

Genomiske ustabilitetsmekanismer

Konstruksjon og undersøkelse av konsekvensene av en mutasjon i PCNA

Kristine Paulseth Larsen



45 studiepoeng

Masteroppgave i farmasi ved Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013

Genomiske ustabilitetsmekanismer

*Konstruksjon og undersøkelse av
konsekvensene av en mutasjon i PCNA*

Kristine Paulseth Larsen



Masteroppgave i farmasi utført ved
Avdeling for Cellebiologi og Avdeling for Strålingsbiologi
Institutt for Kreftforskning
Det Norske Radiumhospital

Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013

© Kristine Paulseth Larsen

2013

Genomiske ustabilitetsmekanismer

Konstruksjon og undersøkelse av konsekvensene av en mutasjon i PCNA

Veiledere: Kirsten Skarstad og Randi Syljuåsen

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

Sammendrag

En viktig faktor som kan føre til kreftutvikling er genomisk ustabilitet. Genomisk ustabilitet kan være forårsaket av flere faktorer, blant annet økt forekomst av dobbeltrådbrudd, eller at reparasjonsmekanismer i DNA ikke fungerer optimalt. Kollaps av replikasjongsafler fører til dobbeltrådbrudd. Dette kan skje både i prokaryote- og eukaryote celler.

Replisomet til *E. coli* består blant annet av det sirkulære proteinet β -clamp, som har en svært viktig funksjon under DNA-replikasjonen. β -clamp omgir DNA-tråden og sørger for at DNA-polymerase holder seg festet til DNA-tråden under hele replikasjonen. I *Escherichia coli* (*E. coli*) er det observert en mutert form av β -clamp som fører til kromosomal fragmentering (ved bruk av puls-felt gelelektroforese), og at noen av replikasjongsaflene som starter i *oriC* ikke fullfører (ved måling av markørfrekvens ved hjelp av microarray). Denne muterte formen av β -clamp har en endret aminosyre i posisjon 175. Mutasjonen innebærer at histidin (CAC) har blitt endret til tyrosin (TAC). I eukaryote celler er det tilsvarende proteinet PCNA. Ved å sammenligne de tredimensjonale krystallstrukturene til β -clamp og PCNA, ble det funnet ut at histidin i posisjon 175 i *E. coli* tilsvarer histidin i posisjon 44 i PCNA. I denne studien var det ønskelig å lage den tilsvarende mutasjonen i PCNA, og undersøke om mutert PCNA ville føre til DNA-skade og cellesyklusproblemer for en human kreftcellelinje.

Sete-dirigert mutagenese ble benyttet for å lage punktmutasjon i humant PCNA. pKL44 (plasmid med gen som koder for mutant-protein) ble transfektert inn i en human kreftcellelinje. Cellene ble analysert for DNA-skade og cellesyklusproblemer ved hjelp av fluorescensmikroskopi og flowcytometri. Høy transfeksjonseffektivitet var gjennomgående i alle forsøkene hvor pGFP-PCNA (villtype) og pKL44 ble transfektert. I cellene som uttrykte eGFP-PCNAH44Y ble det verken observert DNA-skade eller cellesyklusproblemer som var relatert til mutanten. γ H2AX-signal (doppeltrådbrudd) ble under fluorescensmikroskopering detektert i andre celler enn de cellene som uttrykte GFP-PCNA i S-fase. Det vil si at DNA-skaden ikke var i sammenheng med uttrykk av eGFP-PCNAH44Y i S-fasen. DNA-skade ved uttrykk av genet for pKL44 ble sammenlignet med en positiv kontroll av celler som hadde blitt behandlet med CHK1-hemmeren UCN-01. I en stabilt transfektert cellelinje ble det observert lavere uttrykk av eGFP-PCNAH44Y sammenlignet med eGFP-PCNA. I eventuelle videre studier med pKL44, anbefales det at genet som koder for villtype PCNA i cellelinjen gjøres defekt slik at eGFP-PCNAH44Y blir den eneste PCNA til stede i cellene.

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for Cellebiologi og Avdeling for Strålingsbiologi, Institutt for kreftforskning, Det Norske Radiumhospital fra perioden august 2012 til mai 2013.

Jeg vil først og fremst takke mine to veiledere Kirsten Skarstad og Randi Syljuåsen for en spennende oppgave, og for all veiledning underveis i arbeidet. Jeg vil også takke Solveig Fossum-Raunehaug for god hjelp og korrekturlesing av oppgaven. Takk for god hjelp og støtte til Katrine Bjune som jeg har delt kontor med i denne perioden, og takk til Ida B. Pedersen for at jeg fikk bruke noe av arbeidet ditt i denne oppgaven.

Til slutt vil jeg takke min kjære samboer Lars, og mamma og pappa som alltid er der for meg, og som også har vist interesse for oppgaven min.

Oslo, mai 2013

Kristine Paulseth Larsen

Forkortelser

° C	Grader Celsius
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin trifosfat (Adenosine triphosphate)
CFU	Antall kolonier (Colony forming units)
CAC	Aminosyresekvens for histidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	Og andre (Latin: <i>et alibi</i>)
FBS	Fetal Bovine Serum
GFP	Grønt fluorescerende protein (Green Fluorescent Protein)
<i>in vitro</i>	Prosess som skjer i et reagensrør
IPTG	Isopropyl-thio- β -galaktosid
IRES	Internal Ribosome Entry Site
kb	Kilobase
LB-medium	Luria/Bertani buljong
Mb	Megabaser
MCS	Multipelt kloningssete (Multiple Cloning Site)

ME	Mutageneseeffektivitet
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
min	Minutter
nm	Nanometer
ng	Nanogram
NLS	Nuclear Localization Signal
OD	Optisk tetthet (Optical density)
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerasekjedereaksjon (Polymerase Chain Reaction)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Puro	Puromycin
RPA	Replikasjonsprotein A (Replication Protein A)
rpm	Omdreiningar pr. minutt (Revolutions per minute)
TAC	Aminosyresekvens for tyrosin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Enheter (Units)
V	Volt
X-gal	5-brom-4-klor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Kreft.....	1
1.1.1	Årsaken til kreft.....	1
1.1.2	Hva kjennetegner kreft	1
1.1.3	Genomisk ustabilitet og kreft	2
1.2	Prokaryote celler.....	3
1.2.1	<i>Escherichia coli</i>	4
1.2.2	Cellessyklus	4
1.3	Eukaryote celler.....	5
1.3.1	U2OS cellelinje	5
1.3.2	Cellessyklus	6
1.4	DNA replikasjon.....	7
1.4.1	Initiering av DNA-replikasjon	7
1.4.2	Replisomet.....	8
1.4.3	β -clamp og PCNA	8
1.4.4	Kollaps av replikasjionsgafler	9
1.5	<i>E. coli</i> DnaNH175Y	10
1.5.1	Mutant PCNA.....	12
1.5.2	Hensikt med studien	12
2	Metoder	13
2.1	Cellearbeid med bakterier.....	13
2.1.1	Medium	13
2.1.2	Dyrking av bakterieceller	13
2.1.3	Frysing av bakterieceller	14
2.2	Transformasjon.....	14
2.2.1	Tillaging av elektrokompetente celler.....	14
2.2.2	Transformasjon av elektrokompetente celler	15
2.2.3	Transformasjon av kjemisk kompetente celler.....	16
2.3	Agarose gelelektroforese	16
2.4	Kutting av DNA ved hjelp av restriksjonsenzymet	17
2.5	Sete-dirigert Mutagenese	17

2.6	PCR.....	18
2.7	Etanolpresipitering.....	19
2.8	Dyrking av human cellelinje.....	19
2.8.1	Cellemedium	19
2.8.2	Splitte en human cellelinje	20
2.8.3	Fryse humane celler	20
2.8.4	Telle celler.....	20
2.9	Transfeksjon	21
2.9.1	Transient transfeksjon	22
2.9.2	Stabil transfeksjon	23
2.10	Fiksering av celler.....	23
2.10.1	Fiksering med formaldehyd	23
2.10.2	Fiksering med etanol	23
2.11	Antistoffer og immunofluorescens	24
2.12	Mikroskopering ved bruk av fluorescensmikroskop.....	25
2.12.1	Fluorescens.....	25
2.12.2	Fluorescensmikroskopering	25
2.13	Flowcytometri.....	26
2.13.1	Analyse av flowcytometridata.....	26
3	Resultater.....	30
3.1	Transformasjon av peGFP-PCNA inn i DH10B elektrokompetente celler.....	30
3.1.1	Sjekk av peGFP-PCNA transformert inn i DH10B elektrokompetente celler...	31
3.2	Innføre mutasjon i peGFP-PCNA ved bruk av sete-dirigert mutagenese	32
3.2.1	Primer Design.....	33
3.2.2	PCR, klipping med Dpn I og bestemmelse av mutageneseeffektiviteten	34
3.2.3	Transformasjon av kjemisk kompetente celler.....	35
3.3	Optimalisering av sete-dirigert mutagenese	35
3.3.1	Sjekker PCR-produkt på agarosegel for å undersøke om tilstrekkelig mengde av peGFP-PCNA er produsert.....	35
3.3.2	Transformasjonseffektiviteten til kjemisk kompetente celler	37
3.3.3	Optimalisering ved å bytte til DH10B elektrokompetente celler og bruke økt konsentrasjon av PCR-produkt.....	38
3.3.4	Beregning av mutageneseeffektiviteten	39

3.3.5	Transformasjon med peGFP-PCNA-mutagenesereaksjon.....	40
3.3.6	Sekvensering	41
3.4	GFP-PCNA blir uttrykt i U2OS cellelinje.....	41
3.4.1	GFP-PCNA lokaliserer til kjernen	43
3.4.2	γ H2AX-signal lokaliserer ikke til samme sted som GFP-PCNA.....	44
3.5	Optimalisering av transfeksjonsbetingelser i humane celler	44
3.5.1	Transfeksjon av peGFP-PCNA og pKL44.....	45
3.5.2	Transfeksjon av peGFP-N, β -actin og peGFPPCI-53BP1	46
3.5.3	Transfeksjon av tom GFP-vektor	47
3.5.4	Transfeksjon med mindre mengde DNA gir lavere andel av γ H2AX-positive celler.....	48
3.6	pKL44 fører ikke til endring i cellyklus	49
3.7	pKL44 gir ikke økt DNA-skade	51
3.7.1	γ H2AX	51
3.7.2	pRPA.....	52
3.7.3	Positiv kontroll på DNA-skade	53
3.7.4	Stabilt transfektert cellelinje har færre GFP-positive celler.....	54
4	Diskusjon.....	56
4.1	Konstruksjon av mutant PCNA ved hjelp av sete-dirigert mutagenese	56
4.2	Fluorescensmikroskopi.....	57
4.3	Flowcytometri.....	58
4.3.1	Høy transfeksjonseffektivitet	59
4.3.2	H3p som markør for cellyklusproblemer.....	59
4.3.3	γ H2AX og pRPA som markører for DNA-skade.....	59
4.3.4	Stabilt transfektert cellelinje.....	60
4.4	Konklusjon.....	61
	Litteraturliste	63
	Vedlegg A	67
	Vedlegg B.....	77
	Vedlegg C.....	90

1 Introduksjon

1.1 Kreft

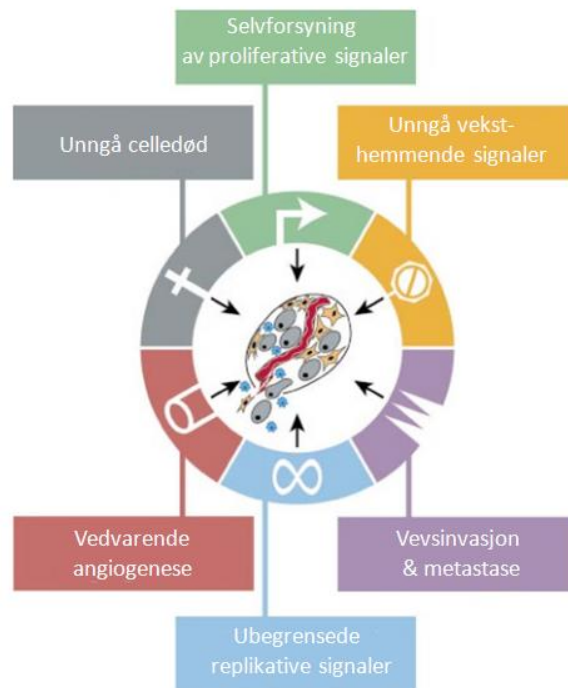
Kreft er den sykdommen som fører til flest dødsfall blant de under 65 år i Norge. I løpet av livet vil hele 4 av 10 nordmenn få kreft i en eller annen form, og av disse vil 1 av 4 dø. Kreftdødeligheten blant menn er noe høyere enn hos kvinner, og kreftformene som fører til flest dødsfall er lungekreft, prostatakreft/brystkreft og tykktarmskreft [1].

1.1.1 Årsaken til kreft

I kroppen vår skjer det hele tiden celledeling og kopiering av arvematerialet slik at begge dattercellene får den samme genetiske informasjonen. Under denne kopieringen av nytt DNA kan mutasjoner oppstå [2]. I tillegg til spontane mutasjoner i DNA, kan DNA bli angrepet av mutagene substanser. Genomet vårt er hele tiden under angrep fra både endogene og eksogene karsinogener. Slike mutasjoner kan over tid føre til kreftutvikling [3]. En mutasjon som oppstår i vekstkontrollerende gener, og samtidig ikke repareres, vil kunne føre til ukontrollert celledeling. Ukontrollert celledeling fører til opphopning av celler som kan begynne å oppføre seg unormalt, det er dette som kjennetegner kreftceller. Kreftcellene kan begynne å spre seg til andre steder i kroppen, og det kalles da for kreft med spredning [4].

1.1.2 Hva kjennetegner kreft

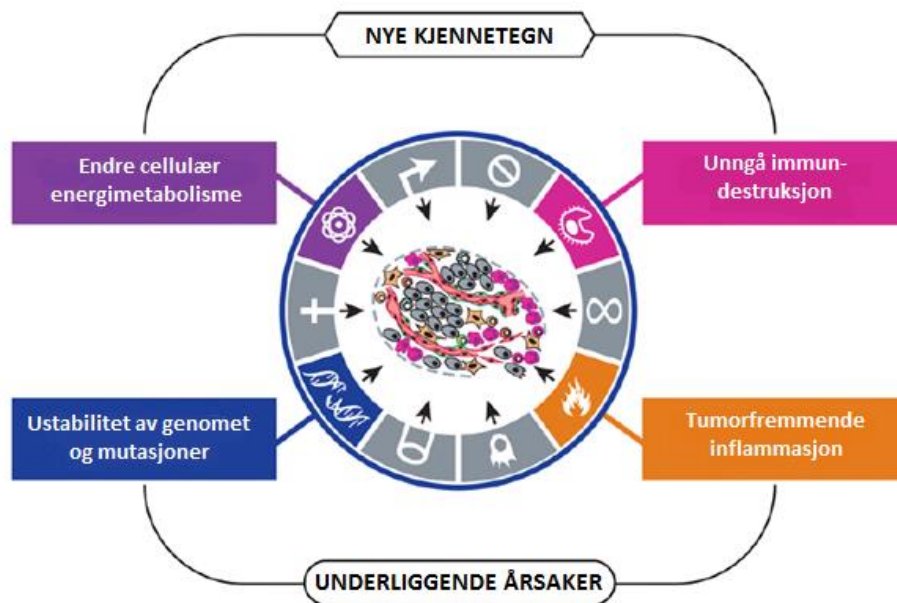
Det er allerede nevnt at kreftceller kjennetegnes ved ukontrollert celledeling, unormal oppførsel og evne til å spre seg til andre organer i kroppen [4]. Men kreft er en mer kompleks sykdom som består av mange flere faktorer. Det er en del faktorer som har kommet til kjenne de siste årene, men fortsatt er det veldig mye som er ukjent. I 2000 publiserte Hanahan og Weinberg en artikkel hvor det ble forslått seks kjennetegn som karakteriserer kreft, og samtidig hvordan disse kjennetegnene sammen kan gi en bedre forståelse for kreft. Disse kjennetegnene er vist i figur 1 [5]. Det har siden den gang blitt forsket videre på disse kjennetegnene, og i 2011 ble det publisert en ny artikkel av de samme forskerne hvor de kom opp med flere kjennetegn som er involvert i patogenesen av kreft. I tillegg ble det foreslått at genomisk ustabilitet og mutasjoner, og tumorfremmende inflammasjon, er underliggende årsaker til kreftutvikling (figur 2) [6].



Figur 1. De seks kjennetegnene på kreft som ble foreslått av Hanahan og Weinberg i 2000. Illustrasjonen er hentet fra samme artikkel (Hallmarks of Cancer 2000) [5]. Teksten er oversatt til norsk.

1.1.3 Genomisk ustabilitet og kreft

I tillegg til at kreftceller inneholder mange mutasjoner, er de også genomisk ustabile. Genomisk ustabilitet betyr at det oppstår mange genomiske endringer i DNA under celledyklus. Ustabilitet av genomet er en av flere viktige årsaker til at kreft utvikles [7]. Genomisk ustabilitet kan skyldes at DNA-reparasjonsmekanismer har redusert effektivitet, eller økt forekomst av kromosombrudd (dobbeltrådbrudd) og rearrangeringer [8]. Cellene har flere mekanismer for å opprettholde den genomiske stabiliteten under celledyklusen [7].



Figur 2. To nye kjennetegn, og underliggende årsaker til kreftutvikling (Hanahan og Weinberg, 2011). Illustrasjonen er hentet fra artikkelen Hallmarks of Cancer: The Next Generation fra 2011 [6]. Teksten er oversatt til norsk.

1.2 Prokaryote celler

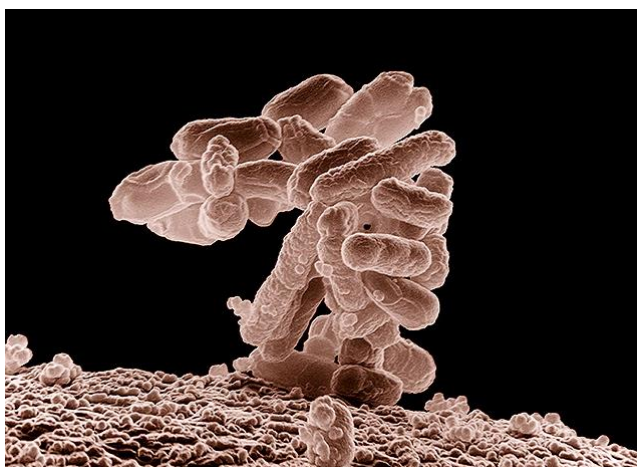
Prokaryoter brukes som en fellesbetegnelse på bakterier, *Bacteria*, og arkebakterier, *Archaea*.

Bakterier kan inndeles i gram positive og gram negative etter Gram farge-reaksjon. Ved mikroskopering av bakterier som er Gram-farget vil bakterien enten farge rosa (gram negativ) eller lilla (gram positiv), fargen avhenger av strukturen til celleveggen [9]. Celleveggen beskytter bakterien. Den gram positive celleveggen er tykkere og består hovedsakelig av peptidoglykan, men har samtidig en enklere oppbygning enn den gram negative. Gram negative bakterier har et tynt peptidoglykanlag, periplasma og en yttermembran [10]. Bakterier har verken cellekjerne eller organeller, men har en cellevegg, en cytoplasmisk membran, cytoplasma, ribosomer, DNA, og kan ha ett eller flere plasmider. Et plasmid er et ekstrakromosomalt element som ikke er essensielt for vekst av bakterien. Plasmider er ofte en bærer av antibiotikaresistens.

Forskjellige typer bakterier varierer både i størrelse og form. Formen kan blant annet være rund, stavformet eller spiralformet [10].

1.2.1 *Escherichia coli*

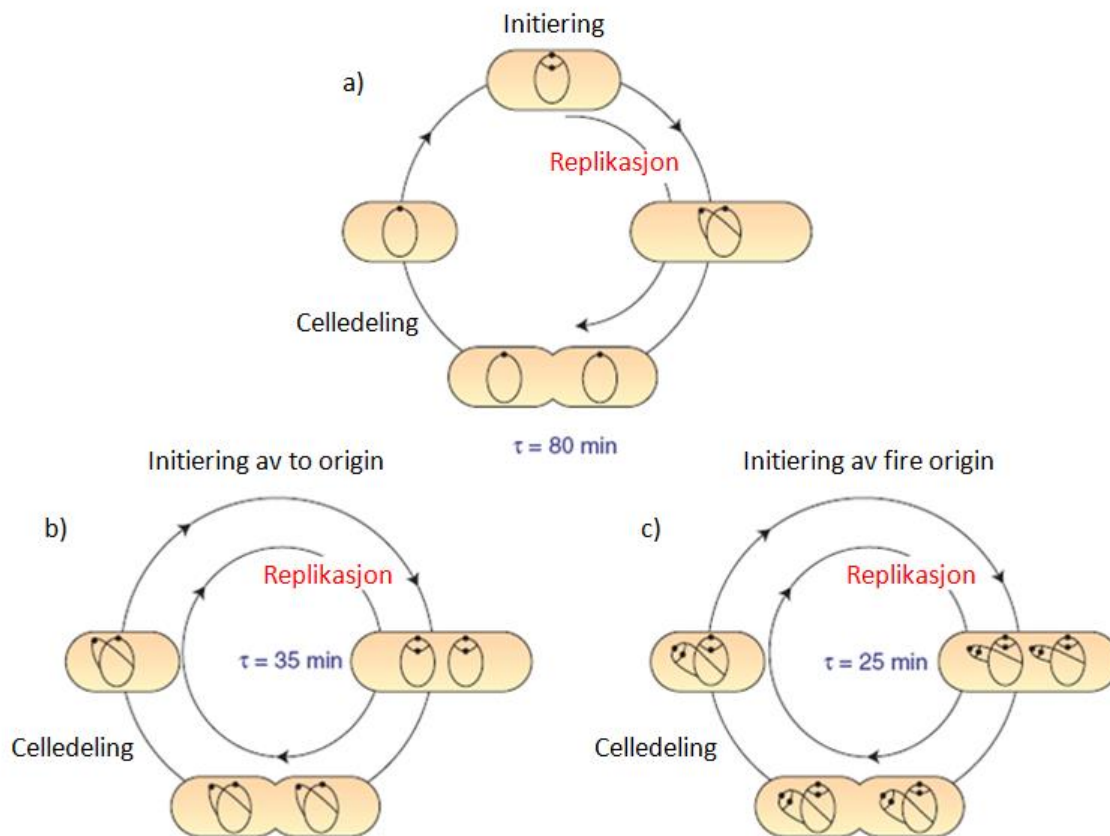
Escherichia coli, *E. coli*, er en gram-negativ, fakulativt anaerob stavbakterie som første gang ble beskrevet av Theodor Escherich, derav navnet, i 1885. *E. coli* er den organismen som er mest studert, som det finnes mest kunnskap om, og brukes av den grunn som en modellorganisme [10] [11]. *E. coli* har en viktig oppgave i fordøyelsessystemet vårt da den er del av normalfloraen, men den kan også forårsake alvorlig sykdom. Det finnes mange serotyper av *E. coli* som produserer potente enterotoksiner. De mest kjente typene er EHEC, EPEC og ETEC [10].



Figur 3. Ansamling av *E. coli*. Hver stav er en enkeltbakterie [12].

1.2.2 Cellesyklus

Figur 4 viser cellesyklusen til *E. coli* når cellene vokser sakte (a), og når de vokser raskt (b og c). Hvor raskt cellene vokser, avhenger av mediumet de vokser i. En celle med sakte vekst vil ha ett enkelt kromosom hvor en replikasjongsaffel vil bevege seg i hver sin retning fra originet, *oriC*. Det vil dannes to nye kromosomer hvor hvert kromosom har en ny og en gammel DNA-tråd. Replikasjonen av hele kromosomet tar 40-50 minutter. Cellene vokser raskt i rikt medium og har da overlappende replikasjonssykluser [13].



Figur 4. Cellesyklus *E.coli*. a: saktevoksende celle med et kromosom. b og c: celler i rikt medium som vokser raskt og med overlappende replikasjonsyklusler [13]. Teksten er oversatt til norsk.

1.3 Eukaryote celler

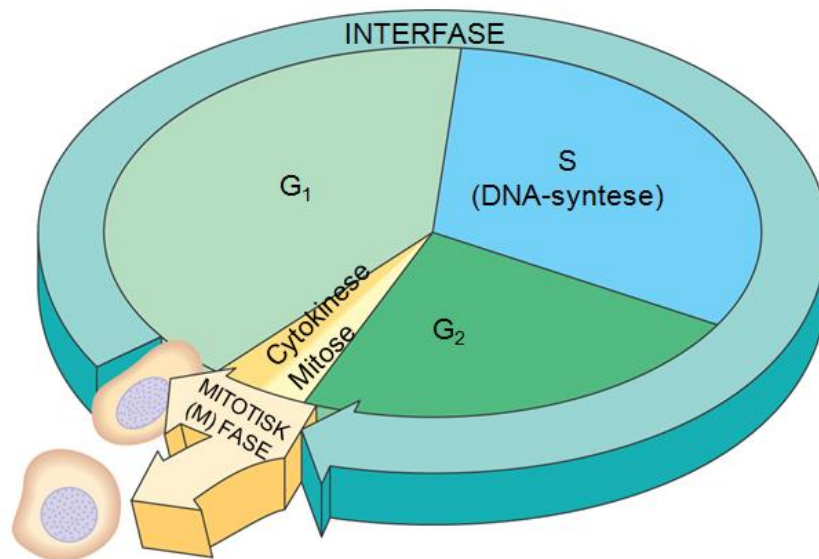
Eukaryote celler har i likhet med bakterier en cytoplasmisk membran, cytoplasma og ribosomer. Eukaryote celler har organeller, og DNA befinner seg i cellekjernen med en beskyttende cellemembran. I tillegg til mammalske celler, går også gjær og planteceller under fellesbetegnelsen eukaryote celler, eller *Eukarya* [10].

1.3.1 U2OS cellelinje

Human osteosarcoma U2OS cellelinje er en av de første cellelinjene som ble isolert. Osteosarcoma er en malign tumor som oppstår i benvev hos barn og unge voksne, og hos de over 60 år. Det var i 1964 at denne cellelinjen første gang ble avledet fra en 15 år gammel jente med sarkom, og har siden blitt brukt mye innenfor forskning [14].

1.3.2 Cellesyklus

Cellessyklusen til eukaryote celler er inndelt i fire faser som er vist i figur 5. S-, G₁- og G₂-fasen kalles for interfase, og i den siste fasen, M-fasen, foregår mitosen og cytokinesen. I S-fasen blir cellens DNA replikert, i G₁- og G₂-fasen vokser cellen og dobler sine cytoplasmiske organeller, og i M-fasen skjer selve celledelingen. Det er cytoskjelettet som står for deling av kjernen (mitose) og den cytoplasmiske delingen (cytokinese) [8].



Figur 5. Cellesyklusen i humane celler. Interfasen med G₁-, S-, og G₂-fasen. Mitotisk (M) fase bestående av cytokinesen og mitosen [15]. Teksten er endret til norsk.

Cellessyklusen har flere sjekkpunkter som kontrollerer cellen underveis. Sjekkpunktene avgjør om cellen kan gå videre til neste fase i syklusen, eller om cellen må bli værende for å rette eventuelle feil. Disse sjekkpunktene er ment for å forhindre endringer av genomet. G₁/S-sjekkpunktet forhindrer ødelagte celler å gå inn i S-fasen. G₂/M-sjekkpunktet forhindrer cellene i å entre mitosen for tidlig. Andre sjekkpunkter er intra-S-, mitotisk spindel- og post-mitotisk sjekkpunkt [7] [8]. Alle disse sjekkpunktene er viktig for å forhindre genomisk ustabilitet [7].

1.4 DNA replikasjon

Før en celle kan dele seg må arvematerialet kopieres slik at begge dattercellene får den samme genetiske informasjonen, dette skjer ved DNA-replikasjon. Replikasjonen av genomet til bakterier tar kortere tid enn genomet til eukaryote celler. Eukaryote celler har et mye større genom som tar lengre tid å replikere, i tillegg beveger replikasjonsmaskinen seg saktere langs DNA-tråden [16].

