

Studier av CaM kinase I $\beta$  ekspresjon i  
hypofyseceller i kultur (GH celler).  
-Forskningsoppgave i medisin for  
Michael Bodd og Hilde Sand.



## **Abstract:**

**Background:**  $\text{Ca}^{2+}$  is without question the most versatile intracellular second messenger in cellular processes initiated by growth factors and hormones and involved in diverse cellular and organ functions such as cell cycle regulation, apoptosis and gene expression. Among the plethora of  $\text{Ca}^{2+}$  binding proteins in cells, the most ubiquitous and abundant is Calmodulin (CaM). One action of CaM is to activate members of a family of Ser/Thr protein kinases called  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependent protein kinases or CaM kinases (CaMK's). There is a significant "crosstalk" between different intracellular pathways.

We wanted to study the expression and regulation of a newly discovered CaM kinase I $\beta$  isoform (Løseth et al., 2000) in closely related pituitary cells which produce growth hormone (GH) and prolactin (PRL).

GH and PRL synthesis is known to be affected by a number of different hormones, hypothalamic releasing factors and chemicals which modulate intracellular signaling systems. 17 $\beta$  estradiol and TRH are major regulators of PRL production while the synthetic glucocorticoid dexamethason stimulates GH production. Bromocriptin a dopamin agonist, inhibits both PRL and GH production.

**Methods:** The cells were grown in plastic bottles for 10 days and thereafter harvested. RNA was isolated by the Trizol-method, and applied on RNA gels for electrophoresis. RNA was then transferred to a filter (Northern blotting) and hybridized to radioactive DNA probes to quantify the amount of CaMK I $\beta$  mRNA in the two GH cell lines. Moreover the amount of CaMK I $\beta$  mRNA was compared between treated and untreated cell cultures using GAPDH mRNA as internal standard.

**Results and conclusions:** The differences in the relative amount of CaM kinase I $\beta$  mRNA/GAPDH mRNA in the controls and treated cell cultures were not significantly different. This indicates that, according to the house-keeper-gene GAPDH, CaM kinase has not been regulated by the substances added. The steady level production of CaM kinase I $\beta$  mRNA is higher in GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub> than in GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cells. This could be due to the fact that GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub> cells excrete growth hormone, whilst the GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cells excrete prolactin. One hypothesis is therefore that CaM kinase could be involved in signaling pathways active in growth hormone producing phenotype. The cellular functions in which the CaM kinase I $\beta$  is involved are still elusive.

## Begrunnelse for valg av oppgave

Vi valgte en forskeroppgave fremfor en litteraturoppgave fordi vi ønsket å få opplæring i og forståelse av valg av vitenskapelige metoder og tilnæringsmåter til et biologisk problem slik det studeres innen en forskergruppe. Vi ønsket å lære hva basalforskning faktisk innebærer. Uansett hvilken gren av medisinen vi ender opp i er ”evidence based” biologisk medisin basert på resultater fra grunnforskningen.

Etter at vi hadde snakket med en del forskjellige fant vi ut av at den oppgaven som ble foreslått av Kaare M. Gautvik ved biokjemisk institutt ville egne seg best innenfor rammen av en slik oppgave. Dette fordi den var passe omfattende og fordi vi ville få lære oss en del forskjellige metoder fra basalforskningen. I tillegg ga oppgaven oss muligheten til å fordype oss litt mer innen cellebiologien. Det var også viktig for oss å komme inn i en veletablert forskergruppe.

## Introduksjon

Protein kinase kaskader er betydningsfulle intracellulære signalveier i forbindelse med reguleringen av en rekke cellulære funksjoner. Man tenkte seg tidligere at disse signalsystemene fungerte som adskilte veier. Senere forskning har vist at det er betydelig ”crosstalk” eller biokjemiske koblinger mellom de ulike protein kinase systemene og at dette er av vesentlig betydning for å integrere ulike signalsystemer for å utløse celle-og vevsspesifikke biologiske effekter. En av de mest kjente signalsystemene er de G-protein medierte (fig 1.)

$Ca^{2+}$  er en av de mest generelt benyttede intracellulære ”second messenger”. Ved hvile er  $Ca^{2+}$  konsentrasjonen intracellulært ca. 100 nM, dvs. ca. 20.000 ganger mindre enn ekstracellulært. Kalmodulin (CaM) er et essensielt protein som er tilstede overalt og fungerer som en viktig reseptor for ionisert kalsium.  $Ca^{2+}$ /kalmodulin komplekset genererer intracellulære signaler via aktivering av kalmodulinavhengige protein kinaser (CaM kinasene) med endring av den cellulære funksjon som resultat.

Den multifunksjonelle CaM kinase familien består av CaM kinase I, II, and IV (hvor alle formene består av en rekke isoformer). CaM kinase II trenger kun kalsium og kalmodulin for aktivering. CaM kinase I and IV derimot er monomere og trenger fosforylering av en CaM kinase før de aktiveres av kalsium-kalmodulin komplekset (Tokumitsu et al., 1995). Etter aktivering, mister CaM-kinase II and IV deres  $Ca^{2+}$ /kalmodulin-avhengige aktivitet grunnet autofosforylering i fravær av  $Ca^{2+}$ , og blir herved  $Ca^{2+}$ /kalmodulin-uavhengige former. De aktiverte CaM-kinase II, IV, og I deaktiveres ved defosforylering av CaM-kinase fosfataser eller andre multifunksjonelle protein fosfataser og gjenopptar den initiale grunnformen (Fujisawa H. 2001).

Disse multifunksjonelle proteinene affiserer mange prosesser inkludert genekspressjon, celle syklus progresjon, og synaptisk plastisitet (Braun og Schulman, 1995). CaM kinasenes effekter inkluderer neurotransmitter frigjøring, muskelkontraksjon, genekspressjon, glykogenedbrytning, insulinsekresjon og progresjon av cellyklus.

Det er relativt nylig blitt påvist et nytt medlem av CaM kinase I undergruppen, nemlig  $\beta$  (Løseth et al., 2000), (og iløpet av oppgaveskrivningen  $\delta$ ) slik at det nå er kjent tre isoformer av CaM kinase I –  $\alpha$ ,  $\beta$  og  $\delta$ . CaM kinase I $\beta$  er et monomerenzym med molekylærvekt 38,5 KDa og som kan fosforylere en rekke substrater.

Det er tidligere vist at PKA kan katalysere direkte fosforylering av CaM kinase I $\beta$  og fosforyleringssitet har blitt identifisert (DeRemer et al., 1992). Dette viser at det er

”crosstalk” mellom PKA og CaM kinase I $\beta$  systemene på fosforyleringsnivå. Det er imidlertid gjort få undersøkelser over cellers/vevs ekspresjon av CaM kinase I $\beta$  og hvordan denne reguleres.

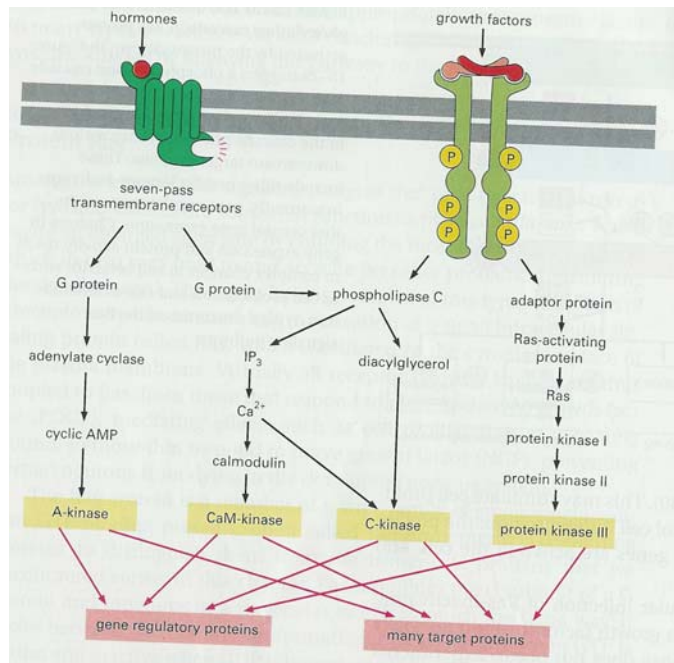


Fig. 1 Eksempel på reseptorutløste intracellulære signalsystemer. Figuren viser hvordan de ulike systemene gjensidig påvirker hverandre. (Alberts et al., 1998).

## Formålet med oppgaven

Vi har ønsket å studere ekspresjonen av CaM kinase I $\beta$  mRNA i 2 hypofysecellelinjer som begge er utviklet fra samme rotte-hypofysetumor (Fjellheim, 2001). Dessuten ønsker vi å undersøke om andre hormoner og substanser som påvirker intracellulære signalsystemer påvirker CaM kinase I $\beta$  mRNA. GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub> celler og GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> celler er utviklete klonale linjer med hver sin fenotype: GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub> produserer veksthormon (GH) og GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> prolaktin (PRL). Om stoffene har forandret RNA nivået av CaM kinase I $\beta$  i cellene undersøkes ved å sammenligne CaM kinase I $\beta$  RNA mengden i behandlede celler med CaM kinase I $\beta$  RNA mengden i ubehandlede celler. Vi vil bruke GAPDH som intern standard da GAPDH RNA mengden i cellene ikke påvirkes av de tilsatte stoffene, og man da antar at mengden uttrykt GAPDH er tilnærmet konstant per celle. Ved å sammenligne CaM kinase I $\beta$  mRNA med GAPDH mRNA vil vi dermed få et mer korrekt inntrykk av hvorvidt CaM kinasen er opp- eller nedregulert. Vi vet ikke på forhånd hvor store mengder av de ulike stoffene som må tilsettes cellene, og forsøkene vil derfor bli utført med ulike konsentrasjoner og til ulike tidspunkt. Før vi satte i gang med forsøket kjørte vi et prøvoforsøk der hensikten var å lære de ulike metodene samt se når cellene uttrykte mest CaM kinase I $\beta$  RNA og dermed når de ideelt sett burde høstes. De kjemiske substansene vi valgte har betydning for intracellulære signalveier og vi var interessert i å se om de kunne påvirke ekspresjon av CaM kinase I $\beta$ . Vi behandlet cellene med følgende stoffer:

- Øtradiol og TRH som stimulerer PRL produksjonen i GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>celler.
- Dexametason, et syntetisk glukokortikoid som øker GH produksjonen.
- TRH frigjør PRL og aktiverer PKC, PKA og CaM kinase II i GH<sub>3</sub> celler.

- Bromokriptin, en dopamin agonist som hemmer PRL og GH produksjon.
- Forskolin stimulerer adenylat syklase og PRL og GH sekresjonen.
- Kalsium-ionofor som øker kalsium opptaket i cellene.

### **Cellelinjer som modellsystem.**

I alle organer som f.eks. hypofyseforlappen, finnes det flere celletyper. Disse kan studeres ved at man anriker dem og dyrker dem i primærkulturer eller bruker permanente cellelinjer som kan være av tumoropprinnelse eller gjort "udødelige" v.h.a. virus transformasjon. For å være en hensiktsmessig modell må de permanente cellelinjer være i stand til å reagere på fysiologiske og farmakologiske substanser og helst ha ett målbart parameter, et fysiologisk endepunkt, som er lett å studere i bestemte situasjoner som f.eks. sekresjon av hormoner.

### **GH-celler**

GH-cellene ble isolert fra en hypofysetumor (MtT/W5) som oppstod ved å bestråle en Wistar-Furth-rotte (Fjellheim, 2001). GH-cellene representerer flere cellelinjer bl.a. GH<sub>12C</sub><sub>1</sub>, GH<sub>3</sub> og GH<sub>4C</sub><sub>1</sub> som spontant produserer og skiller ut GH og/eller PRL. Disse cellelinjene har bevart evnen til å reagere på stimuli utenifra på samme måte som normale hypofyseceller. Vi har benyttet GH<sub>12C</sub><sub>1</sub> celler som først og fremst skiller ut GH og GH<sub>4C</sub><sub>1</sub> cellene som skiller ut PRL. De er fra tidligere godt karakteriserte biologisk (Fjellheim, 2001).

## **Metodebeskrivelser og reagenser.**

Vi har laget og anvendt følgende løsninger under metodeutprøvingene og forsøket:

### **5x TBE Buffer (Tris-Borate-EDTA)**

54 g Tris base  
27,5 g Borsyre  
4,65 g dvs 20 ml 0,5 M NaEDTA

Tilsett ddH<sub>2</sub>O til 1l.

pH er 8.3 og trenger ikke justeres.

