

UiT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

INSTITUTT FOR FARMASI

Kan *Staphylococcus aureus* proteinet SdrD binde til humante Desmoglein 1?

Reka Thiventhira

Far-3901 Masteroppgave i Farmasi
Mai 2014



Forord

Masteroppgaven ble gjennomført ved Forskningsgruppe for Vert-Mikrobe-interaksjoner, Institutt for Medisinsk Biologi, Det helsevitenskapelige fakultetet ved Universitetet i Tromsø fra oktober 2013 til mai 2014. Hovedveileder er Førsteamanuensis Mona Johannessen og biveiledere er Førsteamanuensis Anne-Merethe Hanssen og Professor Johanna E. Sollid.

Dette året har vært veldig spennende og lærerikt, men samtidig litt utfordrende. Møte med forsknings verden har vært innholdsrik med mange kunnskapsrike mennesker.

Jeg vil først og fremst takke min hovedveileder Mona Johannesen for alle faglige innspill og for å ha tatt så godt vare på oss masterstudenter og bidratt til et svært inkluderende og hyggelig miljø ved avdelingen. En stor takk til Anne-Merethe Hanssen og Johanne E. Sollid for alle faglige innspill og for å dele sine engasjement og kunnskap.

Jeg vil rette en stor takk til Kristin Hansen Elisa Ruud for uvurderlig hjelp i faglige spørsmål og lab, og for at hun har delt av sitt store engasjement og kunnskap.

Deretter vil jeg gjerne takke alle medlemmene av forskningsgruppen for det gode arbeidsmiljøet. Dere har alle hjulpet meg gjennom oppturer og nedturer, og alltid vært positiv uansett hva.

Og til slutt takk til den kjære familien min for at dere alltid stiller opp for meg og gir meg så mye trygghet og kjærlighet.

Reka Thiventhira

Tromsø, Mai 2014

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag.....	VI
Forkortelser.....	VII
1. Introduksjon.....	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1 <i>S.aureus</i> kolonisering; nesebæreskap.....	2
1.1.2 Hvordan <i>S.aureus</i> kommer i kontakt med nesen.....	2
1.1.3 Hvordan <i>S.aureus</i> adherer til ulike reseptorer i nesen.....	3
1.1.4 Hvordan <i>S.aureus</i> overkommer vertens forsvar.....	4
1.2 Serine-aspartate repeat proteiner (Sdr).....	5
1.3 Oppbygging av dermis og epidermis.....	6
1.4 Desmoglein.....	7
2. Formål.....	10
3. Materialer.....	11
4. Metoder.....	20
4.1 Isolering av plasmid DNA.....	20
4.2 Polymerase chain reaction (PCR).....	21
4.3 Agarose gel elektroforese.....	23
4.4 Rensing av DNA fra TAE agarose gel.....	24
4.5 Måling av DNA konsentrasjon ved NanoDrop.....	25
4.6 Restriksjonsenzym kutting.....	25
4.7 Ligering av Dsg 1 ekstra og intra PCR produkter inni pT7-Flag-2 vektor.....	26
4.8 Transformasjon av kompetente <i>E.coli</i> celler.....	27
4.9 Sekvensering av DNA.....	28
4.10 Isolering og rensing av proteinene GST, GST-SdrD og His-SdrD.....	29
4.10.1 Indusere uttrykk av His-SdrD og GST-proteiner.....	29
4.10.2 Rensing av proteinet GST og GST-SdrD _A	30
4.10.3 Rensing av His-SdrD _A under native betingelser fra <i>E.coli</i> lysater.....	31
4.11 Isolering av plasmidene Dsg 1 Intra-Flag-2, Dsg 1 ekstra-Flag-2 og CMV 7.1 tom vektor fra <i>E.coli</i> ; Midiprep.....	32

4.12 Induksjon av Flag tagged Dsg 1 intra og Dsg 1 ekstra proteiner uttrykk i <i>E.coli</i> BL 21.....	33
4.13 SDS-PAGE.....	34
4.14 Arbeid med eukaryote celler.....	35
4.15 Co-immunopresipitering.....	37
4.15.1 Co-immunopresipitering metode 1.....	38
4.15.2 Co-immunopresipitering metode 2.....	39
4.15.3 Co-immunopresipitering metode 3.....	39
4.16 Western blot.....	40
5. Resultat.....	42
5.1 Kloning av <i>Dsg 1</i> inni prokaryot Flag-tagget ekspresjonsvektor.....	42
5.1.1 Isolering av plasmid DNA fra <i>E.coli</i> og konsentrasjonsmåling.....	42
5.1.2 Amplifisering av <i>Dsg 1</i> genet ved PCR.....	42
5.1.3 Restriksjonsenzym kutting av pT7-Flag-2-vektor.....	43
5.1.4 Ligering og transformering.....	44
5.1.5 Testing av mulige positive kloner av <i>Dsg 1</i> intra-pT7-Flag-2 og <i>Dsg 1</i> ekstra-pT7-Flag-2.....	47
5.2 Proteinene ble indusert og/eller rensset til renhet.....	50
5.2.1 Rensing av GST protein.....	50
5.2.2 Rensing av His-SdrD proteiner.....	51
5.2.3 Optimalisering for indusering av Flag taggedde <i>Dsg 1</i> ekstra og intra proteiner fra <i>E.coli</i>	52
5.3 Interaksjonsstudier av <i>Dsg 1</i> og SdrD-proteinet.....	54
5.3.1 Co-immunopresipitering ved bruk av rensede proteiner og bakterielt cellelysat hvor <i>Dsg 1</i> ekstra var uttrykt.....	54
5.3.2 Co-immunopresipitering ved bruk av His-SdrD og eukaryot cellelysat transfektert med CMV7.1 vektor, <i>Dsg 1</i> ekstra-CMV7.1 og <i>Dsg1</i> intra-CMV7.1.....	55
6. Diskusjon.....	58
7. Konklusjon og fremtidige perspektiv.....	64
8. Referanse.....	65

Sammendrag

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) evne til å kolonisere humane neseborer er en viktig forutsetning for sykdommer, spesielt hudsykdommer. *S. aureus* koloniserer verten ved å binde til overflatekomponenter. Bakterien benytter adhesiner kalt mikrobielle overflatekomponenter som gjenkjenner adhesive matriks molekyler (MSCRAMM) til å binde til disse. Noen av de humane interaksjons partnere til MSCRAMM er kjent, mens noen er fortsatt ukjent. I denne oppgaven, har vi sett på molekylære interaksjonen mellom et bestemt MSCRAMM, nemlig Serine-aspartat repeat protein D (SdrD) på overflaten av *S. aureus* og desmoglein 1 (Dsg 1) på vertscellens overflate. Dsg 1 består av en ekstracellulær del (ekstra), en transmembran del og en intracellulær del (intra). Genene for hver del ble klonet inn i eukaryot ekspresjonsvektor. Dsg 1 ekstra, Dsg 1 intra og SdrD med forskjellige tagger (His- og GST-tag) ble isolert fra prokaryote ekspresjonsvektor. De rensede proteinene ble brukt i co-immunopresipitering (co-IP) fra eukaryot cellelysate og i testrør (*in vitro*). Flere co-IP forsøk ble utført, men de var inkonklusive og i fremtiden må man optimalisere metodene eller forandre metodene for å endelig bekrefte interaksjoner.

Forkortelser

Amp= Ampicillin

ClfA= Clumping factor A

ClfB= Clumping factor B

Co-IP= Co-immunoprecipitering

Dsc= Desmocollin

Dsg= Desmoglein

Dsg 1= Desmoglein 1

DTT= dithiothreitol

E.coli= *Escherichia coli*

GST= Glutathione S-transferase

HMI= Forskningsgruppe for Vert-Mikrobe-interaksjon

IPTG=Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

IsdA=Jern-regulert overflate determinant protein A

HEK=human embryonale nyreceller

LB=Luria-Bertani

LDS= Litium dodecyl sulfat

MRSA= Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

Ni-NTA=Ni (II)-nitrilotriacetic acid

OD= optical density

S.aureus= *Staphylococcus aureus*

Sdr= Serine-aspartate repeat

SdrC= Serine-aspartate repeat protein C

SdrD= Serine-aspartate repeat protein D

SdrE= Serine-aspartate repeat protein E

SDS-PAGE= Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

WTA=Wall teichoic acid

1. Introduksjon

1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S.aureus*) er en gram positiv ekstracellulær bakterie som er årsaken til mange alvorlige hud infeksjoner i samfunnet [1-3]. Nese bærerskap av *S.aureus* er hoved risiko faktor for blodbårne og sår infeksjoner [4]. *S.aureus* er en komponent av den normale floraen i nasofarynks til omtrent 25-30 % av den friske befolkningen [5], og kolonisering av bakterie er i seg selv asymptomatisk, harmløse og ufarlige [1, 6]. Men denne bakterien kan også infisere organismen og årsake alvorlige, potensielt livstruende sykdommer, som for eksempel brennkopper som er karakterisert med honning farget skorpede sår, erosjoner og noen ganger vesikler på overflaten av huden som er forårsaket av *S.aureus* infeksjon på epidermis [1, 7]. Cellulitt, dyp hudinfeksjon, fremkommer som en varm og erytematøs forstørret plakk som er en resultat av *S.aureus* infeksjon som involverer dermis og subkutant laget av huden. Dype verkebyller forårsaket av dyp *S.aureus* infeksjon av hår follikkel og hudvev som ligger rundt det. Og andre livstruende sykdommer forårsaket av *S.aureus* kan være endokarditt, osteomyelitt, lungebetennelse og blodforgiftning [1, 7].

Men den økende resistensen av denne bakterien mot ulike typer antibiotika gjør det vanskelig for å behandle infeksjoner som skyldes av denne bakterien. For eksempel har forekomsten av methicillin resistent *S. aureus* (MRSA) økt mye i mange land i de siste 10 årene [3]. I USA er *S.aureus* vanlig årsak til sykehus infeksjoner, og en høy andel av disse er forårsaket av MRSA [8, 9]. Dødeligheten assosiert med MRSA infeksjoner er omtrent 20 % [10]. MRSA er ikke bare resistente mot methicillin, men også for de mest vanlige antibiotikaene oxacillin, penicillin og amoxicillin [9]. Derfor er forebygging og redusering av spredningen av *S.aureus* infeksjoner veldig viktig.

1.1.1 *S.aureus* kolonisering; nesebæreskap

Den nasale kolonisering av *S.aureus* er påvirket av mange faktorer der både vert og bakterielle faktorer spiller en stor rolle. Koloniseringen skjer hovedsakelig i hud og slimhinner hos mennesker. Men i motsetning til andre bakteriearter som koloniserer nasofaryngeale vev, så er *S.aureus* lokalisert i fremre del av neseborene, et område kalt vestibulum nasi, som er dekket av hud og hårsekker [4, 6, 11]. Epitelen i denne regionen er en ikke-ciliert epitel som er keratinisert og lagdelt, og er skilt fra resten av nesehulen og luftveiene, som er foret med ciliert sylinderepitel [11].

Nesebærerskap mønsteret er delt inn i 3 ulike grupper i friske individer; vedvarende (persistent) bærere, intermitterende bærere og ikke-bærere. Vedvarende bærere har høyere mengde av *S.aureus* i kroppen og en høyere risiko for å få en *S.aureus* infeksjon. Vedvarende bærere er ofte kolonisert av en enkel stamme av *S.aureus* over lengre tid, mens intermitterende bærere kan bære ulike stammer av *S.aureus* [3, 4, 12]. Longitudinal studier viser at det er ca. 20 % av individer som er vedvarende bærere, og omtrent 30 % er intermitterende bærere og 50 % er ikke-bærere. Men dette varierer mellom forskjellige etniske grupper, alder, kjønn, der det er høyere bærerprosent hos hvite individer og i menn [3, 13].

For at *S.aureus* skal kolonisere nesen så må nesen først [3]

1. Komme i kontakt med *S.aureus* bakterien
2. Deretter må bakterien feste seg til de ulike reseptorene i nasale nisje
3. Så må *S.aureus* overkomme vertens forsvar
4. Til slutt må bakterien forhindre å mekanisk bli utryddet fra nesen

1.1.2 *Hvordan S.aureus kommer i kontakt med nesen*

S.aureus celler kan overleve for mange måneder på alle typer overflater. Hender er hovedvektoren for overføring av *S.aureus* bakterien fra overflaten til nesen. *S.aureus* kan også overføres til nesen via luften, men det skjer sjeldnere. Miljøfaktorer kan også påvirke *S.aureus* nesebærerskapet, for eksempel sykehusinnleggelse, familie på mer enn fem personer og andre aktiviteter som involverer nær fysisk nærkontakt, som f.eks. sport, viser seg til å være en stor risiko faktor [13, 14]. Det viser seg også at *S.aureus* bærere kan påtvinge

deres bærertilstand til andre husstand medlemmer [15, 16]. Studier har vist seg at det finnes stor sammenheng mellom bærertilstanden mellom mor og barn. De fleste av mødrene er bærere av den samme stammen av *S.aureus* som barnet, noe som indikerer at bærer stammen er overført ved nærkontakt [14].

1.1.3 Hvordan S.aureus adherer til ulike reseptorer i nesen

Adherensen mellom *S.aureus* og den nasale epitelium er en multifaktoriell prosess som involverer interaksjons partnere i begge organismer. De fleste *S.aureus* overflate adhesiner er kovalent bundet til cellevegg peptidoglykan og tilhører MSCRAMM (mikrobielle overflate komponenter som gjenkjenner adhesive matriks molekyler) protein familien [17]. Kovalent bundne MSCRAMM har en N-terminal signal-peptid, en eksponert ligand-bindende domene, en karakteristikk hydrofob cellevegg- og membranspanning domene, en C-terminal LPXTG motiv ansvarlig for cellevegg forankring og en positiv ladet hale [17].

S.aureus koloniserer verten ved å adhere til overflatekomponenter som fibrinogen, fibronectin, og cytokeratiner av nasale epithelium eller epidermal keratinocytter. *S.aureus* benytter mikrobielle overflate komponenter (MSCRAMMs) til å binde seg til disse komponentene, inkludert fibrinogen binding proteiner (ClfA og ClfB), jern-regulert overflate determinant protein A (IsdA) og wall teichoic acid (WTA) [1, 18].

S.aureus produserer mange proteiner som kan spesifikt binde til fibrinogen (Fg). To av dem er kovalent-lenkede Fg-bindende MSCRAMMer, kalt Clumping faktorer A og B (ClfA og ClfB) [20]. ClfA og ClfB er karakterisert av region R som da inneholder repeterende-serine-aspartat (SD) dipeptider og er lokalisert mellom vegg-spanning domene og ligand bindende domene A [17]. Clumping factor B, ClfB, er det beste karakteriserte *S.aureus* overflate protein. Den adherer direkte til keratinisert squamous epitel celler i det fremre neseboret ved å binde seg spesifikt til humane type 1 cytokeratin 10 og type II cytokeratin 8 [17].

S.aureus besitter fire kovalent bundne jern regulert overflate proteiner, IsdA, IsdB, IsdC og IsdH. Av de fire er IsdA den mest studerte kovalent bundet overflate proteinet [18].

Studier har vist at IsdA som reguleres av jern tilgjengeligheter, binder til fibrinogen, fibronectin og andre proteiner assosiert med cornified envelope av desquamated nasale epitel celler [18]. *S.aureus* teichoic syrer, WTA, er sterk ladede cellevegg polymere som består av fosfat og ribitol [17-19]. De bakterielle proteinene Serine-aspartate repeat protein C, D og E (SdrC, SdrD og SdrE) har også vist seg til å adhere til desquamated epitel celler [20]. Disse blir beskrevet litt senere i innledningen.

1.1.4 Hvordan *S.aureus* overkommer vertens forsvar

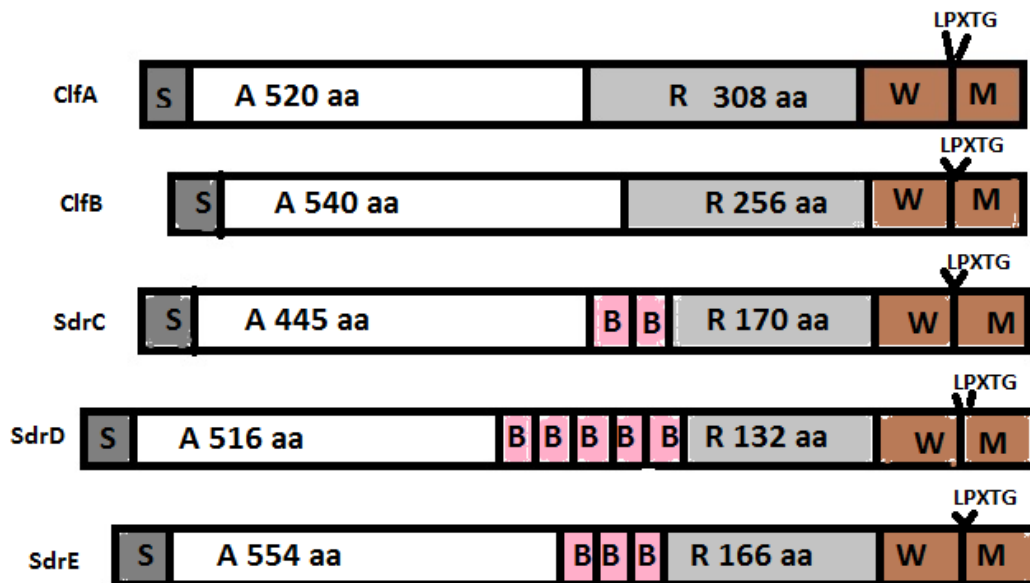
Nasale sekresjon har en betydelig rolle i det medfødte vertsforsvaret i menneskene. Komponenter av nasal sekresjon som bidrar til den medfødte immunresponsen omfatter immunoglobulin A og B, lysozymer, laktoferrin og andre antimikrobielle peptider. Og *S.aureus* bærere kan ha en feilregulering av disse komponentene i deres nasale sekresjon [21, 22].

Tidligere studier har vist at visse antimikrobielle peptider har ingen eller liten aktivitet mot *S.aureus* [23]. Nasale antimikrobielle peptider er ikke i stand til å fjerne *S.aureus* fra nesene. Dette kan forklares ved å se på anatomien til nesene. *S.aureus* hovedsakelig koloniserer området i vestibulum nasi som er fri for cilier og nasal slim sekresjon som inneholder antimikrobielle peptider og immunoglobuliner [24].

In vitro studier har vist at *S.aureus* er i stand til å motstå visse kationiske antimikrobielle peptider. Dette gjøres ved å redusere netto negativ ladning på dens cellevegg og cellemembran, ved hjelp av efflux pumper eller ved å frigjøre proteaser [25]. Cathelicidin LL-37 er en av de få humane bakteriecidale peptider med potent antistaphylococcal aktivitet [26]. Men *S.aureus* utskiller et protein kalt aureolysin, som er en ekstracellulær metalloproteinase som hemmer cathelicidin antimikrobiell aktivitet [1, 26].

1.2 Serine-aspartate repeat proteiner (Sdr)

Andre medlemmer av *S.aureus* Sdr-protein familie er SdrC, SdrD og SdrE [18] og alle disse tre Sdr-proteinene er ansvarlig for initial kontakt med vertscelle [20]. Disse proteinene har nesten lik strukturell organisasjon som ClfA og ClfB [17] (se figur 1). De alle starter med N terminal signal sekvens (S) etterfulgt av en A region med omtrent 500 aminosyrer for ligand binding. En R region med forskjellige lengder avhengig av hvilken type Sdr-protein det er bindet til, en LPXTG celle-vegg-bindende region W, en hydrofob membran region (M) og noen ganger en positiv ladet cytoplasmisk hale mot slutten av C-terminale enden [27]. Men i tillegg til disse grunnleggende strukturelle elementene så har de i tillegg B motiver som inneholder 110-113 aminosyre residue lokalisert mellom A og R regioner. I SdrC finnes det to motiver, mens det er tre B motiver i SdrD og fem B motiver i SdrE [17, 27, 28]. Slik som ClfA og ClfB så induserer SdrE blodplateaggregasjon, mens SdrC og SdrD spiller en rolle i adherens til humane desquamated nasale epitel celler [29].



Figur 1: Strukturell organisering av proteiner i SD-repeat multigen familien av *S.aureus*. S: signal sekvens, A: putativ ligand bindende-region A, B: B motiver, R: dipeptide SD repeats, W: short wall-spanning region, M: Membrane spanning segment. Denne figuren er laget ut ifra Josefsson et al [32]

Josefsson et.al [30] fant at A regionen i Sdr-proteinene er ikke helt identiske og de fem Sdr-proteinene, altså ClfA, ClfB, SdrC, SdrD og SdrE, er ca 21-30 % identiske [30, 31]. De er tilstrekkelig relatert hverandre til å kunne konkludere med at de har en felles opphav, men de er forskjellig nok til å si at de binder seg til forskjellige ligander og har forskjellige

funksjoner. Dette kan være et resultat av selektivt trykk for å unngå immunresponser og/eller for å skaffe nye ligandbindende aktivitet [30]. Og siden de tre Sdr-proteinene, SdrC, SdrD og SdrE, bare har 20-30 % identiske aminosyre residue så tyder det på at de har forskjellige roller i *S.aureus* patogenitet [31].

Det er to forskjellige typer B motiver, og hver av de tre Sdr proteinene har minst en B motiv av hvert slag. B motivet som ligger nærmest R-regionen i alle de tre Sdr proteinene er mest relatert lik hverandre med 95-96 % aminosyre residue identitet [30]. Alle B motiver har kation-bindende EF-hand loop, og kan binde Ca^{2+} [28]. Josefsson et. al. [28] uttrykte SdrD som rekombinant protein i *E.coli*, og fant at strukturen til SdrD kollapset til en ufoldet konformasjon ved fjerning av Ca^{2+} . Tilførsel av Ca^{2+} resulterte i gjenopprettelse av den opprinnelige strukturen. Det vil si at B-motivene er avhengige av Ca^{2+} for å beholde sin konformasjon [28].

