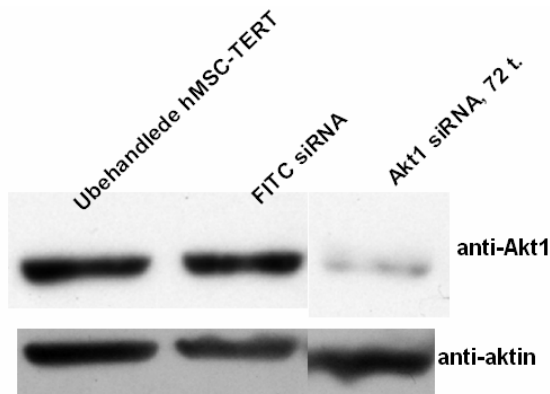
Figur 3.1.2.3

Resultatet viser en kraftig høyreforskyvning i prøven med FITC siRNA transfekterte celler.

3.1.2.3 Transfeksjon av hMSC-TERT med SMARTpool-siRNA

Med bakgrunn i resultatene i figur 3.1.2.2 og 3.1.2.3 på side 52 ble det neste målet å undersøke om det var mulig å redusere genekspresjonen av flere utvalgte sentrale signalproteiner ved hjelp av RNAi. Det ble kjøpt SMARTpool-siRNA spesifikke mot Akt1, Raf-1 og PKA katalytiske enheter α og β . Målgene ble valgt ut med bakgrunn i et ønske om å senere kunne påvirke hypotetiske og kjente signalveier beskrevet i avsnitt 1.2.10 på side 19-20 og figur 1.2.5. Protokollen fra de innledende optimaliserende forsøkene ble benyttet (se avsnitt 2.2.9 side 42). Nedgang i proteinsyntese ble detektert ved hjelp av Westernanalyse. Som kontroll ble det benyttet ubehandlede hMSC-TERT, DOTAP og FITC-TNF α siRNA.

Akt-1 siRNA transfekterte celler ble analysert med anti-Akt1.

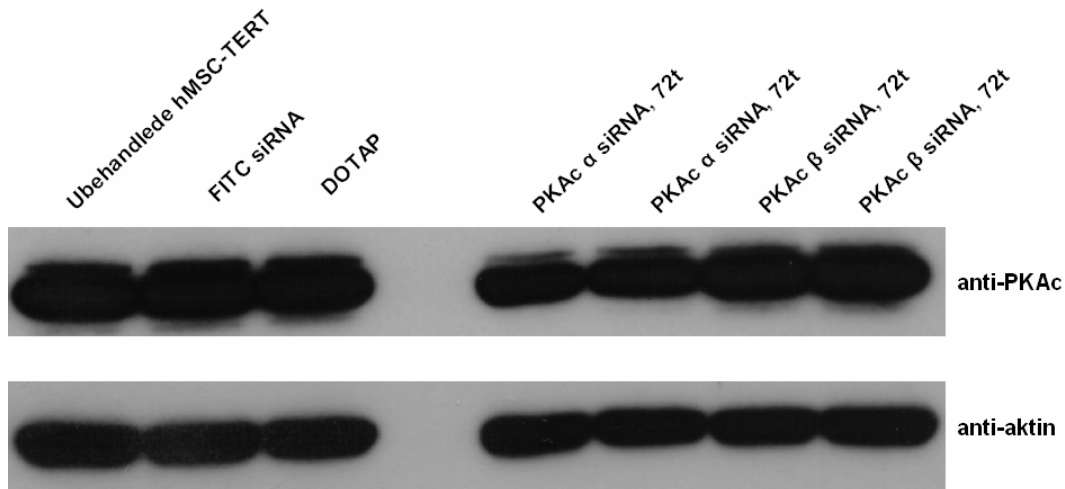


Figur 3.1.2.4

Resultatet viser reduksjon i uttrykk av Akt1 sammenliknet med kontrollene. Anti-aktin-blottet viser lik proteinkonsentrasjon i alle prøver.

Det ble utført atskilte transfeksjoner og kotransfeksjoner med PKA katalytisk enhet α siRNA (PKAc α siRNA) og PKA katalytisk enhet β siRNA (PKAc β siRNA). I alle følgende PKAc Westernanalyser ble det benyttet et antistoff som binder alle isoformer av PKA katalytiske enheter.

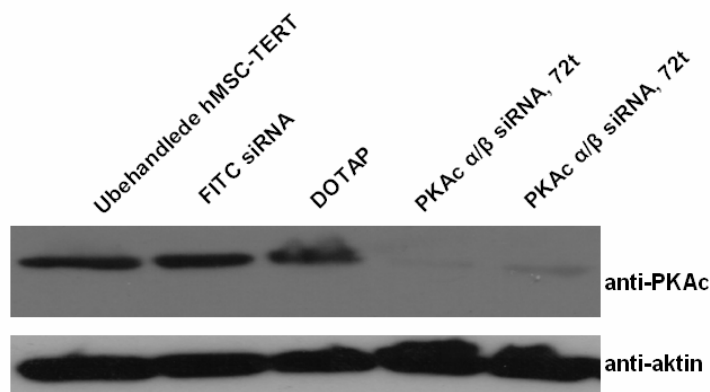
Atskilte PKAc α siRNA og PKAc β siRNA transfeksjoner.



Figur 3.1.2.5

Resultatet viser liten eller ingen nedgang i uttrykk av PKA katalytiske enheter generelt etter transfeksjoner med enten PKAc α siRNA eller PKAc β siRNA. I prøven med celler transfektet med PKAc α siRNA forsvinner båndene som visualiseres under de brede hovedbåndene. Anti-aktin-blottet viser at aktinkonsentrasjonen og den generelle proteinkonsentrasjonen var lik i alle prøver.