### **SSC, 20X**

For 1 l:

175.5 g NaCl  
88 g Na sitrat  
Tilsett vann til 1l total volum, pH justeres til 7,5.

### **50 X TAE buffer**

- mål ~900ml destillert H<sub>2</sub>O.
- tilsett 242g Tris base.
- tilsett 57.1ml Acetat.

- tilsett 18.6 g EDTA
- juster volumet til 1 l med destillert H<sub>2</sub>O

### **Standard Saline Sitrat, SSC**

8.75 g NaCl (20x: 175,3g)  
 4.4 g natriumsitrat (20x: 88,2 g)  
 Løst i 1.0 l destillert vann og justert til pH 7.0.

### **10x MOPS:**

0,5 M 3-N-morfolino-propansulfonsyre (MOPS) pH 7  
 104,65g til 1 l  
 tilsett EDTA pH 7,5 til finalkonsentrasjon 0,01M  
 20 ml 0,5M EDTA til 1 l.  
 Følgende påsettingsbuffer ble brukt:  
 2 ml 0,1 M NaPi buffer  
 1 g ficoll-400  
 0,025 g bromfenolblått  
 vann til 10ml  
 oppbevares ved 4°C  
 Støping av gel (300ml): 3g agarose  
 216 ml RNase fritt vann. Kokes og avkjøles litt og tilsettes under røring 30 ml 10xMOPS.  
 54 ml (sterilfiltrert) 37 % formaldehyd.

## Kapittel 1

### Opplæring i steril arbeid

Vi lærte oss etterhvert hvordan de ulike instrumentene skulle håndteres og hvordan man:

- blandet til nytt medium
- skiftet medium på tidligere subkultiverte celleflasker
- subkultiverte cellene (fra en tett populasjon lages flere tynnere befolkede flasker)
- vurderte cellene før og etter subkultivering i mikroskop
- høstet cellene etter ideelt antall dager
- generelt steril arbeide: bruk av egne frakker, innesko, munnbind og hansker, UV lys og sterilisering av laboratoriet.

Før selve arbeidet med cellene kunne begynne, måtte vi gjøre klar arbeidsbenken. Lyset over benken skrues på, benken vaskes først med destilert vann deretter med 70 % etanol. Hettene på pipetteboksene skrues av, gassbrenneren tennes og suget monteres. Nødvendig utstyr taes ut fra skuffen.

### Celle medium

GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub> og GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cellene ble dyrket i plastflasker (Costar) som var tilsatt Dulbecco's modifiserte Eagle medium (1000 ml glukose supplert med 10% føtalt kalveserum (FKS)). Flaskene ble satt i varmeskap ved 37 °C i en fuktig atmosfære med 95% luft og 5% CO<sub>2</sub>. Cellene ville dø uten tilgang på CO<sub>2</sub> i luften. Det er derfor viktig å la korken sitte løst på. Det er mulig å tilsette antibiotika til flaskene, men vi gjorde ikke dette og derfor ble hygien på

cellelaben ekstra viktig. Celleflaskene ble godt merket med cellelinje og dato for subkultivering.

Nylig subkultiverte celler må skiftes på etter ca. 5 døgn, deretter hvert annet døgn. Cellene bør helst skiftes medium på dagen før de skal høstes (fjerne avfallsstoffer), for å få en liten vekst spurt, og ved starten av hvert eksperiment. Gammelt medium suges av med en steril pasteur pipette. Det er viktig å ikke suge på samme side som der cellene sitter. Deretter fylles det på med ca. 15ml medium. Dato for skifte av medium noteres på flasken.

GH cellelinjer subkultiveres ca. en gang i uken. Vi suger av mediet og tilsetter 3,5 ml 37 °C temperert trypsin (reaksjonen går raskere når trypsinet er oppvarmet). Bikk flasken frem og tilbake, så hele flaten dekkes med trypsin. La flasken ligge i 60 sek. Trypsinet får cellene til å løsne fra veggen. Sug av overflødig trypsin, men la litt bli igjen. På den måten løsner cellene lettere når de så settes i varmeskap i 2 til 4 min. Vi sjekket i mikroskop (lupe-forstørrelse) om cellene har løsnet evt. Slo vi til flasken for å løsne dem. (Løse celler seiler forbi i lupen, fastsittende celler står stille.) Til trypsincelleflasken tilsettes 10 ml medium for GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub>, 4ml for GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>. 1ml taes ut fra hver flaske og tilsettes nye flasker med allerede 14ml medium slik at vi får 15ml totalt, slik som i morcelleflasken (vi får 1/10 og ¼ fortynning). GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub> celler kan altså vanligvis maks subkultiveres på 10 nye flasker og GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> på 4 flasker. (Er ”morcelleflasken” veldig tett kan du evt fortynne mer). Mellom hver cellelinje vasket vi benken med vann og sprit samt skiftet hansker.

Vurdering av celler i lupen:

- Er det få celler (mange åpne felter) eller sitter de tett i tett?
- Sitter cellene fast eller har de løsnet fra flasken (seiler forbi i lupen)?
- Ser vi noen i synlig deling?
- Er det tilkommet soppvekst og må dyrkingen stanses?

## Kapittel 2

### Høsting av celler og RNA isolering ved hjelp av trizol.

Trizol inneholder en monofasisk løsning av fenol og guanidin isotiocyanat og er toksisk (spesielt ved kontakt med hud, øyne og ved svelging). Vi arbeidet derfor under avtrekkskap. Trizol lyserer cellene, men bevarer integriteten til RNA. For å unngå RNase kontaminering er det viktig å hele tiden bruke hansker samt sterilt, RNasefritt utstyr.

- 1) Celleflaskene som skulle høstes ble hentet ut av cellelaben og mediet ble sugd vekk og overført til falconrør. I prøveforsøket høstet vi celler på dag 1, 2, 3, 5, 7, 8 og 10. I hovedforsøket ble alle celleflaskene høstet på dag 10, da dette hadde vist seg å være den mest ideelle dagen for høsting ut fra tidligere forsøk.
- 2) Så tilsatte vi 7,5 ml trizol til hver celleflaske (1 ml per 10 cm<sup>2</sup>) der mediet var fjernet. Trizol/celleblandingen skulle så godgjøre seg i ca 5 min.
- 3) Mediet i falconrørene ble sentrifugert ved 15000g i 4 min for å bli kvitt evt. cellerester. Supernatanten ble overført til nye falconrør og merket med dag, dato og cellelinje (tilsatt stoff). Disse skulle brukes i senere forsøk (av andre), til hormonsekresjons/protein bestemmelse og ble frosset ned ved -70 °C.
- 4) Væsken i celleflaskene ble så overført til eppendorfrør og fryst ned ved -70 °C. Man kan gå rett over til punkt seks uten å ha frosset rørene først.
- 5) Eppendorfrør innholdet ble opptint (på is) og deretter inkubert i 5 min ved romtemperatur. Innholdet ble overført til gule mykplastrør og ble tilsatt 0,2 ml kloroform per ml Trizol, dvs. 1,5 ml kloroform totalt. Kloroform er toksisk og

karsinogent. (I laboratoriet er det mye som er det...) Vi ristet rørene i 15 sek til inneholdet var godt blandet og lot det stå 2-3 min i romtemperatur. Deretter sentrifugerte vi rørene i 15 min ved 2-8°C ved 14929g.

- 6) Væsken i rørene separerte seg i tre faser, en øvre gjennomskiktig fase der RNAet befant seg, en midtre hvitlig fase og en nedre rødlig fase (fenol-kloroform).
- 7) Den øvre fasen ble overført til nye rør og tilsatt 0,5 ml isopropanol per ml Trizol, dvs. 3,75 ml isopropanol totalt. Disse rørene ble satt til inkubering 10 min i romtemperatur før de ble sentrifugert ved 14929g i 10 min ved 2-8 °C. Etter sentrifugering sees en hvitlig géleaktig pellet langs kanten på røret.
- 8) Vi fjernet supernatanten og vasket RNA pelleten i minst 1 ml 75 % etanol per ml Trizol, dvs. 7,5 ml etanol totalt. Inneholdet ble blandet ved å bruke en Vortex (automatisk blande maskin) og sentrifugert ved 71549g i 5 min ved 2-8 °C.
- 9) Vi helte av etanolen, men var svært forsiktige så ikke pelleten skulle forsvinne med etanolen. Pelleten lot vi så lufttørke.
- 10) Pelleten ble deretter løst i 50 µl RNase fritt milliQ-vann.
- 11) Her frøs vi ned rørene igjen. RNAet kan nå lagres i inntil et år.

### Kapittel 3

#### Fremstilling og innmerking av radioaktiv probe for CaM kinase Iβ.

Bakterier som inneholdt plasmid med klonet CaM kinase Iβ (Gautvik et al., 1996) ble dyrket opp for å isolere plasmid. Plasmidet ble deretter spaltet med restriksjonsenzymet (EcoR1) og CaM kinase Iβ cDNA klon ble isolert og radioaktivt merket.

#### **Bakterie dyrkning.**

- 1) Tillaging av LB medium (Luria Bertani) for dyrkning av E.coli. Vi veide opp følgende og blandet det i 1 dl distillert vann: 10g tryptone, 10g NaCl og 5g gjærekstrakt. Deretter ble pH justert v.h.a pH-meter til 7.0 med 0,1 molar NaOH eller 0,1 M HCl.
- 2) Utsåing av bakteriene: Bakteriene ble sådd ut på en skål med Bacto agar. Først ble det tilsatt ampicillin (100µg/ml, tilsetter 1 µl per ml) for å hindre vekst av andre bakteriestammer (ampicillinet fikk trekke inn i 30 min før bakteriene ble sådd ut). Våre CaM kinase positive stammer var satt inn i et plasmid som var resistent mot ampicillinet. Skålene ble deretter snudd på hodet (for å få finere kolonier) og satt i inkubatorskap i 37 °C over natten.
- 3) Bakteriene får vokse videre i LB medium: Dagen etter utsåing hadde vi bakteriene over i Erlenmeyerkolber som hadde 100ml LB medium og 100µl ampicillin i seg. Bakteriene ble overført fra skålen til kolben med en tannpirker. Deretter ble de satt i risteinkubator over natten. Vi hadde tre erlenmeyerkolber med følgende innhold: E.coli med GAPDH plasmid, E.coli med CaM-sense -og E.coli med CaM antisense plasmid.

#### **Plasmid isolering**

Vi benyttet Qiagen-tip protokoll for plasmid prepareringen. Vi brukte ”midi prep” metode (opp til 100 µg). Våre plasmider var såkalte ”low copy” (få plasmider per celle) slik at de trengte 100 ml LB medium for at vi skulle få nok bakterier til å få 100µg plasmid (se ovenfor under plasmid prep).





Fig. 2 ”Qiagen-basert prinsipp” for rensning av plasmid fra bakterier.

#### QIAGEN PROTOKOLL KIT

- 1) Løsningene i erlenmeyerkolben taes over i 4 elberør og sentrifugeres før start. Spinn ned i 10 min på 7154g ved 4 °C. Sett på is. Hell av supernatanten
- 2) Løs bakteriepelleten i 4ml Buffer P1, la det ikke være klumper igjen.
- 3) Tilsett 4ml buffer P2, bland forsiktig og inkuber i romtemperatur i 5min.
- 4) Tilsett 4ml kaldbuffer P3, bland umiddelbart og forsiktig og inkuber på is i 15 min.
- 5) Sentrifuger ved 20000g i 30 min på 4 °C. Fjern den klare supernatanten.
- 6) Sentrifuger på nytt ved 20000g, men kun i 15min på 4 °C. Ta vare på supernatanten(8)
- 7) Ekvilibrer Qiagen tip 100 ved å la det renne gjennom.
- 8) Tilsett supernatanten fra (6) til quiagen-tip 100 og la det renne igjennom.
- 9) Vask Qiagen-tip 100 med 2X10ml buffer QC og la det renne igjennom.
- 10) Fjern DNAet fra filteret ved å vaske med 5ml buffer QF. Nå må du sette noen corex-rør under Qiagen-tipene for å samle opp DNAet .
- 11) Fell ut DNA med 3,5ml isopropanol i hvert rør, sentrifuger v/15000g i 4 °C i 30 min.og fjern supernatanten.
- 12) Vask DNAet med 2ml 70 % etanol, la lufttørke og løs DNA pelleten i 200µl TE Buffer. Frys ned ved -70 °C.