SdrD vist seg til å fremme adherensen av *S.aureus* til humane desquamated nasal epitelial celler høstet fra humane donorer [32]. Men interaksjons partnere i den humane verten er vanskelig å fastsette. Forskningsgruppa for Vert-Mikrobe interaksjoner (UiT-det arktiske universitet i Tromsø) har preliminare studier som viser at A-regionen til SdrD kan interagere med desmoglein 1 [upublisert data, forskningsgruppe for Vert-Mikrobe interaksjon].

1.3 Oppbygging av dermis og epidermis

Huden er en viktig barriere som beskytter kroppen mot sykdomsfremkallende mikroorganismer [33, 34]. Huden er bygd opp av epidermis som er overhuden og dermis som er lærhuden og ligger under epidermis. I tillegg så bruker noen litteratur begrepet subcutis, det vil si underhuden. Subcutis ligger under dermis og består hovedsakelig av bindevev, inkludert fettvev [33].

Epidermis er den ytterste laget av huden og består av fem lag. Det nederste laget kalles basal laget og består av udifferensierte epidermale keratinocytter formet som søyler/kolonner. Basal laget har ansvaret for stadig fornying av cellene i epidermis ved at de deler seg [35]. Ovenfor basal laget har vi spinous laget, deretter granular laget og helt øverst av epidermis har vi corneal laget. Disse cellene er keratinocytter med økende grad av differensiering. Corneal

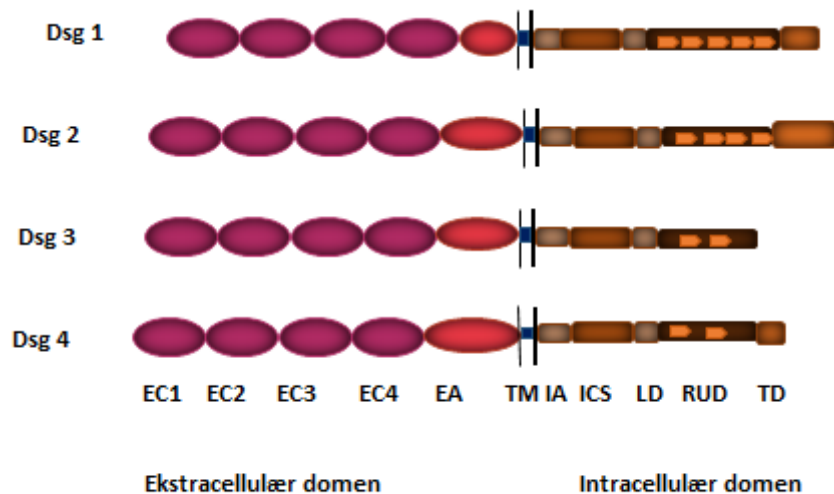
laget, er den mest differensierte cellelaget, og er den viktigste fysiske barriere av huden [34, 35]. Dermis kan deles inn i to undergrupper: den øverste laget heter papillær dermis og den nederste laget heter retikulær dermis [35].

I tillegg til å være en fysisk barriere, er huden også en immunologisk barriere. Det er mange resident immunceller i huden. I epidermis er det dendritiske celler, kalt Langerhans-celler, mens det i dermis, er det dermale dendritiske celler, makrofager, mast celler, T-og B celler, plasmaceller, og NK celler [34, 35]. Hver av disse celletypene kan delta i immunresponser i hud, inkludert vertsforsvar mot patogene organismer. De er også involvert i ulike immunbaserte hudsykdommer slik som atopisk dermatitt og psoriasis [34, 35].

1.4 Desmoglein

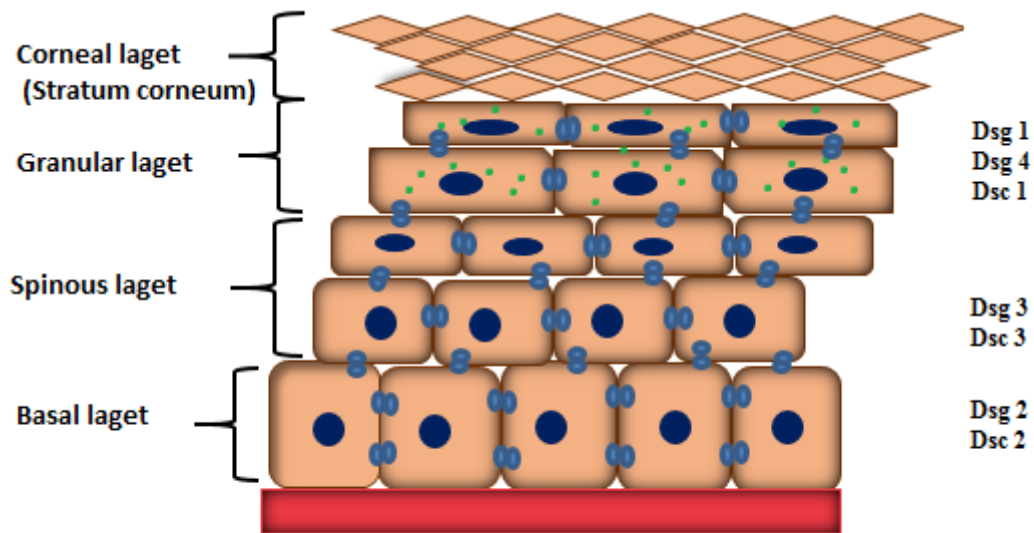
Desmosomer er intracellulære junctions som binder celler til hverandre, og som er i kontakt med en del av cytoskjelettet. Desmosomene gir mekanisk styrke til cellene og dermed stabilitet i vevet. Dermed er desmosomer spesielt viktig i vev som epidermis og hjertemuskler som er kontinuerlig angrepet av mekanisk krefter [36]. Når desmosomal adhesjon svikter, som i visse genetiske og autoimmune sykdommer, kan det vevet som er utsatt for mekanisk stress falle fra hverandre og gi hud eller hjertesykdommer [36].

Desmosomale adhesjonsmolekyler, desmocollin (Dsc) og desmoglein (Dsg), er medlemmer av kaderin familie av kalsiumavhengige adhesjonsmolekyler [36, 37]. Dsc og Dsg inneholder fire ekstracellulære kaderin domener og en femte domene kalt ekstracellulære anker. Disse fem kaderin domener inneholder omtrent 110 aminosyrer hver, og er adskilt av kalsiumbindende motiver. Kalsium støtter kaderin mediert adhesjon ved å la kaderin ekstracellulær domenet til innta en rigid og funksjonell konformasjon [37]. Dsg og Dsc inneholder også en enkel transmembran domene etterfulgt av en intracellulær anker festet på den cytoplasmiske domenen. Desmoglein inneholder også en intracellulær proline-rik linker, et variabelt antall repeat enhet domene og en terminal domene som er glycine-rik (se figur 2) [38, 39].



Figur 2: Strukturell organisering av de fire isoformene av humane Dsg. De ekstracellulære domæne består av fire kadin repeats (EC1-EC4) med 110 aminosyrer hver, og en ekstracellulær anker domene (EA). Den intracellulære domæne av Dsg består av en intracellulær anker domene (IA), en intracellulær kadin-type segment domene (ICS), en linker domene (LD), en repeat unit domene (RUD), en terminal domene (TD). Figuren er modifisert fra Nishifuji et al. [40]

I menneskene finnes det fire isoformer av desmoglein (Dsg 1-4) og tre isoformer av desmocolliner (Dsc1-3) [39, 41]. Dsg2 og Dsg3 er hovedsakelig uttrykt i de nedre lagene av epidermis, mens Dsg1 uttrykkes i alle lag, men nivået øker med graden av celledifferensiering frem til granulært celledag. Dsg4 er hovedsakelig uttrykt i hårsekken, og i den granulære laget. Desmocolliner, Dsc2 og Dsc3, er til stede i de basale og spinous lagene, mens Dsc1 er uttrykt i den granulære laget (se figur 3) [38].



●● Desmosomer

Figur 3: Illustrerer hvor i epidermis de forskjellige desmocolliner og desmogleiner er uttrykt. Denne figuren er modifisert fra Delva et.al. [37]

2. Formål

Gule stafylokokker (*Staphylococcus aureus*) kan være en farlig patogen og forårsaker mange alvorlige livstruende sykdommer. Antibiotika kan være utfordrende på grunn av bakteriens evne til å utvikle bærerskap. Bærerskap er risikofaktor for infeksjon, og en ny profylaktisk strategi er å forhindre kolonisering. Forskningsgruppe for Vert-Mikrobe interaksjon ved UiT har preliminare studier som antyder at SdrD binder seg til Desmoglein 1 (Dsg1), men om den binder til Dsg 1 intracellulært eller ekstracellulært er fortsatt usikkert. Hovedmålet med denne studien er å bekrefte/avkrefte hvorvidt interaksjons mellom SdrD og Dsg1 kan finne sted, og finne ut om bakterien kan binde ekstracellulær og/eller intracellulær del av Dsg 1. For å utføre interaksjonsstudier må intracellulær og ekstracellulær del av Dsg 1 og proteiner med forskjellige tagg (His-tag og GST-tag) isoleres. Dette er dermed delmål for oppgaven.

3. Materialer

Tabell 1: Celler og bakterier brukt i denne oppgaven.

Celler og bakterier	Forklaring	Leverandør / kilde
<i>E.coli</i> DH5	Egner seg til klonings arbeid	HMI
<i>E.coli</i> BL21	Protease defisient, egner seg for protein ekspresjon.	HMI
HEK 293 celler	Human embryonale nyreceller; kan uttrykke proteiner kodet av eukaryote ekspresjonsplasmider	ATCC

Tabell 2: Plasmider brukt i oppgaven.

Plasmid	Forklaring	Leverandør/kilde
Dsg 1 pcDNA-3	Eukaryot ekspresjonsvektor som kan uttrykke Dsg 1 i eukaryote celler	HMI, upublisert
pT7-FLAG-2	Prokaryot ekspresjonsvektor med His-tag C-terminalt for multikloningssete	Sigma
Dsg 1 ekstra-Flag-2	Prokaryot ekspresjonsvektor som uttrykker ekstracellulær del av Dsg 1 med His-tag C-terminalt	HMI, upublisert
Dsg 1 intra-Flag-2	Prokaryot ekspresjonsvektor som uttrykker intracellulær del av Dsg 1 med His-tag C-terminalt	HMI, upublisert
pGEX vektor	Prokaryot ekspresjonsvektor med GST tag	GE Healthcare
pGEX4T-1 SdrDA	A-region av SdrD er klonet bak GST-tag. Fusjonsproteinet	HMI, upublisert

	kan uttrykkes i <i>E.coli</i> BL21	
SdrD pQE30	SdrD klonet i prokaryot ekspresjonsvektor med His-tag N-terminalt. Fusjonsproteinet kan uttrykkes i <i>E.coli</i> BL 21.	HMI, upublisert
CMV 7.1 vektor	CMV 7.1 vektor klonet i eukaryot ekspresjonsvektor	HMI, upublisert
Dsg 1 intra-CMV7.1	Dsg 1 intra klonet i eukaryot ekspresjonsvektor med N-terminal Flag tag	HMI, upublisert
Dsg 1 ekstra-CMV7.1	Dsg 1 ekstra klonet i eukaryot ekspresjonsvektor med N-terminal Flag tag	HMI, upublisert

Tabell 3: Medier/løsninger/buffer brukt i oppgaven.

Medier/ buffere	Innhold/oppskrift	Anvendelse	Leverandør/merknad
Tris-Acetate EDTA buffer (TAE buffer)	1xTAE: 40 mM Tris-acetate 1 mM EDTA	Agarose gel elektroforese	HMI (fellesløsning)
10000x GelRed™ Nucleic Acid Gelstain in water	-	Agarose gel elektroforese	Katalog nr. 41003 (Biotium)
Super optimal broth (SOB) media	2,0 % (w/v) Tryptone 0,5 (w/v) Gjærekstrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl	Tillaging av SOC media	HMI (fellesløsning)
Super optimal broth with catabolite repression (SOC) media	10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose SOB til ønsket volum	Transformasjon	HMI (fellesløsning)

Luria Bertani medium med ampicillin (LB m/100µg/ AMP)	10 g Bacto trypton 6 g Bacto gjær ekstrakt 5 g NaCl ddH ₂ O til 1000 ml 100 µg ampicillin/ml medium	Transformasjon	HMI (fellesløsning)
NZCYM m/AMP	10 g NZ amine 5 g NaCl 5 g Gjærekstrakt 1 g Casamino syre 2 g MgSO ₄ ·7H ₂ O Juster pH til 7 med 5 N NaOH. ddH ₂ O til 1000 ml	Transformasjon	HMI (fellesløsning)
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	-	Splitting av HEK 293 celler	Produkt nr.D6046 (Sigma)
Penicillin/streptomycin 100 µg/ml (arbeidskonsentrasjon)	-	Splitting av HEK 293 celler	Produkt nr. P4333 (Sigma)
Heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS)	-	Splitting av HEK 293 celler	Produkt nr. PO781 (Sigma)
Trypsin	250 µg/ml bovine trypsin i 200 mM ammonium bikarbonat (pH=8,9)	Splitting av HEK293 celler	Produkt nr. T3924 (Sigma)
Phosphate Buffered Saline (PBS buffer)	1xPBS: 1boks PBS Dulbecco without Ca ²⁺ /Mg ²⁺ i 5 L MQH ₂ O	Vaskeløsning for celloarbeid. Protein rensing. Western blot.	Katalog nr. L 182-05 (Biochrom AG)
PBST	1xPBS med 1 % Triton x-100	Protein rensing	Triton x-100: produkt nr. T8787. (Sigma)
Protease inhibitor cocktail	1 Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablett i 2 ml ddH ₂ O	Protein rensing	Produkt nr.11697498001 (Roche)
PBST m/ Protease inhibitor	200 µL protease inhibitor cocktail per 5 ml PBST	Proteinrensing	PBS: Katalog nr. L 182-05 (Biochrom AG) Complete EDTA-free

			protease inhibitor cocktail tabletter: produkt nr.11697498001 (Roche)
Lysis buffer	50 mM Tris HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton x-100, 1 mM EDTA, 1mM DTT	Co-immunopresipitering (co-IP)	1000 mM Tris-HCl pH=8.0: (HMI fellesløsning) 5000 mM NaCl: (HMI fellesløsning) Triton x-100: produkt nr. T8787 (Sigma) 500 mM EDTA: (HMI fellesløsning) DTT: produkt nr. 43816 (Sigma)
Lysis buffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8,0	His-protein rensing	HMI (fellesløsning)
Wash Buffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8,0	His-protein rensing	HMI (fellesløsning)
Elution buffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8,0	His-protein rensing	HMI fellesløsning)
1xNuPAGE running buffer	NuPAGE MES SDS running buffer (20x), MQH ₂ O	SDS-PAGE	Katalog nr. NP0002 (Novex Life technologies)
1 M DL-Dithithreitol løsning (DTT)	3,09 g dithiothreitol i 20 ml 0,01 M Natriumacetat (pH 5.2)Steriliseres ved filtrering	SDS-PAGE	Produkt nr. 43816 (Sigma)
Nupage LDS sample buffer (4x)	106 mM Tris-HCl 141 mM Tris-Base 2 % LDS 10 % Glycerol 0,51 mM EDTA 0,22 mM SERVA	SDS-PAGE	Produkt nr.1296678 (Novex Life technologies)

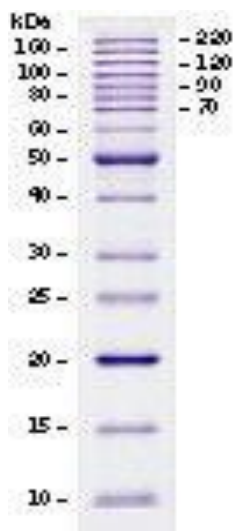
	Blue G250 0,175 mM Phenol Red pH 8.5 Tilsett dH ₂ O		
Blotting buffer	5,8 g Trisma base, 29 g Glyzine, 200 ml Methanol, 800 ml dH ₂ O	Western blot	Trisma base: produkt nr. 93350 (Sigma) Glyzine: produkt nr.33226 (Sigma) Methanol: produkt nr.32213 (Sigma)
Blokkering buffer	50 ml 1xPBS, 2,5 g Dry non-fat milk-Sucotin mager milch pulver leicht löslich, 1 % Tween	Western Blot	Dry non-fat milk: produkt nr. ST00227 (TSI GmbH) Tween 20: product nr. 1379 (Sigma)
Fixation løsning	50 % Ethanol 20 % Aceticacid i dH ₂ O	For fiksering av proteiner etter SDS- PAGE	HMI (fellesløsning)
Coomassie blue løsning	50 % methanol, 10 % glacial acetic acid, 0,05 % coomassie brilliant blue R-250 50 % dH ₂ O	Farging av proteiner etter SDS-PAGE	Produkt nr. 27816 (Sigma)
Destaining løsning	200 ml ethanol, 100 ml glacial acetic acid 700 ml ddH ₂ O	For avfarging av proteiner etter SDS- PAGE	HMI (fellesløsning)
PageBlue protein staining løsning	-	Farging av gel etter SDS-PAGE	Produkt nr. 24620 (Thermo Scientific)
Tris-buffered Saline (TBS buffer)	10mM Tris-Cl 150 mM NaCl pH 7.4 i dH ₂ O	For vasking av resin kuler (co-IP)	HMI (fellesløsning)
0,1 M Glycin-HCl, pH 3.5	11,1 g Glycine- HCl 800 ml dH ₂ O Juster pH til 3,5 med HCl	For vasking av resin kuler (co-IP)	HMI (fellesløsning)
ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel	-	co-IP	Katalog nr.: A2220 (Sigma)

Tabell 4: Protein/DNA ladder brukt i oppgaven.

Ladder	Leverandør
BenchMark™ protein ladder	Produkt nr: 1371018 (Novex Life Technologies)
MagicMark™ XP western protein standard	Produkt nr 1552298 (Novex Life Technologies)
1 kb pluss DNA ladder	Produkt nr. 1305746 (Invitrogen)
SeaBlue Plus 2 Prestained Standard (1x)	Produkt nr. LC5925 (Novex by Life Technologies)

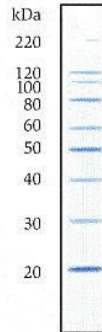
Figur 4: Bilde av DNA/protein ladder brukt i oppgaven

4 A) BenchMark™ protein ladder:



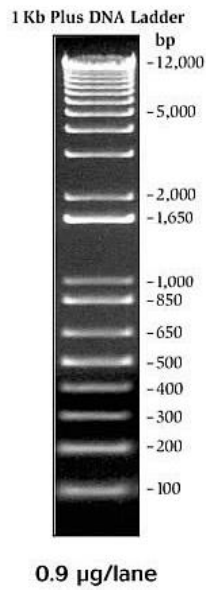
4 B) MagicMark™ XP western protein standard:

**Figure 2 - MagicMark™ XP Standard
visualized with Coomassie®
stain on an SDS-PAGE gel**



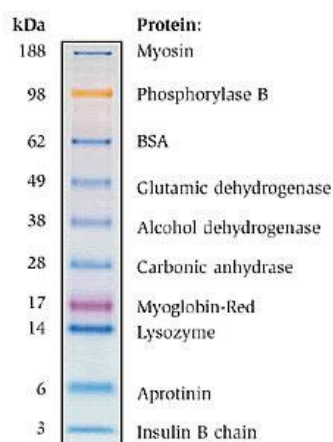
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel with MES
SDS Running Buffer, stained with
SimplyBlue™ SafeStain.

4 C) 1 kb plus DNA ladder



4 D) SeaBlue Plus 2 Prestained Standard (1x):

Apparent molecular weights of SeeBlue®
Plus2 Pre-Stained Standard on a NuPAGE®
Novex 4-12% Bis-Tris Gel w/MES



Tabell 5: Primere brukt i oppgaven.

Primer navn	Primer sekvens (5'-3' sekvens oppgitt)	Leverandør
Dsg Flag intra Rv	ACCACCGGTACCCTTGCTATATTGCAC	Sigma
Dsg Flag intra Fw	GTGGTAAGCTTTGTGATTGTGGAGGTG	Sigma
Dsg Flag xtra Rv	ACCACCGGTACCATGTACATTGTCTGATAAC	Sigma
Dsg Flag xtra Fw	GGTGGTAAGCTTGAATGGATCAAGTTC	Sigma
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	Sigma
PT7-Flag 2 RV 1	TTCTGCGTTCTGATTTAATCT	Sigma
PT7-flag 2 RV2	AATCTTCTCTCACTCGTCGA	Sigma
T7 universal	TAATACGACTCACTATAGGG	Sigma
FLAG-Dsg 1 intra	AAACGGAGCCAAAGATTTGTT	Sigma
FLAG-Dsg 1 xtra	CAGCTCGAAGTCGAATCACA	Sigma

Tabell 6: Antistoffer brukt i oppgaven.

