

MASTEROPPGAVE I FARMASI

Analyser av DKK3 som mulig målgen for Pax6

Skrevet av

Mina Mobasheri



2011

Utført ved

Forskningsgruppen i Farmakologi

Institutt for Farmasi

Det helsevitenskaplige fakultet

Universitet i Tromsø

Veileder

Førsteamanuensis Ingvild Mikkola Institutt for Farmasi, UiT

Forord

Masteroppgave ble gjennomført ved Forskningsgruppen i Farmakologi ved Institutt for farmasi, Universitet i Tromsø i perioden oktober 2010 til mai 2011. Hovedveileder var førsteamanuensis Ingvild Mikkola.

Dette året har vært veldig spennende, lærerikt og til tider veldig utfordrende. Møte med forskningsverden har vært innholdsrik med mange kunnskapsrike mennesker

Jeg vil først og fremst få takke min hovedveileder Ingvild Mikkola. Takk for din tålmodighet veldig god veiledning både på lab og under skrivingen.

Jeg vil også takke Rune Hogseth og Beate Hegge for deres veiledning på lab og deres positive og innstilling som har inspirert meg så mye.

Jeg vil også takke mine gode venner på kull 06 som har gjort disse årene på farmasi studie helt fantastiske.

En spesiell takk går til mine venner og familie som alltid støtter meg gjennom alt, jeg er uendelig takknemlig for alt dere gjør for meg.

Tilslutt vil jeg takke min kjære samboer Magne, tusen takk for at du har støttet meg gjennom disse årene og vært så tålmodig med meg.

Tromsø, Mai 2011

Mina Mobasheri

Sammendrag

Pax6 og Pax6(5a) er to isoformer av den evolusjonært konserverte transkripsjonsfaktoren som blir uttrykt i blant annet hjernen, øyne, nese og pankreas hos virveldyr under embryoutvikling. Uttrykket av Pax6 vil vedvare hos voksne individer, blant annet i øyne, hjernen og pankreas. Den er viktig for vedlikehold av stamceller, men har også en stor betydning for celle differensiering i mange vev. Aniridia hos mennesker og *small eye* i mus er blant de sykdommene som forekommer pga. mutasjoner i ett Pax6-gen. Dersom det forekommer mutasjoner i begge Pax6 genene vil fosteret ved fødsel ikke ha øyne, deler av hjernen vil være manglende eller underutviklet og nasale strukturer vil også mangle. Derfor dør fosteret kort tid etter fødsel. Pax6 er også forbundet med kreftformer slik som glioblastoma. De to isoformene (Pax6 og Pax6(5a)) har forskjellige DNA bindings egenskaper, men blir uttrykt i de fleste celletyper samtidig, slik som i øyne. For å få en oversikt over hvilke målgener de to isoformene regulerer, ble det i forkant av dette prosjektet brukt genekspressjons microarray og en del av resultatene ble bekreftet ved hjelp av qPCR metoder. Det ble oppdaget et lite, men signifikant antall gener som ble regulert av Pax6 og/eller Pax6 i stabil transfekterte 3T3 fibroblaster. Noen av disse er felles målgen for begge isoformene. Men disse blir regulert i forskjellig grad av Pax6 og Pax6(5a). Et målgen som viste seg å bli regulert av både Pax6 og Pax6(5a) var Dickkopf3(DKK3). DKK3 er et medlem av Dickkopf (DKK) familien som er antagonister av Wnt – signalveien. I disse undersøkelsene viste det seg at DKK3 er 18 fold oppregulert av Pax6(5a) i 3T3-fibroblaster fra mus, og 3 fold oppregulert av Pax6. Mulige målseter for Pax6 og Pax6(5a) i promoteren til både mus og menneske DKK3 gen har også blitt identifisert ved bruk av bioinformatikk. I denne oppgaven ble DKK3 promoteren fra mus og menneske klonet og ko-transfektet sammen med plasmider som kodet for Pax6 og Pax6(5a). Vi kunne tydelig se at mDKK3 promoteren ble positivt påvirket ved reporter gen assay analyser. Det ble også gjort forsøk på å klonsebrafisk cDNA' et som koder for DKK3, med tanke på å lage en probe for sebrafisk in situ hybridiseringer. Videre ble det utført transient transfeksjon av plasmider som koder for Pax6 og Pax6(5a) inn i 3T3-kontroll cellene for å se om korttids – uttrykket av Pax6 og Pax6(5a) gir samme resultat som de stabilt transfekterte cellelinjene med tanke på DKK3' gen uttrykket. Protein uttrykket av Pax6 og Pax6(5a) ble bekreftet, men endringer i DKK3 RNA uttrykk kunne ikke identifiseres ved bruk av qPCR.

Forkortelser

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	basepar
CNS	sentralnervesystem
dNTP	deoksyribonukleosid
dH ₂ O	destillert vann
DKK	Dickkopf
DKK3	Dickkopf 3
mDKK3	Mus Dickkopf 3
hDKK3	Human Dickkopf 3
DNA	Deoksyriboukleinsyre
DTT	Dithiothitol
<i>E. Coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethlenediaminetetaacetic acid
FW	Forward
GFP	Grønt fluoriserende protein
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyl transferase
HRP	Horseradish peroxidase
kDa	Kilo dalton
min	Minutter
ml	Mililiter
PAX	Paired Box
PBS	Phosphate-buffered saline

PCR	Polymerase chain reaction
REV	Reverse
RNA	Riboukleinsyre
Rpm	Runder per minutt
RT	Rom temperature
qPCR	Kvantitativ Polymerase chain reaction
SAP	Shrimp alkaline phosphate
siRNA	Silencing Riboukleinsyr
TAE	Tris-acetat
V	Volt
zf	sebrafisk
PBST	Phosphate-buffered saline med 1 % Tween 2o

Innholdsfortegnelse

Forord.....	ii
Sammendrag.....	iii
Forkortelser.....	iv
Innholdsfortegnelse.....	vi
1. Introduksjon	1
1.1. Wnt – signalveien.....	1
1.1.1. Dickkopf (DKK) familien.....	3
1.1.2. DKK3.....	5
1.2. Paired box gener.....	6
1.2.1. Pax6 og Pax6(5a).....	8
1.3 Formål med oppgaven.....	11
2. Materialer	12
3. Metoder	18
3.1. Polymerase chain reaction (PCR).....	18
3.1.1. PCR av sebrafisk cDNA for sebrafiskDKK3 primere.....	18
3.1.2. PCR av mDKK3 og hDKK3 promoter	19
3.1.3. Gel elektroforese av PCR produkter.....	20
3.1.4. TOPO-TA [®] Kloning.....	20
3.1.4.1. Kloning uten TOPO–TA Cloning [®] kit (Invitrogen)	21
3.1.5. DNA miniprep.....	21
3.1.6. DNA Miniprep light	22
3.1.7. Restriksjonsenzymkutting	23
3.1.8. Kloning av DKK3 promoterfragment i pGL3-basic vektor.....	23
3.1.9. Rensing av agarosegel.....	24
3.1.10. DNA ligering.....	24
3.1.11. Sekvensering.....	25
3.1.12. DNA midiprep.....	26

3.1.13. Frysestock	26
3.2 Transfeksjon av celler.....	27
3.2.1 Dyrking av celler... ..	27
3.2.2 Transfeksjon med plasmid DNA.....	27
3.2.3 Transfeksjon med siRNA.....	28
3.2.4 Høsting av RNA og protein fra siRNA transfekterte celler til qPCR og WB.....	29
3.2.5 Transiente transfeksjoner og reporter gen assay.....	31
3.2.6 Western blott.....	33
3.2.7 Preparering av cDNA for RT-PCR.....	34
3.2.8 Kvantitativ PCR (qPCR)	36
4. Resultater	36
4.1 PCR av sebrafisk cDNA for sebrafiskDKK3 primere	36
4.2 PCR av mDKK3 og hDKK3 promoter	39
4.3 Transiente transfeksjoner og reporter gen assay	44
4.4 Delesjonsanalyser av mDKK3 promoter.....	46
4.5 Transfeksjon og uttrykk av Pax6 og Pax6(5a) plasmider om siRNA.....	48
4.5.1 Bilder fra transfeksjon med plasmider	49
4.5.2 Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)	50
5. Diskusjon	
5.1 Kloning av sebrafisk cDNA i pCR2.1-TOPO [®] for probe for <i>in situ</i>	55
5.2 Kloning av DKK3 promoter fra mus og menneske i pGL3-basic.....	55
reportervektor	
5.2.1 Reporter gen assay	56
5.2.2 Western blot.....	56
5.2.3 qPCR.....	56
6. Konklusjon og fremtidige aspekter	58
7. Referanser	59
8. Appendiks	62

1. Introduksjon

1.1 Wnt – signalveien

Wnt-signalveien er en cellulær kommunikasjonsvei som spiller en kritisk rolle i en rekke viktige biologiske prosesser. Disse glycoproteinene kan aktivere minst to viktige signalveier hos virveldyr, noe som medfører forandringer i cellulær regulering (se figur 1). Blant annet vil Wnt-er regulere neurodegenerering, embryogenese, proliferasjon, celle migrering, sørger for at stamceller forblir uendifferensiert, tumor suppresjon og onkogenese.(Nakamura et al., 2007)

Hos voksne vil Wnt-er regulere vedlikehold og ombygging av diverse vev og organer. For eksempel musklens regenerasjon/ fornyelse leverens regenerasjon/ fornyelse og kreft progresjon.(Sethi and Vidal-Puig, 2010, Chien et al., 2009)

Wnt/ β -catenin og de Wnt/ β -catenin uavhengige signalveien er de to signalveiene Wnt-er bruker for å forandre cellulær regulering(se figur 1.1).

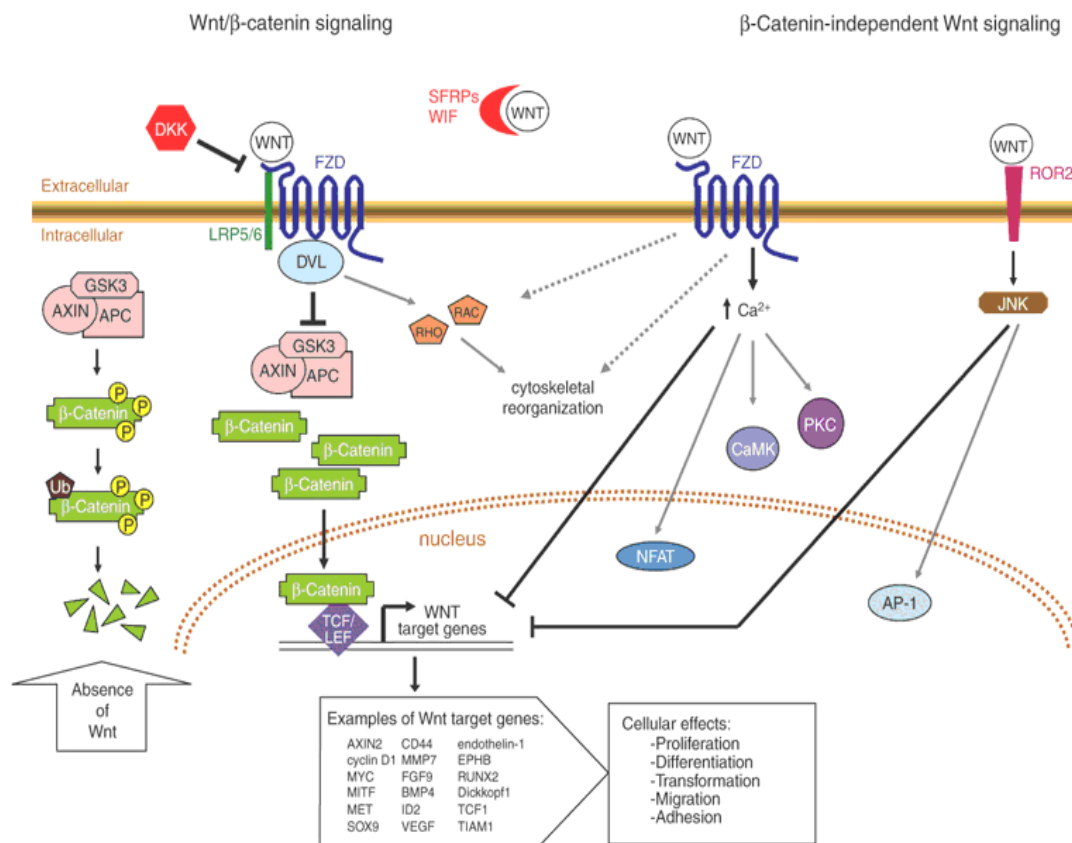
Wnt-signalveien har flere antagonister og disse deles i to generelle grupper. Secreted Frizzled-related protein familien (sFRP) og Wnt inhibitory factor -1 (WIF) tilhører den første gruppen som antagoniserer Wnt-signalveien og forhindrer ligand – reseptor interaksjoner ved å binde til Wnt proteiner. Dickkopf (DKK) familien er den andre gruppen antagonister. Disse binde til en subenhet av Wnt reseptor komplekser. Enkelte sFRP-er og DKK-er antagoniserer ikke Wnt funksjonen(Kawano and Kypta, 2003).

Flere rapporter finnes på forbindelsen mellom Pax6 og Wnt – signalveien når det gjelder øyne og hjernen. For nedregulering av den kjente Wnt signaliseringen i linsens ektoderm /ytterstedel er Pax6 behøvd. Ved å direkte kontrollere uttrykket av Wnt – inhibitorer Sfrp 1, Sfrp 2 og DKK1.(Machon et al., 2010)

Tilbaketrekkingen av Wnt signalisering i hjernebarken virker som et mål for morfogenesen/ utviklingen og organdannelse og er viktig for neurogenesen. Dersom Wnt signaliseringen i hjernebarken under utvikling holdes aktiv lengre enn det den skal, kan det forsinke uttrykket av nervedannende faktorer som Pax6, Ngn2 og Tbr2 og derfor vil neurogenesen forsinkes.(Machon et al., 2010)

I voksne pankreas islet celler har fokuset blitt rettet mot Wnt/ β -catenin signalveien i β -celler. Flere studier viser at β -celler uttrykker Wnt-er, sFRP-er and DKK-er (Sethi and Vidal-Puig, 2010). Wnt/ β -catenin signalveien er innblandet i den selektive utviklingen til det endokrine og eksokrine pankreas. Studier der betinget funksjonstap og gjenvinning av funksjonen av Wnt/ β -catenin signalisering blir undersøkt, er konklusjonen at Wnt/ β -catenin signalisering er nødvendig for at det eksokrine delen av pankreas skal ha en normal utvikling. (Wells et al., 2007, Strom et al., 2007)

Tidlig aktivering av Wnt/ β -catenin signalveien i voksne islet celler kan føre til at β -celler ikke utvikles. Sen aktivering av Wnt/ β -catenin signalveien fører til at β -celler øker i masse(Heiser et al., 2006, Rulifson et al., 2007). Dette fører til potensielle konsekvenser for både pankreas kreft og regenerative/nyskapende strategier for å behandle diabetes(Cano et al., 2008).



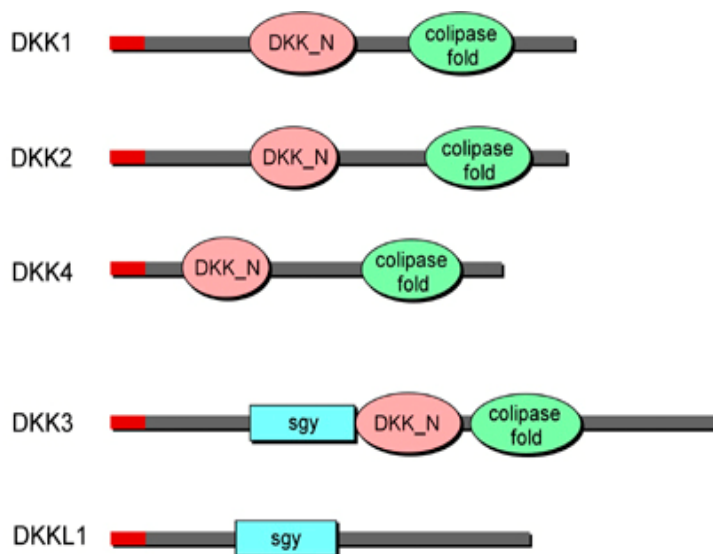
Figuren 1.1 Dette bilde illustrerer de to forskjellige Wnt-signalveiene, Wnt/ β -catenin avhengige og uavhengige signal veier Dickkopf- proteiner virker som inhibitorer av signalveien ved å kompetitiv binde til LRP5/6. (Chien et al., 2009)

1.1.1 Dickkopf (DKK) familien

Dickkopf (DKK) familien består av DKK 1, 2, 3 og 4 samt DKKL1. Disse er en gruppe glycoproteiner som regulerer Wnt signal veien. Denne familien har vært antydnet å være delaktig i forskjellige sykdommer som retinal degenerering (Hackam et al., 2004), forskjellige kreftformer (Hsieh et al., 2004) og Alzheimer's sykdom (Alvarez et al., 2004).

De 5 DKK-proteinene deler 37–50 % protein identitet. Alle virveldyr har to konserverte cystein-rike deler, Dkk_N og C-terminal domenen som er en cystein rik område med et mønster som typisk for colipase domenen. Disse domene blir separert av en ikke-konservert linkende regionen som består av 50-55 aminosyrer hos DKK1, DKK2, DKK4, men hos DKK3 er den på kun 12 aminosyrer (Aravind and Koonin, 1998).

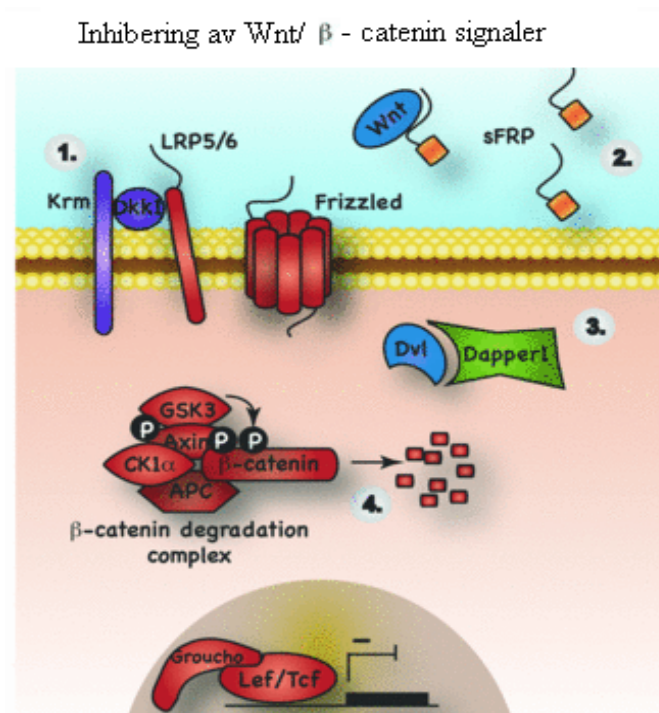
Protein sekvensen og strukturelle analyser antyder at alle DKK-proteiner og Colipaser har det samme disulfid-binding mønsteret og en lignende fold. Colipaser er helt nødvendig for lipid hydrolysen som gjøres av lipaser i pankreas. Colipase folden er den delen som viser den største grad av sekvens konservering blant alle DKK-er (van Tilbeurgh et al., 1999).



Figur 1.2 Domene strukturen til DKK3 familien. Human DKK1–4, også DKKL1 (sgy) er vist med deres domener. DKK_N domene som kalles for Cys1 domenen, colipase fold som også kalles for Cys2. Sgy-domenen (sgy) finnes bare i DKK3 og DKKL1 (Niehrs, 2006)

DKK–proteiner Inhiberer Wnt funksjonen ved at C-terminalen, colipase fold domenet, medierer dette. N-terminalen med Dkk _N domenen kan direkte interagere med Frizzled/Wnt reseptorene.

For å antagonisere Wnt signaliseringen, binder DKK1, DKK2 og DKK4 til LRP5/6 og det transmembranene proteinet Kremen. Dette fører til LRP5/6s internalisering/ forandrer konformasjon og på denne måten forhindres Wnt og Frizzled i å danne et aktivt kompleks med LRP5/6.(Krupnik et al., 1999, Mao et al., 2002)



Figur 1.3 skjematisk fremstilling av virkningsmekanismen for de to hovedgruppene av Wnt–antagonister; DKK og sFRP. Wnt/β–catenin signalveien inhiberes når DKK–proteiner binder til LRP5/6 og Kremen reseptorene(1). sFRP hemmer Wnt signalveien ved å binde til Wnt, slik at denne ikke kan binde Frizzled respptoren(2) (Sethi and Vidal-Puig, 2010)

1.1.2 DKK3

Dickkopf 3 (DKK3) skiller seg ut fra de andre medlemmene i DKK-familien, på bakgrunn av dens funksjoner og sekvens analyser som tyder på dette (Niehrs, 2006). Som vist i figur 1.2 så har DKK3 som de andre medlemmene i gruppen en DKK_N domene og en colipase fold region. Men den har i tillegg et spesiell SGY domene som det har til felles med et protein som kalles for DKK3-lignende-1 eller Soggy. Dette proteinet (Soggy) er lite forsket på og bortsett fra dens potensielle rolle i spermatogenesisen og dens homologi til DKK3 er dens funksjon uklar. (Chien et al., 2009)

DKK3 funksjon er i mindre grad kjent i forhold til de andre medlemmene i DKK-familien. Inntil nylig har flere studier indikert at DKK3 ikke har noen virkning på Wnt-signalveien. Men nyere studier viser at DKK3 spiller en viss rolle i regulering av Wnt-signalveien, avhengig av hvilke celle typer som har blitt undersøkt. (Nakamura and Hackam, 2010). Eksempler viser at DKK3 forsterker Wnt signaliseringen i human Muller glia cellene MIO-M1 og HEK293 celle linjer, men inhiberer signaliseringen i PC12 og osteocarcinoma Saos-2 celler som ble utsatt for Hydrogen peroksid og staurosporine(Nakamura et al., 2007).

Det er også blitt vist at DKK3 har egenskaper som er viktig for cellenes overlevelse. DKK3 nedregulerer caspaser og dermed nedregulerer apoptose. (Nakamura et al., 2007). Både Pax6 og DKK3 blir uttrykket i retina, øyelinsen, og i deler av hjernen og i beta cellene i pankreas. Uttrykket til Pax6 og DKK3 blir til og med observert i samme celletyper. Blant annet er de uttrykket i retina; Muller glia, den indre nukleære laget (INL) og ganglion celle lag etc. (Nakamura et al., 2007, Ang et al., 2004, Hermann et al., 2007).

DKK3 uttrykkes i mange forskjellige organer og vev under utviklingen av epitelceller til nerver, hjerte og bein, nærmere bestemt i regioner der epitel-embryonalt bindevev omformes. (Monaghan et al., 1999). I voksne vev blir DKK3 uttrykt i størst grad i hjerte og hjernen. (Krupnik et al., 1999). Selv om mus som mangler DKK3 utvikler seg normalt, har de visse egenskaper som inkluderer en svak nedsatt gjennomluftning i lungene, hyperaktivitet og økt immunologisk og hematologiske markører. Grunnen til at alvorligere tilfeller av DKK3 mangel ikke forekommer kan være at den har DKK3 homologen Soggy som kanskje kompenserer for DKK3 mangelen (Barrantes Idel et al., 2006).