DNA mengden måles i et spektrofotometer. DNA absorberer best UV-lys v/260 nm. Ratioen: absorbansen på 260/280 skal ideelt sett være mellom 1,8-2,0 for at DNA skal være rent nok. Spektrofotometeret ble ekvilibrert med vann som nullverdi. Væsken fra våre løsninger ble fortynnet 1/1000 µl plasmidprepvæske i 1000 µl destillert vann. Resultatet av denne spektrofotometer målingen viste at 3 av GAPDH rørene virket bra, 2 av CaM kinase Iβ revers rørene var bra og 1 av CaM kinase Iβ var bra. For å være sikrere kjørte vi en fullstendig analyse av ”absorbjonsspekteret” ved ulike nm. Vi skulle ha en topp omkring 260 nm og kurven skulle være jevn. **For rent DNA:**  $A_{260} / A_{280} = 1.8$   
**For rent RNA:**  $A_{260} / A_{280} = 2.0$ . Ut fra absorbansen  $A_{260}$  beregner maskinen (progmet) konsentrasjonen av DNA/RNA.

13) Vi har nå isolert DNAet (bakteriekromosom -og plasmid) til bakterien. Vi må nå kutte ut av plasmidet den sekvensen vi er interessert i, proben vår, og isolere den fra resten av bakteriens DNA. Vi vet hvor CaM kinase I $\beta$  cDNA er klonet inn i plasmidet slik at vi vet hvilke restriksjonsenzymmer vi skal benytte oss av.

Restriksjonsenzymmer kutter ut et stykke probe av plasmidet.

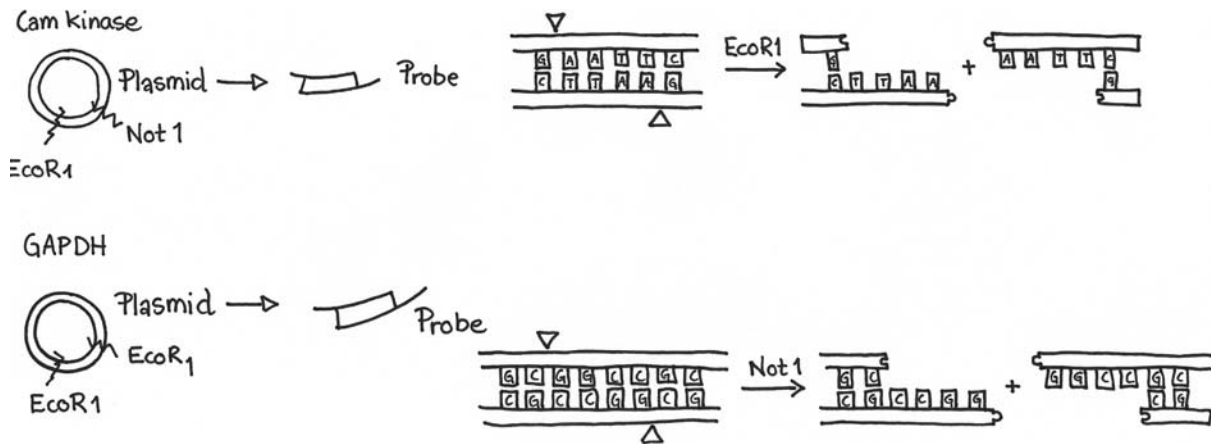


Fig. 3 Skjematisk fremstilling av setene restriksjonsenzymene Not1 og EcoR1 gjenkjenner.

GAPDH: Den er satt inn i en TOPO vektor og er 450bp lang.

CaM kinase I $\beta$ : satt inn i en pCI neo vektor og er 1030bp lang.

CaM kinase I $\beta$  kuttes ut fra pCI neo vektor ved hjelp av Not1 og EcoR1.

GAPDH kuttes ut ved hjelp av EcoR1.

1 unit restriksjonsenzym er nødvendig for å kutte 1 $\mu$ g DNA vektor i 50 $\mu$ l (10X) buffer (buffer 4 for GAPDH, buffer EcoR1Not1 for CaM kinase I $\beta$ ).

V.h.a. resultatene fra spektrofotometer målingene kunne vi regne ut hvor mange  $\mu$ l av hver prøveløsning vi trengte for å kutte 1 $\mu$ g DNA.

For Not1 er konsentrasjonen 15U/ $\mu$ l. For EcoR1; 20U/ $\mu$ l. I denne prøvekuttingen tilsetter vi 1  $\mu$ l restriksjonsenzym, altså i overflod.

Totalt hadde vi 11 rør:

3 GAPDH (1)(2)(3) med EcoR1

2 CaM kinase I $\beta$  (4)(5) med EcoR1 og Not1.

2 CaM kinase I $\beta$  revers (6)(7) med EcoR1 og Not1.

1 CaM kinase med bare EcoR1(8), 1 med bare Not1(9), 1 med GAPDH og vann (10) og tilslutt 1 med bare CaM kinase I $\beta$  og vann(11). Disse siste rørene 8, 9, 10 og 11 skulle fungere som en kontroll på restriksjonsenzymene (linearisert DNA vandrer lenger) og for at vi skulle ha spor på gelen med ukuttet plasmid (10).

Vi sentrifugerte dette raskt ned og lot det stå i 2 t ved 37 °C. 35  $\mu$ l av innholdet i rørene som har stått 2 t i 37 °C taes ut og overføres til nye rør som tilsettes 5 $\mu$ l prøvebuffer 4X (for rør 1-4) og 2,5  $\mu$ l prøvebuffer ( for rør 10-11). Det tilsettes også 20 $\mu$ l bromfenolblått, dette for å se hvor langt gelen har gått. (Bromfenolblått går litt raskere enn proben).

### **Radioaktiv innmerking av probene**

Probene merkes ved hjelp av et kit (Redivue), som inneholder  $^{32}\text{P}$  merket CTP.

Prinsippet er at DNA denatureres slik at vi får enkelttrådet DNA. I reaksjonsrøret har vi ”primer”, nukleotider som binder seg til plasmid promotor område og en DNA polymerase. I tillegg setter vi til en radioaktiv nukleotid, i dette tilfelle CTP. Resultatet er at cytosin, som er radioaktivt merket, inkorporeres i en nysyntetisert DNA tråd.

Dette avgir ved desintegrasjon  $\beta$  stråling (positroner eller elektroner). Som en tommelfingerregel kan vi si at en partikkel med energi på 1MeV har en rekkevidde på en cm i vann. De fleste  $\beta$  partikler har for øvrig en middel energi som er betydelig mindre enn dette. For  $^{32}\text{P}$  er denne 0,7MeV slik at energien absorberes i de ytterste 5 mm av vevet. Når man arbeider med beta radioaktivitet i et rør vil mesteparten av radioaktiviteten bli absorbert i røret og væsken før det når personen. Den største risikoen er derved forbundet med at man ved uhell spiser stoffet.

Prosedyren er enkel. Det som derimot er viktig er likevel at man følger forsiktighetsregler når man jobber med radioaktivt materiale. Man jobber bak en skjerm som stopper  $^{32}\text{P}$  radioaktivitet (plexiglass). Hvis man skal transportere radioaktivt materiale bør man ha minst en armlengdes avstand til dette materialet. Det er viktig at man kontrollerer om arbeidsrommet er blitt kontaminert ved bruk. Dette gjør man ved å måle med en Geigerteller før og etter bruk, både i vask, bak arbeidsbenk og ved sentrifugen. Det er eget utstyr for dette formålet i isotoplåben.

Vi skiller mellom telleutstyr (hvor vi måler antall becquerel og bestemmer strålekvaliteten) og dosemetriutstyr (hvor vi måler stråledoser). Vi kan merke oss at begge typer utstyr forutsetter at *strålingen gir målbare forandringer i et stoff* (en gass, en væske eller et fast stoff).

### **Scintillasjon.**

Enkelte stoffer lyser opp når de treffes av stråling. Lyset kan måles.

Det er mange organiske stoffer som har slike egenskaper. Mest kjent er krystaller av natriumjodid (NaI). Lysglimtet som sendes ut når krystallene blir truffet, varierer i takt med strålingens energi. Tellerne er derfor egnet til å gi informasjon om strålingens energi og til å identifisere ulike isotoper. Scintillasjonstellere gir elektriske pulser som er et mål for strålingsenergien som avsettes i det følsomme volum. Antall pulser per sekund gir et mål for intensiteten. Pulsene forsterkes og filtreres elektronisk.

### **Klargjøring av prøvene.**

Det første man gjør er å fortynne DNA prøvene som skal merkes i en konsentrasjon på 2,5 nM per 45 $\mu\text{l}$  med TE Buffer. Deretter denatureres DNA prøven ved å varme til 95-100 °C i 5 min i kokende vann. Prøvene avkjøles så på is, i 5 min etter denaturering. For å få innholdet ned i bunnen av røret sentrifugerte vi raskt. DNA settes så til reaksjonsrøret. 5 $\mu\text{l}$  med dCTP ( $^{32}\text{P}$ ) settes til og man blander ved å resuspendere opp og ned ca 12 ganger. Man må så inkubere ved 37 °C i 25 min slik at de komplementære DNA trådene kan syntetiseres. Reaksjonen stoppes ved å tilsette 5 $\mu\text{l}$  med 0,2 M EDTA.

Et poeng er at ikke all CTP inkorporeres i DNA. Vi vil derfor ha en del fritt cytosin. Dette vil kunne gi bakgrunnsstøy, slik at båndene ikke blir så fine. Derfor renses alt på en søyle, i vårt tilfelle en G-50 søyle, slik at fritt  $^{32}\text{P}$ -dCTP fjernes.

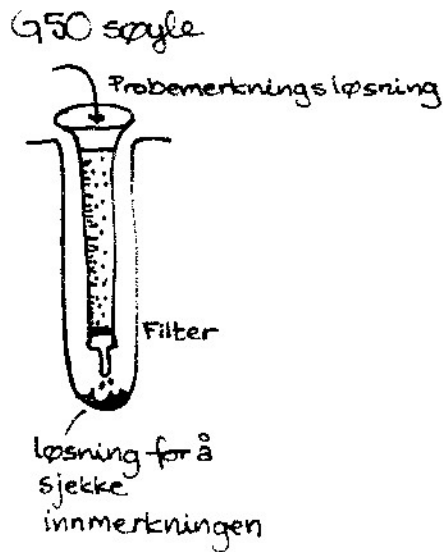


Fig. 6 Skjematisk fremstilling av G50 søyle for rensning av merket probe.

Prinsippet er at de store molekylene går gjennom store porer, mens de små molekylene blir forsinket ved at de blir ledet gjennom mindre porer, der de store molekylene ikke kommer inn (grensen går ved ca 20 basepar). Fritt CTP blir sittende igjen i gelen. G-50 søylen må lages. Vi bruker en 2 ml sprøyte. Et filter brettes til en halvsirkel. Den svarte pakningen på sprøyten fjernet vi. Vi dyttet halvsirkelen nedi med sprøytespissen. Filteret ble dermed sittende nederst i sprøyten. Sephadex G-50 mediet er løst i TE buffer. Vi tilsatte først fra den klare fasen (TE buffer). Deretter tilsatte vi fra den blakkete fasen, dvs G-50 til sprøyten er full (dette krever etterfylling). Søylen spennes ned i 5 min ved maks hastighet for å få søylen godt pakket. Dermed er søylen klar.

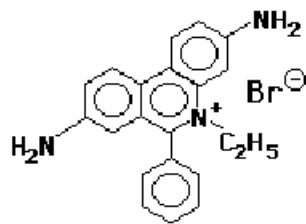
Før søylekjøring taes 1µl ut av prøven for å måle radioaktiviteten i scintillasjonstelleren, for senere å kunne sammenligne med tilsvarende prøve etter søylekjøring. Dette er viktig for å kunne se på innmerkingen dvs. hvor stor mengde av  $^{32}\text{P}$ -CTP, som er blitt brukt i forhold til totalen. Man pleier å si at nedre grense for innmerkingen er 20 %, da man ellers vil få for svake signaler.

De 55 µl fortynnes ved å sette til 100µl med TE buffer. Disse 155µl med probe tilsettes G-50 søylen. Under har vi et Eppendorfrør. For å få ned løsningen må vi spinne i 10 min. Vi får da ca 200µl løsning i Eppendorfrøret (mer TE buffer).

#### **Tillaging av agarosegel.**

Lager 1% gel ved å blande 1g agarose i 100ml TAE buffer (1x fortynnet) i en erlenmeyerkolbe. Vi merker av med tusj (væskestanden) og tilsetter ionebyttet vann til 150 ml. Vi setter flasken i mikrobølgeovn og lar det koke til vannet fordampes til 100ml tusjmerket. Dette tar ca. 7 min.