Antistoff	Formål	Leverandør
Monoclonal Anti-Flag® M2	Primært antistoff. Brukes for å detektere Flag taggede Dsg 1 proteiner	Produkt nr. F3165 (Sigma)
Rb pAB GST	Primært antistoff. Brukes for å detektere GST tagget proteiner	Produkt nr.ab9085 (Abcam)
Anti-SdrD A region Igt	Primært antistoff. Brukes for å detektere SdrD proteiner	Gave fra Dr.Elisabet Josefsson
Polyclonat swine anti-Rabbit immunoglobulins/HRP	Sekundær antistoff. Brukes for å detektere primært antistoff	Produkt nr. 00069121 (Dako)
Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins HRP	Sekundær antistoff. Brukes for å detektere primært antistoff	Produkt nr. P0260 (Dako)
Phospho-NF-kappaB p65 antibody	Brukt I co-IP for å fjerne uspesifikke bindinger til antistoff	Produkt nr. 3037S (Cell signaling technology)

4. Metoder

4.1 Isolering av plasmid DNA

Isolere high-copy plasmid DNA fra E.coli (ved bruk av Nucleospin plasmid/ plasmid (NoLid)kit)

Med en NucleoSpin plasmid metode så vil bakteriepelleten som inneholder ønsket plasmid bli resuspendert i Buffer A1 og plasmid DNA blir deretter frigjort fra *E.coli* etter tilsetning av SDS/alkaline lysis buffer (Buffer A2). Buffer A3 nøytraliserer cellelysaten og gjør i stand plasmid DNA til å binde seg til silica membranen av NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid). Rester av celler, proteiner og genomisk DNA blir fjernet ved en enkel sentrifugerings steg. Supernatanten med plasmid DNA blir overført til en ny NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid) kolonne etterfulgt av et vaskesteg der kontaminering som f.eks. salter, metabolitter, og løselige makromolekylær blir fjernet. Deretter blir plasmid DNAet eluert med en svak alkalisk buffer kalt AE Buffer (5mM Tris/HCl, pH 8,5) [42].

1,5 ml av overnattskultur av *E.coli* med ønsket plasmid (Dsg 1-pcDNA 3 og pT7-Flag-2) ble overførte til 1,5 ml eppendorfrør. Bakteriene ble pelletert ved hjelp av 2 min sentrifugering i Kubota 3500 ved 11.000xg ved rom temperatur. Supernatanten ble deretter fjernet. Nye 1,5 ml av overnattskulturene ble tilsatt til samme eppendorfrør med bakteriepelleten før ny sentrifugering ble utført. Dette ble gjort totalt 3 ganger for å oppnå større mengde bakterieceller. For å isolere plasmid, ble mini kittet Nucleospin plasmid-nucleic acid and protein purification fra Machery-Nagel, katalog nr. 1112/006, brukt. Bakteriepelletene ble resuspendert med 250 µL Buffer A1. Deretter ble 250 µL Buffer A2 tilsatt, og innholdet ble blandet forsiktig ved å snu eppendorfrørene opp og ned 6-8 ganger. Deretter ble eppendorfrørene inkubert ved rom temperatur for 2 min for å få effektiv cellelysis. 300 µL Buffer A3 ble tilsatt til eppendorfrørene og innholdet ble blandet ved å snu opp og ned 6-8 ganger. Sentrifugerte for 5 min ved 11.000xg ved romtemperatur. I mellomtiden ble NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid) kolonne plassert i en oppsamlingsrør (ca. 2 ml). 750 µL av lysatet ble overført til kolonnen, og kolonnen ble sentrifugert i 1 min ved 11.000xg. Under prosessen vil plasmidet binde seg til kolonnen, mens resten havner i oppsamlingsrøret. Etter at supernatanten var fjernet fra oppsamlingsrør, ble NucleoSpin kolonnen plassert tilbake og tilført mer cellelysat. Prosedyren ble gjentatt. I mellomtiden ble Buffer AW

oppvarmet til 50 °C på vannbad. 500 µL av AW Buffere ble tilsatt til kolonnen for å vaske plasmid DNA, og kolonnen ble sentrifugert for 1 min ved 11.000xg. Kolonnen ble tilsatt 600 µL Buffer A4 for ny vasking, og sentrifugert for 1 min ved 11.000xg. Supernatanten fra oppsamlingsrør ble fjernet og kolonnen ble sentrifugert for 2 min ved 11.000xg. Deretter ble oppsamlingsrøret fjernet. Til slutt skulle plasmid DNA elueres ut fra kolonnene. Da ble disse plassert på et sterilt 1,5 ml eppendorffør og tilsatt 35 µL Buffer AE, og inkubert i 1 min ved romtemperatur. NucleoSpin kolonnen ble fjernet og eppendorfførene med plasmid DNA ble oppbevart ved -20 °C.

4.2 Polymerase chain reaction (PCR)

PCR brukes til å amplifisere (lage mange kopier) av en spesifikk DNA sekvens i en test rør. Teknikken kan brukes til å lage korte sekvenser for eksempel et gen eller en del av et gen, eller hele plasmider kan amplifiseres mens man innfører sete-spesifikk mutasjon [43].

Det er 3 trinn i denne metoden:

Trinn 1 Denaturering: PCR ble utført med en syklus initial denaturering trinn ved temperatur 98 °C i 30 s, deretter en denaturering trinn der PCR maskin varmet opp blandingen til ca. 98 °C i 10 s. Det dobbeltrådige templatet (for eksempel Dsg1 pcDNA3) denatureres siden hydrogenbindingen mellom nukleotidene i spiralen brytes, og blir til to enkel DNA tråder [43].

Trinn 2 Hybridisering (annealing): PCR blandingen ble avkjølt til ca. 55-64 °C for denne temperaturen skal være lav nok til at primerne kan binde seg til templatet. Primere er korte DNA-fragmenter på 15-30 basepar som er komplementære til hver sin ende av DNA som skal kopieres. I PCR trengs det 2 primere (primerpar), en i starten på genet (forward) og en i slutten (revers) [43]. Når primerne binder til templatet kan polymerasen (Phusion DNA polymerase), et enzym, syntetisere nytt DNA. Størrelsen på en primer er normalt 20-30 baser, og hvor høy temperaturen i dette trinnet kan være er avhengig av størrelsen; for at en primer skal kunne feste seg, må temperaturen være under smeltepunktet til primeren, vanligvis ca. 5-10 °C under. Smeltepunktet varierer med størrelsen til primere slik at store primere har høyt smeltepunkt [43]. Primeren som ble brukt i denne forskningen har et smeltepunkt på ca.70 °C. Man kan gjøre en gradient PCR, hvor man kjører PCR med flere ulike annealingstemperatur. I

denne oppgaven ble det gjort en gradient PCR der prøvene ble satt i 5 forskjellige annealing temperaturer, 64 °C, 62,2 °C, 60,5 °C, 56,7 °C, 55,6 °C (negativ kontroll) og 55 °C. Tiden som trenges for annealing kan avhenge av enzym brukt i PCR [43]. For enzymet brukt i oppgaven beregner man 15-30 s/kb. Dsg 1 genen er 1,5 kb og vil da trenge annealing tid: 30 sek*1,5kb=45 sek.

Trinn 3 Polymerisering (Extensions): Mål-DNA blir syntetisert av DNA polymerase fra primerne. Dette skjer ved ca. 72 °C i 45 s. Ved oppvarming til 98 °C ved denatureringen vil DNA polymerase fra *E. coli* ødelegges. Hvis man skal slippe å tilsette ny polymerase for hvert polymeriseringstrinn, må det brukes et enzym som tåler høyere temperaturer. Derfor ble det brukt en varmestabil DNA polymerase, kalt Phusion DNA polymerase. Denne fungerer best ved 72 °C. DNA-syntesen går fra den frie 3' OH-enden på begge primere. Primer 1 syntetiserer den ene DNA-tråden, mens primer 2 syntetiserer den andre. De to første produktene vil være halvlange, siden flankerende DNA fra bare den ene siden (før primeren) er borte fra det opprinnelige templatet. Og til slutt en Final Extensions trinn ved 72 grader i 10 min og da er den ferdig med 1. syklusen [43].

Gradient PCR metoden, beskrevet ovenfor, ble utført i en Bio-rad T100Tm thermal cycler PCR maskin. PCR maskinen vil alternere temperaturen som skissert over, og PCR produktet vil bli dannet. Disse inneholder mål-DNA og primere (flankerende DNA fra den andre siden er også fjernet). Antall PCR produkt vil øke eksponentielt. Totalt ble det gjort 30 sykluser.

I praksis ble en mastermiks uten templat laget (se tabell 7). PCR ble utført med Dsg1 pcDNA 3 som templat. Primerne var rettet mot ekstracellulær del av Dsg 1 og intracellulær del av Dsg 1, og dermed ble det laget to mastermikser, en for intracellulært og en for ekstracellulært. For å se om det er forurensning i noen av komponentene ble det brukt en negativ kontroll som inneholdt bare mastermiks og ddH₂O.

Tabell 7: Mastermiks for PCR blanding.

Komponent	Innhold i et PCR rør (total volum 50µL)	Konsentrasjon (sluttkonsentrasjon)	Master miks til 7 reaksjoner (50 µL*7=300 µL)
ddH ₂ O	Add til 50 µL dvs. skal tilsette 35,5 µL		250 µL
5X Phusion HF Buffer	10 µL for 1X kons. Phusion HF Buffer	1X	70 µL
10 mM dNTPsigma D7245	1 µL	200 µM hver	7 µL
*10 µM Forward primer	1 µL	10 µM	7 µL
*10 µM Revers primer	1 µL	10 µM	7 µL
Phusion DNA Polymerase	0,5 µL	0,02 U/µL	3,5 µL
Templat DNA(Dsg1 pcDNA-3)	1 µL (bruker ca. 50 ng som templat, tilsettes til slutt)		-
	I hver gradient PCR rør tilsettes det totalt 50 µL		

**merknad: PCR ble utført med forskjellige primere (Se tabell 5). Primeren skrevet i tabell 7 er bare et eksempel.*

4.3 Agarose gel elektroforese

For å separere DNA ble prøvene kjørt på agarose gel. Ved hjelp av en gel elektroforese kan man separere organiske molekyler ved ulike størrelser. Metoden kan separere DNA-fragmenter mellom 200 basepar til ca. 50kb. DNA molekylet er negativ ladd, og jo mindre partiklene er, jo raskere og lenger vil de vandre mot pluss polen. Fragmentene kan skjæres ut av gelen, renses og benyttes blant annet i kloning [44]. Dsg 1 ekstracellulær (Dsg 1 ekstra) er 1448 basepar (bp) og Dsg 1 intracellulær (Dsg 1 intra) er 1440 basepar (bp).

Til PCR produktene (Dsg 1 ekstra og Dsg 1 intra), i sluttvolum 50 µL, ble det tilsatt 10 µL 6xLoading buffer (LD) og sentrifugert raskt. LD bufferen bidrar med tyngde til DNA prøven, og letter applisering på agarose-gel. Agarose-gelen ble laget ved å veie opp 1 g agarose som ble overført til en erlenmeyerkolbe, og tilsatt 100 ml 1xTAE-buffer. Varmet opp agarose løsningen i mikrobølgeovn for ca. 2 min til all agarosen ble oppløst og løsningen ble klar. Kjølte ned løsningen litt ved å sette erlenmeyerkolben i kaldt vann. Tilsatt 7 µL Gel-Red (DNA-farge) til gelen og helte gel-miksen over i gel-formen. Brønner ble laget ved en kam,

som stod i gel-formen til agarose-gelen stivnet. Lot gelen stivne i 15 min. Det ble tilsatt TAE-Buffer i hver ende av gel-formen til den dekker formen. Tilsatt ddH₂O i midten (der vi har gelen) til den dekker over gelen. Fjernet brønn-kammeret. Tilsatt 15 µL kb plus DNA ladder i første brønnen, deretter ble det tilsatt 30 µL av prøven i hver brønn. Satt i ladningene, minus der prøven ble ladet og pluss side på den motsatte slik at DNAet som er negativ ladet trekker seg mot pluss polen. Gelen ble kjørt på 90 Volt i 45 min.

4.4 Rensing av DNA fra TAE agarosegel

IllustraGFX PCR DNA og Gel Band Purification Kit ble brukt for rensing av DNAet etter agarose-gel bånd. DNA fra størrelse 50 bp opp til 10 kb kan bli renses fra volum opp til 100 µL og fra gel biter opp til 900 mg, derfor er det viktig å ta med minst mulig gel i eppendorfrøret når man skal renses. Capture buffer type 3 inneholder en pH indikator som forandrer fargen ved forskjellige pH nivåer slik at det er enklere å se om prøveløsningen er ved den optimale pHen. For når pHen er optimal så vil DNAet binde seg effektivt til silica membranen. Den optimale pHen er mindre eller lik 7,5 og da vil capture buffer type 3 prøveløsning være gul eller svak oransje. Hvis pHen er større enn 7,5 så vil løsningen forandre fargen til mørke rosa eller rød, og da er DNAet ikke effektivt nok til å kunne binde seg til silica membranen. For å få bort uønskede produkter fra løsningen brukes det en Wash buffer type 1, og til slutt for å eluere ut DNAet brukes det en Elution buffer type 4 [45].

Sentrifugerings maskin som ble brukt under forsøket er Kubota 3500.

Agarose gelen fra gel elektroforesen ble utsatt for UV lys slik at det er enklere for å se DNAet som skal renses. Ved bruk av en steril skalpell ble DNAet kuttet ut fra gelen og overført i en 1,5 ml eppendorfrør. Minst mulig gel ble tatt med i røren. Til eppendorfrøret med DNA ble det tilsatt 300 µL Capture buffer type 3 fra illustraTM 6FXTM PCR DNA and Gel band purification kit, katalog.nr 28-9034-71. Prøven ble inkubert ved 60 °C for ca. 20 min til all agarose gel ble løst opp. Prøven ble blandet ved å snu forsiktig røren opp og ned hver 3. min. En GFX MicroSpin kolonne ble plassert i en oppsamlingsrør. Capture buffer type 3 prøveløsningen ble sentrifugerte, og 800 µL av løsningen ble overført til GFX MicroSpin kolonnen med oppsamlingsrør. Løsningen ble inkubert ved rom temperatur i 1 min, og deretter spant ned ved 16 000 x g i 30 sekunder. Supernatanten fra oppsamlingsrøret ble fjernet og steget ble gjentatt til all capture buffer type 3 løsningen har gått gjennom kolonnen.

Tilsatt 500 μL Wash Buffer type 1 til kolonnen og spant ned ved 16 000 x g i 30 sekunder. Fjernet oppsamlingsrøret og kolonnen med DNAet ble plassert i et sterilt 1,5 ml eppendorfrør. For eluering av DNA ble det tilsatt 25 μL Elution buffer type 4 til midten av kolonnen og inkubert ved rom temperatur i 1 min. Sentrifugerte ved 16 000 x g i 1 min. Kolonnen ble fjernet og DNAet i eppendorfrøret ble oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5 Måling av DNA konsentrasjon ved NanoDrop

Måling av konsentrasjon og renhet av DNA ble utført ved å bruke NanoDrop spektrometer ND-1000. Før måling av DNA konsentrasjon ble pidestallene rengjort med 1 μL ddH₂O. Deretter ble maskinen klargjort ved å tilsette 1 μL ddH₂O direkte til pidestall, og pidestallen ble lukket før man trykker "BLANK". For hvert DNA måling, ble 1 μL av prøven tilsatt til pidestall, og pidestallen ble lukket og DNA konsentrasjon ble målt ved A₂₆₀ ved å trykke "MEASURE". Etter hver måling ble pidestallen renset med ddH₂O.

4.6 Restriksjonsenzym kutting

Restriksjonsenzymmer bindes spesifikt og kutter dobbeltrådige DNAer i spesifikke seter kalt restriksjonsseter. Restriksjonsenzymmer har blitt klassifisert i tre grupper, der type II er den mest benyttede i molekylær kloning. For eksempel enzymet HindIII tilhører type II enzymer. Disse enzymene er endonukleaser som gjenkjenner spesifikke sekvenser vanligvis på fire til seks nukleotider med palindrom symmetri, og vil kutte i denne sekvensen. Noen enzymer kutter begge trådene akkurat i symmetriaksen og danner DNA-fragmenter med såkalte "blunt-ends". Andre kutter hver tråd på likt sted og motsatt side av symmetriaksen slik at det dannes såkalte "sticky-ends" [46] .

Formålet med restriksjonsenzym kutting var å kutte pT7-Flag-2 vektor, Dsg 1 intra og Dsg 1 hver for seg med enzymene KpnI og HindIII, og deretter kunne ligere inn Dsg 1 intra og Dsg 1 ekstra i pT7-Flag-2 vektor. Prøveløsning for restriksjonsenzymkutting ble laget i henhold til tabell 8.

Tabell 8: Tillaging av prøveløsning for restriksjonsenzym kutting

Reaksjon nr.	Hva	DNA (µL)	KpnI (µL)	Hind III (µL)	10x NEB2 (µL)	ddH ₂ O til 25 µL	BSA10 x (1 µL)
1	pT7-FLAG-2 vektor	1,5	1,25	1	2,5	17,75	1
2	pT7-FLAG-2-tester enzym	1,5	1,25	-	2,5	18,75	1
3	pT7-FLAG-2-tester enzym	1,5	-	1	2,5	19	1
4	pT7-FLAG-2-uten enzym	1,5	-	-	2,5	20	1
5	Dsg1 intra	10	0,6	0,4	2,5	10,5	1
6	Dsg1 ekstra	10	0,6	0,4	2,5	10,5	1

Rør nr. 4 skal ikke kuttes og dermed ble det tilsatt 1,5 µL pT7-FLAG-2 uten noen enzym. Til rør nr. 5 ble det tilsatt 10 µL Dsg 1 intra PCR produkt og til rør nr. 6 ble det tilsatt 10 µL Dsg 1 ekstra PCR produkt. Reaksjon 2-4 er kontrollreaksjoner, der 2 og 3 testet om enzymene fungerer. Prøvene ble inkubert på 37 grader i 3,5 timer, og deretter kjørt på agarose-gel.

4.7 Ligering av Dsg 1 ekstracellulært og intracellulært PCR produkt inni pT7-Flag-2 vektor

Ligering er en prosess som setter sammen to stykker av lineære DNA inn i et enkelt stykke ved hjelp av et enzym kalt, DNA ligase. DNA ligase katalyserer dannelsen av en fosfodiester binding mellom 3'-hydroksylgruppen på den ene delen av DNAet og 5'-fosfatgruppen på den andre delen av DNAet. Den mest brukte DNA ligase er T4 DNA ligase [47].

Dsg 1 ekstra og Dsg 1 ekstra ble amplifisert ved hjelp av PCR, kjørt på agarose gel elektroforese, og deretter rensset, og til slutt kuttet med restriksjonsenzymene, KpnI og HindIII. Nå skal Dsg1 ekstra og intra liggeres inn i pT7-Flag-2 vektor ved hjelp av T4 DNA ligase. Det ble satt opp tre reaksjoner for hver Dsg1 domene: med forskjellig volum (konsentrasjon) av DNA. Prøveløsning for ligering ble laget i henhold til tabell 9.

Tabell 9: Tillaging av prøveløsning for ligering av Dsg 1 ekstra og Dsg 1 intra inni pT7-Flag-2 vektor

Hva	Reaksjoner						
	1	2	3	4 kontroll	5	6	7
T4 buffer 10x	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
pT7	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Dsg1 intra	0,5 µL	2,5 µL	5 µL	-	-	-	-
Dsg1 ekstra	-	-	-	-	0,5 µL	2,5 µL	5 µL
ddH ₂ O	16 µL	14 µL	11,5 µL	16,5 µL	16 µL	14 µL	11,5 µL
T4 ligase	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL

Prøveløsningene som ble laget i henhold til tabell 9 ble blandet inni et 1,5 ml eppendorfrør, og deretter inkubert 2 timer på rom temperatur. Deretter ble ligerings reaksjoner transformert inni kompetente *E.coli* DH5 celler (se seksjon 4.8).

4.8 Transformasjon av kompetente *E. coli* celler

Transformasjon er en teknikk som introduserer et fremmed plasmid inni en bakterie. DNA kan bli tvunget inni kompetent celler ved å inkubere cellene og DNA samlet på is, deretter gi en kort varmesjokk ved 42 °C, og til slutt sette tilbake på is. Cellene blir deretter plate ut på en agarplate med antibiotika. Under kloning når formålet var å arbeide med proteiner, ble de forskjellige plasmidene (Dsg 1 ekstra-pT7-Flag-2 og Dsg 1 intra-pT7-Flag-2) transformert inni *E.coli* BL 21, en protease mangelfull stamme som er egnet for transformasjon og protein ekspresjon. BL 21 er mangelfull for Ion og ompT proteaser som er med på å degradere proteiner i cellen [48].

14 ml falcon rør ble satt på is til avkjøling. Kompetente *E.coli* DH5 eller BL 21 celler ble hentet fra -70 °C fryser og tinet på is i ca. 30 min. Deretter ble cellene pipetert forsiktig opp og ned et par ganger før 200 µL ble overført til avkjølte falcon rør. Deretter ble 1,5 µL DNA plasmidene (for eksempel Dsg 1 intra-pT7-Flag-2 og Dsg 1 ekstra-pT7-Flag-2) tilsatt til hver sitt rør med *E.coli* celler. DNA/bakterie blandingen ble inkubert på is i 30 min. Cellene ble varmesjokket ved 42 °C i 90 sekunder, og deretter inkubert på is i 90 sekunder. Deretter ble

800 µL SOC tilført falcon røren under sterile omstendigheter. Falcon rørene ble inkubert ved 37 °C på rist ved 225 rpm i 45-60 minutter. Deretter ble 200 µL av bakterie kulturen platet ut på en LB m/100µg/AMP plate. Platene ble inkubert ved 37 °C overnatt. En negativ kontroll der alt av løsninger ble tilsatt utenom DNA ble inkludert, og platet ut på LB m/100µg/Amp plate for å sjekke om det er noen forurensinger til stede.