1.2 Paired box gener

Paired box (Pax) ble først beskrevet i *Drosophila* som senere ble også oppdaget i menneske, mus, rotter, kylling og sebrafisk (Tremblay and Gruss, 1994). Pax gener er en liten men essensiell gen familie som har mange oppgaver som transkripsjonsfaktorer. Disse er særlig viktig for normal utvikling av embryo og regulering i cellulær differensiering, celle migrering og proliferasjon og cellenes resistens til apoptose. (Lang et al., 2007, (Robson et al., 2006))

Pax-gen familien er består av 9 gener (Pax1-Pax9) delt i 4 grupper basert på hvilket strukturelt domene (Paired domene, homeodomene, octapeptide) proteinene genene koder for har (Se Figer.1).

Det som kjennetegner alle transkripsjonsfaktorer er at de har et eller flere DNA-bindingsdomener. Paired domene er felles for alle Pax proteinene og er et DNA-bindingsdomene på 128 aminosyrer lokalisert ved N-terminalen. (Nornes et al., 1998)

Flere av medlemmene i denne protein familien har Paired domenet alene (Pax 1-og 9) eller sammen med en homeodomene med full lengde (Pax 3, 4, 6, 7). Det finnes også en forkortet homeodomene variant som finnes hos Pax 2, 5 og 8. I tillegg til Paired og homeodomene har alle bortsett fra Pax6 og Pax4 et 8 aminosyre octapeptide motiv. Dette har en inhibitorisk virkning for transkripsjonen (Lang et al., 2007, (Nornes et al., 1998)).

PAX Familien	Protein struktur/domener Paired octapeptide homeodomain	Medlem i protein familien	Embryonal uttrykks domene	Utrykk/Mutasjon i sykdomer hos menneske
1		PAX1	Skjelett, thymus	Klippel-Feil Syndrome, Jarcho-Levin Syndrome
		PAX9	skjelett, tenner og thymus	Jarcho-Levin Syndrome, Oligodentia
2		PAX2	Nyrer og CNS	Hyperproliferative dysplastic kidney, Renal hyperplasia, Bladder and renal cancer, Coloboma Syndrome
		PAX5	B-celler, CNS	Lymphomas
		PAX8	Nyrer, CNS, Tyroid	Congenital hypothyroidism, Thyroid carcinomas/adenomas
3		PAX3	CNS, muskler	Waardenburg Syndrome Types I/III, Melanoma, Rhabdomyosarcoma
		PAX7	CNS, muskler	Rhabdomyosarcoma
4		PAX4	Pankreas, tarm	Diabetes
		PAX6	Tarm, pankreas, CNS og øyne	Aniridia, GI tumors, Cataracts/Peter's Anomaly

Figur.2.1 Pax protein familien er delt i 4 grupper basert på eksistensen eller posisjonen til Paired domenet (Blå rektangel), oktapeptidet (Grønn rektangel) og eller en homodomene (rosa rektangel). Embryonal uttrykks mønster og en del sykdommer som forårsakes pga. mutasjoner er også vist i tabellen. Figuren er en modifisert versjon fra denne referansen (Lang et al., 2007).

Forekomst av mutasjoner i Pax gener kan forårsake abnormal utvikling hos mange organismer. Mangel på Pax gener hos organismer fører til fatale konsekvenser. Sykdommer som Aniridia og andre øye sykdommer, dannelse av forskjellige tumorer, Waardenburg syndrom og diabetes er noen eksempler (se figur 2.1). Hvis begge allelene av et Pax gen er mutert vil det være dødelig for organismen pga. mangel på utviklingen av vitale organer (Lang et al., 2007).

Flere studier har sett på Pax proteins rolle i svulstdannelse/ onkogenesen. En hypotese nå er at Pax proteiner spiller en viktig rolle i å bevare vevs spesifikke stamceller ved å hindre siste fase av differensiering og apoptose, og at disse funksjonene kan føre til at kreftceller oppstår og utvikles til spesifikke kreftformer. Dette er en teori som blir støttet fordi uttrykket av Pax proteiner er unormalt i flere forskjellige typer tumor, men den nøyaktige rollen til Pax proteiner i kreft er ikke tydelig nok klarlagt (Lang et al., 2007).

Det er av stor betydning å kjenne til, og forstå de normale funksjonene til de forskjellige signal veiene Pax protein kontrollerer for muligens kunne finne parallell veier som er involvert i tumor celler. Dette vil være et viktig ledd i å definere nye molekylære mål og signalveier slik at nye kreft medisiner kan utvikles.

1.2.1 Pax6 og Pax6(5a)

Pax6 tilhører transkripsjons faktor familien paired box. Den ble først isolert/klonet fra menneske (Ton et al., 1991), mus (Walther and Gruss, 1991), og sebrafisk (Krauss et al., 1991) og senere for andre virveldyr.

Pax6 er en evolusjonært bevart transkripsjonsfaktor som er svært viktig i organogensen og normal fosterutvikling, men den har også nødvendige funksjoner i visse vev hos voksne individer. Pax6 uttrykket blir først observert så tidlig som dag 8,5 i embryonisk utvikling hos mus, mens neural tuben lukkes igjen (Grindley et al., 1995), (Walther and Gruss, 1991). Uttrykket er bredt i CNS under utviklingen, dette gjelder også forhjernen, cerebellum/ lillehjernen og ventral neural tuben (Grindley et al., 1995) og (Walther and Gruss, 1991).

Pax6 har to DNA bindings domener, et Paired domene og et homeodomenet og en carboxyl-terminal (C-terminal) bestående av 152 aminosyrer som er rik på prolin, serin og treonin. C-terminalen er den transkripsjons aktiverende delen. Paired domenet og homeodomenet kan uavhengig eller i samarbeid med hverandre binde til DNA.

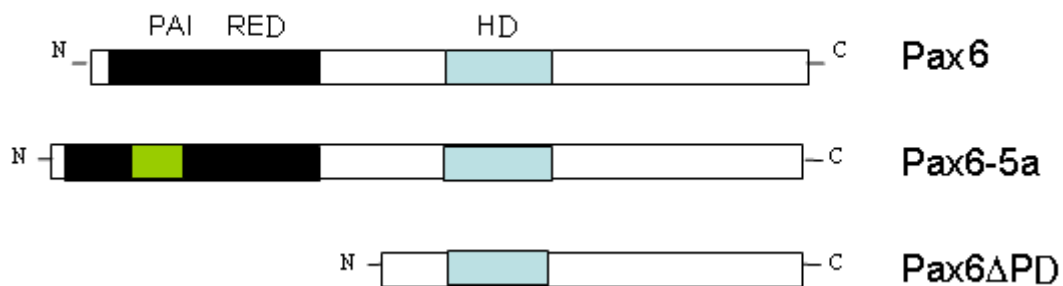
Det finnes 2 andre isoformer av Pax6, Pax6(5a) og Pax6 Δ P (se figur 2.2). Pax6 isoformen vil forekomme hos forskjellige virveldyr men i spesifikk form for hvert medlem (Glaser et al., 1992). Både Pax6 og Pax6(5a) uttrykkes i diverse vev i øyet og hjernen og ser ut til å virke sammen funksjonelt for å stimulere transkripsjon av mål gener. (Chauhan et al., 2002a, Chauhan et al., 2002b, Chauhan et al., 2004).

Pax6 Δ PD isoformen har kun homeodomenet og den transkripsjons aktiverende C-terminalen. Selv om Pax6 Δ PD mRNA er observert i forhjernen til embryoer er dens uttrykks nivå mye lavere enn Pax6 sitt uttrykk. (Osumi N et al.)

Pax6(5a) isoformen har 14 aminosyrer innsatt i den N-terminal delen av Paired domenet. Dette fører til at Pax6(5a) har helt andre DNA-binding egenskaper.

Paired domenet til Pax6 trengs for reguleringen av neurogenesen, celle proliferasjon og cellenes utvikling (Haubst et al., 2004). Mens den Pax6(5a) ikke har noen effekt på differensiering eller cellenes utvikling (Haubst et al., 2004).

Hos voksne mennesker, ser det ut til at det er like nivå av Pax6 og Pax6(5a) i linse og kornea. De to Pax6 isoformene har forskjellige oppgaver, selv om de blir uttrykt sammen, i samme celletyper. Dette kan vises ved for eksempel å se på mus som har mangel på Pax6(5a) isoformen. Disse musene vil ha spesifikke defekter i øyne, og anatomien til bukspyttkjertelen vil være helt annerledes. Eller når begge isoformene blir overuttrykt i kylling retina, øker de begge retinale cellers proliferasjon, mens Pax6(5a) i tillegg vil indusere differensiering av retina på steder der den normalt ikke skal være (Azuma et al., 2005).



Figur 2. De forskjellige isoformene med (minst) 3 forskjellige bindingsmåter til DNA. Forskjellen mellom Pax6 og Pax6(5a) er at sist nevnte har 14 aminosyrer insatt i paired domenet. Dette er årsaken til hvorfor de to proteinene har forskjellig DNA binding spesifisitet. Pax6ΔP mangler paired domenet og vil kun bruke homeodomenet til DNA binding og kontakt med andre proteiner.

Pax6 blir også uttrykt i pankreas under utvikling. Men etter hvert som pankreas utvikles og differensieres blir uttrykket begrenset til de Langerhanske øye celle forløpere. De Langerhanske øyer er endokrine celler i pankreas og består av alfa, beta, delta, and gamma celler. Pax6 er også uttrykt i lukteorgan systemet under embryo utviklingen og i linse, kornea og retina i øyne under utvikling. Pax6 uttrykket er absolutt avgjørende for overlevelse og mus som mangler Pax6 dør raskt etter fødsel. Hos disse musene er øyne og nasale strukturer totalt fraværende og diencephalon (mellomhjernen) klarer ikke å stimulere et svært misdannet cerebral cortex (hjernebarken) (Pratt et al., 2000, Tyas et al., 2003).

Pax 6 uttrykket vil minke betydelig hos voksne individer, slik som med de andre medlemmene i gruppen. Men noe av uttrykket bevares i visse deler av hjernen, blant annet i hippocampal dentate gyrus (Maekawa et al., 2005), glia celler og subventrikulær området til lateral ventricle (Hack et al., 2005), radiale glia-lignende celler og i modne endokrine celler i pankreas (St-Onge et al., 1997).

Strukturen til hjernen hos mennesker med Pax6 som er haploid/ ikke diploid dermed bare et kromosom har en abnormal form. Ofte er pineal kjertelen enten ikke eksisterende eller abnormal (Mitchell et al., 2003).

Den evolusjonære bevaringen av Pax6 og dens spredning blant så mange forskjellige arter viser at den har en unnværlig funksjon. Den viktige regulerende rollen som Pax6 spiller i utviklingsfasen blir bevist når en ser på fenotyper som forårsakes pga. mutasjoner i dette viktige genet. Hos mus fører heterozygositet til mindre størrelse på øyne og visuelle abnormale tilfeller slik som iris hypoplasia/aniridia mangel på regnbuehinne /iris (Georgala et al., 2011). Samme sykdom forekommer hos mennesker med heterozygositet i Pax6.

1.3 Formålet med denne masteroppgaven er :

Å få bekreftet om DKK3 er et gen regulert av Pax6 ved å:

1. Klone sebrafisk DKK3 cDNA-et slik at man kan lage probe for in situ. Dersom det er vellykket og det er nok tid skal Pax6 genuttrykket slås ned i Sebrafisk embryo og se om dette påvirker uttrykket av DKK3 genet vha in situ farging.
2. Klone DKK3 promoteren fra mus og om mulig menneske. Ko-transfektore disse sammen med plasmider som koder for Pax6 og Pax6(5a) for å se om disse kan aktivere DKK3 promoteren. Dersom det påvirkes gjøres det delesjonsanalyser for å se om bindingssetet til Pax6 kan mappes.
3. Slå ned uttrykket av Pax6 med siRNA i 3T3 cellene og å overuttrykke Pax6 og Pax6(5a), for å se om DKK3 uttrykket blir endret. Høst både RNA (til cDNA syntese og qPCR) og protein (til westernblot) fra disse cellene.

2. Materialer

Tabell 2.1 PCR–primere brukt til kloning av mDKK3 og hDKK3 promoteren og zfDKK3 cDNA

Primer	Sekvens 5' til 3'
zDKK3cDNA. FW	ACTCTGAGTCCAGCCAGCAG
zDKK3cDNA. REV	AATTATGAAGTGGTTTAATGTCCAGA
mDKK3promNEW.FW	AAAGGTACCATTAGCCAGCACAGGGAAGA
mDKK3promNEW.REV	AAAAGATCTCATCAGCTCCTCCACCTCTC
mDKK3promMID.FW	AAAGGTACCGTCGTGACCAGATCCAGTT
hDKK3promNEW.FW	AAAGCTAGCTGCAGAGAAAGGCAGTCT
hDKK3promNEW.REV	TTAAGATCTCGTGTCTCCATCAGTTCCT
hDKK3promMID.FW	AAAGCTAGCCTCTCTTGGTGGATGT

Tabell 2.2 Medium til bakteriekulturer

SOC medium	LB-medium
Til 950 ml deionisert H ₂ O:	10 g Trypton
20 g Tryptone	5 g gjærekstrakt
5 g gjær ekstrakt	171 g NaCl
0,5 g NaCl	50µg/ml Ampicillin
pH justeres til 7,0 med NaOH,	tilsett 1000 ml dH ₂ O
tilsett 1000 ml dH ₂ O, tilsett før bruk:	pH justeres til 7,0 med NaOH
10 ml 1M MgCl ₂ , 10 ml 1M MgCl ₄	
Og 20 med mer glukose.	

Tabell 2.3 Bakterier brukt til Kloning

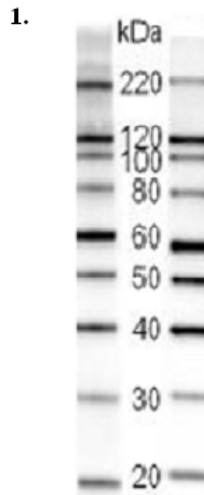
Navn	Beskrivelse	Produsent
DH5 α celler	Kompetenete E.coli	Fra Frysestock
TOPO-10	E.coli	Invitrogen kit

Tabell 2.4 Kommersielle kits

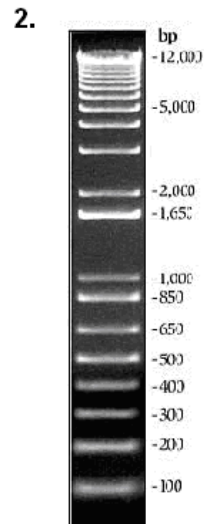
Navn	Bruksområde	Produsent
TOPO-TA cloning	Plasmid kloning	Invitrogen
QIAquick Gel Extraction Kit	Rensing av gel	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep	DNA plasmid rensing	QIAGEN
QIAprep Spin Midiprep	DNA plasmid rensing	QIAGEN
RNeasy Plus Mini kit	RNA prep	QIAGEN

Tabell 2.5 Enzymer brukt i diverse sammenhenger

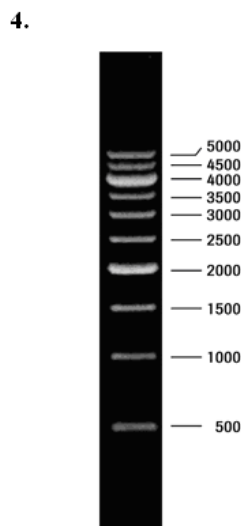
Navn	Enzym	Produsent
polymerase chain reaction (PCR)	DyNAzyme TM II DNA Polymerase	Finnzymes
Retriksjonsenzymer	BglII KpnI XhoI SacI BamHI EcoRI	BioLabs Promega Promega BioLabs BioLabs Promega
DNA ligering	T4 DNA ligase SAP	Invitrogen Biotec Pharmacon
Sekvensering	BigDye [®] 3.1	App. Biosystems



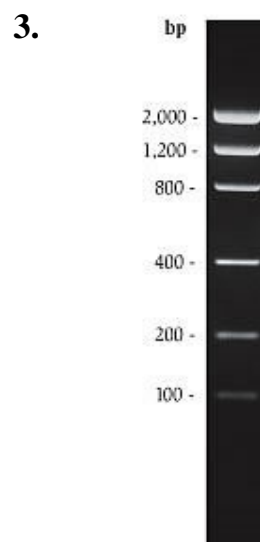
MagicMark™ XP Western Protein Standard
(Invitrogen, cat.# LC5625)



1 Kb Plus DNA Ladder
Invitrogen™ Nucleic Acid Markers
(cat #10787-018)



DNA Molecular Weight Marker XVII
Catalog Number 11855646001 Roche



Low DNA Mass Ladder
(Invitrogen Cat. #10068-013)

Figur 2.1 Laddere brukt til gel elektroforese og Western Blotting

Tabell 2.6 Diverse Løsninger og buffere

2xSDS gel-loading buffer

100 mM Tris HCl
4 % (w/v) SDS
0, 2 % (w/v) Bromphenol blå
20 % (v/v) Glycerol
200 mM (tillsett rett før bruk) Dithiothreitol

1M Dithiothreitol(DTT)

0, 09 g Dithiothreitol
20 ml 0, 01 M NaCH₃COO (pH 5, 2)

0,5 M Trisbase

6, 05 g Tris (base)
80 ml dH₂O
2 ml 20 % SDS
pH justert med 18,5 % HCl til pH 6,8
dH₂O til 100 ml

10 % APS

10 g Ammoniumpersulfat (ICN Biomedicals)
100 ml MilliQ vann

1,5 M TrisBase

30 g Tris (base)
80 ml dH₂O
2 ml 20 % SDS
pH justert med 18,5 % HCl til pH 8,8
dH₂O til 100 ml

5 % Blokkeringsbuffer

2,5 g Tørrmelk(Semper)
1x PBST til 50 ml

10xGelkjøringsbuffer

30 g Tris(base)
144 g Glycine
800 ml dH₂O
10 g SDS
pH justert med 18,5 % HCl
dH₂O til 1000 ml (Fortynna 1:10 før bruk)

Blottebuffer:

1,88 g Tris(base)
23,25 g Glycine
150 ml Metanol
Til 1000 ml dH₂O

PBST:

1000 ml Phosphate buffered saline
1 ml Tween 20

50 x TAE

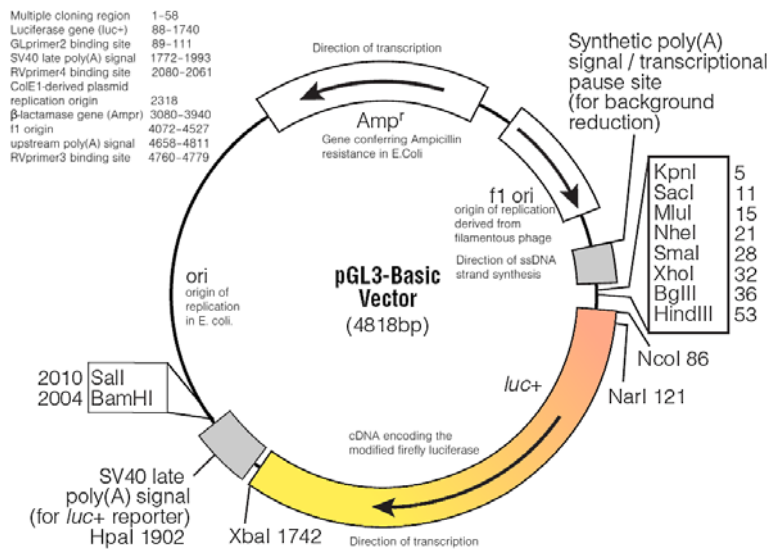
242 g Tris(base)
57,1 ml 11,4 % eddiksyre
100 ml 0,5 M ETA (pH 8,0)
dH₂O til 1000 ml
Fortynnet 1:50 før bruk.

0,5 M EDTA

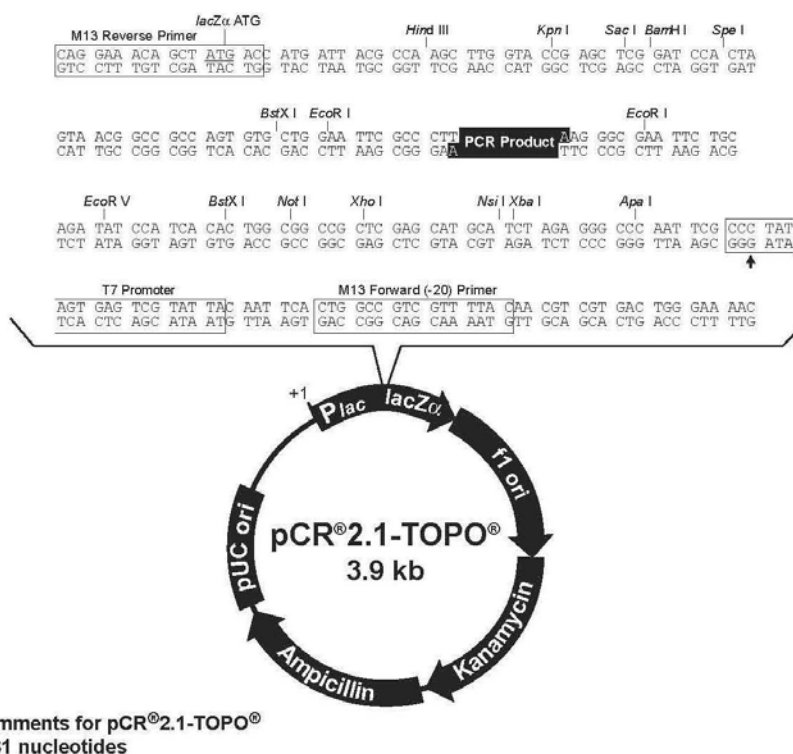
18,61 g Na₂EDTA · 2H₂O
80 ml dH₂O
pH justert med NaOH til pH 8,0
dH₂O til 100 ml

6xT gel loading buffer

0,25 % Xylen Cyanol FF
60 mM Na₂EDTA (pH 8,0)
0,6 % SDS
40 % (w/v) Sukrose i vann



Figur 2.2 Skisse av pGL3-basic vektoren (Promega). Figuren viser også hvor enhancer fragmenter kan klones inn oppstrøms for *luc+* genet. Det vises også restriksjonsenzymene som brukes til å åpne vektoren.



Figur 2.3 Skisse av pCR2.1-TOPO[®] vektoren (Invitrogen) og sekvensen rundt TOPO[®] Kloningsstedet. Det vises også restriksjonsenzymenes kuttsteder som indikerer hvor i sekvensen de kutter.

3 Metoder

3.1 Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase kjede reaksjon(PCR) er en måte for å amplifisere en bestemt DNA-sekvens. Til denne metoden trenger en DNA-templat, komplementære primere(se tabell 2.1), DNA-polymerase enzym og nukleotider (dNTP). Disse blir blandet i en buffer som gir det riktige kjemiske miljøet.

