

Optimalisering av Rekombinant His-S100A4 produksjon i *E.coli*



Rojhat J. Murat

Masteroppgave i farmasi

Vår 2013

Veiledere

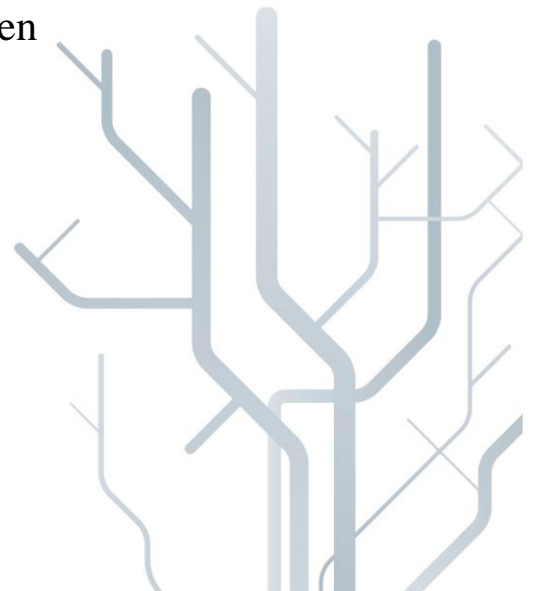
Internveileder: Ole Morten Seternes

Eksternveileder: Gunbjørg Svineng

Biveileder: Liv Tone Eliassen

Tumorbiologisk forskningsgruppe

Institutt for medisinsk biologi



Forord:

Denne oppgaven ble utført ved Tumorbiologisk forskningsgruppe, institutt for medisinsk biologisk Universitetet i Tromsø i perioden oktober 2012 til mai 2013.

Mange fortjener en takk i forbindelse med oppgaven min:

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder ved Tumorbiologisk forskningsgruppe, Gunbjørg Svineng. Takk for at du gjorde det mulig for meg å gjennomføre denne masteroppgaven under din veiledning. Takk for gode innspill og hjelp under skriveprosessen.

Takk til biveileder og nærmeste samarbeidspartner Liv Tone Eliassen for din tålmodighet, ditt gode humør og stadige oppmuntringer har vært til uvurderlig hjelp.

Tusen takk til Eli Berg og alle andre på avdelinge for inspirasjon, veiledning og mye godt humør! Dere har gjort dette til et morsomt og lærerikt år.

Takk til mamma, pappa, mine brødre og min søster for støtte og motivasjon gjennom hele Studietida. I tillegg vil jeg takke venner ved Universitetet i Tromsø, for deres hjelp og får fantastiske studietid.

Tromsø, mai 2013

Rojhat J. Murat

Innholdsfortegnelse

.....	1
.....	1
Forord:.....	2
Sammendrag	5
Forkortelser:.....	6
1. Innledning.....	7
1.1 Bakgrunn for oppgaven	7
1.2 kreft	7
1.3 Metastase:.....	8
1.3.1 De essensielle trinnene er:.....	8
1.4 S100 proteinfamilie:.....	10
1.5 S100a4.....	10
1.5.1 prognostisk betydning:.....	12
1.5.2. Intracellulært bindingspartnere.....	12
1.5.3. Extracellulær bindingspartnere.....	13
1.6 Matriks metalloproteinaser (MMP).....	15
1.6.1. S100A4 og MMPer.....	15
1.7. NFκB	16
1.7.1. NfκB signalveier.....	16
1. METODE TEORI:.....	18
2.1. Ekspresjonsvektor til S100A4	18
2.2. E.coli	19
2.3. Transformasjon.....	22
2.3.1. Bakteriell transformasjon	22
2.4. Transfeksjon	23
2.5. Begreper	25
3. Material	28
4. Metode	29
4.1 Cellelinjer:.....	29
4.2. Medium	30
4.3 Celledyrking	30
4.4.Splitting av celler.....	31
4.5. Celletelling	31

4.6. Prosedyre for produksjon og rensing av human S100A4	32
4.7. SDS-PAGE.....	35
4.8. Produksjon og rensing av NfκB-3x-kb -luc plasmid og pmaxGFP plasmid	36
4.9. Stimulering av His-S100A4 protein ved NFκB aktivitet i en reportergen-assay	38
5.Resultat og diskusjon.....	41
5.1.1. Isolering av ekspresjonsvektoren for His-S100A4.....	41
5.2. Første runde med His-S100A4 protein produksjon og rensing:	44
5.3. Andre runde med His-S100A4 produksjon og rensing	50
5.4. Tredje runde med His-S100A4 produksjon og rensing:	52
5.5. Fjerde runde med His-S100a4 produksjon og rensing:	60
5.6 produksjon og rensing av NFκB plasmid og GFP plasmid	68
5.9 Stimulering av His-S100A4 protein i NFκB aktivitet reportergenassay	76
Konklusjonen:	81
Fremover:	82
Referanser:	83

Sammendrag

Metastase og invasjon er hovedårsaken til mortalitet hos kreftpasienter. Kreftforskningen verden over prøver å gi svar på hva som er mekanismen bak disse prosessene.

Kreftforskningen har vist en stor interesse for Matriks metalloproteiner(MMP), pga deres økte uttrykk som er funnet i flere kreftformer. MMP er ei gruppe enzymer som er involvert i tumorinvasjon, metastasering og angiogenese. S100A4 kalsium bindende protein er vist å påvirke syntese og aktiveringen av flere MMPer.

S100A4 har ingen enzymatisk aktivitet, men virker gjennom interaksjoner med ulike intracellulære og ekstracellulære bindingspartnere. Rollen til ekstracellulært S100A4 er dårlig klarlagt og forutsetningen for å kunne utføre nødvendige forsøk er at det finnes tilstrekkelige mengder ferdig produserte- og rensede S100A4-proteiner

Målet med prosjektet var å etablere en forbedret prosedyre for produksjon og rensing av biologisk aktivt S100A4 protein fra E Coli. Eksisterende prosedyre for S100A4 produksjon og rensing er hentet fra Radiumhospitalet i Oslo. Forskere ved Radiumhospitalet har produsert i S100A4 og har fått til biologisk aktivt S100A4 Det har dog ikke alltid vært lett å produsere og få til aktivt S100A4 protein.

Flere justeringer ble gjort med prosedyren fra Radiumhospitalet. I dette prosjektet ble 4 ulike E.coli stammer brukt for å produsere S100A4 proteinet, for å se om det var noe forskjell mellom rekombinant S100A4 protein produksjon og biologisk aktivitet i de ulike bakteriestammene. Deretter ble proteinet rensset på affinitetskolonne. SDS-page ble kjørt for å påvise hvor ren rS100A4 proteinet var. Oral plateepitelkarsinomcellelinjer ble bruk for å teste grad av biologisk aktivitet til det produserte proteinet.

De to bakteriestammer BI-21 star og BL-21 des ga best utbytte av rensset S100A4. Rensset S100A4 ble testet for aktivering av intracellulært transkripsjonsfaktoren NFkB. Dette viste at S100A4 som var produsert og rensset i laben ga bedre aktivitet enn TNF-alpha (positiv kontroll til S100A4) og S100A4 som var innhentet utenfra..

Forkortelser:

EphA2 Ephrin receptor A2

E.coli: escherichia coli

BM: Basal membran

TNF-a: Tumor necrosis factor-alpha

NF- κ B: Nuclear factor kappa B

PAGE: Polyakrylamid gel-elektroforese

RPMI-1640: Rosewell Park Memorial Institute medium

PBS: Phosphate Buffered Saline

TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase

P53: tumor protein 53

OSCC: Oral Squamous Cell Carcinoma.

DNA: Deoksyribonukleinsyre

ECM: Ekstracellulær matriks

kDa: Kilo dalton

FBS Fetal bovine serum (fetalt kalveserum)

GFP: green fluorescent protein

NF κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

SDS: Natrium dodekyl sulfat

Rpm: Runder per minutt

DTT: Dithiothreitol

MMP: matrix metalloproteinaser

1. Innledning

1.1 Bakgrunn for oppgaven

S100A4 er et lite kalsium protein som tilhører S100 familien, og er ofte overrepresentert i tumorer. Proteinet er vist å ha en viktig rolle i metastaseprosessen. Bl.a. ved å stimulere kreftcellenes motilitet, angiogenese, og ved å regulere apoptose. Forskningsgrupper ved Radiumhospitalet i Oslo og Tumorbiologisk forskningsgruppe ved universitetet i Tromsø har i flere år studert betydningen av S100A4 i kreftutvikling og spredning. Så langt har de kommet frem til at den motilitetsfremmende effekten av S100A4 delvis kan forklares ved at proteinet er vist å påvirke syntese av flere MMPer. Mekanismen bak dette er delvis klarlagt, men i noen tilfeller vist å være knyttet til aktivering av transkripsjonsfaktor NFκB. Forskningsgruppen har tidligere vist en sammenheng mellom S100A4 og MMP-9 uttrykket i orale plateepitelkarsinoma cellelinjer. Deres hypotese er at både ekstracellulær og intracellulær S100A4 er viktig for regulering av MMP uttrykk, dermed invasiv vekst og metastasering av flere kreftformer. Masteroppgaven ved tumorbiologisk forskningsgruppe ved UiT går ut på å optimalisere produksjonen av rekombinant S100A4 proteinet i E.coli, og teste de ulike batchene for biologisk aktivitet. Metoden som er benyttet er dyrking av E.coli og videre produksjon og rensing av rekombinant S100A4 ved affinitetenskromatografi.

1.2 kreft

Verdens helseorganisasjon har beregnet at kreft forårsaket 7,9 millioner dødsfall i 2007, dvs 13% av verdensbefolkning. Dermed blir kreft regnet som en av de hyppigste dødsårsakene i verden. I Norge er kreft den hyppigste dødsårsaken blant befolkningen som dør før 65 år. Etter 65 år er hjerte-karsykdom den dominerende dødsårsaken. I Norge har forekomsten av kreft økt betraktelig siden 1950-tallet. Denne økningen kan skyldes bedre registrering av krefttilfeller, og en gjennomsnittlig økt levealder. I tillegg kan livsstilsfaktorer som overvekt, lav fysisk aktivitet og tobakksrøyking forklare kreftøkningen (folkehelseinstitutt, fakta om kreft).

Felles for kreftsykdommer er at de starter med dårligere kontrollert celledeling, som etterhvert utvikler seg til ukontrollert celledeling og cellevekst. Kreftceller utvikler seg til en klump (svulst). Kreftceller deler seg nødvendigvis ikke raskere enn normale celler, men forholdet mellom cellevekst og celle død er i ubalanse. Normale celler må endre seg mye før de kan bli kreftceller. Forandringer fra normal celle til påvisbar kreftsvulst kan ta flere år. Endringene i

gener i kroppen kan skyldes flere faktorer, for eksempel at genene blir skadet som følge av virus, stråling, sol, og giftigstoffer som for eksempel nikotin i tobakksrøyking. Flere gener blir skadet under kreft. De viktigste skadene er i tre gener i) reparasjonsgener ii) proto-onkogener iii) tumor-suppressorgener. Funksjonen til disse tre genene i normale celler:

Reparasjons-gener lager proteiner som reparerer arveanlegget DNA.

Pro-onkogener lager proteiner som stimulerer cellene til vekst.

tumor-suppressorgener lager proteiner som hemmer cellevekst.

Kreftceller kan spre seg til andre deler i kroppen, ved at løse kreftceller blir transportert i blodet og lymfesystemet til andre steder i kroppen (metastase). (Schmidt-Hansen, Klingelhofer et al. 2004)

1.3 Metastase:

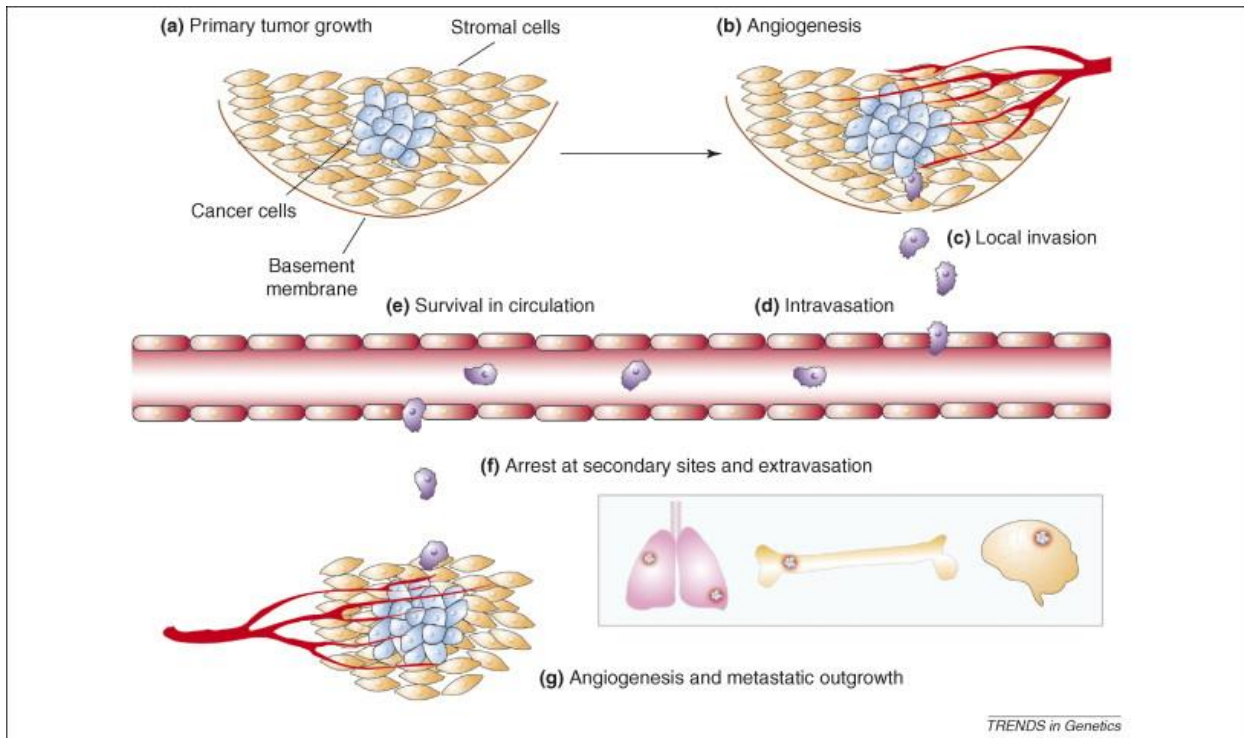
Metastase er hovedårsaken til sykdom og dødelighet hos kreftpasienter. Kreftcellenes evne til å metastasere gjør dem vanskelige å utrydde. Studier har vist at hele 90 % av kreftsyke pasienter dør som følge av metastase (Gupta and Massague 2006). Metastase er en komplisert prosess med flere essensielle trinn. Bare enkelte kreft celler kan overleve alle trinnene og fremme metastase.