4.9 Sekvensering av DNA

UNN/Uit Big Dye V3.1 sequencing protocol

Basert på BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit protocol

DNA-sekvensering er en prosess for å bestemme den nøyaktige rekkefølgen av nukleotider i et DNA-molekyl. Under sekvensering vil DNA polymerasen binde til en enkel trådet DNA templat og syntetiserer den komplementære tråden av DNAet. Når DNA polymerasen inkorporerer tilfeldig en fluorescensmerkede ddNTP, avslutter syntesen. Dette trinnet produserer en blanding av nylig syntetiserte DNA-tråder som er forskjellige i lengde med et enkelt nukleotid. Hver tråd er merket ved 3' -enden med en fluorescensmerkede ddNTP. DNA-blandingen blir separert ved elektroforese. Electropherogram blir brukt til å bestemme sekvensene av de nylig syntetiserte DNA-trådene [49]. Sekvensering kan brukes for en endelig bekreftelse på at ønsket DNA sekvens er klonet inni tenkt vektor.

Følgende mulige positive kloner med Dsg variant i pT7-Flag-2 ble sekvensert; Dsg 1 intra klon 1, 2 og 4, og Dsg 1 ekstra klon 1,2 og 3. Ved sekvensering ble det tilsatt ca.150-200 ng templat til hvert rør. En forward primer og en reverse primer ble brukt for de ulike templatene, men kun en primer ble tilsatt til hver prøve. Det vil si for eksempel til Dsg 1 intra klon 1 prøve 1 ble det tilsatt Dsg intra forward primer, deretter til Dsg 1 intra clone 1 prøve 2 ble det tilsatt Dsg 1 intra revers primer osv ... Primerne hadde en konsentrasjon på 100 µM, men ble fortynnet til 0,32 µM. Til hver prøve ble det tilsatt 2 µL templat DNA, 1 µL Big-Dye v3.1, 3µL 5x sequencing buffer, 1µL primer, og tilslutt ble det tilsatt ddH₂O opptil 20 µL. Det totale volumet av hver prøve ble 20 µL. Alle prøvene ble blandet i PCR rør, og PCR røren ble satt inni PCR maskinen, Bio-rad T100Tm Thermal cycler. Maskinen ble innstilt på følgende måte; temperatur 96 °C i 5 min 1x syklus, 96 °C 10 s, 50 °C 5 s, 60 °C 4 min 25 x sykluser, og tilslutt 4 °C og tid uendelig. Programmene BioEdit og BLAST som brukes for å sammenligne mottatte nukleotid sekvenser mot det opprinnelige nukleotid sekvensen av

DNAet [50], ble brukt til å analysere resultatene fra sekvenseringen og for å se om de ulike plasmid DNAene har blitt klonet inn riktig.

4.10 Isolering og rensing av proteinene GST, GST-SdrD og His-SdrD

De ulike proteinene av interesse er enten GST-tagget (Glutathione-S-transferase) eller His-tagget. Disse taggene kan bli brukt i protein isolering. GST-tagget proteiner er uttrykt fra pGEX4T-1 vektor (fra GE healthcare). pGEX4T-1 vektor inneholder et gen som koder for GST, og GST er et enzym som binder seg spesifikt til glutathione molekyler. GST domen av fusjon proteinet binder med høy affinitet til glutathione som er koblet til sepharose kuler. Kuler som er bundet til proteinet er pelletert ved sentrifugering, og supernatanten blir fjernet og kulene blir vasket flere ganger for å fjerne ubundne proteiner. Fusjons protein blir eluert ved å tilsette høy konsentrasjon av frie glutathione som konkurrerer med immobilisert ligand for GST binding [51].

His-taggede protein ekspresjon fra pQE30 kan bli fanget opp av Ni-NTA Spin Kit fra Qiagen. Dette er en metode for rask rensing av 6xHis-tagget proteiner ved bruk av Ni-NTA spinn kolonner som er ladet med nikkel ioner. Det høye affiniteten av Ni-NTA resiner for 6xHis-taggede proteiner skyldes både spesifisitet av interaksjonen mellom histidin rester og immobilisert nikkel ioner og til styrken som disse ionene har for NTA resin [52].

4.10.1 Indusere uttrykk av His-SdrD og GST-proteiner

Det ble laget en overnattskultur av følgende bakteriekulturer; pGEX vektor (også kalt GST tom vektor), pGEX4T-1 SdrD_A (SdrD_A-GST), SdrD in PQE30 (His-SdrD_A). Det ble tilsatt 15 ml LB m/100µg/Amp medier i 3 forskjellige 100 ml erlenmeyerkolbe. Bakteriekulturene ble tatt opp ved hjelp av en liten ause og deretter ble ausen rørt godt i hver av bakterienes erlenmeyerkolbe og lot den stå til inkubering (på rist) ved 37 °C til natta over. Dagen etter ble overnattskulturene fortennet 1:20 i LB m/100µg/Amp medier. Det ble tilsatt 7,5 ml overnattskultur til hver av erlenmeyerkolbene med 150 ml LB m/100 µg/Amp medier. Løsningene ble satt på rist ved 37 °C, brukte Heitolph unimax 2010 shaker. Mens løsningene står til inkubering, ble det målt OD₆₀₀ ved hjelp av maskinen Pharmacia Biotech Ultrospec 2000. OD₆₀₀ ble målt til 0,6. LB m/100 µg/Amp media ble brukt som referanse og den ble

målt til 0,00 A ved å trykke Set Ref. på maskinen, og deretter ble prøvene målt. Dette ble gjort ved første gang mellom hver måling, altså referanse ble målt først, og deretter ble prøvene målt etter hverandre. I kyvetten ble det tilsatt 1,5 ml prøve ved hver måling. Første måling ble gjort før inkubering. *E.coli* har eksponentiell vekst, så dermed kan OD gå fort opp etter en stund, og derfor ble prøvene målt oftere når det nærmet seg OD= 0,6. Når OD=0,6 ble det tilsatt 150 µL 1M IPTG i hver erlenmeyerkolbe med bakteriekultur. Deretter ble bakteriekulturene satt til inkubering. Bakteriekultur med His-SdrD ble satt til inkubering ved 37 °C i 4 timer, GST-SdrD ble inkubert ved 20 °C i 2 timer og GST ved 20 °C i 2 timer. Etter inkubering ble bakteriekulturene overført til 50 ml falconrør og sentrifugert ved 4000 rpm i 10 min ved 4 °C. Maskinen Beckman coulter SX4750A rotor ble brukt til sentrifugering. Bakteriepelletene ble oppbevart ved -20 °C.

4.10.2 Rensing av proteinet GST og GST-SdrD_A

Bakteriepelleten ble resuspendert i 1 ml PBST m/ protease hemmer, og nå vil proteiner løse seg opp og tritonen som ble tilsatt i PBS vil da bryte ned hydrofobe bindinger i proteinene. Proteaser vil binde seg til proteiner og degraderer dem. For å unngå dette ble det tilsatt en protease hemmer slik at proteinene vil ligge igjen i løsningen og dermed blir det enklere å fiske ut proteinene GST og GST-SdrD_A. Løsningen ble sonikert, ved hjelp av Sonicater heat system-Ultrasonic inc maskin, på is 3-5x i 10 sekunder. Å sonikere vil si at det brukes en lydbølge til å sprengte bakteriene slik at proteiner og alt det andre vil ligge ut i løsningen, så det blir enklere å fiske ut det proteinet som er ønskelig. Supernatanten ble overført til en 1,5 ml eppendorfrør. Eppendorfrøren ble spant ved 13000 rpm, i 10 min ved 4 grader. Nå vil GST proteiner og GST-SdrD_A ligge i supernatanten og alt det andre som ikke trenger ligger da i pelleten. Supernatanten ble overført til et sterilt 1,5 ml eppendorfrør. Det ble tilsatt 100 µL 50 % glutathion kuler m/PBST, og deretter ble eppendorfrøren plassert på en rotator (lykkehjul) for 60 min ved 4 grader. Nå vil løsningen blande godt og kulene vil fange opp de ønskede proteinene. Kulene ble vasket 2 ganger med 1 ml PBST og 1 gang med PBS. Etter hver vask ble supernatanten fjernet og kastet. Eluerte 2 ganger med 250 µL 5mM glutathion i 50 mM Tris pH8.0 og lot den blande i lykkehjulet i ca.15 min. Supernatanten ble overført til en ny 1,5 ml rør og 10 µL av supernatanten ble brukt for SDS-PAGE. Resten ble oppbevart ved -20 °C.

Prøvene ble klargjort til SDS-PAGE

SDS-PAGE buffer løsning:

10 µL av protein

2 µL DTT

4 µL LDS buffer (loading buffer)

ddH₂O opptil 20 µL det vil si tilsatt 4 µL vann.

For å gjøre det litt enklere ble det laget en mastermiks av bare SDS-PAGE buffer løsning uten å tilsette protein. Det ble laget en 5 x Mastermiks med 10 µL DTT, 20 µL LDS og 20 µL ddH₂O. 10 µl av isolert protein ble overført til et 1,5 ml eppendorfrør, og deretter ble det tilsatt 10 µL av mastermiksen. Prøvene ble denaturert ved 70 grader i 10 min. Det ble også kjørt gel for de gjenværende glutathione kulene: det ble tilsatt 10 µL LDS buffer, 2 µL DTT og 8 µL ddH₂O til kulene, og denaturert ved 70 grader i 10 min.

4.10.3 Rensing av His-SdrD_A under native betingelser fra E.coli lysater

Kitt brukt: Ni-NTA Spin kit fra Qiagen (cat.nr 31314)

Før rensing:

Et 50 ml falcon rør med His-SdrD_A inneholdende bakteriepellet ble løst opp/resuspendert i 10 ml LB m/100µg/Amp. Prøvene ble deretter fordelt i 9 sterile eppendorfrør med 1,2 ml prøve i hvert rør. Eppendorfrørene ble sentrifugert på 5000 rpm, 4 grader i 10 min i Kubota 3500 sentrifuger. Supernatantene ble fjernet. Gikk videre med 3 av prøvene, resten ble fryst ned ved -20 grader.

Rensing av His-SdrD:

Responderte pelleten i 700µL lysis buffer. Prøvene ble fryst ved -20 grader i 25 min, og deretter tint på is (20-30 min). I dette steget ble det danne krystaller, og det vil også danne krystaller i bakteriene, og de krystallene vil hjelpe med å sprengte bakteriene. Sonikerte prøvene 4x10 sek av/på ved bruk av Bioruptore plus Diagenode sonicator. Sentrifugerte ved 12000xg i 25 min ved 4 grader. Supernatantene ble samlet i et sterilt eppendorfrør, og 20 µL ble tatt av for SDS-PAGE. Ni-NTA spin kolonnene ble ekvilibrerte med 600 µL lysis buffer. Sentrifugerte med åpent lokk ved 2900 rpm/890xg i 2 min. 600 µL av lysatet ble overført til kolonnen, og sentrifugert ved 1600 rpm/270xg i 5 min. Supernatanten ble samlet og spart for

SDS-PAGE. Kolonnen ble vasket med 2x600 µL Wash buffer og sentrifugert ved 890xg/2900 rpm i 2 min. Supernatantene fra vaskestegene ble spart for SDS-PAGE. Kolonnen ble overført til et sterilt eppendorfrør. Proteinene ble eluert med 300 µL Elution buffer. Sentrifugerte ved 890xg/2900 rpm i 2 min. Tok vare på eluatene. Deretter ble kolonnen overført til et nytt sterilt eppendorfrør og eluerings trinnet ble gjentatt for eluering av de resterende proteinene. Proteinene ble oppbevart ved -20 °C.

4.11 NucleoBond Xtra plasmid purification. High-copy plasmid purification; midiprep
Isolering av plasmidene Dsg 1 Intra-Flag-2, Dsg 1 ekstra-Flag-2 og CMV 7.1 tom vektor fra E.coli.

Kitt brukt: Nucleobond xtra midi katalog nr.1109/008

Overnattskultur av bakterier ble tillaget ved å tilsette 100 ml LB m/100µg/Amp media i erlenmeyerkolber. Erlenmeyerkolbene ble inokulert med ønskede bakterier, det vil si DH5 med plasmiden Dsg 1 intra-Flag CMV 7.1, DH5 med plasmiden Dsg 1 xtra CMV 7.1 og DH5 med plasmiden 3xFlag CMV 7.1. Selve inokuleringen foregikk ved at bakteriene ble tatt opp ved hjelp av en liten ause og deretter ble ausen rørt godt i hver av bakterienes erlenmeyerkolbe. Satt på risting ved 37 °C over natta.

Bakterie cellene ble overført til et GSA rør og ble sentrifugert på Beckman coulter Rotor JLA 16,250 ved 6000 x g i 10 min ved 4 grader, deretter ble supernatanten fjernet. Bakteriepellen ble resuspendert med 8 ml Buffer RES+RNase A ved å pipettere cellene opp og ned i GSA rør. Viktig å være klumpefri! 8 ml LYS buffer ble tilsatt til suspensjonen og blandet forsiktig ved å snu GSA røren opp og ned 5 ganger. Løsningen ble inkubert ved rom temperatur (18-25 grader) i 5 min. Nucleobond Xtra column med filter ble satt i en blå stativ med et plastikk boks under for å samle opp væske. Nucleobond Xtra column med filter ble ekvilibriert med 12 ml Buffer EQU og lot væsken renne gjennom kolonnen. Tilsatt 8 ml Buffer NEU til suspensjonen og blandet det grumsete hvite lysatet forsiktig ved å snu røren 10-15 ganger. For å være sikker på at man har en homogen suspensjon ble røren snudd opp og ned 3 ganger. Deretter ble lysatet overført direkte til kolonnen og lot det renne gjennom kolonnen. Nucleobond xtra column filter og kolonnen ble vasket med 5 ml Buffer EQU. Fjernet filteret og tok vare på kolonnen. Kolonnen ble vasket med 8 ml Buffer WASH. Satt et sterilt glass rør under kolonnespissen og eluerte plasmid DNA med 5 ml buffer ELU. Tilsatt rom tempererte

3,5 ml isopropanol for å felle ut DNA og det ble dannet et bunnfall. Blandet ved hjelp av vortex, og satt glass rørene i gummi rør og balanserte rørene ved hjelp av isopropanol før sentrifugering. To og to glass rør må veie likt! Beckman coulter Rotor Ja 25,50 ble brukt for sentrifugering. Sentrifugerte ved 15000 x g i 30 min ved 4°C og deretter fjernet supernatanten. Tilsatt 2 ml rom temperert etanol 70 % til pelleten og sentrifugerte ved 15,000 x g i 5 min ved rom temperatur. Fjernet forsiktig etanolen vekk fra pelleten og lot resten av etanol fordampe i lufta. Løste opp DNA pelleten i 100 µL TE buffer og 100 µL ddH₂O og blandet ved å pipettere opp og ned. Overførte de til sterilt 1,5 ml eppendorfrør og ble oppbevart ved -20 grader.

4.12 Induksjon av FLAG taggede Dsg 1 intra og Dsg 1 ekstra proteiner uttrykk i *E.coli* BL21

Optimalisering av metoden for å vite når Flag proteinene ble induisert.

Først ble det laget 15 ml overnattsskulturer av *E.coli* BL21 med ekspresjonsplasmider med Dsg 1 intra eller Dsg 1 ekstra. Dagen etter ble 5 ml av overnattskulturen overført til sterile erlenmeyerkolber, to kolber med Dsg 1 intra og to med Dsg 1 ekstra, og det ble tilsatt 45 ml NZCYM m/Amp til hver av erlenmeyerkolbene. Bakteriekultur løsningen ble dyrket opp til OD=0.6. Ved OD=0,6 ble det tatt ut 1 ml bakteriekultur i eppendorfrør fra hver av erlenmeyerkolbene, som ble merket med “før induisering” og ble oppbevart på is. Det ble tilsatt 50 µL 1 M IPTG til hver av erlenmeyerkolbene. Den ene kolben med Dsg 1 ekstra ble plassert i romtemperatur mens den andre erlenmeyerkolben med Dgs 1 ekstra ble plassert ved 37 °C under svak risting. Samme ble gjort med Dsg 1 intra. Det ble tatt 1 ml prøve hver time i 5 timer. Prøvene ble oppbevart på is. Spinnet ned bakteriepelletene i 2 min ved 13000 rpm. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble løst opp med 1 ml PBST m/10 mM DTT. Sonikerte på is 3x10 sek. Til 15 µL av prøven ble det tilsatt 2µL 1 M DTT og µL LDS buffer. Inkuberte i 10 min ved 70 °C og deretter ble prøvene kjørt på SDS-PAGE.

4.13 SDS PAGE: Polyacrylamide gel kjøring

Gel maskin: XCell sureLock Mini-Cell

Gel: NuPAGE Bis-Tris Mini Gels 4-12 % BT 1.0

12 brønners NuPAGE 4-12 % BT 1.0 geler er ferdigstøpte og ligger i poser. Gelene ble tatt ut av posen, og kammen som laget brønnene ble fjernet. Den hvite teipen på gelen ble fjernet. Brønnene ble vasket med NuPAGE running buffer NEW 3 ganger. Gelene ble montert i NuPAGE kammeret og kammeret mellom gelene ble fylt med NuPAGE running buffer NEW. Fylte opp de ytterste kammerene med NuPAGE running buffer Used. Hver brønn ble tilført 17 µL protein prøver, mens det av ladder ble brukt 5 µL med SeaBlue Plus 2 Prestained Standard (1x) og 10 µL med BenchMark protein ladder. Satt på lokket og slå på gel maskinen. Satt på 200 V for 1 t 10 min, og strøm 120 mA.

Farging av gel metode 1:

Maskin brukt: Stuart reciprocating shaker SSL2

Når gelen var ferdig å kjøre ble gelen tatt ut av plast platene. Brønnen og den tykke enden av gelen ble skjært bort. Vippet gelen over i en skål m/lokk. Tilsatt Fixation solutions til den dekker gelen. Fixation solution fikserer proteinet og hjelper med å holde fargen på proteinen. Satt skålen på rist i 1 time. Deretter fixation solution fjernet, og coomassie blue solution ble tilsatt. Denne løsningen farger alle proteinene. Skålen ble satt på rist i 30 min. Coomassie blue solution ble fjernet og gelen ble vasket med fixation solution. Deretter ble destaining solution tilsatt. Denne løsningen avfarger alle de andre proteinene som ikke trengs. Det ble lagt et lite stykke papir i skålen for at papiret skal kunne trekke seg all blåfargen. Lot gelen stå i rom temperatur over natten på rist.

Farging av gel metode 2:

Maskin brukt: Stuart reciprocating shaker SSL2.

Gelen ble plassert på en rent skål, og vasket 3x 10 min med ca.100-200 ml destillert vann. Vannet ble fjernet, deretter ble det tilsatt 20 ml Pageblue protein staining solution til gelen og under svak risting i 60 min. Fjernet staining solution og rensset 2x med 100-200 ml destillert

vann. Tilslutt ble gelen ble rensert med 200 ml destillert vann for 5 min ved svak risting. Deretter ble det tatt bilde av gelen.

4.14 Arbeid med eukaryote celler

Uttak av HEK 293 celler fra nitrogen-tank:

DMEM media, FBS og penicillin/streptomycin ble oppvarmet i varmeskapet (37 °C) for minst 1 time. Til 500 ml DMEM media ble det tilsatt 50 ml FBS og deretter 5 ml penicillin/streptomycin. Løsningen ble blandet ved å pipettere opp og ned ett par ganger. HEK 293 celler (IV, G7 box 2 HEK 293 P2, Gianina) ble tatt ut av nitrogen tanken (-170 grader) og tint opp. Til en liten flaske ble det tilsatt 5 ml DMEM-media m/FBS/penicillin/streptomycin og deretter 1 ml HEK 293 celler langsomt opp mot veggen til flasken. Satt inni inkuberingskapet. Cellene ble splittet 2 dager etterpå.

Splitting av HEK 293 celler:

DMEM-media m/FBS/penicillin/streptomycin ble satt til oppvarming i minst 1 time før prosedyren. Flasken med HEK293 celler ble tatt ut av inkuberingskapet. Vekstmediet (DMEM-medie m/FBS/penicillin/streptomycin) i cellen ble sugd av ved hjelp av en steril pasteurpipette. Deretter ble cellene vasket med 10 ml PBS. PBS ble tilsatt til cellen langsomt opp mot flaske kanten. PBS ble sugd av ved hjelp av en steril pasteurpipette, og 1 ml Trypsin (et enzym) ble tilsatt for å løse opp cellene fra flasken. Satt lokket på flasken og sjekket i mikroskopet om cellene har blitt løst opp fra flasken. Deretter ble det tilsatt 10 ml DMEM media m/FBS/penicillin/streptomycin til cellene. Til et nytt medium flaske ble det tilsatt 10 ml DMEM m/FBS/penicillin/streptomycin. 1 ml av celleduspensjonen ble tilsatt til den nye flasken og flasken ble satt inni inkuberingskapet (37°C).

Såing av HEK 293 celler

Før utsåing ble HEK 293 celler ble vasket og splittet på vanlig måte, og deretter ble 10 µL celleduspensjon og 90 µL varm PBS tilsatt til en kyronrør for telling av antall celler. Cellene ble målt med en celledeteller, Scepter™ Handheld Automated cell counter. Det ble tatt to målinger og deretter ble det tatt gjennomsnittet av de to målingene. ca. 1,5 millioner celler ble sådd ut i 10 cm Nunclon surface skåler i et volum på 8 ml.

Transfeksjon

Dagen etter utsåing ble DMEM m/FBS/penicillin/streptomycin media og optimem satt til oppvarming i 50 min. Plasmid DNA brukt i transfeksjon: CMV 7.1, Dsg 1 intra-CMV7.1 og Dsg 1 ekstra-CMV7.1 som ble isolert fra *E.coli*.