3.1.1 PCR av sebrafisk cDNA for sebrafiskDKK3 primere

cDNA fra voksen sebrafisk og cDNA fra embryo (9-16 hpf, gave fra H.Sao, UiB) ble brukt som templat i PCR reaksjonen. Slik ble reaksjonsmiksen laget:

I hvert rør:

cDNA	5 μ l
2xDyNAzyme™ II PCR master miks	25 μ l
Forward(FW) primer	1 μ l
Reverse (RV) primer	1 μ l
dH ₂ O	18 μ l

Enzymet DyNAzyme™ II er en DNA Polymerase er nødvendig for DNA syntesen under PCR reaksjonen.

Reaksjonen ble utført i en MJ Research PTC-200 Thermo cykler med disse innstillingene:

1. 94 °C i 2 min, initial denaturering
2. 94 °C i 30 sekunder, denaturering
3. 56 °C i 1 min, annealing/ temperering
4. 72 °C i 1 min, ekstensjon
5. 76 °C i 10 min,
6. 4 °C, forever / uendelig

Steg 2-4 ble repetert 34 ganger. Etter endt reaksjon ble PCR produktene kjørt på 0,7 % agarosegel.

3.1.2 PCR av mDKK3 og hDKK3 promoter

Tabell 3.1 Oversikt over PCR reaksjonen

Primere	Templat	Produkt størrelse
mDKK3 prom FW + mDKK3 prom REV	3T3-celler	1678 bp
mDKK3 prom MID + mDKK3 prom REV	3T3-celler	792 bp
hDKK3 prom FW + hDKK3 prom REV	Hela-celler	1700 bp
hDKK3 prom MID + hDKK3 prom REV	Hela-celler	724 bp
hDKK3 prom FW + hDKK3 prom REV	Kontrollceller (humane blodceller fra blodbank)	1700 bp
hDKK3 prom MID + hDKK3 prom REV	Kontrollceller (humane blodceller fra blodbank)	724 bp

Mastermiksen ble laget med disse:

DNA	5 µl
10xDyNAzyme PCR Buffer	5 µl
dNTP mix(10 uM av hver)	1 µl
Forward primer(10 uM)	1 µl
Revers primer(10 uM)	1 µl
ul DyNAzyme(2 U/L)	0,5
dH ₂ O	til 50 ul

PCR rørene ble satt i maskinen ved et forhåndsprogram med disse innstillingene:

- Denaturering ved 94 °C i 2 minutter
- 35 sykluser med:
 - Denaturering ved 94 °C i 2 minutter
 - Binding av primer til templat ved 57 °C i 30 sekunder
 - Syntese av DNA ved 72 °C i 45 sekunder
- Syntese av DNA ved 72 °C i 5 minutter
- Nedkjøling til 4 °C, uendelig

De ferdige PCR produktene ble så kjørt på agarosegel for å finne ut om hvilket hadde forventet størrelse.

3.1.3 Gel elektroforese av PCR produkter

0,7 g agarose (Medpro) i 100 ml 1xTAE ble tilbredd ved oppvarming i mikrobølge ovnen i 3-4 minutter, til agarosen var ferdig smeltet. Agarosen ble nedkjølt til 60-70 °C.

For visualisering av DNA-båndene ble 10 ul etidiumbromid (10 mg/ml SIGMA) pipettert i støpningsformen og den varme gelløsningen ble helt i. En kam ble satt i ned for å lage brønnene. Deretter fikk gelen stivne i avtrekksskap ved rom temperatur (RT) i 30 minutter. Kammen i den ferdig stivnede gelen ble tatt ut forsiktig og formen ble satt i elektroforesekammeret som ble fylt opp med 1xTAE buffer.

15 ul av PCR produktene ble tilsatt 5 ul 6xT og prøvene ble tilsatt i brønnene.

Gelen ble kjørt ved spenning på 70-90 volt i 30-60 minutter. Bildene av gelen ble tatt med Gel Doc 2000 (BIO RAD) og åpnet i Quantity One® programmet.

3.1.4 TOPO-TA® Kloning

TOPO-TA Cloning® kit (Invitrogen) ble brukt for å oppnå en effektiv kloning med direkte innsettelse av Taq-amplifisert PCR produkt i plasmid vektor. pCR® 2.1-TOPO® vektor har en 3'tymidin(T) overheng som gjør at PCR produktene med 3'adenin (A) overheng effektivt liggeres. Denne metoden ble brukt for å klonere Sebrafisk cDNA inn i pCR® 2.1-TOPO® vektor og kloning av DKK3 promotere i pCR® 2.1-TOPO® vektor.

Mastermiks for kloning reaksjonen:

PCR produkt	4 µl
Salt løsning (Invitrogen)	2 µl
pCR [®] 2.1-TOPO [®] vektor	1 µl

Alt ble blandet sammen forsiktig og inkubert ved romtemperatur i 10 minutter deretter ble det plassert på is. 200 µl kompetente DH5α celler og 2 µl mastermiks ble brukt per reaksjon. Reaksjonsmiksen ble deretter inkubert på is i 30 minutter før den fikk varmesjokksbehandling ved 42 °C i 1,5 minutt. Deretter ble 250 µl SOC tilsatt til DH5α cellene før de ble ristet (225rpm) ved 37 grader i 1 time i en Infors AG CH-4103 (Blottmingen). 100 µl ble spredd på en agarplate med ampicillin seleksjon. Agarplaten ble inkubert med bunnen opp ved 37 °C grader overnatt. Dagen etter telles antall kolonier og platene oppbevares ved 4 °C.

3.1.4.1 Kloning uten TOPO–TA Cloning[®] kit (Invitrogen)

Når det gjelder den vanlige transfeksjon metoden er det de samme trinnene til varmesjokk behandlingen som er ved 37 °C istedenfor 42 °C. Så ble cellene tilsatt 5 ml SOC istedenfor 250µl og ristet i 1 time. Etter endte timen ble DH5α cellene sentrifugert (4000rpm) i en Biofuge Frescco (Heraeus Instruments) ved 4 °C i 5 minutter. Etter endt sentrifugering ble det meste av mediet helt ut og bakterie pellet resuspendert i resterende mediet. Så ble de siste trinnene slik de er beskrevet for TOPO–TA fulgt.

3.1.5 DNA miniprep

Bakteriekolonier plukkes fra agarplaten ved hjelp av sterile tannstikkere og tilsettes 3 ml LB-medium med 100ug/ml ampicillin i Falconrør som stod til risting (225rpm) i en Infors AG CH-4103 (Bottmingen) riste/ inkuberingskap, overnatt ved 37 °C. Etter 17 timer inkubasjon ble miniprep(QIAGEN) eller miniprep light versjonen utført.

QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN) ble brukt til isolering av DNA plasmidene 1500 µl av bakteriesuspensjonen fra overnatte-kulturen ble overført til microsentrifugerør og sentrifugert (13000rpm) i 1 minutt i en Biofuge pico (Heraeus Instruments). Vekstmediet ble fjernet og bakteriepelletten ble resuspendert i 250 µl P1 buffer ved bruk av en vortexer (Heidolph REAX top). Deretter ble det tilsatt P2 buffer og rørene ble vendt om 4-6 ganger til

blandingen ble blåfarget. For å nøytralisere blandingen ble det tilsatt 350 µl nøytraliserende N3 buffer. Rørene ble igjen vendt om 4-6 ganger til blandingen ble hvit og klumpete. Rørene ble sentrifugert (13000rpm) i 10 minutter. Supernatanten ble forsiktig overført til QIA spin kolonne og sentrifugert (13000rpm) i 45 sekunder, det som passerte gjennom kolonnen ble fjernet. Kolonnen ble vasket med 500 µl PB buffer der de ble sentrifugert (13000rpm) i 45 sekunder og det som gikk gjennom ble fjernet. Kolonnene ble så vasket med 750 µl PE buffer og sentrifugert (13000rpm) i 45 sekunder. Det som passerte gjennom kolonnen ble fjernet og kolonnen ble sentrifugert i 1 minutt for å fjerne restene til vaskebufferen. Tilslutt ble kolonnene plassert på rene 1.5 ml microsentrifugerør og på kolonnene ble det tilsatt 50 µl elueringsbuffer også ble rørene inkubert i 1 minutt før de ble sentrifugert (13000rpm) i 1 minutt. DNA konsentrasjonen ble målt med NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer.

3.1.6 DNA Miniprep light

Denne metoden er en forenklet versjon av QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN) der QIA spin kolonne ikke brukes og DNA persipiteres ved bruk av isopropanol. Buffere fra QIAGens Miniprep kitt ble brukt for å isolere plasmid DNA-et fra overnattekkulturene.

1,5 ml av overnattekkulturene ble overført til merkede eppendorfrør. Disse ble spunne ned i 20 sekunder ved 13000 rpm og supernatanten ble fjernet. Pelleten ble resuspendert i 100µl P1 buffer. Deretter ble 100 µl P2 buffer tilsatt og rørene ble vendt rundt 4-6 ganger, rørene fikk stå ved RT i 2-3 minutter. 140 µl buffer N3 ble tilsatt i rørene og de ble vendt rundt 4-6 ganger, så ble de sentrifugert i 10 minutter. All supernatant ble overført til nye eppendorfrør og tilsatt 400 µl isopropanol. Rørene ble vendt noen ganger og inkubert i 2-3 minutter ved RT før de ble sentrifugert i 5 minutter ved 13000 rpm. Supernatanten ble fjernet og DNA pelleten vasket med 500 µl 70 % etanol og sentrifugert igjen i 5 minutter.

Supernatanten ble fjernet forsiktig og DNA pelleten tørket i eksikator i ca. 10 minutter.

Deretter ble pelleten løst i 50 µl TE-buffer. DNA konsentrasjonen ble målt med NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer.

3.1.7 Restriksjonsenzymkutting

Diverse restriksjonsenzymmer ble brukt for å bekrefte vellykket kloning og for å bekrefte korrekt orientering av i DNA prøvene med rekombinant plasmid. BglII, KpnI, XhoI, SacI, BamHI, EcoRI er de enzymene som er brukt ved flere anledninger i denne oppgaven. Slik ser en vanlig restriksjonsenzym kutting ut:

DNA plasmid	5 µl
10xTA	2 µl
Restriksjonsenzym	0,5 µl
dH ₂ O	12,5 µl

Etter sammenblanding ble dette innkubert i minst 1 time ved 37 °C. For å se etter riktig insert ble hele reaksjonsblandingen tilsatt 4 µl 6xT loading buffer og satt på en 0,7 % agarosegel ved 90V i 45 minutter.

3.1.8 Kloning av DKK3 promoterfragment i pGL3-basic vektor

DNA plasmid fra miniprepen ble brukt i subkloning. Promoterfragmentet ble overført fra den opprinnelige pCR[®] 2.1-TOPO[®] vektoren til pGL3-basic vektoren. Det ble valgt restriksjonsenzymmer som kuttet promoterfragmentet ut av pCR[®] 2.1-TOPO[®] og dermed resulterte i kompatible/forenelige ender for kloning inn i pGL3-basic vektor.

KpnI og BglII ble brukt for å kutte ut DKK3 promoter sekvensen ut av pCR[®] 2.1-TOPO[®] og åpne pGL3-basic vektor for kloning.

20 µl reaksjonsmiks ble laget slik:

pGL3-basic	5 µl	DNA eluat	8 µl
10 xTA	2 µl	10 xTA	2 µl
KpnI	0,5 µl	KpnI	0,5 µl
BglII	0,5 µl	BglII	0,5 µl
H ₂ O	12µl	H ₂ O	9 µl

Reaksjonsmiksen ble inkubert ved 37 °C i 2 timer. Etter 1,5 time ble 1µl Shrimp Alkaline phosphatase (SAP) tilsatt røret med pGL3-basic vektoren. Etter endt inkubering ble begge rørene tilsatt 6xT loading buffer og satt på 0,7 % gel ved 90V i 40-45 minutter.

3.1.9 Rensing av agarosegel

For å visualisere DNA på gelen ble en High Performance Ultraviolet Tranilluminator(UVP, Ultra-violet products) brukt. Båndene på gelen ble skåret ut ved bruk av en skalpell.

DNA fragmentene ble rensset ut av gelen ved hjelp av QIAquick Gel Extraction Kit (Invitrogen).

Agarosebiten ble overført til microsentrifugerør og tilsatt 300µl QG buffer. Så ble gelen smeltet ved 50 °C i 10 minutter. DNA ble presipitert i 100 µl isopropanol og inkubert ved romtemperatur i 5 min. QIA spin kolonner ble plassert i microsentrifugerør og prøvene ble overført til kolonnene. Disse ble sentrifugert(13000rpm) i 1 minutt i en Biofuge pico(Heraeus Instruments). Væsken som hadde gått gjennom ble kastet. Kolonnene ble deretter vasket med 750 µl PE buffer og sentrifugert(13000rpm) i 1 minutt. Væsken som hadde gått gjennom ble kastet. Kolonnene ble sentrifugert(13000rpm) i ytterligere 1 minutt til. Tilslutt ble kolonnene plassert i nye microsentrifugerør og DNA ble eluert i 50 µl TE buffer og sentrifugert (13000rpm) i 1 minutt. De eluerte DNA fragmentene ble videre brukt i ligeringsreaksjon med plasmidvektor.

3.1.10 DNA ligering

Under ligeringsprosessen ble promoterfragmentet ligert sammen med vektor der det ble dannet kovalente bindinger mellom 3' hydroksyl endene av det ene nukleotidet med 5' fosfat enden av det andre. Plasmidkonstruksjonene ble dannet ved ligering utkuttet promoterfragment inn i linearisert pGL3-basic vektor.

Slik ble ligeringsreaksjonen satt opp:

DNA fragment	7 µl
pGL3–basic	5 µl
T4 DNA ligase	1 µl
10 x ligeringsbuffer	2 µl
dH ₂ O	5 µl

Reaksjonsmiksen ble inkubert ved 14 °C over natt. Neste dag ble ligeringsmiksen blandet med 80 µl dH₂O før den ble transformert med kompetente DH5α celler. Bakteriecellene ble tint på is før 300 µl bakteriesuspensjon ble blandet med ligeringsmiksen. Deretter ble det fulgt samme prosedyre som under TOPO–TA[®] kloningen/vannlig kloning, der bakteriekolonier ble dyrket på agarplate til neste dag, da ble det plukket kolonier og innkubert i LB-medium overnatt, etterfulgt av miniprep av kulturene(se avsnitt 3.1.4, 3.1.4.1 og 3.1.6)

Prosedyren i avsnitt 3.1.7 restriksjonsenzym kutting ble fulgt for å kontrollere at kloningen var vellykket.

3.1.11 Sekvensering

Til sekvenseringen ble disse brukt:

2 ul DNA templat(300-500 ng)
1 ul primer(10 μ M)
2 ul BigDye 3.1(Applied Biosystems)
3 ul 5x sekvenseringsbuffer
12 ul ddH₂O

Disse ble blandet og kjørt på PCR med disse innstillingene:

- Denaturering ved 94 °C i 1 minutt
- 36 sykluser med:
 - Denaturering ved 94 °C i 1 minutt
 - Binding av primer til templat ved 63 °C i 2 minutter
 - Syntese av DNA ved 72 °C i 2 minutter
- Syntese av DNA ved 72 °C i 10 minutter
- Ned kjøling til 4°C, uendelig

Prøvene ble levert for sekvensering på sekvenslaboratoriet på MH bygget. Disse ble så sekvensert med 313x1 Genetic Analyzer Hitachi fra Applied Biosystems.

5xSekvenseringsbuffer

400 mM Tris HCl
10 mM MgCl₂
pH justert til 9,0

3.1.12 DNA midiprep

Midi Prep Kitet til QIAgen ble brukt for å isolere og rense plasmid DNA.

I sterile 250/500 ml erlenmeierkolbe ble det tilsatt 60 ml LB medium med ampicillin antibiotika. En liten del av de frosne bakteriene ble skrapet med en steril pipettespiss og overført til kolben. Her ble arbeidet utført sterilt for å unngå kontaminasjon med andre bakterier. Kolbene ble innkubert ved 37 °C og 225 rpm over natt i Unitson HT infors ristemaskin.

Dagen etter ble overnattekkulturen overført til 50 ml sentrifugerør og sentrifugert ved 4000 rpm g i 5 min ved 4°C. Supernatanten ble fjernet og 6 ml av buffer P1 tilsatt. Bakteriepelleten ble resuspendert ved vortexing. Så ble 6 ml buffer P2 tilsatt, rørene ble snudd opp og ned noen ganger og inkubert ved RT i 5 minutter. For å nøytralisere løsningene ble det tilsatt 6 ml av bufferen N3. Løsningene ble overført til et sprøytefilter med propp på spissen og innkubert i 15 minutter. I mellom tiden ble den DNA- bindende kolonnen ekvillibrert med 4 ml buffer QBT. Deretter ble løsningen sprøytet over i den ekvillibrerte kolonnen som fikk renne gjennom. Når alt av løsningen med plasmidene hadde gått gjennom kolonnen ble det vasket 2 ganger med 10 ml QC vaskebuffer. 5 ml av elueringsbufferen (TE-buffer) ble tilsatt i kolonnen og DNA ble eluert i et sterilt glass rør som så ble tilsatt 3,5 ml isopropanol, Dette ble blandet godt og inkubert ved RT i 5 min. Så ble dette overført til en 50 ml sprøyte som hadde en filter på spissen. Væsken ble presset gjennom filtret. Så ble 3 ml 70 % etanol tilsatt i sprøyten og presset gjennom filtret. For å få vekk alt av alkoholen ble luft presset gjennom for å tørke alt vekk. Deretter ble filtret satt på en 15 ml sprøyte som ble tilsatt 50 ul buffer TE og presset gjennom filtret i en eppendorfrør. Dette ble overført til sprøyten igjen og presset gjennom filtret en gang til.

Konsentrasjonen ble målt med NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer.

3.1.13 Frysestock

Fra fersk over natt bakteriekultur der korrekt plasmid innhold var bekreftet ble det laget Frysestock. 1.2 ml av overnattekkulturen ble blandet med 0,3 ml 50 % glyserol i et Cyro rør og vortexet. Røret ble godt merket før den ble lagret ved – 80 °C.

3.2 Transfeksjon av celler

3.2.1 Dyrking av FIpIn-3T3-Kontroll celler, 3T3 Pax6, 3T3 Pax6(5a) og hela celler

Celler lagret i flytende nitrogentank ble tint raskt ved å tilsette forvarmet dyrkningsmedium. Cellene ble overført til en 200 ml stor dyrkningsflaske med filter kork og inkubert i CO₂(5 %) skap ved 37 °C. Cellene ble splittet hver 2-3 dag. Først blir mediet fjernet, deretter vaskes det med 10 ml 1x phosphate-buffered saline(PBS) som er sterilt, cellene løsnes fra bunnen med 1ml Trypsin- EDTA (1X) (SIGMA), når cellene er trypsinert blir det nøytralisert med varm fersk medium. En tiende del av cellene ble tilsatt ferskt medium i dyrkningsflasken. Disse ble så inkubert videre ved 37 °C og CO₂(5 %).

PBS

ddH₂O 800 mL

NaCl 8 g

KCl 2 g

Na₂HPO₄ 1,44g

KH₂PO₄ 0,24g

pH justert med 18,5 % HCl til pH 7,4

ddH₂O 1000 mL

3.2.2 Transfeksjon med plasmid DNA

Plasmid DNA (pKW-10, pKW-mPax6 og, pKW-mPax6 (5a))ble laget ved hjelp av midiprep kit og brukt til å transfeksjon av 3T3-Kontroll cellene. 100.000 3T3-K celler ble sådd per brønn i 6 brønners Brett(9 brønner totalt) og inkubert i CO₂(5 %) skap ved 37 °C. Disse ble sådd dagen før og transfektert når cellene var ca. 40 % konfluente. Plasmidet pKW-10 ble brukt som kontroll(tom vektor).

Det ble laget en transfeksjonsmikse for hvert av plasmidene. I en 1,5 ml sentrifugerør ble det tilsatt 150 µl DME (høy glukose) uten antibiotika eller FCS (Serum), så ble 9 µl

LipofectaminTM 2000 (Invitrogen) tilsatt, deretter 3 µg av hvert plasmid tilsatt i hvert sitt rør og blandet ved lett vortexing. Til røret med pKW-10 plasmidet ble det i tillegg tilsatt 2,5 µl fluorescet-merket oligo mikse. Dette indikerer om hvor godt cellene tar opp plasmidene.

Transfeksjonsmiksene inkuberes ved romtemperatur i 15 min.

Mediet på cellene skiftes før tilsetning av transfeksjonsmiksen. 1 ml forvarmet DME tilsettes per brønn. Deretter tilsettes 50 µl av transfeksjonsmiksen til hver merkede brønn. Disse ble inkubert i CO₂ (5 %) skap ved 37 °C i 3-4 timer, deretter ble mediet skiftet til vanlig dyrkningsmedium. Cellene inkuberes videre over natten. Neste dag så vi på cellene og kontrollerte om cellene hadde fluorescence og prøvde å anslå om hvor mange prosent av cellene som hadde fluorescence. Deretter ble cellene høstet. To av brønnene for å samle celleekstrakt for RNA for å lage cDNA til qPCR og 1 brønn for å samle celleekstrakt for å samle protein for Western blot.

3.2.1 Transfeksjon med siRNA

3T3-Pax6 og 3T3-Pax6(5a) cellene ble transfektert med mPax6 siRNA (Santa Cruz, sc-36196) for å slå ut Pax uttrykket. I tillegg ble uspesifikt scr siRNA (Ambion, #4611) brukt som kontroll og Fluoricient oligo (Invitrogen # 46-0926)) ble brukt som markør på transfeksjonseffektiviteten.

Det ble laget en transfeksjonsmikse med mPax6 siRNA og en med scr siRNA.

I transfeksjonsmiksen hadde vi 200 µl DME 12 µl Lipofectamin 2000(Invitrogen), og 6 µl av hver si RNA(10µM). Rørene med transfeksjonsmiksen fikk stå i romtemperatur i minst 15 minutter. I mens ble cellene i dyrkningsflasken først vasket med 10 ml sterilt PBS så trypsinert i et par minutter. For å nøytralisere trypsin ble 9 ml DME (høy glukose) uten antibiotika eller FCS. Deretter ble antall celler telt. 4 * 14 ml rør ble merket ifølge celle type og siRNA som ble brukt. Til hvert av disse rørene ble 100 µl transfeksjonsmikse tilsatt så mediet og celler, hvert rør inneholdt 150.000 celler per ml. 1 ml ble overført til merkede brønner og oppbevart i CO₂(5 %) skap ved 37 °C over natt. Neste dag så tidlig som mulig ble mediet skiftet til varm, ferskt dyrkningsmedium. Cellene med den Fluoricient oligo ble observert i mikroskopet for å finne ut om hvor mange prosent av cellene som hadde fluorescens. Cellene ble satt tilbake i varmeskapet. Etter endte 24 timer ble cellene høstet for både analyser av RNA(tillaging av cDNA for Q-PCR) og Proteiner(for Western Blot).