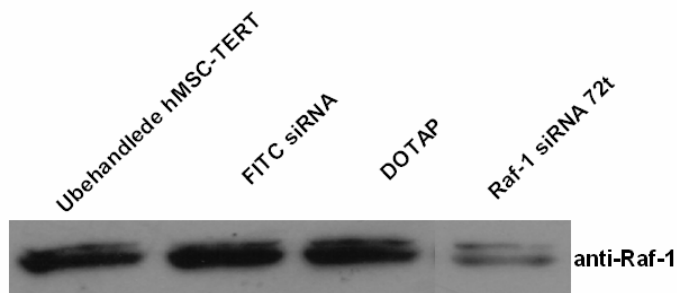
Kotransfeksjon av PKAc α siRNA og PKAc β siRNA.



Figur 3.1.2.6

Resultatet viser en kraftig nedgang i uttrykk av PKA katalytiske enheter sammenliknet med kontrollene. Anti-aktin-blottet viser lik proteinkonsentrasjon i alle prøver.

Raf siRNA transfekterte hMSC-TERT ble analysert med Raf-1 spesifikt antistoff.



Figur 3.1.2.7

I de transfekterte cellene var det en kraftig nedgang i Raf-1-uttrykk etter inkubasjon i 72 timer.

Resultatene viser at siRNA transfeksjon var en metode som kunne anvendes til målrettet reduksjon av signalproteiner.

3.1.2.4 Celledød eller redusert vekst etter siRNA transfeksjoner

Celledød eller redusert vekst som resultat av siRNA transfeksjoner var en generell observasjon. Etter 72 timers inkubasjon etter transfeksjon var celleantallet av levende siRNA transfekterte celler vanligvis mellom 15- og 40 % lavere enn vekstkontrollene ubehandlede hMSC-TERT og DOTAP. Det ble aldri observert celledød blant celler kun tilsatt transfeksjonsløsning med DOTAP.

En annen observasjon ble utført etter at celler var blitt transfektert med 5 µg siRNA i motsetning til anbefalte 1 µg. Økte mengder tilsatt siRNA ved transfeksjon førte til tilnærmet total celledød i alle prøver allerede etter 24 timers vekst.

3.2 Adenosin- og PGE2 stimulering av GPCR i siRNA- transfekterte hMSC-TERT

På grunnlag av påviste reduksjoner av signalproteiner i siRNA-transfekte hMSC-TERT (hele avsnitt 3.1.2.3), ble det besluttet å utføre forsøk der transfekte hMSC-TERT ble stimulert med PGE2 og adenosin.

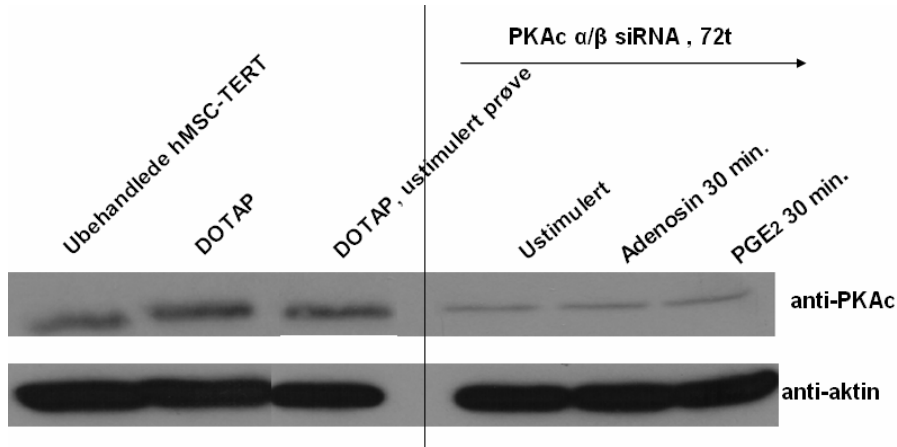
En av målsettingene i oppgaven var å identifisere signalveier i hMSC-TERT som påvirkes av forskjellige betennelsesmediatorer (PGE2 og adenosin). PGE2 og adenosin påvirker som beskrevet i innledningen (avsnitt 1.2.6), GPCR i hMSC-TERT og fører begge til cAMP syntese i hMSC-TERT. PGE2 resulterer i ~4 ganger høyere cAMP syntese enn adenosin og cAMP aktiverer PKA (se avsnitt 1.2.7). I de følgende forsøkene var målet å undersøke effekter av PGE2 og adenosinstimulering i siRNA knockdownceller.

3.2.1 Effekt av adenosin- og PGE2 stimulering på GSK3 β og Akt/PKB i PKAc knockdownceller

PKA har som beskrevet i avsnitt 1.2.10 side 19-20, to hypotetiske funksjoner som var ønsket å undersøke. PKA kan muligens fosforylere og aktivere Akt/PKB og fosforylere og inhibere GSK3 β . GSK3 β er som beskrevet i avsnitt 1.2.2 side 11, et sentralt inhibert protein i en aktivert wnt-signalvei. Hensikten i dette forsøket var å påvise endrede Akt/PKB- og GSK3 β -fosforyleringsmønstre i PGE2 og adenosinstimulerte PKAc RNAi-knockdownceller.

Først ble cellene transfektert med PKAc α og β siRNA (PKAc siRNA) og inkubert i 72 timer (se avsnitt 2.2.9). De transfekte cellene og celler tilsatt transfeksjonsløsning med DOTAP ble alle stimulert med PGE2 eller adenosin i 30 minutter i henhold til protokoll (se avsnitt 2.2.6). Som kontroll på stimuleringene, ble transfekte celler og celler tilsatt transfeksjonsløsning med DOTAP, inkubert i 30 minutter uten stimuli (ustimulert).