1.3.1 De essensielle trinnene er:

Kreftcelle deler seg ukontrollert. En forutsetning for at kreft celler skal fortsette å dele seg er at de har nok tilgang til oksygen, og næringsstoffer. Samtidig må avfallsstoffer fraktes bort. Kreftceller slår på signalsystemer som fremmer angiogenese. Angiogenese er dannelsen av nye blodårer til tumorceller. Disse blodårene forsyner tumorcellene med oksygen og næringsstoffer, samtidig som de frakter bort avfallsstoffer. Angiogenese er særlig viktig når kreftcellene vokser til en diameter på 1-2 mm (sml: angiogenese).

Normale /friske celler har adhesjonsmolekyler som opprettholder celle-celle kontakt. For at de primære tumor-cellene skal metastasere, må de først nedregulere aktiviteten til adhesjonsmolekyler som e.cadherin, selectiner og medlemmer av immunoglobulinfamilier. Nedregulering av disse adhesjonsmolekylene vil føre til at kreftcellene løser seg lettere fra naboceller. En forutsetning for at kreftcellene skal metastasere er at de løsriver seg fra

naboceller og deretter trenger gjennom basalmembranen (BM) og ekstracellulært matris (ECM) som omgir tumorecellene. Basalmembran er cellefri hinne av proteinfibrer som epitelet festes til. ECM består av collagener, glykoproteiner og proteoglykaner. Tumor-cellene må først bryte seg gjennom basalmembranen før de invaderer til systemisk sirkulasjon (figur 1). Tumorcellene skyller derfor ut proteolytiske enzymer som degradere ECM og BM. disse enzymene er matrix metalloproteiner (MMP) og plasminogen. Deretter blir kreftcellene spredt i kroppen via lymfe og eller blodåresystemet (Gupta and Massague 2006).



Figur 1: essensielle trinnene for metastase fra primær tumor til sekundære lokasjoner. Trinnene er forklar i teksten. Figuren er hentet fra (Ma and Weinberg 2008)

Når kreftceller når en organ, vil de først bli oppfattet som fremmede av kroppens immuneceller, og andre forsvarsmekanismer. Kroppen klarer å ta livet av mange kreftceller, men blant mange milliarder løsrevne kreftceller, klarer enkelte å slå seg ned blant normale celler i den nye organen. En ny runde med metastasering startes. Studier har vist at bare 0,01 % av alle tumorcellene overlever trinnene før metastase, og er i stand til å indusere sekundære tumorvekst.

Fremover beskrives S100 proteinfamilie, S100A4 og mulige funksjoner i metastaseprosesser. Samtidig vil en del teori bak metodene bli beskrevet fordi en stor del av oppgaven går ut på å forbedre prosedyren.

1.4 S100 proteinfamilie:

S100 familie er små og syrlige kalsiumbindende proteiner som har en molekylmasse på 10-12 kDa (Marenholz, Heizmann et al. 2004). 20 medlemmer av S100 proteiner er identifisert hos mennesker, 16 av disse er båndet til Iq21 kromosomet (Marenholz, Heizmann et al. 2004). Hver S100 protein har sine unike funksjoner med spesifikke bindinger til Ca²⁺

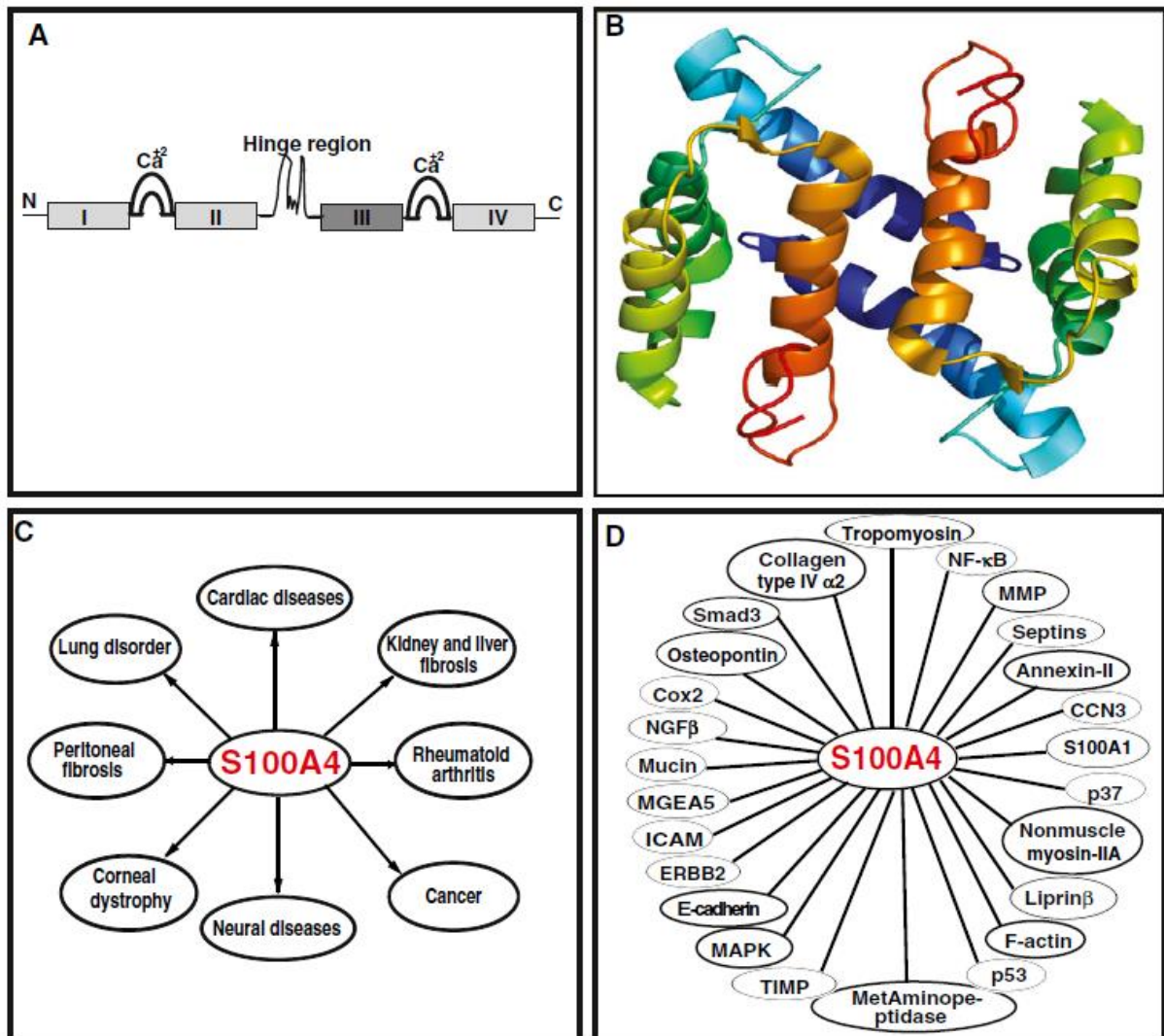
De første S100 proteinene (S100A1 og S100 B) ble identifisert i 1965 av Moore. Sammensetningen ble kalt for S100, fordi bestanddelene var løselig i 100% mettet ammoniumsulfat ved pH 7 (Zimmer, Cornwall et al. 1995). S100 proteiner er involvert i immunrespons, differensiering, cytoskjelett dynamikken, enzymaktivitet, Ca²⁺ homøostase og proliferasjon. Alle disse prosessene kan ha betydning i kreftutviklingen (Emberley, Murphy et al. 2004).

1.5 S100a4

S100A4 er kalsium-bindende protein, og er også kjent under andre navn, blant annet metastasin (Mts1) (Watanabe, Kobayashi et al. 1992), fibroblast-spesifikk protein (FSP1) (Strutz, Okada et al. 1995), 18A2, pEL98 (Goto, Endo et al. 1988) p9Ka (Barraclough, Savin et al. 1987), 42A, CAPL, og calvasculin (Watanabe, Usuda et al. 1992). S100A4 er en undergruppe av S100 proteinfamilie, S100A4 er en polypeptid som har 101 aminosyre med en molekylstørrelse på 11,5kDa (figur 2b). Hos mennesker sitter S100A4 proteinet på 1q21 kromosomet. S100A4 har stor utbredelse i normale menneskelige vev, inkludert fibroblaster (Strutz, Okada et al. 1995), monocytter (Cabezon, Celis et al. 2007) makrofager (Takenaga, Nakamura et al. 1994) T-lymfocytter, nøytrofile granulocytter (Cabezon, Celis et al. 2007) og endotelceller. Påviselige mengder av S100A4 er også funnet i vev i eggstokkene, prostata, milT, skuldbruskjertel, beinmarg (Ilg, Schafer et al. 1996). Mindre mengde av S100A4 er vist i pankreas, tykktarmen, tyreoidkjertel, lunge og nyrer. Den menneskelige S100A4 genet har 4 helisk-bånd, med to EF hender (helix-loop-helix kalsium-bindende domener). Amino-terminal i den ene EF-hand blir kalt for non-cannonical og har lav affinitet til Ca²⁺. Mens karbon-terminalen på andre EF hand blir kalt for kannonikal og har høy affinitet for Ca²⁺. Ikke-kannonical EF-hand ligger mellom heliks I og II. Kannonikal EF-hand ligger i heliks IV (Gribenko and Makhatadze 1998). Det er en hengslet region mellom EF-hendene. Hengslende regionen har flere

aminosyregrupper(figur:2a). Når S100A4 binder seg til kalsium, skjer det en konformasjonsendring i proteinet, som gir en hydrofob lomme som er viktig for gjenkjenning av målproteiner.

S100A4 har ingen enzymatisk aktivitet, og virker hovedsakelig ved å danne ikke-kovalente bindinger med intracellulært og ekstracellulært proteiner(Tarabykina, Griffiths et al. 2007). Bindingen er nødvendig for å få biologisk funksjon.



Figur 2: A) strukturell domener av S100A4 proteinet representert. B) diagrammet viser molekylstrukturen til S100A4 proteinet. C) rollen til S100A4 i patologien til flere humane sykdommer. D) viser etablerte og potensielle bindingspartnere til S100A4 proteinet. Figuren er hentet fra (Mishra, S. K., et al. (2012).

1.5.1 prognostisk betydning:

S100A4 har en sentral rolle i metastaseprosessen. Flere studier har undersøkt korrelasjon mellom S100A4-uttrykk og overlevelse. Derfor har flere forskere forsket på om S100A4 kan bli brukt som prognostisk markør hos kreftpasienter. En av de største studiene ble gjort på brystkreft, der Rudland et al i 2000 undersøkte S100A4 uttrykk i primærtumorer fra 349 brystkreftpasienter. Studien tok med kvinner som hadde fått diagnosen brystkreft mellom 1976-1982, der sykdommen var i fase I og II). 80 % av pasientene med S100A4-negative svulster var i live etter 19 år, mens kun 11 % av pasientene med S100A4-positive svulster var i live. Studiet konkludert med at det var en sterk korrelasjon mellom S100A4-uttrykk og pasientenes prognose. Videre i studiet ble S100A4-uttrykk sammenlignet med etablerte markører for sykdomsprogresjon. Det kom frem at S100A4-uttrykk var den mest signifikante markøren for overlevelse(Rudland, Platt-Higgins et al. 2000). Den andre store studien ble gjort i 2002 av Gongoll, der inkluderte de 709 pasienter med kolorektalkreft. Det ble funnet en signifikant korrelasjon mellom S100A4-uttrykk og pasientoverlevelse(Gongoll, Peters et al. 2002) Det er også gjort flere mindre studier der hvor en signifikant korrelasjon mellom S100A4-uttrykk og overlevelse ble funnet. S100A4 er også funnet involvert i patogenese til andre humane sykdommer(figur 2, c).