3.2.2 Høsting av RNA og protein fra siRNA transfekterte celler til qPCR og Western Blot

Etter 24 timer ble celle høstet. For høsting av protein ble det laget 400 µl med 2xSDS buffer pluss 100 µl 1M DTT. Og for RNA høsting ble 1,44 ml RLT buffer blandet med 60 µl 1M DTT. Disse rørene ble oppbevart på is. Cellene ble vasket 2 ganger med 1 ml PBS, og alt PBS ble sugd vekk nøye, slik at det ikke skal bli volum økning. 350 µl RLT(m DTT) buffer ble tilsatt i de brønnene som skal høstes til RNA og 100 µl 2xSDS(m DTT) buffer i de brønnene til høsting av protein. Alle brettene var plassert på is, proteinprøvene ble høstet først. For hver brønn som ble skrapet ble alt av cellelysatet overført til eppendorfrør og satt på varmeblokk ved 100 °C i 5-7 minutter.

Brønnene for RNA høsting ble tilsatt 350 µl RLT(m DTT) buffer og skrapet og overført til en microsentrifugerør oppbevart på is. Så ble det utført RNA prep ved hjelp av RNeasy Plus Mini kit (QIAGEN) slik som beskrevet i RNeasy[®] Plus Mini Handbok.

Protein rørene ble lagret ved -20 °C og RNA rørene ved -80 °C.

3.2.3 Transiente transfeksjoner og reporter gen assay

Hela-celler ble transfektert med kalsium-peresipitert plasmid DNA (pKW-10, pKW-mPax6 og, pKW-mPax6 (5a)) for reporter gen assay. Det ble sådd ut 60.000 celler per brønn (til sammen 18 brønner) i en seks brønners Brett, disse ble inkubert i CO₂ (5 %) skap ved 37 °C over natta. Neste dag ble cellene studert med mikroskopet og cellene var ca. 40 % konfluente. Celle mediet ble skiftet 1 time før transfeksjonsmiksen ble laget. Disse består av en blanding av pKW-10, pKW-mPax6 og, pKW-mPax6 (5a)plasmidene og pGL3- mDKK3/pGL-basic promoteren (se tabell 3.1).

Tabell 3.3 Oppsett for transfeksjonsmiksen, og innhold av mastermikslaget for 4 brønner

2 µg pKW10	2 µg pGL3-basic	0,2 µg pCH110	H ₂ O til total volum til 200 µl
2 µg pKW10	2 µg pGLmDKK3 promoter	0,2 µg pCH110	H ₂ O til total volum til 200 µl
2 µg pKWPax6	2 µg pGL3 -basic	0,2 µg pCH110	H ₂ O til total volum til 200 µl
2 µg pKWPax6	2 µg pGLmDKK3 promoter	0,2 µg pCH110	H ₂ O til total volum til 200 µl
2 µg pKWPax6(5a)	2 µg pGL3 -basic	0,2 µg pCH110	H ₂ O til total volum til 200 µl
2 µg pKWPax6(5a)	2 µg pGLmDKK3 promoter	0,2 µg pCH110	H ₂ O til total volum til 200 µl

Alle miksen ble tilsatt 24,8 µl 2M CaCl₂.

Transfeksjonsmiksen ble tilsatt dråpevis i 200 µl HBS (pH 7,08). 100 µl av miksen ble så tilsatt hver av tre merkede brønner og inkubert i CO₂(5 %) skap ved 37 °C over natta. Neste morgen ble transfeksjonsmiksen fjernet og erstattet med vanlig medium.

Cellene ble høstet etter 24 timer etter transfeksjonen. Cellene ble først vasket med 2x2ml PBS før det ble tilsatt 100 µl Tropix[®] lysesbuffer (Applied Biosystems) med 0,1 % DTT til hver brønn. Disse sto til svak risting i 5 minutter før det ble pipettert i eppendorfrør som ble sentrifugert (13 000rpm) i 1 min i en Biofuge pico (Heraeus Instruments). 20 µl av lysatene ble pipettert over i et 96 brønnersbrett (Thermo) for å bli analysert i Lumiscan-RT (Labsystems).

Buffer A og B ble tint mørkt. 15 µl buffer A og 60 µl buffer B tilsatt 0,1 % β-Galacton Plus[®] (TROPIX) ble brukt for hver brønn. Lysesbuffer ble brukt som kontroll/blank.

3.2.4 Western blott

Western Blot er en er en analytisk teknikk som brukes for å detektere spesifikke proteiner i celleekstrakter. Denne metoden tar utgangspunktet i prinsippene til gel elektroforese. De negativt ladede proteinene flytter seg i gelens nettverksstruktur mot positive elektroden. Molekylstørrelsen og ladningen til proteinene er de avgjørende separeringen.

Celler som ble høstet (se beskrivelsen i 3.3) ble sonikert 3 x 30 sekunder med i et ultralydbad (Bioruptor[®] UCD-200, Diagenode) også sentrifugert i 2 minutter ved 13000 rpm i en microsentrifuge.

Det ble brukt MagicMark[™] XP Western Protein Standard (Invitrogen) som leder.

Til polyakrylamidgelen ble det brukt glassplater med 1,5 med mer(BIO-RAD). Det ble laget en separerende gel som ble fylt opp mellom glasspaltene til kammeret var 3/4 fullt. På toppen av denne gelen ble det forsiktig til satt MilliQ vann for at gelen skulle få en jevn overfalte ved stivning. Etter 20 minutter var gelen polymerisert. Vannet over gelen ble helt ut. Og den konsentrerende gelen ble fylt opp til det var 2 med mer igjen til øvre kant av glassplaten. Kammen med 10 brønner ble satt mellom glassplatene, viktig at ingen bobler kom i gelen. Etter 20 minutter var konsentrerende gelen også ferdig polymerisert. Kammen ble tatt ut forsiktig og gelen ble overført til gelkjøringskammer(BIO-RAD). Kammeret ble fylt opp med 1xgelkjøringsbuffer, deretter ble 20 ul av proteinprøvene og 16 ul av MW markørene satt på gelen.

Gelen ble kjørt i 2 timer (eller til alle prøvene hadde beveget seg helt ned i gelen) på 120volt.

10 % Separerende gel:

2,6 ml Acrylamid Bis 40 %(Merck)

2,5 ml 1,5 M Trisbase

4,8 ml MilliQ vann

100 ul 10 % APS

10 ul TEMED(Promega)

3 % Konsentrerende gel:

250 ul Acrylamid Bis 40 %(Merck)
650 ul 0,5 M Trisbase
1,6 ml MilliQ vann
25 ul 10 % APS
2,5 ul TEMED(Promega)

Blotting av membran:

To svamper, fire filter og Hybondmembranen ble inkubert i blottebufferen i 15 minutter. Gelen ble tatt forsiktig av platene og satt i blottebufferen. Slik ble oppsettet til blottingen:

- svamp	
- to filterpapir	
- Hybondmembran	
- SDS-PAGE gel	
- To filterpapir	
- Svamp	
	<u>Blottebuffer:</u>
	1,88 g Tris(base)
	23,25 g Glycine
	150 ml Metanol
	Til 1000 ml dH ₂ O

Dette ble satt i blottekammer(BIO-RAD) som ble fylt opp med 1 liter blottebuffer. Blottingen ble kjørt i 1 time på 100 volt med magnet rør i bunnen.

Farging med antistoff:

Etter blokkingen ble membranen satt i en liten kar, vasket kort med dH₂O og tilsatt 10 ml 5 % blokkeringsbuffer. Røret ble satt til rotering i kjølerom(4 °C) over natt.

Neste dag ble blokkeringsbufferen fjernet, og membranen ble overført til et 50 ml rør. 4 ml ny 5 % blokkeringsbuffer og den aktuelle primær antistoff(se tabell) ble tilsatt. Røret ble satt til rotering i 1,5-2 timer. Deretter ble membranen vasket med 10 ml PBST i 5 min, noe som ble repetert 5 ganger i løpet av 30 minutter. Så ble 4 ml blokkeringsbuffer, anti biotin antistoff og sekundær antistoffet tilsatt i røret. Så fikk røret rotere i 1 time før den ble vasket med 10 ml PBST i 5 minutter per vask.

Membranen ble tørket forsiktig med papir. Så ble Western blott luminol reagens løsning A og B(Santa Cruz Biotechnology) blandet i eppendorfrør i forhold 1:1 og fordelt på

membranen. Dette fikk virke i 1 minutt, så ble den reagensløsningen fjernet og membran plassert i en plast lomme. Bilde ble tatt med Fujifilm LAS-3000 intelligent dark box.

Stripping av membran ble gjort med 20 ml 0,5 M NaOH i 5 minutter på vippebrett. Det ble skylt grundig med dH₂O. Membranen ble satt i 10 ml 5 % blokkingsbuffer i kjølerom over natt(-4 °C).

Neste dag ble Actin primær antistoff tilsatt og de samme prosedyre ble gjort slik som beskrevet tidligere ved merking med antistoff.

Tabell 3.2 Primære antistoffer og sekundære antistoffer i Western blot

Navn	Produsent	katalog nr.	Fortynning
Kanin α -Pax6 C-terminal antigen	Milipore	AB2237	1:1200
Geit - anti kanin HRP, Konjugert med horseradish peroxidase	BD Pharmigen	554021	1:2000
Anti - biotin HRP, Konjugert med horseradish peroxidase	Cell signaling	7075	1:2000
Rabbit-Anti-actin	Sigma	A2066	

3.2.5 Preparering av cDNA for RT-PCR

cDNA ble laget ved hjelp av superscript III Revers Transkriptase (Invitrogen).

RNA ble plassert på is, så ble det tilsatt i et eppendorfrør:

X ul RNA(1 μ g)

2 ul random hexamer primer (pdN₆), (0.25 ug/ul)

2 ul dNTP mix (10 mM)

Y ul Nukleasefritt H₂O (til 26 ul)

Røret ble plassert på varmeblokk i 5 minutter, deretter med engang på is i minst 1 minutt for så å bli spinnert ned noen sekunder. Det ble så tilsatt:

- 8 ul 5xFirst-Strand buffer
- 2 ul 0.1M DTT
- 2 ul RNAsin
- 2 ul Superscript III RT (200 units/ul)

Dette ble så plassert i PCR maskinen på program cDNA (25 °C i 5 min, 50 °C i 45 min, tilslutt 70 °C i 15 min). cDNA blir deretter satt på is fortynna med 80 ul nuclease fritt vann, spunnet ned i bordsentrifuge og lagret ved -20 °C.

3.2.6 Kvantitativ PCR (qPCR)

For hvert primersett ble det laget en mastermix for å gjøre det enklere og feilfritt.

Mastermix for qPCR reaksjonen:

- 12,5 ul Sybrgreen mastermix
- 0,5 ul FW-primer(10µM)
- 0,5 ul REV-primer(10µM)
- 9,5 ul RNase-fritt vann(til 23 ul)

23 ul mastermix ble over til qPCR rørene og tilsatt 2 ul cDNA. For hvert prøve ble det kjørt 2 paralleller(skall ikke avvike mer enn 0,5 Ct-verdi). For hvert primersett ble det også kjørt 2 kontroller. En kontroll uten revers transkriptase enzym(No RT) ble tatt med som kontroll på evt. nærvær av genomisk DNA. Også en kontroll uten templat (NTC)altså kun vann ble også tatt med.

Tilslutt ble alle prøvene sentrifugert raskt, og det ble sørget for ingen bobler. Prøvene ble satt i maskinen med disse innstillingene:

- Denaturering ved 95 °C
- 48 sykluser med:
 - Denaturering ved 95 °C i 30 sekunder
 - Binding av primer til templat ved 60 °C i 1 minutt

- Syntese av DNA ved 72 °C i 30 sekunder
- Smeltekurve
- Denaturering ved 94 °C i 1 minutter
- 55 °C i 30 sekunder
- Temperatur økning til 95 °C i 30 sekunder.

Resultatene ble analysert med MxPro-Mx3000P v3.20 Build 340, Schema 74© 2006 Stratagen.

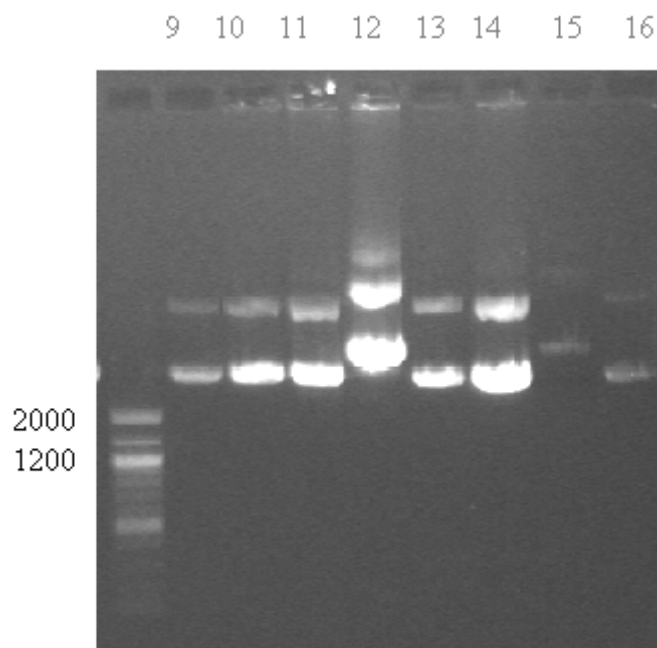
4. Resultater

Resultatene i oppgaven er i delt i 4 avsnitt. Først ble det forsøkt å klonere sebrafisk cDNA i pCR2.1-TOPO[®] for å lage probe for *in situ*. I neste avsnitt ble DKK3 promoteren fra mus og menneske forsøkt klonet i reporter-gen vektor og ko-transfektet denne sammen med plasmider som koder for Pax6 og Pax6(5a) for å se om disse kan aktivere DKK3 promoteren. I tredje avsnitt ble transfeksjoner med Pax6 og Pax6(5a) plasmider og siRNA-er mot Pax6 utført. Hensikten var å undersøke om disse påvirker det endogene nivået av DKK3 på RNA- og protein nivå i løpet av en begrenset tidsrom.

4.1 PCR av sebrafisk cDNA for sebrafisk DKK3 primere

De første observasjonene av DKK3 som mulig målgen for Pax6 er gjort i cellekulturer. Siden det er av interesse å se om dette i en levende organisme ville vi se på DKK3 gen - uttrykket i sebrafisk, og om det ble endret i nærvær eller fravær av Pax6.

For å kunne lage probe for *in situ* i sebrafisk embryo må vi klonere sebrafisk cDNA inn i pCR2.1-TOPO[®] vektor. cDNA fra voksen sebrafisk og cDNA fra embryo (9-16 hpf) ble brukt som templat i PCR reaksjonen der primersett zDKK3cDNA. FW og zDKK3cDNA. REV (se tabell.1) var forventet å gi et produkt på 1100 bp. Der cDNA fra voksen sebrafisk ble brukt som templat, ble to bånd: ca (1)1600 og (2)1000 bp observert. Sebrafisk cDNA fra embryo (9-16 hpf) ga ingen produkt. Det ble ikke tatt bilde av gelen siden begge båndene fra cDNA fra voksen Sebrafisk ble kuttet ut av gelen og renses vha QIAquick gel extraction kit. Fragment 1 og 2 ble klonet inn i pCR2.1-TOPO[®] vektor og transformert inn i kompetente DH5 α celler (*E.coli*). bakteriesuspensjonene ble spredt på agarplate Neste dag ble kolonier plukket, og inkubert over natt i LB-medium. DNA plasmid fra prøvene ble og kjørt på agarosegel, se figur 4.1



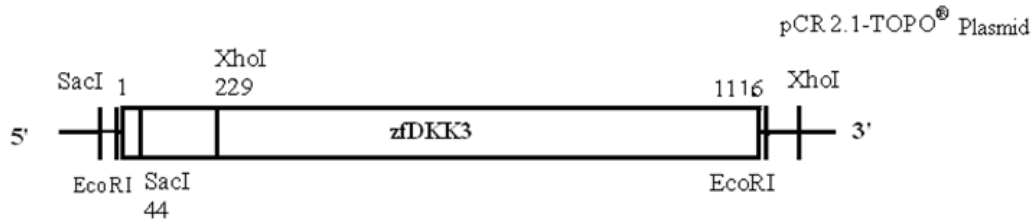
Figur 4.1 Kjøring av DNA miniprep prøvene på agarosegel for å bekrefte insert av sebrafisk DKK3 kodende region i pCR2.1-TOPO[®] vektor. Ukuttet plasmid ble kjørt på 0,7 % agarosegelen. Prøve nr. 12 og 15 ser ut til å ha en insert siden de beveger seg saktest i gelen.

Ladder nr. 3 (se materialer delen, under laddere) ble brukt her.

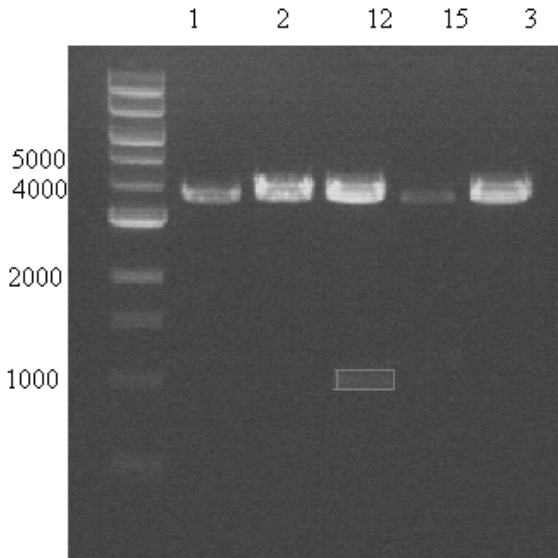
Prøve nr 12 og 15 ble videre kontrollkuttet med restriksjonsenzymmer for å avgjøre om inserten i vektoren har størrelse og riktig retning. EcoRI kuttsete er 4 bp utenfor det klonede PCR produktet på begge sider av fragmentet (fig. 4.2 A) og vil derfor vise hele lengden av det klonede PCR fragmentet. Dersom dette er klonet i riktig vei vil kontroll kutting med enzymet SacI gi en liten fragment på ca. 44 bp og en på ca 4000 bp (se figur 4.2 A). Men om den er klonet i feil retning i vektoren vil det være et fragment på 1072 bp og en på ca. 3000 bp.

Resultatet av kuttingen er vist i figur 4.2 B. og 4.2 C. og bekrefter at prøve nr 12 har et insert av rett størrelse, og at det ser ut til å stå rett vei i vektoren. Prøven ble sendt til sekvensering, men det var vanskelig å få en god sekvens og da vi omsider fikk en brukbar sekvens viste det seg at det ikke var sebrafisk DKK3 cDNA'et som var klonet. Dermed ble ikke denne delen av prosjektet fullført.

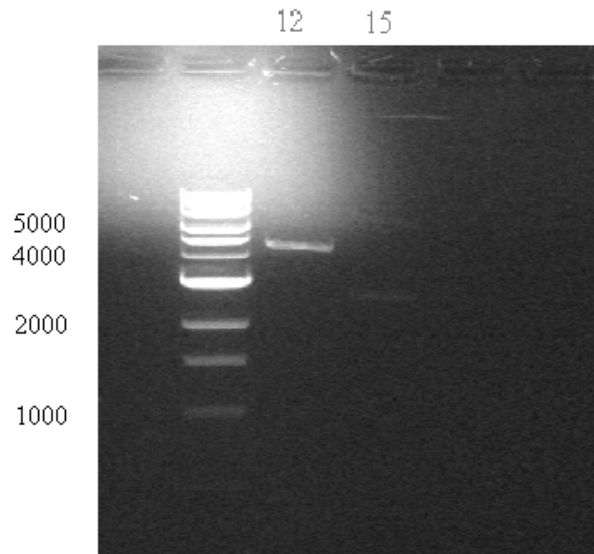
A.



B.



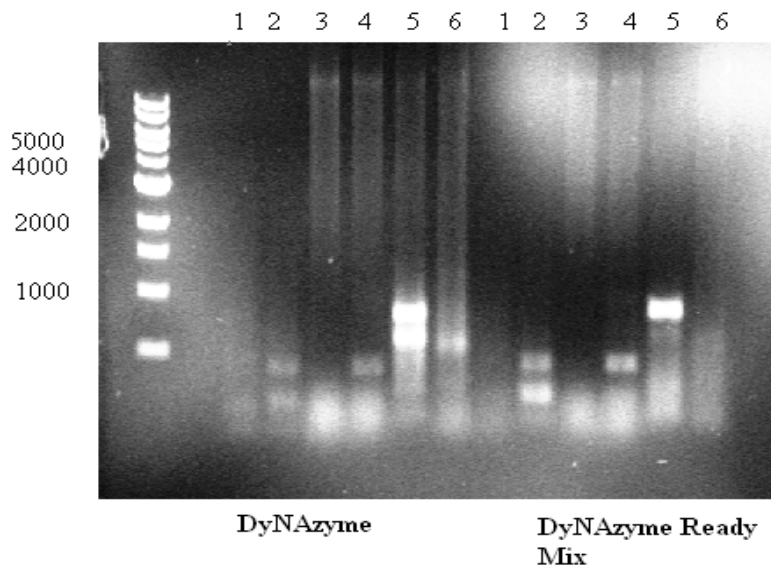
C.



Figur 4.2 kontrollkutting med restriksjonsenzymet EcoRI for bekrefte kloning av zfDKK3 kodende sekvensen i pCR2.1-TOPO vektoren. A. skjematisk fremstilling av zfDKK3 kodende sekvensen inn i pCR2.1-TOPO[®] vektor der PCR fragmentet er rektangelboksen og streken er plasmidet. Kuttsetene til restriksjonsenzymet EcoRI, SacI og XhoI er også vist. **B.** Prøve nr. 12 og 15 har et bånd på 1000 basepar som er ca samme størrelse som promotersekvensen. Det er lagt en figurboks til fragmentet i bildet siden den synes så dårlig på bildene. **C.** Prøve nr 12 og 15 ble kontrollkuttet med restriksjonsenzymet SacI for å bekrefte riktig retning på sekvensen i pCR2.1-TOPO[®] vektor.