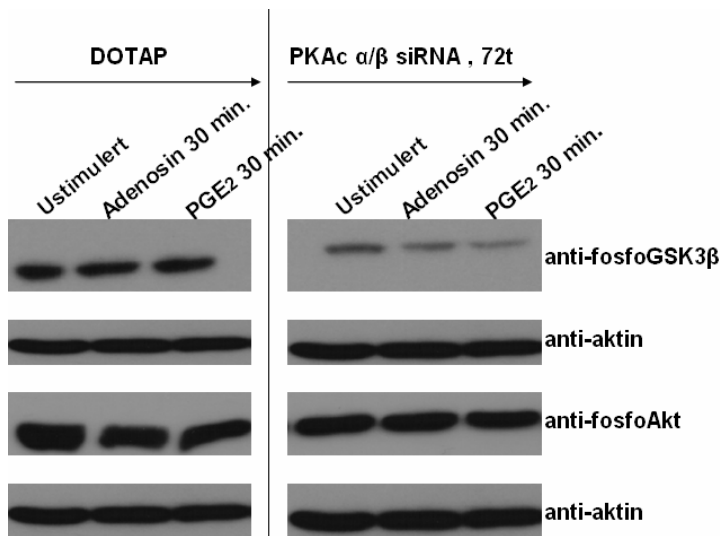
Cellene ble transfektert med PKAc siRNA.



Figur 3.2.1.1

Blottet viser at redusert uttrykk av PKAc i PKAc siRNA transfekterte og stimulerte celler sammenliknet med kontrollene. Vedlagt anti-Aktin-blot viser lik proteinkonsentrasjon i alle prøver.

PKAc siRNA transfekterte celler og kontroller ble stimulert med PGE2 og adenosin.



Figur 3.2.1.2

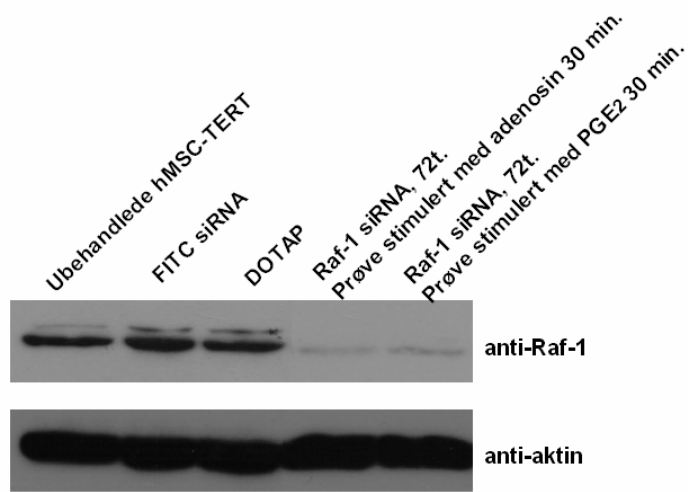
Anti-fosfoGSK3 β -blottet (figur 3.2.1.2 på forrige side) viser at GSK3 β -fosforyleringen generelt reduseres betraktelig i PKAc siRNA transfekterte celler sammenliknet med de andre prøvene og kontrollen merket DOTAP ustimulert. I prøven merket PKAc siRNA ustimulert er GSK3 β -fosforyleringen svak, prøven merket PKAc siRNA adenosin er GSK3 β -fosforyleringen svakere og i prøven merket PKAc siRNA PGE2 er GSK3 β fosforyleringen ytterligere svakere. Anti-fosfoAkt blottet viser ingen klare forskjeller i fosforyleringsmønstre i noen prøver. Anti-Aktin blottene viser lik proteinkonsentrasjon i alle prøver.

3.2.2 Effekt av adenosin- og PGE2-stimulering på ERK1/2-fosforylering i Raf-1- og PKAc knockdownceller

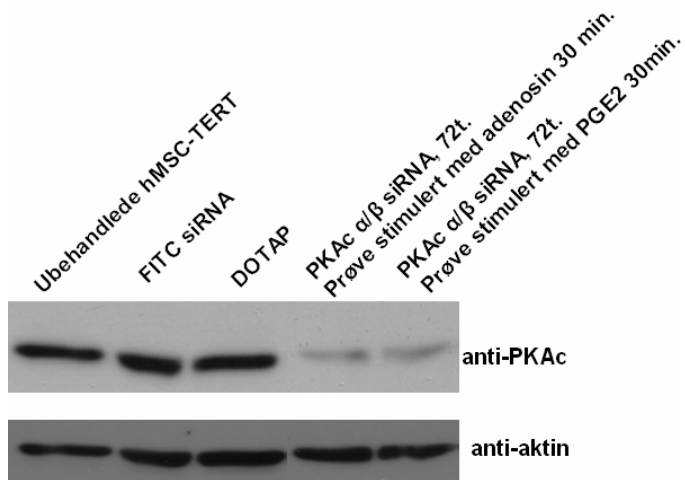
PKA kan som beskrevet i avsnitt 1.2.10, inhibere Raf-1. Aktivert Raf-1 er en MAP3-kinase som beskrevet i avsnitt 1.2.4 kan mediere fosforylering av ERK1/2. Hensikten var å undersøke effekter av adenosin- og PGE2-stimuleringer på ERK1/2 fosforylering i Raf-1- og PKAc-RNAi-knockdownceller.

Først ble cellene transfektert med henholdsvis Raf-1 siRNA og PKAc α og β siRNA (PKAc siRNA) og inkubert i 72 timer (se avsnitt 2.2.9). De transfekterte cellene og celler tilsatt transfeksjonsløsning med DOTAP ble alle stimulert med PGE2 eller adenosin i 30 minutter i henhold til protokoll (se avsnitt 2.2.6). Som kontroll på stimuleringene, ble transfekterte celler og celler tilsatt transfeksjonsløsning med DOTAP, inkubert i 30 minutter uten stimuli (ustimulert).

Først ble cellene transfektert med Raf-1 siRNA eller PKAc siRNA.