1.5.2. Intracellulært bindingspartnere

De studiene som er gjort for å vise basisk mekanisme for S100A4 funksjoner har vist en potensiell rolle for S100A4 i motilitet (dødelighet), invasjon og apoptose (Takenaga, Nakamura et al. 1994). Flere intracellulære bindingspartnere har blitt identifisert som mål for S100A4 proteinet (figur 2 d). intracellulære funksjoner til S100A4 proteinet er kalsium avhengige. selv om disse bindingene er funnet *in Vitro*, betyr det ikke at de er biologisk relevante.

Cytoskeletal proteiner: studier har vist at S100A4 kan interagere med cytoskeletal proteiner som for eksempel aktin, non-muskel myosin, tubulin, og tropomyosin. Bindingen induserer strukturelle endringer i tumorcellers cytoskjelett(Wang, Rudland et al. 2000).

Adhesjonsmolekyler: økt uttrykk av S100A4 har vist å hemme uttrykk av adhesjonsmolekyler e-cadherin. Dette fører til redusert celle-celle adhesjon, deretter fremmer invasjon og metastase(Keirsebilck, Bonne et al. 1998).

1.5.3. Extracellulær bindingspartnere

S100a4 har også evnen til å interagere via ekstracellulære interaksjoner. Mest sannsynlig er den biologiske virkningen av ekstracellulært S100A4 mediert via en celleoverflate-reseptor. En mulig overflatereseptor er RAGE (reseptor for Advanced glycation end Products). RAGE er medlem av immunoglobulin reseptorer. Lav nivå av RAGE er uttrykt i en rekke celler som makrofager, endotelceller, glatte muskelceller og myositter (Nienhuis, de Leeuw et al. 2008). RAGE har blitt identifisert som en mulig reseptor for S100 proteiner. Studier har gjort for å vise om ekstracellulært funksjoner av S100A4 proteiner var RAGE avhengige. Studiene viste at cellostimulering med S100A4 som deretter aktiverte NFκB og MAP kinaser i chondronytter var RAGE-avhengige. Mekanismen bak RAGE avhengigheten er fortsatt ikke-klarlagt. Men det er antatt at løselige peptider av RAGE blokkerer intracellulært translokasjon av S100A4, S100A12, S100A13, og S100B i endotel celler. Etter at S100A4 har interagert med RAGE, blir ukjente signalkaskader sendt til cytoplasma. Der blir ulike veier brukt for å formidle signalene, en av veiene er aktivering av NFκB (figur 3). Signalene aktiverer NFκB kinase kompleks hemmer IKKer. IKK vil deretter aktivere NFκB ved å binde seg og fosfolysere IKβα proteiner, og NFκB translokeres til kjernen. Aktivering av NFκB resulterer i transkripsjon av ulike mål gener som kan inkludere cytokiner, adhesjons molekyler osv. Avhengig av signalene vil da NFκB i sin vei sende ut respons til signalene. For eksempel aktivere celle apoptose, migrering, invasjon osv. (Chuong, Katz et al. 2009)

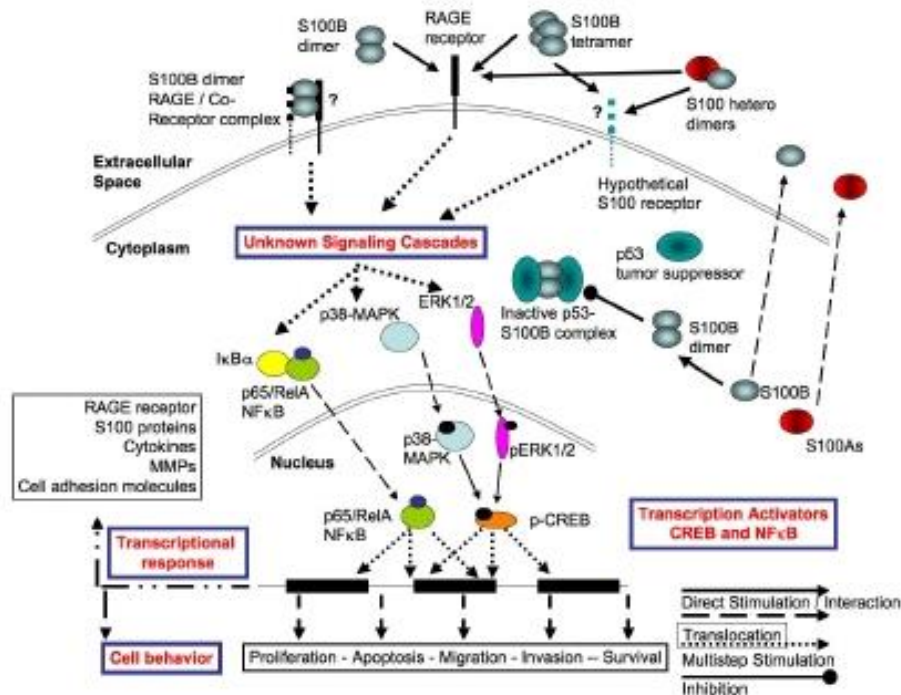


Figure 3: stimulanter som muligens binder seg til RAGE, og deretter medierer effekten av RAGE. Figuren er fra hentet fra Vetter and Lecters lab.

Studier har også vist at S100A4 kan aktivere NFκB i fravær av RAGE reseptoren. En studie ble gjort på oral squarkarcinoma cellelinjer, der de studerte en mulig rolle av RAGE i S100A4 industert NFκB aktivering. Her ble siRNA molekylar for RAGE mRNA benyttet. Studie konkluderte med at ekstracellulært S100A4 aktiverer IKK komplekset, som deretter induserer NFκB aktivitet uavhengig av mengde RAGE tilstede i cellene (Grotterod, Maelandsmo et al. 2010). Andre studier har også vist at S100A4 industert signaler i primære neuronar og endotelceller var uavhengige av RAGE (Schmidt-Hansen, Ornas et al. 2004).

Angiogenese:

S100A4 er vist å indusere translokasjon av annexin II på overflaten av endotelceller. Endotelceller skiller ut t-PA vevs plasminogenaktivator og S100A4/annexin II kompleks på overflaten til endoteliske celler, økt mengde t-PA-medierte plasmin produksjon fra plasminogen. Aktiv plasmid aktiverer pro-MMPer inkludert MMP2 og MMP13. Aktive MMPer og plasmin induserer tilrettelegging av ekstracellulært matriks (Semov, Moreno et al. 2005).

1.6 Matriks metalloproteinaser (MMP)

Matriks metalloproteinaser er en stor familie av kalsium- og sinkavhengige peptidaser. MMP er ansvarlig for modulering av vev og nedbrytning av ekstracellulær matriks (ECM), inkludert kollagen, elastin, gelatin, matriks glykoproteiner, og proteoglykaner.

MMP er regulert av hormoner, vekstfaktorer, cytokiner, celle til celle og celle til matriks interaksjoner. Endogene MMP hemmer (MMPIer) og vev hemmer av MMPer (TIMPer), er strengt regulert av disse enzymene, ubalanse mellom MMPer og TIMPer kan føre til ulike patologiske sykdommer (Gross and Lapiere 1962). Matriks-metalloproteinaser blir skilt ut fra en rekke bindevev og pro-inflammatoriske celler, inkludert fibroblaster, osteoblaster, endotelceller, makrofager, nøytrofile, og lymfocytter. Under normal fysiologiske tilstander er MMP minimalt uttrykt. MMP blir aktivert når re modellering av ECM er nødvendig for eksempel under sårheling, og dannelsen av nye blodårer. Tre etterfølgende trinn kontrollerer den proteolytiske aktiviteten til MMP i) aktivering av zymogener, ii) transkripsjon iii) hemming av de aktive formene til ulike vev hemmer av MMPer (TIMPer). Ved patologiske tilstander er likevekten mellom MMP og TIMP forskjøvet mot økt MMP aktivitet som fører til vevsdegradering.

1.6.1. S100A4 og MMPer

En avgjørende faktor for at kreftceller skal metastasere er at de må først nedbryte ekstracellulær matriks komponenter. MMP spiller en essensiell rolle i denne prosessen, og flere eksperimenter har etablert forbindelse mellom S100A4 og visse medlemmer av MMP familien. Nedregulering av S100A4 uttrykk i osteosarkoma celler leder til redusert uttrykk av MMP-2 og MT1-MMP, redusert aktivitet av MMP-2 minsker cellenes evne til å migrere gjennom matrigel-coated filter. (Bjornland, Winberg et al. 1999)

Angiogenetiske funksjonen til S100A4 var assosiert med deres evne til å oppregulere MMPer uttrykket, og nedregulere av TIMPer uttrykket. Studier har vist at S100A4 aktiverer transkripsjon av MMP-11, MMP-13, MMP-14 og i uPA endotelceller med størst økning i MMP-13 gen. Samtidig førte transkripsjonen til nedregulering av to av tre gener som koder for proteasehemmere -TIMP-1 og TIMP-1, så vel som PAT-I. (Schmidt-Hansen, Klingelhofer et al. 2004). Casein zymografi viste at S100A induksjon av endotelialceller var fulgt av økt

nivå av MMP aktivitet. Eksakte mekanismen bak S100A4 påvirkning av MMP er ikke kjent.

En mulighet er at S100A4 stimulerer aktiviteten til NF κ B, som deretter setter i gang transkripsjonen av MMP. Inflammasjon stimulerer MMP-produksjon fra vaskulære muskel celler inkluderer IL-1 α og CD40-CD40. Ligand interaksjoner er vist å aktivere NF κ B. Hvordan NF κ B regulerer MMP-1, -3, og -9 er uklar. Men det er vist at MMP har en promotor som kan binde NF κ B. Det er også identifisert et NF κ B lignende element i MMP-1 promotoren. Nylig har en studie vist at oppregulering av MMP-3 var hemmet i fravær av en analog til NF κ B sete inn i MMP-13 promotoren. Dermed kan en mulig mekanisme bak koblingen mellom S100a4 og MMPer være det at S100A4 er en stimulans som fremmer NF κ B aktivitet. Aktivt NF κ B går inn i kjernen og binder seg til NF κ B promotor sete på MMP DNAet, og mRNA MMP blir transkribert, og deretter blir det sendt ut i cytoplasma. I cytoplasma mRNA blir translokert til MMP proteaser. Dermed har S100A4 uttrykk oppregulert MMP (Bond, Chase et al. 2001).

1.7. NF κ B

Nuclear transkripsjonsfaktor κ B (NF- κ B) ble identifisert av David Baltimore i 1986 som en faktor i kjernen som binder promotoren til en kappa-kjede av immunglobuliner i B-celler (Aggarwal 2004). NF κ B finnes i inaktiv tilstand i cytoplasmaet til alle humane celler. NF κ B regulerer mange fysiologiske prosesser, blant annet medfødt og ervervet immunrespons. I tillegg NF κ B er assosiert med betennelse, celledød, spredning, invasjon og angiogenese av kreft. Over 200 fysiologiske stimuli er vist å aktivere NF κ B blant annet cytokiner, vekstfaktorer, bakterier, virus antigener, ioniserende, ultrafiolett strålinger, og produkter skilt ut fra nekrotiske celler(Tergaonkar 2006).

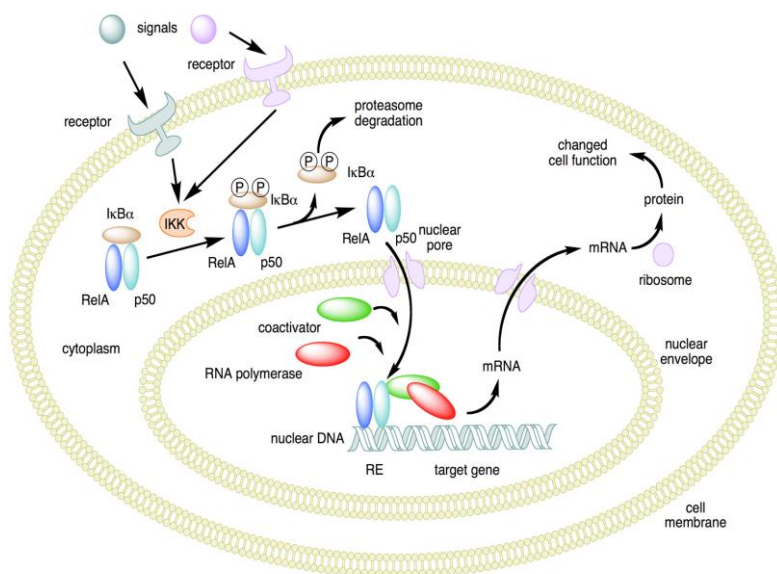
Fem medlemmer av NF- κ B familien er identifisert og klonet, NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), Rel α (p65), RelB, og c-Rel. Disse subenhetene eksisterer som homo- eller heterodimer. Alle medlemmer av NF- κ B familien inneholder et N-terminalt domene kalt Rel-homologidomenet (RHD). RHD binder DNA og er avgjørende for dimerisering (Perkins 2007).

1.7.1. Nf κ B signalveier

det er to signalveiere til Nf κ B aktivering: Kanonikal, og ikke kanonikal signalvei

Kanonikal signalveien

Den klassiske NF κ B-signalveien kan bli aktivert av flere stimulanter. Stimulantene vil aktivere NF κ B-kinasekompleks-hemmere (IKKer). IKK komplekset består av to katalytiske subenheter, IKK α og IKK β , samt den katalytiske subenheten IKK γ , også kalt NEMO. Etter stimulering vil NF κ B i cytoplasma bli Aktivert ved at IKK β fosforylere I κ B proteiner og dermed merke dem for polyubiquitinering som gir nedbrytning av 26S proteasomet (figur 4). RelA/p50 komplekset blir da frigjort, translokert til kjernen og kan der regulere transkripsjonen.