1.4.1 Initierting av DNA-replikasjon

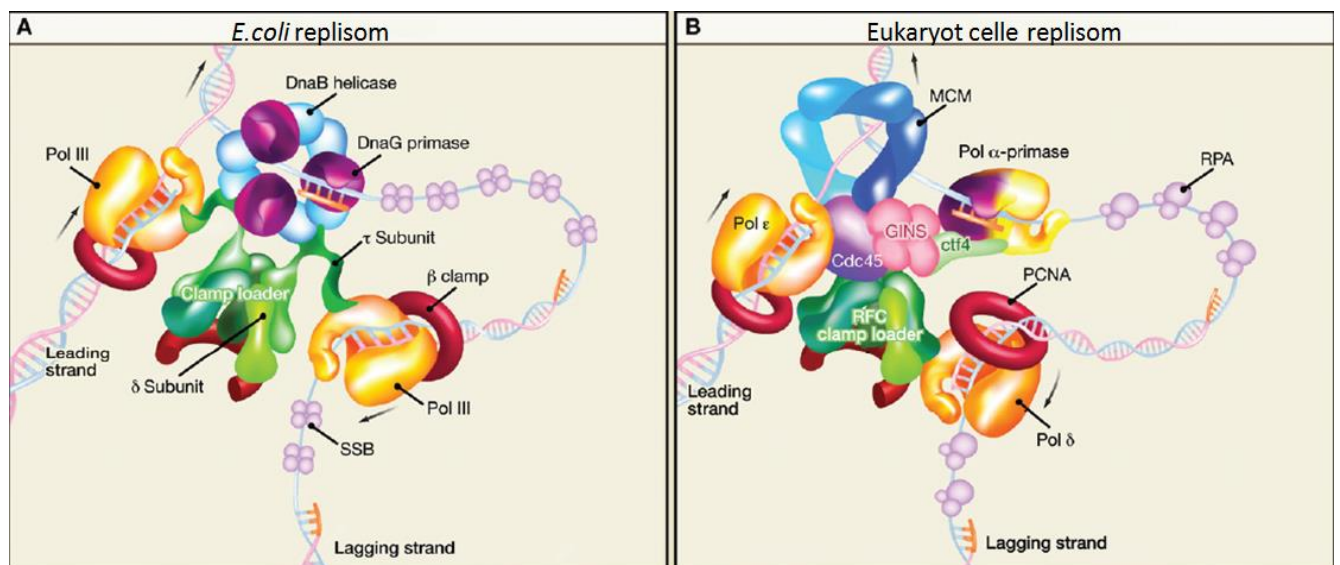
Før replikasjonen av DNA kan starte må en rekke proteiner binde seg til kromosomets origin. De origin-bindende proteiner tilhører AAA⁺ (ATPase Assosiert med diverse cellulære Aktiviteter) proteinfamilien, og aktiverer originet. I bakterier heter dette proteinet DnaA, og i eukaryote celler ORC (origin replikasjonskompleks) [17] [16]. Forskjellen mellom bakterier og eukaryote celler er at bakterier kun har et origin hvor en replikasjongaffel beveger seg i hver sin retning fra dette originet, mens eukaryote celler har flere origin og dermed flere replikasjongaffer. DNA helikase, DnaB (*E. coli*) og MCM (eukaryote celler), binder seg til originet ved hjelp av henholdsvis DnaC og Cdt1. Etter at helikase er bundet frigis DnaC og Cdt1 fra dette komplekset ved ATP-hydrolyse, og helikasen aktiveres. Den aktiverte helikasen vil bevege seg langs DNA-tråden og åpne opp DNA-trådene ved å bryte hydrogenbindingene mellom de komplementære basene. Binding og aktivering av helikase er nøye regulert i cellen slik at initierting av originet bare skjer en gang pr. cellesyklus. I *E. coli* kontrolleres dette ved at SeqA sekvestrerer originet, og forhindrer tilgang til DnaA. SeqA binder kun til hemimetylerte GATC-seter [16]. DNA-tråden er hemimetylert bare en kort periode rett etter DNA-replikasjonen. Hemimetylert DNA vil si at kun den ene av de to DNA-trådene (foreldretråden) har metylgrupper i posisjon N⁶ på adenin. Dam (DNA adenin metyltransferase) (kodet av *dam E.coli* genet) er et enzym som binder seg til DNA, og remetylerer den hemimetylerte tråden ved å sette på metylgrupper på GATC-setene. Remetyleringen hemmes derimot når SeqA binder seg, men så snart SeqA frigjøres kan Dam remetylere hemimetylert DNA [18] [19].

I eukaryote celler reguleres initiertingen på en helt annen måte. Eukaryote celler har CDK (cyklin-avhengig kinase) mediert kontroll. Det vil si at både aktivering og inaktivering av initiertingsproteiner under S-fase kontrolleres av CDK-kinaser [17]. I tillegg kan det se ut til at CDK-kinaser også sørger for at de ulike prosessene skjer til riktig tid i S-fasen [20].

1.4.2 Replisomet

DNA-replikasjonen foregår ved at cellen bruker en replikasjonsmaskin som kalles for et replisom. Replisomet består av helikase, primase, polymerase, sliding clamp, og en clamp loader. Fra kromosomets origin beveger to replikasjonsgafler seg langs DNA-tråden i hver sin retning. Som tidligere nevnt åpner helikase opp den gamle DNA-tråden, primase danner en kort RNA-primer, polymerasen syntetiserer nytt DNA ved å bruke den gamle tråden som templat for to nye tråder, og det glidende, ringformede proteinet (sliding clamp) sørger for at polymerasen er godt festet til DNA-tråden under replikasjonen [8] [21].

Figur 6 viser replisomet til *E. coli* og eukaryote celler. DNA-replikasjonen foregår på samme måte i *E. coli* og eukaryote celler. Replisomene har ulike proteiner, men de har stort sett de samme oppgavene under replikasjonen. Replisomet til eukaryote celler har i tillegg noen proteiner som ikke er til stede i *E. coli*, funksjonen til alle disse proteinene er ikke fullstendig kjent [22].

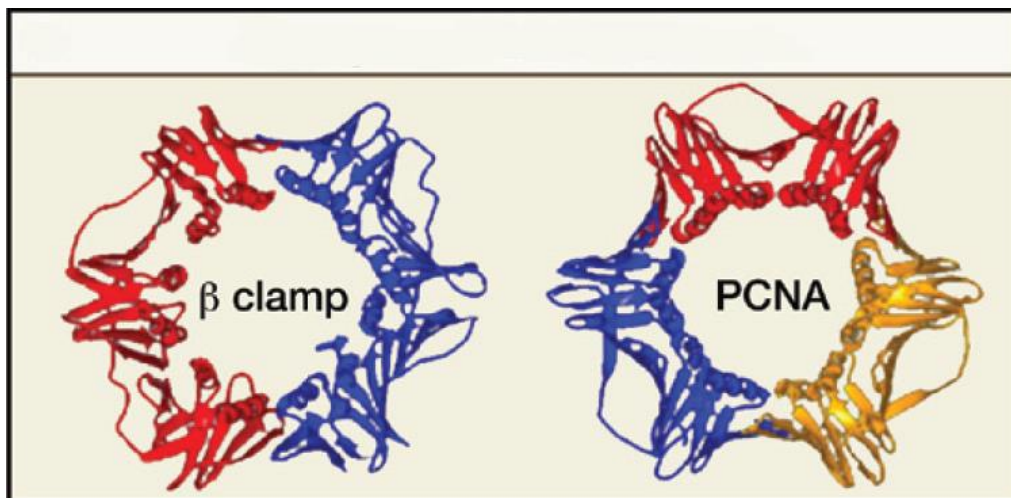


Figur 6. Replisomet til *E. coli* og eukaryote celler [22].

1.4.3 β-clamp og PCNA

β-clamp og PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) er to ulike proteiner med den samme funksjonen i henholdsvis *E. coli* og humane celler [22]. De tilhører DNA sliding clamp familien [23]. Proteinene har en viktig funksjon i DNA-replikasjonen ved at de omgir DNA-tråden, og sørger for at polymerasen holder seg festet til DNA-tråden. De sørger dermed for

en rask og proressiv replikasjon. I tillegg til denne funksjonen har de også en rolle i andre metabolske prosesser [24]. PCNA har blant annet en viktig rolle ved å binde proteiner som er en viktig del av DNA-skaderesponsen. PCNA bidrar dermed til å sørge for et stabilt genom [25]. Strukturmessig er β -clamp og PCNA like ved at de er ringformede, med en positiv indre overflate, og en negativ ytre overflate. Den positive indre overflaten gjør at clampen kan danne bindinger med negativt ladet DNA. Krystallstrukturen (figur 7) til β -clamp viser at den er en homodimer [26], mens PCNA er en homotrimer [27].



Figur 7. Krystallstruktur av β -clamp og PCNA. β -clamp er en dimer og PCNA er en trimer [22].

1.4.4 Kollaps av replikasjongsaffler

Replikasjongsaffelen er helt essensiell for at nytt DNA skal dannes. Det er observert at replikasjongsaffler kan kollapse som følge av en skade på DNA, og at gaffelkollapser kan føre til et ustabil genom. Under syntetiseringen av nytt DNA kan replikasjongsaffelen møte på et brudd i den gamle DNA-tråden [28]. Enkeltråddbrudd oppstår ofte i nærheten av replikasjongsaffelen hvor tråden enda ikke har blitt replikert [3]. Dersom dette tråddbruddet ikke repareres i tide vil gaffelen kollapse, som vil føre til dobbeltråddbrudd av den nye DNA-tråden [28]. I eukaryote celler er det målt at det skjer ti dobbeltråddbrudd pr. cellesyklus når cellen er i S-fase, men heldigvis har cellene reparasjonsmekanismer som reparerer de fleste av disse bruddene [3]. Kollaps av replikasjongsaffler kan skje både i prokaryote- og eukaryote celler.

Det er flere måter å detektere en eventuell gaffelkollaps på. I denne studien er det brukt antistoffer med fluorescerende egenskaper mot γ H2AX og pRPA. Disse vil kunne gi en indikasjon på om det er DNA-skade blant cellene som studeres.

1.4.4.1 γ H2AX

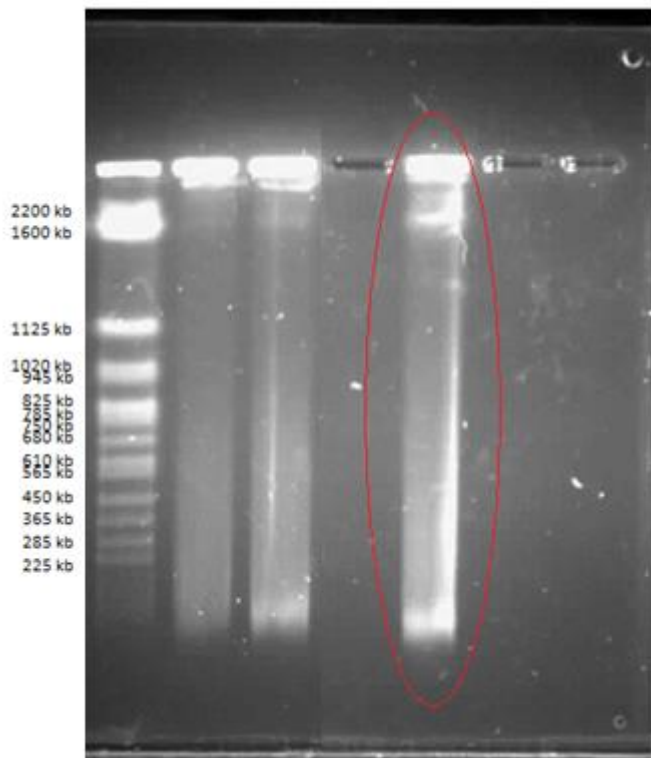
H2AX er medlem av histon H2A familien. Ved dobbeltrådbrudd blir H2AX raskt fosforylert. H2AX som er fosforylert på Serine 139 kalles " γ H2AX". γ H2AX dannes på steder hvor det er dobbeltrådbrudd. På det samme stedet vil også andre proteiner som deltar i DNA-reparasjonsmekanismen samle seg [29]. Ved å bruke antistoff mot γ H2AX kan man få et kvantitativt mål på mengde dobbeltrådbrudd ved å kjøre flowcytometri. Lokaliseringen av dobbeltrådbruddene kan ses på i et fluorescensmikroskop.

1.4.4.2 pRPA

RPA er en forkortelse for replikasjonsfaktor A. RPA er et enkelttrådet DNA-bindingsprotein som består av tre subenheter, RPA1, RPA2 og RPA3. RPA har en viktig rolle under DNA-replikasjonen, men også i reparasjon av ødelagt DNA og i andre metabolske prosesser. Ved DNA-skade skjer det fosforylering av RPA2 [30] [31].

1.5 *E. coli* DnaNH175Y

Kirsten Skarstad sin forskningsgruppe studerer forskjellige β -clamp mutanter. En av disse mutasjonene (DnaNH175Y) har vist seg å forårsake kromosomal fragmentering i *E. coli*. Ved kromosomal fragmentering skjer det brudd i DNA-tråden som resulterer i at det dannes flere DNA-fragmenter. Kromosomal fragmentering kan være forårsaket av flere hendelser. Både dobbeltrådbrudd og kollaps av replikasjongs-gaffelen vil kunne føre til fragmentering av et sirkulært kromosom [32]. Aminosyren histidin (CAC) ble endret til tyrosin (TAC). Vedlegg C1 viser DnaN (β -clamp villtype) som er sammenlignet med DnaNH175Y β -clamp mutant). Puls-felt gelelektroforese ble brukt for å undersøke den kromosomale fragmenteringen til DnaNH175Y (figur 8). Puls-felt gelelektroforese er en metode som brukes for å separere større DNA-molekyler enn hva den vanlige gelelektroforesen er i stand til (opp til ca. 5 Mb). DNA beveger seg fra en negativ pol mot en positiv pol, men underveis vil spenningen skifte retning. Dette kan etterpå detekteres på en gel [33].



Figur 8. Kromosomal fragmentering av β -clamp mutanten DnaNH175Y. Fra venstre: standarden *S. Cerevisiae*; AB1157 (villtype); SK129 (RecBC); β -clamp mutant DnaNH175Y (markert med rød ring). Forsøket ble utført av Ida B. Pedersen.

Stammen som ble benyttet hadde defekt RecBC for å kunne se den kromosomale fragmenteringen, da RecBC degraderer DNA. Bildet av gelen (figur 8) viser at β -clamp mutanten (DnaNH175Y) har en tydelig kromosomal fragmentering. Fragmentene har varierende størrelse (Ida B. Pedersen, upubliserte resultater).

Kromosomal microarray ble også brukt i undersøkelsene av DnaNH175Y. Denne studien indikerte at start av replikasjonen skjedde normalt, men at det var mange gafler som aldri nådde fram til terminus (T. Waldminghaus og K. Skarstad, upubliserte resultater).

1.5.1 Mutant PCNA

β -clamp proteinet har en bindingslomme som danner kontakter med ulike proteiner (polymeraser, MutS, Hda). Aminosyre histidin 175 er av de mindre viktige kontaktpunktene i dette bindingsmotifet. Den tilsvarende aminosyren i humant PCNA er histidin 44. Den tilsvarende posisjonen ble funnet ved å sammenligne de tredimensjonale krystallstrukturene med hverandre (personlig kontakt med Bjørn Dalhus, Rikshospitalet). Aminosyre 44 i humant PCNA ble mutert, CAC (histidin) ble endret til TAC (tyrosin).

Som tidligere nevnt (1.4.3 β -clamp og PCNA) er β -clamp en dimer, mens PCNA er en trimer. Den tilsvarende mutasjonen i PCNA vil føre til en endring tre steder i clampen (trimer) til forskjell fra β -clamp hvor endringen er to steder (dimer).

1.5.2 Hensikt med studien

På bakgrunn av resultatene i forsøkene med *E. coli* (β -clamp mutant DnaNH175Y) var det ønskelig å undersøke hvilke konsekvenser en tilsvarende mutasjon i PCNA ville ha. Dette ble utført ved å lage en punktmutasjon i humant PCNA (CAC \rightarrow TAC) ved bruk av plasmidet peGFP-PCNA (figur 15) og ved hjelp av sete-dirigert mutagenese. peGFP-PCNA mutanten ble transfektert inn i en human kreftcellelinje, og analysert ved bruk av fluorescensmikroskopi og flowcytometri.

2 Metoder

2.1 Cellaarbeid med bakterier

2.1.1 Medium

For at bakterieceller skal kunne vokse og dele seg trenger de et medium med nødvendige næringsstoffer. Det finnes forskjellige typer medium bestående av ulike mengder og typer av næringsstoffer. Hvilket medium som benyttes avhenger av bakteriestammen. Nødvendige næringsstoffer kan blant annet være karbon, kalium, jern og spormetaller, vitaminer og aminosyrer [10]. Medium som ble brukt i denne studien var LB-, LB lavsalt- og SOC-medium (vedlegg A8).

2.1.2 Dyrking av bakterieceller

Bakterier kan dyrkes i kultur eller på agar-skåler. I denne studien ble *E. coli* dyrket. Dersom man ønsker en suspensjon med bakterieceller, dyrkes cellene i et vekstrør eller i en glasskolbe med medium (vedlegg B1). For å få enkeltkolonier av bakterier må de dyrkes på en skål med agar. Metoden for å dyrke enkeltkolonier av *E. coli* i denne studien ble gjort ved å pipettere celleduspensjonen (100 μ l) på toppen av en LB-agarplate slik at det ble dannet bakteriekolonier etter 16-18 timer inkubering ved 37 ° C [10]. LB-agaren varmes opp ved lav styrke i mikrobølgeovnen til det er klumpfritt. Antibiotika, ampicillin (100 mg/ml) som ble brukt i denne studien, tilsettes til kultur eller agarplate. Ampicillin tilsettes glasskolben med LB-agar når kolben er kald nok til å holde i, men før agaren begynner å klumpe seg igjen (ca. 50 ° C) (vedlegg B2). Hvilket antibiotikum som brukes avhenger av hvilket antibiotikum bakteriestammen har resistensgener for. Det kan også tilsettes andre reagenser til agaren hvis det er ønskelig å selektere for noe spesielt.

Celleveksten av bakterier i kultur kan måles ved å bruke en turbiditetsmåler, eller et spektrofotometer som det også heter [10]. Spektrofotometeret har en strålingskilde som sender ultrafiolett-lys mot celleduspensjonen, en bølglengdedetektor velger ut den riktige bølglengden, og deretter måler en detektor intensiteten av lyset som slipper gjennom celleduspensjonen på andre siden. [34]. Turbiditet, eller klarhet, måles i enheten OD (optisk tetthet) ved en spesifikk bølglengde [10].

2.1.3 Frysing av bakterieceller

Bakterieceller som skal tas vare på til senere bruk fryses ned. En over natt kultur (vedlegg B1) tilsettes en 87 % glyserolblanding (1:1), og fryses ned på -80°C . Cellene og glyserol blandes til en jevn blanding [35].

2.2 Transformasjon

Transformasjon er en metode som gjør det mulig å introdusere eksogent plasmid-DNA til bakterieceller. *E. coli* er ikke i stand til å ta opp fremmed DNA fra omgivelsene gjennom transformasjon uten hjelp. Det finnes flere transformasjonsmetoder som kan hjelpe cellene med dette. I denne studien ble transformasjon av elektrokompetente celler og kjemisk kompetente celler utført [36].

2.2.1 Tillaging av elektrokompetente celler

Elektrokompetente celler har den fordelen at de ofte kan oppnå veldig høy transformasjonseffektivitet. Ved laging av elektrokompetente celler er det viktig å ha så lite salter som mulig i det ferdige produktet. Mye salt vil føre til at prøven blir ødelagt under elektroporeringen på grunn av et elektrisk overslag. Dette oppnås ved å bruke et lavsalt medium og i tillegg ha flere vasketrinn i metoden [37].

Elektrokompetente celler lages ved å dyrke celler i lavsalt medium til cellene har den ønskede OD-verdien. I denne studien ble det laget DH10B [38] elektrokompetente celler. Det var ønskelig å få $\text{OD}_{600} = 0,8$. Det vil si at lyset som sendes gjennom cellesuspensjonen har en bølgelengde på 600 nm, og at når OD-målingen viser 0,8 har cellene den tettheten som er ønskelig. Det lages en over natt kultur, dagen etter overføres en del av denne over natt kulturen til en målekolbe med lavsalt LB (1:500). Kolben settes i vannbad ved 37°C og 200 rpm. OD for referansen (lavsalt LB-medium) måles først ved at 1 ml lavsalt LB-medium tilsettes en kyvette. Deretter tas det målinger av cellesuspensjonen hver time, og hvert 15.-30. minutt når OD begynner å nærme seg 0,8. Hvor ofte slike målinger tas er avhengig av hvor raskt bakteriestammen vokser. Ved $\text{OD}_{600} = 0,8$ settes målekolben på is i 15 min, cellene vil da slutte å vokse og dele seg. Cellesuspensjonen overføres til sentrifugerør og cellene sentrifugeres til det dannes en pellet (8500 rpm , 4°C , 10 min). Cellene vaskes i Milli-Q vann i to omganger, og en gang i iskald 10 % glyserol. Til slutt resuspenderes pelleten av celler i

iskald 10 % glyserol og overføres til fryserør. Cellene fryses umiddelbart i flytende nitrogen (N₂) og oppbevares til senere på -80 °C.

2.2.2 Transformasjon av elektrokompetente celler

I 1988 utga Fiedler og Wirth en artikkel hvor de beskrev hvordan de hadde transformert DNA plasmid inn i *E. coli* ved elektroporering [39]. Ved elektroporering blir cellene i kyvetten utsatt for en elektrisk puls som destabiliserer cellemembranen og danner små hull slik at DNA lettere kan tas opp av cellen [33]. Rett etter at kyvetten har mottatt den elektriske pulsen settes den på is for at porene i cellene skal holde seg åpne lenger og DNA kan passere inn via de åpne porene. De elektroporete cellene tilsettes LB-medium og inkuberes med risting (300 rpm) ved 37 °C i 1 time. Elektroporerings effektiviteten avhenger av lengden, styrken og formen på den elektriske pulsen [39]. Det er vist for flere stammer av *E. coli* at det kan oppnås en veldig høy transformasjonseffektivitet (10^9 - 10^{10} transformanter/ μ g DNA) [40].

Gene Pulser® II fra BIO-RAD ble brukt i denne studien for å transformere de elektrokompetente cellene. Kyvetten som ble benyttet hadde en avstand på 0,2 cm mellom hver elektrode, og kunne inneholde opp til 400 μ l. I denne studien ble det tilsatt 100 μ l til kyvetten av en blanding med cellesuspensjon og plasmid.

Parameterne som elektroporatoren var innstilt på var følgende:

Kapasitans (μ F)	25
Volt (KV)	2,50
Motstand (ohm)	Low range: 400
	High range: ∞

Tabell 1. Elektroporeringsparametere. Gene Pulser® II fra BIO-RAD var stilt inn på følgende for å transformere plasmid inn i DH10B elektrokompetente celler.

2.2.3 Transformasjon av kjemisk kompetente celler

Transformasjon av kjemisk kompetente celler kan gjøres på flere måter. I 1970 ble for første gang fremmed DNA transformert inn i *E. coli* ved bruk av kalsiumioner (CaCl_2) for å gjøre cellene klare for opptak av DNA [41]. Denne metoden ved bruk av CaCl_2 er i dag den mest brukte metoden for å klargjøre *E. coli* for opptak av eksogent DNA [36]. Plasmid transformeres inn i cellene ved at blandingen av celler og plasmid blir utsatt for et lite varmesjokk ved 42°C i 30 eller 45 sekunder (dette avhenger av hvilken *E. coli* stamme som brukes). Cellene settes på is i et par minutter, og forvarmet medium tilsettes til slutt. Cellene inkuberes i 1 time ved 37°C og 225 rpm (vedlegg B8). De kjemisk kompetente cellene som ble brukt i denne studien ble kjøpt ferdig kompetente fra produsenten. Varmesjokket cellene utsettes for, senker antakelig membranpotensialet til cellene ved en foreløpig ukjent mekanisme slik at DNA lettere kan passere cellemembranen [42].

2.3 Agarose gelelektroforese

Gelelektroforese er en metode som brukes for å identifisere og separere DNA-fragmenter fra hverandre med hensyn på størrelse. Hva slags type gel som benyttes er avhengig av størrelsen på DNA-fragmentene. Agarose brukes for å separere DNA-fragmenter fra 50 bp og opp til flere megabaser i lengde. DNA-fragmentene beveger seg fra en negativ pol mot en positiv pol, og på denne måten kan fragmentene skilles fra hverandre ettersom hvor langt de vandrer i gelen [33]. DNA består av negativt ladede fosfatgrupper som er årsaken til at DNA vil vandre mot den positive polen [8].

Agarose er en kopolymer som består av galaktose som er bundet sammen med glykosidbindinger. I løsning har agarosemolekylene en tilfeldig kveilet struktur, men ettersom temperaturen synker dannes en gel med en tredimensjonal struktur [33] [43]. Hvor raskt DNA-fragmentene beveger seg gjennom denne gelen avhenger av blant annet DNA-størrelsen, agarosekonsentrasjonen, DNA-konformasjonen, spenningen, elektroforesebufferen og type agarose [33].

I denne studien ble det benyttet en 0,8 % agarosegel med Tris/acetat buffer. Se vedlegg B4 for hvordan en 0,8 % agarosegel lages. Alle prøver som skal kjøres på gel tilsettes i forkant en gel-loading buffer. Elektroforeseapparatet settes på 100 V. Etter omtrent 1,5 times vandring i gelen ($\frac{3}{4}$ av gelen), legges gelen i et kar med vann og GelRed (1:100) til farging i minst

30 minutter. GelRed er en farge med fluorescerende egenskaper som kan bindes til enkeltrådet- og dobbeltrådet DNA, og RNA [44]. Gelen tas ut av karet og legges på en plate hvor DNA-fragmentene visualiseres ved bruk av ultraviolet-lys [45]. GeneSnap fra SYNGENE brukes for å ta bilder av gelen og redigere dem.

2.4 Kutting av DNA ved hjelp av restriksjonsenzym

Et restriksjonsenzym er et enzym som gjenkjenner en kort DNA sekvens og som kutter DNA på stedet den gjenkjenner. Det finnes mange ulike restriksjonsenzym som gjenkjenner forskjellige DNA sekvenser, eller som gjenkjenner samme DNA-sekvens, men kutter DNA på forskjellige steder innenfor den samme sekvensen. Gjenkjennelsesstedet kan kuttes i midten slik at det dannes to butte ender, eller stedet kan kuttes slik at det dannes uparede baser på begge sider av DNA-fragmentet (5' eller 3' overheng) [46]. For at et restriksjonsenzym skal fungere, må de riktige betingelsene være til stede. Det vil si riktig buffer, riktig mengde av enzym og DNA, konsentrasjon av salt i buffer, temperatur og varighet av selve reaksjonen, er alle avgjørende faktorer [47]. Restriksjonsenzymene som ble brukt i denne studien ble funnet ved å bruke dataprogrammet Vector NTI Advance® fra Life Technologies.

2.5 Sete-dirigert Mutagenese

I *in vitro* setedirigert mutagenese endres en DNA-sekvens. Denne endringen kan innebære kun en enkelt punktmutasjon eller flere mutasjoner [48]. Det finnes mange mutagenesekit på markedet, i denne studien ble QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit fra Agilent Technologies brukt. Dette kitet er spesielt godt egnet for store plasmider og det gjør det mulig å bruke et dobbeltrådet plasmid som templat for syntetisering av nytt DNA [49]. Setedirigert mutagenese hvor det var mulig å benytte dobbeltrådet DNA, kom Deng og Nickoloff opp med i 1992 [50]. Denne metoden var mindre tid- og arbeidskrevende enn tidligere, hvor det var nødvendig med subkloning og bruk av enkeltrådet DNA [48]. Setedirigert mutagenese består av flere trinn; først lages mutageneseprimere, PCR utføres for å amplifisere opp mutert plasmid, og til slutt transformeres cellene. Hvordan mutagenesekitet fra Agilent Technologies er bygd opp, og hvordan det ble benyttet i denne studien forklares under resultatdelen og i vedlegg B9.

2.6 PCR

PCR, polymerase kjedereaksjon, er en enzymatisk metode for å amplifisere opp DNA ved hjelp av en varmemestabil DNA-polymerase. Metoden var opprinnelig basert på *Taq* DNA polymerase fra bakterien *Thermus aquaticus* [51].

Det første trinnet i amplifiseringen av dobbeltrådet DNA er å blande plasmid, reaksjonsbuffer, primere, nukleotider og DNA-polymerase i et PCR-rør som settes i en PCR-maskin. PCR-maskinen som ble brukt var C1000™ Thermal Cycler fra BIO-RAD. PCR-løsningen varmes opp til 95 °C som fremgår av tabell 2. Ved denne høye temperaturen vil DNA-trådene gå fra hverandre. Deretter senkes temperaturen til 60 °C og hver enkelttråd vil kunne feste seg til hver sin komplementære primer. Temperaturen økes til 68 °C og *PfuUltra* high-fidelity DNA polymerase (2,5 U/μl) kan syntetisere nye DNA-tråder ved å bruke de gamle trådene som templat. Denne prosessen ble gjentatt 18 ganger. Vanligvis har en slik PCR-reaksjon rundt 30 sykluser for å amplifisere opp en tilstrekkelig mengde med DNA. Denne reaksjonen hadde kun 18 sykluser for å redusere sjansen for andre tilfeldige mutasjoner som kunne oppstå [33] [51]. Parameterne for PCR-reaksjonen (tabell 2) som ble benyttet i denne studien er oppgitt i QuikChange II XL Mutagenesis Kit [49].

Segment	Syklus	Temperatur	Tid
Oppvarming	1	95 °C	1 min
Denaturering	18	95 °C	50 sek
Annealing		60 °C	50 sek
DNA-syntese		68 °C	7-8 min
	1	68 °C	7 min

Tabell 2. Parameterne i PCR-maskinen som ble brukt i denne studien for å utføre PCR.

2.7 Etanolpresipitering

Etanolpresipitering er en metode for å oppkonsentrere og rense DNA. Metoden består av flere trinn; justere saltkonsentrasjonen, tilsette 96 % etanol, og vaske pelleten med 70 % etanol [52]. Ved å tilsette etanol til løsningen med DNA vil de negativt ladede fosfatgrupper eksponeres for løsningen. For å nøytralisere denne negative ladningen er det nødvendig med tilstrekkelig mengde av kationer i løsningen. Når denne frastøtende kraften mellom kjedene er borte på grunn av nøytralisering av kationer, vil DNA felle ut. Pelleten av DNA som dannes vaskes i 70 % etanol, og pelleten resuspenderes til slutt i TE-buffer når all etanolen er fjernet [33]. Det er flere typer kationer som kan brukes, men i dette forsøket ble det brukt NaCl i en sluttkonsentrasjon på 0,2 M (se vedlegg B7 for hele prosedyren).

2.8 Dyrking av human cellelinje

For å ta vare på en cellelinje må cellene mates, splittes og fryses. Det er viktig å arbeide ved bruk av aseptisk teknikk i LAF-benk for å unngå at cellene blir infisert av bakterier eller sopp.

En cellelinje kan enten vokse i suspensjon eller festet til en overflate. U2OS var cellelinjen som ble benyttet i alle forsøkene hvor humane celler ble brukt i denne studien. Denne cellelinjen vokser på en overflate som et enkelt lag av celler. Cellene fester seg til bunn av en overflatebehandlet vekstflaske ved at cellene skiller ut proteiner som danner bindinger til overflaten. Under vekst oppbevares cellene i en inkubator med 5 % CO₂ og ved 37 ° C. Vekstflasken har en filterkork som gjør at cellene får CO₂ gjennom denne. Tilgang på riktig mengde CO₂ er viktig for at cellene skal vokse under riktig pH [53].

2.8.1 Cellemedium

Når cellene er i vekst, må cellemediumet byttes ut med jevne mellomrom fordi næringsstoffene etter hvert brukes opp. Cellemediumet som ble brukt for U2OS cellelinjen er et medium bestående av DMEM og Glutamax. Mediumet inneholder fenolrødt som fungerer som en pH-indikator. Mediumet er rødt ved pH 7,4, som er den pH-verdien som er mest optimal for de fleste cellelinjer. Cellemediumet tilsettes FBS og penicillin/streptomycin før bruk. FBS er et serum som inneholder nødvendige næringsstoffer og vekstfaktorer. Flasken med medium oppbevares kjøling når det ikke er i bruk, og varmes opp til 37 ° C 30 minutter før bruk [53].