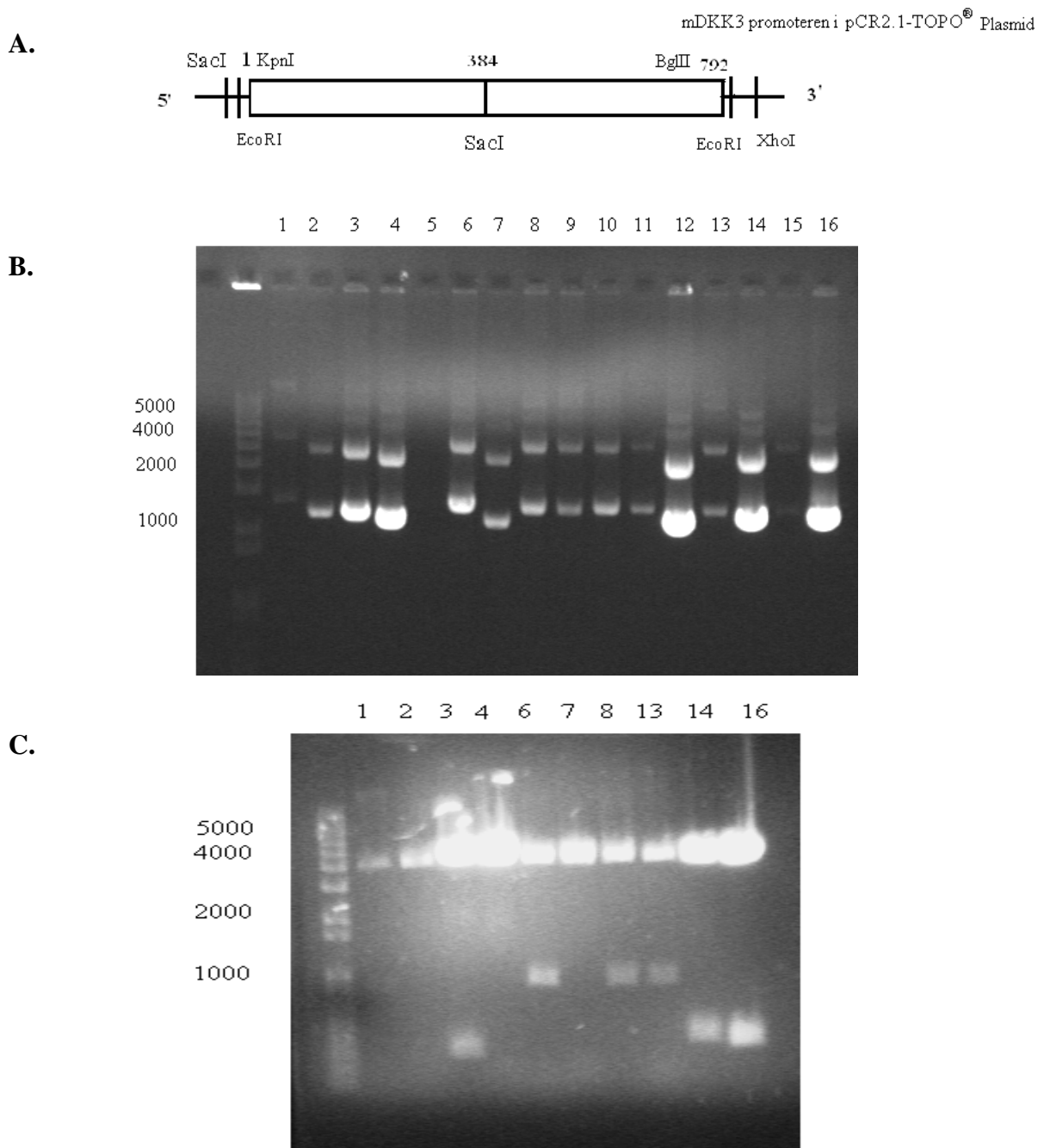
4.2 PCR av mDKK3 og hDKK3 promoter

For å kunne klonere DKK3 promoteren fra mus og menneske i pCR2.1-TOPO[®] vektor blir det først utført PCR reaksjon. Det ble brukt forskjellig primersett for sjekke om det var mulig å oppnå ønsket produkt med disse. De forventede størrelsene til PCR produktene for promoter kloningen er, for DKK3 promoter fra menneske 1700 og 724 bp og for DKK3 promoteren fra mus 1678 bp og 792. PCR produktene ble kjørt på agarosegel og resultatet som vist i figur 4.3. Primerkombinasjon MID.FW + NEW.REV ga et ca. 800 bp fragment som passet i størrelse med det som var forventet (792 bp). Prøverør nr. 5 inneholder mDKK3 promoter som har rett størrelse. Prøve nr. 5 fra DyNAzyme Ready Mix ble gått videre med for kloning i pCR2.1-TOPO[®] vektoren.



Figur 4.3 PCR produktene ble kjørt på agarosegel for å visualisere basepar størrelse. Forventet rett størrelse for mDKK3 er av 792 bp. Prøve i brønn nr.5 har riktig størrelse. Følgende primere kombinasjoner ble utprøvd i kombinasjon med DyNAzyme Ready Mix og vanlig DyNAzyme i samme rekkefølge som på agarosegelen: hDKK3 prom MID + hDKK3 prom REV, hDKK3 prom FW + hDKK3 prom REV, hDKK3 prom MID + hDKK3 prom REV, hDKK3 prom FW + hDKK3 prom REV. mDKK3 prom MID + mDKK3 prom REV mDKK3 prom FW + mDKK3 prom REV
Ledder nr. 4 ble benyttet i dette forsøket (se materiale delen for ladder).

Videre ble mDKK3 promoterfragmentet klonet i pCR2.1-TOPO[®] vektor og transformert inn i kompetente DH5a celler (*E.coli*). Bakteriesuspensjonene ble spredt på en agarplate med ampicillin seleksjon. Neste dag ble kolonier plukket og inkubert i over natt i LB medium. DNA plasmid fra prøvene ble isolert og kjørt på agarosegel (se figur 4.4 A). Deretter ble de som så ut til å ha en insert kontrollkuttet med restriksjonsenzymet EcoRI (se figur 4.4 B) for å bekrefte kloning av og se på størrelsen til DNA fragmentene i pCR2.1-TOPO[®] vektoren.

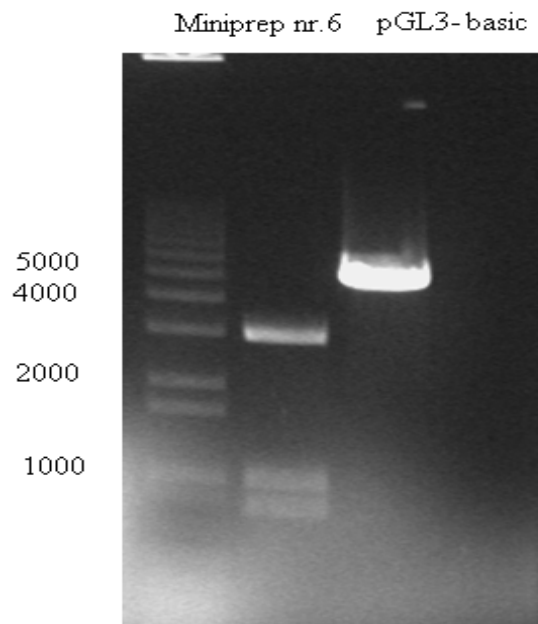


Figur 4.4 A. Skjematisk fremstilling av DKK3 promoteren i pCR2.1-TOPO® vektor der promoter fragmentet er rektangelboksen og streken er plasmidet. Kuttsetene til restriksjonsenzymet EcoRI, SacI og XhoI er også vist. **B.** mDKK3 promoterfragmentet ble klonet i pCR2.1-TOPO® vektor og transformert inn i kompetente DH5α celler (*E.coli*). Miniprep prøvene ble kjørt på agarosegel og ut ifra vandring i gelen ser det ut til at flere (Prøve nr.1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 13, 14, og 16) av plasmidene har insert i vektoren. **C.** Kontrollkutt med restriksjonsenzym for å se på størrelsen til de klonede DNA fragmentene i pCR2.1-TOPO® vektoren. Promoterfragmentet som har størrelse på 792 bp blir kuttet ut av vektoren ved hjelp av EcoRI kutter på ca.4 bp på hver side av promoterfragmentet (fig. 4.2 A). Prøve nr. 6 valgt til å gå videre med siden den har riktig størrelse på insertet. Ladder nr.2 ble benyttet i gel elektroforesen.

Miniprep nr. 6 har et insert av korrekt størrelse, så denne DNA-prepen blir sekvensert (se appendiks 2). Sekvensen bekrefter at det er mus DKK3 promoteren som er klonet i pCR2.1-TOPO[®] vektoren. Prøve nr. 6 ble derfor benyttet i neste steg der mDKK3 promoteren blir kuttet ut av pCR2.1-TOPO[®] vektoren og klonet i pGL3-basic vektoren. Denne vektoren brukes som reporter-gen vektor siden den har luciferase aktivitet, og skal brukes til transfeksjon av HeLa celler.

Promoterfragmentet fra mDKK3 ble kuttet ut av pCR2.1-TOPO[®] vektor med restriksjons enzymene KpnI og BglII. Disse setene vises ikke på kartet til mDKK3 promoteren, men ble puttet inn i PCR primerne da disse ble lagd for å klonere denne sekvensen. pGL3-basic vektoren ble linearisert med de samme enzymene. DNA fragmentene ble kjørt på 0,7 % agarosegel (se figur 4.5). Forventet størrelse på promoterfragmentet er på 792 bp. Den forventede størrelsen på pGL3-basic som blir linearisert med KpnI og BglII er 4818 bp.

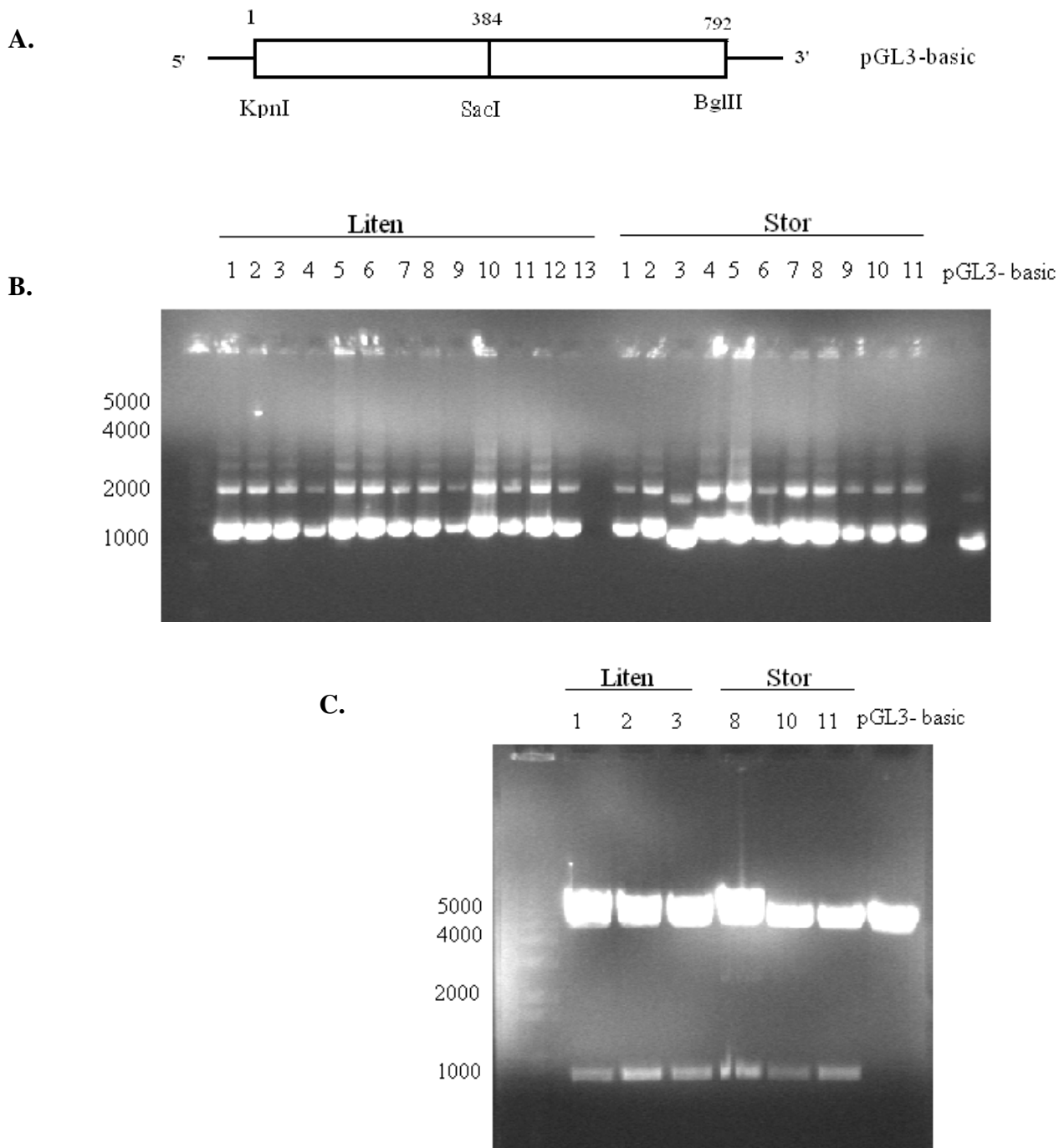
På denne gelen (se figur 4.5) ble det observert 2 bånd med ganske lik størrelse. Derfor ble det bestemt at begge disse båndene skulle kuttes ut og klones i pGL3-basic vektoren. DNA fragmentet med minst størrelse blir kalt L og det største båndet S.



Figur 4.5 Promoterfragmentene ble kuttet ut av pCR2.1-TOPO[®] vektor med restriksjons enzymene KpnI og BglII. Forventet størrelse på promoterfragmentet er på 792 bp. For pGL3-basic som blir linearisert med KpnI og BglII er den forventede størrelsen på 4818 bp og den vises også i det området. Ladder nr. 2 ble benyttet

DNA fragmentene ble kuttet ut av gelen og rensset med ved hjelp av QIAquick Gel Extraction Kit. De rensede promoterfragmentene og pGL3-basic vektoren ble ligert og transformert inn i kompetente DH5 α celler (*E.coli*). Agarplater med ampicillin seleksjon ble brukt til å spre bakteriesuspensjonene på. Kolonier fra begge platene ble plukket og inkubert over natt i LB medium tilsatt ampicillin. DNA plasmid fra prøvene ble isolert vha QIAprep[®] Miniprep og kjørt på agarosegel (se figur 4.6 B).

De fleste koloniene fra begge platene inneholdt plasmid med insert (figur 4.6 B). KpnI og BglII ble derfor brukt for å kutte ut og se på størrelsen for tre minipreper fra begge agarplatene. Overraskende nok viste det seg at fragmentene som var klonet på S og L platen hadde samme størrelse (figur 4.6 C). Vi valgte derfor å gå videre med miniprep nr. 2 fra plate L og denne ble verifisert ved sekvensering og brukt både til transfeksjon og delesjonsanalyser.

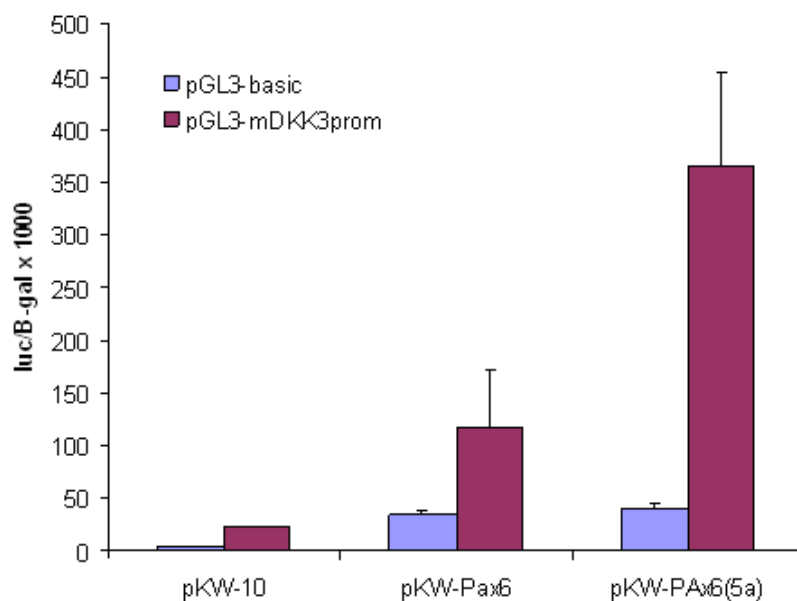


Figur 4.6 **A.** Bildet viser en skjematisk fremstilling av mDKK3 promoteren i pGL3-basic vektoren, der rektangelet er promoterfragmentet og streken er plasmidet. Kuttsetene til KpnI, SacI og BglII er også vist. **B.** viser basepar størrelse for promoterfragmentet i pGL3-basic vektoren. Brønn nr.1-13 viser miniprep fra plate L(liten) og 1- 11 er fra plate S(stor). Siste brønn viser kun pGL3-basic vektoren uten insert. Bilde viser at de fleste av prøvene har insert. **C.** kontroll kutting med restriksjons enzymene KpnI og BglII, for å bekrefte at inserten har riktig størrelse. Forventet størrelse er på 792 bp for promoter fragmentet og 4818 for pGL3-basic plasmidet. Ladder nr. 2 ble benyttet.

4.3 Transiente transfeksjoner og reporter gen assay

For å undersøke om Pax6 påvirker uttrykket/ aktiviteten til musDKK3 promoteren ble det utført reporter gen assay. Hela celler ble transfektert med pKW10, pKW-Pax6 og pKW-Pax6(5a) plasmider sammen med pGL3-mDKK3 eller tom vektor pGL3-basic med luciferase aktivitet. Etter et døgn ble cellene høstet og luciferase aktiviteten målt. Mengden på luciferase protein er et mål på hvor effektiv Pax6 og Pax6(5a) proteinet var i transkripsjonsaktiveringen. Som det går fram i figur 4.7 ser vi økning i transkripsjonsaktiviteten til mDKK3 promoteren i cellene som ble transfektert med pKW-Pax6 og pKW-Pax6(5a) plasmider, sammenlignet med aktiviteten i de cellene som ble transfektert med tom vektor (pKW10).

Pax6(5a) isoformen ser ut til å øke uttrykket 3 ganger mer enn Pax6 gjør.



HeLa cells transfected with the mouse DKK3 promoter (24/11-10)

Figur 4.7 Reporter gen assay viser økt transkripsjonsaktivitet til mDKK3 promoteren mediert av Pax6 og Pax6(5a) uttrykk. I Hela celler ble 0,5µg pGL3-basic eller pGL3-mDKK3 promoter co-transfektet med 0,5µg pKW10, pKW-Pax6, eller pKW-Pax6(5a) per brønn i 6-brønners Brett. Tre brønner ble brukt per transfeksjon. Cellene ble høstet etter 36 timer etter transfeksjon og luciferase aktiviteten ble målt og normalisert mot β-gal.

Både Pax6 og Pax6(5a) ser ut til å øke uttrykket for mus DKK3 promoteren. Videre var det interessant å undersøke om reporter gen assay ville vise en dose–respons sammenheng mellom Pax6 og Pax6(5a) aktiviteten i pGL3-mDKK3 promotor. Dermed ble transfeksjoner med konstant mengde pGL3-mDKK3 promotoren plasmid og økende mengde ekspresjonsvektor for Pax6 og Pax6(5a) gjennomført. Tom vektor, pKW10, ble brukt som kontroll. Forsøket ble gjentatt 3 ganger og transkripsjonene viste at det er en viss sammenheng mellom mengde Pax6 og Pax6(5a) brukt i transfeksjonene og tilsvarende økt uttrykk av mDKK3.

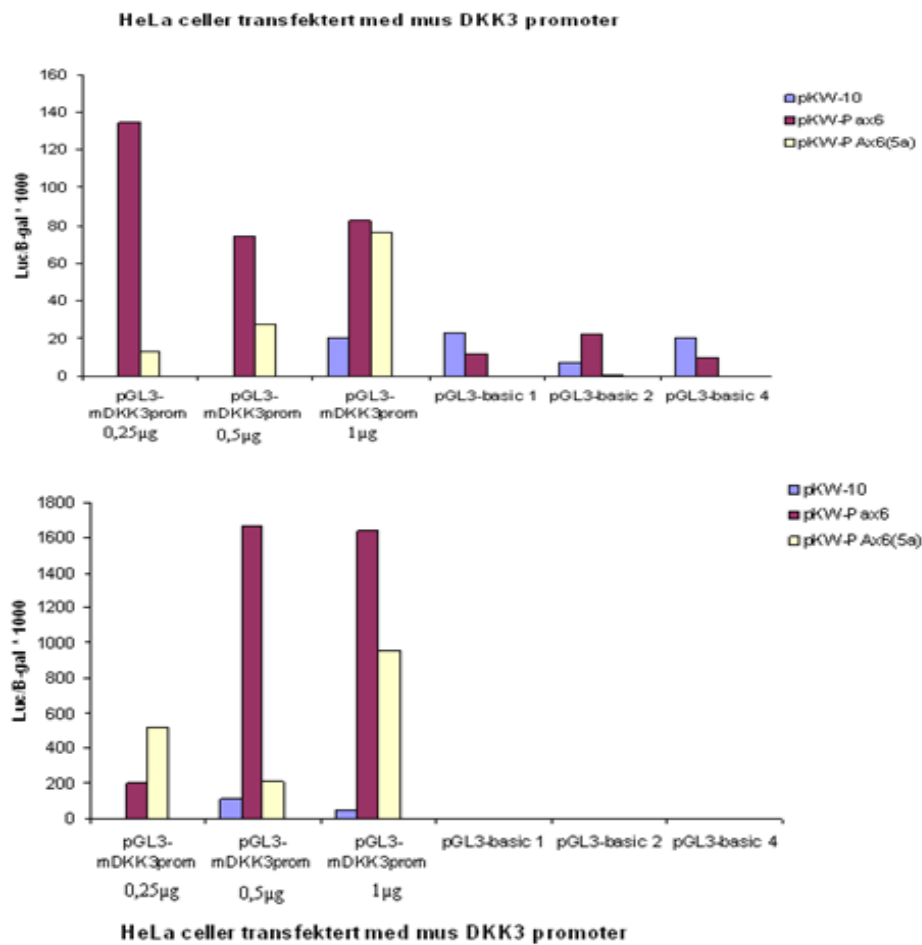
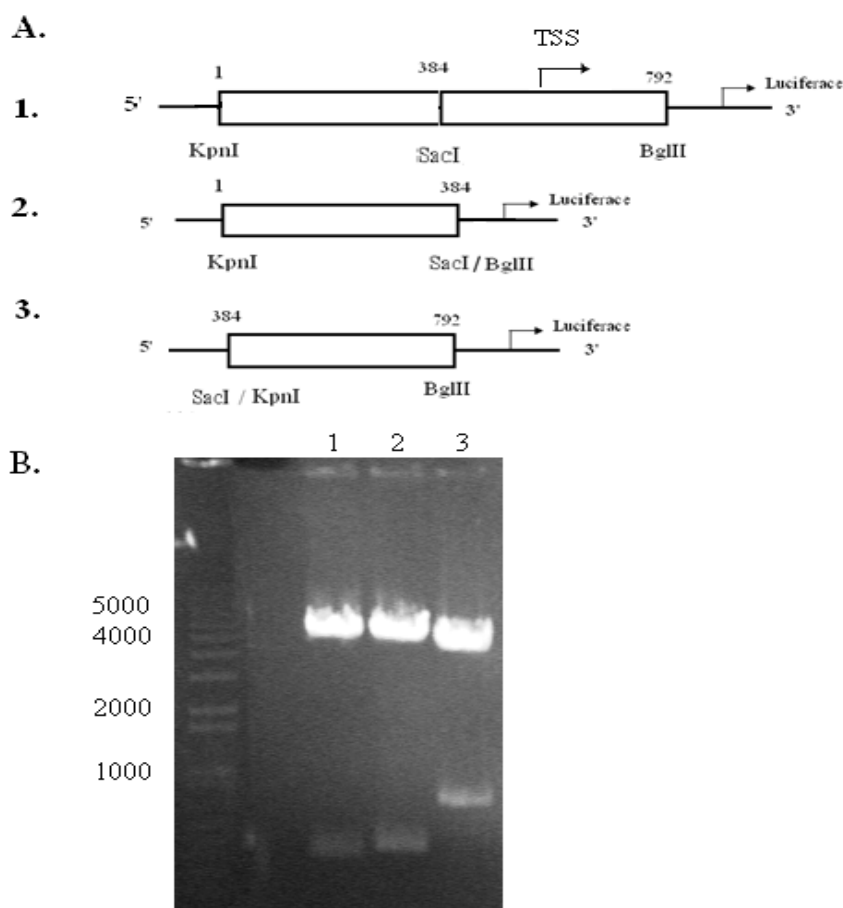


Figure 4.8 Reporter gen assay viser i 2 av 3 forsøk at det er en sammenheng mellom mengden Pax6 og Pax6(5a) som cellene ble transfektert med og økende nivået på promotor aktivering. I HeLa celler ble 0,5µg pGL3-basic eller pGL3-mDKK3 promotor ko–transfekttert med økende konsentrasjoner (0,25µg, 0,5µg, og 1µg) pKW10, pKW-Pax6, eller pKW-Pax6(5a) per brønn i 6–brønners Brett. Tre brønner ble brukt per transfeksjon. Cellene ble høstet etter 36 timer etter transfeksjon og luciferase aktiviteten ble målt og normalisert mot β–gal.