Kjøøl ned innholdet noe (for at plastkaret ikke skal bøye seg/endre form noe som kunne ført til at gelmassen renner ut) og tilsett etidiumbromid (karsinogent fargestoff som binder seg til DNA/RNA slik at man kan visualisere det under UV-lys ved at det fluorescerer dvs. ved eksitering med ultrafiolett lys)



Etidiumbromid

Gel formen lages ved å teipe dobbelt sideveggene på en 2 vegget plastform. (et 4-sidig plastkar ville hindret strømmen i å passere, da plast isolerer). En kam settes ned i formen før gelen helles oppi.

Gelen bruker ca 30 min på å stivne og bør brukes innen 3 t.

### Gelelektroforese

Gelen settes i et kar med TAE buffer som skal dekke brønnene. Kobler til en strømkrets på 100V. DNA er negativt ladet (fosfatgruppen) og vandrer fra – elektroden til + elektroden.

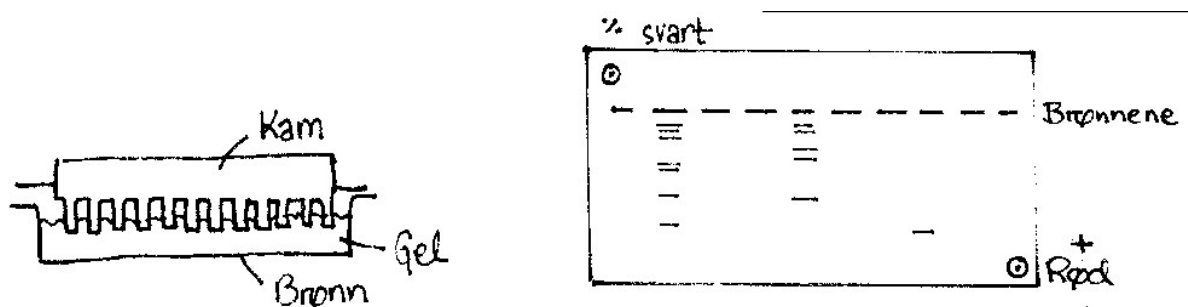


Fig. 4 Skjematiske fremstilling av gelstøping A) og visualisering av DNA fragmenter etter elektroforese vha etidiumbromid. B)

Elektroforese i ½ time til 1 time. Resultatet kontrolleres ved å ta fotografi av gelen som legges over UV lys. DNA båndene lyser opp klart.

Vi velger oss de to klareste båndene til å lage probe av. GAPDH fra rør 2. CaM kinase revers retning fra rør 4.

Vi kutter denne gangen 20 µg.

A) 1µl EcoR1 (20 units), (30µl) buffer 4, (32µl) DNA fra rør 2. (239µl) vann.

B) 1,5µl Not1 (20 units), (1,0 µl) EcoR1, (30µl) buffer Not1-EcoR1 21µl DNA fra rør 4. 246,5 µl vann.

Dette lot vi stå over natten i 37 °C i varmebad. Deretter ble dette kjørt på DNA gel igjen ved 80 volt.

### Isolering av DNA fra gelen.

Gelbiter med DNA båndene ble kuttet ut av gelen. Det ble brukt et kit til dette.

Gelbitene ble kuttet i mindre biter og overført til forhåndsveide 1,5 ml µsentrifugeglass.

Veide eppendorfrøret med innhold og substrater for å finne gelens vekt. Maximum gelvekt for protokollen var 300 mg.

Vi tilsatte 10µl capture buffer for hver 10mg gel. Vi lukket tuben og vortexet kraftig.

Inkuberte ved 60 °C til agarosen var fullstendig løst (5-15 min). Mens vi ventet plasserte vi en GFX kolonne i et GFX samlerør for hver rensing.

Etter at agarosen er fullstendig løst, sentrifuger raskt for å samle alt på bunnen. Overfør prøven til GFX kolonnen. Inkuber ved romtemperatur i 1 min. Sentrifuger prøven i en sentrifuge ved maks hastighet (10.000-16.000 g) i 30 sekunder. Det som renner gjennom kastes. Vi tilsetter deretter 500 µl med vaskebuffer og sentrifugerer ved full hastighet i 30 sek. GFX samlerøret kastes og ett eppendorf rør settes under kolonnen. Vanligvis tilsettes 50 µl med elusjonsbuffer, men vi ønsket mer konsentrert DNA og brukte 25 µl. Inkuber ved romtemperatur i 1 min. Sentrifuger ved maks hastighet i 1 min, for å få rensset DNAet.

### Vurdering av mengden DNA/probe.

Etter isoleringen av DNA fra gelen ble mengden målt spektrofotometrisk og renheten ble vurdert. For å vurdere mengden probe ble det også kjørt en gel, der man sammenlignet med en standard, λ DNA Hind III fordøyd. Dette er en bakteriofag som er isolert fra E.coli λ cl857 S7. DNA isoleres fra fagen og fordøyes med Hind III. Bånd med like mange nukleotider totalt, og dermed lik masse av DNA, vil lyse opp like mye, da mengden etidiumbromid bundet vil være proporsjonell med antall nukleotider. Vi sammenligner CaM kinase Iβ og GAPDH probens intensitet med ett lambda bånd med samme intensitet som vi kjenner størrelsen (antall nukleotider) på.

Vi ønsket å ha 100 ng med probe ut fra målingene spektrofotometrisk. Altså trengte vi 2,5 µl med GAPDH og 4µl CaM kinase Iβ i brønnene. Vi brukte en 4x påsettsbuffer.

Ulike konsentrasjoner av λ DNA Hind III digest ble brukt.

Mengden GAPDH ble funnet å være: totalmasse av λ DNA (i µg) x antall basepar i båndet/antall basepar totalt =  $2 \times 564/48377 = 0,024\mu\text{g} = 24\text{ng}$

Analogt for mengden GAPDH:  $0,25 \times 2027/47813 = 0,011\mu\text{g} = 11\text{ng}$ .

Vi ser at det er en liten forskjell mellom den spektrofotometriske målingen og elektroforesemålingen. Vi velger å bruke den laveste målingen ved senere merking av probene for å være sikre på at vi har nok probe.

## Kapittel 4

### Utførelse av celle eksperiment

Følgende agens ble tilsatt.

Celletype:	Agens:	Konsentrasjon i celleflasken	dag:
GH <sub>1</sub> 2C <sub>1</sub> , GH <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	T3	10 <sup>-6</sup> M	0
GH <sub>1</sub> 2C <sub>1</sub> , GH <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	østradiol	10 <sup>-6</sup> M (løst i 10µl 70% etanol)	0
GH <sub>1</sub> 2C <sub>1</sub> , GH <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	dexametason	10 <sup>-6</sup> M (løst i 10 µl 100% etanol)	0
GH <sub>1</sub> 2C <sub>1</sub> , GH <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	uten tilsetning	-	0
GH <sub>1</sub> 2C <sub>1</sub> , GH <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	med etanol	(10 µl etanol som kontroll)	0
	Mediet skiftes ut og hormonene tilsettes på nytt.		2
GH <sub>1</sub> 2C <sub>1</sub> , GH <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	bromokriptin	5x10 <sup>-5</sup> M	4
GH <sub>1</sub> 2C <sub>1</sub> , GH <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	TRH	10x10 <sup>-6</sup> M	4
GH <sub>1</sub> 2C <sub>1</sub> , GH <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	TPA	10x10 <sup>-4</sup> M	4

Mediet skiftes ut og hormonene tilsettes på nytt.

GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub>, GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>    dexametason                      Se ovenfor                      6

Mediet skiftes ut og hormonene tilsettes på nytt.

GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub>, GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>    Forskolin                      5 x 10<sup>-5</sup>M                      7(15min før høsting)  
GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub>, GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>    Kalsium ionofor 10<sup>-5</sup>M                      7(15 min før for begge + 2t  
før for GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub>)

For å kjøre parallelle forsøk (vi kjører 2 paralleller for alle tilsetningsstoffene) trengs minst 24 flasker GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> og 26 flasker GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub>,

### Praktisk utføring:

Når man tilsetter stoffene bør man prøve å få det jevnt fordelt over cellene, ved å bikke forsiktig på flasken.

-T3: konsentrasjon i utgangsrør, 10<sup>-4</sup>M. Tar ut 100µl direkte, endelig konsentrasjon 10<sup>-6</sup>M.

-Østradiol, Etanol: konsentrasjon i utgangsrør, 10<sup>-3</sup>. Vi må lage en fortykning fordi et lite volum (10µl) er vanskeligere å fordele gjevnt utover celleflasken. Tar ut 540 µl medium og tilsetter 60µl stoff. Tar ut 100µl av dette igjen i hver celleflaske.

For etanol gjelder samme fremgangsmåte. Etanol tilsettes som en kontroll for de stoffene som er løst i etanol for å se på etanols egen virkning.

-Bromokriptin konsentrasjonen i utgangsrørene er 10<sup>-2</sup>M. Det ønskes tilsatt:  $V_i = C_s \times V_s / C_t$   
 $C_t = 5 \cdot 10^{-5} \times 10^{-2} / 10^{-2} = 5 \times 10^{-5} = 50 \mu\text{l}$ . Taes ut direkte.

-TRH konsentrasjonen i utgangsrørene er 5,54x10<sup>-4</sup>M. Det ønskes en sluttkonsentrasjon på 1nM. Vi må ta 18 µl med TRH. Vi lager en fortykning. 100 µl TRH i 900 µl medium. Tar ut 180 µl TRH. For sluttkonsentrasjon på 0,01µM må vi ta ut 1,8 x 10<sup>-1</sup> µl. Ut 1µl TRH, fortynne i 1000µl (1ml). Tar 180 µl ut.

-TPA. Ønsker 10<sup>-6</sup> fra 10<sup>-3</sup>: Tar ut 10 µl og lager fortykning som tidligere.

-Forskolin (10mg i flasken). (M=410,5g.mol<sup>-1</sup>). Ønsker 50µM/l (løst i etanol). Vil ta ut 10µl  $V_t = m_t / M_t \cdot V_i / (V_t C_t)$ . Vi må løse i 480 µl. For å sette til 10 µl bruker vi en fortykning som ovenfor.

-Ca<sup>2+</sup> ionofor. M=523,6. Ønsker 10<sup>-5</sup>M. Vi vil ta ut 10µl (bruker 10x fortykning slik som før-se under østradiol). Må løse de 5mg i 1ml DMSO. Det skal tilsettes kalsium samtidig, slik at vi får ca 1,3 x 10<sup>-3</sup> M i mediet. For å få til dette må vi tilsette 1,9 mg Ca<sup>2+</sup> (M=147 g/mol). Vi tar derfor 190 mg og lager en 1/100 fortykning. Dette løser vi i 5 ml vann. Vi setter så til 50 µl av Ca<sup>2+</sup>løsningen til celleflasken.

## Kapittel 5

### RNA blot (Northern) analyse

#### Tillaging av RNA gel.

Vi brukte først en forenklet metode for å kjøre en rask RNA gel.

Denne metoden er grov og egner seg ikke til nøyaktige RNA undersøkelser.

Vi jobber hele tiden RNase fritt. Vi bruker 1 % agarosegel (1g), 100ml 0,5 TBE buffer. 3 µl etidumbromid. Kok gelen i mikrobølgeovn; fyll opp med vann pga. avdampning. Sett deretter til etidumbromid, og støp gelen. Alt glassutstyr bakes.

2 µg RNA gir tydelige bånd (vi fortynner prøvene slik at vi kan ta ut 1µl) og tilsetter 5 µl loading: 50% glycerol i vann og markør (metylblått), 15 µl TBE buffer og 4 µl vann.

Deretter kjørte vi en normal metode for RNA gel.

300 ml gel består av 216 ml dH<sub>2</sub>O (RNAse fritt)

30 ml 0,2M natriumfosfat buffer pH 7,0.

4,5 g agarose. Merk av på kolben. Tilsett ca 100ml vann til.

Kok i mikrobølgeovn, som ved tillaging av DNA gel.

Avkjøl til 65 °C

Tilsett så 54 ml 37 % formaldehyd (sterilfiltrert). Det er viktig at løsningen er avkjølt ellers vil formaldehyd fordampe. Tilsett 5 µl etidiumbromid.

Tillag gelkaret som ved DNA gel. Polymeriserer etter ca ½ time. Dekk så gelen med 2 mm kjørebuffer (må gjøres innen to timer etter at gelen er laget). Trekk kammen forsiktig ut.

Plasser evt. en svart film under brønnene for å visualisere dem bedre.