2.8.2 Splitte en human cellelinje

Celler som vokser i vekstflaske må splittes slik at det ikke blir for mange celler i flasken. Hvor ofte en cellelinje må splittes avhenger av hvor raskt de vokser, dette varierer mellom de ulike celletypene. Ved for mange celler i flasken vil cellene etter hvert dø på grunn av mangel på plass og næring. I mikroskopet kan døde celler ses ved at de flyter på toppen av mediumet [53].

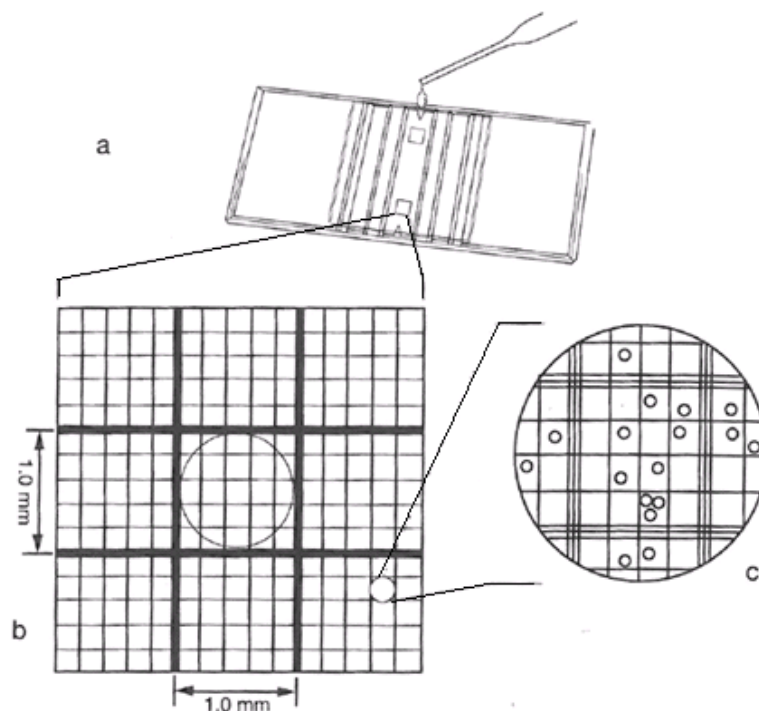
Cellene splittes ved at gammelt medium suges av, og PBS tilsettes. PBS vasker bort rester av serum som vil hemme effekten av trypsin. PBS suges av og trypsin tilsettes. Celler som er festet til bunnen av vekstflasken løsner ved hjelp av trypsin. Trypsin er et proteolytisk enzym som ødelegger proteinene som binder cellene til vekstflasken. Bunnen spyles med nytt medium slik at det dannes en cellesuspensjon [53]. 1/10 av cellesuspensjonen tilsettes en ny vekstflaske sammen med nytt vekstmedium, og cellene kan vokse og dele seg videre (vedlegg B10).

2.8.3 Fryse humane celler

Dersom man ønsker å ta vare på en cellelinje over en lengre periode, må cellene fryses. Det bør verken være for få eller for mange celler som fryses ned, ca. 1×10^7 celler pr. ml medium er det optimale. Frysemediumet består av 10 % DMSO i FBS. DMSO forhindrer cellemembranen i å sprekke [53]. Pelleten av celler resuspenderes i 1 ml frysemedium, rørene pakkes godt i bobleplast og legges på toppen av fryseren slik at cellene fryses sakte.

2.8.4 Telle celler

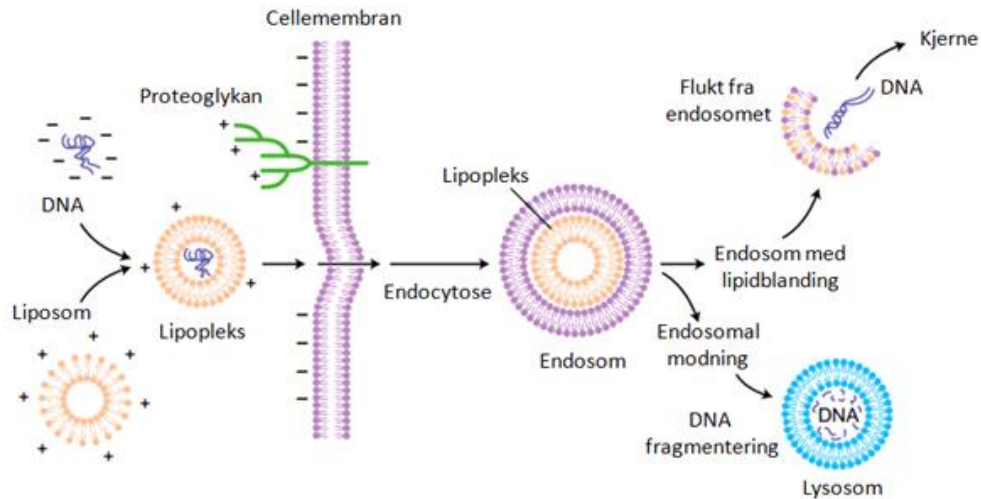
Før cellene skal brukes i forsøk og plates ut i skåler, må cellene telles slik at riktig mengde celler tilsettes skålen. For å finne ut hvor mange celler det er i cellesuspensjonen pr. ml, brukes et tellekammer, eller hemocytometer som det også kalles. Figur 9 viser hvordan et slikt tellekammer ser ut. Tellekammeret har et 3x3 rutenett, hvor ruten i midten igjen har et rutenett på 5x5, det er dette rutenettet som telles og eventuelt et eller flere av de andre rutene, avhengig av celletettheten. For å finne ut hvor mange celler det er pr. ml cellesuspensjon, multipliseres gjennomsnittet av antall celler innenfor $1,0 \times 1,0$ mm rute med en faktor på 10^4 . I forsøkene som ble gjort i denne studien var det ønskelig med en celletetthet på 10^5 celler pr.ml (vedlegg B11).



Figur 9. Tellekammer (hemocytometer). a: hvert tellekammer har to kamre hvor det pipetteres 10 μl celleduspensjon i hvert kammer. b: hvert kammer har et rutenett på 3x3, og hver av disse rutene har mindre ruter på 5x5. c: hver av de 25 rutene innenfor 1,0 x 1,0 mm, har igjen enda mindre ruter. Antall celler som er innenfor 1,0 x 1,0 mm brukes for å beregne antall celler/ml. Illustrasjonen er hentet fra boken «At the Bench: A Laboratory Navigator» [53].

2.9 Transfeksjon

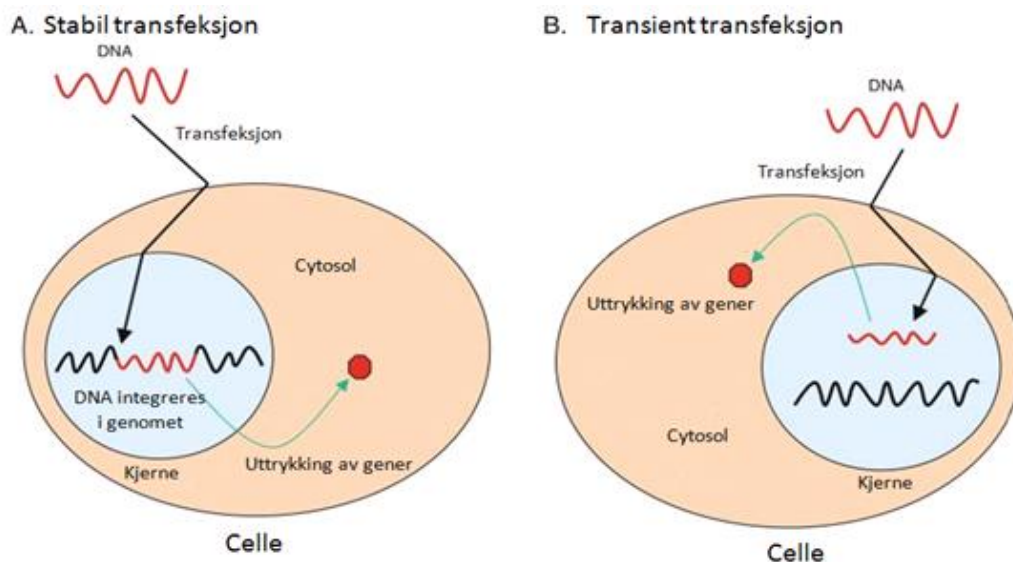
Transfeksjon benyttes når man ønsker å introdusere fremmed genetisk material inn i eukaryote celler [54]. Ved hjelp av denne metoden kan funksjonen av ulike gener og genprodukter studeres [55]. For cellene er transfeksjon en traumatisk hendelse som kan være cytotoxisk for cellene [56]. I denne studien ble det brukt kationisk lipid-mediert transfeksjon ved hjelp av FuGENE® HD Transfeksjonsreagens. Kationisk lipid-mediert transfeksjon går ut på at positivt ladete liposomer tiltrekker seg negativt ladet DNA og at det dannes et kompleks. Mekanismen bak hvordan dette komplekset passerer inn i cellen er ikke fullstendig kjent, men man tror at komplekset passerer cellemembranen ved endocytose og at det dannes et endosom på innsiden av cellen (figur 10). På innsiden av cellen vil DNA komme seg ut av endosomet og bevege seg mot kjernen, eller DNA blir degradert [57]. Det finnes to typer transfeksjon; transient- og stabil transfeksjon.



Figur 10. Kationisk lipid-mediert transfeksjon. Liposom og DNA danner et lipopleks som passerer inn i cellen ved endocytose. DNA inne i cytoplasma kan enten gå videre til cellekjernen, eller bli degradert. Teksten er oversatt til norsk fra originalfigur [57].

2.9.1 Transient transfeksjon

Ved transient transfeksjon vil DNA komme seg inn i cellekjernen, men vil ikke bli en del av genomet til vertscellen (figur 11 B). Cellen uttrykker disse genene i bare noen få dager fordi cellen mister det genetiske materialet under celledeling eller på grunn av andre faktorer [54] [55].



Figur 11. Forskjellen mellom stabil- og transient transfeksjon. Celler som blir stabilt transfektert får det nye DNAet integrert i genomet, mens transient transfekterte celler vil ha det nye DNAet i kun få dager før cellen mister det [54].

2.9.2 Stabil transfeksjon

Ved transfeksjon av celler vil en liten andel av cellene få det fremmede DNAet integrert i genomet, disse cellene kan selekteres for og det dannes en stabil transfektert cellelinje. Det er hvorvidt de nye genene blir integrert i kromosomet eller ikke, som skiller stabilt- og transient transfekterte celler fra hverandre (figur 11). Det nye integrerte genet vil bli replikert og uttrykt av cellen på tilsvarende måte som cellens egne gener [54]. I denne studien ble det laget en stabilt transfektert U2OS cellelinje som ble selektert for ved bruk av antibiotikumet puromycin. Plasmidet som cellene ble transfektert med hadde gener som koder for puromycinresistens. Det var etter hvert bare stabilt transfekterte celler i vekstflasken, da de transient transfekterte cellene ikke ville klare å uttrykke genene for puromycinresistens mer enn noen få dager.

2.10 Fiksering av celler

Celler som man ønsker å oppbevare for senere analyse, må fikseres for å opprettholde strukturen til cellene. Fikseringsreagenser kan endre litt på cellestrukturen, så derfor er det viktig å finne den fikseringsmetoden som egner seg best for cellene [58]. Hvilken metode man benytter avhenger også av hva formålet med forsøket er. Det er flere reagenser som kan brukes for å fikserer celler, to av reagensene er beskrevet her.

2.10.1 Fiksering med formaldehyd

I denne studien ble cellene som skulle analyseres ved hjelp av immunofluorescensmikroskopi fiksert ved bruk av 4 % formaldehyd. Metoden hvor man benytter aldehydgrupper er ofte å foretrekke [59]. Ved å tilsette formaldehyd til cellene, dannes det kryssbindinger mellom molekylene i cellen slik at strukturen til cellen bevares [58]. Disse kryssbindingene dannes best ved en pH på 7,5-8 [59]. Alt arbeid med formaldehyd gjøres i avtrekkskap, og rester av formaldehyd og pipettespisser kastes i en egen beholder.

2.10.2 Fiksering med etanol

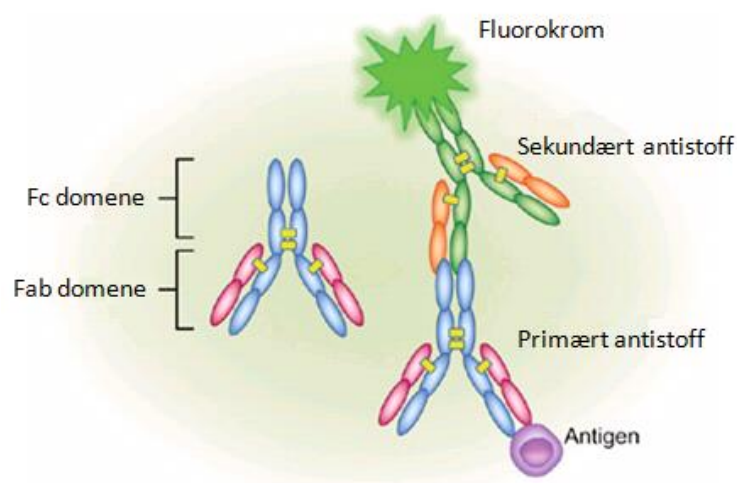
En annen fikseringsmetode som ble benyttet i denne studien var å tilsette iskald 70 % etanol til cellene. Etanol virker normalt ved å erstatte vannet i cellen, som fører til at cellen skrumper sammen, bryte hydrogenbindinger og ødelegge den tredimensjonale strukturen til proteinene

[59]. Molekyler kan også risikere å bli vasket ut av cellen under fikseringen [58]. Men ved å bruke iskald etanol og oppbevare cellene på -20°C rett etter presipiteringen, kan etanol brukes uten å ødelegge proteinene [59]. Denne metoden ble benyttet for fiksering av cellene som skulle farges med Hoechst (DNA farges) og deretter analyseres ved hjelp av flowcytometri.

2.11 Antistoffer og immunofluorescens

Antistoffer er en del av det adaptive immunforsvaret. De produseres av B-celler i respons på infeksjon. På overflaten av B-cellene har de reseptorer som kalles for immunoglobuliner. Antistoffer er også en type reseptor, men den er til forskjell fra immunoglobulinene i løselig form og ikke festet til B-celleoverflaten. B-cellene som produserer antistoffer kalles for effektor B-lymfocytter eller for plasmaceller. Strukturen til et antistoff består av fire polypeptidkjeder, to like tungkjeder (vist i blått i figur 12) og to like lettkjeder (vist i rødt). Antistoffet har et konstant område og et variabelt område, det er det variable området som binder til epitoper på antigenene (antigen-bindingssete). I tillegg kan antistoffet deles inn i et Fab (Fragment antigen binding) domene og Fc (Fragment crystallizable) domene. Antistoffer er spesifikke og binder kun til en eller noen få forskjellige antigener. Det er fem hovedklasser av antistoffer som skilles ved oppbygningen av tungkjeden: IgG, IgM, IgD, IgA og IgE [60].

Innenfor molekylærbiologisk forskning er det IgG som oftest brukes. Av IgG finnes det fire subklasser: IgG1, IgG2, IgG3 og IgG4 [58].



Figur 12. Strukturen til et antistoff. [61]

Immunofluorescens er en teknikk hvor det benyttes antistoffer med et fluorokrom mot et antigen (figur 12). Fluorokromer er molekyler med fluoreserende egenskaper. Dette kan enten gjøres direkte eller indirekte. Ved direkte immunofluorescens brukes et antistoff (med fluorokrom) som binder direkte til epitopet på antigenet. Indirekte immunofluorescens består av to trinn. I det første trinnet tilsettes et primært antistoff som binder til antigenet, i det andre trinnet tilsettes et sekundært antistoff med et fluorokrom som binder til det primære antistoffet [61].

2.12 Mikroskopering ved bruk av fluorescensmikroskop

2.12.1 Fluorescens

Fluorescens oppstår når et fluorescerende molekyl absorberer lys med høy energi og en spesifikk bølgelengde. Molekylet går da fra grunntilstanden sin til en eksitert tilstand. Etter noen få nanosekunder vil det fluorescerende molekylet miste denne energien og gå tilbake til sin grunntilstand. Når dette skjer emitteres lyset. Emittert lys har en lengre bølgelengde enn det eksiterende lyset, og forskjellen mellom disse bølgelengdene kalles for Stokes shift [62]. Ved mikroskopering av fluorescerende molekyler blokkerer man for det eksiterende lyset (ikke det emitterende), og det er da mulig å se bare de molekylene som fluorescerer (emittert lys) [63].

Fluorokromer er som nevnt molekyler med fluoreserende egenskaper. Hvert fluorokrom har et karakteristisk absorban- og emisjonsspektrum [62].

2.12.2 Fluorescensmikroskopering

Bildene som er tatt med fluorescensmikroskop i denne studien ble tatt med hjelp fra veileder. Ved fluorescensmikroskopering eksponeres prøven man ønsker å se på for lys med en bestemt bølgelengde, dette lyset filtreres bort slik at man bare ser det emitterte lyset med en lengre bølgelengde [63].

Mikroskopet Axio Imager Z1 med ApoTome fra Zeiss og dataprogrammet Axio Vision Release 4.8 software ble brukt for å se på og ta bilde av cellene.

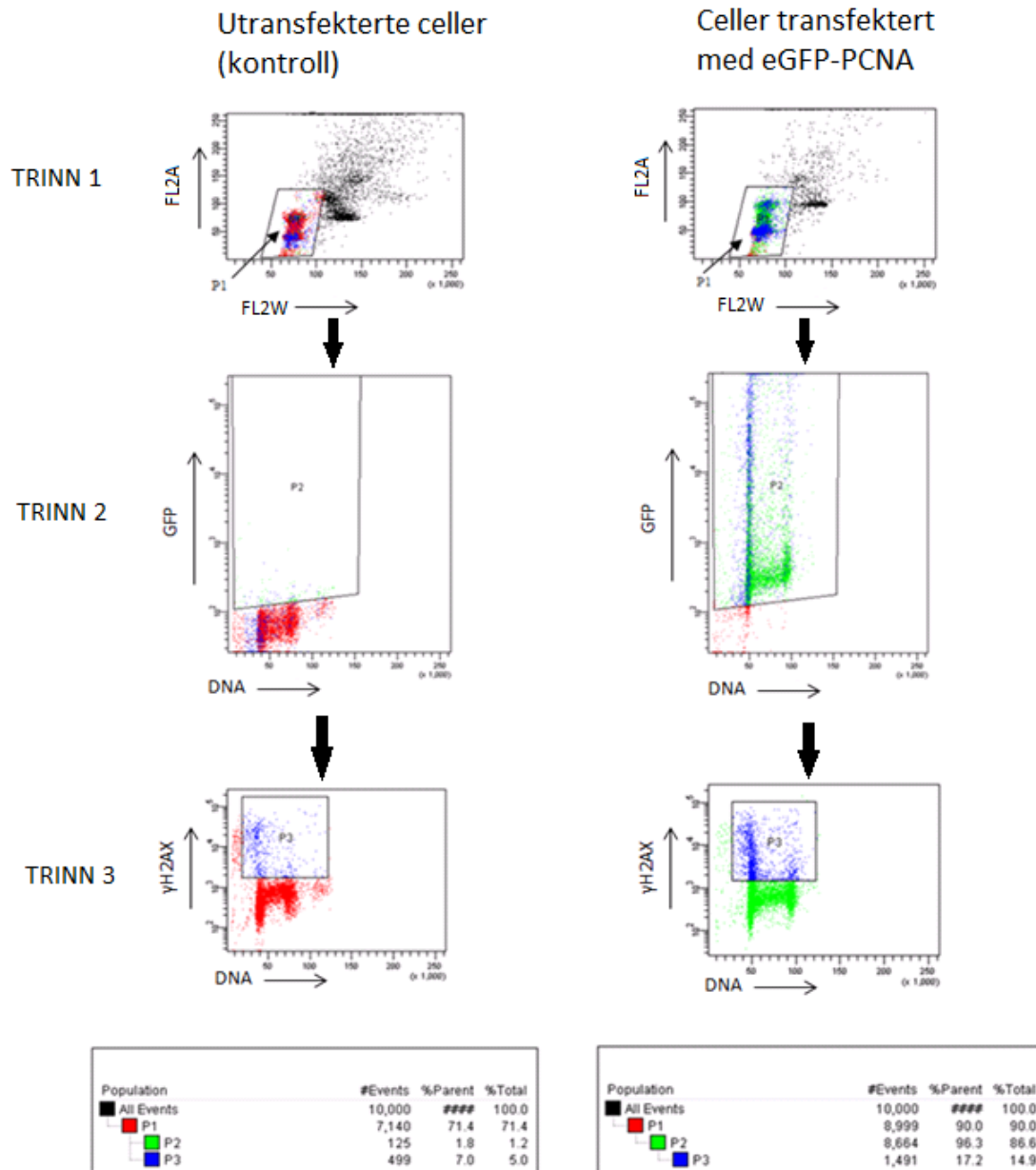
Cellene som ble analysert ved hjelp av fluorescensmikroskop i denne studien ble farget med antistoffer og Hoechst 33258 (DNA). I noen av forsøkene ble cellene preekstrahert før fiksering. Ved preekstrahering av cellene fjernes alt som ikke er bundet til cellekjernen. Ved preekstraksjon tilsettes cellene en ekstraksjonsbuffer i 5 minutter mens de står på is. Ekstraksjonsbufferen fjernes og cellene vaskes med PBS (vedlegg B13). Deretter fikseres cellene i 4 % formaldehyd, og tilsettes et primært- (1:400) og et sekundært antistoff (1:1000) før de ses på i fluorescensmikroskop (se vedlegg B14 og B15 for fullstendig prosedyre).

2.13 Flowcytometri

Flowcytometri er en metode som brukes for å kvantifisere ulike parametere hos individuelle celler. Flere tusen celler kan analyseres pr. sekund. Cellesuspensjonen sendes gjennom en væskestrøm hvor hver enkel celle belyses av flere lasere med bestemte bølgelengder. I tillegg er det også flere detektorer som fanger opp det spredte lyset og fluorescensen fra cellen. Lyset som fanges opp av detektorene vil gi informasjon om cellene [64]. Flowcytometri ble kjørt med hjelp fra veileder.

2.13.1 Analyse av flowcytometridata

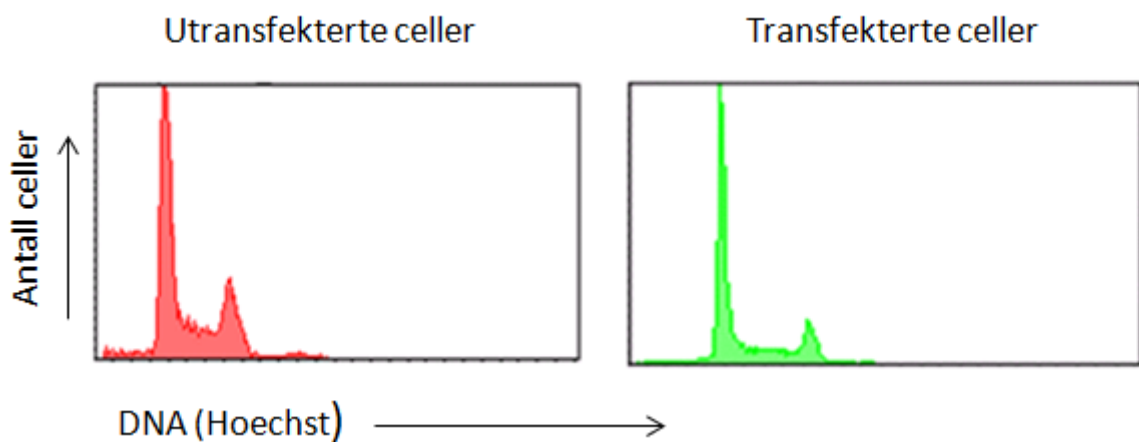
Informasjonen som fanges opp av detektorene blir organisert ved hjelp av en datamaskin og et dataprogram som er spesielt beregnet for flowcytometri. BD FACSDiva Software fra BD Biosciences var programmet som ble brukt for å analysere flowcytometridataene i denne studien. Figur 13 viser hvordan det ble gått frem for å analysere dataene.



Figur 13. Analyse av data fra flowcytometri. Trinn 1: fjerner klumpene; trinn 2: markerer cellene som er GFP-positive; trinn 3: markerer cellene som er γ H2AX-positive. FL2A angir arealet av Hoechst-signalet, men FL2W angir bredden av signalet. Den røde fargen angir cellene som er GFP- og γ H2AX-negative, den grønne fargen er de transfekterte cellene (GFP-positive) og den blå fargen er cellene som er γ H2AX-positive.

Det første som gjøres med dataene fra flowcytometriforsøket er å sortere vekk klumper, det er vist i trinn 1 i figur 13. Alt som er utenfor rammen P1 er klumper og disse cellene fjernes fra figurene under. I denne studien var det ønskelig å se på hvor stor andel av cellene som var transfekttert, og hvor mange celler som var γ H2AX-positive. Dette er vist i trinn 2 og 3 (figur 13), der P2 er mengde transfekterte celler (vist i grønt) og P3 er andelen av cellene som er γ H2AX-positive (vist i blått). Cellene vist i rødt er GFP- og γ H2AX-negative. Tabellene

under diagrammene viser hvordan disse rammene er satt opp, og hvor mange prosent av cellene som er innenfor hver av gruppene. Figurene i venstre kolonne hører til de utransfekterte cellene (kontroll) og det er etter denne kontrollen at rammene settes opp. P2 (GFP-positive celler) for kontrollen settes opp slik at de utransfekterte cellene er utenfor rammen. For kontrollen skal P2 bli tilnærmet 0 % da disse cellene ikke er transfekterte. Denne rammen settes da opp automatisk på akkurat samme sted hos cellene som har blitt transfektert med plasmid, og andel transfekterte celler kan da bestemmes. Når det gjelder hvordan rammen for γ H2AX-positive celler settes, brukes det litt forskjellig fremgangsmetode for kontrollen med utransfekterte celler, og celler transfektert med plasmid. For de transfekterte cellene var det ønskelig å se mengden av γ H2AX-positive celler (P3) for kun de cellene som uttrykker GFP (cellene farget grønt), det vil si cellene innenfor rammen P2. Kontrollen hadde ingen celler innenfor rammen P2. For å finne antall γ H2AX-positive celler blant de utransfekterte cellene ble derfor rammen P3 satt innenfor cellene i rammen P1. Kontrollen hadde ingen celler innenfor rammen P2, så dersom den samme rammen P3 ble satt opp for kontrollen ville ikke det gitt noen celler.



Figur 14. DNA-profiler for utransfekterte celler (rød) og transfekterte celler (grønn). Den høyeste toppen er celler i G1-fasen, den andre toppen er celler i G2/M-fasen, mens cellene mellom disse toppene er celler i S-fase (replikasjon).

Figur 14 viser DNA-profiler for henholdsvis en kontroll med utransfekterte celler, og celler transfektert med mutert peGFP-PCNA (pKL44). Profilen til venstre (rød) inkluderer kun de GFP-negative celler, mens profilen til høyre (grønn) inkluderer de GFP-positive (transfekterte) cellene for mutanten.

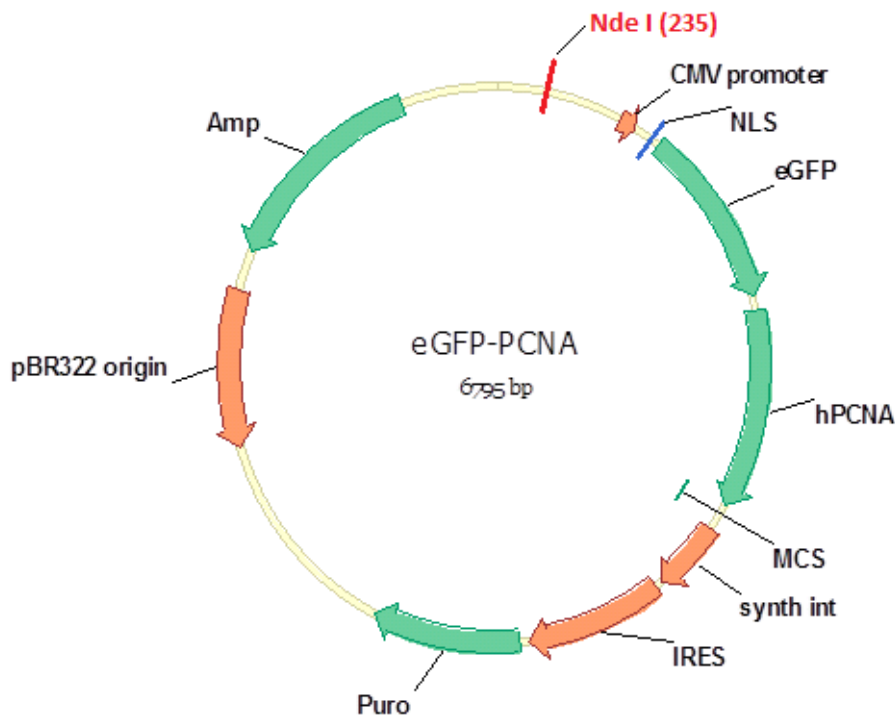
Fargene som brukes er gjennomgående for hele oppgaven. Rød farge representerer de GFP-negative (og γ H2AX-negative) cellene, grønn farge er GFP-positive cellene, og blå farge representerer γ H2AX-positive celler. Blå farge kan også representere celler som uttrykker H3p eller pRPA, men dette vil da komme tydelig fram i figurtekstene. Der det er brukt en farge til, vil dette forklares i de tilfellene der dette gjelder.

Transfeksjonseffektiviteten beregnes ut i fra totalt antall celler som er kjørt i flowcytometeret med unntak av de cellene som har dannet klumper. Andel γ H2AX-positive celler for de transfekterte cellene beregnes bare ut i fra de GFP-positive cellene. Når det gjelder de utransfekte cellene blir andel av γ H2AX-positive celler beregnet ut i fra de GFP-negative cellene, da disse cellene har tilnærmet ingen GFP-positive celler. Det samme prinsippet gjelder når medianverdiene ble funnet.