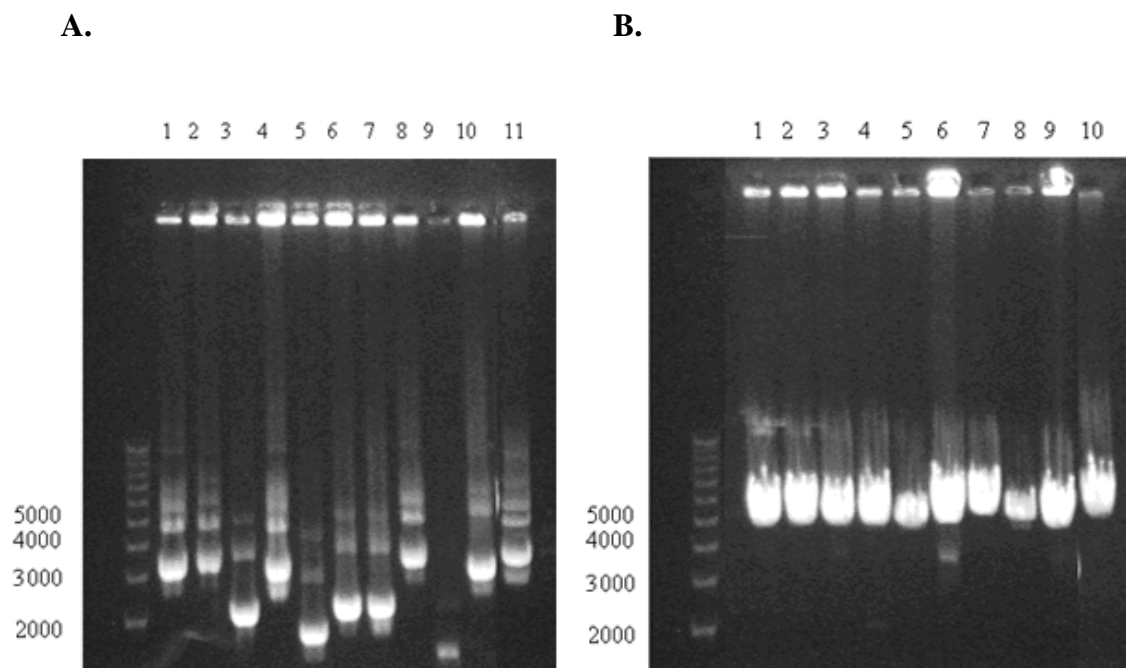
4.4 Delesjonsanalyser av mDKK3 promoteren

Siden Pax6 og Pax6(5a) ser ut til å aktivere mDKK3 promoteren ble det gjort delesjonsanalyser for å se om området Pax6 binder til kan mappes. Siden SacI kutter midt i mDKK3 promoteren og ikke i plasmid vektoren kan det gjøres kutting på pGL3 mDKK3 promoteren (se figur 4.10 A 1.) med KpnI og SacI (se figur 4.10 A 2.) og en kutting med SacI/ og BglII (se figur 4.10 A 3) for å lage konstruksjoner der halvparten av promoteren er delert. Prøvene ble kjørt på agarosegel (se figur 4.10B), og det største båndet til prøve 1 og 2 ble kuttet ut og rensset. Deretter liggeres endene slik at vi får de ønskede plasmidene med forkortede/kuttete promoterfragmenter.



Figur 4.9 A. Skjematisk fremstilling av det ukuttete mDKK3 promoter fragmentet i pGL3-basic vektoren(1) og mDKK3 promoter fragmentene som ble deletert fra 3' enden (2) og den som ble deletert fra 5' enden (3). **B.** I brønn 1 og 2 ser vi pGL3 mDKK3 promoter Δ 3 og pGL3 mDKK3 promoter Δ 5, de øverste båndene ble kuttet ut og rensset før ligering. I brønn tre er pGL3 mDKK3 promoter som er kuttet med KpnI og BglII for å kontrollere om det var en vellykket kutting. Ladder nr 2. ble brukt her.

Etter at de lineariserte plasmidene ble ligert sammen, ble de transformert i kompetente DH5 α (*E.coli*) celler og spredt på en agarplate med ampicillin seleksjon. Neste dag ble kolonier plukket, og inkubert i LB medium over natten. DNA plasmid fra prøvene ble isolert og prøvene for konstruksjon $\Delta 3$ ble linearisert med KpnI og prøvene for konstruksjon $\Delta 5$ ble linearisert med BglII og kjørt på agarosegel (se figur 4.10). Forventet størrelse på fragmentene er 5226 bp. Resultatene viser at trunkering av promoterfragmentet har fungert for nesten alle prøvene for pGL3 mDKK3 promoter $\Delta 5$, prøve nr. 7 ble valgt til å gå videre med for midiprep for transfeksjon. For pGL3 mDKK3 promoter $\Delta 3$ ble det valgt å gå videre med prøve nr. 5. Prøvene ble sendt til sekvensering, men det var ikke mulig å få gode sekvenser. I utgangspunktet var det meningen at disse konstruksjonene skulle brukes i Transiente transfeksjoner og reporter gen assay. Det ble gjort et forsøk uten noen resultat, og det ble dessverre ikke tid til å gjenta transfeksjon flere ganger.



Figur 4.10 A. De første 10 brønnene viser prøver fra plate 1 med plasmider som har pGL3 mDKK3 promoter $\Delta 5$ i kolonne 11 er det kontrollkutting av pGL3-mDKK3 promoteren med BglII. **B.** De første 9 brønnene viser prøver fra plate 2 som har plasmider pGL3 mDKK3 promoter $\Delta 3$ i, prøven siste brønnene inneholder kontrollkutting av pGL3-mDKK3 promoteren med KpnI. Ladder nr 2. ble brukt her.

4.5 Transfeksjon og uttrykk av Pax6 og Pax6(5a) plasmider om siRNA

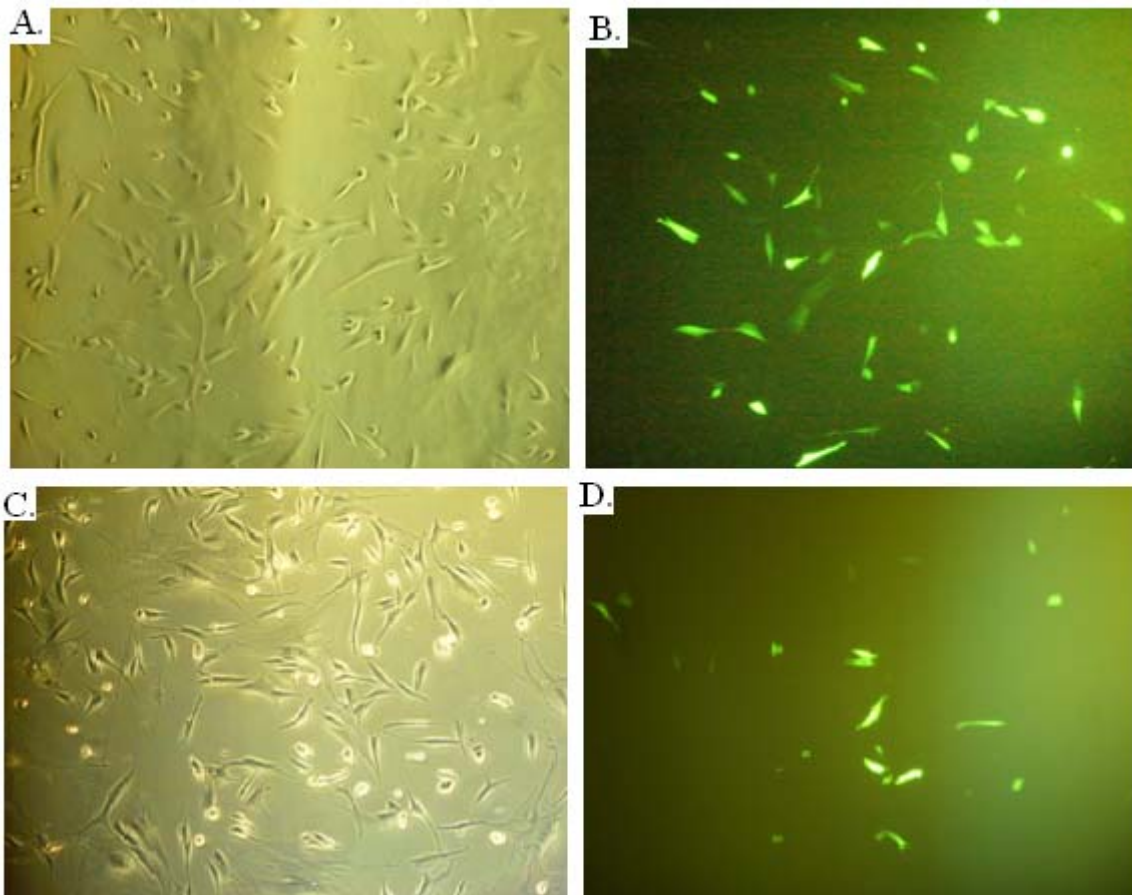
Innledende qPCR bekreftet funnene i genekspressjons microarray, og viste at både 3T3-Pax6 og Pax6(5a) cellelinjene hadde mer DKK3 RNA enn den opprinnelige cellelinjen (Flpln3T3). Dette er cellelinjer med stabilt uttrykk av Pax6 og Pax6(5a) over tid.

For å teste om transient uttrykk av Pax6 og Pax6(5a) vil føre til økning av DKK3 uttrykket i Flpln3T3 cellene så ble disse cellene transfektert med pKW10, pKWPax6 og pKWPax6(5a). Protein og RNA ble høstet etter 36 timer. Western blot viser at Pax6 og Pax6(5a) uttrykket er veldig sterkt i disse cellene (se figur 4.11).

RNA ble rensset og brukt til å lage cDNA og resultatet fra qPCR viste varierende resultater (se tabell 1 og 2) og diskuteres i et senere avsnitt.

Fordi det tilsynelatende var stor forskjell mellom effekten av transfeksjon på protein nivå (uttrykk av Pax6 og Pax6(5a)), og det vi forventet å se på RNA nivå (endret mengde DKK3) så vi på transfeksjonseffektiviteten i Flpln-3T3 cellen. Dette ble gjort ved å inkludere plasmider for grønt fluoriserende protein (GFP) i en av transfeksjonene. Ut ifra bildene (de som ikke er vist også) viste resultatene at transfeksjonseffektiviteten var på ca 15-20 % for de cellene som ble transfektert med 3 µl LipofectaminTM 2000 (Invitrogen) og dette kan forklare hvorfor det er så stor forskjell mellom effekten av transfeksjon på protein nivå enn på RNA nivået.

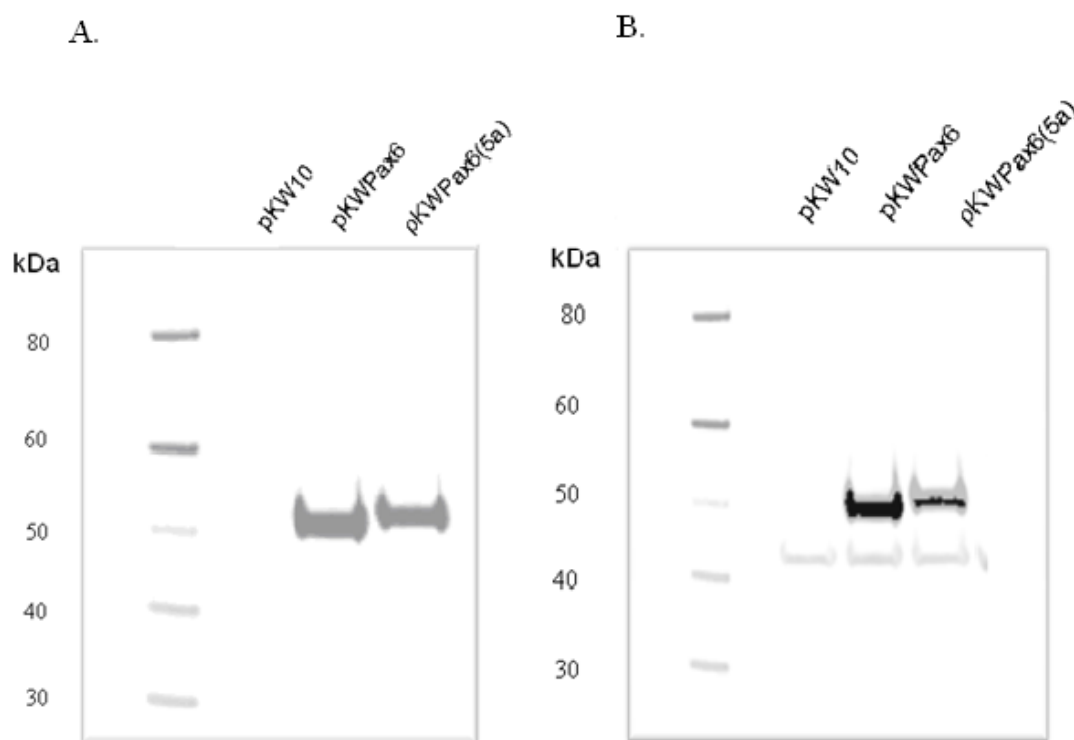
4.5.1 Bilder fra transfeksjon med plasmider som koder for pKW 10, pKW Pax6 og pKW Pax6(5a) i 3T3K-celler for å kontrollere transfeksjonseffektiviteten.



Figur 4.11 Bildene viser A. 3T3K med GFP 3 µl Lipofectamin, BF, B. 3T3K med GFP 3 µl Lipofectamin, FL, C. 3T3K med GFP 1,5 µl Lipofectamin BF, D. 3T3K med GFP 1,5 µl LP, FL. Ut ifra bildene som ble tatt av de cellene som ble transfektert med GFP som koder for grønt fluoriserende protein, kan vi måle transfeksjonseffektiviteten. Etter 24 timers inkubering ble celle observert i mikroskopet enten med bright field, (BF) eller med Fluoriserende lys, (FL). Forskjellige områder i brønnene ble observert og flere bilder ble tatt. Her har vi valgt å ta med 2 bilder av forskjellige områder i 2 brønner med. Det ble til sammen tatt 4 bilder fra forskjellige områder for å beregne transfeksjonseffektiviteten. I den ene ble det brukt 1,5 µl LipofectaminTM 2000 (Invitrogen), mens i den andre er det brukt 3 µl. I de cellene som ble transfektert med 3 µl LipofectaminTM 2000 (Invitrogen), er transfeksjonseffektiviteten på ca. 15-20 %, mens den er på mindre enn 10 % på de med 1,5 µl LipofectaminTM 2000 (Invitrogen).

4.5.2 Western Blott

For å undersøke om transfeksjon av Pax6, og Pax6(5a) ekspresjons plasmid i FIpIn-3T3-Kontroll cellene var vellykket ble Western Blott gjennomført. Ved å lage en separerende polyakrylamid gel ble proteinene separert etter lengden på polypeptid kjedene. For å finne de spesifikke proteinene som ble uttrykket for Pax6 og Pax6(5a) ble primærantistoffer som gjenkjenner disse og sekundærantistoffer konjugert med HRP anvendt på nitrocellulosemembranen. For å kontrollere at likt mengde protein fra prøvene hadde ble membranen strippet og inkubert med antistoff mot actin. Det ble observert 2 sterke bånd ved 50 kDa. For Pax6 antistoffet, der båndet i Pax6(5a) prøven som forventet var litt tyngre enn båndet til i Pax6 prøven (figur 4.11A). Ingen Pax6 protein detekteres i kontrollen transfektert med tom vektor. Bruk av actin antistoff gir et bånd med på 43 kDa og bekrefter at lik mengde protein-ekstrakt satt på for alle prøvene.



Figur 4.12 Western Blott analyse av Pax6, og Pax6(5a) plasmid i FIpIn-3T3-Kontroll celler. **A.** Her ser vi uttrykket av Pax6 og Pax6(5a) veldig sterkt på bildet mens det ikke er noe uttrykk for kontrollen pKW10. **B.** viser actin uttrykket i cellene som ble brukt. Dette indikerer at det ble satt like mye proteiner fra hver prøve på gelen. Pax6 antistoffet ble ikke fullstendig strippet fra membranen og man observerer derfor bånd på ca. 50 kDa.

- siRNA transfeksjon

3T3-Pax6 og 3T3-Pax6(5a) cellene ble transfektert med mPax6 siRNA for å slå ut Pax uttrykket. I tillegg ble uspesifikt scr siRNA brukt som kontroll og Fluorocent oligo ble brukt som markør på transfeksjonseffektiviteten. Da cellene ble undersøkt under mikroskopet etter transfeksjonen, ble det konstatert at transfeksjonseffektiviteten var ca. 20-25 %. RNA og proteiner ble høstet ble da høstet for qPCR og WB.

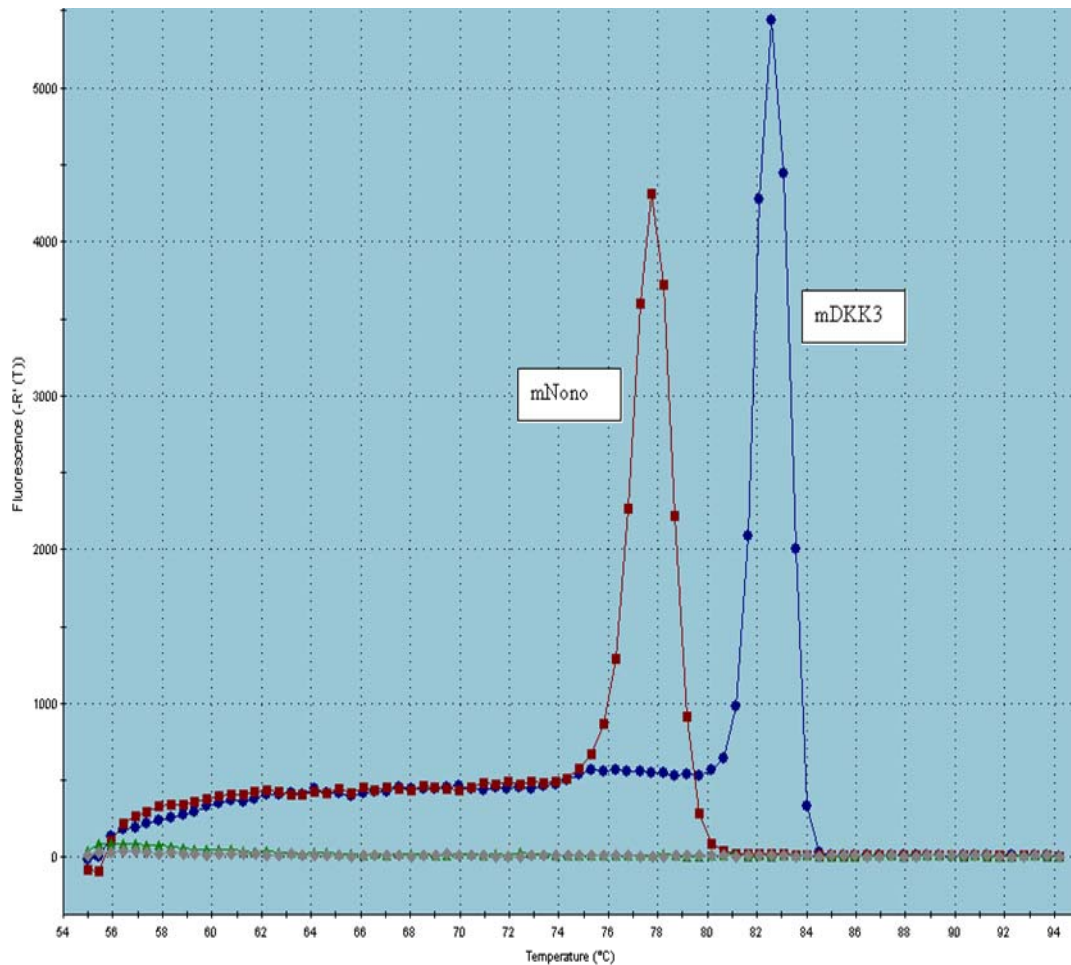
Det ble gjennomført WB med proteinene, men det ble ikke observert noen tydelige forskjeller i mengden Pax6 proten på membranen. En grunn til at det ikke var noen forskjell kan skyldes den dårlige transfeksjonseffektiviteten og derfor kan vi ikke observere noen forskjell på protein nivå. Derfor ble det bestemt at det ikke skulle gjøres analyser på RNA-nivå for de Pax6 siRNA transfekterte cellene.

4.5.3 Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Kvantitativ eller real time polymerase chain reaction (qPCR) er en metode basert på de generelle PCR prinsippene. En stor forskjell er at denne metoden amplifiserer og kvantifiserer mengden DNA mens reaksjonen pågår (in real time) i stedet for at det gjøres helt til slutt. Mengden/kvantiteten kan enten måles som en absolutt tall av antall kopier eller en relativ mengde når det normaliseres mot en normaliserende gen.

I figur 4.13 og 4.14 vises det eksempler på en smeltekurve og en amplifikasjon kurve. Dissosiasjonen av SYBR Green fra DNA trådene ved oppvarming vil forårsake sterk reduksjon av fluoresensen. Det er viktig å utføre smelte kurve analyser for å kontrollere spesifisiteten til PCR reaksjonen.