Figuren 4: viser kannonikal veien. Bilde er hentet fra wikipedia

Ikke kanonikal signalver:

ikke-kanonisk NF κ B veien er rettet mot aktivering av NF-p52/RelB κ B kompleks. Genetiske bevis tyder på at ikke-kanonisk NF κ B signalveien regulerer viktige biologiske funksjoner, som for eksempel B og T-lymfocyt generering, aktivitet til dendrittiske celler og regulerer beinmetabolisme (Dejardin 2006). Ikke-kanoniske veier fører til aktivering av IKK α av NF κ B-induserende kinas (NIK) etter stimulerin. Dannelsen av komplekset NIK-IKK α -P100 fører til fosforylering av p100-underenhet. Dette resulterer i 26S proteasom avhengig konvertering av p100 til P52, som kan føre til aktivering av P52-relB, som mål for κ B element og indusere transkripsjon av mål gener .

Reseptor-binding fører til aktivering av NIK, som fosforylerer og aktiverer en IKK alfa kompleks som i sin tur fosforylerer den ikb domene av P100 som fører til frigjøring av p52/RelB. Denne heterodimer translokteres til kjernen for å aktivere målgener regulert av kB sete(Sun 2011).

I prosjektet ble TNF- α brukt som positiv kontroll til NF κ B aktivitet av rekombinant S100A4 proteinet. TNF α (tumor nekrose faktor alfa) er en pro-inflammatorisk cytokin som har en viktig rolle i immunforsvarets funksjon. TNF- α blir dannet i hvite blodceller. Deres funksjon er å oppregulerer immunforsvaret når det blir angrepet av mikroorganismer eller fremmede stoffer. TNF α starter betennelsesreaksjonen. Studier har vist at TNF- α stimulerer aktiviteten til NF κ B (Zhou, Scoggin et al. 2003).

1. METODE TEORI:

Siden dette prosjektet gikk ut på å etablere en forbedret metode for produksjon av rekombinant his-S100A4, blir litt teori bak metodene beskrevet.

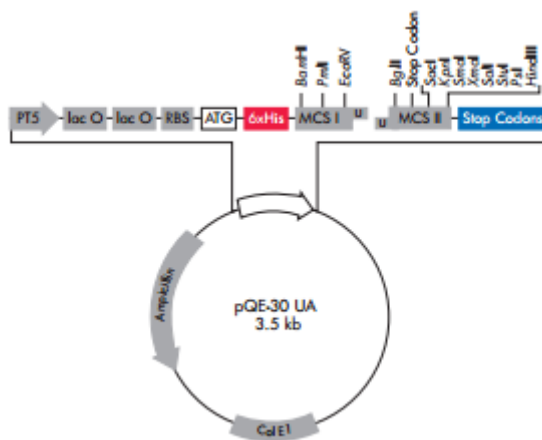
S100A4-proteinet som skulle produseres var et histidin-merket humant S100A4 protein uttrykt i *E.coli*. Human S100A4 var PCR forsterket, sekvensert og klonet inn i pQE30 vektor (Qiagen, Oslo, Norge) i ramme med en histidin-tag. His taget rekombinant S100A4 ble uttrykt i *E. coli* stammen M15 og renses ved hjelp av Co-MAC rensing Kit (Novagen/Calbiochem, Nottingham, UK) etter produsentens protokoll. Etter avsalting på en PD-10-kolonne (Amersham Biosciences, Oslo, Norge), ble proteinet eluert i PBS(Berge, Pettersen et al. 2011). Det er den eneste måten denne vektoren er klonet på.

2.1. Ekspresjonsvektor til S100A4

pQE30 vektorer blir brukt for deres høy nivå uttrykk av 6xHis-t tagget proteiner i *E.coli* som er basert på T5 promoter transkripsjon-translasjon system. PQE30 plasmider tilhører pDS familie av plasmidet, og er utlevert fra plasmidet pDS56/RBSII og pDS781/RBSII-DHFRS av Stüber et al. 1990. dette plasmidet er lav-kopi plasmid, og har følgende seter (figur 5):

- PT5:T5 promoter: er optimalisert promoter-operatør element som blir gjenkjent av *E.coli* RNA polymerase

- Lac O: Lac operator som øker lac repressor bindende og sikrer effektiv undertrykkelse av T5 promotoren.
- RBS: Ribosom-binding site som gir høye translasjon.
- ATG: Start codon
- 6xHis: 6xHis tag sequence
- MCS: Multiple cloning site her binder human S100A4 proteinet.
- Stop Codons: In all 3 reading frames: har flere stopp kodoner for praktisk effektiv uttrykkelse av proteinet
- Col E1: origin of replication
- β -lactamase gene (*bla*) som koder for proteiner som gjør vektoren ampicilin resistens (Sutcliffe 1979) ved 100 μ g/ml. Det finnes også et annet sete på vektoren kloramfenikol acetyl transferase-gen (CAT) som kan uttrykke proteiner som igjen vil gjøre vektoren resistens mot kloramfenikol, men normalt er dette sete ikke uttrykt fordi det ikke finnes noen promotorer som uttrykker det.



Figur 5: viser en skisse over pQE-30 vektor som His-S100A4 proteinet er klonnet i. Figuren er hentet fra [The QIAexpressionist™A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins](#)

2.2. E.coli

S100A4 ekspressjonsvektor er bare transformert i *E.coli* stammen M15. Under prosjektet ble ulike *E.coli* stammer benyttet, for å se om det var noe forskjell mellom ulike

Bakteriestammene i forhold til S100A4 protein total utbytte og biologisk aktivitet.

E.coli står for escherichia coli, og er gram-negativ bakterie som er en del av normalflora i tarmen. Navnet kommer fra Escherich som oppdaget og beskrev bakterien i 1885 og *coli* fra colon som betyr tykktarm⁸⁶. *E. coli* omfatter en stor gruppe bakterier hvor over 250 ulike serotyper er blitt påvist⁸⁶. *E.coli* cellene er vanligvis stang-formet, og er omtrent 2,0 mikron (um) lang og 0,5 mikrometer i diameter, med en celle-volum på 0,6-0,7 (mikrometer).

Optimal vekst av *E. coli* oppstår ved 37 °C, men noen *E.coli* laboriestedammer kan formere seg ved temperaturer på opptil 49 ° C. Veksten kan drives ved aerob eller anaerob celleånding.

E.coli stammene som ble brukt i laben var Dh5-ALPHA, M15, B1-21star (de3), B1-21 (des), rossette-gami de3. (tabell 1)

Tabell 1: oversikt over bakteriestammene med deres egenskap og resistant gen

Stammene	Egenskaper	Resistent ($\mu\text{g/ml}$)	Hentet fra
M15	Protein produksjon	Kanamycin (25)	Radiumhospitalet i Oslo
Rosetta- Gami (DE3) pLysS	Ekspresjonsvert, forbedrer disulfidbinding formasjon i cytoplasma, uttrykker seks sjeldne tRNAs (to Arg-tallet, Ile, Leu, Pro, Gly) for å tilrettelegge uttryk av gener som koder for sjeldent uttrykk i E.coli kodoner	Kloramfenic kol (34)	Transfertmert med S100A4- plasmid
BL-21 (de3)	Er ideelle for bruk med bakteriofag T7 promoter-baserte ekspresjonssystemer (f.eks pRSET, pCR \propto T7, og PET). bærer lambda DE3 lysogen. Rekombinante proteiner som er ikke-toksiske for E. coli er generelt uttrykkes ved høye nivåer i BL21 (DE3) celler	None	Tumorbiologisk avdeling ved UiT
BL21 Star (DE3)/pRA REpLysS	RNaseE trunkering + sju sjeldne tRNA (Ile, Arg tre s, Leu, Pro, Gly) + pLyss. Produserer T7-lysozym til å redusere basal ekspresjon av genet av interesse	Kanamycin (34)	Qiagen

2.3. Transformasjon

Transformasjon beskriver overføring av et gen fra en celle/bakterie til en annen bakterie. Genet er nakent ekstracellulært DNA som blir tatt opp av en bakterie, sirkulært DNA elementer blir i bakterie. Dette resulterer i at bakterie får nye arvelige egenskaper som kommer fra den fremmede DNAet(Lorenz and Wackernagel 1994).

Transformasjon ble først oppdaget av Briten Griffith i 1928(Lacks 2003), fenomenet ble oppdaget hos pneumokokken(*Streptococcus pneumoniae*), senere ble det påvist hos mange andre bakteriearter. Selve mekanismen ble først klarlagt av amerikaneren O.T. Avery og hans medarbeidere C. M. MacLeod og M. McCarthy i 1944(Avery, Macleod et al. 1944). Etter hvert har det vist seg at oppdagelsen av denne egenskapen hos bakteriene, hadde en grunnleggende betydning for studier av arvelighetsforholdene hos bakterier og i biologiske sammenhenger.

2.3.1. Bakteriell transformasjon

Prokaryotenes system for rekombinant uttrykk av proteiner er veldig populært innenfor forskning. Det finnes flere typer bakterier som kan brukes til protein produksjon. E.coli er attraktive bakterier til dette formålet siden de deler seg raskt og er kostnadseffektive. Samtidig er bakteriene godt beskrevet genetisk og er tilgjengelig i stadig flere kloningsvektorer og mutante vertsstammer(Avery, Macleod et al. 1944). Protein uttrykkelsen kan lett bli induert ved å bruke IPTG (forklares senere).

Rensingen av plasmid fra bakterielle celler er lett og de fleste gangene finnes det kommersielle protokoller tilgjengelig for rensing av rekombinant protein. Ulemper ved denne metoden er at proteinene som blir produsert i prokaryotes/bakterielle celler kan bli uløselige, eller så kan det være vanskelig å gjenvinne deres funksjon om det skal brukes videre i funksjonelle og enzymatiske studier.

Forskjellen mellom Prokaryote celler og eukaryote celler, er at eukaryote celler har post-translasjons modifikasjoner, noe som prokaryotes celler mangler. Det kan bli et problem når ekstracellulært DNA som er opprinnelig fra eukaristiske celler, puttes inn i prokaryotes celler. Når proteinet er ferdig produsert, vil proteinets funksjoner være mangelfullt fordi den ikke har gått gjennom siste steget, post-translasjons modifikasjonen. Det er særlig et problem når proteinet skal brukes videre i andre studier.

Transformasjon kan være en naturlig prosess. Få bakteriearter har evne til å ta opp nakent ekstracellulært DNA. De fleste bakterieartene som blir brukt i laben inkludert *E.coli* er ikke kompetente. Det finnes metoder som brukes i laben for å gjøre disse bakterieartene kompetente: kjemisk transformasjon eller elektroforering.

Kjemisk transformasjon

Cellene gjøres kompetente ved å løse dem i iskald løsning av toverdige kationer (typisk Ca, Mg). Etterfulgt av et kort varmesjokk. Celler som er i delingsfasen synes å gi høyeste andelen av transformanter. Det er usikkert hvordan cellene tar opp DNA, en teori er at tilstedeværelsen av porer i celleveggen danner kanaler, gjennom disse kanalene passerer DNA-molekyler.

Elektroforese

Elektroforese er en annen metode forskerne bruker for å gjøre bakteriene kompetente. Celler eller bakterier utsettes for elektrisk sjokk på 10-20kV/cm, som vil da danne ”hull/porer” i membranen. Det gjør at plasmid DNA går gjennom porene og inn i bakterie, porene lukker seg raskt igjen av cellens egen reparasjonsmekanisme.

Under prosjektet ble bare kjemisk transformasjon brukt.

2.4. Transfeksjon

Transformasjon i eukaryote celler blir kalt for transfeksjon. Forskjellige eukaryote celler kan brukes for transfeksjon for eksempel gjær, mammalie celler og baculovirus celler (insekt)

Fordeler med å uttrykke proteiner i eukaryote celler er at en kan få flere protein transfeksjoner. Proteinene er lett å rense ved hjelp av spesielle tager som inngår i de plasmidene som blir brukt. Plasmid av interesse som skiller ut proteinet i media er lett tilgjengelig og man kan lett kjøpes. Eukaryote celler har post-translasjonelle modifikasjoner som er viktig for studering av proteiner, og protein-protein interaksjoner. Ulempen med eukaryotiske celler er at cellene vokser langsommere enn prokaryote celler, og økonomisk sett er det litt dyr å drive med eukaryote protein uttrykkelsen.

Mange transfeksjons metoder er utviklet. En ideell metode bør ha høy transfeksjons effektivitet, lav celle toksisitet, og i tillegg skal den ha minimale effekt på cellens normal fysiologi, og være enkelt å bruke.

Det finnes tre metoder å transfektere eukaryote celler med nakent ekstracellulært plasmid,

biologisk, kjemisk og fysisk

Biologisk transfeksjon

Biologiske metoder også kalt for virus-mediert transfeksjon eller transduksjon. Virus blir brukt til celle transfeksjon. Denne metoden kan være veldig effektiv og er lett å bruke, pga virusets naturlige evne til å integrere inn i verts genomer (Pfeifer and Verma 2001). Ulempen ved denne metoden er cytotoxicitet. Innføring av en viral vektor i cellene kan forårsake betennelsesreaksjoner og føre til dannelsen av mutasjoner (Woods, Muessig et al. 2003). Derfor blir metoden sjeldent brukt.

Fysisk transfeksjon

Instrumenter blir brukt for å introdusere DNA inn i cellene. Metodene kan være direkte micro injeksjon, biolistisk partikkel utlevering, elektroporering, og laser-basert transfeksjon (Mehier-Humbert and Guy 2005).