3 Resultater

3.1 Transformasjon av peGFP-PCNA inn i DH10B elektrokompetente celler

peGFP-PCNA (figur 15) ble brukt for å uttrykke GFP-PCNA i humane celler. Dette plasmidet ble opprinnelig laget av Daniel Gerlich [65]. Plasmidet har en størrelse på ca. 6,8 kb som er et relativt stort plasmid.



Figur 15. Plasmidkart over eGFP-PCNA. Plasmidet er laget av Daniel Gerlich [65]. Hvor restriksjonsenzymet Nde I kutter er markert i rødt. Illustrasjonen er hentet fra VNTI (Life Technologies).

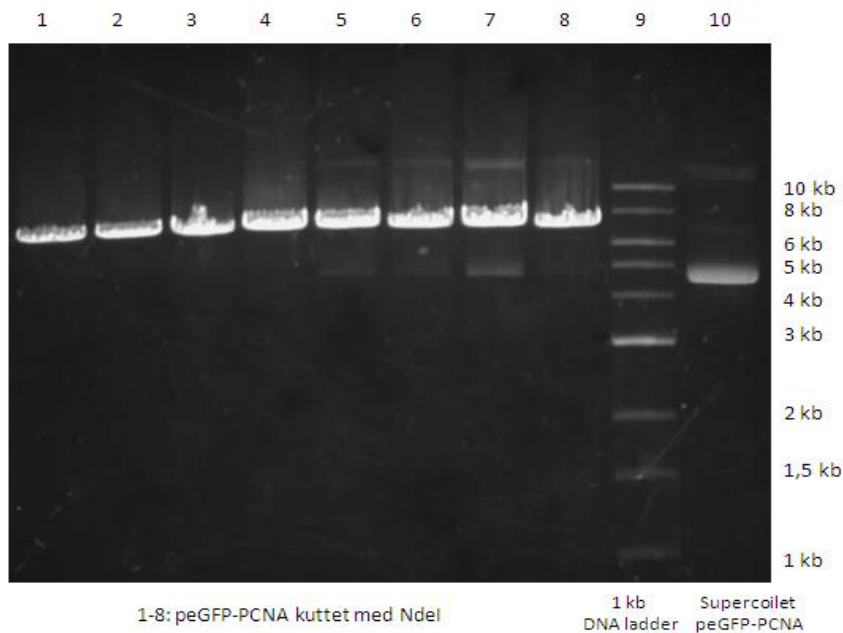
Promoteren i plasmidet er en CMV (cytomegalovirus) promoter som setter i gang transkripsjonen av genene som koder for GFP og humant PCNA [66]. GFP (grønt fluorescerende protein), fra maneten *Aequorea victoria*, er i dette plasmidet fusjonert sammen med PCNA. GFP fluorescerer grønt når proteinet eksponeres for lys med en bølgelengde på 488 nm [67]. GFP og hPCNA er fusjonert sammen med en binding på 18 aminosyrer (VNTI). NLS, "Nuclear Localization Signal", er en aminosyresekvens som finnes på proteiner som er

ment for å kunne transporteres inn i cellekjernen. NLS interagerer med en reseptor (Importin α) på cellekjerneoverflaten, og proteinet med NLS transporteres inn i kjernen [68]. Plasmidet inneholder ampicillin- og puromycin resistensgener (Amp og Puro). MCS, "Multiple Cloning Site", er en sekvens som inneholder mange restriksjonssteder. IRES er en forkortelse for "Internal Ribosome Entry Site", og tillater at fusjonsproteinene GFP-PCNA og puromycin translateres fra samme mRNA. Det vil si at så lenge cellene uttrykker puromycinresistensgener, vil de også ha genene for GFP-PCNA [69]. pBR322 originet gjør at plasmidet kan replikeres i *E. coli*. pBR322 har *E. coli* som sin naturlige vert. Den har et kopitall på 15-20 pr. celle, det vil si at det er et moderat til høy kopitall plasmid [70].

peGFP-PCNA ble transformert inn i DH10B elektrokompetente celler (100 μ l) (se delkapittel 2.2.2 Transformasjon av elektrokompetente celler). De transformerte cellene ble fortynt 1:100 i LB-medium og strøket ut på en LB-agarplate med ampicillin, og inkubert ved 37 ° C over natten. Dagen etter var det ca. 800 kolonier på platen. Det ble plukket 8 kolonier og laget over natt kultur av disse i LB-medium med ampicillin (vedlegg B1). Neste dag ble det laget frysekultur (se delkapittel 2.1.3 Frysning av bakterieceller). Disse ble foreløpig navngitt klon 1-8.

3.1.1 Sjekk av peGFP-PCNA transformert inn i DH10B elektrokompetente celler

For å være sikker på at riktig plasmid hadde blitt transformert inn i DH10B elektrokompetente celler, ble plasmid rensset ut fra hver av de åtte klonene ved hjelp av QIAprep Spin Miniprep Kit (vedlegg B5). Rensset plasmid ble kuttet med restriksjonsenzymet Nde I i NEBuffer 4 (vedlegg B6). Nde I kutter et sted i peGFP-PCNA (se figur 15), som resulterte i ett lineært DNA-fragment (6,8 kb). Ukuttet, supercoilet plasmid i NEBuffer 4 ble brukt som kontroll, og 1 kb DNA-ladder ble brukt som markør. 1 kb DNA-ladder består av fragmenter med størrelser som ligger mellom 1 kb og 10 kb. Denne markøren gjør det derfor mulig å finne størrelsen på DNA-fragmenter som har en størrelse innenfor dette intervallet. Prøvene ble kjørt på en 0,8 % agarosegel i 1X TAE buffer ved 100 V.



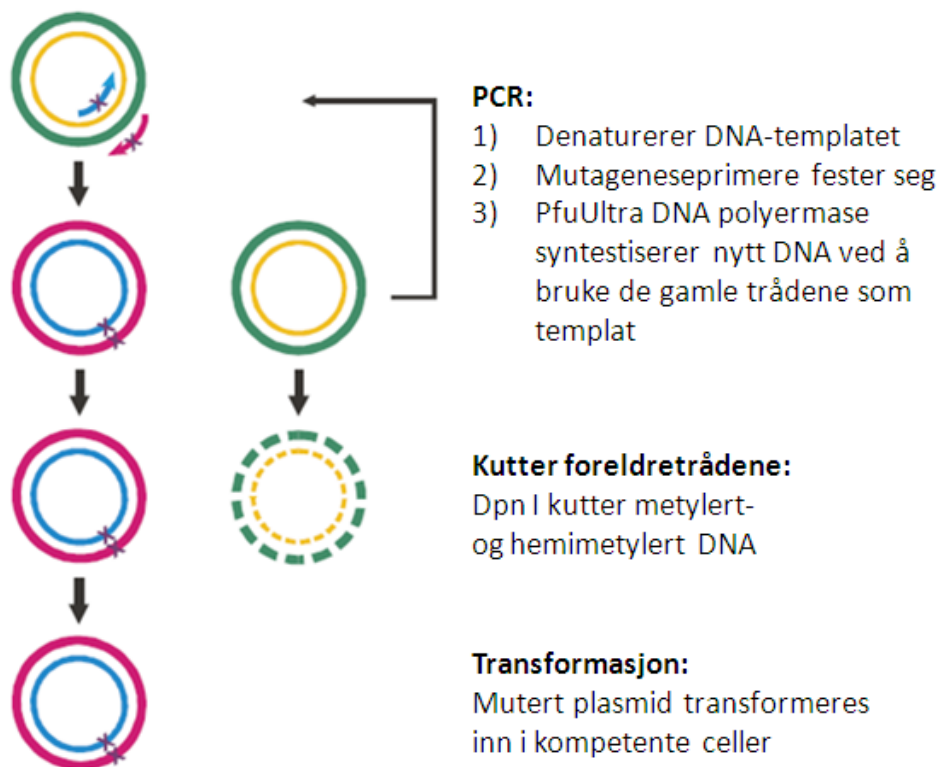
Figur 16. Agarosegel av peGFP-PCNA fra klon 1-8 kuttet med Nde I. Brønn 1-8: peGFP-PCNA (0,6 µg) kuttet med restriksjonsenzymet Nde I (6 U); brønn 9: 1 kb DNA-ladder (0,5 µg) med DNA-fragmenter med størrelser fra 1 kb til 10 kb; brønn 10: supercoilet peGFP-PCNA (0,53 µg).

Prøvene med rensset plasmid (fra klon 1-8) kuttet med Nde I hadde et bånd som ble sammenlignet mot fragmentene til 1 kb DNA-ladder (brønn 9) for å finne riktig størrelse. Agarosegelen (figur 16) viser at plasmidet hadde en størrelse på 6,8 kb. Dette tydet på at peGFP-PCNA var transformert inn i DH10B elektrokompetente celler. Klon 1 ble valgt for videre forsøk, og stammen fikk navnet KL01.

Klon 5-7 hadde et bånd mellom 4 og 5 kb (brønn 5-7) på linje med ukuttet, supercoilet peGFP-PCNA (brønn 10). Disse prøvene hadde ikke fått fullstendig kutting av plasmidet.

3.2 Innføre mutasjon i peGFP-PCNA ved bruk av sete-dirigert mutagenese

På bakgrunn av observasjonen som var gjort i *E. coli* β -clamp (se innledning) ble det laget en tilsvarende mutasjon i posisjon 44 (histidin ble endret til tyrosin) i humant PCNA. Dette ble utført ved å benytte QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit fra Agilent Technologies. Figur 17 gir en oversikt over de ulike trinnene i metoden. Hvert av disse trinnene vil bli forklart underveis som resultatene presenteres.



Figur 17. Illustrasjon over trinnene i QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit fra Agilent Technologies. Tegningen er hentet fra protokollen til kitet (teksten er oversatt til norsk).

3.2.1 Primer Design

Det ble laget to mutageneseprimere med den ønskede mutasjonen hvor CAC (histidin) ble endret til TAC (tyrosin) i aminosyren i posisjon 44 i hPCNA. Primerne var helt komplementære til hverandre, det vil si at de hadde den komplementære nukleotidsekvensen til hver sin DNA-tråd. Den ønskede mutasjonen befant seg i midten av hver primer. Disse mutageneseprimerne ble laget ut fra kriterier som er oppgitt i protokollen til kitet. Kriteriene var:

- Lengde av primere: 25-45 nukleotider
- Smeltepunkt (T_m) ≥ 78 °C
- Mutasjonen i midten med 10-15 baser på hver side
- Minimum 40 % GC
- Enden av primeren skal være en eller flere C- og G-baser

Mutageneseprimerne hadde 43 nukleotider hver, et smeltepunkt på 80,2 °C og GC-innholdet var 58 %. Primerne ble bestilt fra Bionordika. Oversikt over primersekvensene finnes i vedlegg A3.

3.2.2 PCR, klipping med Dpn I og bestemmelse av mutageneseeffektiviteten

PCR ble i denne studien utført for å introdusere den ønskede mutasjonen i humant PCNA ved bruk av peGFP-PCNA, og amplifisere opp det muterte plasmidet. Det ble utført PCR av to ulike PCR-reaksjoner; mutagenesereaksjon med peGFP-PCNA, og mutagenesereaksjon med pWhitescript kontrollplasmid.

Det ble laget en PCR-miks av peGFP-PCNA (5, 10, 20 og 50 ng) med mutageneseprimere (125 ng). pWhitescript (10 ng) med kontrollprimer #1 (125 ng) og #2 (125 ng) ble brukt som kontroll. Parameterne i tabell 2 (2.6 PCR) ble brukt. pWhitescript er et plasmid på 4,5 kb som ble brukt som kontroll på mutageneseeffektiviteten (ME) til QuikChange II XL metoden. Dette ble gjort ved PCR av pWhitescript med kontrollprimere, kutte med Dpn I og transformere pWhitescript inn i kompetente celler. Transformerte celler ble strøket ut på LB-agarplater med ampicillin, 80 µg/ml X-gal (5-brom-4-klor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid) og 20 mM IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) (vedlegg B3). Antall blå kolonier ble sammenlignet med totalt antall kolonier, og mutageneseeffektiviteten ble beregnet. pWhitescript (4,5-kb) har et stoppkodon der hvor et glutaminkodon normalt ville vært i β-galaktosidasegenet til pBluescript II SK(-). Kompetente celler som transformeres med dette plasmidet vil vokse opp som hvite kolonier. PCR av pWhitescript med kontrollprimerne vil danne en punktmutasjon som endrer stoppkodonet til glutaminkodonet slik at genet koder for β-galaktosidase. Dette vil føre til at celler med mutert plasmid vil danne blå kolonier. De cellene som vokser opp med blå fenotype produserer β-galaktosidase og har fått innført mutasjonen. β-galaktosidase er et enzym som kløyver X-gal til galaktose, og 5-brom-4-klor-3-hydroksindol som videre oksideres til 5,5'-dibrom-4,4'-diklor-indigo (resulterer i blå farge på koloniene). β-galaktosidase kodes av LacZ genet [71]. IPTG er en inducer av β-galaktosidase-aktivitet ved at den hemmer lac-repressoren [72].

Etter PCR-reaksjonen ble Dpn I restriksjonsenzym (10 U) tilsatt, og prøvene ble inkubert i 1 time ved 37 °C. Dpn I kutter opp metylert- og hemimetylert DNA (foreldreplasmid) (se

delkapittel 1.4.1 for forklaring). Når Dpn I har kuttet ferdig skal det være lite igjen av plasmid uten mutasjon i løsningen med plasmid [73].

3.2.3 Transformasjon av kjemisk kompetente celler

XL10-Gold ultrakompetente celler (fulgte med kitet) ble tint på is før de ble tilsatt blandingen av β -ME (β -mercaptoetanol). Celler og β -ME ble inkubert på is i 10 min, og hvert 2. minutt ble løsningen ristet forsiktig. β -ME ble brukt for å øke transformasjonseffektiviteten. PCR-reaksjon behandlet med Dpn I (peGFP-PCNA) ble tilsatt til de kjemisk kompetente cellene (vedlegg B8). pWhitescript kontrollplasmid behandlet med Dpn I og pUC18 (10 pg) ble også transformert inn i XL10-Gold ultrakompetente celler.

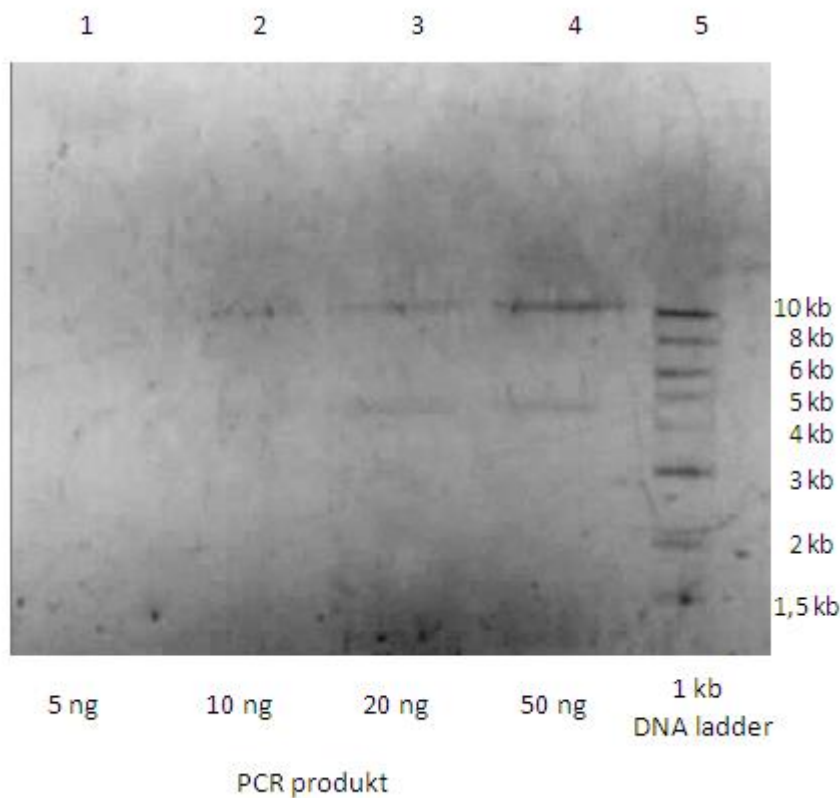
De kjemisk transformerte cellene (peGFP-PCNA og pUC18) ble strøket ut på LB-agarplater med ampicillin (vedlegg B2), mens pWhitescript ble strøket ut på LB-agarplater med ampicillin, X-gal og IPTG (vedlegg B3). Platene med celler ble inkubert ved 37 ° C til dagen etter. Dagen etter var det ingen kolonier på noen av platene.

3.3 Optimalisering av sete-dirigert mutagenese

Forsøket med sete-dirigert mutagenese med peGFP-PCNA og pWhitescript kontrollplasmid ble forsøkt flere ganger uten at det vokste opp kolonier på agarplatene. De ulike trinnene i metoden ble derfor forsøkt optimalisert.

3.3.1 Sjekker PCR-produkt på agarosegel for å undersøke om tilstrekkelig mengde av peGFP-PCNA er produsert

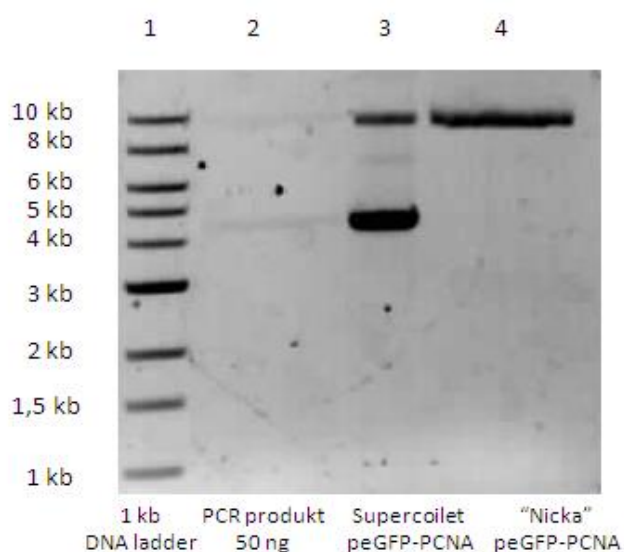
PCR-produktet av peGFP-PCNA ble analysert med agarosegelelektroforese for å undersøke om det var amplifisert opp nok DNA i PCR-reaksjonen. Dette kunne være en mulig årsak til at det ikke vokste opp kolonier på agarplatene. Det ble utført fire forskjellige PCR-reaksjoner med ulike mengder av peGFP-PCNA (5,10, 20 og 50 ng). Parameterne som PCR-maskinen ble innstilt på er oppgitt under delkapittel 2.6 (PCR). Etter PCR-reaksjonen ble prøvene og 1 kb DNA-ladder analysert ved hjelp av 0,8 % agarosegelelektroforese.



Figur 18. Agarosegel av PCR-produkt fra peGFP-PCNA. Brønn 1-4: PCR-produkt fra prøver med 5, 10, 20 og 50 ng peGFP-PCNA i PCR-reaksjonen; brønn 5: 1 kb DNA-ladder (0,5 µg).

Det ble observert to bånd fra hver prøve med PCR-produkt av peGFP-PCNA (brønn 1-4) på agarosegelen (figur 18). Agarosegelen viste bånd ved ca. 10 kb og et svakere bånd mellom 4 og 5 kb. Båndene ble kraftigere med øktende mengde peGFP-PCNA. Alle båndene var ganske svake, som tydet på at en liten mengde plasmid ble dannet i PCR-reaksjonen. PCR-produktet fra brønn 1 (5 ng plasmid) var så svakt at det ikke kan ses på bildet. Båndet ved 10 kb var mest sannsynlig ”nicka” peGFP-PCNA. Med ”nicka” plasmid menes at bare den ene DNA-tråden i plasmidet har blitt kuttet. Båndet mellom 4 og 5 kb ble antatt å være supercoilet peGFP-PCNA. For å undersøke om disse antagelsene var korrekte ble det utført en ny PCR-reaksjon med 50 ng peGFP-PCNA.

Ukuttet, supercoilet peGFP-PCNA (brønn 3) og ”nicka” peGFP-PCNA (brønn 4) ble brukt som kontroller. Løsning med ”nicka” plasmid ble laget ved å kutte peGFP-PCNA med restriksjonsenzymet Nt.BstNBI i NEBuffer 3 (vedlegg B6).



Figur 19. Agarosegel av PCR-reaksjon med 50 ng peGFP-PCNA. Brønn 1: 1 kb DNA-ladder (0,5 µg); brønn 2: PCR-produkt med 50 ng peGFP-PCNA i PCR-reaksjonen; brønn 3: supercoilet peGFP-PCNA (0,54 µg); brønn 4: ”nicka” peGFP-PCNA (0,3 µg) kuttet med Nt.BstNBI (10 U).

Figur 19 viser at båndet ved 10 kb var ”nicka” plasmid og båndet mellom 4 og 5 kb var supercoilet plasmid. Båndene til PCR-reaksjonen (brønn 2) inneholdt supercoilet og ”nicka” peGFP-PCNA. Kontrollen for supercoilet peGFP-PCNA (brønn 3) inneholdt også ”nicka” plasmid. Det ble antatt at noe av ”nicka” plasmid (brønn 2) var foreldreplasmid og noe var PCR-produkt.

3.3.2 Transformasjonseffektiviteten til kjemisk kompetente celler

XL10-Gold ultrakompetente celler som fulgte med mutagenesekitet hadde for lav transformasjonseffektivitet ($2,2 \times 10^8$ CFU/µg plasmid). Derfor ble andre typer kjemisk kompetente celler testet ut. Transformasjonseffektiviteten ble testet ut ved å transformere 10 pg av pUC18/19, (vedlegg B8 angir protokollene for transformasjon av de ulike kjemisk kompetente cellene med peGFP-PCNA). Transformasjonseffektiviteten for alle cellene er oppgitt i tabell 3. Den ble beregnet ved bruk av følgende formel:

Antall CFU pr. µg DNA =

$$\frac{\text{Antall kolonier}}{\text{pg transformert DNA}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{\text{Totalt transformasjonsvolum}}{\text{antall } \mu\text{l platet ut}}$$

Formel 1. Beregning av transformasjonseffektivitet.

	Produsentens oppgitte transformasjons-effektivitet (CFU/ μ g plasmid DNA)	Transformasjons-effektivitet ved transformasjon av pUC18/19 (CFU/ μ g plasmid DNA)	Produsent
XL1-Blue Superkompetente celler	$> 1 \times 10^8$	$4,01 \times 10^7$	Agilent Technologies
One Shot® OmniMAX™ 2 T1^R	$> 5 \times 10^9$	$2,55 \times 10^8$	Invitrogen®
XL10-Gold Ultrakompetente celler	$> 1 \times 10^9$	$2,20 \times 10^8$	Agilent Technologies

Tabell 3. Transformasjonseffektiviteten til kjemisk kompetente celler.

Tabell 3 viser at transformasjonseffektiviteten til de kjemisk kompetente cellene var lavere enn hva produsenten hadde oppgitt. Lav transformasjonseffektivitet og lav mengde peGFP-PCNA i PCR bidro antakelig til at det ikke vokste kolonier på agarplatene.

3.3.3 Optimalisering ved å bytte til DH10B elektrokompetente celler og bruke økt konsentrasjon av PCR-produkt

For å øke transformasjonseffektiviteten ble elektrokompetente celler testet ut. DH10B elektrokompetente celler ble laget, transformert med pUC19 (10 pg), og transformasjonseffektiviteten til disse cellene ble beregnet til å være $2,32 \times 10^9$ CFU/ μ g (formel 1). Denne transformasjonseffektiviteten var høyere enn hva som hadde blitt oppnådd med de kjemisk kompetente cellene.

For å øke plasmidkonsentrasjonen av PCR-produktet ble mengden av plasmid i PCR-reaksjonen økt til det tidobbelte (50, 100, 200 og 500 ng). Etter kutting med Dpn I ble DNA oppkonsentrert ved etanolpresipitering (se vedlegg B7).

3.3.4 Beregning av mutageneseeffektiviteten

PCR ble utført av pWhitescript kontrollplasmid (50, 100, 150, 200 ng), kuttet med Dpn I, og transformert inn i DH10B elektrokompetente celler. Cellesuspensjonen ble strøket ut på LB-agarplater med ampicillin, X-gal og IPTG i to forskjellige konsentrasjoner av celler, og inkubert på 37 ° C over natt. Dagen etter ble det observert både hvite og blå kolonier på platene. Alle koloniene som hadde vokst opp var celler som hadde fått transformert inn plasmid, men det var kun celler fra de blå koloniene som stammet fra en transformant med umetylert plasmid med mutasjon. Tabell 4 angir antall blå og hvite kolonier som ble observert på de ulike platene.

Mengde DNA før PCR	10 µl celler		1090 µl celler	
	Blå	Hvite	Blå	Hvite
50 ng	0	36	8	> 2000
100 ng	0	30	20	> 2000
150 ng	0	57	10	> 2000
200 ng	3	13	247*	Ca. 700*

Tabell 4. DH10B elektrokompetente celler transformert med pWhitescript mutagenesereaksjon. Antall observerte blå og hvite kolonier fra DH10B elektrokomptente celler transformert med ulike konsentrasjoner av pWhitescript. Cellene ble strøket ut i to konsentrasjoner av celler (1:10 fortyning i LB-medium (10 µl), og den resterende mengden av cellene ble sentrifugert til en pellet og resuspendert i 100 µl LB-medium (1090 µ)) på LB-agarplater med 100 µg/ml ampicillin, 80 µg/ml X-gal og 20mM IPTG.

Mutageneseeffektiviteten (ME) kan beregnes ved bruk av formel 2:

$$ME = \frac{\text{Antall blå kolonier (CFU)}}{\text{Totalt antall kolonier (CFU)}} \times 100 \%$$

Formel 2. Beregning av mutageneseeffektiviteten (ME).

Tabell 4 viser at andelen blå kolonier er lav i forhold til totalt antall kolonier. Formel 2 ble benyttet for å regne ut ME for platen som er merket med * i tabell 4. ME ble her beregnet til 26 %. Den store andelen av hvite kolonier tydet på at det fortsatt var mye foreldreplasmid igjen etter kutting med Dpn I.

Blå og hvite kolonier på agarplatene tydet på at bruk DH10B elektrokompetente celler med høyere transformasjonseffektivitet, økt mengde plasmid i PCR-løsningen og etanolpresipiteringen hadde fungert.

3.3.5 Transformasjon med peGFP-PCNA-mutagenesereaksjon

peGFP-PCNA (50, 100, 200 og 500 ng) mutagenesereaksjon ble forsøkt transformert på nytt inn i DH10B elektrokompetente celler. Inkubering med Dpn I ble økt fra 1 til 2 timer på bakgrunn av mye foreldreplasmid for kontrollen. I tillegg ble Dpn I inaktivert etter ferdig kutting i 20 min ved 80 °C. Cellene ble strøket ut i forskjellige fortyninger på LB-agarplater med ampicillin, og inkubert over natt. Dagen etter hadde alle platene mange kolonier.

Tabell 5 viser mengden av kolonier som vokste opp på platene.

	10 µl celler	100 µl celler	990 µl celler
Mengde DNA før PCR:	Antall kolonier:		
50 ng	424	> 1000	> 1000
100 ng	119	> 1000	> 1000
200 ng	Ca. 800 *	> 1000	> 1000
500 ng	>1000	> 1000	> 1000

Tabell 5. DH10B elektrokompetente celler transformert med peGFP-PCNA-mutagenesereaksjon. Cellene ble transformert med ulike konsentrasjoner av peGFP-PCNA i PCR-reaksjonen og strøket ut i ulike fortyninger.

3.3.6 Sekvensering

10 kolonier (fra platen merket *) (tabell 5) ble plukket, og laget en over natt kultur av. Renset plasmid (50 ng/ μ l) fra hver av de ti koloniene og sekvenseringsprimerne (10 pmol/ μ l) ble sendt til sekvensering til GATC Biotech.

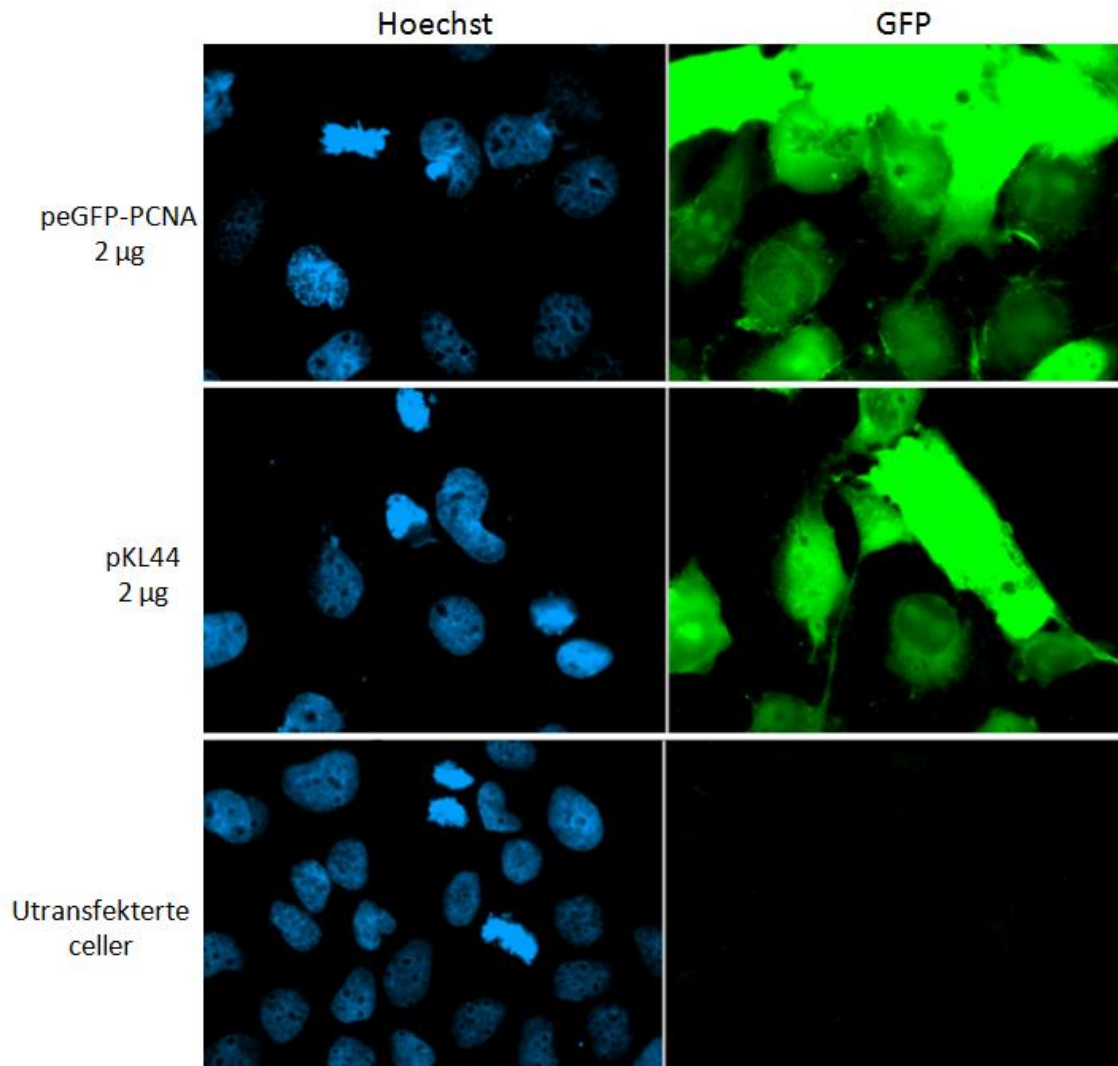
Sekvensering av klon 1-10 viste at en prøve (klon 2) hadde punktmutasjonen hvor aminosyren histidin (CAC) var endret til tyrosin (TAC) (se vedlegg C3 for sekvenseringsresultat). Mutert peGFP-PCNA (klon 2) ble sammenlignet med villtype peGFP-PCNA. Denne sammenligningen viste at det ikke var andre mutasjoner i genet for hPCNA enn den ønskede mutasjonen (CAC til TAC).

peGFP-PCNA mutant fikk navnet pKL44 (KL: Kristine Larsen, 44: mutasjon i aminosyren i posisjon 44 i hPCNA). pKL44 ble transformert inn i DH10B elektrokompetente celler. Denne stammen fikk navnet KL02.