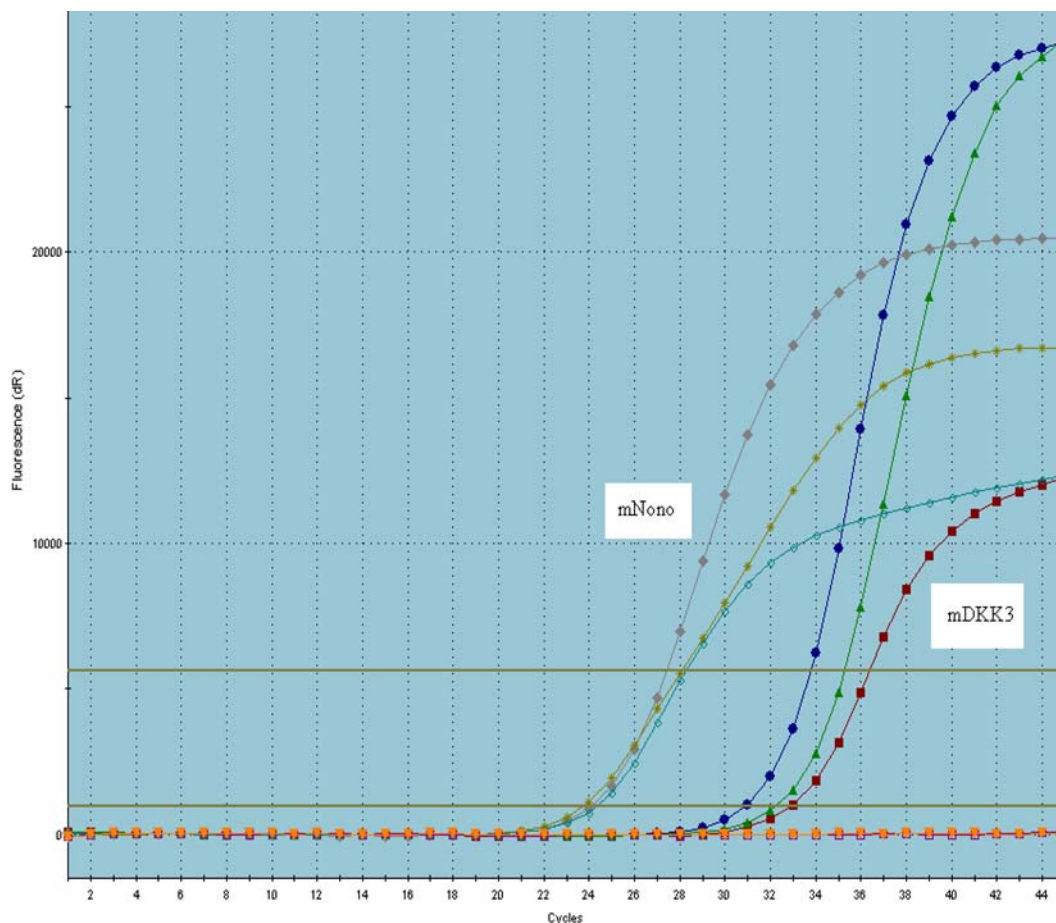
Det gjøres ved å se på PCR produktenes homogenitet og kontrollere at det ikke finnes Primer dimere (biprodukter) som gir unøyaktighet i målingene. Det finnes to måter å detektere/gjenkjenne produktene i qPCR. I denne oppgaven bruker vi fluoriserende farge (SYBR[®] Green, QIAGEN) som binder til dobbelt trådig DNA. Dette fører til fluorescens. Når mengden av DNA som blir amplifisert øker vil intensiteten til fluorescensen øke. Dette registreres for hver syklus, og tillater oss å måle DNA konsentrasjonen. Når det nærmer seg den lineære fasen til amplifikasjon, vil fluorescens mengden øke over bakgrunnen. Ved et punkt vil fluorescens mengden være målbar, dette kalles for threshold cycle (Ct) (se figur 4.14)



Figur 4.13 Dissosiasjon/smeltekurve analyser for mDKK3 og mNono primere.

Dissosiasjon/smeltekurve analyser gjøres etter endt qPCR reaksjon. Smeltekurven analysen utføres i tre steg. Først vil alle komponentene denatureres ved 95 °C deretter gjøres temperering/annealing ved en forhåndsinnstilt temperatur, og helt til slutt en gradvis økning i temperaturen til 95 °C. Ved det siste steget blir intensiteten på fluorescensen monitorert for å få en smeltekurve. i i takt med denaturering av PCR produktene vil fluorescensen minke for reaksjoner der SYBR[®] Green er benyttet.

Dersom det ikke finnes dobbelt topper i grafene er primerne ”godkjent”.



Figur 4.14 Eksempel på amplifikasjon kurve. På y-aksen er mengden på fluorescens som blir målt i løpet av forsøket målt. På x-aksen blir antall sykluser vist. Den røde linjen som går gjennom kurven viser det punktet er fluorescens mengden er målbar, dette kalles for threshold cycle (Ct). Lave Ct verdien viser at det er større mengder av cDNA i utgangspunktet og trengs derfor færre sykluser for å oppnå Ct verdien. Jo mindre spredning mellom parallellene, desto mer nøyaktig blir målingene.

3T3-Kontroll celler ble transfektert med plasmid som koder for Pax6 og Pax6(5a). I tillegg ble pKW-10 som ikke har noe Pax6 aktivitet brukt som kontroll. Cellene ble studert ved bruk av et fluorescens mikroskop (Zeiss Axiovert S 100). Cellene ble høstet etter 24 timer og RNA konsentrat ble høstet og rensed ved bruk av RNeasy Plus Mini kit, RNA prep (QIAGEN). Så ble det cDNA laget fra det rensede RNA-et. Resultatet til qPCR viser ikke det vi hadde forventet, altså oppregulering av DKK3 uttrykket i cellene. I tabell 4.1 og 4.2 er fold verdiene oppsummert for Pax6 og Pax6(5a) mot kontrollen pKW10. Disse verdiene viser heller det motsatte av det som ble forventet. For Pax6(5a) er det kun en verdi som har veldig høy fold verdi, men de andre verdiene viser tegn på represjon eller veldig lave verdier (1,11 og 1,57) som er ubetydelig økning i uttrykket. Det ble gjort flere forsøk å få til den ene høye verdien som vi fikk på det ene forsøket gjort 24.01.2011. Men den høye verdien lot seg

ikke gjenprodusere og istedenfor ble kun represjon av uttrykket til DKK3 i cellene som ble transfektert.

Tabell 4.1 qPCR resultater fra forskjellige forsøk(datoer) for Pax6 vs. pKW10 og beregnet endring i mengde DKK3 transkript (fold-verdi)

Primer sett	FIpIn-3T3kontroll - Pax6 vs. FIpIn-3T3kontroll - pKW10	Fold
Dkk3	01.02.11	-1,8
	01.02.11	-1,3
	01.02.11	1
	24.01.11	-1,1
	20.01.11	-7,7

Tabell 4.2 qPCR resultater fra forskjellige forsøk(datoer) for Pax6(5a) vs. pKW10 og beregnet endring i mengde DKK3 transkript (fold-verdi)

Primer sett	FIpIn-3T3kontroll - Pax6(5a) vs. FIpIn-3T3kontroll - pKW10	Fold
Dkk3	01.02.11	1,1
	01.02.11	-1,3
	01.02.11	1,6
	24.01.11	7,5
	20.01.11	-2,4

For utfyllende informasjon se på Appendiks 1.

5. Diskusjon

5.1 Kloning av sebrafisk cDNA i pCR2.1-TOPO[®] for probe for *in situ*.

DKK3 ble først observert som mulig målgen for Pax6 ble gjort i cellekulturer. For å kunne undersøke om DKK3 gen-uttrykket lar seg bli påvirket i nærværet eller fraværet av Pax6 i et levende organisme (her sebrafisk embryo) er RNA *in situ* hybridiseringen den beste metoden å ta i bruk.

RNA *in situ* hybridiseringen er en teknikk som brukes for å detektere og lokalisere spesifikke DNA sekvenser eller RNA ved hjelp av komplementære prober av gensekvenser.

Visualiseringen av proben gjøres ved at den enten har en fluorescent merkelapp på seg, eller at den har innebygget varianter av nukleotider (DIG eller fluorescein). Bruk av fluorescerende prober kan påvise hele kromosomer, deler av kromosomer eller enkelt gener i celler og vev, og på denne måten viser at det er en stor grad av likhet i sekvensen.

Fluorescence mikroskopi brukes for å se hvor fluoresescensen oppstår når proben binder til genomet. Sebrafisk cDNA som ble forsøkt klonet i pCR2.1-TOPO[®] er proben, og sebrafisk embryoet er ”vevet” der uttrykket av DKK3 og Pax6 skulle bli undersøkt for å se på hvilke organer de befinner de seg i.

Dessverre klarte ikke vi å klonere cDNA’et i pCR2.1-TOPO[®]. Som det går ut ifra figur 4.2B. og 4.2 C ser det ut til at det finnes en insert, og etter mange forsøk på å sekvensere denne prøven, viste det seg at det ikke var sebrafisk cDNA i det hele tatt. Dermed ble denne delen av forsøket lagt på is pga. mangel på tid.

Grunnen til at cDNA kloningen ikke ble vellykket er kan være kvaliteten på cDNA primersettet som ikke var optimal. Det ser ut til at primersettet har gjenkjent og amplifisert noe annet. Nye primere og evt. høyere annealing-temperatur kunne vært prøvd.

5.2 Kloning av DKK3 promoteren fra mus og menneske i pGL3-basic reportervektor for transfeksjoner, reporter gen assay, Western blott og qPCR.

Utgangspunktet for denne oppgaven er basert på forskningen til Kiselev og kollegaer for å oppdage nye målgener til Pax6 og Pax6(5a) isoformen. DKK3 blir regulert av begge isoformene til Pax6. Kiselev og kollegaer brukte genekspressjons microarray og qPCR for å lage en oversikt over målgener, de to Pax6 isoformene regulerer. De oppdaget et lite, men signifikant antall gener som blir kontrollert av Pax6 og Pax6(5a). I disse undersøkelsene viste det seg at DKK3 er 18 fold oppregulert av Pax6(5a) i FlpIn-3T3-fibroblaster fra mus, og 3 fold oppregulert av Pax6 (Tonje Engevik Eriksen^{1*} et al., 2010).

Interessen blir forsterket når studier av Pax6 og DKK3 viser sammenhenger mellom dem. Selv om det ikke er skrevet direkte om denne sammenhengen kommer det tydelig fram når vi ser nærmere på hva slags organer, vev og celler Pax6 og DKK3 blir uttrykket i. Både Pax6 og DKK3 blir uttrykket i retina, øyelinsen, og i deler av hjernen og i beta cellene i pankreas. Uttrykket til Pax6 og DKK3 blir til og med observert i samme celletyper. Blant annet er de uttrykket i retina; Muller glia, den indre nukleære laget (INL) og ganglion cellelaget (Nakamura et al., 2007, Ang et al., 2004, Hermann et al., 2007).

Det Kiselev og hans kollegaer gjorde var en stabil transfeksjon av Pax6 og Pax6(5a) plasmider i FlpIn-3T3-fibroblaster som gikk over lengre tid (flere uker). Vi var interessert i hvordan tidsaspektet påvirker mus DKK3 uttrykket i cellene. Derfor gjorde vi transiente transfeksjoner som gikk over 36 timer. Dette vil også si noe om Pax6(5a) og Pax6 har en direkte effekt på mus DKK3 eller om de aktiverer andre signalveier for å øke uttrykket til mus DKK3.

I dette prosjektet ble DKK3 promoteren fra både mus og menneske forsøkt klonet i reporter gen vektor, men kun kloning av mus DKK3 promoteren ble vellykket og derfor valgte vi å gå videre med eksperimentet uten menneske DKK3 promoteren. Mus DKK3 ble transfektert sammen med plasmider som kodet for Pax6 og Pax6(5a) og aktiveringsgraden til mDKK3 promoteren ble målt ved forskjellige metoder.

Noen av disse metodene som ble brukt for å se på promoteraktiviteten til mDKK3 ga resultater som vi hadde forventet, mens andre ga resultater som var stikk motsatte av det vi hadde regnet med. Disse blir diskutert hver for seg under.

5.2.1 Reporter gen assay

Hela celler ble transfektert med pKW10, pKW-Pax6 og pKW-Pax6(5a) plasmider sammen med pGL3-mDKK3 eller tom vektor pGL3-basic med luciferase aktivitet for å kunne utføre reporter gen assay. Som resultatene i del 4.3 og figurene 4.7 og 4.8 viser, ble transaktivering mediert av både Pax6 og Pax6(5a) av mDKK3 promoteren. mDKK3 promoteren ble i sterkeste grad påvirket av Pax6(5a), som forventet, siden DKK3 er en Pax6(5a) spesifikk målgen (Tonje Engevik Eriksen^{1*} et al., 2010). For å se om mengden av Pax6 og Pax6(5a) plasmider hadde noe betydning for hvor mye økningen til uttrykket av mDKK3 promoteren kom til å være ble det utført titreringsforsøk der mengden med pKW10, Pax6 og Pax6(5a) plasmidene økte. Mengden av plasmidene viste seg å ha betydning (se figur 4.8) og den økte i takt med økt mengde Pax6 og Pax6(5a).

5.2.2 Western blot

FipIn-3T3-Kontroll celler ble transfektert med Pax6, og Pax6(5a) ekspresjons plasmid. Proteinene som ble høstet ble brukt i Western blot analyse for se om Pax6 og Pax6(5a) uttrykket på proteinnivået. Resultatene viser tydelig sterk uttrykk av både Pax6 og Pax6(5a). Dette ga god utgangspunkt for å se om mDKK3 uttrykket ble oppregulert i qPCR.

5.2.3 qPCR

cDNA ble syntetisert fra RNA ekstraktene som ble høstet fra FipIn-3T3-Kontroll cellene transfektert med plasmidene. qPCR reaksjon ble gjort for å se om DKK3 hadde blitt påvirket av Pax6 og Pax6(5a). Resultatene i denne delen viste (se del 4.4.3) at oppregulering av mDKK3 uttrykket ikke hadde skjedd. Det kan være mange grunner til hvorfor qPCR resultatene ikke ble som vi hadde forventet.

Da Kiselev og kollegaer gjorde var en stabil transfeksjon av Pax6 og Pax6(5a) plasmider i FipIn-3T3-fibroblaster, fikk de resultater som viste at DKK3 uttrykket blir oppregulert av begge isoformene (i ulik grad). Men i forsøkene vi gjorde var det kort tid (36 t) mellom eksponering for plasmidene, til cellene ble høstet.

En viktig grunn er transfeksjonseffektiviteten i cellene. I figur 4.11 har vi tatt bilder av cellene med fluorescens lys, og med vanlig bright field. Ut ifra bildene og observasjonen som ble gjort kan vi konkludere med at transfeksjonseffektiviteten er på ca.15-20 %. Dette er i utgangspunktet ikke så veldig høy, og det betyr at mange av cellene er ikke blitt transfektert. Dermed ble mengden RNA som er uttrykt i de cellene som ble transfektert med plasmidene, fortynnet og resulterte i de qPCR resultatene vi fikk.

Forskjellen i tilgjengelighet til promoterene er (kromatin–struktur) vil antakelig også kunne forklare hvorfor reporter gen assay og qPCR ga forskjellige resultater. I det transfekterte pGL3-mDKK3 promoter plasmidet vil et evt. Pax6 bindesete være lett tilgjengelig, mens de vil være pakket inn i kromatin i det naturlige genomet i cellene.

6. Konklusjon og fremtidige aspekter

Pax6 er en transkripsjons faktor som blant annet er en viktig del av reguleringen av organogenesen og normal fosterutvikling. Mutasjoner i Pax6 genet forårsaker mange typer sykdommer.

Det er vist at Pax6 og Pax6(5a) regulerer uttrykket av DKK3 uttrykket.

Hvorvidt DKK3 blir direkte kontrollert av Pax6 og Pax6(5a) er bekreftet i reporter gen assay, men ikke i qPCR resultatene.

For å kunne bevise denne sammenhengen kreves det videre forskning i framtiden.

Det er viktig å gjennomføre *in situ* hybridisering med sebrafisk cDNA for faktisk å kunne se om Pax6 og Pax6(5a) regulerer uttrykket til DKK3 i en levende organisme og hvilke organer eller vev det skjer i.

Når det gjelder de påbegynte delesjonsanalysene av pGL-mDKK3 promoteren, er det viktig å få sekvensert og verifisert at trunkeringen har fungert. Når sekvensen er bekreftet vil det gjøres nye transfeksjoner av Hela celler for å kunne utføre reporter gen assay. Dersom disse konstruksjonene gir resultater i reporter gen assay, betyr det at vi er et steg nærmere å mappe Pax6 bindesete i promoter sekvensen. Dersom konstruksjonene ikke gir noen resultater i reporter gen assay vil det si at det kanskje hele promoter sekvensen trenges for å kunne gi uttrykk.

7. Referanser

- ALVAREZ, A. R., GODOY, J. A., MULLENDORFF, K., OLIVARES, G. H., BRONFMAN, M. & INESTROSA, N. C. 2004. Wnt-3a overcomes beta-amyloid toxicity in rat hippocampal neurons. *Exp Cell Res*, 297, 186-96.
- ANG, S. J., STUMP, R. J., LOVICU, F. J. & MCAVOY, J. W. 2004. Spatial and temporal expression of Wnt and Dickkopf genes during murine lens development. *Gene Expr Patterns*, 4, 289-95.
- ARAVIND, L. & KOONIN, E. V. 1998. A colipase fold in the carboxy-terminal domain of the Wnt antagonists--the Dickkopfs. *Curr Biol*, 8, R477-8.
- AZUMA, N., TADOKORO, K., ASAKA, A., YAMADA, M., YAMAGUCHI, Y., HANDA, H., MATSUSHIMA, S., WATANABE, T., KOHSAKA, S., KIDA, Y., SHIRAISHI, T., OGURA, T., SHIMAMURA, K. & NAKAFUKU, M. 2005. The Pax6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Hum Mol Genet*, 14, 735-45.
- BARRANTES IDEL, B., MONTERO-PEDRAZUELA, A., GUADANO-FERRAZ, A., OBREGON, M. J., MARTINEZ DE MENA, R., GAILUS-DURNER, V., FUCHS, H., FRANZ, T. J., KALAYDJIEV, S., KLEMPF, M., HOLTER, S., RATHKOLB, B., REINHARD, C., MORREALE DE ESCOBAR, G., BERNAL, J., BUSCH, D. H., WURST, W., WOLF, E., SCHULZ, H., SHTROM, S., GREINER, E., HRABE DE ANGELIS, M., WESTPHAL, H. & NIEHRS, C. 2006. Generation and characterization of dickkopf3 mutant mice. *Mol Cell Biol*, 26, 2317-26.
- CANO, D. A., RULIFSON, I. C., HEISER, P. W., SWIGART, L. B., PELENGARIS, S., GERMAN, M., EVAN, G. I., BLUESTONE, J. A. & HEBROK, M. 2008. Regulated beta-cell regeneration in the adult mouse pancreas. *Diabetes*, 57, 958-66.
- CHAUHAN, B. K., REED, N. A., YANG, Y., CERMAK, L., RENEKER, L., DUNCAN, M. K. & CVEKL, A. 2002a. A comparative cDNA microarray analysis reveals a spectrum of genes regulated by Pax6 in mouse lens. *Genes Cells*, 7, 1267-83.
- CHAUHAN, B. K., REED, N. A., ZHANG, W., DUNCAN, M. K., KILIMANN, M. W. & CVEKL, A. 2002b. Identification of genes downstream of Pax6 in the mouse lens using cDNA microarrays. *J Biol Chem*, 277, 11539-48.
- CHAUHAN, B. K., YANG, Y., CVEKLOVA, K. & CVEKL, A. 2004. Functional interactions between alternatively spliced forms of Pax6 in crystallin gene regulation and in haploinsufficiency. *Nucleic Acids Res*, 32, 1696-709.
- CHIEN, A. J., CONRAD, W. H. & MOON, R. T. 2009. A Wnt survival guide: from flies to human disease. *J Invest Dermatol*, 129, 1614-27.
- GEORGALA, P. A., CARR, C. B. & PRICE, D. J. 2011. The role of Pax6 in forebrain development. *Dev Neurobiol*.
- GLASER, T., WALTON, D. S. & MAAS, R. L. 1992. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nat Genet*, 2, 232-9.
- GRINDLEY, J. C., DAVIDSON, D. R. & HILL, R. E. 1995. The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development*, 121, 1433-42.
- HACK, M. A., SAGHATELYAN, A., DE CHEVIGNY, A., PFEIFER, A., ASHERY-PADAN, R., LLEDO, P. M. & GOTZ, M. 2005. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci*, 8, 865-72.
- HACKAM, A. S., STROM, R., LIU, D., QIAN, J., WANG, C., OTTESON, D., GUNATILAKA, T., FARKAS, R. H., CHOWERS, I., KAGEYAMA, M., LEVEILLARD, T., SAHEL, J. A., CAMPOCHIARO, P. A., PARMIGIANI, G. & ZACK, D. J. 2004. Identification of gene expression changes associated with the

- progression of retinal degeneration in the rd1 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 2929-42.
- HAUBST, N., BERGER, J., RADJENDIRANE, V., GRAW, J., FAVOR, J., SAUNDERS, G. F., STOYKOVA, A. & GOTZ, M. 2004. Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development. *Development*, 131, 6131-40.
- HEISER, P. W., LAU, J., TAKETO, M. M., HERRERA, P. L. & HEBROK, M. 2006. Stabilization of beta-catenin impacts pancreas growth. *Development*, 133, 2023-32.
- HERMANN, M., PIRKEBNER, D., DRAXL, A., BERGER, P., UNTERGASSER, G., MARGREITER, R. & HENGSTER, P. 2007. Dickkopf-3 is expressed in a subset of adult human pancreatic beta cells. *Histochem Cell Biol*, 127, 513-21.
- HSIEH, S. Y., HSIEH, P. S., CHIU, C. T. & CHEN, W. Y. 2004. Dickkopf-3/REIC functions as a suppressor gene of tumor growth. *Oncogene*, 23, 9183-9.
- KAWANO, Y. & KYPTA, R. 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*, 116, 2627-34.
- KRAUSS, S., JOHANSEN, T., KORZH, V. & FJOSE, A. 1991. Expression of the zebrafish paired box gene pax[zf-b] during early neurogenesis. *Development*, 113, 1193-206.
- KRUPNIK, V. E., SHARP, J. D., JIANG, C., ROBISON, K., CHICKERING, T. W., AMARAVADI, L., BROWN, D. E., GUYOT, D., MAYS, G., LEIBY, K., CHANG, B., DUONG, T., GOODEARL, A. D., GEARING, D. P., SOKOL, S. Y. & MCCARTHY, S. A. 1999. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene*, 238, 301-13.
- LANG, D., POWELL, S. K., PLUMMER, R. S., YOUNG, K. P. & RUGGERI, B. A. 2007. PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol*, 73, 1-14.
- MACHON, O., KRESLOVA, J., RUZICKOVA, J., VACIK, T., KLIMOVA, L., FUJIMURA, N., LACHOVA, J. & KOZMIK, Z. 2010. Lens morphogenesis is dependent on Pax6-mediated inhibition of the canonical Wnt/beta-catenin signaling in the lens surface ectoderm. *Genesis*, 48, 86-95.
- MAEKAWA, M., TAKASHIMA, N., ARAI, Y., NOMURA, T., INOKUCHI, K., YUASA, S. & OSUMI, N. 2005. Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes Cells*, 10, 1001-14.
- MAO, B., WU, W., DAVIDSON, G., MARHOLD, J., LI, M., MECHLER, B. M., DELIUS, H., HOPPE, D., STANNEK, P., WALTER, C., GLINKA, A. & NIEHRS, C. 2002. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*, 417, 664-7.
- MITCHELL, T. N., FREE, S. L., WILLIAMSON, K. A., STEVENS, J. M., CHURCHILL, A. J., HANSON, I. M., SHORVON, S. D., MOORE, A. T., VAN HEYNINGEN, V. & SISODIYA, S. M. 2003. Polymicrogyria and absence of pineal gland due to PAX6 mutation. *Ann Neurol*, 53, 658-63.
- MONAGHAN, A. P., KIOSCHIS, P., WU, W., ZUNIGA, A., BOCK, D., POUSTKA, A., DELIUS, H. & NIEHRS, C. 1999. Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mech Dev*, 87, 45-56.
- NAKAMURA, R. E. & HACKAM, A. S. 2010. Analysis of Dickkopf3 interactions with Wnt signaling receptors. *Growth Factors*, 28, 232-42.
- NAKAMURA, R. E., HUNTER, D. D., YI, H., BRUNKEN, W. J. & HACKAM, A. S. 2007. Identification of two novel activities of the Wnt signaling regulator Dickkopf 3 and characterization of its expression in the mouse retina. *BMC Cell Biol*, 8, 52.
- NIEHRS, C. 2006. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, 25, 7469-81.