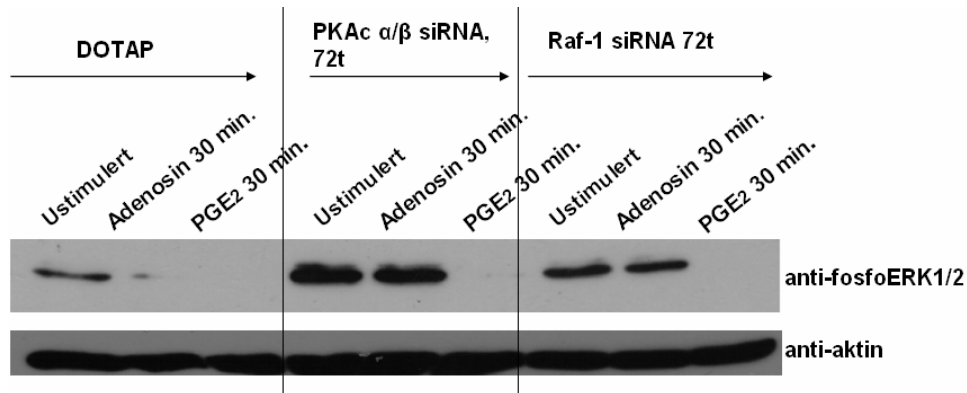
Figur 3.2.2.1



Figur 3.2.2.2

Som vist i figur 3.3.1 og 3.3.2 var det kraftig nedgang i uttrykk av både Raf-1 og PKAc sammenliknet med kontrollene. Anti-Aktin-blottene viser lik proteinkonsentrasjon i alle prøver.

De transfekterte cellene og kontrollceller (DOTAP) ble stimulert.

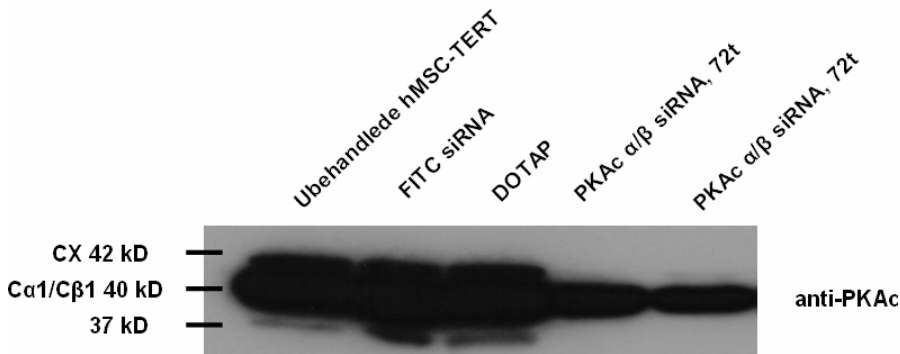


Figur 3.2.2.3

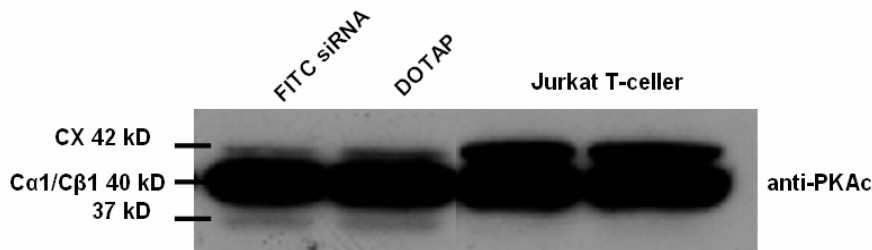
Anti-fosfoERK1/2 blottet karakteriseres ved ingen ERK fosforylering i noen av prøvene merket PGE2. I ustimulerte prøver er ERK fosforyleringen svak i prøven merket DOTAP, sterkere i Raf-1 siRNA og sterkere i PKAc siRNA. I adenosinstimulerte prøver er det en veldig svak antydning til fosforylering i prøven merket DOTAP, sterk fosforylering i Raf-1 siRNA og sterkere i PKAc siRNA. Anti-aktin blottet viser lik proteinkonsentrasjon i alle prøver.

3.3 Isolering og analyse av isoform av PKA katalytisk enhet

PKA består som beskrevet i innledningen (avsnitt 1.2.7 side 17), av flere isoformer og underisoformer av de katalytiske enhetene. Under arbeidet med å etablere en metode for å nedregulere PKAc uttrykk med siRNA fremkom forskjellige bånd etter westernanalyse med antistoffet PKAc. Under denne identifiseringen ble det observert, i sterke eksponeringer av filmene, et bånd ved ~37 kD som ikke har blitt observert tidligere i andre cellelinjer (37). Dette båndet ligger i underkant av hovedbåndet (se figur 3.3.1 under). Hovedbåndet er identifisert som en sammensetning av PKA katalytiske enheter I α og I β ved 40 kD (37). Over dette hovedbåndet detekteres det i andre cellelinjer en annen katalytisk enhet ved ~42 kD (37).



Figur 3.3.1

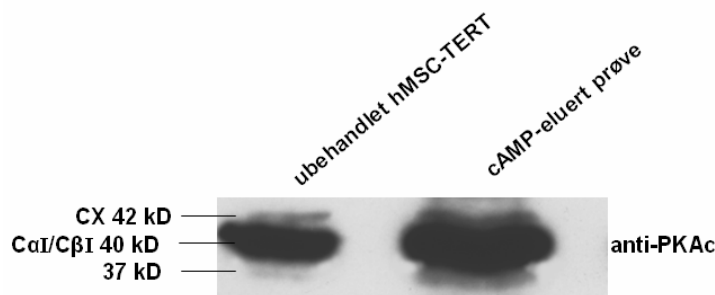


Figur 3.3.2

Ved å se tilbake til blottet i figur 3.1.2.5 forsvinner båndet ved ~37 kD etter transfeksjon med PKAc α siRNA. I resultatet vist i figur 3.3.1 over forsvinner begge båndene ved ~42 kD og ~37 kD i prøver transfektert med PKAc α/β siRNA. I prøvene med Jurkat T-celler i figur 3.3.2, er båndet ved ~42 kD kraftig og båndet ved ~37 kD helt fraværende. På grunnlag av observasjonene i figur 3.1.2.5, figur 3.3.1 og 3.3.2, ble det spekulert i om det

detekterte båndet ved ~37 kD kunne være en ikke tidligere beskrevet isoform av $C\alpha$ som uttrykkes i hMSC-TERT.