### **Tillaging av RNA prøvene.**

Ha alt på is (RNA degraderes lett av RNAser).

Vi ønsker 12,5-50 µg RNA i hver brønn (løst i 1 volumenhet, for eksempel 3µl, brønnene tar maksimalt 45µl).

Vi begynner med denatureringsløsningen (5 volumenheter, f.eks. 15µl), vi tilsetter deretter prøvene.

Vi sentrifugerer raskt. Varmer i 50 °C i 15 min. Kjøles på is i 15 min.

Tilsetter påsettingsbuffer. (1,5 volumenheter, 4,5µl). Sentrifugerer. Appliserer.

Det er også mulig å felle ut RNA'et på nytt før man kjører det på gelen for å få en høyere konsentrasjon av RNA. Dette ble også gjort. Vi tilsatte RNA'se fritt milliQ vann til RNA rørene opp til 40 µl. Deretter hadde vi 100 µl iskald absolutt alkohol oppi rørene før vi tilsatte 14 µl 3 M natriumacetat. Vi satte rørene ned i en -70 °C fryser i 30 min. Så ble rørene sentrifugert 1 min ved full hastighet på bordsentrifuge i romtemperatur før de ble sentrifugert videre i 30 min ved max hastighet på bordsentrifugene på kjølerommet. Nå kunne etanolen forsiktig dekanteres av. RNAet var ferdig felt.

### **Tillaging av løsninger.**

Følgende løsninger er nødvendige når man skal kjøre en RNA gel.

Kjørebuffer. Her brukte vi en 20mM natriumfosfat buffer. Formaldehyd(37 %) ble sterilfiltrert gjennom et 0.22µ filter (veldig finmasket). Vi laget en 10x denatureringsbuffer (50ml) bestående av 200mM Hepes (2,38g), 50mM Na-acetat, 10mM EDTA (sterilfiltrert, 0,22 µ), 40ml RNAse fritt vann. pH ble justert ved å bruke NaOH. Vi fyller opp til 50ml.

Denatureringsløsning (750 µl) lages fersk hver gang. Den består av 12 % (v/v) denatureringsbuffer(90 µl), 60 % (v/v) deionisert formamid (450µl), 7,2 % (v/v) formaldehyd (146µl) og 64 µl vann.

Påsettingsbufferen (lagres ved 4 °C) består av 20 mM Na-fosfatbuffer (pH 7,0), 10 % (v/v) ficoll-400 (1g), 0,25 % (v/v dvs. 0,025g). Dette ble ikke filtrert.

### **Gel elektroforese.**

Det ble brukt en 20mM Na fosfatbuffer (kjøre buffer). Da prøvene ble applisert til brønnene kjørte man først gelen ved 100V (uten igangsetting av pumpen). Prøvene ble da kjørt litt inn i gelen før man skrur på pumpen, da pumpen kunne føre til diffusjon av prøvene i brønnene. Deretter ble RNAet separert ved 45V i ca 16t. Kjørebufferen ble pumpet rundt i karet, av den nevnte peristaltiske pumpen med en flow på 300 ml per t. Pumpen er nødvendig fordi bufferen som brukes i karet er en svak buffer. Uten pumpen vil opphopning av negative ioner ved den positive polen og av positive ved den negative polen gjøre at bufferen ikke fungerer



godt nok. RNA vil dermed kunne degraderes. Et annet problem er at RNA lettere degraderes ved høyere temperatur (f.eks. ved romtemperatur), slik at gelen ideelt sett burde ha blitt kjørt på kjølerom. Dette skaper imidlertid et annet problem fordi det ikke er avtrekk på kjølerommet og formaldehyden som fordampes fra gelen er giftig.

Etter kjøring fotografieres gelen i UV skap. Det sees etter de karakteristiske 18 S og 28 S båndene, som er den lille og den store subenheten av ribosomalt RNA (sees best fordi det er mye av det).

## Kapittel 6

### Kort om bakgrunnen for RNA blot (Northern).

Bruk av RNA blot er en veletablert teknikk som brukes i detekteringen av og kvantifiseringen av spesifikt mRNA i ulike celler og vev. Det er en variant av DNA blot utviklet av Southern *et al.* (1975). Selve Northern teknikken ble utviklet av Alwine *et al.* (1979). RNA blot er en prosedyre der RNA båndene blir overført/blottet fra gelen over til et filter som fikserer RNA. Navnet Northern kommer bare fra et ordspill på Southern (DNA blot). Immun blot (Western) er en tilsvarende metode der protein detekteres/kvantifiseres.

Det er en del viktige vilkår som må oppfylles for å utføre en vellykket Northern: Det første er renheten og integriteten til RNA. Integriteten bevares ved å hindre RNase kontaminering. Renheten får vi ved å bruke fenol (i Trizol) og kloroform, som gir en god separasjon av RNA fra DNA og andre celle komponenter. Et annet poeng er som tidligere beskrevet, nødvendigheten av et denaturerende agens. RNA har nemlig en tendens til å folde seg tilbake på seg selv og danne sekundære strukturer (pga av korte strekninger med komplementære basepar langs RNAets lengde). Disse sekundære strukturene ville påvirke vandringsen av RNA på gelen. Vi brukte formaldehyd, som finnes både i gelen og i prøvene som appliseres. I tillegg ble prøvene varmet opp for å bryte "hårnåls" strukturer i RNA.

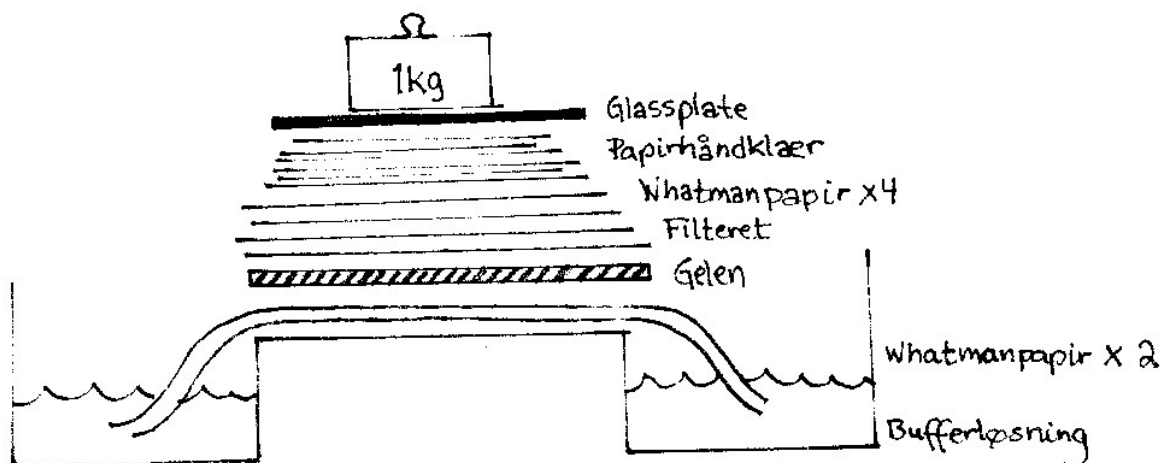


Fig. 5 Skjematisk fremstilling av Northern blotting system. For detaljer se teksten.

Blottingsapparatet fylles opp med 20 x SSC buffer. Det legges en glassplate mellom de to bufferkaret som gelen skal legges oppå. På glassplaten legges 2 tykke Whatmann papir (2mm) fuktet i 20 x SSC. Det er viktig å fjerne all luft ved å rulle over med en pipette, dette for at væsken skal kunne trekke gjennom overalt. Whatmannpapirene må være så lange at de når skikkelig ned i bufferkarrene. Gelen legges så oppå papirene med brønnene vendt ned mot

glassplaten). Nylonfilteret til blottingen (hybond, en positivt ladet nylonmembran) klippes slik at det blir ca  $\frac{1}{2}$  - 1 cm større enn gelen. Filteret legges direkte i 20 x SSC. Gelen dekkes langs kantene av strimler med gammel film, slik at bufferen trekker gjennom de deler av gelen man er interessert i. Fjern all luft ved å rulle over med en pipette. 2 Whatmannpapirer  $\frac{1}{2}$  cm større enn filteret fuktes i 20 x SSC og legges over nylonfilteret. En tykk bunke med papir håndklær legges oppå dette igjen. Deretter legges en glassplate øverst. Til slutt legges en halvflasje med vann på toppen, som skal være litt over  $\frac{1}{2}$  kilo. Det er viktig å sjekke at det er nok buffer i karrene.

Vi lar det hele stå i noen t før vi bytter papirhåndklær som har blitt våte (for at det skal fortsette å trekke igjennom).

Etter 24 t ser vi på filteret om RNAet er overført til filteret.

Filteret gjennomlyses med UV lys i 1min på hver side. Merker samtidig filteret med blyant på den siden RNAet sitter, det vil si den siden RNAet sees dårligst på (evt klippe av et lite hjørne nederst til høyre). Dette ved første inntrykk paradoksale fenomen skyldes sannsynligvis filterets absorpsjonsspekter av elektromagnetisk stråling ( UV-lys passerer dårlig, mens synlig lys passerer lett). Det er viktig å merke hvor brønnene er, 18 S og 28 S båndene og selvfølgelig navn og hva som er på filteret, navn og dato.

Filteret kan pakkes i plast og deretter legges i  $-20^{\circ}\text{C}$  fryser klart til bruk.

## Kapittel 7

### Hybridiseringsprosedyre

Den siste delen av forsøket er hybridiseringsprosedyren. Før prosedyren lager vi 2 x SSC buffer og legger RNA filteret i dette, slik at det blir fuktet på forhånd (da suger det ikke til seg så mye kommersiell hybridiseringsvæske "express hyb", som er dyrt). Det vi gjør da er å vaske filteret med expresshyb (15ml). Dette gjør vi i 30 min ved  $68^{\circ}\text{C}$ . Vi tilsetter så denaturert probe (  $1 \times 10^6$  cpm/ml ekspresshyb, altså  $1,5 \times 10^7$ cpm). Dette inkuberes ved  $68^{\circ}\text{C}$  i 60 min. Vask i 2 x SSC/0,05 % SDS (100ml) i 3x15min ved romtemperatur. Vask deretter i 0,1xSSC/0,1 %S DS (det er viktig å varme opp til  $50^{\circ}\text{C}$  på forhånd) i 2x20 min ved  $50^{\circ}\text{C}$ .

Disse vaskingen ble utført for å vaske bort proben som ikke har hybridisert med mRNAet vårt.

Slik ble løsningen laget:

2,5 ml 20x SSC, 5ml 10% SDS og 492,5 ml vann for 500ml for 0,1xSSC/0,1% SDS.

50 ml 20 x SSC, 2,5 ml 10 % SDS og 447,5 ml vann for 2 x SSC/ 0,05 % SDS).

Filteret ble satt inn i plast og plassert i en "imager PC maskin" som måler /leser av radioaktiviteten.

Stripping av filteret er en metode vi brukte for å renske filteret for probe for så å sette til en annen probe, slik at man kan få flere hybridiseringsresultater fra samme filter. I vårt tilfelle brukte vi GAPDH som standard probe. Å relatere CaM kinase resultatene til en intern standard ville også indikere om det var noe galt med proben eller "kittet" vi hadde brukt. Det vi gjorde var å tilsette 0,5 % SDS i vann ved  $90^{\circ}\text{C}$  i 10 min. Vi ristet underveis og lot kjøle i 10 min. Vi lar ikke filteret tørke. Vi går over til å legge filteret i 2 x SSC buffer.

## Kapittel 8 Resultater

### Metodeutprøvingen.

I forsøksserie I ble følgende metode parametere testet:

A) Fremstilling og kvalitetssikring av RNA i GH celler som funksjon av tid i kultur. GH celler vokser med en generasjonstid på 48 timer og går fra eksponentiell til platåvekstfase etter ca. 7 dager (Fjellheim, 2001). I denne serien rensset vi RNA isolert fra 1-10 dagers kulturer og kvalitetsundersøkte dette. Resultatene er gjengitt i figur 7 og 8 samt i tabell 1 med tekst.