Den metoden som blir mye brukt i laben er elektroforering. Her blir cellemembranen utsatt for en kort elektrisk puls, som danner «hull» i membranen, deretter passerer DNA celle membranen. Metoden er effektiv og lett å bruke. Den har evnen til å transfektere mange celler i kort periode. Ulempen kan være at mange celler ikke vil tåle impulsene, og dermed vil dø.

Kjemisk transfeksjon

Under kjemisk metode blir forskjellige kjemiske forbindelser brukt til å transfektere DNA inn i celle. Prinsippet er enkelt, positiv ladete grupper av kjemiske forbindelser danner komplekser med negativt ladet DNA grupper. Deretter danner positive kompleksene/ ekstracellulært DNA interaksjoner med negativ ladet grupper på celle membranen. Det er ukjent hvordan disse kompleksene passerer celle membranen, men det er antatt at endocytose er involvert i prosessen. DNA må passere cytoplasma og gå inn i kjernen for at transfeksjonen skal bli vellykket. De forbindelsene som blir brukt er: kationiske polymere, kalsium fosfat forbindelser, kationisk lipider, kationiske aminosyrer. Hvilken av disse kjemiske forbindelser blir brukt er avhengig av celletype.

Kjemisk transfeksjon er avhengig av forskjellige faktorer, blant annet kompleks dannelse mellom DNA og transfeksjons reagensen, pH, og celle membranens tilstand.

I prosjektet blir bare kjemisk transfeksjon brukt. Kjemisk transfeksjons reagens som blir brukt i laben: Lipofecatamin 2000 og jetPRIME

2.5. Begreper

IPTG:

Under kjemisk transformasjon blir IPTG brukt for å uttrykke PQE30-His-S100A4 vektoren i de ulike *E.coli* stammene:

IPTG: isopropylthio-beta-D-galactoside er en meget stabil syntetisk analog av laktose, som inaktiverer lac repressoren og induserer syntese av beta-galaktosidase, et enzym som fremmer laktose utnyttelse. IPTG blir brukt for å indusere uttrykkelse av klonet gen under kontroll av lac-operonen. Det binder og inaktiverer lac-repressoren, og dermed induserer uttrykk av proteinet som kodes for cDNAet som er under kontroll av lac- operon i e.coli (IPTG biochemical reagents).

Co-MAC affinitets kromatografi

Under His-S100A4 protein rensing blir Co-MAC affinitets kromatografi brukt.

Co-MAC kolonne er en affinitets kromatografi, og har en stasjonærfase som er pakket med 1 ml resin ladet kobolt. Bindingene mellom kobolt molekyler og His-S100A4 proteinløsningen (lysate) er kovalente bindinger. Bare proteiner med mange histidin aminosyrer etter hverandre kan binde seg til kobolt kolona. Andre proteiner i løsningen vil renne gjennom kolonnen, uten å bli stoppet av stasjonære fasen. Det finnes få bakterieproteiner som har mange histidin etter hverandre, derfor er co-Mac veldig spesifikk. Bindingene mellom proteinet og stasjonærfasen er reversible, og kan brytes ved enten å endre pH eller ione konsentrasjonen. Co-MACTM Purification Kit Novagen blir brukt i prosjektet. Kittet følger med 3 ulike buffere. Bindings buffer, vaske buffer og elueringsbuffer. Alle buffere inneholder Tris-HCl, NaCl, Og imidazole, med ulik konsentrasjon. Det som bryter kovalente bindinger mellom his-tag proteinet og kobolt molekyler på stasjonærfasen er imidazol. Imidazol er en organisk forbindelse sammen med his-tag proteiner konkurrerer om bindingsplass til stasjonærfasen. Imidazole har en større

affinitet til kolona enn his-tag proteinet, dermed elueres his-tag proteinene mens imidazole tar deres plass i co-mac kolone.

PD-10 avsalting kolonne

Pd-10 avsalting kolonne inneholder Sephadex G-25 matrise. Det er en matrise med porer av ulik størrelser. Proteinene blir separert i henhold til deres molekylstørrelse. PD-10 avsaltings kolonne brukes til avsalting, buffer utveksling og protein/prøve rensing av co-mac eluate. Molekyler større enn de største porene i Sephadex matrise er utelukket fra matrisen og eluderes først, i eller like etter tilsatt volum. Molekyler mindre enn de største porene i Sephadex matrise vil trenge inn i porene i varierende grad. Pga porestørrelse vil små proteiner komme ut senere enn større proteiner. Elueringsbuffer under PD-10 avsalting kolonne er PBS.

Dialysekassett

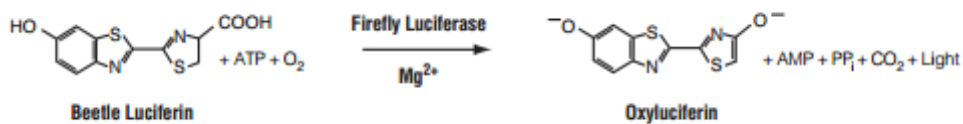
Dialysekassett er en alternativ til PD-10 avsaltings kolonne. Dette steget kommer etter Co-MAC kolonne. Ved dialysekassett sprøytes co-MAC eluate i en kassett. Kassetten legger i en begerglass med 1 liter PBS, ved 4°C til overnatting. Dialysekassett har en membran som er veldig unik og pga osmotisk forskjell mellom eluatet i dialysekassetten og det store volumet av PBS, vil stoffer fra co-MAC eluatet diffundere ut til PBS bufferen, mens PBS vil diffundere inn i kassetten. Salter og andre proteiner/forurensingen som er mindre enn 3500 kDa vil gå ut i PBS. Mens andre proteiner som er større en 3500 kDa vil være igjen i dialysekassett. Under prosjektet blir thermo scientific A-lyzer dialyse casset med cut-off på 3,5 Kilo dalton brukt.

Luciferase assay

Mekanismen bak luciferase aktivitet assay.

NFκB proteinet er nesten i alle celler. Cellene i laben blir først transformert med NFκB plasmidet ved hjelp av transfeksjons reagensen (enten Lipofectamin 2000 eller jetPRIME). mRNA koder for luciferase forn start sete har promotor i NFκB plasmidet. Foran promotoren har NFκB tre konsenser binding seter. Stimulering av S100A4 vil føre til at NFκB i cytoplasms blir aktivert ved at IKKβ fosfolyserer IKβ proteiner og dermed merker dem for

polyubiquitinerings som gir nedbrytning av 26S proteasomet. NFκB går inn i kjernen, der binder den seg til de tre setet foran luc-promotoren og setter i gang med transkripsjonen. Først blir mRNA til luciferase dannet, videre går mRNA ut i cytoplasma der det blir translokert til proteiner ved hjelp av ribosomer. Luciferase proteiner er nå i cytoplasma. Deretter høster vi cellen, og dagen etter går vi opp med lysate og måler luciferase aktivitet ved hjelp av enzym spektrofotometer. Luciferase proteinet som er produsert vil i mikroskopet gi fra seg lys. I spektrometeret blir lys produsert ved å omdanne kjemisk energi til luciferin oksidasjon gjennom et elektron overgang. Oxyluciferin molekylet blir dannet. (Figur 6). Firefly luciferase, en monomerisk 61kDa protein, katalyserer luciferin oksidasjon ved hjelp av ATP • Mg²⁺ + som en kosubstrate.



Figur 6: viser bioluminescent reaksjon katalysert av Firefly luciferase.

3. Material

Reagens	Produsent
DMEM[WU2] : med 4500 mg glucose/L, L-glutamine, NaHCO ₃ og pyrixodine, HCL	Sigma Aldrich lot: [WU3] RNBB8235, UK
RPMI	Sigma lot: RNBC701, ST. LOUIS[WU4] MO, USA
Trypsin-EDTA (1x)	Sigma: lot: SLBD0810
Opti-MEM-serum redusert medium	Life technologies, REF: 11058-021 lot: 1255091. made in UK
co-mac bindingsbuffer (8x)	Novagen, 71659-3, SAN DIEGO , CA, USA
Co-mac wash buffer (8x)	Novagen, 71659-3, SAN DIEGO, CA, USA
Co-mac eluerings buffer (x4)	Novagen, 71659-3, SAN DIEGO, CA, USA
Hi trap TM talon crude	GE healthcare, lot: 10150415, SWEDEN
Pd-10 kolonne pre packade	GE healthcare, lot: 5032484, BUCKING HAMSHIREE, made in UK
Bugbuster 10x protein extraction reagent	Novagen, Cat-No 70921-3, SAN DIEGO, CA, USA
Benzonase nuclease purify >90%	Novagen SAN DIEGO, CA, USA Cat:70746-4
Lipofectamin 2000	Invitrogen: cat nr: 11668-019, CARLSBAD, CA 92008 USA
Jetprime: transfection reagent	Polyplus: LOT:B120724
Jetprime buffer	Polyplus: LOT:B120724
Pefa-block sigma fast protease	Sigma-fast, ST. LOUIS MO USA. S8830-

inhibitor cocktail	20TAB. 069K8209
Nupage-4-12% bis-trisgel 1,5 mm x 10 well	CARLSBAD, CA, USA. Cat: 12092871
Luciferase Assay Substrate	Promega: Cat nr: E4030 · MADISON, USA
Luciferase Assay Buffer	Promega: Cat nr: E4030 · MADISON, USA
Reporter Lysis 5X Buffer	Promega: Cat nr: E4030 · MADISON, USA

4. Metode

4.1 Cellelinjer:

De cellene vi tok utgangspunktet i og brukte i laben var cellelinjene UT-SCC-14 og UT-SCC-24A (tabell). Disse cellene fikk vi fra Prof. R. Grenman, ved Universitet i Turku, Finland, fra to pasienter med plateepitelkarsinom i tunge. I tillegg ble en annen osteosarkomcellelinja brukt celler, kaldt for II-11b fikk vi fra Prof. G Mælandsmo, ved Radiumhospitalet, Oslo Universitetssykehus. II-11b celler blir brukt for å optimalisere mengde DNA og transfeksjons reagens, før vi gikk videre med UTSCC- cellelinjene (tabell 2).

Tabell 2: UT-SCC-14 og UT-SCC-24A cellelinjene brukt i forsøkene:

UTSCC-14	Cellelinje
Kontroll	UTSCC14/HUSH-NS
S100A4 knockdown	UTSCC14/HUSH-S100A4-II B
UTSCC-24	
Kontroll	UTSCC-24A/HUSH-NS
S100A knockdown	UTSCC24/HUSH-S100A4- 11B

4.2. Medium

Enkelte celletyper kan dyrkes i kultur i laboratoriet. En av de forskjellene mellom normale celler og tumorceller, er at normale celler i motsetning til kreft celler deler seg kontrollert. Derfor kan normale celler bli dyrket i korte perioder fra noen dager til uker i laboratoriet. Kreftceller kan derimot deles uendelig i laboratoriet. En forutsetning for dyrking av celler utenfor kroppens naturlige miljø er at cellene er omgitt av et vekstmedium med nødvendige næringsstoffer, og at de dyrkes ved riktig pH og temperatur. UTSCC- cellelinjene som ble brukt i forsøkene ble dyrket i Dulbeccos Modified Eagles medium (DMEM), med 4500 mg glukose/L (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO). Mediet ble også tilsatt 1% ikke-essensielle aminosyrer (Sigma-Aldrich), 10 % fetal bovint serum (FBS)(Biochrom, Berlin, Tyskland), og 0,5 µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich). Mengden av antibiotika puromycin var så pass lite at det skal ikke drepe selve modercellelinjene, men skal holde modercellene fra bakterie infeksjoner. II-11b cellelinje dyrket i RPMI-1640 medium tilsatt 1 % ikke-essensielle aminosyre (Sigma-Aldrich),10 % fetal bovint serum (FBS)(Biochrom, Berlin, Tyskland) og hepes 1M bufferløsning (life technologies) . både UTSCC-cellelinjer og II-11b cellelinjer ble dyrket i dyrkningsflasker av størrelsesorden T25 (25cm²) til T150 (150cm²) og inkubert i varmeskap ved 37 °C med 97 % oksygen og 5 % CO₂.

FBS er serum fra ku, som er veldig populær pga. deres næringsstoffer. Serumet blir først rensert og bearbeidet, slik at det ikke inneholder noen røde blodceller, deretter blir de brukt i mediet til celledyrking, for den inneholder vekst faktorer som er nødvendig for at cellene skal overleve. DMEM inneholder essensielle aminosyrer, cellene våre trenger både essensielle, og ikke essensielle aminosyrer, derfor blir 1% av non-essensielle aminosyre tilsatt til mediet. Alt arbeidet med cellene pågikk i LAF-benken på laben. I utgangspunktet skal alt være sterilt i LAF-benken, men nesten ingenting er helt perfekt, derfor ble 0,5 ug/ml puromysin antibiotika tilsatt til UTSCC-14NS cellelinje mediet for å unngå bakterie infeksjon i mediet.

4.3 Celledyrking

Cellene blir vanligvis lagret i flytende nitrogen ved -200 grader. Cellene ble hentet fra nitrogen tanker, og ble tint i en hanske i vannbad ved 37 °C i ca. 60 sekunder til det var en liten isklump igjen. Beholderen ble dreid hele tiden under opptiningen, deretter ble DMEM mediet tilsatt litt etter litt ca. 1ml omgangen, for at cellene ikke skulle få sjokk. Cellene ble

sentrifugert, for å fjerne frysemiddelet (95% FCS og 5% DMSO). Supernatanten ble kastet, pellete ble løst i 1 ml medium og ble overført til 75 cm² dyrkningsflaske, til dagen etter. Dagen etter fikk cellene enten en ny medium eller så ble de splittet. Avhengig av tettheten til flasken.