Målet ble å kunne isolere, rense, konsentrere og identifisere det aktuelle proteinet. Holoenzymet PKA ble isolert ved immunpresipitering ved bruk av antistoffet anti-PKA regulatorisk enhet I α (anti-RI α) etterfulgt av eluering av de katalytiske enhetene med cAMP (se avsnitt 2.2.10 side 44). Parallelt med en westernanalyse ble de samme prøvene applisert på en gel som ble sølvfarget (se avsnitt 2.2.11 side 45). Hensikten var å kunne rense og isolere båndet før prøven ble analysert ved hjelp av massespektrometri.



Figur 3.3.3

Til venstre i blottet vises vanlige lyserte hMSC-TERT (5000 lyserte celler/ μ l prøve). I prøven med cAMP-eluat detekteres båndet ved 37 kD med et kraftig signal. Alle de tre detekterte båndene er betydelig sterkere i cAMP eluert prøve enn i hMSC-TERT.

Det ble utført ett enkelt forsøk der bånd med mulig ny isoform av PKAc ble forsøkt identifisert ved anvendelse av massespektrometri. Resultatet var at konsentrasjonen av det aktuelle proteinet i prøven var for lav til at en konklusjon kunne trekkes. Prøvens renhet var heller ikke god nok. Keratin (fra hud og lignende) hadde forurenset prøven i løpet av prepareringsarbeidet. Massespektrometri var lite i bruk under arbeid med oppgaven, og er derfor ikke beskrevet i materialer og metoder.

4 Diskusjon

Innledningsvis var målet å undersøke hvilke metoder som lot seg anvende i studier av signalveier i hMSC-TERT. Det ble utført forsøk der hMSC-TERT ble elektroporert med proteinuttrykkende plasmider og etablert en siRNA transfeksjonsmetode tilpasset hMSC-TERT.

I første del av arbeidet ble det utført transiente transfeksjoner av hMSC-TERT ved hjelp av elektroporering med Bio-Rad Gene Pulser. Transfeksjonsfrekvensen av GFP-vektoren ble beregnet til $\sim 8\%$ ved hjelp av væskestrømscytometri. I motsetning til dette resultatet hadde den samme protokollen tidligere gitt vår gruppe formålstjenlige resultater etter elektroporeringen av de humane T-cellelinjene Jurkat, Jurkat TAg og 293T (60). En rekke andre forskningsgrupper ved Rikshospitalet har ikke oppnådd tilfredsstillende transfeksjonsfrekvenser etter elektroporering av verken tilsvarende T-cellelinjer eller mesenkymale stamceller (60).

I prinsippet tilsvarer cellelinjen hMSC-TERT primære celler og har ikke hardføre egenskaper som ofte er tilfelle i cellelinjer. Generelt har både celler og cellelinjer forskjellige egenskaper. Eksempelvis har Jurkat erfaringsmessig vært en relativt robust cellelinje som lettere lar seg elektroporere (60). Det var ikke på forhånd kjent at hMSC-TERT var spesielt robust eller lett å elektroporere. En annen årsaken til den lave transfeksjonsfrekvensen kan ha vært at den opprinnelige protokollen var tilpasset T-cellelinjene og ikke hMSC-TERT.

De transfekterte cellene kunne ha blitt sortert ved bruk av væskestrømscytometri. En slik sortering ville ha kunnet sortert ut kun $\sim 3 \cdot 10^6$ celler i timen. Påkjeningen av mekanisk stress og den lange sorteringstiden kunne ha ført til uønskede effekter på cellene.

Ved anvendelse av Amaxa "nucleofection" prosedyren ble det oppnådd en GFP-transfeksjonsfrekvens på over 50 % (figur 3.1.1.1 side 47) og påvist overuttrykk av

målgene (figur 3.1.1.2 side 48). Ved kjøp av transfeksjonssettet fra Amaxa var det vedlagt en optimalisert protokoll tilpasset mesenkymale stamceller. Amaxa settet bestod av engangskyvetter og begrenset volum av tilhørende reagenser. I eventuelle fremtidige forsøk, var ønsket å bruke et stort antall celler. Den viktigste årsaken til at endringer av protokollen kun førte til lavere transfeksjonsfrekvens, var sannsynligvis at de optimale transfeksjonsbetingelsene ble overskredet. Videre spekuleringer om årsak er vanskelig fordi Amaxa ikke oppgir noen form for informasjon om hvilke reagenser som følger med settet eller hvordan elektroporeringsmaskinen fungerer.

I utgangspunktet ble det vurdert flere transfeksjonsmetoder som kunne tenkes å bli anvendt i transfeksjon av siRNA. Elektroporering, anvendelse av lipidbaserte transfeksjonsreagenser og viral transduksjon var de tre hovedkandidatene. Først ble muligheten for anvendelse av det kationiske lipidet DOTAP undersøkt. Under de innledende forsøkene, der hMSC-TERT ble transfektert med FITC koblet TNF α -spesifikt siRNA, ble det i første forsøk påvist ~100 % transfeksjonsfrekvens etter transfeksjon ved anvendelse av det kationiske lipidet DOTAP (figur 3.1.2.1.1 side 50). Med bakgrunn i resultatene i figur 3.1.2.1.1 ble ingen andre transfeksjonsmetoder forsøkt anvendt selv om muligheten er til stede for at andre reagenser kunne ha gitt ønsket effekt.