- NORNES, S., CLARKSON, M., MIKKOLA, I., PEDERSEN, M., BARDSLEY, A., MARTINEZ, J. P., KRAUSS, S. & JOHANSEN, T. 1998. Zebrafish contains two pax6 genes involved in eye development. *Mech Dev*, 77, 185-96.
- OSUMI N, S. H., NUMAYAMA-TSURUTA K, MAEKAWA M., SOURCEDIVISION OF DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE, C. F. T. A. A. A. R., TOHOKU UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE, 2-1, SEIRYO-MACHI, AOBA-KU, SENDAI 980-8575, JAPAN. OSUMI@MAIL.TAINS.TOHOKU.AC.JP & RABELING, D. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator.
- PRATT, T., VITALIS, T., WARREN, N., EDGAR, J. M., MASON, J. O. & PRICE, D. J. 2000. A role for Pax6 in the normal development of dorsal thalamus and its cortical connections. *Development*, 127, 5167-78.
- ROBSON, E. J., HE, S. J. & ECCLES, M. R. 2006. A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat Rev Cancer*, 6, 52-62.
- RULIFSON, I. C., KARNIK, S. K., HEISER, P. W., TEN BERGE, D., CHEN, H., GU, X., TAKETO, M. M., NUSSE, R., HEBROK, M. & KIM, S. K. 2007. Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 6247-52.
- SETHI, J. K. & VIDAL-PUIG, A. 2010. Wnt signalling and the control of cellular metabolism. *Biochem J*, 427, 1-17.
- ST-ONGE, L., SOSA-PINEDA, B., CHOWDHURY, K., MANSOURI, A. & GRUSS, P. 1997. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature*, 387, 406-9.
- STROM, A., BONAL, C., ASHERY-PADAN, R., HASHIMOTO, N., CAMPOS, M. L., TRUMPP, A., NODA, T., KIDO, Y., REAL, F. X., THOREL, F. & HERRERA, P. L. 2007. Unique mechanisms of growth regulation and tumor suppression upon Apc inactivation in the pancreas. *Development*, 134, 2719-25.
- TON, C. C., HIRVONEN, H., MIWA, H., WEIL, M. M., MONAGHAN, P., JORDAN, T., VAN HEYNINGEN, V., HASTIE, N. D., MEIJERS-HEIJBOER, H., DRECHSLER, M. & ET AL. 1991. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell*, 67, 1059-74.
- TONJE ENGEVIK ERIKSEN^{1*}, Y. K., SIRI FORSDAL¹, TORIL ANNE GRØNSET^C, LAN HUONG THI NGUYEN¹, JACK ANSGAR BRUUN² AND INGVILD MIKKOLA¹, ¹RESEARCH GROUP OF PHARMACOLOGY, D. O. P., UNIVERSITY OF TROMSØ, ² TROMSØ UNIVERSITY PROTEOMICS PLATFORM, D. O. M. B., UNIVERSITY OF TROMSØ & EQUALLY, T. A. C. 2010. generation of pax6 and Pax6(5a) expressing 3t3 cell lines identifies both common and Pax6-isoform specific target genes with function in cell growth and migration
- TREMBLAY, P. & GRUSS, P. 1994. Pax: genes for mice and men. *Pharmacol Ther*, 61, 205-26.
- TYAS, D. A., PEARSON, H., RASHBASS, P. & PRICE, D. J. 2003. Pax6 regulates cell adhesion during cortical development. *Cerebral Cortex*, 13, 612-9.
- VAN TILBURGH, H., BEZZINE, S., CABBILLAU, C., VERGER, R. & CARRIERE, F. 1999. Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase. *Biochim Biophys Acta*, 1441, 173-84.
- WALTHER, C. & GRUSS, P. 1991. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*, 113, 1435-49.
- WELLS, J. M., ESNI, F., BOIVIN, G. P., ARONOW, B. J., STUART, W., COMBS, C., SKLENKA, A., LEACH, S. D. & LOWY, A. M. 2007. Wnt/beta-catenin signaling is required for development of the exocrine pancreas. *BMC Dev Biol*, 7, 4.

8. Appendiks

Appendix 1.

Rå data til qPCR forsøk.

20,01,2011

Replicate	Well	Well Name	Well Comment	Dye	Assay	Well Type	Threshold (dR)	Ct (dR)
1	---	3T3K-pKW10	dil, 1x5	SYBR	mDKK3	Unknown	5613,192	33,81
2	---	3T3K-mPax6	dil 1x5	SYBR	mDKK3	Unknown	5613,192	36,43
3	---	3T3K-mPax6(5a)	dil 1x5	SYBR	mDKK3	Unknown	5613,192	35,31
7	---	3T3K-pKW10	dil, 1x5	SYBR	mNONO	Unknown	975,805	24,16
8	---	3T3K-mPax6	dil 1x5	SYBR	mNONO	Unknown	975,805	23,84
9	---	3T3K-mPax6(5a)	dil 1x5	SYBR	mNONO	Unknown	975,805	24,42
---	A10	---	---	SYBR	mDKK3	NTC	5613,192	No Ct
---	A12	---	---	SYBR	mNONO	NTC	975,805	No Ct

24,01,2011

Replicate	Well	Well Name	Well Comment	Dye	Assay	Well Type	Threshold (dR)	Ct (dR)
1	---	3T3K-pKW10	13,01,2011	SYBR	mDKK3	Unknown	6373,69	34,14
2	---	3T3K-mPax6	13,01,2011	SYBR	mDKK3	Unknown	6373,69	33,87
3	---	3T3K-mPax6(5a)	13,01,2011	SYBR	mDKK3	Unknown	6373,69	34,8
7	---	3T3K-pKW10	13,01,2011	SYBR	mNONO	Unknown	2624,809	24,77
8	---	3T3K-mPax6	13,01,2011	SYBR	mNONO	Unknown	2624,809	24,42
9	---	3T3K-mPax6(5a)	13,01,2011	SYBR	mNONO	Unknown	2624,809	28,34
---	A7	---	---	SYBR	mDKK3	NTC	6373,69	No Ct
---	A8	---	---	SYBR	mNONO	NTC	2624,809	No Ct

01,02,2011

Replicate	Well	Well Name	Well Comment	Assay	Well Type	Ct (dR)
1	---	3T3K-pKW10	13,01,2011, C	mDKK3	Unknown	33,49
2	---	3T3K-mPax6	13,01,2011, C	mDKK3	Unknown	34,46
3	---	3T3K-mPax6(5a)	13,01,2011, C	mDKK3	Unknown	35,64
4	---	3T3K-pKW10	13,01,2011, C	mNONO	Unknown	23,62
5	---	3T3K-mPax6	13,01,2011, C	mNONO	Unknown	23,74
8	---	3T3K-mPax6	13,01,2011, C	mDKK3	Unknown	32,23
9	---	3T3K-mPax6(5a)	13,01,2011, C	mDKK3	Unknown	31,5
10	---	3T3K-pKW10	13,01,2011, C	mNONO	Unknown	21,93
11	---	3T3K-mPax6	13,01,2011, C	mNONO	Unknown	22,83
12	---	3T3K-mPax6(5a)	13,01,2011, C	mNONO	Unknown	22,17
13	---	3T3K-pKW10	13,01,2011, C	mDKK3	Unknown	30,87
14	---	3T3K-mPax6	13,01,2011, C	mDKK3	Unknown	No Ct
15	---	3T3K-mPax6(5a)	13,01,2011, C	mDKK3	Unknown	30,72
16	---	3T3K-pKW10	13,01,2011, C	mNONO	Unknown	23,44
17	---	3T3K-mPax6	13,01,2011, C	mNONO	Unknown	No Ct
18	---	3T3K-mPax6(5a)	13,01,2011, C	mNONO	Unknown	23,94
---	A7	---	---	mDKK3	NTC	No Ct
---	A8	---	---	mNONO	NTC	No Ct

Beregning av ratio og fold verdier for qPCR resultatene

01.02.2011

cDNA dl. 1x5

3T3-K cells with pKW Pax6

primers	setting	ct targ contr	ct targ samp	ct ref contr	ct ref samp	RATIO samp vs contr	fold
Dk43	pW10-Pax6 vs pW10	33,49	34,46	23,62	23,74	0,55	-1,8
Dk43	pW10-Pax6 vs pW10	30,94	32,23	21,93	22,83	0,76	-1,3
Dk43	pW10-Pax6 vs pW10	30,87 No Ct		23,44 No Ct		#VALUE!	0

01.02.2011

primers	setting	ct targ contr	ct targ samp	ct ref contr	ct ref samp	RATIO samp vs contr	fold
Dk43	pW10-Pax6(5a) vs pW10	33,49	35,64	23,62	25,92	1,11	1,11
Dk43	pW10-Pax6(5a) vs pW10	30,94	31,5	21,93	22,17	0,80	-1,25
Dk43	pW10-Pax6(5a) vs pW10	30,87	30,72	23,44	23,94	1,57	1,57

24.01.2011

cDNA, dl. 1x5

3T3-K cells with pKW Pax6

primers	setting	ct targ contr	ct targ samp	ct ref contr	ct ref samp	RATIO samp vs contr	fold
Dk43	pW10-Pax6 vs pW10	34,14	33,87	24,77	24,42	0,95	-1,05

primers	setting	ct targ contr	ct targ samp	ct ref contr	ct ref samp	RATIO samp vs contr	fold
Dk43	pW10-Pax6(5a) vs pW10	34,14	34,8	24,77	28,34	7,52	7,52

20.01.2011

3T3-K cells with pKW Pax6

primers	setting	ct targ contr	ct targ samp	ct ref contr	ct ref samp	RATIO samp vs contr	fold
Dk43	pW10-Pax6 vs pW10	33,81	36,43	24,16	23,84	0,13	-7,7

primers	setting	ct targ contr	ct targ samp	ct ref contr	ct ref samp	RATIO samp vs contr	fold
Dk43	pW10-Pax6(5a) vs pW10	33,81	35,31	24,16	24,42	0,42	-2,4

Appendix 2.

Sekvens Reverse

Alignment (NCBI) av sekvensert miniprep nr. 6 (pCR-TOPO med mDKK3 promoter insert), M13 REV primer, med mDKK3 promoter-sekvensen hentet fra Ensemble genom-databasen (=Sbjekt).

Score = 194 bits (214), Expect = 6e-54
Identities = 124/141 (88%), Gaps = 0/141 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 85   CTTGNANNTCANCTTTGTTTCATTTCGAATTGNNNTNANNGGTGGTCNTCGTCGTGGAGATAG 144
          ||||| | ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 24   CTTGCAGCTCAGCTTTGTTTCATTTCGAATTGGGTGAGCGGTGGTCATCGTCGTGGAGATAG 83

Query 145  CCCAGCTGGGTCTCCCTTAGTTNAGATGGGGGGCTCCATGCNNTTTCGNTCGNGATGNGA 204
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 84   CCCAGCTGGGTCTCCCTTAGTTAGAGATGGGGGGCTCCATGCATTTGCATCGCGATGGGA 143

Query 205  GGAGGATGAACTGNGAGGAGG 225
          ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 144  GGAGGATGAACTGGGAGGAGG 164
```

Sekvens Forward

Alignment (NCBI) av sekvensert miniprep nr. 6 (pCR-TOPO med mDKK3 promoter insert), M13 FW primer, med mDKK3 promoter-sekvensen hentet fra Ensemble genom-databasen (=Sbjekt).

Score = 1085 bits (1202), Expect = 0.0
Identities = 679/733 (93%), Gaps = 10/733 (1%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 90   TCAGCTCCTCCACCTCTCGAAACATCTCATTGAGCGTAGCTTCCTCCTGAGGGTAGTTGA 149
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 796  TCAGCTCCTCCACCTCTCGAAACATCTCATTGAGCGTAGCTTCCTCCTGAGGGTAGTTGA 737

Query 150  GAGCTGGGCCCGGCTCCGCCGGAGTCCAAGTGACCGTCGGGGAAGGAGCAGGAGCAGTGG 209
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 736  GAGCTGGGCCCGGCTCCGCCGGAGTCCAAGTGACCGTCGGGGAAGGAGCAGGAGCAGTGG 677

Query 210  GGACCGCCGCCGCCAGCNGTGTACACAGCAAAATACCCCGAGCCGCTGCATGTTTGTTC 269
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 676  GGACCGCCGCCGCCAGCAGTGTACACAGCAAAATACCCCGAGCCGCTGCATGTTTGTTC 617

Query 270  CGCGCTGGCCGCCGCTGTGTGTCCCGGAAAGCTATCAAAGACTGCAGGACCAccccctct 329
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 616  CGCGCTGGCCGCCGCTGTGTGTCCCGGAAAGCTATCAAAGACTGCAGGACCAccccctct 557

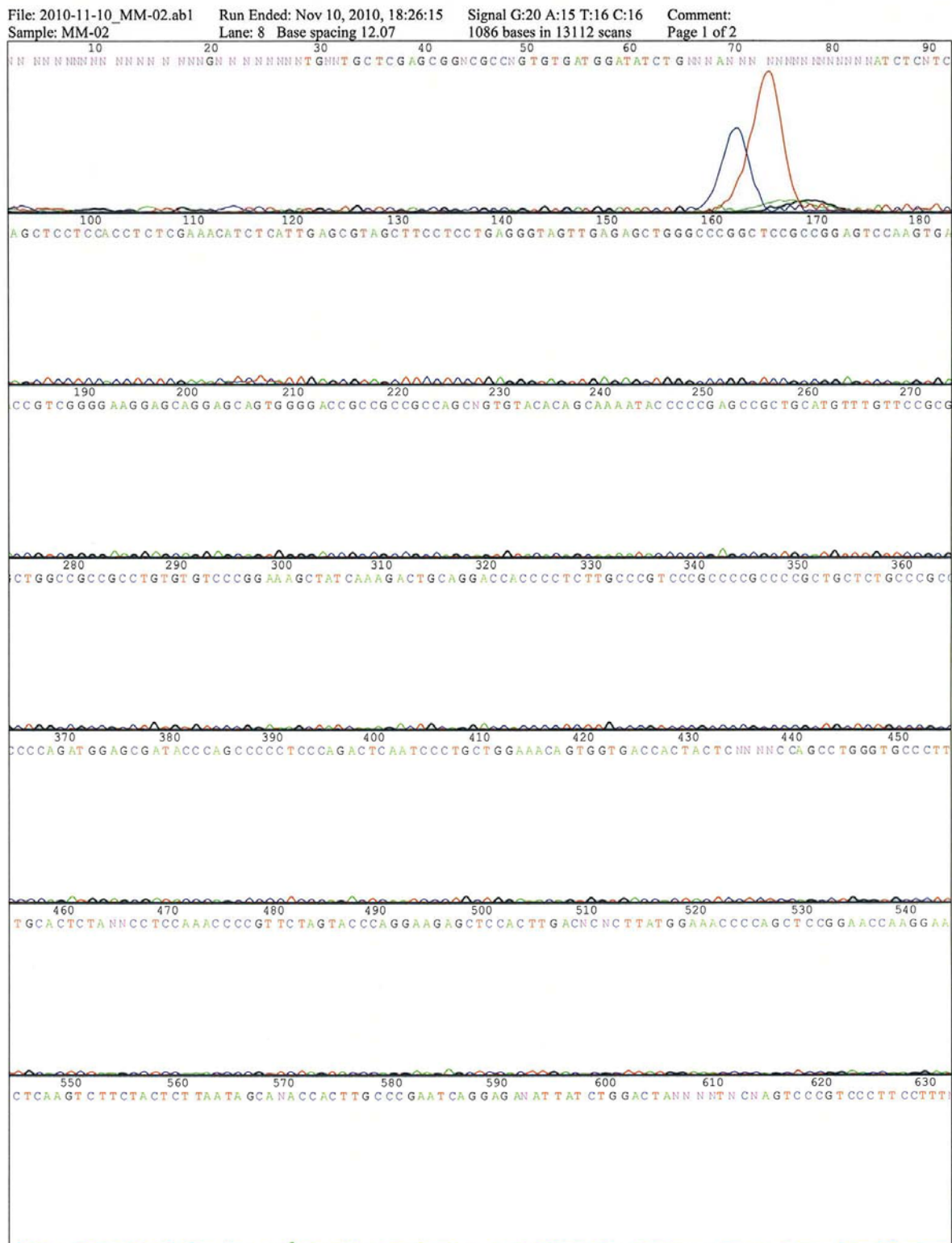
Query 330  tgccccgtccccccccgccccgctgctctgccccccccagatggagcgatacccagcccc 389
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 556  TGCCCGTCCCGCCCGCCCGCTGTCTGCCCCCCCCAGATGGAGCGATAACCAGCCCC 497

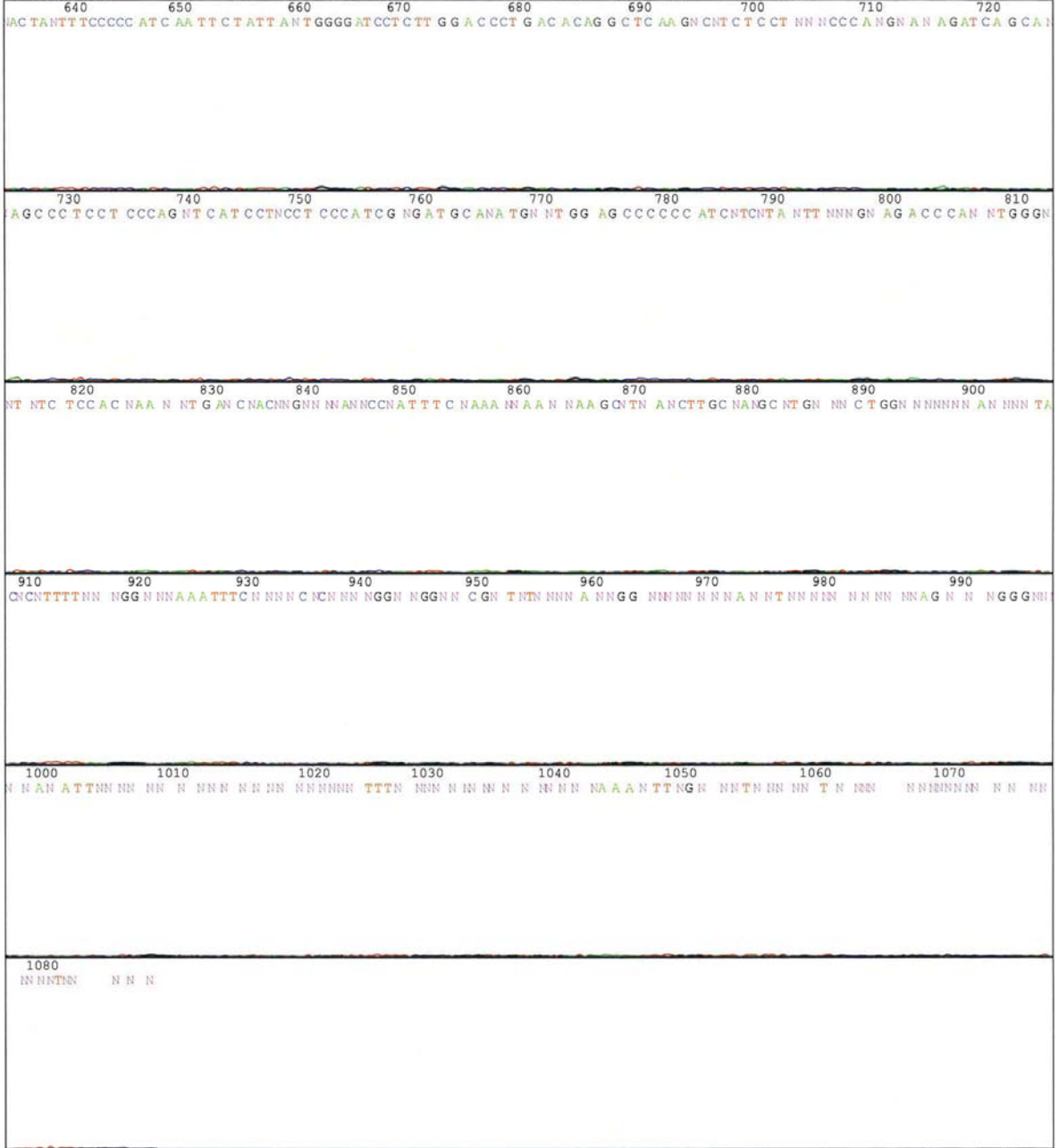
Query 390  ctcccAGACTCAATCCCTGCTGGAAACAGTGGTGACCACTACTCNNNNCCAGCCTGGGTG 449
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 496  CTCCCAGACTCAATCCCTGCTGGAAACAGTGGTGACCACTACTCCTCTCCAGCCTGGGTG 437

Query 450  CCCTTTGCACTCTANNCC TCCAAACCCCGTTCTAGTACCCAGGAAGAGCTCCACTTGACN 509
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 436  CCCTTGTCACTCTAAGCCCCAAACCCCGTTCTAGTACCCAGGAAGAGCTCCACTTGACA 377

Query 510  CNCTTATGGAAACCCAGCTCCGGAACCAAGGAACTCAAGTCTTCTACTCTTAATAGCAN 569
```


(miniprep 6 sekvensert med hhv M13 FW og M13 REV primer)





File: 2010-11-10_MM-03.ab1
Sample: MM-03

Run Ended: Nov 10, 2010, 18:26:15
Lane: 10 Base spacing 12.80

Signal G:20 A:13 T:15 C:12
282 bases in 6520 scans

Comment:
Page 1 of 1