3.4 GFP-PCNA blir uttrykt i U2OS cellelinje

Etter at punktmutasjonen i peGFP-PCNA ble generert og kontrollert ved sekvensering, ble det videre arbeidet i studien utført ved bruk av den humane kreftcellelinjen U2OS. Det muterte plasmidet peGFP-PCNA, heretter kalt pKL44, og villtype plasmidet peGFP-PCNA, heretter kalt peGFP-PCNA, ble transfektert inn i U2OS celler. Genet for mutert GFP-PCNA (fusjonsprotein) blir videre kalt eGFP-PCNAH44Y, og genet for villtype GFP-PCNA blir kalt eGFP-PCNA.

I første omgang var det ønskelig å finne ut om GFP-PCNA kunne uttrykkes i U2OS cellelinjen. 35 mm skåler med dekkglass i bunn ble tilsatt cellesuspensjon av U2OS celler, og inkubert over natt (vedlegg B11). Dagen etter ble cellene transfektert med plasmid (peGFP-PCNA for celler i den ene skålen, og pKL44 i den andre skålen) ved hjelp av FuGENE® HD transfeksjonsreagens (vedlegg B12). Den siste skålen var en kontroll med utransfekteerte celler. Etter 48 timer i inkubator ble cellene fiksert i 4 % formaldehyd (vedlegg B14) og farget med Hoechst (vedlegg B15). Cellene ble ikke preekstrahert fordi et eventuelt GFP-signal i både cellekjernen og cytoplasma skulle ses på.

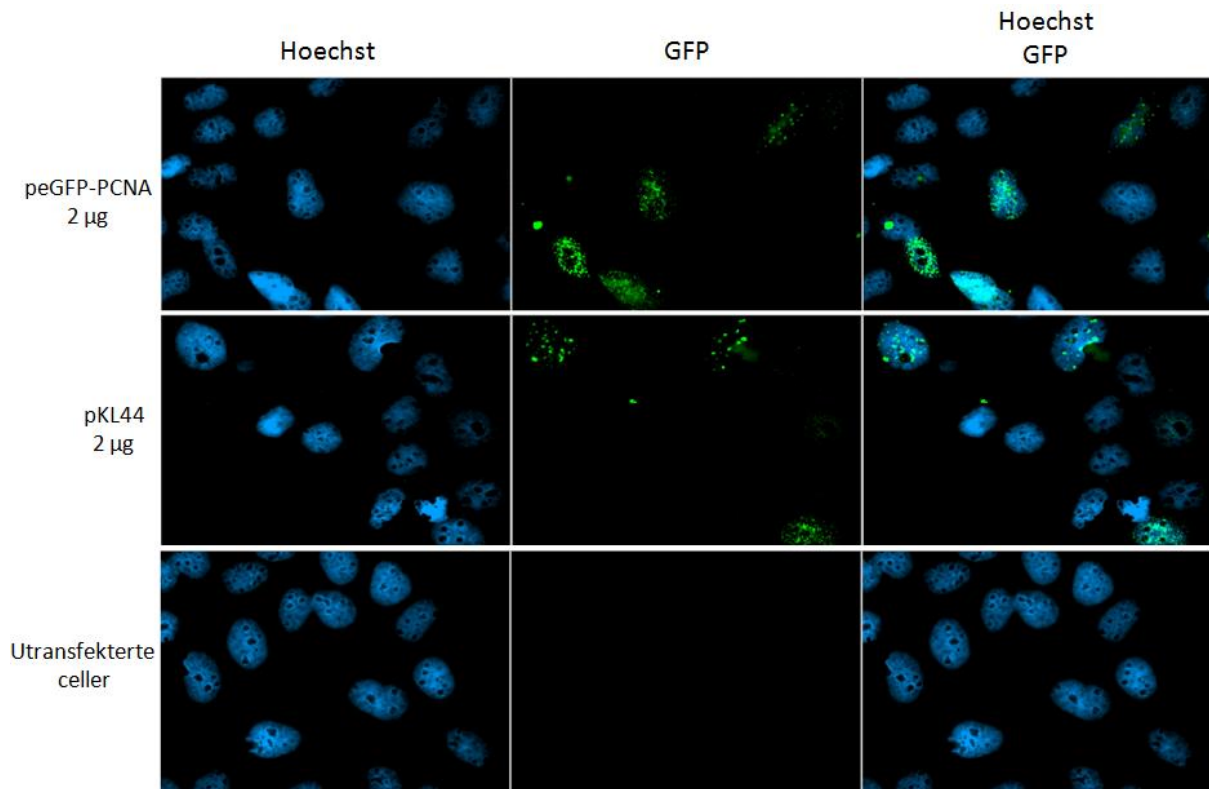


Figur 20. U2OS celler uttrykker GFP-PCNA 48 timer etter transfeksjon. Første rad: celler transfektert med 2 µg peGFP-PCNA; andre rad: celler transfektert med 2 µg pKL44; tredje rad: uttransfekterte celler. Kolonnen til venstre viser DNA som er farget med Hoechst, og kolonnen til høyre viser GFP-signal.

Dekkglassene med U2OS celler ble sett på i fluorescensmikroskop (Axio Imager Z1 med ApoTome fra Zeiss). Figur 20 viser at alle cellene som var transfektert med enten peGFP-PCNA eller pKL44 hadde et GFP-signal i både kjernen og cytoplasma. De hadde derimot varierende grad av GFP-signal, noen av cellene var svakt GFP-positive, mens andre var kraftig GFP-positive. Alle bildene (figur 20) ble tatt med den samme høye eksponeringstid på 2300 ms, denne eksponeringstiden var akkurat under grensen til at kontrollen begynte å gi et svakt GFP-signal (bakgrunn). GFP-signal fra cellene transfektert med peGFP-PCNA og pKL44 har derfor et reelt positivt signal sammenlignet med bakgrunnen. Ut fra dette ble det konkludert at det så ut som de fleste cellene uttrykte GFP-PCNA etter transfeksjon.

3.4.1 GFP-PCNA lokaliserer til kjernen

For å undersøke nærmere hvorvidt GFP-PCNA lokaliserte til replikasjonsfoci i kjernen ble cellene preekstrahert før de ble fiksert (4 % formaldehyd) og farget (vedlegg B13-B15). Ved å preekstrahere cellene ble alt som ikke var bundet til cellekjernen fjernet. Dette ville gjøre det mulig å se på hvordan GFP-PCNA ble uttrykt i kjernen.

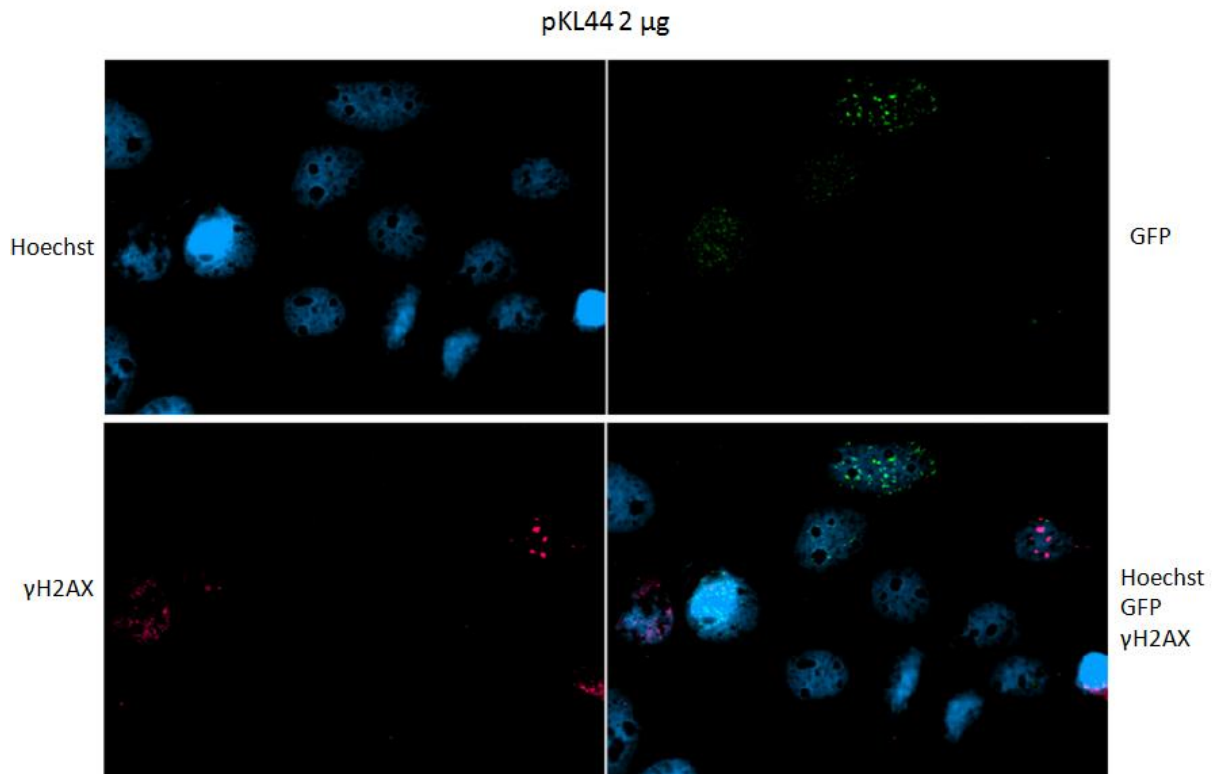


Figur 21. Preekstraherte U2OS celler etter 48 timer. Første rad: celler transfektert med 2 µg peGFP-PCNA; andre rad: celler transfektert med 2 µg pKL44; tredje rad: utransfekterte celler. Kolonnen til venstre viser DNA som er farget med Hoechst, kolonnen i midten viser cellene som uttrykker GFP i cellekjernen, og kolonnen til høyre er bildene til venstre og i midten lagt opp på hverandre.

Bildene i figur 21 (midterste kolonne) viser cellene som gir et GFP-signal i kjernen. Det fluorescerende proteinet GFP er fusjonert sammen med PCNA, så derfor er også PCNA til stede der hvor GFP gir et signal. Cellene som gir GFP-signal ser ut til å ha ulike mønstre som ligner på typiske replikasjonsfoci. Det er i slike foci at DNA-replikasjonen foregår, og det er bare de cellene som er under replikasjon (S-fase) som har replikasjonsfoci [74]. Størrelsen og mengden av fociene avhenger av hvor i S-fasen cellen befinner seg. Celler med mange små foci er typisk i tidlig S-fase, celler med mellomstore foci i utkanten av kjernen, er i midt S-fase, og cellene med store og få foci er i sen S-fase [75].

3.4.2 γ H2AX-signal lokaliserer ikke til samme sted som GFP-PCNA

I tillegg til GFP-signal i kjernen, ble det også sett på γ H2AX-signal (vist i rødt) i preekstraherte celler. Som det fremgår av bildene i figur 22 ble det detektert γ H2AX-signal i noen av cellene, men disse cellene var ikke de samme cellene som ga GFP-signal. γ H2AX-signalet kommer altså ikke fra cellene som er i S-fasen.



Figur 22. γ H2AX-signalet er ikke lokalisert i de samme cellene som er i S-fasen. U2OS celler transfektert med 2 μ g pKL44. Cellene ble preekstrahert og fiksert 48 timer etter transfeksjon, og farget med antistoff mot γ H2AX. DNA ble farget med Hoechst.

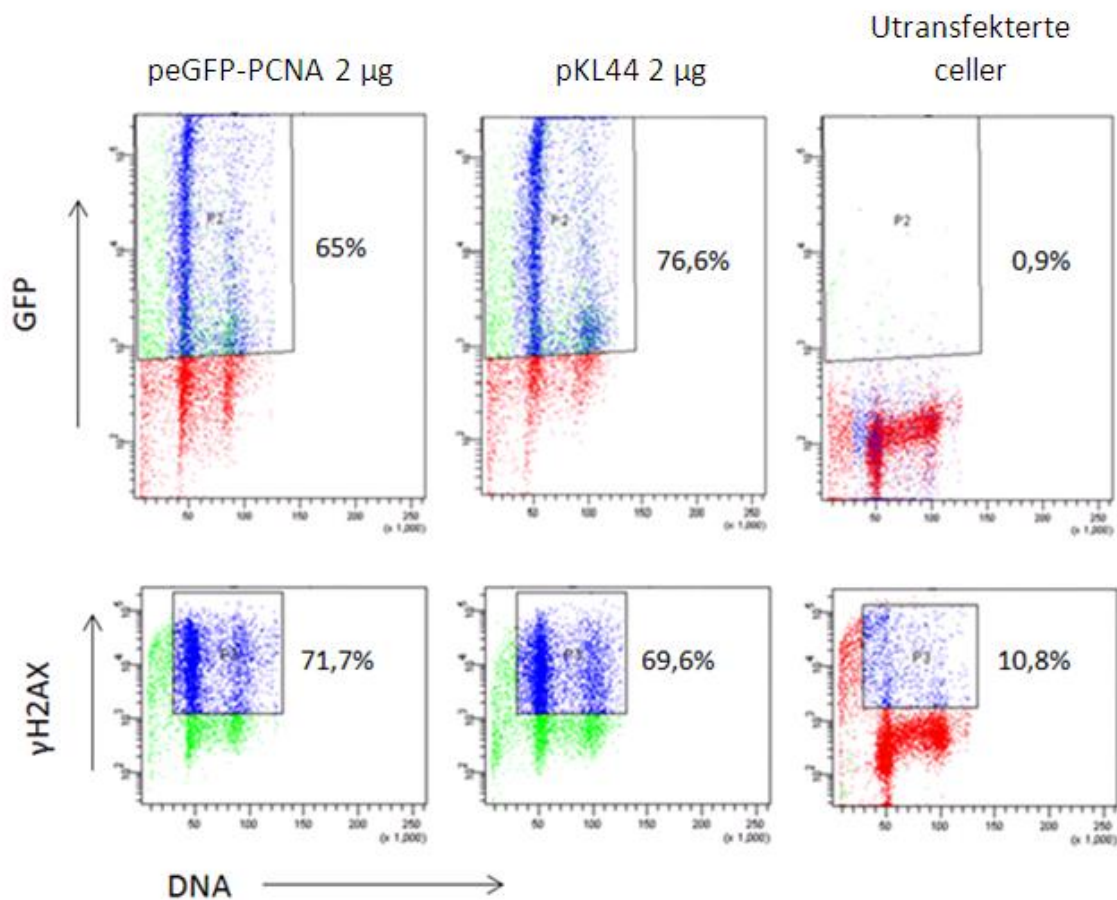
3.5 Optimalisering av transfeksjonsbetingelser i humane celler

I tillegg til å se på U2OS cellene transfektert med peGFP-PCNA og pKL44 i fluorescensmikroskop, ble cellene også analysert ved hjelp av flowcytometri. Flowcytometri er en metode som gjør det mulig å måle raskt på forskjellige parametere av flere tusen enkeltceller [64]. Ved å bruke flowcytometri vil det kunne gi et mer kvantitativt mål på eventuelle forskjeller mellom cellene som ble transfektert med peGFP-PCNA og de som ble transfektert med

pKL44. Før resultatene fra flowcytometrien kunne gi svar, var det nødvendig å optimalisere flere av transfeksjonsbetingelsene.

3.5.1 Transfeksjon av peGFP-PCNA og pKL44

Immunofluorescensanalysen indikerte at omtrent alle cellene uttrykte GFP-PCNA etter transfeksjon (figur 20), og at noen av cellene hadde γ H2AX-signal (figur 22). For mer nøyaktig kvantifisering ble transfeksjonseffektiviteten og γ H2AX-signal målt ved flowcytometri.



Figur 23. U2OS celler med GFP- og γ H2AX-signal 48 timer etter transfeksjon. Fra venstre: celler transfektet med 2 µg peGFP-PCNA; celler transfektet med 2 µg pKL44; utransfektete celler. Cellene er farget med Hoechst (DNA) og antistoffer mot γ H2AX (vedlegg B15).

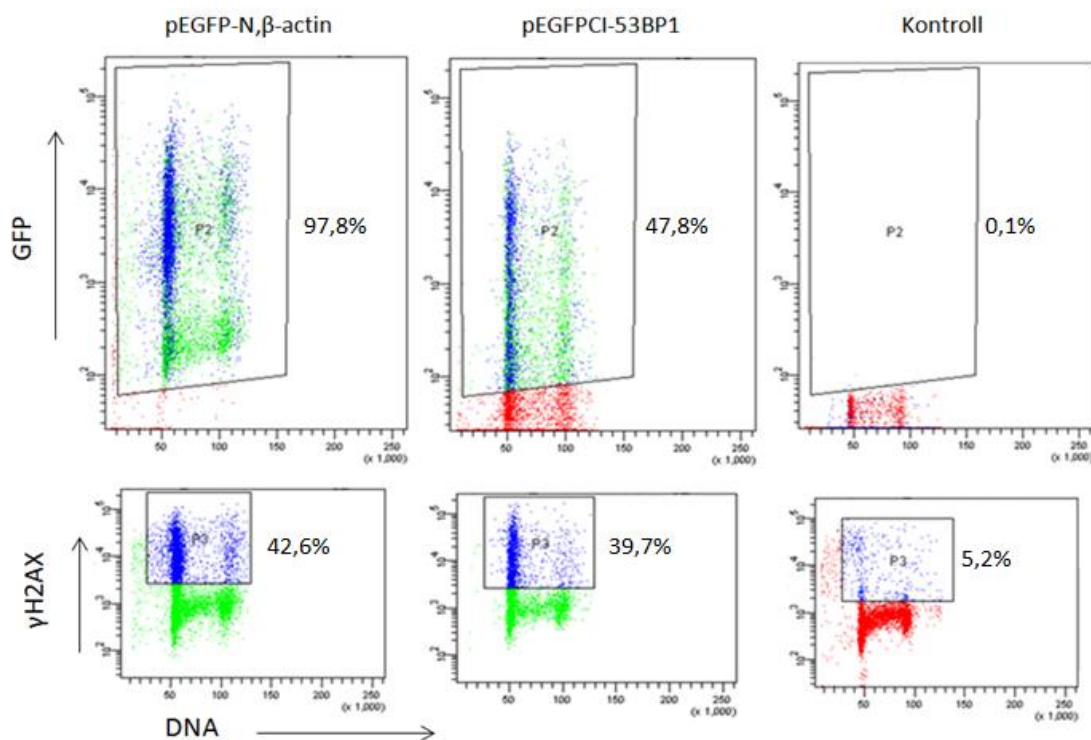
De øverste diagrammene i figur 23 viser andel av celler som er GFP-positive, disse er markert (P2). Diagrammene på andre linje angir cellene som er γ H2AX-positive (P3). Mengde γ H2AX-positive celler for peGFP-PCNA var ca. 72 %, og ca. 70 % for pKL44. Dette var en

høy prosentandel av γ H2AX-positive celler for begge prøvene. De γ H2AX-positive cellene så ikke ut til å være i S-fase, men heller G1 og G2 (ut fra DNA-innhold). Kontrollen med utransfektete celler hadde en andel av γ H2AX-positive celler på ca. 11 % i dette forsøket.

3.5.2 Transfeksjon av peGFP-N, β -actin og peGFPPCI-53BP1

Siden såpass mange av de transfektete cellene var γ H2AX-positive, og disse ikke var S-fase populasjon som ville forventes hvis γ H2AX-signalet skyldtes PCNA-relatert S-faseskade, ble det undersøkt om transfeksjonen alene kunne være årsaken til γ H2AX-signalet.

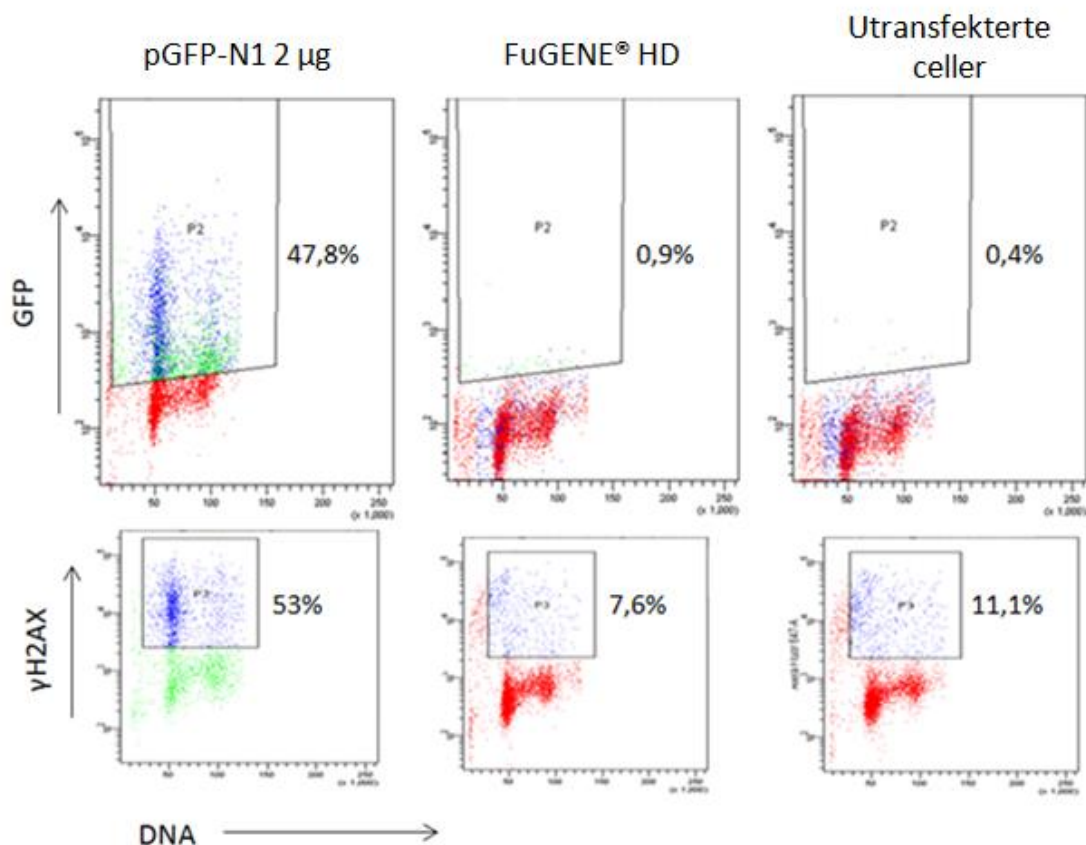
Cellene ble derfor transfektet med to andre GFP-vektorer, disse var peGFP-N, β -actin og peGFPPCI-53BP1. I likhet med peGFP-PCNA og pKL44 (figur 23) viser flowdiagrammene i figur 24 at disse GFP-vektorene også hadde mange γ H2AX-positive celler. Denne prosentandelen av γ H2AX-positive celler var mindre, men det indikerer likevel at transfeksjonen kan føre til γ H2AX-signal i cellene.



Figur 24. U2OS celler transfektet med to andre GFP-vektorer 48 timer etter transfeksjon. Fra venstre: celler transfektet med 2 μ g peGFP-N, β -actin; celler transfektet med 2 μ g peGFPPCI-53BP1; utransfektete celler. Cellene er farget med Hoechst (DNA) og antistoffer mot γ H2AX (vedlegg B15).

3.5.3 Transfeksjon av tom GFP-vektor

I de to forrige forsøkene var en stor andel av cellene γ H2AX-positive. For å se enda litt nærmere på hvorvidt transfeksjonen alene kunne forårsake γ H2AX-signal, ble cellene transfektert med tom vektor (pGFP-N1). Det ble også inkludert celler som kun ble tilsatt FuGENE® HD transfeksjonsreagens uten plasmid. Dette var en kontroll for å sjekke om transfeksjonsreagenset (FuGENE® HD) førte til γ H2AX-positive celler.

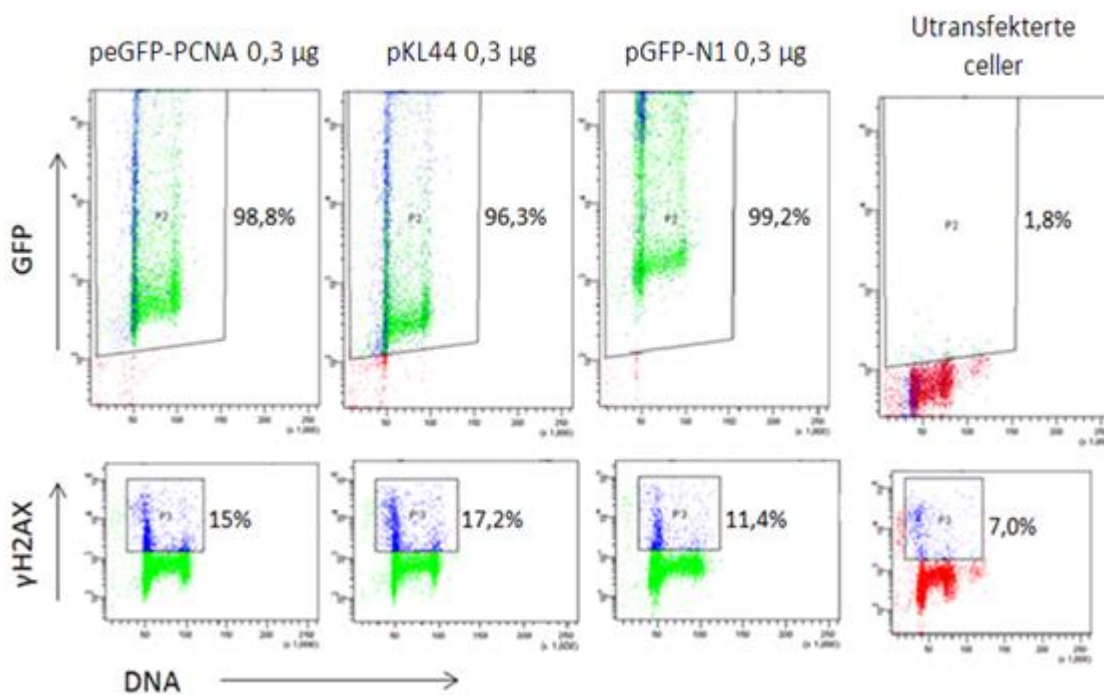


Figur 25. U2OS celler transfektert med tom GFP-vektor og celler kun tilsatt transfeksjonsreagens. Fra venstre: celler transfektert med 2 μg pGFP-N1; celler tilsatt FuGENE® HD transfeksjonsreagens; utransfektete celler. Cellene ble fiksert og farget med antistoff (mot γ H2AX) og Hoechst (DNA) 48 timer etter transfeksjon og tilsetning av FuGENE® HD transfeksjonsreagens.

Tallene i flowdiagrammene (figur 25) viser at 48 % av cellene fikk transfektert inn den tomme vektoren, og av de transfekterte cellene var 53 % γ H2AX-positive. FuGENE® HD transfeksjonsreagens ga ikke flere γ H2AX-positive celler enn hva kontrollen med utransfektete celler gjorde. Transfeksjonsreagenset ble derfor utelukket som årsak til γ H2AX-positive celler.

3.5.4 Transfeksjon med mindre mengde DNA gir lavere andel av γ H2AX-positive celler

Alle forsøkene hittil hadde gitt store mengder med γ H2AX-positive celler, men dette så ut til å være et resultat av selve transfeksjonen. Protokollen som det ble arbeidet etter var en godt innarbeidet fremgangsmåte som var mye brukt i laboratoriet. På bakgrunn av et annet forsøk som ble utført (data ikke vist) ble det valgt å endre denne protokollen. I dette forsøket ble det transfektert med lavere mengde plasmid (0,5 μ g) og redusert mengde av FuGENE® HD transfeksjonsreagens. Dette ga lavere andel av γ H2AX-positive celler. På bakgrunn av dette ble det forsøkt å transfektere med enda lavere mengder plasmid for å se om γ H2AX-signalet som følge av transfeksjonen kunne reduseres.