I det videre arbeidet ble det undersøkt om en reduksjon av et målprotein kunne bli påvist etter DOTAP-transfeksjon med en målgenespesifikk siRNA-sekvens. Arbeidet med Akt1 siRNA førte til at en endelig tilpasset protokoll for siRNA-transfeksjon ved hjelp av DOTAP kunne lages. Resultatet av de endelige tilpasningene er beskrevet som en optimalisert protokoll beskrevet i avsnitt 2.2.9 side 42 i metoder.

Det ble påvist redusert ekspresjon av alle målgene 72 timer etter transfeksjon med SMARTpool-siRNA (se avsnitt 3.1.2.3 side 53-55). Til sammen fire siRNA-konstrukturer kunne derfor bli benyttet i videre funksjonstapsanalyser. Generelt kunne kanskje en ytterligere reduksjon i proteinekspresjon ha blitt oppnådd om inkubasjonstiden var blitt utvidet til eksempelvis 96 timer kombinert med repeterte transfeksjoner av deler av den

allerede transfekterte cellepopulasjonen. Den detekterte reduksjonen etter 72 timer var likevel tilstrekkelig for videre funksjonstapsanalyser.

Resultatet i figur 3.1.2.5 side 54 er et godt eksempel på at deteksjon av redusert proteinsyntese kan maskeres ved anvendelse av et antistoff som binder flere proteiner enn målproteinene. Anti-PKAc binder alle isoformer for PKA katalytiske enheter. De dominerende isoformene PKAc α I og β I som fremkommer som kraftige bånd er, som tidligere beskrevet, like store (40 kD). I figur 3.1.2.6 side 54 vises derimot en kraftig nedgang i PKAc uttrykk 72 timer etter transfeksjon med PKAc α og β siRNA samtidig. En kotransfeksjon med både PKAc α og β siRNA var altså nødvendig for å kunne detektere redusert proteinnivå.

Den observerte reduserte celleveksten eller økte celledøden som generelt fremkom etter siRNA-transfeksjonene (1 μ g siRNA/mL) kan forklares av at essensielle proteiner i signalveier ble slått ut (se avsnitt 3.1.2.4 side 55). Reduksjon av vitale proteiner kan ha ført til enten redusert vekstrate eller i ytterste konsekvens celledød. En total celledød ble observert etter 24 timer i prøver transfektert med 5 μ g siRNA/mL. Resultatet kan sannsynligvis forklares av eventuelle toksiske effekter av høye konsentrasjoner av siRNA (49) eller siRNA-løsningene. Den påviste reduksjonen i cellevekst eller økt celledød i celler transfektert med mer moderate 1 μ g siRNA/mL, kan alternativt forklares av slike toksiske effekter. Celleveksten i kontroller som var tilsatt kun transfeksjonsløsningen med 40 μ l tilsatt DOTAP/ mL viste ikke tegn til verken redusert vekst eller celledød.

Etter siRNA-transfeksjoner ble det aldri observert noen effekt på de forskjellige målgenene ved parallelle transfeksjoner med den uspesifikke kontrollen TNF α -siRNA (FITC). Denne kontrollen dokumenterer at kun spesifikke siRNA-konstrukter påvirker proteinsyntesen i de utførte forsøkene.

Oppgavens andre målsetting var å identifisere signalveier i hMSC-TERT som påvirkes av forskjellige betennelsesmediatorer (PGE2 og adenosin) og karakterisere effekter på Wnt-signalveien. I det følgende diskuteres detekterte effekter av adenosin- og PGE2-stimuleringer på Raf-1- og PKAc- siRNA transfekterte celler.

Figur 3.2.1.2 side 57

Prøvene i anti-fosfoAkt blottet viste ingen endrede fosforyleringsmønstre som funksjon av verken PGE2 eller adenosin i de ustimulerte prøvene, sammenliknet med celler med redusert PKAc. Resultatet indikerer at PKA ikke har en direkte regulatorisk funksjon på Akt/PKB. Den positivt regulatoriske funksjonen kan likevel ikke utelukkes på grunnlag av dette ene resultatet. Ved å gjenta forsøket flere ganger, kan en effekt vise seg å bli påvist.

Anti-fosfoGSK3 β viser i alle prøver med PKAc knockdownceller en tydelig reduksjon av serin-9 fosforylering. Resultatet viser at GSK3 β fosforyleringen blir svakere ved fravær av PKA. Dette resultatet støtter påstanden om at PKA har en negativ regulatorisk effekt på GSK3 β . Årsaken til de svakere fosforyleringene i prøvene stimulert med adenosin og ytterligere svakere i prøvene stimulert med PGE2, kan være resultatet av ukjente effekter av aktivering av adenosin- og PGE2 reseptorene.

Figur 3.2.2.3 side 60

Ikke transfekterte celler (DOTAP)

I ustimulerte prøver merket DOTAP vises bakgrunnsaktiveringen av ERK1/2. Adenosin stimulerte prøver merket DOTAP viser veldig svak fosforylering av ERK1/2. Den lave fosforyleringen kan forklares ved PKA mediert inhibering av Raf-1. En ytterligere reduksjon i prøven merket PGE2 kan forklares ved den høyere cAMP syntesen som følge av PGE2 stimuleringen.

Raf-1 siRNA transfekterte celler

Ustimulerte og adenosinstimulerte prøver viste sterk ERK1/2 fosforylering. I PGE2 stimulerte prøver ble det ikke detektert noen fosforylering. I og med at Raf-1 ikke skulle

formidle aktiverende signaler i ustimulerte og adenosinstimulerte Raf-1 knockdown celler, kan det være enn annen signalvei som påvirker fosforyleringen. Det er kjent at ERK1/2 kan fosforyleres via Raf-1 ortologene A-Raf eller B-Raf etter aktivering av alternative signalveier (61). Redusert signalisering gjennom Raf-1 må, i så fall ved en ukjent mekanisme (61), føre til en kompenserende aktivering av A-Raf eller B-Raf. Ingen fosforylering av ERK1/2 i PGE2 stimulerede Raf-1 knockdown celler, kan forklares ved at PGE2 stimuleringen aktiverer inhiberende $G\alpha_i$ -enheter eller β/γ -enheter. $G\alpha_i$ -enheter eller β/γ -enheter kan videre påvirke A-Raf/B-Raf -signalveiene eller eventuelt andre signalveier. A-Raf eller B-Raf inhibering via PGE2 er ikke funnet beskrevet i litteraturen.