4.4.Splitting av celler

For å kunne opprettholde eksponentiell vekst, ble cellene splittet ved ca. 80 % konfluens, vanligvis mandag, onsdag og fredag. Celler kan overleve på to måter, enten binder de seg til overflaten/ hverandre, såkalte adherente celler, eller så flyter de i mediet (suspensjons celler). Alle cellelinjene som ble brukt under oppholdet er typen som fester seg til overflaten av dyrkning flasken, og til hverandre. Ved splitting av celler ble mediet i dyrkningsflasken sugd av, og cellene ble skylt med Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma-Aldrich). Før det ble det tilsatt 2-5 ml 0,25 % Trypsin- EDTA (Sigma-Aldrich), avhengig av størrelsen på dyrkningsflasken. PBS er en bufferløsning som vanligvis blir brukt til biologisk forskning. Det er vannbasert saltløsning som inneholder flere salter, blant annet natriumklorid, natriumfosfat og i noen formuleringer inneholder den også kalium fosfat og kalium-klorid. Fosfatgruppene i buffere hjelper til å opprettholde en konstant pH. Konsentrasjonen og osmolaritet til løsningen, samsvarer med det som finnes i kroppen, såkalt isoton. Derfor blir den brukt i labben for å skylle cellene med uansett cellelinje. Trypsin er en serinprotease som bryter peptidbindinger som fester cellene til overflaten og til hverandre. Avhengig av celletypen, på UTSCC- cellene virket trypsin i 5-10 minutter i varmeskapet før det visuelt ble kontrollert om cellene var løsnet. Mens for II-11b cellene virket trypsin i 2-4 minutter. For å inaktivere trypsin virkningen ble serumholdig medium tilsatt i minst like stort volum som tilsatt mengde trypsin. Cellesuspensjonen ble homogenisert ved resuspending, og deler av den homogene cellesuspensjonen ble pipettert over til en ny dyrkningsflaske. Avhengig av størrelsen på dyrkningsflasken ble det tilsatt minimum 15 ml medium til en T75-flaske og 30 ml medium til en T150-flaske. Dyrkningsflasken ble så satt tilbake i varmeskap for videre inkubering. Medium ble alltid forvarmet i varmeskap til 37°C før bruk.

4.5. Celletelling

Transfeksjon er en nødvendig prosess for å kunne uttrykke rekombinant HisS100A4 proteinet. Alle kitene som følger transfeksjons reagensen står det hvor konfluent cellene bør være før de blir transfektert. Celletelling er derfor en nødvendig steg under denne prosessen. Tellingen ble gjort for hver høsting, dette for å kunne beregne mengden cellesuspensjon som skulle til for å få rett antall celler til høstingen. Cellesuspensjonen ble laget ved trypsinering som forklart

tidligere. Etter nøytralisering av trypsinerte celler med medium, ble 200 ul av celle suspensjonen tilsatt til 8 ml av isoton løsning som utgjør en fortynningsfaktor på 40, for tellingen av celler i Beckman Coulter Counter, Z-series maskinen. Resten av celle suspensjons ble overført til et sentrifugerør, og ble sentrifugert ved 250 rpm i 7 minutter. Supernatanten ble fjernet, og cellepelleten ble re suspendert opp og ned i 1 ml medium.

Formelen som ble brukt her var :

$$C1*V1 = C2*V2$$

C1: første konsentrasjonen som tilhører til V1 (volum).

C2: andre konsentrasjonen som tilhører til V2(volum)

4.6. Prosedyre for produksjon og rensing av human S100A4

-Oslo protokollen

Dag 1:

En liten del av kompetente bakterier med pQE30 His-S100A4 plasmid fortynnet i 4 ml LB-medium med selektiv antibiotika (både til bakteriestammen og pQE30 His-S100A4 plasmidet), kulturen inkuberte ved 37C i 4 timer, deretter fortynnet 4 ml i 100 ml LB-medium med selektiv antibiotika.

Dag 2:

- Kulturen på 100 ml fortynnet 1:10.
- 25 ml bakteriekultur fortynnet i 225 ml LB-medium. Total 500 ml bakteriekultur
- Dette ble ristet videre i 30-60 minutter, til OD600 er på 0,6. OD optikal tetthet
- OD målet for hver kolbe og hvis verdiene var OK, tilsatt IPTG til en sluttkonsentrasjon på 1 mM. 0.5 ml av 0,5M IPTG til 250ml medium med bakterier.
- Dyrket deretter videre ved romtemperatur under risting i 3,5-4 time
- Kulturene/kolbene satt på is i 30 minutter

- Kulturene ble sentrifugert ved i Beckman ultrasentrifuger rotor ved 4°C, 5000 rpm i 10 min
- Brukte noe av mediet etter spinningen til å samle bakteriene i 2 kolber. Spinnet på samme måte om igjen og fjernet mediet. Pelletene fryste på -70°C.

Dag 3:

Bakteriepellets tok opp og tinet på is, tilsvarer 0,5 l dyrket bakterier.

- Løste bakteriepelleten i 10 ml lysisbuffer.
- 10 ml lysisbuffer:
 - 120ul 5M NaCl (60nM sluttkons): salt
 - 100 ul 1 M NaP pH 8 (10mM sluttkons)1 ml 10 x bugbuster: salt
 - 100 ul 100mM Pefa-block: hemmer proteaser. Slik at enzymene ikke degraderer proteiner.
 - 10 ul benzonase: degraderer DNA
 - Fyllet opp med destillert vann til 10 ml.
- Når bakteriepellets ble løst, (med forsiktig pippetering), inkuberte/lyserte dette ved RT i 10 minutter.
- Overførte til et 30 ml sarstedt rør og spinnet i Sorvall ultrasentrifuger rotor ved 4C, 20000 rpm, 20 min
- Supernatanten ble overført til nytt rør og filtrerte med 0,45 um filter.
- Mer NaCl salt tilsatt til supernatanten, for at salt hindret u-spesifikke bindinger og hjelper til med å separere/spre proteinene, dvs mindre klumping. Slutt konsentrasjon skulle være på 300 mM. 60mM er allerede tilsatt, 240mM ble tilsatt
- Etter tilsatt av salt, justerte pH til 8 med 0,1 M NaOH. 25 µl av prøven tok av til SDS-PAGE (P1)

His-S100A4 Protein rensing

- Renset ved bruk av kit: Co-MACTM Purification kit (fra novagen/calbiochem)
- Gjorde klar: 15ml 1x bindingsbuffer

6 ml 1 x washbuffer

6 ml 1x elueringsbuffer

- Gjorde klar kolonne:
- Fjernet den øvre sorte pluggen fra Co-MAC-kolonne
- Fylte opp med deionisert vann
- Luer lockadapter (brun) koblet til en 10-ml sprøyte som er fylt med vann
- Kolonna og sprøyte koblet sammen. Viktig: det må ikke komme luft mellom.
- Fjernet den nedre pluggen på kolonna.

Begge pluggene tok vare på fordi de skulle bli satt på kolonne igjen etter endt bruk. Kolonne kan brukes om igjen flere ganger til samme protein.

- Kolonne vasket ved å presse gjennom 5 ml H₂O. ikke presset for hardt, 1 dråpe pr 2 sekund.
- Kolonne ekvilibrerte med 5 ml- 1x bindings-buffer. unngått luft
- Proteinlysate tilsatt og dryppet gjennom kolonne med samme hastighet. 25 µl tok av til gel= P5.
- Kolonna vasket med 10 ml 1x binding-buffer. 25 µl tok av til gel= P2
- Kolonna vasket med 6 ml 1x wash-buffer. 25 µl tok av til gel= P3
- Proteinet eluert med 6 ml elueringsbuffer. 25 µl tok av til gel= P4

Mål A280. Ex: A280=0,844 à 0,844:0,239=3,35µg/µl

0,239 er ekskresjonskoeffisient (forklart I resultat og diskusjon). 0,239 blir funnet ved å kjøre His-S100A4 sekvenser på en database.

His-S100A4 sekvenser: HHHHHHMACPLEKALD VMVSTFHKYS GKEGDKFKLN
KSELKELLTR ELPSFLGKRT DEAAFQKLMSNLDSNRDNEV DFQEYCVFLS
CIAMMCNEFF EGFPDKQPRK K

PD-10 desalting kolonne

His-S100A4 proteinet avsaltet og endret til å være i PBS-buffer. til dette brukte vi «PD-10 desalting column» fra amersham

- Tok ut 2 kolonner

- Klippet av tuppen av kolonnene
- Tok av lokket og hell ut væsken
- Satt kolonnene i stativet og ekvilivrer med 25 ml PBS.
- Tilsatt 2,5 ml av proteinet i hver kolonne. = 5 ml protein.
- Kastet-flow through
- Eluer med 3,5 ml PBS i hver kolonne. Tatt være på eluatene. = proteinet mitt

Målte absorbansen ved A280

Sterilfiltrering

His-S100A4 proteinet steril filtrerte I sterilbank.

- Bruk 0,2 um filter (i en stund ble pall life sciences acrodisc syringe filter 0,2um super membran brukt, mot slutten av prosjektet ble millex gv 0,22unit filter unit brukt.
- Mål absorbansen ved A280.
- Hvis konsentrasjonen er høyere enn 2ug/ul fortynnes den med steril PBS til denne konsentrasjonen.
- Fordel proteindet I eppendorfrør, ca 0,5 ml I hvert.
- Merk rørene med navn, dato og konsentrasjon, lagret ved -70C

4.7. SDS-PAGE

- Prøvene (p1-p5) fortynnet om høy protein konsentrasjon, vi hadde lav protein konsentrasjon. Derfor hopet jeg over det steget her.
- Tilsett 5 µl sample buffer «blå-løsning 5x konsentrasjon inneholder DTT» til 25 ul prøve. Vorteks godt.
- Prøve løsningen med sampel buffer kokte i 3 minutter ved 100°C. Spinnet på benksenter.
- Laget kjøre buffer: 1 liter flaske fyllet med 600 ml milliq-vann og 30ml Nupage buffer.

Tar ut gel rammen fra pakningen, skyllet i vann fra springen og tørket.

- Tok ut kammen og vasket brønnene med kjørebuffer mha sprøyte med spiss, vasket hver brønn.
- Monterte gelen i kammeret om bare en gel kjøret satt «liksom gelbrett» på andre side.
- Fylte kammeret fullt med kjøregel. Sjekket eventuelt lekkasjer. Hvis ingen- fylte resten av bufferet i rommet rundt kammeret.
- Satt på prøvene- 25 ul med pippettespiss.
- Montert på kammerlukk. Skrude på elektrodene.
- Valget Nupage gel på listet, plottet inn antal geler, 1 eller 2 → start.
- Her tok 35 minutter for proteinet å vandre på gelen. Lite protein vandrer raskere enn store proteinet.

Farging:

- Filtrerte 2% coomasi-farge (25 ml), og tilsatt 20% eddiksyre (25ml).

Elektroforesen ferdig:

- Demonterte kammer
- Tok gel rammen til avtrekk
- Lagt gel i stor petriskal, og helte på fargeblanding- lokket på.
- Rist i 1 time, ved 50 rpm i avtrekk.

Avfarging

- Avfargingsløsning var ferdig laget: milliq-vann: metanol: eddiksyre, 6:3:1. 300ml:150 ml: 50ml
- Suget av fargeløsning og tilsatt avfargingen i ca 1 time under risting.
- Byttet til ny løsning etter 1 time.
- Fjernet og tilsatt Milli-Q vann, lagret på dette. Tar bilde av gel.

4.8. Produksjon og rensing av NfκB-3x-kb -luc plasmid og pmaxGFP plasmid

Dag 1

Stammen vi brukte i laben til å produsere NfκB-3x-kb -luc plasmid og pmaxGFP plasmid var

DH-5 a *E. coli* stamme. DH-5 a var allerede kompetente, vi skulle transformere plasmidene i stammen.

- En liten del av bakteriestammen tilsatt til LB-medium, vi hadde 4 rør av LB-medium med kompetente bakterier, 2 rør til hver plasmid.
- Hentet NfkB-3x-kb -luc plasmid og pmaxGFP plasmid fra -70C.
- Plasmidkonsentrasjonen som ble brukt var 50ug/ul.
- NfkB-3x-kb -luc plasmid og pmaxGFP plasmid tilsatt til bakteriekulturen.
- Kulturen satt på is i 30 min, kulturen skulle ikke ristes under inkuberingen for at bakteriene er litt skjøre, kan derfor bli drept av ristingen.
- Kulturen fikk et varmesjokk ved 42 grader i 30 sekunder, deretter satt den videre til is i ytterligere 2 minutter. Fordi bakteriene eset, og noe som gjorde at bakteriene for porer og det ble lettere for plasmidet å komme inn i bakteriene.
- 250ul av SOC-mediumet tilsatt til bakteriekulturen ved rom temperatur.
- Inkuberte under rysting ved 37⁰C i 1 time.
- Hentet 4- LB-medium plater. 20 ul av kulturen spred på LB plate og 150ul på den andre agar-platen. Bruket et glass stave. Deretter lot det tørke til væsken var trengt inn i agaren og inkuberte ved 37⁰C til overnatting.