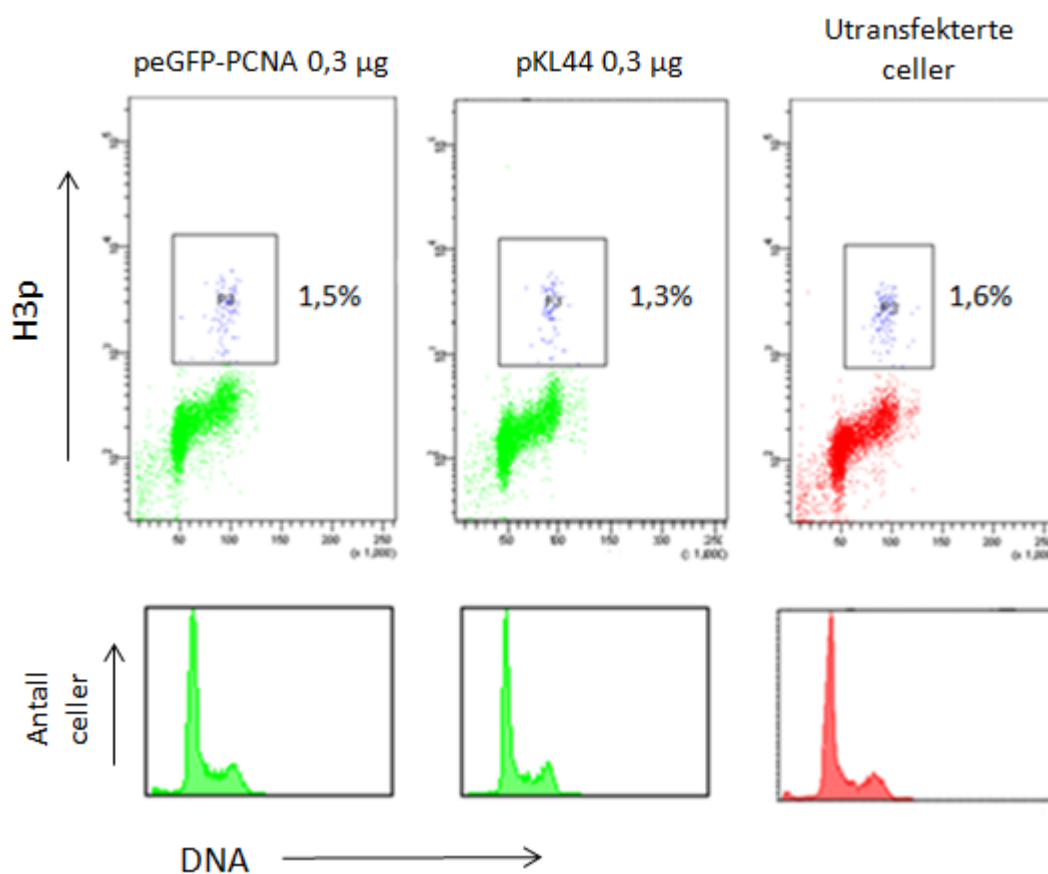
Figur 26. U2OS celler transfektert med ulike mengder plasmid. Fra venstre: celler transfektert med 0,3 μ g peGFP-PCNA; celler transfektert med 0,3 μ g pKL44; celler transfektert med 0,3 μ g pGFP-N1; utransfektete celler. Cellene ble fiksert (vedlegg B14) og farget med antistoffer og Hoechst (DNA) (vedlegg B15) 48 timer etter transfeksjon.

Cellene som ble transfektert med 0,3 μ g plasmid (peGFP-PCNA, pKL44 og pGFP-N1) (figur 26) hadde høy transfeksjonseffektivitet, og en langt lavere andel av γ H2AX-positive celler enn i tidligere forsøk. Ved en enda lavere mengde plasmid (0,1 μ g), ble det observert dårlig transfeksjonseffektivitet på kun 4 % (data ikke vist). Basert på disse optimaliseringsforsøkene

ble det valgt å transfektere med 0,3 µg plasmid (peGFP-PCNA og pKL44) i de videre forsøkene.

3.6 pKL44 fører ikke til endring i cellesyklus

For å undersøke om pKL44 ville føre til endring i cellesyklus ble det brukt en markør for celler i mitose. Cellene ble farget med antistoff mot fosforylert histon H3. Histon H3 er som navnet tilsier medlem av histonfamilien, i likhet med H2AX. Histoner er viktige proteiner som er en del av strukturen til kromatin, og de blir fosforylert under mitose [76].



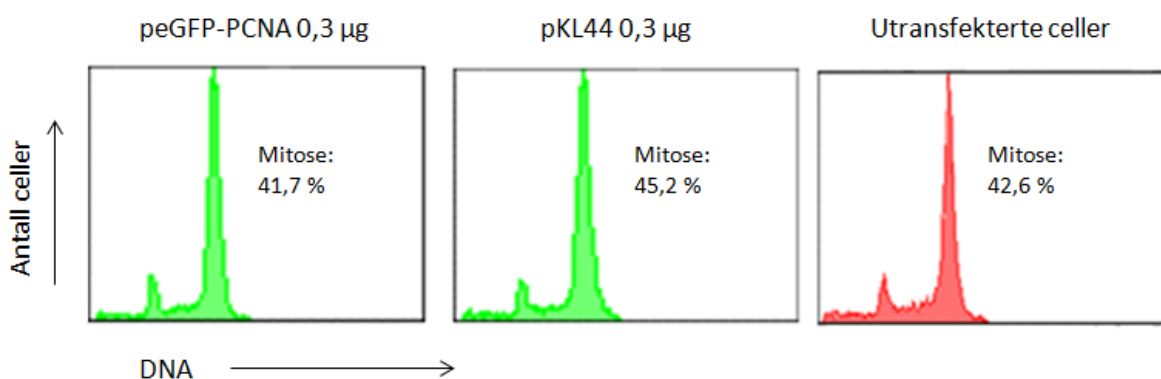
Figur 27. U2OS celler i mitose 72 timer etter transfeksjon. Fra venstre: celler transfektert med 0,3 µg peGFP-PCNA; celler transfektert med 0,3 µg pKL44; uttransfektete celler. Nederste rad viser DNA-profilene. Cellene er farget med Hoechst (DNA) og antistoffer mot fosforylert histon H3 (H3p).

Figur 27 angir andel celler som var H3p-positive (P3). Disse H3p-positive cellene danner en egen liten populasjon som skiller seg fra de resterende cellene. 1,5 %, 1,3 % og 1,6 % var mengden av celler som var H3p-positive, for henholdsvis peGFP-PCNA, pKL44 og kontroll med uttransfektete celler. Dette var andelen av celler som var i mitose, og som tallene i

flowdiagrammet viser var det ingen forskjell mellom peGFP-PCNA og pKL44. Det var altså like mange celler som hadde kommet seg gjennom S-fasen og var i M-fasen. Transfeksjonseffektiviteten for cellene transfektert med peGFP-PCNA og pKL44 var begge høye med 96 % og 98 % av cellene, og de utransfekterte cellene med 0,3 % (data ikke vist). DNA-profilene var også like ved at flest celler var i G1-fasen, få celler i S-fasen og litt flere igjen i G2/M-fasen.

I et tilsvarende forsøk ble cellene tilsatt Nocodazole 18 timer før cellene ble høstet og fiksert. Nocodazole er et antimittotisk middel som ødelegger dannelsen av mikrotubuli ved at den hemmer tubulinpolymeriseringen [77]. Dette fører til at celledelingen stopper opp i M-fasen, mitosen [8]. DNA-profilene (figur 28) ser helt annerledes ut enn de cellene som ikke hadde fått Nocodazole. For cellene som ble behandlet med Nocodazole var kun en liten andel av cellene i G1-fasen, enda færre i S-fasen, mens de aller fleste cellene befant seg i G2/M-fasen. Disse cellene kom seg ikke videre herfra fordi Nocodazole har stoppet cellene i M-fasen. Dette ble brukt for å sammenligne mengden av celler i mitose mellom peGFP-PCNA og pKL44. Hvis cellene hadde problemer i S-fasen, ville ikke like mange celler komme seg til M-fasen. DNA-profilene ser like ut, og mengden av H3p-positive celler (celler i mitose) for peGFP-PCNA og pKL44 ligger på ca. 42 og 45 %, dette er ingen stor forskjell. Transfeksjonseffektiviteten var 97 %, 98 % og 0,6 % for henholdsvis peGFP-PCNA, pKL44 og de utransfekterte cellene (data ikke vist).

Disse resultatene tyder på at uttrykk av eGFP-PCNAH44Y ikke fører til endringer i cellesyklus.



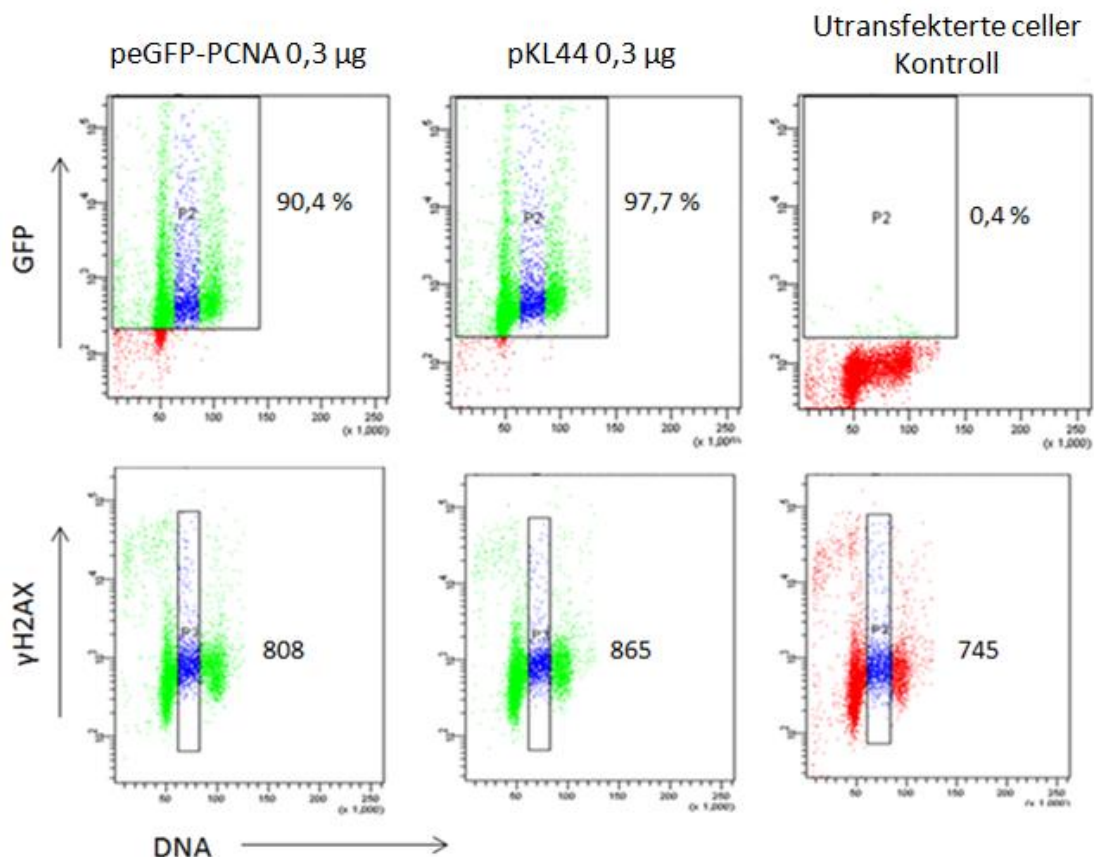
Figur 28. DNA-profilen til U2OS celler behandlet med Nocodazole. Fra venstre: celler transfektert med 0,3 µg peGFP-PCNA; celler transfektert med 0,3 µg pKL44; utransfektete celler. Cellene ble fiksert (vedlegg B14) og farget med Hoechst (DNA) og antistoffer mot H3p (vedlegg B15) 72 timer etter transfeksjon. Nocodazole ble tilsatt 18 timer før cellene ble høstet.

3.7 pKL44 gir ikke økt DNA-skade

Markørene som ble brukt for å analysere cellene for DNA-skade i denne studien var antistoffer mot γ H2AX og pRPA. Som nevnt under introduksjonen brukes antistoff mot γ H2AX som en markør for dobbeltrådbrudd [29], mens antistoff mot pRPA brukes som en mer generell markør på DNA-skade i S-fase (replikasjonsstress, enkelttrådbrudd, "stalled" replikasjon) [31].

3.7.1 γ H2AX

For å undersøke om uttrykk av eGFP-PCNAH44Y ville føre til DNA-skade ble cellene først farget med antistoffer mot γ H2AX (vedlegg B15). Celler transfektert med pKL44 ble sammenlignet med peGFP-PCNA.

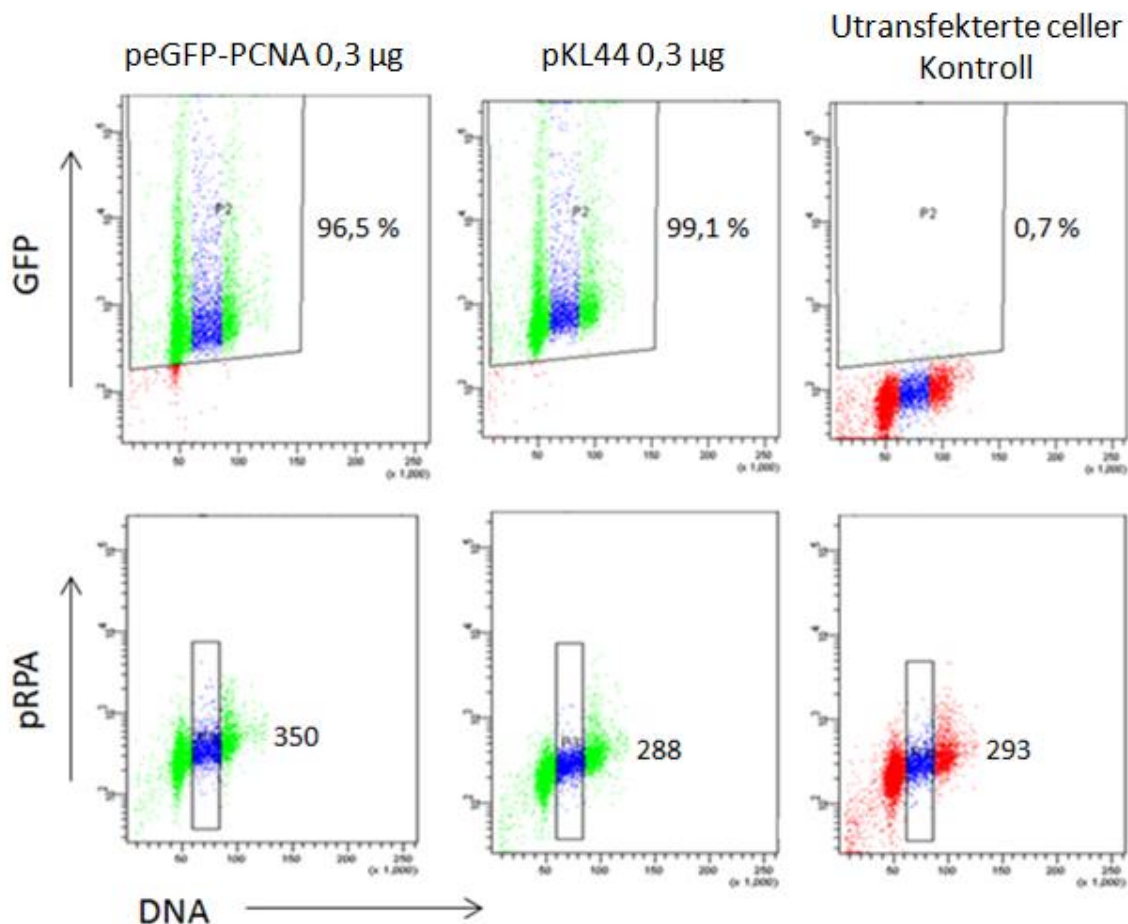


Figur 29. Medianverdi for γ H2AX-signal i S-fasen for U2OS celler. Fra venstre: celler transfektert med 0,3 µg peGFP-PCNA; celler transfektert med 0,3 µg pKL44; utransfekteerte celler. Cellene ble fiksert og farget med antistoffer mot γ H2AX og Hoechst (DNA) 72 timer etter transfeksjon.

Andel GFP-positive celler var som diagrammene viser 90 % for peGFP-PCNA, 98 % for pKL44 og 0,4 % for de utransfektete cellene (figur 29). I stedet for å se på andel av γ H2AX-positive celler som det hadde blitt gjort i tidligere forsøk, ble det denne gangen sett på medianverdien for cellene som uttrykker γ H2AX i S-fasen. Medianen var 808 for celler som uttrykte eGFP-PCNA og noe høyere med 865 for de som uttrykte eGFP-PCNAH44Y, men dette er ingen nevneverdig forskjell.

Disse resultatene tyder på at uttrykk av eGFP-PCNAH44Y ikke fører til DNA-skade (γ H2AX) i S-fasen for cellene.

3.7.2 pRPA



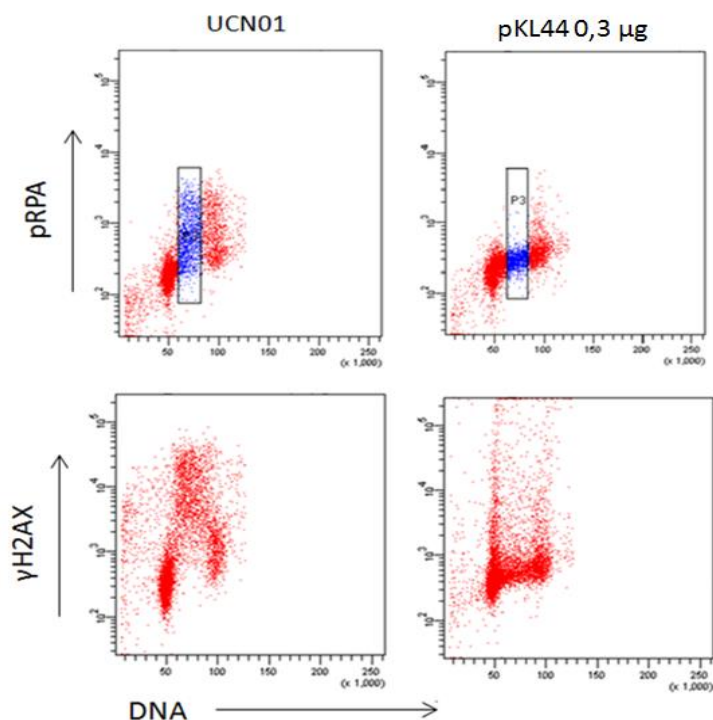
Figur 30. Medianverdi for pRPA-signal i S-fasen for U2OS celler 72 timer etter transfeksjon. Fra venstre: celler transfektet med 0,3 µg peGFP-PCNA; celler transfektet med 0,3 µg pKL44; utransfektete celler. Cellene ble farget med Hoechst (DNA) og med antistoffer mot pRPA (vedlegg B15).

Den andre markøren som ble benyttet for å studere om uttrykk av eGFP-PCNAH44Y ville føre til DNA-skade var pRPA. I likhet med det forrige forsøket hvor antistoff mot γ H2AX var

benyttet, ble også medianverdien til cellene som uttrykker pRPA i S-fasen markert. Medianen for peGFP-PCNA og pKL44 i S-fasen var henholdsvis 350 og 288. Kontrollen hadde en medianverdi på 293. Medianverdiene for pRPA-signal tydet ikke på cellene som uttrykte eGFP-PCNAH44Y hadde mer DNA-skade i S-fase.

3.7.3 Positiv kontroll på DNA-skade

Så langt viste alle eksperimentene at uttrykk av eGFP-PCNAH44Y ikke førte til verken γ H2AX- eller pRPA-signal i S-fasen for cellene. Som en positiv kontroll for γ H2AX- og pRPA-signal i celler med DNA-skade og S-faseproblemer, ble pKL44 transfekterte celler sammenlignet med celler tilsatt CHK1-hemmeren UCN-01 (7-hydroksyl-staurosporin). Det er tidligere vist at UCN-01 fører til DNA-skade i S-fase [78]. Disse cellene ble tilsatt en blanding av to typer primære antistoffer og to sekundære antistoffer (mot γ H2AX og pRPA). Det var viktig at de sekundære antistoffene hadde to ulike fluorokromer som ikke vil gi overlappende signal i flowcytometeret.



Figur 31. Positiv kontroll for U2OS celler med S-faseproblemer. Fra venstre: celler behandlet med 300 nM UCN-01; celler transfektert med 0,3 μ g pKL44. Cellene er farget med antistoffer mot både γ H2AX og pRPA, og Hoechst (DNA).

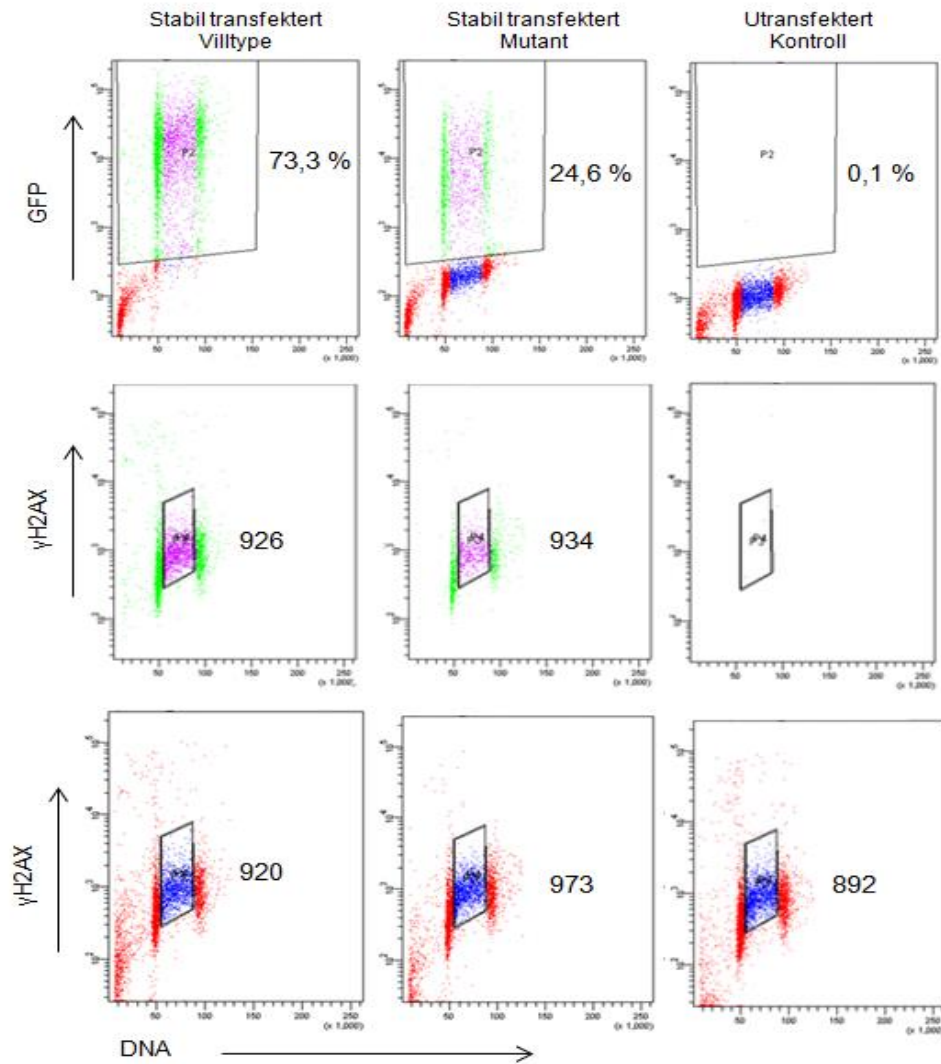
Den positive kontrollen for DNA-skade viser tydelig at det er en forskjell mellom cellene som ble behandlet med UCN-01 og cellene som ble transfektert med pKL44, dette gjelder både for cellene som gir et γ H2AX-signal og de som gir et pRPA-signal. Cellene som ble behandlet med UCN-01 har et klart kraftigere signal i S-fasen sammenlignet med cellene som ble transfektert med pKL44. Dette er et eksempel på hvordan store S-faseproblemer ville sett ut, hvis det hadde vært tilfelle med celler transfektert med pKL44.

3.7.4 Stabilt transfektert cellelinje har færre GFP-positive celler

I alle eksperimentene til nå ble cellene analysert 48 eller 72 timer etter transfeksjon. For å undersøke om celler som uttrykker eGFP-PCNAH44Y kan vokse normalt over flere generasjoner, ble det selektert for to stabile transfekterte cellelinjer ved bruk puromycin gjennom 5,5 uker. Plasmidet har som tidligere nevnt resistensgener for puromycin (figur 15). Den ene cellelinjen var transfektert med peGFP-PCNA og den andre med pKL44.

Den stabilt transfekterte cellelinjen transfektert med pKL44 hadde bare en andel på 25 % GFP-positive celler, mens peGFP-PCNA hadde 73 % GFP-positive celler (figur 32). Dette var færre GFP-positive celler enn hva som var observert for den transient transfekterte cellelinjen som var transfektert med 0,3 μ g pKL44. Det var ingen betydelig forskjell i medianverdien for γ H2AX mellom de transfekterte cellene (peGFP-PCNA og pKL44).

Det tydet altså ikke på at de stabilt transfekterte cellene som hadde uttrykt eGFP-PCNAH44Y over flere uker, hadde høyere γ H2AX-signal sammenliknet med eGFP-PCNA. Derimot hadde disse cellene er veldig lav andel GFP-positive celler som kan være tegn på at cellene ikke liker å uttrykke eGFP-PCNAH44Y over en lengre periode.



Figur 32. Stabilt transfektert U2OS cellelinje. Fra venstre: celler transfektert med 0,3 μ g peGFP-PCNA; celler transfektert med 0,3 μ g pKL44; utransfektete celler. Øverste rad angir cellene som er GFP-positive; andre rad: medianverdien av γ H2AX i S-fasen hos de transfektete cellene; tredje rad: medianverdien av γ H2AX i S-fasen hos alle cellene (både transfektete og utransfektete). Cellene er fiksert, og farget med Hoechst (DNA) og antistoffer mot γ H2AX 5,5 uker etter transfeksjon.

4 Diskusjon

4.1 Konstruksjon av mutant PCNA ved hjelp av sete-dirigert mutagenese

På bakgrunn av mutasjonen i β -clamp *E. coli* som førte til replikasjonsproblemer for *E. coli*, var det ønskelig å lage en tilsvarende mutasjon i humant PCNA for å undersøke hvordan denne mutasjonen ville påvirke en human kreftcellelinje. Histidin i posisjon 44 i PCNA så ut til å tilsvare histidin i posisjon 175 i bindingslommen til β -clamp, *E. coli* (se introduksjon). Det var kun nødvendig å endre på ett nukleotid, der CAC (histidin) ble endret til TAC (tyrosin). Denne punktmutasjonen i humant PCNA ble utført ved hjelp av QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit. Plasmidet som ble benyttet for å utføre mutagenesen var peGFP-PCNA som koder for fusjonsproteinet GFP-PCNA.

QuikChange II XL Mutagenesis Kit består av flere trinn. Det ble først laget komplementære mutageneseprimere med den ønskede mutasjonen (TAC/GTA) i midten av hver primer. Deretter ble PCR utført av peGFP-PCNA og pWhitescript kontrollplasmid (5, 10, 20 og 50 ng), foreldreplasmid ble kuttet med restriksjonsenzymet Dpn I, og til slutt ble plasmid transformert inn i kompetente celler. I de første forsøkene ble protokollen til kitet fulgt. Etter flere forsøk, uten suksess, var det nødvendig med optimalisering av trinnene.

I de innledende forsøkene ble det funnet at plasmidkonsentrasjonen (PCR-produkt) etter PCR var lav (figur 18). En årsak til lite PCR-produkt kunne være primerdimerisering, det vil si at mutageneseprimerne kan basepare og føre til problemer under PCR [79]. For å få økt mengde plasmidprodukt ble plasmidkonsentrasjonen økt til det tidoble (50, 100, 200 og 500 ng), og DNA-syntesetrinnet ble økt fra 7 til 8 minutter.

De kjemisk kompetente cellene som fulgte med kitet ga lav transformasjonseffektivitet, så derfor ble andre typer kjemisk kompetente celler testet. Men disse cellene ga også en transformasjonseffektivitet som var 10-100 ganger lavere enn hva produsenten hadde oppgitt (se tabell 3). Transformasjon av kjemisk kompetente celler har flere kritiske trinn hvor feil som gjøres kan redusere transformasjonseffektiviteten (for kraftig blanding, for lav/høy temperatur under varmesjokket, eller for kort/lang tid under varmesjokket). Den lave transformasjonseffektiviteten kan skyldes at noen av disse trinnene ikke ble utført korrekt.

Den kan også skyldes at cellene ikke har blitt oppbevart riktig hos produsent eller under transport (-80 ° C). På grunn av lav transformasjonseffektivitet ble det derfor byttet til elektrokompetente celler (DH10B *E. coli* [38]) som ble laget selv. Disse hadde transformasjonseffektivitet på $2,32 \times 10^9$ CFU/ μ g DNA (pUC19).

Ved å øke plasmidkonsentrasjonen i PCR-reaksjonen og transformere med DH10B elektrokompetente celler, ga transformasjon av pWhitescript blå kolonier (tabell 4). Koloniene med blå fenotype var cellene med mutasjon. Mutasjonseffektiviteten (ME) ble beregnet til 26 %, da det var mange færre blå enn hvite kolonier. Årsaken til den lave andelen av celler med blå fenotype kan skyldes at syntetiseringen av mutert plasmid i PCR ikke fungerte optimalt, men også at Dpn I ikke klarte å kutte foreldreplasmid (metylert- og hemimetylert plasmid) i tilstrekkelig grad. I følge kitet skulle andelen av celler med blå fenotype være > 98 % hvis transformasjonen av pUC18/19 ga høyere transformasjonseffektivitet enn > 10^9 CFU/ μ g. Dette tydet på at Dpn I ikke kuttet godt nok. Ved transformasjon av peGFP-PCNA inn i DH10B elektrokompetente celler ble tiden hvor Dpn I kutter økt fra 1 time til 2 timer. I tillegg ble Dpn I inaktivert (80 ° C, 20 min) etter kutting, for å forhindre at Dpn I skulle fortsette å kutte DNA videre.

Agarplatene med DH10B elektrokompetente celler transformert med peGFP-PCNA ga mange kolonier (tabell 5). Plasmid fra 10 kolonier ble rensert og PCNA ble sekvensert. PCNA i ett plasmid hadde den ønskede mutasjonen (CAC→TAC). Mutert plasmid fikk navnet pKL44, og ble brukt videre i studien. Mutasjonseffektiviteten var da ca. 10 %, men ti kolonier er for lite til å estimere et nøyaktig tall. Det ble konstatert at metoden kunne blitt ytterligere optimalisert, og at det svake trinnet antakelig var Dpn I aktivitet.