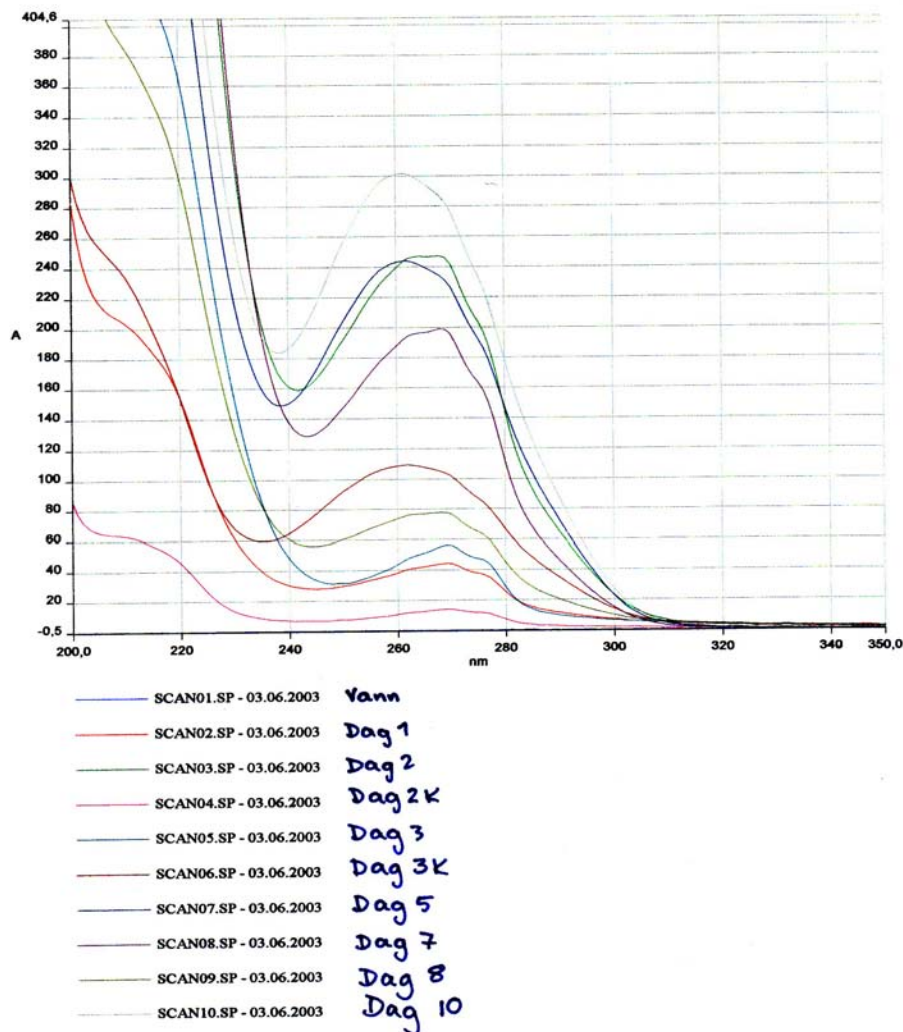


Fig. 7 Optic Density (OD) spektrum av rensset RNA isolert fra GH celler fra dag 1-10. Se under diskusjon/feilkilder for en forklaring på forskyvning av kurvene mot to-puklete kurver.

Ratio 260nm/280nm and RNA Concentration

Method : APPLIC17 Instrument: Lambda 25  
Wavelengths : 260,00 , 280,00 nm Factor: 40  
Date : 03.06.2003 Time : 15:39:59

---

SampleID	A(260nm)	A(280 nm)	Ratio	Dil.Factor	RNA Conc.	Sample Info
RatRNA00	0,0001	-0,000	-0,333	1001,0	4,0040 [µg/mL]	vann
RatRNA01	0,0378	0,0257	1,4691	1001,0	1513,5 [µg/mL]	Dag 1
RatRNA05	0,1088	0,0673	1,6153	1001,0	4354,7 [µg/mL]	Dag 3
RatRNA06	0,2463	0,1534	1,6053	1001,0	9860,6 [µg/mL]	Dag 5
RatRNA07	0,1886	0,1162	1,6238	1001,0	7551,5 [µg/mL]	Dag 7
RatRNA08	0,0737	0,0451	1,6318	1001,0	2949,3 [µg/mL]	Dag 8
RatRNA09	0,2996	0,1850	1,6199	1001,0	11997, [µg/mL]	Dag 10

Tabell 1 RNA per skål i celler som er dyrket fra 1 til 10 døgn. Tabellen viser at RNA mengden per skål er størst dag 5 og dag 10. Dag 8 verdiene ble lavere pga. en teknisk feil.



Dag 1 2 3 5 7 8 10

Fig. 8a Kvalitetsvurdering av RNA isolert fra 1 til 10 dagers cellekulturer viser sterke/tydelige bånd for henholdsvis dag 5 og dag 10 som tegn på vekst av celler samt pågående proteinsyntese. Fremstilling av total RNA etter 2 t elektroforese på agarose gel.

Vi valgte RNA fra dag 5 og dag 10 og gjentok elektroforesen over natt med ulike konsentrasjoner applisert på gelen. Vi tok også med noen prøver fra dag 3 og dag 7. Konsentrasjonen vi appliserte på gelen var henholdsvis 30 µg, 20 µg og 12,5 µg RNA. En standard ble også satt på.

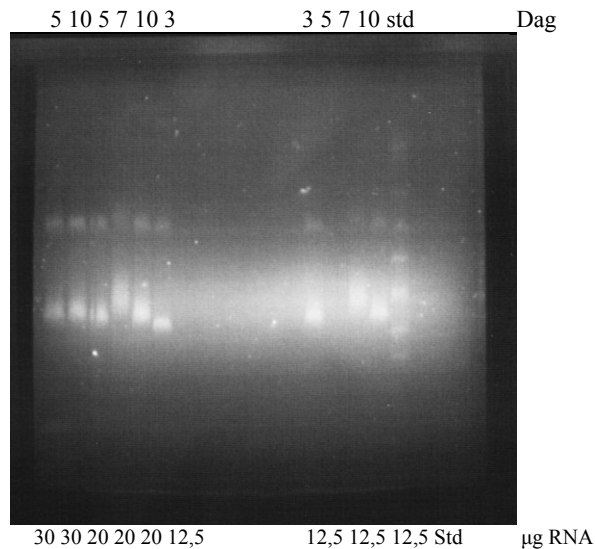


Fig. 8b Fremstilling av total RNA etter 16 t elektroforese på agarosegel med RNA fra dag 3, 5, 7 og 10. MÅ SETTE PÅ BÅND FOR 18 og 28S. RNA er degradert og viser uklare/utsvevende bånd, ”bremsespor”.

B) Fremstilling, kvalitetssikring og hybridisering med prober i Northern blot. Vi ønsket å benytte prober for GAPDH og CaM kinase (i ”sense” og ”antisense” orientering) for å besvare prosjektets oppgave. Bakteriekultur, plasmid isolering, DNA rensing og spalting for å lage probene er utført slik som beskrevet i metod delen. Figurene 9-12 samt tabell 2 viser resultatene som er kort omtalt i tilhørende tekst.

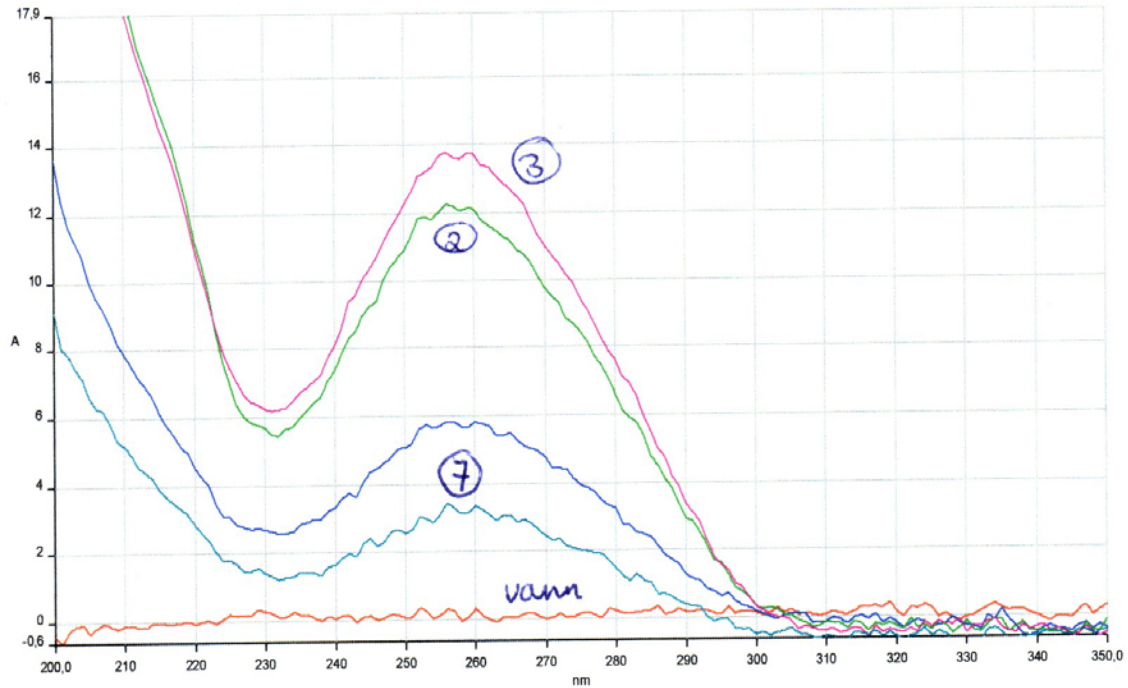
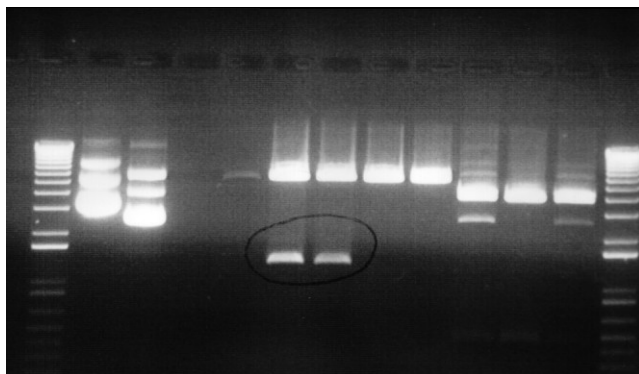


Fig. 9 Spektrofotometrisk kvantitering av RNA ved hjelp av OD avlesning ved 260 nm og 280 nm, probene GAPDH (nr. 2 og 3) og CaM antisense (nr. 7)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 Spor

Fig. 10 Gelkjøring av probene. Spor 1 og 13 er standard. Spor 2 er CaM kinase revers cDNA uten restriksjonsenzymmer og spor 3 er GAPDH uten restriksjonsenzymmer. Spor 4 er CaM kinase I $\beta$  med EcoR 1 mens spor 5 er CaM kinase I $\beta$  med Not 1. Spor 6 og 7 er CaM kinase revers cDNA. Spor 8 og 9 er CaM kinase I $\beta$ . Spor 10, 11 og 12 er GAPDH. CaM kinase I $\beta$  har av en eller annen grunn ikke blitt kuttet. Det ser ut som om CaM kinase revers cDNA proben (1030) og GAPDH proben (450bp) har blitt kuttet greit.