En *alternativ forklaring* tar utgangspunkt i at det kan ha vært en tilstrekkelig mengde Raf-1 igjen i celler som kan ha hatt to funksjoner: Raf-1 kunne ha blitt inhibert av PKA og ført til stopp i signaltransduksjonen som leder til ERK1/2-fosforylering. Eller så kunne Raf-1 ikke ha blitt inhibert av PKA og videre formidlet aktiverende signaler som førte til fosforylering av ERK1/2.

ERK1/2 fosforyleringen i ustimulerte Raf-1 knockdown celler kan være resultat av en sterk bakgrunnsaktivering. Denne bakgrunnsaktiveringen kan i dette tilfellet ikke ha blitt påvirket av adenosinstimuleringen. Adenosinstimuleringen kan følgelig ikke ha ført til tilstrekkelig aktivering av PKA og inhibisjon av gjenværende Raf-1 i cellene. PGE2 derimot, kan ha ført til tilstrekkelig aktivering av PKA som resultat av høyere cAMP syntese (PGE2 stimulering fører til 4 ganger høyere cAMP syntese enn adenosinstimulering). PKA aktiveringen kunne derfor kanskje føre til inhibisjon av gjenværende Raf-1. Raf-1 kunne i dette tilfellet ikke føre til fosforylering av ERK1/2.

PKAc siRNA transfekterte celler

Den sterke ERK1/2-fosforyleringen i prøven med ustimulerte PKAc knockdown celler kan forklares ved at redusert PKA aktivitet fører til redusert inhibisjon av Raf-1. Redusert inhibisjon av Raf-1 fører til økt fosforylering av ERK1/2. ERK1/2 fosforyleringen var like sterk i adenosinstimulerte PKAc knockdown celler. Den sterke fosforyleringen kan

forklares av at cAMP syntesen som følge adenosinstimuleringen ikke kunne aktivere PKA som følge av PKAc knockdown.

Ingen ERK1/2 fosforylering i PGE2 stimulerende PKAc knockdown celler kan forklares ved at PGE2 aktiverer den ukjente inhiberende tilleggsmekanismen beskrevet i avsnittet "*Raf-1 siRNA transfekterte celler*" på side 66. En *alternativ forklaring* tar utgangspunkt i at det var en tilstrekkelig mengde PKA igjen i celler som kunne utøve en effekt på Raf-1. PGE2, i motsetning til adenosin, kan ha ført til tilstrekkelig aktivering av resterende PKA som resultat av høyere cAMP syntesen. PKA aktiveringen kunne derfor føre til inhibering av Raf-1 fulgt av ingen ERK1/2 fosforylering.

De *alternative forklaringene* beskrevet i begge avsnittene "*PKAc- og Raf-1 knockdownceller*" tar ikke hensyn til eventuelle effekter av andre signalveier.

Forklaringene antar at den inhiberende effekten av både PGE2- og adenosinstimuleringene på ERK1/2-fosforyleringen kun medieres gjennom PKA. Når utgangspunktet er at ingen andre signaler, og kun PKA og Raf-1 påvirker ERK1/2-fosforylering, kan det oppstå et forklaringsproblem når fosforylering av ERK1/2 er så høy som den er i ustimulerte og adenosinstimulerte Raf-1 knockdownceller.

De to forklaringene beskrevet først i både PKAc- og Raf-1 knockdownceller tar derimot hensyn til både PKA mediert effekt og påvirkning av alternative signalveier. Generelt antydes det i disse forklaringene at adenosin medierer sin effekt på ERK1/2-fosforylering gjennom PKA, og at PGE2 har en PKA uavhengig og alternativ inhiberende mekanisme. Samtidig er det vanskelig å forklare at den høye cAMP syntesen som resultat av PGE2 stimulering, ikke har en effekt på PKA-aktivering. PGE2 kan derfor kanskje mediere to parallelle inhiberende mekanismer som resulterer i ikke-fosforylert ERK1/2, via PKA og en ukjent mekanisme.

I avsnitt 1.2.7 beskrives det at PKA katalytiske enheter α eksisterer som isoformer og underisoformer (36). Tidligere har det blitt identifisert underisoformer av PKAc der det i mange tilfeller er en delesjon i den N-terminale regionen i proteinet (37). Følgelig medfører denne delesjonen til et protein med lavere molekylvekt. Under arbeidet med PKAc siRNA argumenterer resultatene, som beskrevet i avsnitt 3.3, for at et bånd ved ~ 37 kD kunne være ubeskrevet isoform av PKA katalytisk enhet α . Isoformen PKA katalytisk enhet αI detekteres ved ~ 40 kD.

Det ble benyttet et monoklonalt antistoff som skulle detektere alle isoformer av PKAc. Antistoffet detekterte et bånd ved ~ 37 kD som ikke har blitt påvist i andre cellelinjer (37). Generelt er uttrykket av isoformer av PKA katalytiske enheter forskjellig i hMSC-TERT i forhold til andre cellelinjer (eksempelvis Jurkat T-celler se figur 3.3.2 og avsnitt 1.2.7). Båndet ved ~ 37 kD forsvant i celler transfektert med PKAc α siRNA og ikke i celler transfektert med PKAc β siRNA. Båndet forsvant også ved transfeksjon med både PKAc α og β siRNA. Det ble benyttet en etablert immunpresipiteringsmetode i isoleringen av PKA, etterfulgt av vask av immunpresipitatet, eluering og oppkonsentrering av katalytiske enheter med en cAMP-analog. Følgelig skulle eluatet kun inneholde PKA katalytiske enheter og ingen andre proteiner. Ved western blotting analyse av eluatet, fremkom det samme båndet sterkt ved ~ 37 kD etter deteksjon med anti-PKAc (figur 3.3.3). Etter sølvfarging av en gel med separert PKAc eluat, fremkom et bånd med en molekylvekt (~ 37 kD) som tilsvarte PKAc-båndet (~ 37 kD) detektert ved western blotting.