Dag 2

Hentet agar-platene med kolonier fra dag 1(4.8.1.)

- Plukket en kolonne fra en plate til hvert plasmid (NfkB-3x-kb -luc vektor og pmaxGFP vektor), tilsatt til 3 ml LB-medium med selektiv antibiotika.
- Bakteriekulturen inkuberte under risting ved 37 C, ved 300rpm for 8 timer.
- Inkubert bakteriekultur med plasmidene(NfkB-3x-kb -luc og pmaxGFP) fortynnet i 100 ml LB-medium, inkuberte under risting til overnatt ved 37C ved 300 rpm.

Dag 3:

Under denne prosessen ble NfkB-3x-kb -luc vektor og pmaxGFP vektor rensset fra bakteriekulturen. NfkB-3x-kb -luc vektor og pmaxGFP vektor var høy-kopi plasmid. Derfor ble Endotoxin-free plasmid DNA purification User manual NucleoBond® 96 Xtra EF midi-prep brukt.

- Hentet bakteriekulturen og målt OD ved 600nm. Konsentrasjonen skulle være 0.5, om høyere, ble kulturen fortennet til å nå den konsentrasjonen vi skulle ha.
- Bakteriekulturen sentrifugerte ved 4500-6000 rpm i 10 min ved 4 °C. Beholder pelleten og kaster supernatanten.
- Bakterielle pelleten ble re-suspendert i 8ml RES-EF buffer. Pipetterte løsningen forsiktig opp og ned
- Add LYS-EF bufferen, og pipetterte forsiktig opp og ned Løsningen ble inkubert ved romtemperatur i 5 minutter.
- Add ekvibrerings buffer til løsningen.
- Add nøytraliserer (Buffer-NEU-EF) til løsningen og inkuberes i på is i 5 minutter.
- Lysatet ble kjørt gjennom kolonne. Kolonne tommes ved tyngdekraften.
- Vasket kolonnen med Filter-Wash Buffer. Kast kolonne filteret.
- Vasket kolonnen igjen med Buffer ENDO-EF, lot det renne gjennom ved hjelp av tyngdekraften.
- Vasket igjen med Wash-EF buffer.
- Eluerte plasmid DNA med Elution buffer ELU-EF. Samlet eluate i et rør. Sentrifugerte ved 15000 x g for 30 minutter ved 4 C.
- Supernatten kastet og pellet vasket og tørket i etanol. Etter det, løste/tørket DNA i endotoksin-fri TE-EF Buffer. Re-suspenderte forsiktig opp og ned, og satt til risting ved romtemperatur for 60 min. Plasmid DNA konsentrasjon målte ved hjelp av UV- spektrofotometeret.

4.9. Stimulering av His-S100A4 protein ved NFκB aktivitet i en reporter-gen-assay

Dag 1:

- Så ut UTSCC-14NS/II-11b celler i 24 brønns brett.
- Anbefalt mengde celler per brønn følger med i transfeksjons reagensenes protokoll.
- Mengden av UTSCC-14/ celler og II-11b celler ble sådd ut i 500 ul medium. Inkuberte ved 37C, 5% CO2 over natt.

Dag 2:

Her ble lipofectamin kit brukt som transfeksjons reagens: Lipofectamine® 2000 Reagent – Invitrogen.

- Transfeksjonen skjedde når konfluentet var rundt 70-90%. Konfluentet er bare en estimat. Det fant ikke noen måter å telle prosenten på.
- Lipofectamin 2000 reagens ble fortynnet i Opti-MEM® Reduced Serum Medium
- NFkB-3x kb-luc og pmaxGFP plasmidene ble fortynnet i Opti-MEM® Reduced Serum Medium
- Cellene ble transfektert med NF-KB 3x-kb luc plasmid og pmaxGFP plasmid. Tilsatt mengde plasmid er avhengig av anbefalingene til transfeksjons reagensen.
- Fortynnet Lipofectamine 2000 reagens ble tilsatt til fortynnet NF-KB 3x-kb luc plasmid og pmaxGFP plasmid, inkubert ved romtemperatur i 5 minutter.
- Plasmid reagens komplekset tilsettes til medium. Mediumet blir ikke byttet før transfeksjon. inkuberes videre ved 37°C i 1-3 dager.

Dag 2:

Her forklares hvordan cellene ble transfektert når jetPRIME transfeksjons reagens ble brukt
Transfeksjon ved bruk av kit: Polyplus jetPRIME® short protocol-DNA Transfection

- Transfeksjonen skjedde når konfluentet var rundt 70-90%.
- Cellene får ny medium ½-1 time før transfeksjonen.
- NFkB-3x kb-luc og pmaxGFP plasmidene ble fortynnet i jetPRIME buffer, vortekser i 10 sekunder og spinner ned
- JetPRIME reagensen ble tilsatt til plasmid fortynningen, vortekser i 10 sekunder, spinner ned og inkuberte ved romtemperatur i 10 minutter.
- JetPRIME og plasmid komplekset ble tilsatt til celle mediet. Mediet ble byttet 4 timer etter transfeksjonen.
- Transfektete cellemediet inkuberte videre i 24-48 timer.

Dag 3:

Ser om hvordan transfeksjonen har gått uansett hvilken transfeksjons reagens er brukt

- Vi transfekterer cellene våre med pmaxGFP vektor for å se hvor effektiv transfeksjonen har vært. Det blir sett ved å estimere hvor mange % av cellene som uttrykker GFP proteiner er i forhold til de som ikke gjør det. GFP aktivitet blir observert under mikroskopet. Under mikroskopet vil cellene som har tatt opp pmaxGFP vil lyse grønn ved en spesifikk bølgelengde
- Hvis transfeksjons effektivitet er over 20%, blir cellene stimulert: felles for alle stimuleringer er at vi måtte ha 3-5 parallelle brønner med ustimulert/utransfektet, 3-5 parallelle brønner ustimulert/transfektet, 3-5 parallelle brønner TNF- α , 3-5 parallelle brønner med S100A4 hentet utenfra, 3-5 parallelle brønner med rekombinant His-S100A4 proteinet produsert og rensset under prosjektet.
- Stimulerte celler blir inkubert ved 37°C til overnatt.

Dag 4:

- Cellene ble stimulert ytterligere med 8 og 6 timers, og 4 og 3 timers intervall.
- Stimuleringen ved alle tidspunktene ble stoppet samtidig. Tidsintervallet var 24, 8/6 og 4/3 timer. Mediet ble suget av cellene.
- Celle høsting: Tilsettes 50ul av 1XRLB i hver brønn, og brønnene skraper, og overfører lyssatte til eppendorfrør. Fryses -70C for cellelysis. Det er viktig at 1x RLB blir fortynnet og får romtemperatur før en tilsetter det til cellene.

Dag 5:

- Måling: for å måle protein uttrykkelse, må først luciferase assay reagent1(LAR1) bli laget. LAR1 blir laget ved å løse substrate som følges med kittet i luciferase assay buffer, kalt for LAR. LAR1 fikk romtemperatur før tilsatt til lysate.
- Lysate ble tinet og 30 ul lysat pipettert fra hver prøve over i B&W 96-brønners plate. Det var alltid en tom brønn mellom alle prøvene for at signalene til brønnene skulle ikke påvirkes av hverandre. Det er viktig at LAR1 beskyttes mot lys, for den kan bli ødelagt om det utsettes for lys. Videre kjøres prøven på luciferase maskinen, for å se om det har skjedd stimulering. 50 ul av LAR1 blir tilsatt til prøvene under liciferase maskinen. Svar gis i tabell

5.Resultat og diskusjon

S100A4 er et liten kalsium-bindende protein som er direkte involvert i tumor metastase. S100A4 proteinet har ingen enzymatisk aktivitet, men i stedet interagerer den med bindingspartnere både intracellulært og ekstracellulært. Flere studier har påvist at S100A4 proteinet kan fremme tumorspredning, blant annet ved å påvirke syntese av MMPer. Det er gjort studier som viser funksjonene til intracellulært S100A4 (Mathisen, Lindstad et al. 2003), mens rollen til ekstracellulært S100A4 fortsatt er dårlig klarlagt. En forutsetning for å kunne utføre de nødvendige forsøkene er å produsere store mengder av S100A4 proteinet. For å oppnå dette ble en ekspresjonsvektor med His-tagget humant S100A4 brukt. Denne vektoren var allerede transformert inn i M15 *E.coli* bakteriestammen og laget i forskningsgruppen til professor Gunhild Mælandsmo ved Radiumhospitalet, Oslo Universitetssykehus.

Opgaven var å bruke denne ekspresjonsvektoren for å lage rekombinant His-S100A4 i fire ulike *E.coli* stammer, for å se hvilken stamme som er best egnet til å uttrykke rekombinant S100A4 protein. His-S100A4 protein ble deretter testet for NFκB aktivitet i en reporter-gen-assay.

5.1. Del 1:

5.1.1. Isolering av ekspresjonsvektoren for His-S100A4

En liten del av kompetent bakteriestamme (M15) med pQE30-His-S100A4 vektoren His-S100A4 vektor ble stryket ut på agar-plate med selektiv antibiotika. I følge The QIAexpressionist™ håndboken til pQE30 plasmidet, er pQE30-His-S100A4 en lav-kopi vektor. Produsert His-S100A4 vektoren i M15 stammen blir deretter rensset ved å bruke Endotoxin-free plasmid DNA purification User manual NucleoBond® 96 Xtra EF midi-prep. Konsentrasjonen og renheten til plasmiden ble bestemt ved NanoDrop-spektrometer (tabell 3).

Tabell 3: viser total utbytte og renhet til rensset pQE30-His-S100A4

Bakteriestamme	M15
Konsentrasjon	11,2ng/ul
Totalt utbytte	6720 ug/600ul
Plasmid renhet (260/280)	1,55

Årsak til lav utbytte av His-S100A4 vektor:

Ulike plasmid har ulike origin of replication (ori-sekvenser), som har innflytelse på DNA utbytte. Plasmider kan deles inn i enten høy-kopi nummer eller lav-kopi nummer plasmider. Kopi nummer til et plasmid reflekterer til gjennomsnitt kopier av et plasmid i vertscelle, jo høyere kopi nummer jo mer effektiv er plasmidet til å replikere seg selv i vertscelle. I følge håndboken til 6xhis-tag protein The QIAexpressionist™ er pQE30vektor lav-kopi plasmid.

Stammen M15 blir generelt brukt til produksjon av proteiner, men ikke til plasmid replikering. Kombinasjonen av lav-copy number plasmid og M15 stamme kan ha påvirket total utbytte av HisS100A4 vektor produksjon.

Plasmid renhet ble målt ved bølgelengde på 260 og 280nm og ble uttrykt som (A260/280) i UV-spektrofotometer. A260/280 mellom 1,80- 2 indikerer ren plasmid DNA, en A260/280 ratio over 2 indikerer svært lite protein i prøven, mens en ratio under 1,8 indikerer forurensning av protein. His-S100A4 vektoren renheten ga en rasion (A260/280) på 1.55. I endotoxin-free DNA plasmid purifikasjons protokoll står det: for å få renere plasmidprep, bør mindre mengde bakterie lysat brukes, samt bør dobbel mengde av vaskebuffer kjøres gjennom kolonne. Men siden his-S100A4 vektoren kun skulle brukes i transformasjon av andre stammer, var renheten ikke en avgjørende faktor. Protein urenheter skulle være viktigere om his-S100A4 vektoren skulle brukes til transfeksjon av mammaliske celler. Siden proteiner som følger med DNAet hindrer opptak av DNAet, dvs at transfeksjonseffektiviteten blir dårlig.

Endotoxin-free plasmid DNA purification midi-prep som beskrevet i material og metode. His-S100A4 ble dyrket i andre kompetente bakterier, og frysestock ble laget av de ulike bakteriestammene som har ekspresjonsvektor for His-S100A4 i seg. Frysestock blir brukt når his-S100A4 vektor skal produseres i ulike bakteriestamme.

PQE30- His-S100A4 vektor ble brukt til transformasjon av følgende *E.coli* stammer (se tabell 4).

Tabell 4: viser hvilken *E.coli* stamme er brukt, egenskapen til stammene, og hvilke antibiotikum stammen er resistent mot.

<i>E.coli</i> bakterie-stamme	Egenskaper	Resistent (ug/ul)	Leverandør
Rosetta-Gami (DE3) pLysS	Ekspresjonsvert, forbedret disulfid-binding-dannelse i cytoplasma, uttrykker seks sjeldne tRNAs (to Arg, Ile, Leu, Pro, Gly).	Cam (34)	Novagen
BL21 Star (DE3)/pRARE pLysS	RNaseE avkutting+ syv sjeldne tRNAs (Ile, tre Arg, Leu, Pro, Gly) + T7-lysozym til å redusere basal ekspresjon av genet av interesse	Cam (34)	fra Norstruct
BL21(DE3)	Er ideelle for bruk med bakteriofag T7 promoter-baserte ekspresjonssystemer (f.eks pRSET, pCR α T7, og PET). bærer lambda DE3 lysogen. Rekombinante proteiner som er ikke-toksiske for <i>E. coli</i> er generelt uttrykkes ved høye nivåer i BL21 (DE3) celler	ingen	
M15	Protein produksjon	Kanamycin (25)	Qiagen

Videre ble His-S100A4 vektoren transformert i bakteriestammene: transformasjon er beskrevet i material og metode delen. Under dyrkingen ble 20ul bakterie kulturen spredt over den ene agar-platen mens 150 ul ble spredt over den andre agar-plate.(se tabell 5)

Tabell 5: viser hvordan agar-platene til ulike stammene som var transformert med pqe30-His-S100A4 vektoren så ut etter at det var inkubert overnatt ved 37 °C.