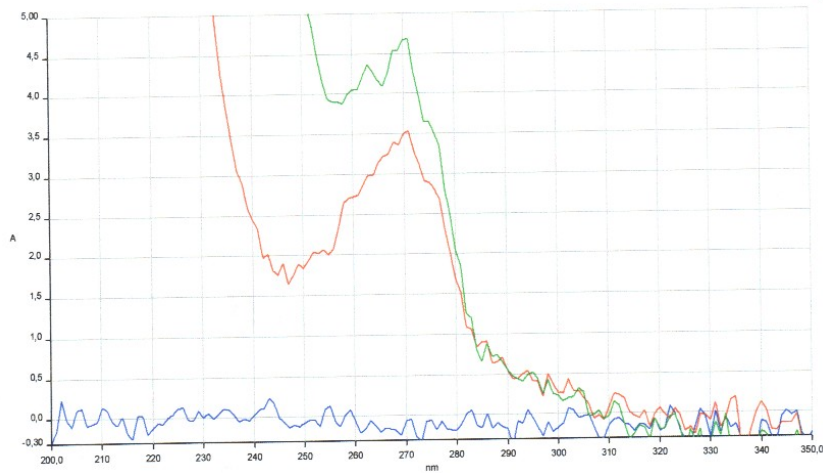
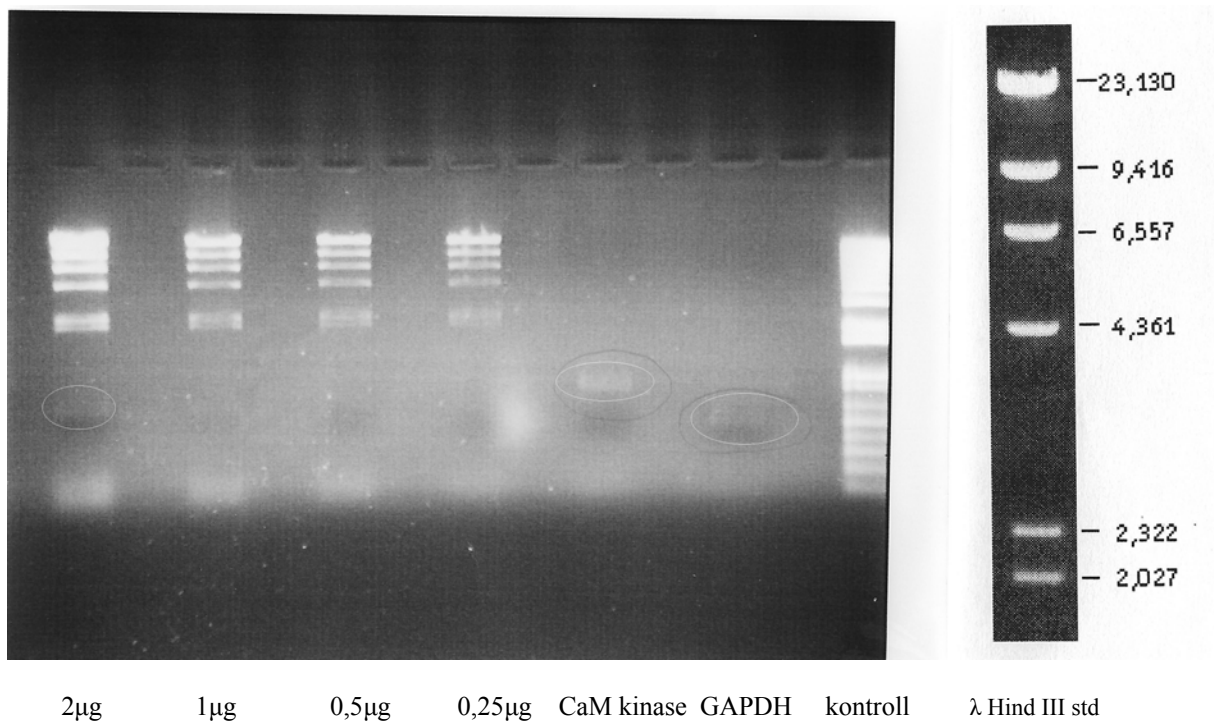


Fig.11 Bestemmelse av mengden CaM kinase cDNA og GAPDH cDNA etter kutting fremstilt ved hjelp av OD spektra. Grønn – GAPDH, rød – CaM kinase revers cDNA og blå – vann.

Prøvens identitet	A(260nm)	A(280nm)	Ratio	DNA konsentrasjon $\mu\text{g/ml}$
Vann	0,0002	-0,000	-1,454	1,6080
GAPDH	0,0042	0,0023	1,8246	41,808
CaM kinase	0,0027	0,0013	1,9851	26,733

Tabell 2 Bestemmelse av mengden probe vha OD.



2 $\mu\text{g}$     1 $\mu\text{g}$     0,5 $\mu\text{g}$     0,25 $\mu\text{g}$     CaM kinase    GAPDH    kontroll     $\lambda$  Hind III std

Fig. 12 Bestemmelse av mengden CaM kinase I $\beta$  revers cDNA ved sammenligning med  $\lambda$  DNA Hind III standard med kjent masse (massesammenligning).

C) Radioaktiv innmerking og opprensing av prober. Innmerking med  $^{14}$ CTP ble utført som beskrevet i metoddelen og resultatene er vist i tabell 3 og i tekst.

Probe	Radioaktivitet før søylekjøring dvs total radiaktivitet (cpm): Rf	Radioaktivitet etter søylekjøring dvs inkorporert i proben (cpm): Re
CaM antisense	$8,1 \cdot 10^5$	$6,9 \cdot 10^4$

Tabell 3 Radioaktiv innmerking av probene.

Vi tok ut 1  $\mu$ l (av 250  $\mu$ l) av den radioaktivt merkede proben før søylekjøring for separering av radioaktivt merket CTP, som et mål på total radioaktivitet. Vi tok så ut 1 $\mu$ l (av 155  $\mu$ l) av den radioaktivt merkede proben etter at fritt cytosin er blitt fanget i filteret.

Ratioen mellom radioaktivitet av proben og totalradioaktivitet sier noe om hvor mye radioaktiv probe vi har fått laget i forhold til tilsatt mengde radioaktivt P. Det er viktig at denne ratioen er høy nok for at vi får nok radioaktiv probe til at resultatene blir tydelige nok ved senere avlesning etter hybridisering.  $Re/Rf \times 250/155$  (respektive volumer\*) =  $6,9 \cdot 10^4 / 8,1 \cdot 10^5 \times 250/155 = 14\%$  var den beste innmerkningen vi fikk.

\*vi må korrigere for volum forskjellen i de to prøvene som vi tok ut 1  $\mu$ l fra.

D) Hybridisering av  $^{14}$ C-merket CaM kinase probe til RNA filter. Hybridiseringen ble utført som omtalt i metoddelen.

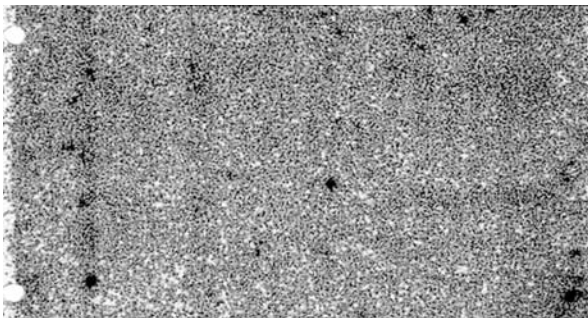


Fig. 13 Mislykket hybridisering med CaM kinase revers cDNA til RNA filter. Forklaring på dette se s. 26.

**Metodeutprøvingen i forsøksserie I resulterte i følgende resultater som vi anvendte i forsøksserie II. Vi lærte oss:**

- Dyrkning av celler i kultur, medium tillaging, subkultivering for senere å høste dem på det tidspunkt der de uttrykte størst mengde RNA, svarende til dag 10.
- Isolering av RNA.
- Plasmid-fremstilling og utkutting vha Eco R1 og Not1 restriksjonsenzymmer for CaM kinase I $\beta$  og EcoR1 for GAPDH. Syntese av probene.



- Bestemmelse av probe mengde vha. ulike metoder.
- Merking av probene med radioaktivt cytosin.
- Støping av gel og elektroforese
- Blotting av resultatene fra gelene over på hybridiseringsfilter.
- Hybridisering, og lesing av resultater.
- Forming av en konklusjon.

## Forsøksserie II

1) Forsøksserie I ble gjentatt og utvidet med cellebehandlings forsøk som beskrevet i metodedelen. I hovedsak ble de samme metodene brukt, men noen forskjeller var det likevel.

- det ble brukt mindre trizol. Trizol er dyrt, og på bakgrunn av andres erfaring ble det bestemt at man kunne bruke 2 ml (fremfor 7,5 ml slik Trizol-kittet ville.)
- RNA gelkjøring ble gjort på 3 t fremfor over natt (da båndene ble brede ved kjøring over natt). Dette ble gjort på kjølerom uten pumpe ved bruk av en annen buffer (MOPS). Prøvene ble kjørt inn ved 80V og deretter kjørt ved 140 V i 3t.
- Det ble kuttet ut nye prober fra et annet plasmid.

2) RNA konsentrasjonen ble målt i alle prøver som tidligere. Fordi det var så mange prøver ble kun enkelte valgt ut til å bli fremstilt grafisk (fig. 16). Figur 16 viser for øvrig kvalitets undersøkelse som forklarer de tidligere RNA spektra.

3) Fig 14 a og b viser hvordan RNA gelelektroforese avslører degradert materiale.



Fig. 14a Slik ser en vellykket Northern gel ut. TEGN PÅ 18 OG 28S.

Størrelse  
(Kb)

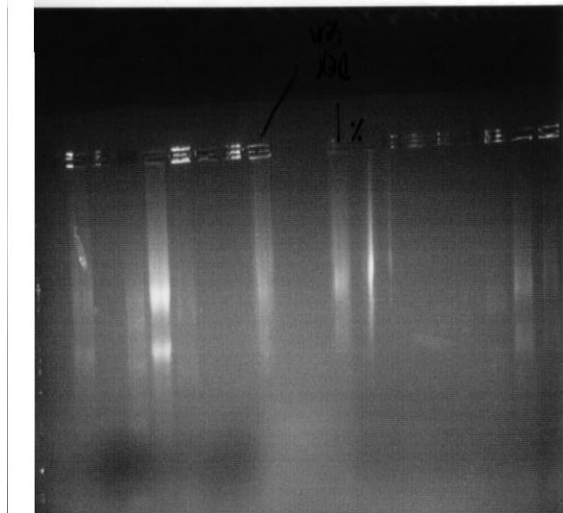


Fig. 14bRNA gel som viser hovedsakelig degradert RNA. Forsøket måtte derfor kjøres på nytt.

4) Celleforsøket ble utført som omtalt i metodedelen slik at GH<sub>1</sub> og GH<sub>4</sub> celler ble behandlet med de oppførte biologisk aktive substansene.

5) Anvendte konsentrasjoner står i metodedelen. 50µg total RNA ble applisert i hver brønn.

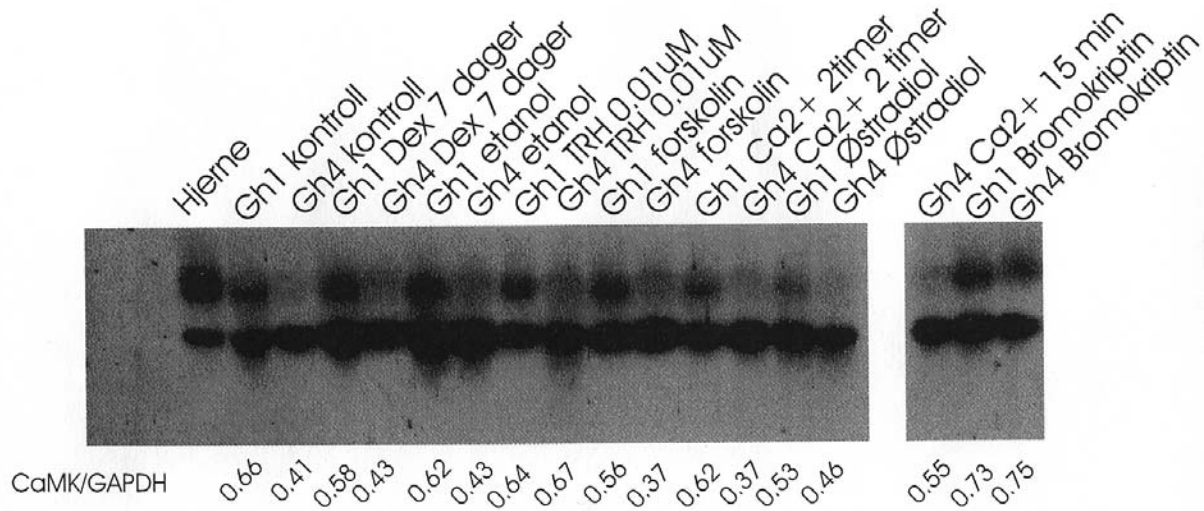


Fig. 15 Northern blot hybridisering med CaM kinase Iβ probe og GAPDH probe fra GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub> og GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> celler etter behandling med overnevnte substanser.

MARKER HVA SOM ER GAPDH (nederste linje) OG CaM (øverste linje). Størrelsen er 1,8 kbp GAPDH.

Bildet gir inntrykk av at GAPDH og CaM kinasen er av ulik lengde. Dette er ikke tilfelle.

Begge ligger på ca 1,8 kbp. Hybridisering med GAPDH ble nemlig foretatt etter stripping av filteret.

### Kommentarer til resultatene vist i figur 15:

- 1) Noe ujevn påsetting av RNA per brønn vist ved varierende GAPDH mengder.
- 2) Mye CaM kinase mRNA i hjernen (inkludert som positiv kontroll).
- 3) Mer CaM kinase i GH<sub>1</sub> enn i GH<sub>4</sub> celler (0.25/0.41 ca. 60 %).
- 4) Dex (7 dagers behandling) påvirker ikke eller lite CaM kinase mRNA nivåene.
- 5) TRH påvirker ikke CaM kinase mRNA i GH<sub>1</sub> celler, men kan ha en liten stimulerende effekt i GH<sub>4</sub> celler <20 %).
- 6) Forskolin har liten eller ingen virkning på CaM kinase genekspressjon.
- 7) Kalsium ionofor og østradiol har liten eller ingen effekt.
- 8) Bromokriptin kan muligens stimulere CaM kinase i GH<sub>4</sub> celler.
- 9)

## Kapittel 8

### Diskusjon/konklusjon/feilkilder.

Vi vil i dette kapitlet vurdere mulige forklaringer på at anvendte metoder ikke fungerte i forsøksserie I.