Tillaging av Optimem/metafectene medie til 3 skåler:

Før transfeksjon må metafectene blandes i optimem. Man beregner 2,5 µL metafectene/µg DNA. Til hver skål trengs det 8 µg DNA og 300 µL optimem. Dermed for tre skåler trengs det 900µL optimem og 60 µL metafectene. Optimem og metafectene ble blandet i en 15 ml falcon rør.

Tillaging av DNA fortynning med optimem:

DNA som skal brukes i transfeksjon fortynnes i optimem til ønsket konsentrasjon.

Siden det skal være 8 µg DNA i hver skål så ble mengde DNA beregnet ut ifra konsentrasjonen til CMV 7.1, Dsg 1 ekstra-CMV7.1 og Dsg 1 intra-CMV7.1 plasmid DNA.

Volum av de ulike komponentene er oppgitt i tabell 10.

Tabell 10: Tillaging av DNA fortynning med optimem.

Plasmid DNA	Konsentrasjon ng/ µL	Mengde DNA (µL)	Mengde Optimem (µL)
1. CMV 7.1	696,5	11,5	300
2. Dsg1 ekstra- CMV7.1	350,5	22,8	300
3. Dsg 1 intra- CMV7.1	172	46,5	300

DNA fortynninger nr. 1-3 med optimem ble tillaget i henhold til tabell 10 og ble tilsatt til hver sitt eppendorfrør merket med 1, 2 og 3. Deretter ble 300 µL Optimem/metafectene løsning tilsatt til 3 nye eppendorfrør merket med 1,2 og 3. Så ble 300 µL av DNA fortynning m/optimem rør 1 tilsatt til eppendorfrør 1 med optimem/metafectene løsning. 300 µL av DNA fortynning m/optimem rør 2 til ble tilsatt til eppendorfrør 2 med optimem/metafectene løsning osv... Rørene ble inkubert for ca.15-20 min i romtemperatur.

Tilsetting av DNA løsning til cellene:

Mediet ble fjernet fra Nunclon surface skålen med HEK293 celler, deretter ble det tilsatt 4,5 ml varm DMEM media m/FBS/penicillin/streptomycin. Tilsatt 600 µL av hvert DNA/optimem/metafectene blanding til hver sin 10 cm skål. Alle skålene ble inkubert overnatt i inkubatorskap. I løpet av natta vil cellene ta opp DNAet.

Høsting av cellelysat

Dagen etter transfeksjon ble DMEM media m/FBS/penicillin/streptomycin fra skålen sugd av og cellene ble vasket 2x med 7 ml varm PBS for å få bort serum og resten av mediene. Deretter ble det tilsatt 1000 µL lysisbuffer til cellene og en celleskraper ble brukt for å få med alle cellene i supernatanten. Supernatanten ble overført til eppendorfrør på is. Spant ned rørene ved 13000 rpm ved 4 °C i 10 min for å fjerne celledbris. Overførte supernatanten til nye eppendorfrør. Supernatanten inneholder intracellulære proteiner. 30 µL av supernatanten ble overført til nye eppendorfrør som en input kontroll. Til dette ble det tilsatt 2 µL DTT og 8 µL LDS sample buffer. Prøvene ble inkubert ved 70 °C i 10 min og senere kjørt på gel og deretter western blot. Resten av lysatet ble brukt i co-immunopresipitering (se seksjon 4.15.2).

4.15 Co-immunopresipitering

Co-immunopresipitering (co-IP) er en metode for å undersøke protein-protein interaksjon, hvis antistoffet mot proteiner av interesse er tilgjengelig. For å utføre co-IP så må først antistoffet mot et målprotein være koblet til sepharose-kuler gjennom protein A eller G, deretter vil da komplekser som inneholder målproteinet bli immunopresipitert med antistoff koblet sepharose kuler ved sentrifugering. Protein komponenter i kompleksene blir visualisert med Western blotting ved å bruke antistoffer som er spesifikke for de forskjellige komponentene. Man kan gjøre metode ved bruk av rensende proteiner, for å se om de kan interagere i et testrør, eller man kan bruke det til å sjekke om proteiner interagerer i cellelysat [53].

4.15.1 Co-immunopresipitering metode 1

Prinsippet går ut på å isolere Flag-proteiner, som igjen skulle bli brukt som agn for å trekke ned tilsatt protein i testrør.

Tillaging av Flag-Resin:

Resinet ble resuspendert ved å riste forsiktig. Den må være helt uniform. Ca. 250 µL resin ble overført til eppendorfrør. Resinet ble vasket 3 ganger med å tilføre 1 ml 0.1M Glycin-HCl pH 3.5. Eppendorfrøeren ble sentrifugert ved hjelp av en bordsentrifuge, og deretter ble supernatanten kastet. Så ble resinet vasket 5 ganger med TBS, og til slutt ble det laget en 50 % Flag resin ved å tilsette 1:1 forhold av Resin og TBS.

Bakterie pellet med Dsg 1 ekstra-Flag-2 proteiner fra et 50 ml rør ble resuspendert i 1 ml lysisbuffer. Sonikerte 3-5x 10 sek på is, og spant ned celledetritus ved 13000 rpm i 10 minutter. Supernatanten som inneholder Flag proteiner ble fordelt til fire nye eppendorfrør merket:

- a. No protein
- b. Gst
- c. GST-SdrD
- d. His-SdrD

Det ble tilsatt 50 µL 50 % Flag-resin (25 µL resin- som vil binde minst 25 µg protein). Inkuberte videre i minst 1 time ved romtemperatur på rotator (lykkehjul). Spant ned resin ved 1000 g i 5 min og supernatanten ble fjernet forsiktig. Resinet ble vasket 3 ganger ved å tilsette 1 ml lysisbuffer, spant ned resin/flag-proteiner med en bordsentrifuge og deretter fjernet supernatant. Tilsatt 400 µL lysisbuffer til alle fire rør. Tilsatt så 1 µg protein i henhold til merking på rør (dvs. no protein, GST, GST-SdrD eller His-SdrD) og inkuberte ved romtemperatur i 30 min på lykkehjul. Spant ned Flag-resin og deretter vasket 3 ganger med 1 ml lysisbuffer. Tilsatt 20 µL loading buffer til de fire rørene (pr prøve så består denne loading bufferen av: 15 µL LDS buffer + 2 µL 1M DTT + 3 µL ddH₂O). Inkuberte prøvene ved 70 °C i 10 minutter. Senere ble prøven kjørt på SDS-PAGE og deretter ble det kjørt western blott.

4.15.2 Co-immunopresipitering metode 2

Prinsippet går ut på å bruke rensed protein som agn til å trekke ned mulig interaksjonspartnere som er uttrykt i eukaryote celler.

Tillaging av 50 % sepharose glutathione kuler

Ca. 450 µL sepharose glutathione kuler ble overført til eppendorfrør og vasket 3 ganger med litt lysis buffer, og kulene ble spant ned og lysisbuffer ble fjernet mellom hver vask. De vaskede sepharose kulene blandes i 1:1 forhold med lysisbuffer slik at det blir en 50 % sepharose kule løsning.

Til resten av cellelysatet med DNA fra seksjon 4.14 (CMV7.1, Dsg 1 ekstra-CMV7.1 eller Dsg 1 intra-CMV7.1) ble det tilsatt 60 µL 50 % sepharose kuler. Cellelysatet ble inkubert i 30-60 min på lykkehjul ved 4 °C. Kulene ble spant ned, og supernatanten ble overført til nye eppendorfrør (dvs. proteiner som ikke bandt uspesifikt til sepharose kuler er nå i supernatant). Det ble tilsatt 10 µg His-SdrD til supernatanten. Supernatanten ble inkubert på lykkehjul i en time, 4°C. Nå får His-SdrD mulighet til å binde seg til Dsg1 ekstra eller Dsg1 intra i cellelysatet. Deretter ble Anti-FLAG antistoff (1 µL anti-Flag antistoff til 250 µL supernatant) tilsatt til supernatanten. Inkubert på lykkehjul i en time, 4°C. Deretter ble det tilsatt 80 µL 50 % sepharose kuler til supernatanten og inkubert på lykkehjul i en time, 4°C. Sepharose kulene ble vasket 3 x 1 ml i lysisbuffer, og deretter 2 x 1 ml i 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Bufferen ble fjernet. Til sepharose kulene ble 20 µL loading buffer (10 µL LDS sample buffer, 2 µL 1 M DTT, 8 µL H₂O). Inkubert ved 70°C i 10 minutter. Prøvene ble kjørt på SDS-PAGE og deretter på western blot.

4.15.3 Co-immunopresipitering metode 3

Co-IP metode 3 er resiprok presipitering det vil si vi forsøker trekke ned proteinene «begge veier»; enten med å trekke ned SdrD og se om Flag-proteinene co-presipiterer, eller vi trekker ned Flag-proteinene og ser om SdrD presipiterer.

Sepharose glutathione kuler ble vasket 3 ganger i lysisbuffer før en 50 % sepharose kule løsning ble laget i lysisbuffer (se seksjon 4.15.2). Til cellelysatet med DNA fra seksjon 4.14 (CMV7.1, Dsg 1 ekstra-CMV7.1 eller Dsg 1 intra-CMV7.1) ble det tilsatt 1µL Phospho-NF-kappaB p65 (for å fjerne uspesifikke bindinger til antistoffene, anti-SdrD og anti-Flag) og 10

μg His-SdrD. Inkuberte på lykkehjul i en time ved 4°C . Tilsatte $60\ \mu\text{L}$ 50 % sepharose kuler og inkuberte på lykkehjul i en time ved 4°C . Spant ned sepharose kulene (30-60 sekunder med bordsentrifuge), og overførte supernatanten til nye eppendorfrør. Tilsatt Anti-SdrD (1:250) til rør 1-3 og anti-Flag til rør 4-6. Inkuberte på lykkehjul i en time ved 4°C . Tilsatte $80\ \mu\text{L}$ 50 % sepharose kuler og inkuberte på lykkehjul i en time ved 4°C . Sepharose kulene ble vasket 3 x 1 ml i lysisbuffer og deretter 2 x 1 ml i 50 mM Tris-HCl pH 8.0. All bufferen ble fjernet. Til sepharose kulene ble $20\ \mu\text{L}$ loading buffer ($10\ \mu\text{L}$ LDS sample buffer, $2\ \mu\text{L}$ 1 M DTT, $8\ \mu\text{L}$ H_2O) tilsatt. Inkuberte ved 70°C i 10 minutter før Western blot ble kjørt.

4.16 Western Blott

Antistoffer bindes til spesifikke sekvenser av aminosyrer. Fordi aminosyresekvensen er forskjellig fra protein til protein, kan antistoffet gjenkjenne spesifikke proteiner blant en gruppe av mange. Derfor kan en enkelt protein bli identifisert i et cellelysat som inneholder tusenvis av forskjellige proteiner og de kan bli kvantifisert ved western blot analyse. Først blir proteinene skilt fra hverandre basert på deres størrelse. Deretter brukes antistoffene til å påvise proteinet av interesse. Til slutt blir et substrat som reagerer med et enzym anvendt for å vise antistoff/proteinkomplekset [54].

Det ble kjørt en SDS-PAGE av ønskede protein prøver. 5 blotting pads ble dyppet ned i blotting buffer for ca. 5 minutter. Deretter ble membranen vasket 3 sekunder i metanol, 10 sekunder i destillert vann og 5 minutter i blottingbuffer. Når gelen ble ferdig så ble gelkassetten åpnet. Dyppet whatman filterpapir i blotting buffer og deretter ble den plassert over gelen og holdt gelen fuktig uten luftbobler. Brønnene og den tykkeste delen av gelen ble skjært bort. Først ble to pads som var dyppet i blottingbuffer plassert i holderen, så ble gelen plassert med filterpapir siden ned over padsen. Så ble membranen plassert over gelen og deretter et filterpapir, og til slutt ble det plassert tre blotting pads over og satt på lokket. Holderen ble satt i en gelkjøring modul med blotting buffer i det indre kammeret, og kaldt destillert vann i ytre kammeret. Gelen ble kjørt i 1 time på 30 V. Etter blotting så ble membranen tatt ut av holderen og ble blokket med 20 ml blokkering buffer ved romtemperatur, i en passende skål med langsom risting. Deretter ble membranen plassert i et 50 ml falcon rør med 3 ml blokkering buffer. Så ble primær antistoff tilsatt og lot falcon røren stå ved 4°C på lykkehjul over natten. Dagen etterpå ble primært antistoff fjernet. Vasket membranen tre

ganger med ca.10-12 ml PBST (0,1 % Tween) i 4 minutter på lykkehjul ved romtemperatur. Deretter ble det tilsatt 3 ml blokking buffer og sekundært antistoff og lot det stå på lykkehjul i 1 time ved romtemperatur. Deretter ble membranen vasket 2x5 min ved romtemperatur med 12 ml PBST (0,1 % Tween) på lykkehjul. Deretter ble membranen vasket 2x5 min med 12 ml vaskebuffer på lykkehjul ved romtemperatur. Vaskebuffer ble fjernet og membranen ble plassert i en skål med 1,5 ml luminol A og 1,5 ml luminol B og ristet manuelt for 1 min. Tilslutt ble membranen plassert i en passende brødpose og analysert på LumiAnalyst maskin.

5. Resultat

Preliminære studier indikerte at *S.aureus* proteinet SdrD_A kan binde til humant desmoglein 1 (HMI, upublisert). For å bekrefte/avkrefte dette, skulle prokaryot ekspresjonskonstrukter lages (seksjon 5.1), proteiner skulle renses (seksjon 5.2) og interaksjonsstudier gjøres (seksjon 5.3).

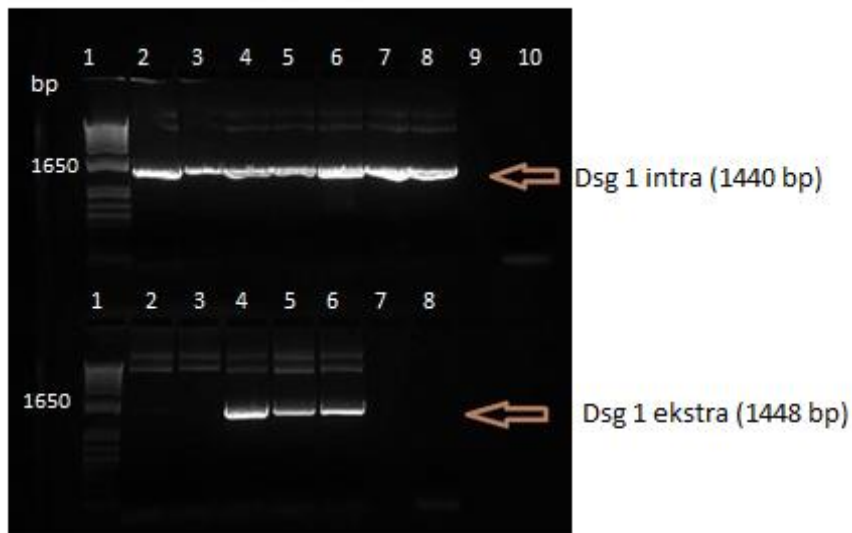
5.1 Kloning av Dsg 1 inni prokaryot Flag-tagget ekspresjonsvektor

5.1.1 Isolering av plasmid DNA fra *E.coli* og konsentrasjonsmåling

pT7-Flag-2 (CMV7.1 vektor) og Dsg 1-pcDNA 3 (som inneholdt full lengde Dsg 1) ble isolert fra *E.coli* DH5 bakteriekultur og deretter ble DNA konsentrasjon målt ved NanoDrop Spektrometer. Det ble isolert totalt tre eppendorfrør med pT7-Flag-2 vektor og tre eppendorfrør med Dsg 1-pcDNA 3. Konsentrasjon på pT7-Flag-2 vektoren var 748 ng/μL, 637 ng/μL og 501 ng/μL. Konsentrasjonen på Dsg1-pcDNA3 var 51 ng/μL, 47 ng/μL og 49 ng/μL. Det isolerte Dsg 1-pcDNA 3 ble brukt som templat for amplifisering ved PCR, og pT7-Flag-2 vektoren ble brukt for å kloner inn Dsg 1 intracellulær og ekstracellulær del.

5.1.2 Amplifisering av Dsg 1 genet ved PCR

For å kloner Dsg 1 ekstracellulær og intracellulær del i pT7-Flag-2 tagget ekspresjonsvektor, ble Dsg 1-pcDNA3 brukt som templat for å amplifisere fragmentene ved hjelp av PCR. Resultatet av PCR ble evaluert ved hjelp av agarose gel elektroforese. Størrelsen på Dsg 1 intra er 1440 bp og Dsg 1 ekstra er 1448 bp. Av figur 5 ser vi både Dsg 1 intra (øverst i figur 5) og Dsg 1 ekstra (nederst i figur 5) ble amplifisert for vi fikk et bånd ved 1448 bp for Dsg 1 ekstra og et bånd ved 1440 bp for Dsg 1 intra. Figuren viser også at prøvene i brønn 2 og 3 (nederst i figur 5) ikke har noe DNA insert (Dsg 1 ekstra). PCR produkt for Dsg 1 intra og Dsg 1 ekstra ble kuttet med restriksjonsenzymene KpnI og HindIII, kjørt på agarose gel og deretter renses til renhet i henhold til metode 4.4.

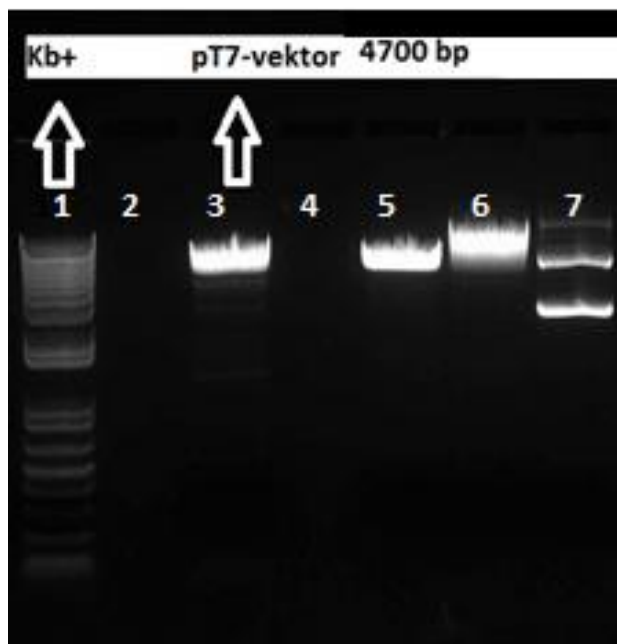


Figur 5. Agarose gel av PCR produktene Dsg 1 intra og Dsg 1 ekstra.

Øverste del; Brønn 1: Kb+ DNA ladder ble brukt for å estimere molekylvekten til DNA fragmentene, brønn 2-8: PCR produkt av Dsg 1 intracellulær, Brønn 10: negativ kontroll. Nederste del; Brønn 1: Kb+ DNA ladder, Brønn 2-6: PCR prøver av Dsg 1 ekstracellulær, brønn 8: negativ kontroll.

5.1.3 Restriksjonsenzym kutting av pT7-Flag-2-vektor

Vektoren pT7-Flag-2 som de ulike Dsg 1-fragmentene skulle klones i, ble kuttet med samme restriksjonsenzymmer, KpnI og HindIII, og analysert ved hjelp av agarose gel elektroforese (se figur 6). Som kontroll på enzymene, ble pT7-Flag-2 vektoren også kuttet med hvert enkelt enzym. Ukuttet pT7-Flag-2 ble også inkludert.