4.2 Fluorescensmikroskopi

Etter at mutasjonen (TAC) var innført i PCNA, ble plasmid (peGFP-PCNA og pKL44) transfektert inn i en U2OS cellelinje for å undersøke om GFP-PCNA ble uttrykt i cellene (kjerne eller cytoplasma), og for å se på markøren for γ H2AX (dobbeltråddbrudd) i fluorescensmikroskop.

Bildene i figur 20 viser at GFP-PCNA protein var til stede både i kjernen og cytoplasma. GFP-signalet fra cellene var veldig varierende, noen hadde et kraftig signal, mens andre hadde et veldig svakt signal. For å se signalet fra de helt svakeste cellene ble derfor

eksponeringstiden økt til 2300 ms. Den høye eksponeringstiden førte til at cellene med kraftigst GFP-signal overskygget signalet fra flere av de andre cellene. At noen celler uttrykker GFP kraftigere enn andre skyldes hvor mye DNA cellene har klart å ta opp i kjernen. Hvorfor noen celler tar opp mer DNA enn andre er ikke fullstendig kjent, men det er flere studier som tyder på at celler tar opp mer plasmid til den fremtidige kjernen når de er i mitose [80] [81].

For de preekstraherte cellene (figur 21) var det noen som viste uttrykk av GFP-PCNA i kjernen, dette er cellene som var i S-fase. Cellene som uttrykte GFP-PCNA i kjernen hadde typiske mønstre for replikasjonsfoci. Replikasjonsfociene hadde varierende størrelse, dette forteller hvor i S-fasen cellen befant seg. Celler i tidlig S-fase har mange små replikasjonsfoci spredt rundt i hele cellekjernen, med unntak av akkurat rundt DNA. Cellene i midt S-fase har foci i utkanten av cellekjernen og rundt DNA, og cellene i sen S-fase har større, men færre foci, og de har begynt å danne ringer av foci [75]. For å være helt sikker på at PCNA var lokalisert til replikasjonsfociene, kunne cellene blitt tilsatt tymidinanalogen EdU noen minutter før cellene skulle fikseres [82].

I figur 22 er det vist et bilde av celler (pKL44) som er γ H2AX-positive. Som bildene viser var ikke disse cellene de samme som uttrykte GFP-PCNA. Dersom cellene hadde hatt problemer under replikasjonen burde γ H2AX-signalet vært lokalisert i de samme cellene som uttrykker GFP-PCNA i kjernen (S-fase celler). De γ H2AX-positive cellene i figur 22 kan være døde celler som har en celledød-relatert fosforylering [83].

4.3 Flowcytometri

I tillegg til å se på hvordan cellene så ut i fluorescensmikroskop var det ønskelig å få et mer kvantitativt resultat på transfeksjonseffektivitet, mengde DNA-skade og undersøke om cellene hadde cellyklusproblemer. Dette ble undersøkt ved å bruke flowcytometri. Flowcytometri vil gi et godt kvantitativt mål på mengden av transfekterte celler, og fordi flere parametere kan måles for flere tusen celler i løpet av få sekunder [64]. Transfeksjonseffektiviteten ble målt ved å se på andel GFP-positive celler ved flowcytometri.

4.3.1 Høy transfeksjonseffektivitet

Transfeksjonseffektiviteten ble målt til å være relativt høy i alle forsøkene hvor plasmid ble transfektert inn i U2OS celler. Den var spesielt høy for de cellene som ble transfektert med 0,3 µg plasmid (nærmere 100 % transfeksjonseffektivitet). Den høye andelen av transfekterte celler ble diskutert med Trond Stokke (leder for flowcytometri kjernefasiliteten) som mente at det var ingenting som tydet på at dette var annet enn transfekterte celler. Dette viser at protokollen som ble brukt med FuGENE® HD transfeksjonsreagens fungerte svært godt i U2OS cellene. Lavere mengde plasmid (0,1 µg) ga for lav transfeksjonseffektivitet (data ikke vist), men her ble det også brukt mindre transfeksjonsreagens.

4.3.2 H3p som markør for cellesyklusproblemer

For å undersøke om de transfekterte cellene hadde problemer i cellesyklus, ble H3p (forforylert histon H3) brukt som en markør for celler i mitose [76]. Dersom replikasjons-gaffelen i U2OS cellene skulle ha tilsvarende problemer som det var observert i *E. coli* (se introduksjon), ville det forventes at det skulle være en forskjell i andel celler i mitose mellom de som var transfektert med peGFP-PCNA og pKL44. Verken forsøket uten (figur 27) eller med Nocodazole (figur 28) viste noen forskjell i mengde celler i mitose mellom cellene som uttrykte eGFP-PCNA og eGFP-PCNAH44Y. Dette tyder på at cellene ikke hadde cellesyklusproblemer. Nocodazole kunne alternativt blitt tilsatt cellene 12 timer før de skulle høstes, istedenfor 18 timer slik som i figur 28, slik at en mindre andel av cellene hadde rukket å komme i mitose. Hvis cellene hadde cellesyklusproblemer, ville det vært enklere å se dette ved et litt tidligere tidspunkt.

4.3.3 γ H2AX og pRPA som markører for DNA-skade

Flowcytometri av transfekterte celler (peGFP-PCNA og pKL44) farget med antistoffer for γ H2AX, var det forsøket som ble utført flest ganger. Verken i forsøkene hvor 2 µg (figur 23) eller 0,3 µg plasmid (figur 26) ble transfektert var det noe som tydet på at cellene som uttrykte eGFP-PCNAH44Y hadde flere γ H2AX-positive celler enn de som uttrykte eGFP-PCNA. I figur 29, hvor det ble sett på medianverdien av γ H2AX-signal i S-fase, har cellene som ble transfektert med pKL44 litt høyere medianverdi sammenlignet med peGFP-PCNA, men det er likevel ingen stor forskjell.

pRPA (fosfo replikasjonsprotein A) ble også brukt som en markør for DNA-skade [30]. Det tydet heller ikke på i dette forsøket at uttrykk av eGFP-PCNAH44Y førte til mer DNA-skade i S-fasen for cellene (figur 30). Dette forsøket ble bare utført en gang, så derfor bør det gjøres flere ganger før man kan fastslå noe.

γ H2AX ble i denne studien brukt som en markør for DNA-skade, da H2AX fosforyleres ved dobbeltrådbrudd av DNA-tråden [29]. Høy prosentandel av γ H2AX-positive celler var gjennomgående i alle forsøkene. Dette gjaldt ikke bare for de cellene som ble transfektert med peGFP-PCNA og pKL44, men også for de cellene som ble transfektert med andre typer GFP-vektorer. Mange γ H2AX-positive celler (transfektete) kan tyde på at en del av cellene er døde som følge av transfeksjonen [54]. Transfeksjonen i seg selv er en prosess som er svært traumatisk for cellen og som kan føre til død [56].

Kontrollen med utransfektete celler hadde også en relativt høy mengde av γ H2AX-positive celler. Da prøvene som skulle brukes i flowcytometri-forsøket ble laget, ble gammelt medium med flytende døde celler overført til et 15 ml sentrifugerør og sentrifugert til en pellet sammen med de levende cellene. Denne mengden med døde celler kunne vært unngått dersom gammelt medium hadde blitt fjernet før de levende cellene ble sentrifugert. Derimot ble det funnet ut at mengden av γ H2AX-positive celler ble redusert ved og transfektete med en lavere mengde plasmid (peGFP-PCNA og pKL44), og tilsvarende redusere transfeksjonsreagenset (FuGENE® HD). Ved å redusere mengde transfektet DNA ble også transfeksjonseffektivitet høyere. Det er viktig å finne en balanse mellom høy transformasjonseffektivitet og lav cytotoxicitet for cellene [56]. Det kan se ut som at disse U2OS cellene ikke taklet transfeksjonen like bra ved mye DNA til stede, som resulterte i en noe lavere transfeksjonseffektivitet og flere døde celler.

4.3.4 Stabilt transfektet cellelinje

Den stabilt transfektete cellelinjen som hadde blitt selektert for ved bruk av puromycin i 5,5 uker ga en lavere andel av GFP-positive celler enn hva som tidligere var sett for både peGFP-PCNA og pKL44 (0,3 μ g). Det var hovedsakelig cellene som var transfektet med pKL44 som hadde en veldig lav andel GFP-positive celler med 25 % (figur 32). Det kan være flere årsaker til den lave andelen GFP-positive celler. Det kan være det første tegnet på at cellene ikke liker å uttrykke eGFP-PCNAH44Y over en lengre periode, og at cellen over tid klarer og "skru av" genet. En annen mulighet som ble vurdert var at promoteren var "skrudd av", det vil si at den

er undertrykt. peGFP-PCNA og pKL44 har en CMV-promoter, som gradvis undertrykkes i stabile transfekterte cellelinjer når de står over flere måneder. Dette vil føre til at genene som er under kontroll av denne promoteren (GFP-PCNA) ikke blir transkribert og dermed heller ikke uttrykt i cellene [84]. Den mest kjente årsaken til at dette skjer med retrovirale promotere er på grunn av DNA-metylering [85]. Men siden plasmidet som ble brukt i denne studien har en IRES-sekvens, blir mRNA for eGFP-PCNAH44Y og puromycin laget fra samme CMV-promoter. Det er derfor ikke så sannsynlig allikevel at promoteren var "skrudd av", da cellene heller ikke ville produsert resistensgener for puromycin, og dermed dødd. Uttrykk av eGFP-PCNAH44Y kan være redusert på grunn av dårlig translasjon eller at proteinene nedbrytes. DNA-sekvensen som koder for eGFP-PCNAH44Y kan også ha blitt utsatt for homolog rekombinasjon eller andre typer rearrangeringer som fører til at uttrykket har gått tapt [8].

U2OS cellelinjen som ble brukt i denne studien hadde fortsatt genet som koder for produksjon av villtype PCNA. Cellene som uttrykte eGFP-PCNAH44Y ga ikke mer DNA-skade eller cellesyklusproblemer sammenlignet med cellene som uttrykte eGFP-PCNA. Det vil allikevel ikke si at den muterte formen av PCNA (eGFP-PCNAH44Y) ikke fører til replikasjonsproblemer for cellene, fordi cellene fortsatt uttrykker villtype PCNA. I fremtidige forsøk bør genet som koder for produksjon av villtype PCNA gjøres defekt i cellene transfektert med pKL44, slik at cellene bare uttrykker genet for den muterte formen av PCNA (eGFP-PCNAH44Y). Dette kan brukes som utgangspunkt for videre arbeid med pKL44.

4.4 Konklusjon

GFP-PCNA ble lokalisert til replikasjonsfoci i cellekjernen. Dette var cellene som var i S-fase. Det ble observert at transfeksjonen alene førte til store mengder DNA-skade hos cellene. DNA-skaden ble midlertidig redusert ved å transfektere med lavere mengde DNA (0,3 µg). Transfeksjonseffektiviteten var gjennomgående veldig høy, spesielt for cellene som ble transfektert med 0,3 µg plasmid. Det ble ikke observert forskjell i verken transfeksjonseffektivitet, DNA-skade eller cellesyklusproblemer mellom cellene som uttrykte eGFP-PCNAH44Y og eGFP-PCNA. Den stabilt transfekterte cellelinjen med pKL44 hadde derimot et betydelig lavere uttrykk av protein, men dette kan ha flere forklaringer. U2OS cellene som ble brukt i studien hadde fortsatt det funksjonelle genet som koder for produksjon av villtype PCNA. For å konkludere om uttrykk av eGFP-PCNAH44Y fører til

replikasjonsproblemer for humane celler bør genet som koder for produksjon av villtype PCNA i cellene gjøres defekt, slik at cellene ikke lenger klarer å produsere villtype PCNA.

Litteraturliste

1. Folkehelseinstituttet. *Fakta om kreft - forekomst og dødelighet*. 2012 [søkt 15.03.13]; Tilgjengelig fra: http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=239&trg=List_6212&Main_6157=6263:0:25,6183&MainContent_6263=6464:0:25,6188&List_6212=6218:0:25,6185:1:0:0:::0:0.
2. Folkehelseinstituttet. *Kreft og kreftrisiko*. 2006 [søkt 15.03.13]; Tilgjengelig fra: http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=239&trg=List_6212&Main_6157=6263:0:25,6183&MainContent_6263=6464:0:25,6188&List_6212=6218:0:25,6189:1:0:0:::0:0.
3. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer*. 2007, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
4. Norsk Elektronisk Legehåndbok. *Kreft*. 2009 [søkt 08.05.13]; Tilgjengelig fra: <http://legehandboka.no/kreft/pasientinformasjon/om-kreft/kreft-1808.html>.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
6. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
7. Shen, Z., *Genomic instability and cancer: an introduction*. *J Mol Cell Biol*, 2011. **3**(1): p. 1-3.
8. Alberts, B., et al., *Essential Cell Biology, second edition*. 2004, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC .
9. Popescu, A. and R.J. Doyle, *The Gram stain after more than a century*. *Biotech Histochem*, 1996. **71**(3): p. 145-51.
10. Madigan, M.T., et al., *Brock Biology of Microorganisms*. 2009, San Francisco: Pearson Benjamin Cummings™.
11. Senter for Biofilmforskning. *E.coli*. [søkt 21.02.13]; Tilgjengelig fra: <http://biofilmforskning.wordpress.com/mikroorganismer/e-coli/>.
12. Erbe, E. and C. Pooley. *Image Number K11077-1*. 2006 [søkt 21.02.13]; Tilgjengelig fra: <http://www.ars.usda.gov/is/graphics/photos/mar05/K11077-1.htm>.
13. Skarstad, K. and T. Katayama, *Regulating DNA replication in bacteria*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(4).
14. Niforou, K.M., et al., *The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line*. *Cancer Genomics Proteomics*, 2008. **5**(1): p. 63-78.
15. Campbell, N.A. and J.B. Reece, *Biology*. 7th ed. 2005, San Francisco: Benjamin Cummings-Pearson Education, Inc.
16. O'Donnel, M., L. Langston, and B. Stillman, *Principles and Concepts of DNA Replication in Bacteria, Archaea, and Eukarya*, in *DNA Replication*. 2013, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
17. Katayama, T., et al., *Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and oriC*. *Nat Rev Microbiol*, 2010. **8**(3): p. 163-70.
18. Casadesus, J. and D. Low, *Epigenetic gene regulation in the bacterial world*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006. **70**(3): p. 830-56.
19. Lobner-Olesen, A., O. Skovgaard, and M.G. Marinus, *Dam methylation: coordinating cellular processes*. *Curr Opin Microbiol*, 2005. **8**(2): p. 154-60.
20. Sorensen, C.S. and R.G. Syljuasen, *Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(2): p. 477-86.
21. Johnson, A. and M. O'Donnell, *Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork*. *Annu Rev Biochem*, 2005. **74**: p. 283-315.

22. Yao, N.Y. and M. O'Donnell, *SnapShot: The replisome*. Cell. **141**(6): p. 1088, 1088 e1.
23. Strzalka, W. and A. Ziemienowicz, *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation*. Ann Bot. **107**(7): p. 1127-40.
24. Indiani, C. and M. O'Donnell, *The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(10): p. 751-61.
25. Mailand, N., I. Gibbs-Seymour, and S. Bekker-Jensen, *Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(5): p. 269-82.
26. Kong, X.P., et al., *Three-dimensional structure of the beta subunit of E. coli DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp*. Cell, 1992. **69**(3): p. 425-37.
27. Gulbis, J.M., et al., *Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA*. Cell, 1996. **87**(2): p. 297-306.
28. Kuzminov, A., *Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8241-6.
29. Bonner, W.M., et al., *GammaH2AX and cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(12): p. 957-67.
30. Oakley, G.G. and S.M. Patrick, *Replication protein A: directing traffic at the intersection of replication and repair*. Front Biosci, 2010. **15**: p. 883-900.
31. Vassin, V.M., M.S. Wold, and J.A. Borowiec, *Replication protein A (RPA) phosphorylation prevents RPA association with replication centers*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(5): p. 1930-43.
32. Bradshaw, J.S. and A. Kuzminov, *RdgB acts to avoid chromosome fragmentation in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2003. **48**(6): p. 1711-25.
33. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2001, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
34. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 2004, Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.
35. Morrison, S.L., *Preparing frozen bacterial stocks*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3M.
36. Yoshida, N. and M. Sato, *Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies*. Appl Microbiol Biotechnol, 2009. **83**(5): p. 791-8.
37. Warren, D.J., *Preparation of highly efficient electrocompetent Escherichia coli using glycerol/mannitol density step centrifugation*. Anal Biochem, 2011. **413**(2): p. 206-7.
38. Grant, S.G., et al., *Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4645-9.
39. Fiedler, S. and R. Wirth, *Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation*. Anal Biochem, 1988. **170**(1): p. 38-44.
40. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale, *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(13): p. 6127-45.
41. Mandel, M. and A. Higa, *Calcium-dependent bacteriophage DNA infection*. J Mol Biol, 1970. **53**(1): p. 159-62.
42. Panja, S., et al., *Role of membrane potential on artificial transformation of E. coli with plasmid DNA*. J Biotechnol, 2006. **127**(1): p. 14-20.
43. Stellwagen, N.C., *Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution*. Electrophoresis, 2009. **30 Suppl 1**: p. S188-95.
44. GeneOn. *GelRED™ Nucleic Acid Gel Stain*. 2009 [søkt 15.05.13]; Tilgjengelig fra: http://www.taq-dna.com/rich_files/attachments/Real_time_RT-PCR_Mastermixe_DE/Gelred_0_5_ml.pdf.

45. Voytas, D., *Agarose gel electrophoresis*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Chapter 10**: p. Unit 10 4.
46. Smith, D.R., *Restriction endonuclease digestion of DNA*. Methods Mol Biol, 1993. **18**: p. 427-31.
47. Bloch, K.D., *Digestion of DNA with restriction endonucleases*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Chapter 10**: p. Unit 10 8.
48. Carrigan, P.E., P. Ballar, and S. Tuzmen, *Site-directed mutagenesis*. Methods Mol Biol, 2011. **700**: p. 107-24.
49. Agilent Technologies. *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit*. [søkt 09.10.12] Tilgjengelig fra: <http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/200521.pdf>.
50. Deng, W.P. and J.A. Nickoloff, *Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site*. Anal Biochem, 1992. **200**(1): p. 81-8.
51. Institutt for Biovitenskap, UIO. *PCR*. 2011 [søkt 24.09.12]; Tilgjengelig fra: <http://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html>.
52. Fregel, R., A. Gonzalez, and V.M. Cabrera, *Improved ethanol precipitation of DNA*. Electrophoresis, 2010. **31**(8): p. 1350-2.
53. Barker, K., *At the Bench: A Laboratory Navigator. Updated Edition*. 2005, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
54. Smith, C. *Stable vs. Transient Transfection of Eukaryotic Cells*. 2013 [søkt 24.04.13]; Tilgjengelig fra: <http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/126324-Transfection/>.
55. Kim, T.K. and J.H. Eberwine, *Mammalian cell transfection: the present and the future*. Anal Bioanal Chem, 2010. **397**(8): p. 3173-8.
56. Shaffer, C. *In DNA Transfection, Efficiency and Cytotoxicity Are Two Sides of the Same Coin*. 2011 [søkt 24.04.13]; Tilgjengelig fra: <http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/41821-In-DNA-Transfection-Efficiency-and-Cytotoxicity-Are-Two-Sides-of-the-Same-Coin/>.
57. Parker, A.L., et al. *Lipoplex-mediated transfection and endocytosis*. 2003 [søkt 26.04.13]; Tilgjengelig fra: http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_22/S1462399403006562sup002.htm.
58. Burry, R.W., *Immunocytochemistry: A Practical Guide for Biomedical Research*. 2010, New York: Springer Science + Business Media.
59. Melan, M.A., *Overview of cell fixation and permeabilization*. Methods Mol Biol, 1994. **34**: p. 55-66.
60. Parham, P., *The Immune System Third Edition*. 2009, New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
61. Odell, I.D. and D. Cook, *Immunofluorescence techniques*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(1): p. e4.
62. Behlke, M.A., et al. *Fluorescence and Fluorescence Applications*. 2005 [søkt 05.03.13]; Tilgjengelig fra: http://3979.voxcdn.com/Support/Technical/TechnicalBulletinPDF/Fluorescence_and_Fluorescence_Applications.pdf.
63. Lichtman, J.W. and J.A. Conchello, *Fluorescence microscopy*. Nat Methods, 2005. **2**(12): p. 910-9.
64. Ibrahim, S.F. and G. van den Engh, *Flow cytometry and cell sorting*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2007. **106**: p. 19-39.
65. Held, M., et al., *CellCognition: time-resolved phenotype annotation in high-throughput live cell imaging*. Nat Methods, 2010. **7**(9): p. 747-54.

66. Qin, J.Y., et al., *Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10611.
67. Phillips, G.J., *Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization*. FEMS Microbiol Lett, 2001. **204**(1): p. 9-18.
68. Lange, A., et al., *Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5101-5.
69. Clontech. *Bicistronic IREC Vectors*. 2013 [søkt 02.05.13]; Tilgjengelig fra: http://www.clontech.com/NO/Products/Fluorescent_Proteins_and_Reporters/Coexpression/IREC_Bicistronic?sitex=10023:22372:US.
70. Balbas, P. and F. Bolivar, *Back to basics: pBR322 and protein expression systems in E. coli*. Methods Mol Biol, 2004. **267**: p. 77-90.
71. Burn, S.F., *Detection of beta-galactosidase activity: X-gal staining*. Methods Mol Biol, 2012. **886**: p. 241-50.
72. BIORON. *Fine Chemicals - IPTG*. [søkt 02.05.13] Tilgjengelig fra: <http://www.bioron.net/en/products/enzymes-and-fine-chemicals/fine-chemicals/iptg/>.
73. Geier, G.E. and P. Modrich, *Recognition sequence of the dam methylase of Escherichia coli K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease*. J Biol Chem, 1979. **254**(4): p. 1408-13.
74. Cardoso, M.C., H. Leonhardt, and B. Nadal-Ginard, *Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication*. Cell, 1993. **74**(6): p. 979-92.
75. Leonhardt, H., et al., *Dynamics of DNA replication factories in living cells*. J Cell Biol, 2000. **149**(2): p. 271-80.
76. Sawicka, A. and C. Seiser, *Histone H3 phosphorylation - a versatile chromatin modification for different occasions*. Biochimie, 2012. **94**(11): p. 2193-201.
77. Modriansky, M. and Z. Dvorak, *Microtubule disruptors and their interaction with biotransformation enzymes*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2005. **149**(2): p. 213-5.
78. Syljuasen, R.G., et al., *Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(9): p. 3553-62.
79. Brownie, J., et al., *The elimination of primer-dimer accumulation in PCR*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(16): p. 3235-41.
80. Wilke, M., et al., *Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity*. Gene Ther, 1996. **3**(12): p. 1133-42.
81. Mortimer, I., et al., *Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity*. Gene Ther, 1999. **6**(3): p. 403-11.
82. Chehrehasa, F., et al., *EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system*. J Neurosci Methods, 2009. **177**(1): p. 122-30.
83. Podhorecka, M., A. Skladanowski, and P. Bozko, *H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy*. J Nucleic Acids, 2010. **2010**.
84. Choi, K.H., et al., *Activation of CMV promoter-controlled glycosyltransferase and beta-galactosidase genes by butyrate, trichostatin A, and 5-aza-2'-deoxycytidine*. Glycoconj J, 2005. **22**(1-2): p. 63-9.
85. Swindle, C.S. and C.A. Klug, *Mechanisms that regulate silencing of gene expression from retroviral vectors*. J Hematother Stem Cell Res, 2002. **11**(3): p. 449-56.

Vedlegg A

Oversikt over celler, reagenser og utstyr som ble brukt i denne studien:

A1: Bakteriestammer

A2: Plasmid

A3: Primere

A4: Kommersielle kit

A5: Enzymer

A6: Antibiotika

A7: Kjemikalier

A8: Medium

A9: Human cellelinje

A10: Buffer

A11: Antistoff

A12: Apparater og utstyr

A1: Bakteriestammer

Bakteriestamme	Genotype	Produsent/kilde
XL1-Blue Superkompetente celler	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Agilent Technologies
XL10-Gold Ultrakompetente celler	Tet ^r Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-</i> <i>mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyr A96</i> <i>relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r]	Agilent Technologies
One Shot® OmniMAX™ 2 T1 ^R	F' { <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI^q lacZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R) Δ(<i>ccdAB</i>)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80(<i>lacZ</i>)ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> <i>tonA panD</i>	Invitrogen®
DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 endA1 recA1</i> <i>deoR</i> Δ(<i>ara,leu</i>)7697 <i>araD139 galU galK</i> <i>nupG rpsL λ-</i>	Grant, et al. [38]
KL01 (DH10B m/peGFP- PCNA)		Denne studien
KL02 (DH10B m/pKL44)		Denne studien

A2: Plasmid

Plasmid	Antibiotikamarkør	Produsent/kilde
peGFP-PCNA	Ampicillin/puromycin	Addgene plasmid 26461
pKL44	Ampicillin/puromycin	Denne studien
pUC18	Ampicillin	Agilent Technologies
pUC19	Ampicillin	Invitrogen®
pWhitescript 4,5-kb	Ampicillin	Agilent Technologies

A3: Primere

Primer	Primersekvens	Produsent
Kontrollprimer #1	5' CCATGATTACGCCAAGCGC GCAATTAACCCTCAC' 3	Agilent Technologies
Kontrollprimer #2	5' GTGAGGGTTAATTGCGCGC TTGGCGTAATCATGG' 3	Agilent Technologies
PCNA44-sense (Mutagenesepriemer 1)	5' GCAGAGCATGGACTCGTCCTAC GTCTCTTTGGTGCAGCTCACC' 3	Bionordika (lagt for denne studien)
PCNA44-antisense (Mutagenesepriemer 2)	5' GGTGAGCTGCACCAAAGAGACG TAGGACGAGTCCATGCTCTGC' 3	Bionordika (lagt for denne studien)
PCNA44(L) (Sekvenseringsprimer 1)	5' TCACATGGTCCTGCTGGAGTTC' 3	Bionordika (lagt for denne studien)
PCNA44(R) (Sekvenseringsprimer 2)	5' TCGCAGACAGCGAATTAATTCC' 3	Bionordika (lagt for denne studien)

A4: Kommersielle kit

Kit	Produsent
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis #200522	Agilent Technologies

A5: Enzymer

Enzym	Buffer	Produsent
NdeI	NEBuffer 4	New England Biolabs®
Nt.BstNBI	NEBuffer 3	New England Biolabs®
Dpn I		Agilent Technologies
PfuUltra High Fidelity DNA Polymerase (2,5 U/μl)		Agilent Technologies

A6: Antibiotika

Antibiotika	Konsentrasjon	Produsent
Ampicillin	100 mg/ml	Bristol-Meyers Squibb
Puromycin		Life Technologies
Penicillin-Streptomycin	100X	Life Technologies

A7: Kjemikalier og andre reagenser

Kjemikalier og andre reagenser	Produsent
Agarose	Sigma-Aldrich ®
dNTP miks	Agilent Technologies
Etanol	Kemetyl Norge AS
Formaldehyd	Sigma-Aldrich ®
FuGENE® HD Transfection Reagent	Roche
Gel Loading Dye, Blue (6X) #B7021S	New England Biolabs ®
GelRed™	Life Technologies
Glyserol	Sigma-Aldrich ®
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich ®
IPTG	Sigma-Aldrich ®
NaCl	Merck ®
Nuclease-Free Water	QIAGEN
Nocodazole	Sigma-Aldrich ®
ProLong® Gold Antifade reagent	Life Technologies
QuikSolution reagens	Agilent Technologies
Trypsin 0,25 %	Sigma-Aldrich ®
X-gal	Sigma-Aldrich ®
XL10-Gold β-mercaptoetanol miks	Agilent Technologies
1 kb DNA-ladder (500 µg/ml) #N3232L	New England Biolabs ®

A8: Medium

Medium	Innhold
LB medium	10 g trypton 5 g gjærekstrakt 10 g NaCl dH ₂ O til 1 liter
LB lavsalt medium	10 g trypton 5 g gjærekstrakt 5 g NaCl dH ₂ O til 1 liter
SOC medium	10 g trypton 5 g gjærekstrakt 0,5 g NaCl 20 mM glukose dH ₂ O til 1 liter
LB agar	10 g trypton 5 g gjærekstrakt 10 g NaCl 20 g agar dH ₂ O til 1 liter

Medium	Produsent
DMEM 1X med Glutamax™	Life Technologies
Opti-MEM med redusert serum	Life Technologies

A9: Human cellelinje

Cellelinje	Kilde
U2OS	Brukt på laboratoriet i flere år

A10: Buffer

Buffer	Innhold
TAE buffer 50X	121 g trisbase 28,6 ml 50 ml 0,5 M EDTA til sluttvolumet 500 dH ₂ O
TAE buffer 1X	40 ml 50X TAE-buffer til sluttvolumet 2 liter dH ₂ O
TE-buffer	10 mM Tris-Cl, pH 8 1 mM EDTA
Detergent buffer	100 µl Igepal 100 ml PBS
Ekstraksjonsbuffer	0,5 % Triton X-100 20 mM Hepes pH 7,4 50 mM NaCl 3 mM MgCl ₂ 300 mM sukrose

Buffer	Produsent
PBS 1X	Life Technologies
NEBuffer 3	New England Biolabs®
NEBuffer 4	New England Biolabs®
10 X reaksjonsbuffer (QuickChange II XL Mutagenesis Kit)	Agilent Technologies

A11: Antistoff

Antistoff	Konsentrasjon	Produsent
Alexa Fluor 568 Donkey Anti-Mouse IgG #A10037	2 mg/ml	Invitrogen ®
Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit IgG #A31573	2 mg/ml	Invitrogen ®
Alexa Fluor 647 goat anti-mouse IgG #A21235	2 mg/ml	Invitrogen ®
Anti-gamma H2A.X (phospho S139) antibody #ab11174	1 mg/ml	abcam
PCNA Antibody (PC10) SC-56	200 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology

A12: Apparater og utstyr

Apparater og utstyr	Modell	Produsent
Elektroporator apparat	Gene pulser ® II	BIO-RAD
NanoDrop™	ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Science
Gelelektroforese apparat	Power PAC 300	BIO-RAD
Varmeblokk	QBD2	Grant Instrument
Vannbadrister	Innova™ 3100	New Brunswick Scientific
Mikrobølgeovn	Wavedom	LG
UV Spektrofotometer	UV1800	Shimadzu
Ristende inkubator	Thermomixer comfort	Eppendorf
PCR-maskin	C1000™ Thermal Cycler	BIO-RAD
Pipettesuger	PIPETBOY comfort	IBS - INTEGRA BIOSCIENCES

Bunsen burner	FLAMEBOY	IBS - INTEGRA BIOSCIENCES
Mikrosentrifuge	Mikro 200R	Hettich
Mini mikrosentrifuge	Galaxy Ministar	VWR
Stor sentrifuge	5930	KUBOTA
Vekt	Extend	Sartorius
Qubit ®	2.0	Invitrogen
Vortexer	MS 3 digital	IKA® Works, Inc
Pipetter	0,5 – 5 µl 2 – 20 µl 10 – 100 µl 100 – 1000 µl	Thermo Scientific
Inversikroskop	AE31 Tension	Motic
Fluorescens mikroskop	Axio Imager Z1	Zeiss
Pipettespiss	0,1-200 µl 0,2-1000 µl	Sarstedt
Elektroporator kyvette	0.2 cm electrode gap	BIO-RAD
1,5 ml rør	1,5 ml	Axygen
2 ml rør med rund bunn	2,0 ml	Eppendorf
Parafilm		Bemis
Plastrør	15 ml 50 ml	Sarstedt
Glassrør	5 ml	Falcon ®
Sterile pipetter	5 ml 10 ml 25 ml 50 ml	Fisher Scientific
Petriskåler	90 x 15 mm	Heger AS
Vekstskåler	35 x 15 mm Style 60 x 15 mm Style	BD Falcon
Vekstflaske (behandlet og blå filterkork)	75 cm ² 160 ml nundon™ overflate	Nunc

Dekkglass	13 mm	Thermo Scientific
Objektglass	76 x 26 mm	Thermo Scientific
Tellekammer	Neubouer Improved	Assistent

Vedlegg B

Oversikt over protokoller som ikke er beskrevet til det fulle i oppgaveteksten til forsøkene som ble utført i denne studien:

B1: Lage over natt kultur

B2: LB-agarskål med ampicillin

B3: LB-agarskål med ampicillin, X-gal og IPTG

B4: Hvordan lage 0,8 % agarosegel

B5: QIAprep Spin Miniprep Kit fra QIAGEN

B6: Kutting av plasmid med restriksjonsenzymer

B7: Etanolpresipitering for å øke DNA-konsentrasjon

B8: Transformasjon av kjemisk kompetente celler

B9: QuikChange II XL Mutagenesis Kit fra Agilent Technologies

B10: Splitte en human U2OS kreftcellelinje

B11: Vekst av celler i 35mm/60mm-skåler

B12: Transfeksjon ved bruk av FuGENE® HD Transfection Reagent

B13: Prekstraksjon av celler på dekkglass

B14: Fiksering av celler

B15: Farging av celler

B1:

Lage over natt kultur

1. Et 2 ml vekstrør brukes, alternativt en glasskolbe for større volum av over natt kultur som skal lages, hull stikkes i toppen av lokket med en kanyle slik at cellene får oksygen
2. 1,5 LB-medium tilsettes til vekstrøret (alternativt mer ved bruk av glasskolbe)
3. Litt av en bakteriestamme som oppbevares på -80°C tilføres røret ved hjelp av en pipettespiss
4. Røret med celler inkuberes ved 37°C til risting på 1100 rpm til dagen etter (16-18 timer), eller på vannbad (200 rpm)

B2:

Agarskåler med ampicillinresistens

1. LB-agar varmes på svak styrke i mikrobølgeovnen til det er flytende og klumpfritt
2. Ampicillin 100 mg/ml tilsettes agaren ved ca. 50°C
3. 25 ml LB-agar tilsettes til hver skål
4. Agarplatene står i romtemperatur til agaren har stivnet før de kan brukes

B3:

Agarskåler med ampicillin, X-gal og IPTG

1. LB-agar varmes på svak styrke i mikrobølgeovnen til det er flytende og klumpfritt
2. Ampicillin 100 mg/ml, X-gal 80 $\mu\text{g/ml}$ og 20 mM tilsettes agaren ved ca. 50°C
3. 25 ml LB-agar tilsettes til hver skål
4. Agarplatene står i romtemperatur til agaren har stivnet før de kan brukes

B4:

Lage 0,8 % agarosegel

1. 0,4 g agarose veies opp og tilsettes til 50 ml 1x TAE buffer
2. Agarose og buffer varmes opp i mikrobølgeovnen til all agarosen er oppløst
3. Agaroseløsningen helles over i en form med en kam som lager brønnene, og står til den har stivnet (20-30 min)
4. Når gelen har stivnet dras kammen forsiktig opp, og gelen legges i elektroforesekaret med 1x TAE buffer

B5:

QIAprep Spin Miniprep Kit fra QIAGEN

1. En over natt kultur (1,5 ml) overføres til et 1,5 ml eppendorfrør, og sentrifugeres til det dannes en pellet
2. Supernatanten suges av, og pelleten resuspenderes i 250 µl Buffer P1 (med RNase A)
3. 250 µl Buffer P2 tilsettes løsningen, blandes ved å vende røret 4-6 ganger (cellene lyserer)
4. 350 µl Buffer N3 tilsettes til blandingen, dette blandes umiddelbart ved å vende røret 4-6 ganger (proteinene feller ut)
5. Løsningen sentrifugeres på 13 000 rpm i 10 min (proteinene danner en pellet)
6. Supernatanten (som inneholder DNA) pipetteres over i en QIAprep spinnkolonne
7. Spinnkolonnen sentrifugerer i 60 sek. Det som passerer kolonnen kastes
8. DNA i spinnkolonnen vaskes ved å tilsette 750 µl Buffer PE (tilsatt etanol), sentrifugeres i 60 sek
9. Det som passerer gjennom kolonnen kastes. Sentrifugeres igjen i 60 sek for å fjerne resten av vaskebufferen
10. Spinnkolonnen settes i et rent 1,5 ml eppendorfrør
11. DNA elueres ved å tilsette 40 µl vann til spinnkolonnen, står i 1 min for så å sentrifugeres i 1 min. Eluatet tas vare på
12. Konsentrasjonen til eluatet måles

B6:

Kutte plasmid med restriksjonsenzym

Kutting med Nde I:

1. Et 1,5 ml eppendorfrør tilsettes følgende:
 - 0,6 µg peGFP-PCNA
 - 1 µl 10X NEBuffer 4
 - 6 U Nde I
 - Nukleasefritt vann tilsettes til et sluttvolum på 10 µl
2. Løsning inkuberes i 2 timer ved 37 °C (plasmid kuttes av Nde I)
3. Enzymet inaktiveres ved 65 °C i 15 minutter

Kutting med Nt.BstNBI:

1. Et 1,5 ml eppendorfrør tilsettes:
 - 0,3 µg peGFP-PCNA
 - 5 µl 10X NEBuffer 3
 - 10 U Nt.BstNBI
 - Nukleasefritt vann tilsettes til et sluttvolum på 50 µl
2. Løsning inkuberes i 1 time ved 55 °C (den ene tråden i plasmidet kuttes av Nt.BstNBI)
3. Enzymet inaktiveres ved 80 °C i 20 minutter

B7:

Etanolpresipitering for å øke DNA-konsentrasjon

1. 50 µl PCR-produkt tilsettes til et 1,5 ml eppendorfrør
2. 6 µl 5 M NaCl tilsettes til PCR-produktet, dette vil gi en sluttkonsentrasjon av NaCl på 0,2 M
3. 100 µl iskald 96 % etanol tilsettes til røret, blandes godt
4. Eppendorfrøret settes i fryseren ved -20 °C i minst 30 min, DNA feller ut
5. Røret sentrifugeres i 15 min ved 0 °C og det dannes en pellet av DNA, supernatanten suges av
6. Eppendorfrøret fylles halvfullt med 70 % etanol, sentrifugeres i 2 min på 4 °C
7. Supernatanten suges av, pelleten tørkes til all etanolen har fordampet
8. Pelleten resuspenderes i 6 µl TE-buffer, inkuberes i noen timer for at pelleten skal være fullstendig løst
9. DNA-konsentrasjonen måles

B8:

QuikChange II XL Site Directed Mutagenesis Kit fra Agilent Technologies

1. Bruker PCR-rør hvor det i hvert rør blandes følgende:

Kontrollplasmid – pWhitescript:

5 µl 10x reaksjonsbuffer
10-200 ng pWhitescript 4,5-kb kontrollplasmid
125 ng oligonukleotidprimer 1
125 ng oligonukleotidprimer 2
1 µl dNTP-miks
3 µl QuikSolution reagens
2,5 U PfuUltra HF DNA-polymerase
Nukleasefritt vann til en sluttmengde på 50 µl

peGFP-PCNA:

5 µl 10x reaksjonsbuffer
5-500 ng peGFP-PCNA
125 ng oligonukleotidprimer 1
125 ng oligonukleotidprimer 2
1 µl dNTP-miks
3 µl QuikSolution reagens
2,5 U PfuUltra HF DNA-polymerase
Nukleasefritt vann til en sluttmengde på 50 µl

2. Rørene plasseres i PCR-maskinen (parameterne er beskrevet under kapittel 2.6 PCR)
3. Etter endt PCR-reaksjon kuttes PCR-produktet med 10 U Dpn I i 1-2 timer
4. Dpn I inaktiveres (80 °C, 20 min)
5. Plasmidet transformeres inn i kompetente celler
6. Dpn I behandlet PCR-produkt fra peGFP-PCNA strykes ut på LB-agarplater med amp 100 mg/ml
7. Dpn I behandlet PCR-produkt fra pWhitescript kontrollplasmid strykes ut på LB-agarplater med amp 100 µl/ml, X-gal 80 µg/ml og IPTG 20 mM

B9:

Transformasjon av kjemisk kompetente celler

XL10-Gold ultrakompetente celler:

1. De kjemisk kompetente cellene tines på is
2. 2 μ l β -Mercaptoetanol-miks tilsettes cellene, inkuberes på is i 10 min. Cellene og β -ME vortexes hvert 2. minutt
3. 1-10 μ l Dpn I behandlet PCR-produkt tilsettes rørene med 50 μ l celler, blandes forsiktig
4. Cellene og plasmid inkuberes på is i 30 min
5. Cellene gis et varmesjokk på 42 °C i 45 sekunder
6. Deretter settes cellene på is i 2 minutter
7. Røret med celler tilsettes det 500 μ l LB-medium
8. Røret med celler inkuberes i 1 time (37 °C, 300 rpm)
9. Cellene strykes på LB-agarplater med amp i ulike fortynninger (1:100, 1:10 eller uforynnet i forskjellige volum)
10. Agarplatene inkuberes over natt ved 37 °C

One Shot® OmniMAX™ 2-T1^R kjemisk kompetente celler:

1. De kjemisk kompetente cellene tines på is
2. 1-10 μ l Dpn I behandlet PCR-produkt tilsettes rørene med 50 μ l celler, blandes forsiktig
3. Cellene og plasmid inkuberes på is i 30 min
4. Cellene gis et varmesjokk på 42 °C i 30 sekunder
5. Deretter settes cellene på is i 2 minutter
6. Røret med celler tilsettes det 250 μ l forvarmet SOC-medium
7. Røret med celler inkuberes i 1 time (37 °C, 300 rpm)
8. Cellene strykes på LB-agarplater i ulike fortynninger (1:100, 1:10 eller uforynnet i forskjellige volum)
9. Agarplatene inkuberes over natt ved 37 °C

XL1-Blue Superkompetente celler:

1. De kjemisk kompetente cellene tines på is
2. 1-10 µl Dpn I behandlet PCR-produkt tilsettes rørene med 50 µl celler, blandes forsiktig
3. Cellene og plasmid inkuberes på is i 30 min
4. Cellene gis et varmesjokk på 42 °C i 45 sekunder
5. Deretter settes cellene på is i 2 minutter
6. Røret med celler tilsettes det 500 µl forvarmet LB-medium
7. Røret med celler inkuberes i 1 time (37 °C, 300 rpm)
8. Cellene strykes på LB-agarplater i ulike fortynninger (1:100, 1:10 eller ufortynnet i forskjellige volum)
9. Agarplatene inkuberes over natt ved 37 °C

B10:

Splitte en human U2OS kreftcellelinje

1. PBS, vekstmedium (DMEM og GlutaMAX) og trypsin varmes i vannbad ved 37 ° C i 30 min før bruk
2. Utstyr sprites med 70 % etanol og settes i LAF-benken
3. Vekstflasken med cellene tas ut fra inkubator, og cellene ses på i mikroskop for å bestemme hvor mye cellene skal splittes
4. Gammelt medium suges av med en glasspipette
5. Overflaten av vekstflasken hvor cellene er festet vaskes med 5 ml PBS for å fjerne rester av vekstmedium, PBS suges av
6. 1,5-2 ml trypsin tilsettes cellene, trypsin suges av
7. Vekstflasken settes i inkubator i 2-3 min (cellene løsner fra bunn)
8. Overflaten spyles flere ganger med 10 ml medium (dannes en cellesuspensjon)
9. Cellesuspensjon og nytt vekstmedium (som regel 1:10) overføres til en ny vekstflaske
10. Vekstflasken med celler settes tilbake i inkubator (37 ° C, 5 % CO₂) for videre vekst

B11:

Vekst av celler i 35mm/60mm-skåler

(Dette gjøres i forbindelse med at cellene splittes)

1. 10 µl cellesuspensjon pipetteres til hvert kammer i tellekammeret
 2. Teller antall celler i 1,0 x 1,0 mm rutenettet, i begge tellekammerne.
 3. Gjennomsnittet av antall celler innenfor 1,0 x 1,0 mm beregnes og multipliseres med en faktor på 10⁴
 4. 10⁵ celler/ml pipetteres til 35mm/60 mm skåler. 35 mm (2 ml) og 60 mm (3 ml)
 5. Vekstskålen settes i inkubator ved 37 ° C og 5 % CO₂ til neste dag
- Vekst av celler på dekkglass gjøres etter samme prosedyre. Autoklaverte dekkglass (13 mm) legges i bunn av skålen.

B12:

Transfeksjon ved bruk av FuGENE® HD Transfection Reagent

(Flowprøver og dekkglass)

1. Opti-MEM settes i vannbad på 37 °C 15 min før det skal brukes
2. 47-92 µl Opti-MEM (avhenger av mengde FuGENE og DNA som brukes) tilsettes til et 1,5 ml eppendorfrør
3. 2-6 µl FuGENE tilsettes direkte til Opti-MEM, unngå veggene i eppendorfrøret da reagenset kan ødelegges av plasten
4. Inkuberes i 5 min (romtemperatur)
5. 0,1-2 µg DNA tilsettes
6. Inkuberes i 15 min (romtemperatur)
7. Løsningen pipetteres dråpevis til 35mm/60mm-skålen med celler som har stått i inkubator fra dagen før
8. 35mm/60mm-skålen inkuberes (37 °C, 5 % CO₂) i 48/72 timer
9. Medium skiftes en gang i løpet av denne tiden
→ Transfeksjon av celler på dekkglass gjøres på tilsvarende måte.

B13:

Prekstraksjon av celler på dekkglass

1. Cellene på dekkglasset vaskes med 2 ml PBS, PBS fjernes
2. 1 ml ekstraksjonsbuffer tilsettes skålen med dekkglass, skålene inkuberes på is i 5 min
3. Cellene vaskes med 2 ml PBS, PBS fjernes
4. Trinn 3 gjentas til sammen tre ganger

B14:

Fiksering av celler

Fiksering av celler på dekkglass

1. Iskald PBS tilsettes skålen med dekkglass med celler
2. Cellene fikseres i 4 % formaldehyd, inkuberes i romtemperatur i 12 min før formaldehyd fjernes – NB; avtrekkskap!
3. Cellene vaskes med 2 ml PBS, PBS fjernes
4. Trinn 3 gjøres til sammen tre ganger

Fiksering av celler til bruk i flowcytometri

1. Mediumet fra hver 35mm/60mm-vekstskål, som har vært inkubert i 48-72 timer etter transfeksjon, overføres til hvert sitt 15 ml-sentrifugerør
2. Cellene i vekstskålen vaskes med 1 ml PBS, PBS overføres til røret
3. 1 ml trypsin tilsettes vekstskålen
4. Vekstskålen inkuberes i 2-3 min (cellene løsner fra bunn)
5. Trypsin og celler som har løsnet overføres til røret
6. 2 ml medium tilsettes skålen, overflaten spyles, medium og celler overføres til røret. Dette gjentas en gang til
7. Røret med celler sentrifugeres (5 min, 8500 rpm)
8. Supernatanten suges av
9. Peletten av celler resuspenderes i 1 ml iskald etanol 70 %, cellene vortexes samtidig som etanol tilsettes
10. Inkuberes ved -20°C i minst 1 time før cellene farges

B15:

Farging av celler

Farging av celler på dekkglass

1. Primærantistoff fortynnes 1: 400 i DMEM
2. 100 µl primærantistoff-løsning tilsettes fikserte celler på dekkglass, inkuberes (1 time, mørkt, romtemperatur)
3. Cellene vaskes med 2 ml PBS, PBS suges. Dette gjentas 2 ganger
4. Sekundærantistoff fortynnes 1:1000 i DMEM
5. 100 µl sekundærantistoff-løsning tilsettes celler på dekkglass, inkuberes (30 min, mørkt, romtemperatur)
6. Cellene vaskes med 2 ml PBS, PBS suges. Dette gjentas 2 ganger
7. 100 µl Hoechst 33258 i PBS (2,4 µl/ml) tilsettes dekkglasset, inkuberes i 5 min
8. Cellene skylles i Milli-Q vann, tørkes i 20 min
9. Det dryppes en dråpe for hvert dekkglass på et objektglass med Prolong Gold, dekkglasset legges med cellene ned på denne dråpen
10. Dekkglasset fester med blank neglelakk og tørkes

Farging av celler til bruk i flowcytometri

1. Fikserte celler i 15 ml sentrifugerør tas ut av fryseren
2. Røret fylles med en løsning av PBS og 1 % FBS, løsningen sentrifugeres (5 min, 8500 rpm)
3. Supernatanten suges av, men litt av supernatanten blir værende igjen
4. Røret med celler og det resterende av supernatanten sentrifugeres på nytt, resten av supernataten fjernes med en pipette
5. Pelleten av celler resuspenderes i en blanding av detergentbuffer og ikke-fet melk (1:25), inkuberes i romtemperatur i 5 min
6. Primær antistoff fortynnes 1:250 i løsningen med detergentbuffer og ikke-fet melk
7. 50 µl av primær antistoff-løsningen tilsettes røret med celler, dette inkuberes (1 time, romtemperatur)
8. Trinn 2-3 gjentas

9. Sekundær antistoff fortynnes 1:500 i løsningen med detergentbuffer og ikke-fet melk
10. 100 µl av sekundær antistoff-løsningen tilsettes røret med celler, dette inkuberes (30 min, romtemperatur)
11. Trinn 2 gjentas, supernatanten suges av
12. Hoechst 33258 fortynnes i PBS til en konsentrasjon på 2,4 µl/ml. NB! Arbeidet foregår i LAF-benk når Hoechst 33258 pipetteres
13. Pelleten resuspenderes i 200 µl av Hoechst 33258 i PBS (2,4 µl/ml) (DNA farges)
14. Cellesuspensjonen i Hoechst overføres til flowcytometri-rør gjennom en filterkork
15. Flowcytometri-rør med fargete celler lagres mørkt ved 4 °C til flowcytometri skal utføres

Vedlegg C

Andre vedlegg:

C1: Sammenligning av villtype DnaN- og mutant DnaN H175Y-sekvens

C2: Humant PCNA (fra eGFP-PCNA plasmidet)

C3: Sekvenseringsresultater for PCNA

C1:

Sammenligning av sekvensen for villtype DnaN (β -clamp) og DnaNH175Y (β -clamp mutant)

Query = villtype *dnaN*
Subject = mutant *dnaN175*

dnaN175

```
Query 1 ATGAAATTTACCGTAGAACGTGAGCATTTATTTAAAACCGCTACAACAGGTGAGCGGTCCG 60
|      |||
Sbjct 58 ATGAAATTTACCGTAGAACGTGAGCATTTATTTAAAACCGCTACAACAGGTGAGCGGTCCG 117

Query 61 TTAGGTGGTCGCTCCTACGCTACCGATTCTCGGTAATCTGCTGTTACAGGTTGCTGACGGT 120
|      |||
Sbjct 118 TTAGGTGGTCGCTCCTACGCTACCGATTCTCGGTAATCTGCTGTTACAGGTTGCTGACGGT 177

Query 121 ACGTTGTCGCTGACCGGTACTGATCTCGAGATGGAAATGGTGGCACGTGTTGCGCTGGTT 180
|      |||
Sbjct 178 ACGTTGTCGCTGACCGGTACTGATCTCGAGATGGAAATGGTGGCACGTGTTGCGCTGGTT 237

Query 181 CAGCCACACGAGCCAGGAGCGACGACCGTTCCGGCGCGCAAATCTTTGATATCTGCCGT 240
|      |||
Sbjct 238 CAGCCACACGAGCCAGGAGCGACGACCGTTCCGGCGCGCAAATCTTTGATATCTGCCGT 297

Query 241 GGTCTGCCTGAAGGCGCGGAAATGCGCGTGCAGCTGGAAGGTGAACGGATGCTGGTACGC 300
|      |||
Sbjct 298 GGTCTGCCTGAAGGCGCGGAAATGCGCGTGCAGCTGGAAGGTGAACGGATGCTGGTACGC 357

Query 301 TCCGGGCGTAGCCGTTTTTTCGCTGTCTACCCTGCCAGCGGCGGATTTCCCGAACCTCGAT 360
|      |||
Sbjct 358 TCCGGGCGTAGCCGTTTTTTCGCTGTCTACCCTGCCAGCGGCGGATTTCCCGAACCTCGAT 417

Query 361 GACTGGCAGAGTGAAGTCGAATTTACCCTGCCGACAGGCAACGATGAAGCGTCTGATTGAA 420
|      |||
Sbjct 418 GACTGGCAGAGTGAAGTCGAATTTACCCTGCCGACAGGCAACGATGAAGCGTCTGATTGAA 477

Query 421 GCGACCCAGTTTTCTATGGCGCATCAGGACGTTTCGCTATTACTTAAATGGTATGCTGTTT 480
|      |||
Sbjct 478 GCGACCCAGTTTTCTATGGCGCATCAGGACGTTTCGCTATTACTTAAATGGTATGCTGTTT 537

Query 481 GAAACCGAAGGTGAAGAACTGCGCACCGTGGCAACCGACGGCCACCGTCTGGCGGTCTGT 540
|      |||
Sbjct 538 GAAACCGAAGGTGAAGAACTGCGCACCGTGGCAACCGACGGTTACCGTCTGGCGGTCTGT 597

Query 541 TCAATGCCAATTGGTCAATCTTTGCCAAGCCATTCGGTGATCGTACCGCGTAAAGGCGTG 600
|      |||
Sbjct 598 TCAATGCCAATTGGTCAATCTTTGCCAAGCCATTCGGTGATCGTACCGCGTAAAGGCGTG 657

Query 601 ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCGACAATCCGCTGCGCGTACAGATTGGCAGC 660
|      |||
Sbjct 658 ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCGACAATCCGCTGCGCGTACAGATTGGCAGC 717

Query 661 AACAAATTCGCGCCACGTTGGCGACTTTATCTTCACCTCCAACTGGTGGATGGTTCGC 720
|      |||
Sbjct 718 AACAAATTCGCGCCACGTTGGCGACTTTATCTTCACCTCCAACTGGTGGATGGTTCGC 777

Query 721 TTCCCGGATTATCGCCGCTTCTGCCGAAGAACCCGGACAAACATCTGGAAGCTGGCTGC 780
|      |||
Sbjct 778 TTCCCGGATTATCGCCGCTTCTGCCGAAGAACCCGGACAAACATCTGGAAGCTGGCTGC 837
```

```

Query 781 GATCTGCTCAAGCAGGCGTTTGCTCGCGCGGCGATTCTCTCTAACGAGAAATTCGCGGC 840
          |||
Sbjct 838 GATCTGCTCAAGCAGGCGTTTGCTCGCGCGGCGATTCTCTCTAACGAGAAATTCGCGGC 897

Query 841 GTACGTCTTTATGTCAGCGAAAACCAGCTGAAAATCACCGCCAACAACCCGGAACAGGAA 900
          |||
Sbjct 898 GTACGTCTTTATGTCAGCGAANACCAGCTGAAAATCACCGCCAACAACCCGGAACAGGAA 957

Query 901 GAAGCGGAAGAGATCCTCGACGTTACCTATAGCGGTGCGGAGATGGAAATCGGCTTCAAC 960
          |||
Sbjct 958 GAAGCGGAAGANATCCTCGACGTTACCTATAGCGGTGCGGANATGGAAATCGGCTTCAAC 1017

Query 961 GTCAGTTATGTGCTGGATGTTCTGAACGCGCTGAAATGCGAAAACGTCCGCATGATGCTG 1020
          |||
Sbjct 1018 GTCAGTTATGTGCTGGATGTTCTGAACGNGCTGAAATGCGAAAACGTCCGCATGATGCTG 1077

Query 1021 ACCGATTCGGTTTCCAGCGTGCAGATTGAAGATGCGGCCAGCCAGAGCGCGCTTATGTT 1080
          |||
Sbjct 1078 ACCGATTCGGTTTCCAGCGTGCANATTGAANNTGCGGCCAGCCANANNGCGCTTATGTT 1137

Query 1081 GTCATGCCA 1089
          |||
Sbjct 1138 GTCATGCCA 1146

```

To mutasjoner er til stede i DnaNH175Y (merket med ramme rundt):

CAC → TAC Histidin → Tyrosin – Mutasjon som skaper problemer for DNA-replikasjonen i *E. coli*.

GGC → GGT Gly → Gly – Stille mutasjon (engelsk: silent mutation), mutasjonen endrer ikke aminosyren, og vil da ikke ha noen betydning.

C2:

Humant PCNA (fra eGFP-PCNA plasmidet)

ATGTTTCGAGGCGCGCCTGGTCCAGGGCTCCATCCTCAAGAAGTGTTTGGAGGCACTCAAGGA
CCTCATCAACGAGGCCTGCTGGGATATTAGCTCCAGCGGTGTAAACCTGCAGAGCATGGACT
CGTCCCACGTCTCTTTGGTGCAGCTCACCCCTGCGGTCTGAGGGCTTCGACACCTACCGCTGC
GACCGCAACCTGGCCATGGGCGTGAACCTCACAGTATGTCCAAAATACTAAAATGCGCCGG
CAATGAAGATATCATTACACTAAGGGCCGAAGATAACGCGGATACCTTGGCGCTAGTATTTG
AAGCACCAAACCAGGAGAAAGTTTCAGACTATGAAATGAAGTTGATGGATTTAGATGTTGAA
CAACTTGGAATTCCAGAACAGGAGTACAGCTGTGTAGTAAAGATGCCTTCTGGTGAATTTGC
ACGTATATGCCGAGATCTCAGCCATATTGGAGATGCTGTTGTAATTTCTGTGCAAAAGACG
GAGTGAATTTTTCTGCAAGTGGAGAACTTGAAATGGAAACGTTAAATTGTCACAGACAAGT
AATGTGGACAAAGAGGAGGAAGCTGTTACCATAGAGATGAATGAACCAGTTCAACTAACTTT
TGCACTGAGGTACCTGAACTTCTTTACAAAAGCCACTCCACTCTCTTCAACGGTGCACTCA
GTATGTCTGCAGATGTACCCCTTGTTGTAGAGTCTAAAATTGCGGATATCGGTCACTTAAAA
TACTACTTGGCTCCCAAGATCGAGGATGAAGAAGGATCTTAG

Mutant PCNA44 (nytt konstrukt):

Histidin → Tyrosin i posisjon 44

CAC → TAC

CAC er merket med understrek.

C3:

Sekvenseringsresultat av pKL44

Prøve 2 - Venstre Primer:

gagctgtacaGGGCGaanGGCAAGGGCAAGGGCAAGGGCCGGGCCGCGGctaCGCgTATCGA
TCCATGTTCGAGGCGCGCCTgGTCCAGGGCTCCATCCTCAAGAAGGTGTTGGAGGCACTCAA
GGACCTCATCAACGAGGCCTgCTGGGATATTAGCTCCAGCGgtgtAAACCTGCAGAGCATGG
ACTCGTCCTACGTCTCTTTGGTGCAGCTCACCCCTGCGGTCTGAGGGCTTCGACACCTACCGC
TGCGACCGCAACCTGGCCATGGGCGTGAACCTCACAGTATGTCCAAAATACTAAAATGCGC
CGGCAATGAAGATATCATTACACTAAGGGCCGAAGATAACGCGGATACCTTGGCGCTAGTAT
TTGAAGCACCAAACCAGgagAAAGTTTCAGACTATGAAATGAAGTTGATGGATTTAGATGTT
GAACAACCTTGAATTCAGAACAGGAGTACAGCTGTGTAGTAAAGATGCCTTCTGGTGAATT
TGCACGTATATGCCGAGATCTCAGCCATATTGGAGATGCTGTTGTAATTTCTGTGCAAAAG
ACGGAGTGAAATTTTCTGCAAGTGGAGAACTTGGAAATGGAAACATTAATTTGTCACAGACA
AGTAATGTCGATAAAGAGGAGGAAGCTGTTACCATAGAGATGAATGAACCAGTTCAACTAAC
TTTTGCACTGAGGTACCTGAACTTCTTTACAAAAGCCACTCCACTCTCTTCAACGGTGACAC
TCAGTATGTCTGCAGATGTACCCCTTGTGTAGAGTATAAAAATTGCGGATATGGGACACTTA
AAATACTACTTGGCTCCCAAGATCGAGGATGAAGAAGGATCTTAGTCTAGCGCTACCGGACT
CAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCGGGATCCGCGG
CCGCATAGATAACTGATCCAGTGTGCTGGAATTAATTCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTtg
gGgGTGAGTACTCcCTCTCAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAagaTTGTCAGTTtCCAAA
AaCGaaggaGGATTTGATATTcacCTGGCCCGcGGTGAtgcCTttgagGgt

Punktmutasjonen (CAC →TAC) i posisjon 44 i hPCNA er merket med understrek.