5 Litteraturliste

- (1) Department of Health and Human Services. *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*. 2001.
- (2) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391):1145-1147.
- (3) Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 1992; 225(4):951-960.
- (4) Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290(5497):1775-1779.
- (5) Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 2001; 7(4):393-395.
- (6) Friedenstein AJ. Osteogenic stem cells in the bone marrow. *Bone Miner* 1991.
- (7) Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 1994; 84(12):4164-4173.
- (8) Kassem M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells* 2004; 6(4):369-374.
- (9) Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1993; 8(12):1453-1458.
- (10) Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF, Kassem M. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif Tissue Int* 2002; 71(1):36-44.
- (11) Hering TM, Kazmi NH, Huynh TD, Kollar J, Xu L, Hunyady AB et al. Characterization and chondrocyte differentiation stage-specific expression of KRAB zinc-finger protein gene ZNF470. *Exp Cell Res* 2004; 299(1):137-147.
- (12) Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164(2):247-256.
- (13) Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003; 33(6):919-926.

- (14) Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20(6):592-596.
- (15) Waters C, Pyne S, Pyne NJ. The role of G-protein coupled receptors and associated proteins in receptor tyrosine kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* 2004; 15(3):309-323.
- (16) Sharma RP, Chopra VL. Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1976; 48(2):461-465.
- (17) Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982; 31(1):99-109.
- (18) Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653(1):1-24.
- (19) Miller JR. The Wnts. *Genome Biol* 2002; 3(1):REVIEWS3001.
- (20) Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81(2):807-869.
- (21) Tanoue T, Nishida E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* 2003; 15(5):455-462.
- (22) Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9(9):726-735.
- (23) Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 2002; 110(6):669-672.
- (24) Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P et al. Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 1993; 363(6424):85-88.
- (25) Jelinek T, Dent P, Sturgill TW, Weber MJ. Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1996; 16(3):1027-1034.
- (26) Zheng CF, Guan KL. Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem* 1993; 268(15):11435-11439.
- (27) Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74:49-139.

- (28) Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(2):180-186.
- (29) Baccarini M. Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". *FEBS Lett* 2005; 579(15):3271-3277.
- (30) Brady AE, Limbird LE. G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction. *Cell Signal* 2002; 14(4):297-309.
- (31) Levitzki A, Bar-Sinai A. The regulation of adenylyl cyclase by receptor-operated G proteins. *Pharmacol Ther* 1991; 50(3):271-283.
- (32) Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* 2003; 15(9):813-827.
- (33) Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:661-690.
- (34) Kleiveland CR. Stipendiat i egen forskningsgruppe. 2005.
Ref Type: Unpublished Work
- (35) Francis SH, Corbin JD. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* 1994; 56:237-272.
- (36) Carlson CR, Ruppelt A, Tasken K. A kinase anchoring protein (AKAP) interaction and dimerization of the RIalpha and RIIbeta regulatory subunits of protein kinase a in vivo by the yeast two hybrid system. *J Mol Biol* 2003; 327(3):609-618.
- (37) Skålhegg B. Institutt for Ernæringsforskning. 2005.
Ref Type: Personal Communication
- (38) Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1697(1-2):3-16.
- (39) Ramstad C, Sundvold V, Johansen HK, Lea T. cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibits T cell activation by phosphorylating ser-43 of raf-1 in the MAPK/ERK pathway. *Cell Signal* 2000; 12(8):557-563.
- (40) Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 2004; 29(2):95-102.
- (41) Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67(4):657-685.

- (42) Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 1990; 2(4):279-289.
- (43) Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG. Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 1991; 113(2):503-514.
- (44) Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; 15(2):188-200.
- (45) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411(6836):494-498.
- (46) Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 2003; 299(5607):716-719.
- (47) Kawasaki H, Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* 2004; 431(7005):211-217.
- (48) Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 2004; 305(5688):1289-1292.
- (49) Dharmacon RNA Technologies U. RNA Interference Technical & Reference Application Guide – www.dharmacon.com. 2004.

Ref Type: Catalog

- (50) Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5):843-854.
- (51) Nelson P, Kiriakidou M, Sharma A, Maniatakis E, Mourelatos Z. The microRNA world: small is mighty. *Trends Biochem Sci* 2003; 28(10):534-540.
- (52) Bayne EH, Allshire RC. RNA-directed transcriptional gene silencing in mammals. *Trends Genet* 2005; 21(7):370-373.
- (53) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003; 21(6):635-637.
- (54) Molecular Cloning. *Molecular Cloning* 2005.
- (55) Qiagen. Endofree® Plasmid Mega Kit. *Endofree Plasmid Purification Handbook* 2003.

(56) Ole Petter F., Clausen Gøril Olsen, Geir E. Tjønnfjord. Væskestremscyometri - anvendelse i cellebiologi og nytte i klinisk medisin. Tidsskr Nor Lægeforen 2000.

(57) Lea T. Figuren ble anvendt med tillatelse av Tor Lea. 2005.

Ref Type: Personal Communication

(58) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227(5259):680-685.

(59) Bio-Rad Laboratories U. Bio-Rad Silver Stain protokoll. 2005.

(60) Lea T. 2005.

Ref Type: Personal Communication

(61) Marais R, Marshall CJ. Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. Cancer Surv 1996; 27:101-125.