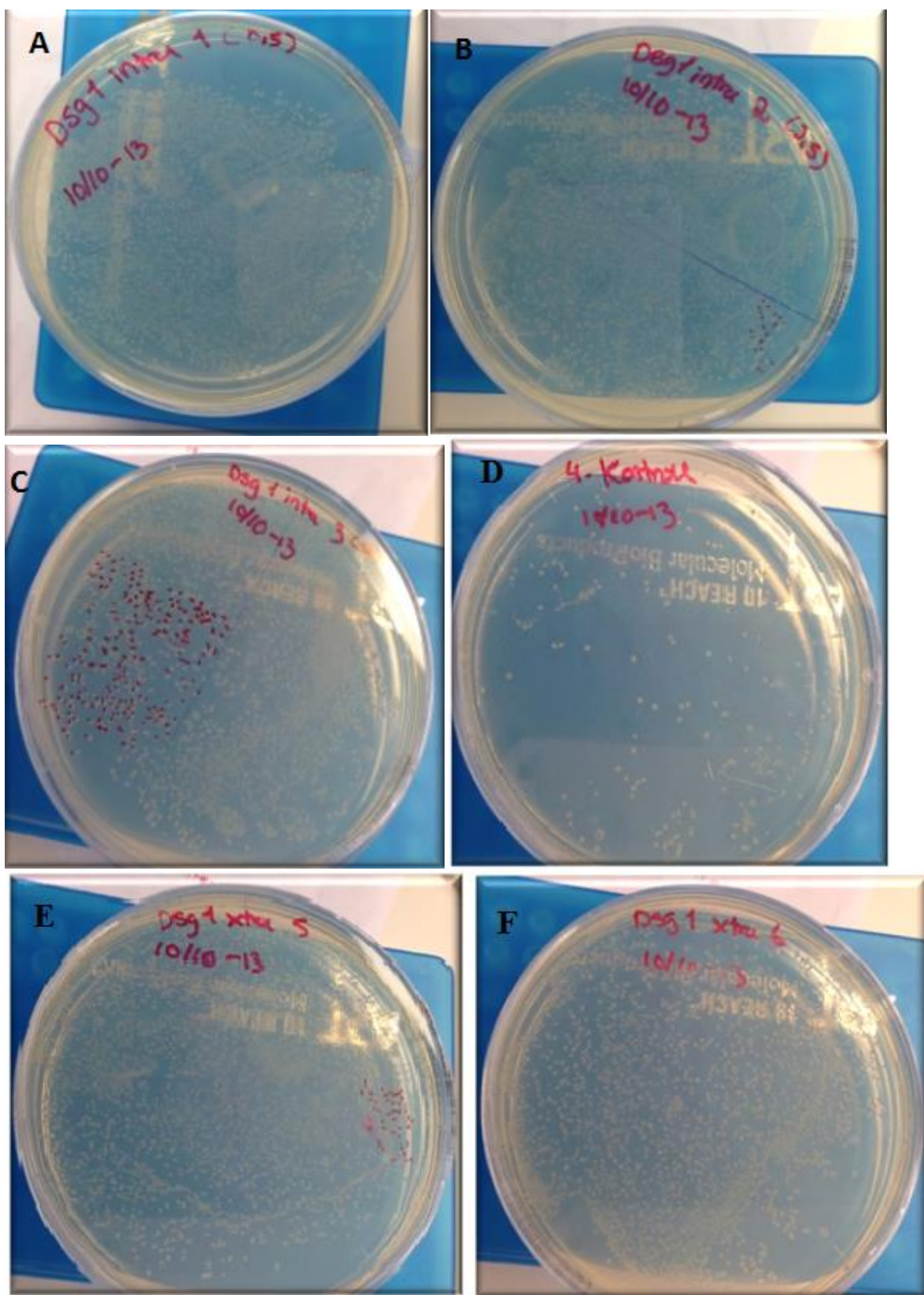


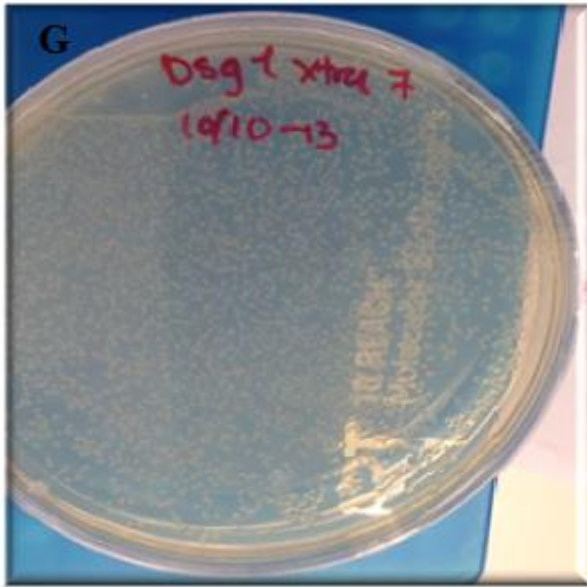
Figur 6. Agarose gel over resultat av restriksjonsenzymkutting av pT7-Flag-2 vektor.
 Brønn 1: Kb+DNA ladder ble brukt for å estimere molekylvekten til pT7-Flag-2, Brønn 3:
 pT7-FLAG-2-vektor kuttet med begge enzym, Brønn 5: pT7-FLAG-2 tester enzym (KpnI),
 Brønn 6: pT7-FLAG-2-tester enzym (HindIII), Brønn 7: pT7-FLAG-2-ikke tilsatt enzym

Størrelsen på pT7-Flag-2 vektoren er 4700 bp. Ser av figur 6 at pT7-Flag-2 vektoren er kuttet med begge enzymene for vi fikk et bånd ved 4700 bp. Og man ser at begge enzymene fungerer bra for hvis ikke ville båndet i prøve 3,5 og 6 være som båndet i prøve 7. pT7-Flag-2 vektoren ble rensset til renhet i henhold til metode beskrevet i seksjon 4.4 og konsentrasjonen ble målt ved NanoDrop spektrometer. Konsentrasjonen var på 29 ng/μL.

5.1.4 Ligering og transformering

For å klonere Dsg 1 intracellulær og Dsg 1 ekstracellulær inn i pT7-Flag-2 vektor, ble det satt opp ligeringer med ulikt insert/vektor forhold. Alle ligeringer ble transformert inn i kompetente *E.coli* celler-DH5. Bakterier som har tatt opp plasmid vil være resistent mot Ampicillin og kunne vokse på plater som er tilsatt dette antibiotikum. Resultatet av transformasjonen er vist i figur 7 og tabell 11.





Figur 7: Bilde over kolonier etter transformasjon av Dsg 1 intra-pT7-Flag-2 og Dsg 1 ekstra-pT7-Flag-2 inni *E.coli* celler

Bilde A: 0,5 μL Dsg 1 intra, bilde B: 2,5 μL Dsg 1 intra, bilde C: 5 μL Dsg 1 intra, bilde D: kontroll prøve med bare 0,5 μL pT7-Flag-2 vektor. Bilde E: 0,5 μL Dsg 1 ekstra, bilde F: 2,5 μL Dsg 1 ekstra, bilde G: 5 μL Dsg 1 ekstra.

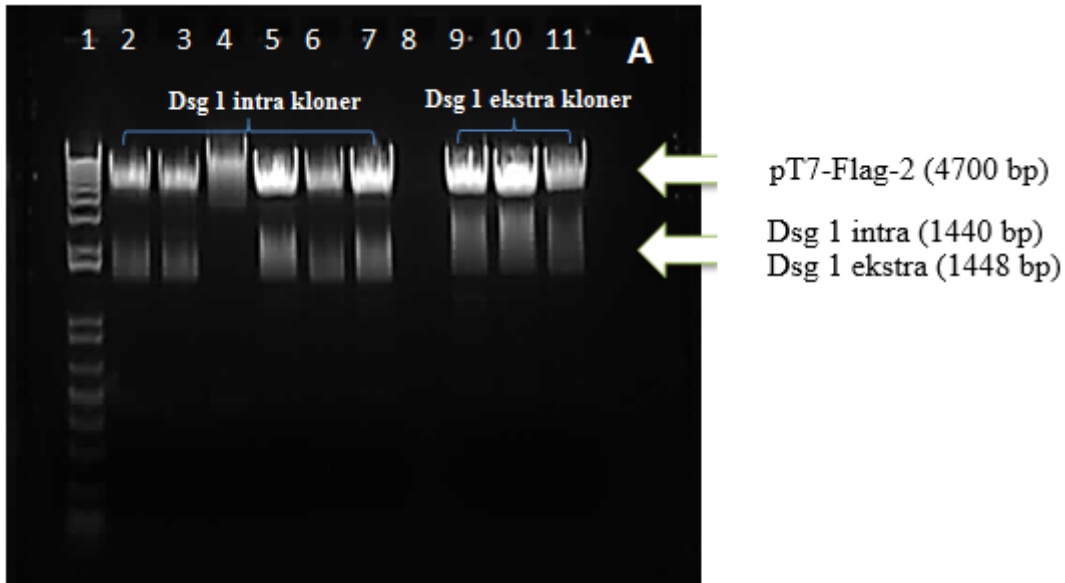
LB m/100 μg /Amp agarplater ble brukt til å plate ut Dsg 1 intra-pT7-Flag-2 og Dsg 1 ekstra-pT7-Flag-2 som ble transformert inni *E.coli* celler. Plasmidene Dsg 1 intra-pT7-Flag-2 og Dsg 1 ekstra-pT7-Flag-2 har en ampicillin resistent gen, og genet som gir ampicillin resistent koder for beta-lactamase, som er et enzym som bryter ned ampicillin. Så hvis *E.coli* cellene har klart å ta opp Dsg 1 ekstra-pT7-Flag-2 og Dsg 1 intra-pT7-Flag-2 så vil de kunne vokse opp på LB m/100 μg /Amp plater ved at beta-lactamase bryter ned ampicillin. Av figur 7 og tabell 11 kan man se at det var bra vekst i alle platene, noe som tyder på at *E.coli* cellene har klart å ta opp plasmid DNAet. Figur 7 D viser kolonier av bakterier transformert med 0,5 μL pT7-Flag-2 vektor, det vil si uten noen insert. Dette skal være en kontroll og viser nivå på antall kolonier med bare tom vektor man har i oppsettet. Det ble også tatt en negativ kontroll med bare kompetente *E.coli* celler og det var ingen bakterievekst i negativ kontrollen (figur ikke vist). Så tallene i tabell 11 viser at man kan få nesten ti ganger flere transformanter dersom bakteriene ble tilbudt ligeringsmiks som inneholder både vektor og insert. Dette indikerer positive kloner.

Tabell 11: Antall bakterie kolonier på de ulike agarplatene etter transformering i *E.coli* med Dsg 1 intra-pT7-Flag-2 og Dsg 1 ekstra-pT7-Flag-2

Navn på bakterieplate	Ligeringsblanding: 0,5 µL pT7-Flag vektor + oppgitt DNA insert	Antall bakteriekolonier
A) Dsg 1 intra nr. 1	0,5µL Dsg1 intra	1690
B) Dsg 1 intra nr. 2	2,5 µL Dsg 1 intra	1780
C) Dsg 1 intra nr.3	5 µL Dsg 1 intra	1735
D) vektor kontroll nr.4	0,5 µL pT7-Flag-2	142
E) Dsg 1 ekstra nr.5	0,5 µL Dsg 1 ekstra	1730
F) Dsg 1 ekstra nr.6	2,5 µL Dsg 1 ekstra	1790
G) Dsg 1 ekstra nr.7	5µL Dsg 1 ekstra	1835

5.1.5 Testing av mulige positive kloner av Dsg 1 intra-pT7-Flag-2 og Dsg 1 ekstra-pT7-Flag-2

Plasmidene, Dsg 1 intra-pT7-Flag-2 og Dsg 1 ekstra-pT7-Flag-2, fra mulige positive kloner ble isolert og kuttet med KpnI og HindIII, og DNA fragmentene ble separert ved agarose gel elektroforese, og resultatet er vist på figur 8 A og B.



Figur 8 A: Agarose gel av mulige positive kloner av *Dsg 1* intra-pT7-Flag-2 og *Dsg 1* ekstra-pT7-Flag-2 kuttet med restriksjonsenzymene *KpnI* og *HindIII*.

Mulige positive kloner av *Dsg 1* intra-pT7-Flag-2 og *Dsg 1* ekstra-pT7-Flag-2 kuttet med restriksjonsenzymene *KpnI* og *HindIII*, og de ulike fragmentene ble separert ved hjelp av agarose gel elektroforese.

Brønn 1: Kb+ DNA ladder, brønn 2: *Dsg 1* intra klon 1, brønn 3: *Dsg 1* intra klon 2, brønn 4: *Dsg 1* intra klon 3, brønn 5: *Dsg 1* intra klon 4, brønn 6: *Dsg 1* intra klon 5, brønn 7: *Dsg 1* intra klon 6, brønn 9: *Dsg 1* ekstra klon 1, brønn 10: *Dsg 1* ekstra klon 2, brønn 11: *Dsg 1* ekstra klon 3.



Figur 8 B: Agarose gel av mulige positive kloner av Dsg 1 ekstra-pT7-Flag-2 kuttet med restriksjonsenzymene *KpnI* og *HindIII*.

Mulige positive kloner av Dsg 1 ekstra-pT7-Flag-2 kuttet med restriksjonsenzymene *KpnI* og *HindIII*, og de ulike fragmentene ble separert ved hjelp av agarose gel elektroforese.

Brønn 1: Kb+ DNA ladder, brønn 2: Dsg 1 ekstra klon 4, brønn 3: Dsg 1 ekstra klon 5, brønn 4: Dsg 1 ekstra klon 6

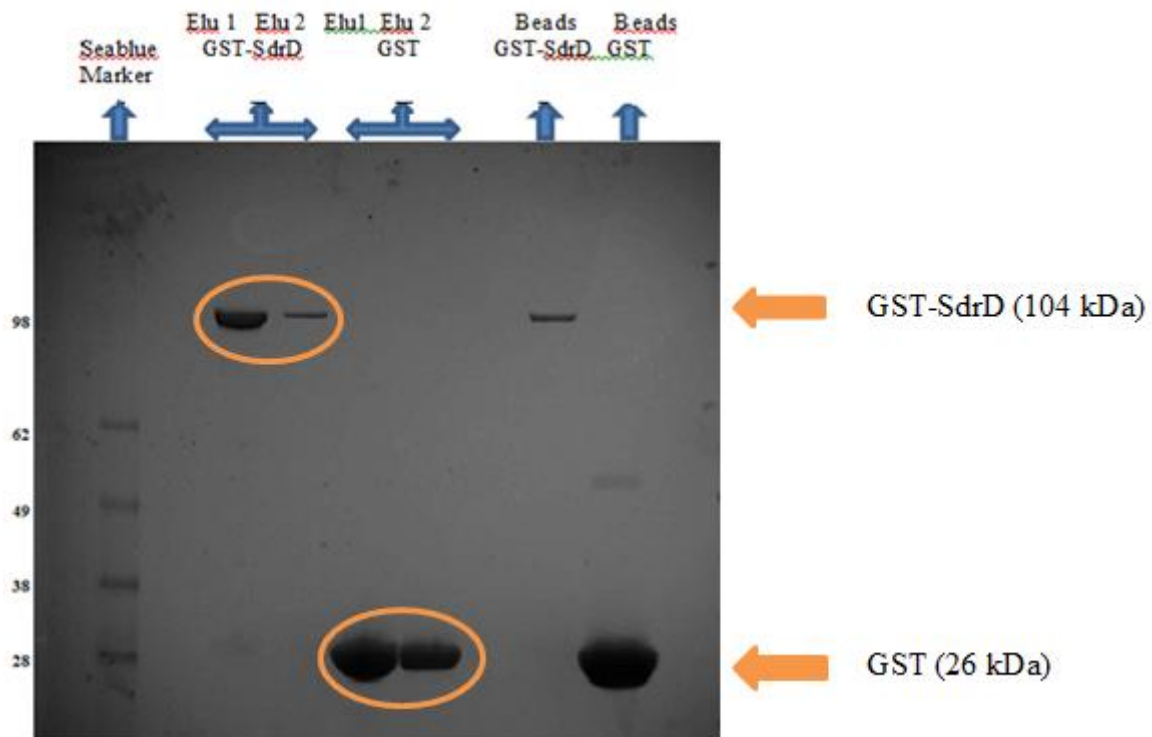
Selv om figurene 8 A og B ikke er så tydelig så ligger pT7-Flag-2 vektoren der den skal ligge, altså ved 4700 basepar, Dsg 1 intra ved 1440 basepar og ekstra ved 1448 basepar. Men det ser ut som intra klon 3 ikke har noe insert (Dsg 1 intra) siden den ligger litt ovenfor de andre prøvene. Dsg 1 intra klon 1,2 og 4, og Dsg 1 ekstra klon 1, 2 og 3 ble ansatt som mulige positive kloner, og ble derfor sekvensert ved bruk av en rekke ulike primere. Sekvensene ble BLASTet mot de opprinnelige sekvensene for Dsg 1 intra og ekstra. Da viste det seg som om Dsg 1 intra og ekstra ble funnet i vektor. Men da sekvensene alene ble BLASTet uten bruk av de opprinnelige sekvensene, ble det ikke funnet noe Dsg 1 intra eller ekstra. Istedenfor viste det alltid en feil vektor som egentlig ikke skulle ha vært der. Dessverre viste det seg at noe hadde skjedd med vektoren, og konstruktene måtte forkastes. Videre i oppgaven ble Dsg 1 intra-pT7-Flag-2 og Dsg 1 intra-pT7-Flag-2, laget av forskningsgruppa for Vert og mikrobe ved UiT, brukt.

5.2 Proteinene ble induert og/eller rensert til renhet

For å analysere mulige interaksjoner mellom Serine-aspartat repeat protein D (SdrD) og desmoglein 1 intracellulær eller ekstracellulær (Dsg 1 intra og Dsg 1 ekstra) så trengtes det å isolere en rekke proteiner med ulike tag. Disse er beskrevet i de følgende seksjonene.

5.2.1 Rensing av GST protein

Protein ekspresjon av GST og GST-SdrD i *E.coli* BL 21 celler var induert når OD₆₀₀ nådde 0,6. Proteinene ble rensert ved å binde til sepharose glutathione kuler, og prøver av de rensede proteinene ble kjørt på en SDS-PAGE, og deretter farget med coomassie blue for å visualisere innholdet og renheten av de eluerte proteinene.



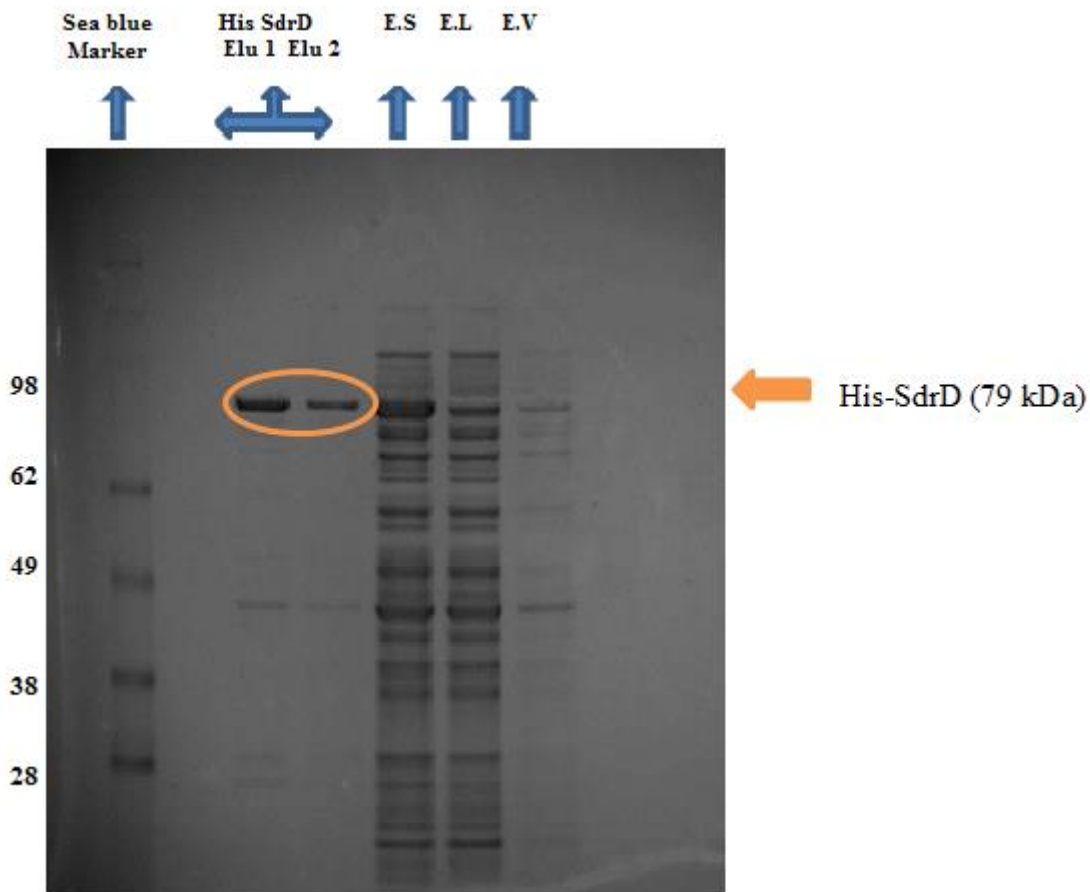
Figur 9: Rensede GST proteiner ble evaluert ved hjelp av SDS-PAGE.

Proteiner ble separert på SDS-PAGE og farget med coomassie blue. SeaBlue ble brukt som protein ladder. Elu 1 og Elu 2 representerer første og andre eluering av GST og GST-SdrD proteiner. Beads representerer rester av GST og GST-SdrD proteinene på sepharose kulene.

Figur 9 viser at GST ved 26 kDa var eluert fra sepharose glutathione kulene i begge eluering, men det er fortsatt mye GST protein igjen i kulene. GST-SdrD ved 104 kDa var induert og eluert med den høyeste mengde proteiner i eluering 1.

5.2.2 Rensing av His-SdrD proteiner

Protein ekspresjon av His-SdrD i *E.coli* BL 21 celler var induisert når OD₆₀₀ nådde 0,6. His-SdrD proteiner ble rensed under native betingelser fra *E.coli* lysater (se metode 4.10.3). Prøver av de rensede proteinene ble kjørt på SDS-PAGE og farget med coomassie blue for å visualisere innholdet og renheten av de eluerte proteinene.