Vi hadde noen problemer under metodeutprøvingen der CaM kinase I $\beta$  cDNA av en eller annen grunn ikke ble kuttet i det hele tatt (Fig. 10). Det så ut som om CaM kinase revers proben hadde blitt kuttet ut greit (Fig. 10), men det viste seg å ikke være tilfellet da vi senere hybridiserte og proben ikke ville binde seg (Fig. 13). Restriksjonsenzymene vi hadde brukt for å lage probene viste seg å være gale. På grunn av feilinformasjon fra en forskerkollega ble andre restriksjonsenzymene brukt enn de som var tenkt brukt. Dette kan ha ført til at vi kuttet ut et annet område i plasmidet og dermed fikk en annen probe som ikke egnet seg for hybridisering/ikke lot seg hybridisere med CaM kinase I $\beta$  RNAet (fig. 13).

Under isoleringen av RNA etter at cellene var blitt høstet vha. Trizol metoden opplevde vi å få utlevert gale plastrør. Vi skulle ha brukt myke plastrør men fikk harde plastrør som smeltet da kloroformen ble tilsatt. Dermed rant mye av løsningen ut før vi fikk skiftet rør samt at plasten ble oppløst og blandet seg med RNAet og trolig bant dette slik at vi fikk lave konsentrasjoner av RNAet. RNA prøvene var forurenset av plasten og kan være årsaken til at kurvene ved spektrofotometermålingene ble forskjøvet. Vi hadde også en teori om at disse topuklete kurvene kunne skyldes fenol forurensning. For å utprøve denne teorien sammenlignet vi rent RNA som vi isolerte på nytt med "skittent RNA" tilsatt fenol.

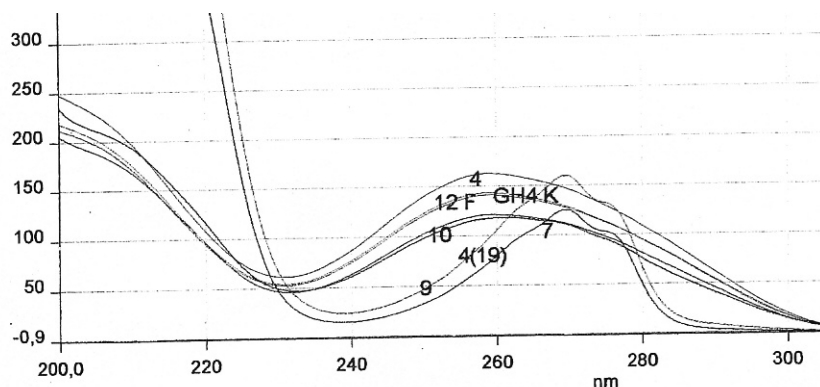


Fig. 16 Hvordan fenol-forurensning påvirker OD-målinger (to topper), mens rent RNA har en jevn topp som ligger rundt 260 nm. LAG PILER PÅ GODT RNA, NORMAL PROFIL OG PHENOL FORURENSET KURVE.

Som tidligere nevnt under metoder er RNA meget skjørt og det er derfor ikke så rart at gelkjøring med forurenset plast-fenol-RNA gav bånd som ikke var fine, men viste degradert RNA. Degradert RNA viste seg som lange bremsespor (Fig. 14b). I samråd med veileder og flere andre fagpersoner ble forsøket derfor avbrutt da det ikke var noen vits i å blotte eller hybridisere med slike ikke-reproduserbare/dårlige resultater.

Forsøket ble kjørt om igjen, og denne gangen gikk alt bra. Det følgende ble resultatet: Forskjellene i den relative mengden av CaM kinase I $\beta$ /GAPDH mRNA for kontrollen og ved tilsetning av de ulike stoffene er ikke signifikant endret (det burde vel minst vært en forskjell på en faktor to). Dette viser at i forhold til husholdsgenet GAPDH har ikke CaM kinase latt seg regulere (i utgangspunktet lar ikke GAPDH seg regulere). Forsøket viser at ekspresjonen av CaM kinase I $\beta$  ikke lar seg regulere av disse stoffene, ved bruk av de metodene som er valgt og ved de konsentrasjonene som ble utprøvd.

Det vi likevel ser er at CaM kinase I $\beta$  uttrykkes i større grad i GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub> enn i GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> celler. GH<sub>1</sub>2C<sub>1</sub> er celler som hovedsakelig skiller ut GH mens GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cellene skiller ut PRL. En

hypotese er da at CaM kinasen kan være involvert i signalveier som er viktige i celler som produserer GH, men som trolig er mindre viktig i celler som produserer prolaktin.

## Avslutning.

Gjennom arbeidet i laboratoriet har vi blitt fortrolige med en rekke viktige metoder innenfor basalforskningen og vi har lært å kjenne et forskermiljø. Det har vært lærerikt å utveksle erfaringer og problemstillinger med de andre ansatte på instituttet, og hyggelig å få oppmuntring når forskningen ikke gikk helt etter planen. Så det ble med forskningen som det ofte sies at det famles litt i blinde og at man plutselig dumper over noe betydningsfullt eller interessant, eller kanskje det stikk motsatte, at man ikke finner noe, selv om man slet seg gjennom mye motgang og uhell med geler og plastrør, og kveldene og nettene blir uendelig lange. Men artig er det, når sant skal sies, og vi er glade for å ha fått denne erfaringen. En stor takk rettes til alle som har tilrettelagt for oss på laben, som har lært oss alt fra celledyrking til hybridisering og som villig har strukket en hjelpende hånd ut når vi trengte det.

## Aknowledgements

Vi ønsker å takke alle som har hjulpet oss i arbeidet med denne oppgaven. En særlig stor takk rettes til Ole Petter Løseth som har vært vår støttespiller i laboratoriet og rettet oppgaven flere ganger før levering. En stor takk rettes også til Åse Karine Fjellheim som har undervist oss i teknikker/metoder og som sammen med Ole Petter Løseth har gitt oss en videre forståelse av hva forskning innebærer. En stor takk rettes også til Zere som har bistått i alle spektrofotometriske målinger og tolkningen av disse. Videre vil vi takke Vigdis Teig Gautvik for kyndige instruksjoner om arbeidet på lab underveis og hjelp utover de sene ettermiddager. Vi vil også takke Marit Nilsen for veiledning på RNA laboratoriet. Takk også til Jorun Tangen som har holdt motet vårt oppe. Sist men ikke minst ønsker vi å takke vår veileder Kaare M. Gautvik som har lagt ned enormt mye arbeid i veiledning og retting av oppgaven. Takk til biokjemisk institutt og takk til sensor Ivar S. Walaas.

Michaël Bodd og Hilde Sand

## Ordliste

**Buffer**-svak syre eller base i et slikt pH område at syren eller basen foreligger i delvis dissosiert tilstand; en kjemisk løsning eller et system som holder en nesten konstant pH verdi tross tilførsel av mindre mengder base eller syre og som ofte består av en svak syre sammen med et salt av samme syre.

**DEX**-forkortelse for dexametason

**DNA**-deoksyribonukleinsyre

**Elektroforese**-partikkelbevegelser i et elektrisk felt, brukes til å separere forskjellige substanser med forskjellig ladning. Skilles ved forskjellig vandringshastighet i det elektriske feltet.

**Geigerteller**-instrument som brukes til detektering og måling av ioniserende stråling.

**GH**-forkortelse for veksthormon

**Hybridisere**-binding mellom to komplementære DNA fragmenter

**Innmerking**-en metode til å føre for eksempel en radioaktiv isotop inn i et molekyl ved hjelp av en kjemisk reaksjon.

**Kinase**-vanlig etterledd i navn på de enzymene som overfører en fosfatgruppe fra et stoff til et annet.

**Klon**-cellefamilie der alle celler har identiske genetiske egenskaper fordi de har blitt til ut fra en eneste celle, i dette tilfellet bakterier som inneholder plasmid med samme gen.

**MOPS** 3-N-morfolino-propansulfonsyre

**Primer**-syntetisk oligonukleotid som er komplementært til en aktuell DNA-kjede og brukes for å starte en polymerasekjedereaksjon.

**PRL**-forkortelse for prolaktin

**Probe**-en radioaktivt merket DNA eller RNA sekvens som brukes som søkefragment for å oppdage eller påvise forekomsten av en komplementær struktur eller sekvens vha forskjellige molekylærbiologiske analysemetoder.

**Restriksjonsenzym**-en gruppe enzymer som spalter nukleinsyrer og nukleotider med høy spesifisitet for enkelte nukleotidsekvenser

**SDS** Sodium dodecyl sulfat

**Spektrofotometri**-kjemisk laboratoriemetode for måling av intensiteten hos ulike bølgelengder av lys som sendes ut eller absorberes av et stoff eller en løsning. En måte å måle konsentrasjonen og indirekte mengden av et stoff gjennom måling av hvor mye av det gjennomstrålete lyset som absorberes av stoffet som er oppløst i væske eller gass.

**SSC** Standard Saline Sitrat

**TBE Buffer** Tris-Borate-EDTA buffer

## Referanser:

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Robert K., Walter P. 1998. *Essential Cell Biology*. New York. Garland Publ. Inc.
- Alwine J. C., Kemp D. J., Parker B. A., Reiser J., Renart J., Stark G. R., Wahl G. M. 1979. Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzoyloxymethyl paper. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5350-5354.
- Braun A. P. and Schulman H. 1995. The multifunctional Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 417-445.
- DeRemer M. F., Saeli R. J., Edelman A. M. 1992. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinases 1 $\alpha$  and 1 $\beta$  from rat brain 1. Identification, purification and structural comparisons. *J. Biol. Chem.* **267**, 13466-13471.
- Fjellheim Å. K., 2001. *Distribusjon og fysiologisk regulering av TRH R1*. Hovedoppgave-Universitetet i Oslo.
- Fujisawa H. 2001. Regulation of the activities of multifunctional Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* **129**, 193-199.
- Gautvik K. M., deLecea L., Gautvik V. T. 1996. Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8733-8738.
- Høvring P. I., Matre V., Fjellheim Å. K., Løseth O. P., Gautvik K. M. 1999. Transcription of the human thyrotropin releasing-hormone receptor-gene analysis of basal promotor elements and glucocorticoid response elements. *Biochem. Bioph. Res. Com.* **257**, 829-834.
- Liu M. Y., Simon M. I. 1996. Regulation by cAMP-dependent protein kinase of a G-protein-mediated phospholipase. *C. Nature.* **382**, 83-87.
- Løseth O. P., Gautvik K. M., Walaas S. I. 2004. Phosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase 1 $\beta$  in vivo and in vitro. In preparation.
- Løseth O. P., Lecea L. de, Calbet M., Danielson P. E., Gautvik V., Høvring P. I., Walaas S. I., Gautvik K. M. 2000. Developmental regulation of two isoforms of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase 1 $\beta$  in rat brain. *Brain Res.* **869**, 137-145.
- Nairn A. C., Picciotto M. R. 1994. Calcium/Calmodulin-dependent protein kinases. *Semin. Cancer Biol.* **5**, 295-303.
- Sun P. Q., Enslin H., Myung P. S. 1994. Differential activation of CREB by Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev.* **8**, 2527-2539.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503.

Tokumitsu H., Enslen H., Soderling T. R. 1995. Characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning and expression of Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 19320-19324.

Towbin H., Staehlin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.

Yokokura H., Terada O., Naito Y., Hidaka H. 1997. Isolation and comparison of rat cDNAs encoding  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent protein kinase 1 isoforms. *Biochim. Biophys. Acta-Prot. Struct. Mol. Enzymol.* **1338**, 8-12.

**Følgende web-sider ble brukt for å finne metoder og lese litt bakgrunnsstoff:**

<http://www.med.uio.no/imb/research/PG-golgi/Metoder/RNA>

<http://home.hio.no/~nilss/gbfaglinker.html>

<http://www.chem.byu.edu/faculty/rlk/research/586.html>

<http://www.med.upenn.edu/micro/alwine.html>

<http://www.msu.ac.th/bio-dept/LB-Medium.htm>

<http://www.neb.com/neb/products/nucleic/301-2.html>