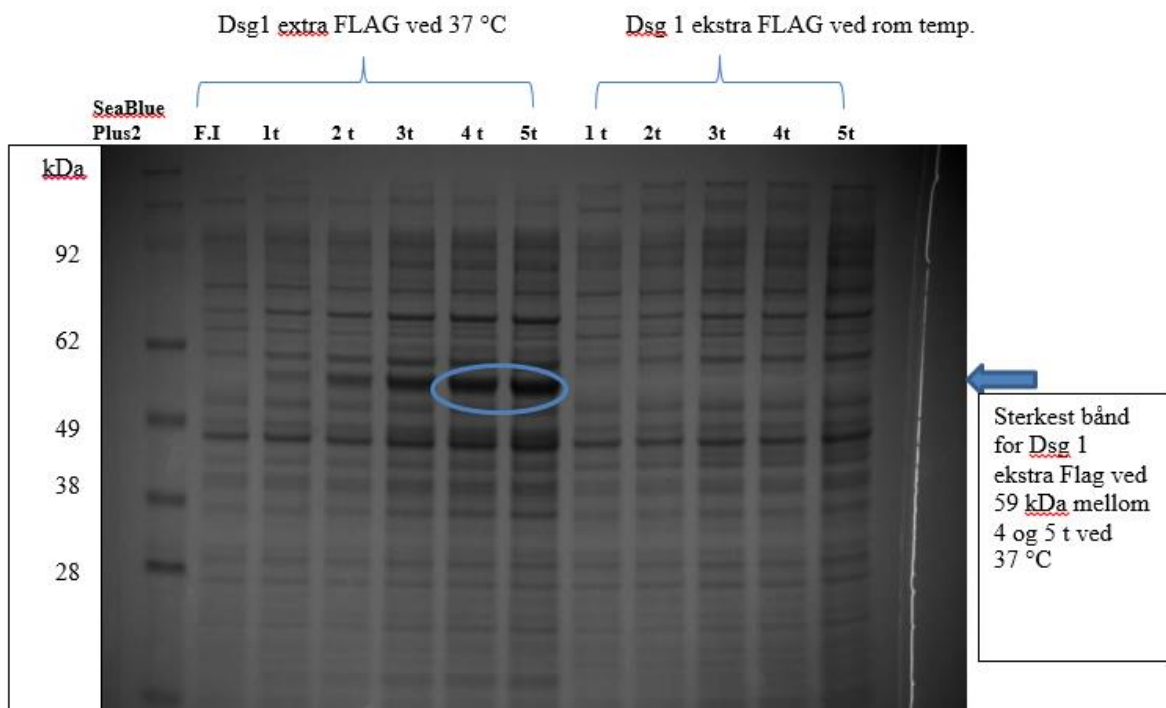
Figur 10: Rensede His-SdrD proteiner ble evaluert ved hjelp av SDS-PAGE.

SeaBlue ble brukt som protein ladder, His-SdrD elu 1 og elu 2 står for første og andre eluering, E. S står for prøve tatt etter sonikering, E. L står for prøve tatt etter lysering med lysisbuffer, E. V står for prøve tatt etter vasking med vaskebuffer.

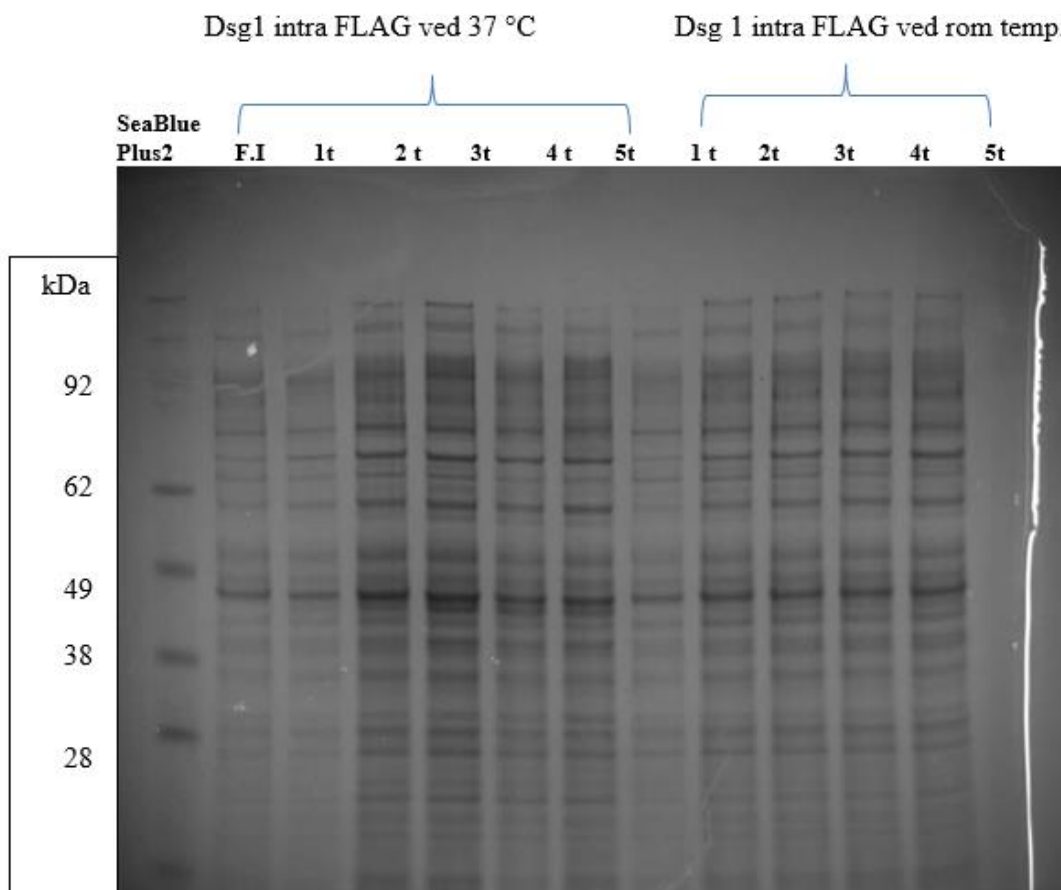
Figur 10 viser at His-SdrD proteinet ved 79 kDa var eluert i begge elueringene, men første eluering inneholder mer protein enn andre eluering. Figuren viser også at det eluerte His-SdrD proteinet er ganske ren siden det ikke inneholder så mye andre proteiner. Man ser også at det ligger igjen mye His-SdrD proteiner etter sonikering og etter lysering, men lite protein igjen i supernatanten etter vask. Prøvene tatt etter sonikering og etter lysering er ikke så rene siden det inneholder mye andre proteiner.

5.2.3 Optimalisering for indusering av Flag taggede Dsg 1 ekstra og intra proteiner fra *E.coli*

E.coli BL 21 celler ble transformert med de nylagede prokaryote ekspresjonsvektorene Dsg 1 intra-pT7-Flag-2 og Dsg 1 ekstra-pT7-Flag-2. Dagen etter ble LB media m/100 µg/ml/Amp inokulert med plasmidene transformert i BL 21. Og deretter ble 10 % av overnattskulturen brukt til å inokulere i NZCYM m/100µg/ml/Amp inntil OD₆₀₀ nådde 0,6. Deretter ble protein uttrykk i bakteriene industert ved tilsetning av 1M IPTG. Bakteriekultur ble overført til to erlenmeyerkolber. En erlenmeyerkolbe med bakteriekultur ble dyrket ved 37 °C og den andre i romtemperatur. Prøver ble tatt før induksjon og hver time etter induksjon i inntil 5 timer. Prøver av de lyserte bakteriepelletene fra alle tidspunkt og temperatur ble kjørt på SDS-PAGE og farget med PageBlue Protein farge løsning i henhold til metode 4.13. Figur 11 A og B viser resultatet av optimaliseringen for henholdsvis Dsg 1 ekstra-Flag og Dsg 1 intra-Flag.



Figur 11 A: SDS-PAGE som viser optimalisering for Flag taggede Dsg 1 ekstra protein. Prøvene ble tatt hver time i fem timer ved 37 °C og romtemperatur, deretter evaluert ved hjelp av SDS-PAGE og farget med PageBlue Protein farge løsning. SeaBlue ble brukt som protein laddet. F.I= prøve tatt for indusering, 1t= prøve tatt 1 t etter indusering, 2t=prøve tatt 2 t etter indusering osv..



Figur 11 B: SDS-PAGE som viser optimalisering for Flag taggede Dsg 1 intra protein. Prøvene ble tatt hver time i fem timer ved 37 °C og romtemperatur, deretter evaluert ved hjelp av SDS-PAGE og farget med PageBlue Protein farge løsning. SeaBlue ble brukt som protein ladder. F.I= prøve tatt for indusering, 1t= prøve tatt 1 t etter indusering, 2t=prøve tatt 2 t etter indusering osv.

Størrelsen på Dsg 1 ekstra-Flag-2 proteiner er 59 kDa og Dsg 1 intra-Flag-2 er 50 kDa, og Flag taggen har 8 aminosyrer. Figur 11 A viser indusering av Dsg 1 ekstra-Flag-2 proteiner. Siden størrelsen på Flag taggen ikke er så stor så antas det at det vil vise et bånd ved 59 kDa hvis man har klart å indukere proteinet. I prøven tatt før indusering (37 °C) så finnes det ikke noe Dsg 1 ekstra-Flag-2 proteiner og det skal heller ikke være noe bånd på gelen ved 59 kDa. Og dette ser man tydelig på figur 11 A. Og på de neste prøvene, altså prøve 1t til 5t så ser man et bånd ved omtrent 59 kDa, og dette vil si at man har klart å indukere uttrykk av Dsg 1 ekstra-Flag-2 proteiner. Ved fjerde og femte time er båndet sterkest og er den beste tiden for indusering. På prøvene tatt ved romtemperatur så ser man ikke så sterke bånd ved 59 kDa og dermed kan man konkludere med at den beste temperaturen for tiden for indusering av Dsg 1 ekstra Flag taggede proteiner er ved 37 °C i 5 timer.

Figur 11 B viser indusering av Dsg 1 intra-Flag-2 proteiner. Dsg 1 intra skal være 50 kDa og på bilde er det vanskelig å se om man har klart å inducere Dsg 1 intra-Flag-2 for det er nesten like bånd på alle prøvene, til og med i prøven før indusering som ikke skal inneholde Dsg 1 intra-Flag-2 proteiner.

5.3 Interaksjonsstudier av Dsg 1 og SdrD-proteinet

Interaksjonsstudier ble gjort med ulike rensede proteiner som agn.

5.3.1 Co-immunopresipitering ved bruk av rensede proteiner og bakterielt cellelysat hvor Dsg 1 ekstra var uttrykt

Etter optimalisering av metoden for indusering av Flag taggede Dsg 1 ekstra proteiner, ble det funnet ut at optimal induksjon av Dsg 1 ekstra-Flag-2 finner sted etter 5 timer ved 37 °C.

Bakterier ble dyrket opp og Dsg 1 ekstra-Flag-2 ble indusert i henhold til det. Bakterie cellelysat ble enten uberørt eller tilført GST, GST-SdrD eller His-SdrD. Antistoff mot Flag, som da vil gjenkjenne Flag taggede Dsg 1 ekstra, ble tilsatt til bakterie cellelysat og immunopresipitere Dsg 1 ekstra-Flag-2.

Ved Co-immunopresipitering *in vitro* (figur 12) skal det ses om Dsg 1 ekstra-Flag-2 har klart å trekke med seg His-SdrD og om det spesifikt binder seg til His-SdrD eller om det binder til andre proteiner som f.eks. GST. Bakterielysat uten tilførsel av rensede proteiner ble inkludert som kontroll (NP i figur 12). Antistoffet mot SdrD ble brukt for å detektere His-SdrD og GST-SdrD. Deretter ble membranen strippet og testet med Anti-Flag antistoffet for å detektere Dsg 1 ekstra-Flag-2. Membranen ble strippet igjen og testet med GST antistoff for å detektere GST. Figur 12 (midterste del) viser at Dsg 1 ekstra-Flag-2 finnes i alle prøvene for man ser et bånd ved 59 kDa i alle prøvene. Dette bekrefter at anti-Flag har trukket ned Dsg 1 ekstra-Flag-2. Man ser også et bånd ved 80 kDa og 104 kDa som tyder på at Dsg 1 ekstra-Flag-2 har klart å trekke meg seg His-SdrD og GST-SdrD (øverste del av figur 12). Men så finnes det også et bånd ved ca. 26 kDa og det tyder på at Dsg 1 ekstra-Flag har på en eller annen måte klart å trekke meg seg GST og dermed binder seg uspesifikt (nederste del av figur 12).

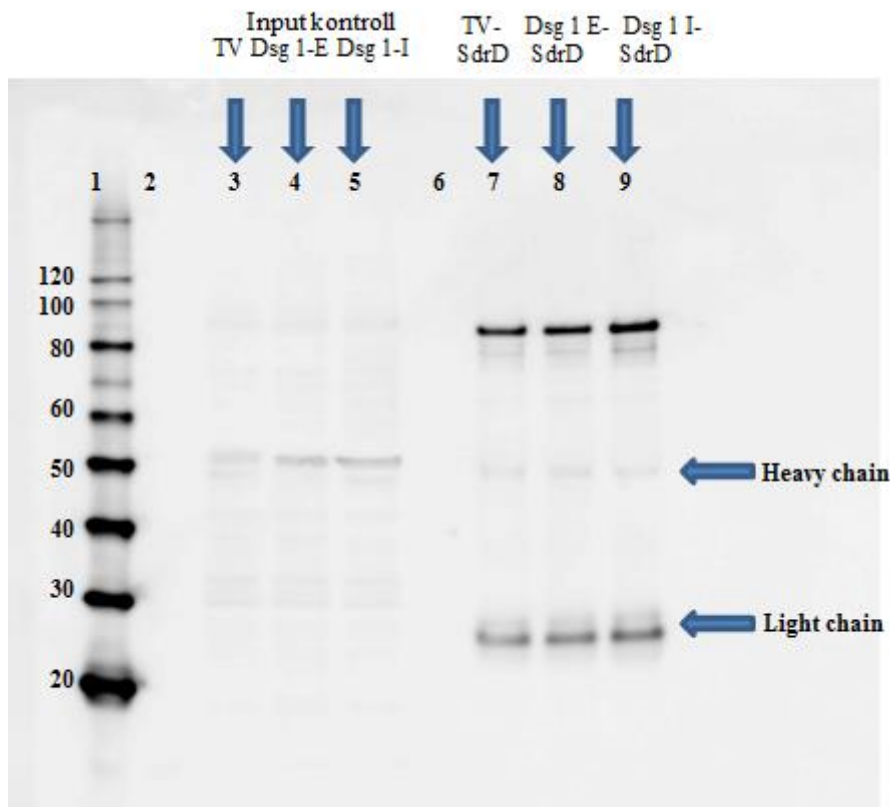


Figur 12: Co-immunopresipitering der Dsg 1 ekstra-Flag-2 trekker ned proteiner tilsatt i test rør.

Resultat av Co-immunopresipiteringen ble evaluert av western blott ved bruk av antistoff mot SdrD (øverste del), antistoff mot Flag (midterste del) og antistoff mot GST (nederste del). Magic marker ble brukt som protein ladder for å estimere størrelsen på de ulike proteinene. Tilsatt protein er indikert ovenfor blottene. NP er bakterielysate hvor det ikke ble tilført rensset protein. De andre bakterielysate er tilført indikert protein.

5.3.2 Co-immunopresipitering ved bruk av His-SdrD og eukaryot cellelysate transfektert med CMV7.1 vektor, Dsg 1 ekstra-CMV7.1 og Dsg 1 intra-CMV7.1

Det ble også gjort et interaksjonsstudium der His-SdrD ble brukt som agn for å trekke ned Dsg 1 ekstra og Dsg 1 intra som var uttrykt i HEK293 celler. Celler transfektert med tom vektor ble brukt som negativ kontroll i forsøkene.



Figur 13: Resultat av co-immunopresipitering fra cellelysat metode 1.

Resultatet ble analysert på westernblott, og anti-SdrD antistoffet ble brukt for å detektere SdrD proteinet. Brønn 1: Magic marker ble brukt som protein ladder, brønn 3: input kontroll tom vektor transfekterte celler, brønn 4= input kontroll Dsg1 ekstra transfekterte celler, brønn 5=input kontroll Dsg1 intra transfekterte celler, brønn 7=coIP tom vektor transfekterte celler + sdrD, brønn 8=coIP Dsg1 ekstra transfekterte celler + sdrD, brønn 9=coIP Dsg1 intra transfekterte eller + SdrD

Interaksjonen mellom SdrD og Dsg 1 ekstra og/eller Dsg 1 intra ble testet ved å tilsette His-SdrD til eukaryote cellelysat som var transfektet med tom vektor (CMV7.1) eller vektor som koder for Dsg 1 ekstra (Dsg 1 ekstra-CMV7.1) eller Dsg 1 intra (Dsg 1 intra-CMV7.1). Dsg ble immunopresipitert ved bruk av Flag antistoff, og western blot ble kjørt med antistoff mot SdrD. Input kontroll ble tatt med for å se protein-uttrykket i cellene før presipitering. Figur 13 viser nesten ikke båndene for input kontrollene. Grunnen til det kan være at input kontroll prøven er veldig fortennet, det var 1:1000 forhold (se metode 4.14; høsting av cellelysat). Dersom SdrD binder seg til Dsg 1 intra eller ekstra så vil det komme til uttrykk i form av et bånd ved 79 kDa. Figur 13 viser et bånd ved ca. 79 kDa for både Dsg 1 intra og ekstra. Men det viser også et bånd ved 79 kDa for tom vektor, dette tyder på uspesifisitet i metoden.

Forsøket ble gjentatt flere ganger med samme resultat. Det ble også gjort en resiprok presipitering der det ble forsøkt å trekke ned «begge veier»; enten med å trekke ned SdrD og se om Flag-proteinene co-presipiterer, eller ved å trekke ned Flag-proteinene og ser om SdrD presipiterer. Men resultatet var det samme som før (figur ikke vist). Det ble også prøvd å belegge sepharose kulene med 3 % BSA, men resultatet var det samme (figur ikke vist).

6. Diskusjon

S.aureus er en potensielt farlig patogen som kan gi mange livstruende sykdommer. Brudd av hudbarrieren kan føre til at *S.aureus* vandrer inn i huden, og en rekke virulensfaktorer av bakterien gjør det mulig for den til å overleve på og i vertscellen [1, 2, 4]. Men selv etter alle disse årene med forskning så har man ikke et fullstendig svar på samspillet mellom *S.aureus* og vert, og mange andre spørsmål rundt kolonisering og infeksjon av *S.aureus*. Siden behandling av *S.aureus* infeksjoner kan være utfordrende og kan resultere i behandlingssvikt, så er det veldig viktig å finne en måte å forebygge disse *S.aureus* infeksjonene [9].

Forskningsgruppe for Vert-Mikrobe interaksjon ved UiT har preliminnære studier som antyder at SdrD binder seg til Desmoglein 1 (Dsg1). Denne oppgaven gikk ut på å bekrefte/avkrefte hvorvidt en slik interaksjon kan finne sted. Før interaksjonsstudier kunne finne sted, skulle ekstracellulære og intracellulære del av Dsg 1 klones inn i prokaryote ekspresjonsvektor. Dessuten måtte Flag-Dsg 1 ekstra, Flag-Dsg 1 intra, GST proteiner og His taggede SdrD proteiner induseres og/eller isoleres fra bakterier.

Kloning av Dsg 1 ekstra og intra inni prokaryote ekspresjonsvektor (pT7-Flag-2)

Programmene BioEdit og Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) brukes for å sammenligne mottatte nukleotid sekvenser mot det opprinnelige nukleotid sekvensen av DNAet. BLAST programmet finner lignende sekvenser, ikke ved å sammenligne sekvensen i sin helhet, men ved å finne korte samsvar mellom de to sekvensene som sammenlignes [50]. Sekvenser fra mulige positive kloner viste insert av Dsg 1 ekstra og Dsg 1 intra i pT7-Flag-2 vektor.

Men senere, etter minst 6 gjentatte forsøk med ulike primere, viste det seg at Dsg variantene var havnet i feil vektor, vektorsekvensen ble ikke funnet ved BLAST. Tilsvarende skjedde med en kollega som klonet og sekvenserte i samme tidsrom. Hvor den ukjente vektoren kom i fra er helt ukjent. Mulig var pipettene brukt i kloning kontaminert. Senere ble konstruktene laget av HMI ved bruk av andre pipetter og med filtertips.

Protein-induksjon av Dsg 1 intra og ekstra i prokaryote ekspresjonsvektor

Flag taggede Dsg 1 intra og ekstra proteiner ble godt induert 4-5 timer etter IPTG stimuli i bakteriene dyrket både i rom temperatur og ved 37 °C (se figur 11). Derimot lot ikke Flag-Dsg 1 intra seg induere i testede tidsrom verken ved rom temperatur eller ved 37 °C. Metoden kunne ha blitt optimalisert ved å bruke f.eks. ulike medier, forskjellige temperaturer eller andre *E.coli* stammer. Men Dsg 4 er ganske lik Dsg 1 i struktur [39, 41], og forskningsgruppen har tidligere prøvd å induere Flag taggede Dsg 4 intra proteiner, men disse lot seg ikke induere verken ved bruk av ulike *E.coli* stammer, andre medier eller temperaturer. Hva som er årsak er ukjent, kan hende at noe gikk galt under forsøket eller at metoden ikke fungerer. Det ble derfor av tidsmessige grunner bestemt å fokusere på Dsg 1 ekstra videre i forsøkene i denne oppgaven.

Co-immunopresipitering ved bruk av rensede proteiner og bakterielt cellelysat med induert Dsg 1 ekstra uttrykk

For å sjekke om His-SdrD binder seg til Dsg 1 ekstra ble det gjort en co-immunopresipitering hvor His-SdrD, GST eller GST-SdrD ble tilført bakterielysat som var induert til å uttrykke Dsg 1 ekstra-Flag-2. Kontrollprøven med GST ble brukt for å sjekke om SdrD binder seg spesifikt til Dsg 1 ekstra-Flag-2. GST er ca. 26 kDa og hvis man ikke så et bånd ved 26 kDa, men et bånd ved 79 kDa (His-SdrD) og 104 kDa (GST-SdrD) så kan man anta at SdrD spesifikt binder seg til Dsg 1 ekstra. Forsøket ble gjentatt fire ganger, men GST båndet ble alltid detektert. Dette indikerer at Dsg 1 ekstra binder uspesifikt.

I følge *Co-immunoprecipitation (co-IP) Troubleshooting Guide (Thermo Scientific)* [55], så kan man for eksempel forandre på bufferet som brukes i co-IP. Vaskebufferer vil fjerne det meste av uspesifikke bindingene samtidig bevare den spesifikke bindingen mellom antistoff og antigen [55]. Vasking med lysisbuffer er vanlig siden det inneholder milde denatureringsmidler som kan bidra til å bryte uspesifikke interaksjoner. Men hvis man får trøbbel med mye bakgrunn og med å fjerne uspesifikke bindinger så kan man bruke andre vaskebufferer [55].

Men for å velge en passende buffer så må man se på stringensen til bufferet. Sterke protein-protein interaksjoner tåler høyere stringens buffer, og dersom interaksjonen mellom SdrD og Dsg 1 ekstra-Flag er sterkere enn GST og Dsg 1 ekstra-Flag vil økningen i stringensen kunne

løse problemet med bakgrunn. Hvis bindingen mellom His-SdrD-Dsg 1 ekstra er svak så kan man risikere med å miste de svake interaksjonene mellom proteinene ved valg av en høyere stringens buffer. Det beste er å prøve seg fram, altså starte med en høyere stringens buffer og hvis det ikke går så kan man gå over til svakere stringens buffer. I følge co-IP troubleshooting Guide så er RIPA buffer en høy stringens buffer. Men siden RIPA buffer er ikke tilgjengelig på laben og tidligere erfaringer viser seg at lav stringens buffer med natrium klorid (NaCl) er bra for co-IP så kan man bruke det istedenfor lysisbuffer. PBSCM (PBS-buffer (100 mM natriumfosfat, 150 mM NaCl, pH 7,2) med 1 mM CaCl₂ + 1 mM MgCl₂) eller modifisert Dulbeccos PBS (8 mM natriumfosfat, 2 mM kaliumfosfat, 140 mM NaCl og 10 mM KCl, pH 7,4) er ofte brukt som immunopresipitering bindende buffere [55].

En annen ting som kan være problematisk under co-IP er resin kulene. Ingen resin er totalt inert. Derfor vasker man resinet med TBS og glycine-HCl pH 3,5 for å gjøre dem mer inert [56]. På denne måten kan man unngå uspesifikke bindinger ved co-IP. Utslag for GST bånd trenger nødvendigvis ikke å skyldes at Dsg 1 ekstra-Flag-2 binder til GST. Det kan hende at GST binder seg til resin kulen og dermed så ser man et bånd for GST på membranen. Men hvis man belegger (Coating) resin kulene med 3 % BSA i 1 time ved rom temperatur, så kan man kanskje unngå dette problemet [55]. Ved å belegge resin kulene så gjør vi det vanskelig for proteinene til å binde seg til resin kulene. Bare de proteinene som har sterke bindinger til resinet kan binde seg til det. Hvis GST proteinet har en svak binding til resin kulene så vil den kanskje ikke være i stand til å binde seg til resinet etter at man har belegget kulene. Hvis man da fortsatt for utslag for GST bånd så kan det være et tegn på at Dsg 1 ekstra binder seg uspesifikk til GST.

Co-immunopresipitering fra eukaryot cellelysat med tom vektor(CMV7.1), Dsg 1 ekstra-Flag-2 og Dsg 1 intra-Flag

Interaksjonen mellom SdrD og Dsg 1 ekstra og/eller Dsg 1 intra ble testet ved å tilsette His-SdrD til eukaryote cellelysat som var transfektert med tom vektor eller vektor som koder for Dsg 1 ekstra eller Dsg 1 intra. Kontrollprøven med tom vektor(CMV7.1) ble brukt.

Input kontroll ble tatt med for å se protein-uttrykket i cellene før presipitering. Dsg 1 ekstra og intra ble immunopresipitert med antistoff mot Flag. I teorien skal dette presipitere bare Flag taggede Dsg 1 varianter fra cellelysat som har disse uttrykt. Dersom SdrD binder Flag-Dsg1, er det forventet at SdrD co-immunopresipiterer sammen med Flag-Dsg 1 og dette kommer til uttrykk i form av et 79 kDa bånd på western blott. Figur 13 viste at dette var tilfelle, men SdrD ble også trukket ned av Flag-antistoff tilsatt til celler uten Flag-Dsg 1 varianter (Dsg 1 intra-Flag-2 og Dsg 1 ekstra-Flag-2). Dette tyder på uspesifisitet i metoden. Videre ble det bestemt å gjøre en resiprok presipitering det vil si å trekke ned «begge veier»; enten med å trekke ned SdrD og se om Flag-proteinene co-presipiterer, eller trekker ned Flag-proteinene og ser om SdrD presipiterer, men igjen uten hell. Resultatet (figur ikke vist) viste seg til å ha et bånd over 79 kDa, noe som tyder på at det er ikke His-SdrD, men et annet protein. Totalt ble forsøket gjentatt 5 ganger med samme resultat hver gang. Hva som skyldes denne uspesifikke bindingen er ukjent.

Mulig at antistoff spesifisiteten ikke var godt nok. Kanskje antistoffer binder seg til andre proteiner i prøven. Membranen ble strippet og testet med anti-SdrD antistoffer og Anti-Flag antistoff for å detektere SdrD proteiner og Dsg 1 proteiner. Hvis antistoffet er uspesifikt så kunne man tenkt seg bånd i alle tre cellelysatenes. Men antistoffet mot SdrD har blitt testet ut av forskningsgruppen tidligere og det har vist seg til å fungere bra. Men Anti-Flag antistoffet derimot har ikke blitt testet ut før så det kan hende at Anti-Flag antistoffet er uspesifikt.

Men det kan også være at spesifisiteten til sepharose kulene ikke er så bra. Det kan godt hende at sepharose kulene binder seg til andre proteiner i prøven. Det ble også gjort et forsøk der sepharose kulene ble belegget med 3 % BSA, men resultatet var det samme. Det må til noen optimalisering av metoden, kanskje av sepharose kulene eller bufferen for å eventuelt lykkes med forsøket.

Hvorfor er desmogleiner en gunstig målgruppe for *S.aureus*?

Oppdagelsen av desmogleiner (Dsg) i desmosomer, deres forhold til adhesjonsmolekyler og deres rolle i ulike hudsykdommer har vært et stort fokus i forsknings verden i de siste 10 årene [57]. Men hvorfor vil *S.aureus* binde seg til desmogleiner i det første? Hvorfor spiller desmogleiner en stor rolle i ulike hudsykdommer som forårsakes av *S.aureus*? For å svare på det så man se nærmere på desmogleinens struktur og dens rolle i huden.

Etter oppdagelsen av desmosomer så begynte man å undersøke det nøye med elektromikroskopi. Da så man et hvitt område mellom cellemembranene til naboceller, som ble antatt til å være “limet” som holdt desmosomer, og derved cellene, sammen. Og videre ble det funnet ut at desmogleiner er en del av familien av adhesjons molekyler [57]. Og hvis *S.aureus* vil komme seg dypere inn i huden og infisere verten, så må den på en eller annen måte ødelegge huden og derav cellene for å komme seg dypere inn huden og deretter kolonisere. Og siden desmogleiner er en adhesjonsmolekyl som er med på å holde sammen cellene og derav huden, og i tillegg til det så ligger desmogleiner i den ytterste delen a huden, altså epidermis, så vil det være mest sannsynlig å tenke seg at det vil være en gunstig målgruppe for *S.aureus* til å binde seg og infisere verten. Hvis *S.aureus* binder til desmogleiner i huden og derav bryter adhesjonen mellom cellemembranene så kan det komme dypere inni huden og kolonisere.

Det finnes to typer autoimmune sykdommer mot desmosomer: pemfigus vulgaris (PV) og pemfigus foliaceus (PF) [57]. Sykdommen skyldes dannelse av autoantistoffer mot antigenene desmosmale kaderiner på keratinocytter (Dsg 1 og Dsg 3). Antigenen for PF er Dsg 1 og antigenen for PV er Dsg 3. I begge disse typene oppstår det blemmer i hud og slimhinner som er en resultat av tap av celle adhesjon i epidermis [57]. Pemfigus sykdommen har også hjulpet med å avklare årsaken til blemmedannelse i bulløs brennkopper og stafylokokk skåldet hud sykdommer [57].

Stafylokokk skåldet hud sykdommer rammer primært spedbarn og små barn, og sykdommen starter med feber og hud ømhet etterfulgt av separering av epidermal cellemembran lagene i hele hudoverflaten i løpet av noen få timer [58].

Både bulløs brennkopper og stafylokokk skåldet hud sykdom er forårsaket av et giftstoff, kalt eksfoliativ toksin (ET), som lages og utskilles av *S.aureus* [57, 58]. Det finnes to hoved gruppe av eksfoliativ toksin, eksfoliativ toksin A (ET_A) og eksfoliativ toksin B (ET_B) [58, 59]. Men selv mange år etter denne oppdagelsen så har det ikke vært klar for seg hvordan dette toksinet forårsaker blemmer i epidermis [57]. Selv om pemfigus ikke er direkte relaterer til *S.aureus* hudsykdommer så gav dette et hint på at det kan lett oppstå hudinfeksjoner ved bryting av adhesjonen mellom cellemembranene i epidermis. Og det viste seg at eksfoliativ

toksinets protein substrat var Dsg 1, og senere ble det påvist at både ET_A og ET_B kløyver Dsg 1 uten å påvirke Dsg 3, og at ET_B kløyver direkte den ekstracellulære domenen av Dsg 1 og derav splitter de epidermale lagene [57-59]. Og igjen så sier disse funnene noe om hvorfor desmogleiner, spesielt Dsg 1, er en gunstig målgruppe for *S.aureus*.

Desmoglein er ikke bare en målgruppe for *S.aureus*, men den er også involvert i infeksjoner som er forårsaket av adenovirus. De fleste av humane adenovirus (serotype A til F) bruker coxsackie adenovirus reseptor (CAR) som en primære bindings reseptor [57, 60]. Men serotype B adenovirus, som forårsaker luftveis- og urinveis infeksjoner, benytter ikke coxsackie adenovirus reseptor. I stedet for så binder den til Dsg 2 som den primære høyaffinitets reseptor og fører til en kortvarig åpning av intercellulære junction og gjennomtrengning av virus inn i de subepiteliale cellelagene og blodstrømmen, og får virus til å spre seg [57, 60].

7. Konklusjon og fremtidige perspektiv

Proteinene Dsg 1 ekstra-Flag-2, His-SdrD og GST har stor sett latt seg isolere og/eller inducere og kan brukes i interaksjonsstudier. Men Dsg 1 intra-Flag-2 proteiner lot seg ikke inducere og det må til optimalisering av metoden for å kunne inducere Dsg 1 intra-Flag-2 proteiner i framtiden. Co-immunopresipitering der isolerte flag proteiner ble brukt som agn for å trekke ned tilsatt protein i testrør ble utført. Og co-immunopresipitering der rensset proteiner, Dsg 1 intra , Dsg 1 ekstra og His-SdrD, ble brukt som agn til å trekke ned mulig interaksjonspartnere som er uttrykt i eukaryote celler ble også utført. Men metodiske problemer medførte at man per i dag ikke har lyktes i å bekrefte/avkrefte interaksjon mellom Dsg 1 intra og/eller Dsg 1 ekstra og SdrD. Interaksjonsstudiene viste seg at Dsg 1 ekstra-Flag-2 binder seg uspesifikt. Det viste alltid et bånd ved 26 kDa (GST). Forskningsgruppa HMI må fremover fortsette å optimalisere metodene, samt bruke andre metoder for å bekrefte interaksjonen mellom Dsg 1 ekstra og/eller Dsg 1 intra og SdrD.

Siden *S.aureus* forårsaker mange livstruende sykdommer, og det er utfordrende å forebygge de sykdommene på grunn av dens resistent mot ulike typer antibiotika så er det veldig viktig å finne adhesjonsmolekylet til *S.aureus* i kroppen. Hvis man vet hvilket adhesjonsmolekyl den binder til seg i verten så kan man utvikle medisiner som kan hindre videre spredning og kolonisering av bakterien. Hvis man vet at *S.aureus* binder seg til Dsg 1 så kan man utvikle legemidler som konkurrerer med *S.aureus* om bindingssete til Dsg 1 og derav hemme bindingen mellom *S.aureus* og Dsg 1.

Er man bærer av *S.aureus* i nesen er det også økt risiko for infeksjoner i operasjonssår andre steder i kroppen. *S.aureus* kan spre seg rundt omkring i kroppen gjennom pusting eller ved at man av og til klør seg i ansiktet og deretter via fingrene overføre det til operasjonssåret. Hvis man er da bærer av *S.aureus* og man skal gjennomgå en operasjon så kan man først dekolonisere pasient for *S.aureus*, og deretter smøre på med et liniment eller salve som inneholder modifisert SdrD som skal etterligne SdrD i *S.aureus* og konkurrere om bindingssete, og tilslutt hemmer bindingen mellom SdrD (i *S.aureus*) og Dsg 1. Dette vil da hemme videre kolonisering av bakterien.

8. Referanse

1. Krishna, S. and L.S. Miller, *Host–pathogen interactions between the skin and Staphylococcus aureus*, in *Current Opinion in Microbiology*. 2012. p. 28-35.
2. Hamdan-Partida, A., T. Sainz-Espuñes, and J. Bustos-Martínez, *Isolation of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in healthy carriers in a Mexican community*. *International Journal of Infectious Diseases*, 2014. **18**(0): p. 22-26.
3. Wertheim, H.F., et al., *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*. *Lancet Infect Dis*, 2005. **5**(12): p. 751-62.
4. Ten Broeke-Smits, N.J., et al., *Hair follicles as a niche of Staphylococcus aureus in the nose; is a more effective decolonisation strategy needed?* *J Hosp Infect*, 2010. **76**(3): p. 211-4.
5. van Belkum, A., et al., *Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*, 2009. **9**(1): p. 32-47.
6. Johannessen, M., J.E. Sollid, and A.M. Hanssen, *Host- and microbe determinants that may influence the success of S. aureus colonization*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012. **2**: p. 56.
7. Linda F, M., et al., *Staphylococcus aureus–associated Skin and Soft Tissue Infections in Ambulatory Care*. *Emerging Infectious Diseases*, 2006. **12**(11).
8. DeLeo, F.R. and H.F. Chambers, *Reemergence of antibiotic-resistant Staphylococcus aureus in the genomics era*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(9): p. 2464-74.
9. Klein, E. and D. Smith L, *Hospitalizations and Deaths Caused by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, United States, 1999–2005*. *Emerging Infectious Diseases*, 2007. **13**(12).
10. Klevens, R.M., et al., *Invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in the United States*. *Jama*, 2007. **298**(15): p. 1763-71.
11. Peacock, S.J., I. de Silva, and F.D. Lowy, *What determines nasal carriage of Staphylococcus aureus?* *Trends Microbiol*, 2001. **9**(12): p. 605-10.
12. Eriksen, N.H., et al., *Carriage of Staphylococcus aureus among 104 healthy persons during a 19-month period*. *Epidemiol Infect*, 1995. **115**(1): p. 51-60.
13. Vandenberg, M.F. and H.A. Verbrugh, *Carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical relevance*. *J Lab Clin Med*, 1999. **133**(6): p. 525-34.
14. Peacock, S.J., et al., *Determinants of acquisition and carriage of Staphylococcus aureus in infancy*. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(12): p. 5718-25.
15. Goslings, W.O. and K.K. BÜChli, *Nasal carrier rate of antibiotic-resistant staphylococci: Influence of hospitalization on carrier rate in patients, and their household contacts*. *A.M.A. Archives of Internal Medicine*, 1958. **102**(5): p. 691-715.
16. Fritz, S.A., et al., *Staphylococcus aureus colonization in children with community-associated staphylococcus aureus skin infections and their household contacts*. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 2012. **166**(6): p. 551-557.
17. Heilmann, C., *Adhesion mechanisms of staphylococci*. *Adv Exp Med Biol*, 2011. **715**: p. 105-23.
18. Clarke, S.R. and S.J. Foster, *Surface adhesins of Staphylococcus aureus*. *Adv Microb Physiol*, 2006. **51**: p. 187-224.
19. Xia, G., T. Kohler, and A. Peschel, *The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 2010. **300**(2-3): p. 148-54.

20. Sitkiewicz, I., I. Babiak, and W. Hryniewicz, *Characterization of transcription within sdr region of Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011. **99**(2): p. 409-16.
21. Kaliner, M.A., *Human nasal respiratory secretions and host defense*. *Am Rev Respir Dis*, 1991. **144**(3 Pt 2): p. S52-6.
22. Cole, A.M., P. Dewan, and T. Ganz, *Innate antimicrobial activity of nasal secretions*. *Infect Immun*, 1999. **67**(7): p. 3267-75.
23. Nagaoka, I., et al., *Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins*. *Inflamm Res*, 2000. **49**(2): p. 73-9.
24. Cole, A.M., et al., *Determinants of Staphylococcus aureus nasal carriage*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001. **8**(6): p. 1064-9.
25. Peschel, A., *How do bacteria resist human antimicrobial peptides?* *Trends Microbiol*, 2002. **10**(4): p. 179-86.
26. Sieprawska-Lupa, M., et al., *Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by Staphylococcus aureus-derived proteinases*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(12): p. 4673-9.
27. Wang, X., et al., *Structures of SdrD from Staphylococcus aureus reveal the molecular mechanism of how the cell surface receptors recognize their ligands*. *Protein Cell*, 2013. **4**(4): p. 277-85.
28. Josefsson, E., et al., *The binding of calcium to the B-repeat segment of SdrD, a cell surface protein of Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(47): p. 31145-52.
29. O'Brien, L., et al., *Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by Staphylococcus aureus: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A*. *Mol Microbiol*, 2002. **44**(4): p. 1033-44.
30. Josefsson, E., et al., *Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 1998. **144** (Pt 12): p. 3387-95.
31. Sabat, A., et al., *Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding sdr genes among nasal-carriage and invasive Staphylococcus aureus strains*. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**(3): p. 1135-8.
32. Corrigan, R., H. Miajlovic, and T. Foster, *Surface proteins that promote adherence of Staphylococcus aureus to human desquamated nasal epithelial cells*. *BMC Microbiology*, 2009. **9**(1): p. 1-10.
33. Michael E, A. and T. Kevin, *Aulton's Pharmaceuticals-The design and Manufacture of Medicines*. 3 ed, ed. A. Michael E. 2007: Churchill Livingstone.
34. Kupper, T.S. and R.C. Fuhlbrigge, *Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(3): p. 211-22.
35. Frank, O.N., et al., *Skin immune sentinels in health and disease*. *Nature Reviews Immunology*, 2009. **9**(10): p. 679-691.
36. Garrod, D. and M. Chidgey, *Desmosome structure, composition and function*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(3): p. 572-87.
37. Delva, E., D.K. Tucker, and A.P. Kowalczyk, *The desmosome*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. **1**(2): p. a002543.
38. Green, K.J. and C.L. Simpson, *Desmosomes: new perspectives on a classic*. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(11): p. 2499-515.
39. Ishii, *Identification of Desmoglein as a Cadherin and Analysis of Desmoglein Domain Structure*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007.

40. Nishifuji, K., M. Sugai, and M. Amagai, *Staphylococcal exfoliative toxins: "Molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals*. Journal of Dermatological Science, 2008. **49**(1): p. 21-31.
41. Kljuic, A., et al., *Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris*. Cell, 2003. **113**(2): p. 249-60.
42. *Macherey-Nagel plasmid DNA purification manual: NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)*. Last update date: 07 / 2010 [cited 2014 16 May]; Available from: <http://www.mn-net.com>.
43. Kolmodin, L.A. and D.E. Birch, *Polymerase chain reaction. Basic principles and routine practice*. Methods Mol Biol, 2002. **192**: p. 3-18.
44. Lee, P.Y., et al., *Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments*. J Vis Exp, 2012(62).
45. *GE Healthcare: PCR DNA and Gel Band Purification Kit (product booklet)*. Last update date: 10/2008 [cited 2014 4 March]; Available from: <http://www.gelifesciences.com>.
46. *New England Biolabs (NEB): Restriction Endonucleases: Molecular Cloning and Beyond*. [cited 2014 14 May]; Available from: <http://international.neb.com/products>.
47. *New England BioLabs (NEB): DNA Ligation*. [cited 2014 8 May]; Available from: <http://international.neb.com>.
48. Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama, *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids*. Gene, 1990. **96**(1): p. 23-8.
49. Leroy, H. and G. David, *The digital code of DNA*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 444-448.
50. *The National Center for Biotechnology Information (NCBI): BLAST Basic Local Alignment Search Tool-Blast Program Selection Guide*. Last update date: 1/7/2009 [cited 2014 16 May]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
51. Harper, S. and D.W. Speicher, *Purification of proteins fused to glutathione S-transferase*. Methods Mol Biol, 2011. **681**: p. 259-80.
52. *Qiagen: Ni-NTA Spin Kit Handbook*. Last update date: 1/2008 [cited 2014 11 January]; Available from: www.qiagen.com.
53. Lee, C., *Coimmunoprecipitation assay*. Methods Mol Biol, 2007. **362**: p. 401-6.
54. Mahmood, T. and P.C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. N Am J Med Sci, 2012. **4**(9): p. 429-34.
55. *Thermo Scientific: Co-immunoprecipitation (Co-IP) Troubleshooting Guide* Last update: 2008 [cited 2014 16 April]; Available from: www.thermo.com/pierce.
56. *Sigma-Aldrich: ANTI-FLAG M2 Affinity Gel. Product information; Catalog Number A2220*. Last update date: 10/2008 [cited 2014 10 February]; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/norway.html>.
57. Amagai, M. and J.R. Stanley, *Desmoglein as a target in skin disease and beyond*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(3 Pt 2): p. 776-84.
58. Amagai, M., et al., *Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein I*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(5): p. 845-50.
59. Amagai, M., *The molecular logic of pemphigus and impetigo: the desmoglein story*. Vet Dermatol, 2009. **20**(5-6): p. 308-12.
60. Wang, H., et al., *Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14*. Nat Med, 2011. **17**(1): p. 96-104.