Bakteriestamme:	Antallet kolonier
Rosette-gami de3:	3 kolonier på 150ul plate, og ingen kolonier på 20ul plate
BL-21 de3	En del kolonier både på 20 og 150ul plate, mange flere enn av rosette og BL-21 star
BL-21 star de3	Ikke så mange kolonier her, men flere enn rosette
DH-5alpha	Flest kolonier her, nesten hele 20ul og 150ul plate var full

Alle bakteriekoloniene som vi fikk i tabellen over hadde His-S100A4 vektor i seg. Fordi His-S100A4 vektor har et gen i seg som uttrykker et protein som gir resistans mot ampicillin (100ug/ul) antibiotikum. For at kun bakterier som har tatt opp His-S100A4 vektoren i seg skal overleve på agar-plate, må agar-platen både ha ampicillin antibiotikum, og selektiv antibiotikum som bakteriestammen er resistens mot. Lav antall bakteriekolonier indikerer, få replikering av His-S100A4 protein i bakteriestammen, og igjen indikerer hvor kompetente bakteriestammen var. For eksempel BL-21 star (de3) er mer kompetente enn Rosette-gami (de3).

Dag 2

laget forkultur: en koloni fra dag 1 dyrkes i 4 ml LB-medium med selektiv antibiotika som His-S100A4 vektoren er resistens mot og med selektiv antibiotika som bakteriestammen er resistens mot. Utførelsen er beskrevet i material og metode.

Frysestock på 600ul ble laget av hver bakteriestamme.

5.2. Første runde med His-S100A4 protein produksjon og rensing:

Dag 1:

produksjon for dyrking og rensing av His-S100A4 i følge protokollen fra Mælandsmo's gruppe i Oslo (heretter kalt Oslo-protokollen).

Dag 2:

Resultat av dag 2 er i tabell 6.

Tabell 6: viser inkubasjonstid for ulike *E.coli* stammer med pQE30-His-S100A4 vektor, tiden før absorbansen ble målt ved OD600, og mengde tilsatt IPTG.

Bakteriestamme	Inkubasjons tid før OD-måling og IPTG tilsetting	Tilsatt mengde IPTG til hver kolbe
BL-21 de3	60 min	0,5 ml av 0,5mM til hver kolbe. Inkuberes i 4 timer
M15	1time 30 min	0,5 ml av 0,5mM til hver kolbe. Inkuberes i 4 timer
BL-21star de3	Ca 3 timer, 30 minutter	0,4ml av 0,5ml IPTG ble tilsatt fordi det bare var nok til 400ml kultur
Rosette-gami de3:	Ca 3 timer 45 minutter	0,4ml av 0,5ml IPTG ble tilsatt fordi vi hadde bare nok til 400ml kultur

Målt absorbans ved OD600 var nesten lik ved alle bakteriestammene fra 0,6-0,7

Dag 3:

Resultatene vi fikk under denne dagen er i tabell 7

Tabell 7: konsentrasjonen og total utbytte av His-S100A4 proteinet etter co-mac kolonne rensing ,og pD-10 desaltings kolonne i 4 ulike *E.coli* stammene

	Kons etter Co-mac: $\mu\text{g} / \mu\text{l}$	Total utbytte-etter co-mac: μg	Kons etter Pd-10 kolonna: $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Total utbytte etter Pd-10 kolonna: μg	% igjen fra co-mac til pD-10
Bl-21 de3	0,5	3000	0,18	900	4,44%
M15	2,9	17400	0,1	500	2,96%
BL-21 star (de3)	4,0	24000	1,16	5800	24%
Rosette-gami (de3)	0,1	600	-	-	-

Konsentrasjonen av His-S100A4 proteinet er beregnet som følge: OD280: 0,239(ekstinksjonskoeffisienten) = ug/ul.

Tabellen over viser at uavhengig av stammene, ble en del av proteiner tapt fra co-mac kolonna til pD-10 desaltings kolonne. Tallene i tabellen viser at rosette-gami stammen er ikke egnet til His-S100A4 protein produksjon, pga lav protein utbytte etter co-Mac kolonne rensingen.

His-S100A4 rensing på co-mac kolonne

Co-MAC purifikasjons Kit har anbefalt at 1X 6 ml imidazol skulle bli brukt til å eluere his-proteinet fra kolonne. Likevel av ulike grunner kan noen ganger imidazol komme ut med eluate, for eksempel

- Stasjonærfasen kan bli mettet av imidazol bindingene
- Grunnen til lavt utbytte etter co-MAC kan være at proteinet sitter fast på kolonnene og ikke blir eluert ut. En mulig forklaring på det kan være at konsentrasjon til imidazol er ikke optimal. Da kan man prøve å optimalisere konsentrasjonen til imidazol i Co-MAC eluate. Først prøve med litt lavere konsentrasjon av imidazole, hvis utbytte blir lavere, kan en prøve med litt høyere konsentrasjonen av imidazol, enn det som er anbefalt i Co-MAC kittet. En gang var jeg bort i ikke fortynnet imidazol, 4x mer konsen-

trert enn det som er anbefalt i Co-MAC kittet. Resultatet ble at jeg måtte kaste Co-MAC kolonne, fordi alt rosa fargen i kolonne, det vil si kobolt molekylene var skylt ut. Man bør derfor være forsiktig når man øker konsentrasjonen til imidazol.

His-S100A4 avsalting på PD-10 desaltings kolonne

Co-MAC eluate blir kjørt gjennom en annen kolonne, pD-10 desaltings kolonne. PD-10 desaltings kolonne brukes til avsalting, buffer utveksling og protein/prøve rensing fra Co-MAC eluate. Elueringsbuffer under PD-10 desalting kolonne er PBS. Tabell 7 viser veldig mye % tap fra Co-MAC kolonne til PD-10 desaltings kolonne. Teoretisk kan flere grunner ha ført til protein tap under PD-10 desalting kolonne:

pH til Co-MAC elueringsbuffer er ikke lik pH til his-tag S100A4 proteinet. Når vi tilsetter elueringsløsning, vil imidazole konkurrere mot His-tag S100A4 proteinet for å få en plass ved stasjonær fasen. Imidazole danner sterkere bindinger til stasjonærfasen enn His-tag proteinet, dermed vil his-S100A4 proteinet slippe taket. Under elueringen har his-S100A4 proteinet en annen pH enn elueringsbufferen, om His-S100A4 proteinene er ladet kan det være fare for at positiv ladning på den ene proteinet, vil danne bindinger med imidazole som er negativ ladet, eller danne bindinger med andre His-tag S100A4 proteiner/salter som er i eluate og føre til protein aggregering. Hvis aggregering er stor kan det være fare for at proteinet vil ikke gå gjennom Pd-10desalting matriksen, og bli varende på overflaten av kolonne.

Størrelsen på His- S100A4 proteinet er 11 kDa, som utgjør en molekyl vekt på 12551,21g/mol. PD-10 desaltings kolonne er egnet for å rense og avsalte proteiner og andre store biomolekyler over 5000 Mw. Pd-10 desalting kolonne skal holde Mw <1000 igjen i kolonne, mens Mw >5000 vil gå gjennom. S100A4 skal ikke ha noen problemer med å gå gjennom kolonne, men det kan være bindinger til matriksen som kan ha ført til at proteinet ikke elueres ut.

Pd-10 desaltings kolonne er laget av kryss-lenket dekstran. Dekstran er hydrofile og ikke ladete polymerisk karbohydrater som er løselig i vann. Studier har påvist at dekstran kan danne ikke spesifikke interaksjoner med proteiner, pga høye konsentrasjoner av hydroksylgrupper i dekstran molekylet. Studiet konkluderte med at dekstran kan danne interaksjon med proteiner, men det var avhengig av pore størrelse, bindings kapasitet, og konsentrasjonen av ladet polymere i dekstran. Det er mulighet at Hi-s S100A4 proteinet har

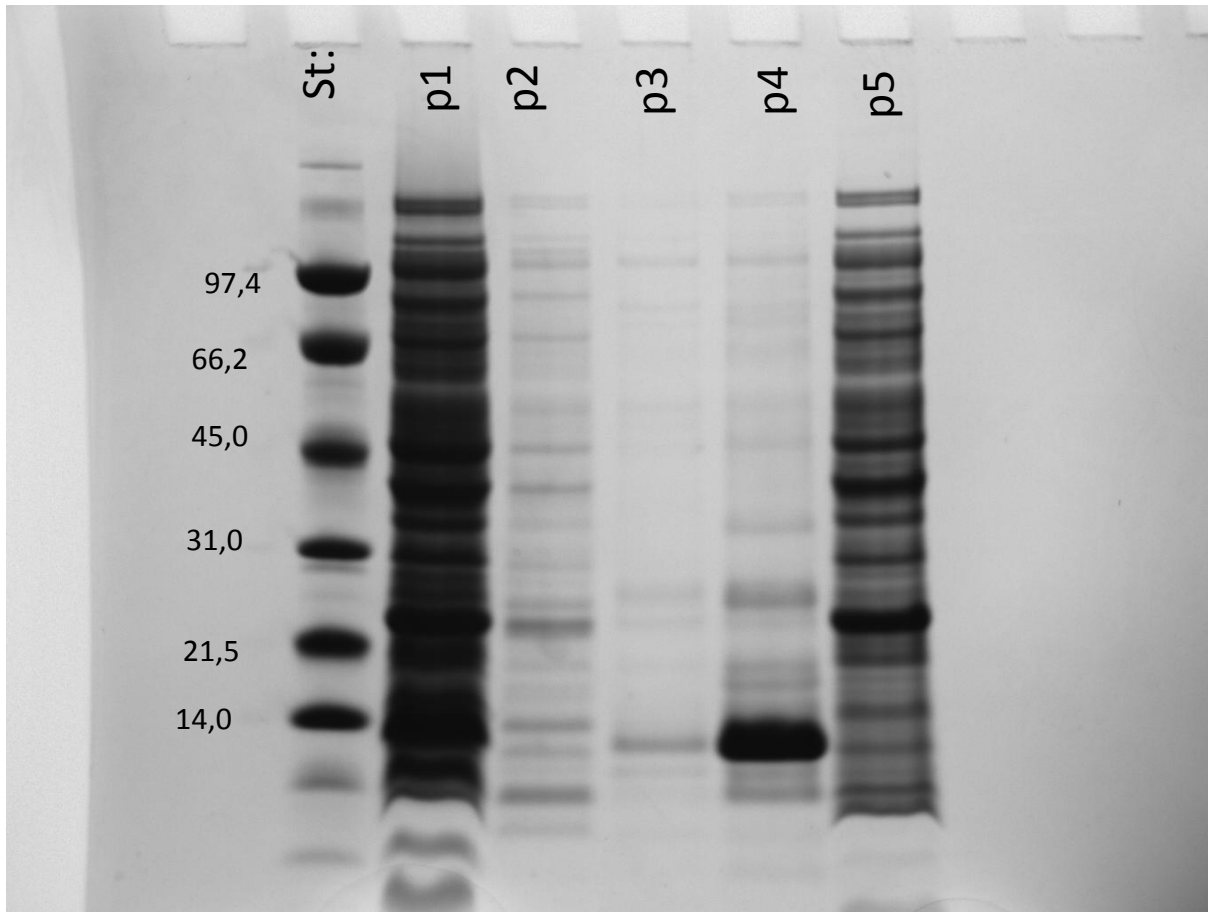
bundet seg til hydroksyl gruppene på dekstran matrisen, og ført til at proteinet ikke kommer ut med eluerings bufferen. Det vil si at det vil ta lengre tid og mer eluering for å få His-S100A4 proteinet ut gjennom Pd-10 desaltings kolonne.

Det kan også være at His-S100A4 proteinet er et ustabil protein i enten co-mac elueringsbufferen eller i PBS. Dvs at proteinet brytes ned av seg selv når det oppbevares i de bufferene.

Eluate fra PD-10 kolonnen ble så sterilfiltrert for å fjerne eventuelle forurensninger av bakterier og sporer. Det eneste som ble sterilfiltrerte etter pd-10 kolonna var proteinet rensset fra BL-21 star de3, pga protein utbytte var høyere enn i de andre stammene. Etter sterilfiltrering hadde proteinet rensset fra BL-21 star de3 total utbytte på 5800ug/6,5ml. His-S100A4 proteinet ble fordelt i eppendorfrør, ca 0,5 ml i hvert rør. Rørene ble merket med navn, dato og konsentrasjon, og oppbevart i -70C fryseren.

SDS –PAGE

Det beste resultatet jeg fikk til nå dvs Bl-21 star de3 med en konsentrasjon på 1.163ug/ul, ble kjørt på SDS-PAGE for å se om hvor ren var rensset His-S100A4 proteinet. 25 µl volum fra hver fraksjonen ble satt til SDS-PAGE gelen. Figuren viser resultatet av SDS-PAGE. Det som er interessant her er p4. p4 er eluate der His-S100A4 har eluert fra kolonne. Her ble spectra broad low range standard brukt, for å kunne si litt om molekylstørrelse til proteinene i de ulike fraksjonene. S100A4 har en molekylstørrelse på 10-12 kDa. Vi forventer å få en sterk båndt på under molekylstørrelse på 14kDa ved standard fraksjonen.



Figur 6: SDS-PAGE gel som viser rekombinant S100A4 protein produsert i BL-21 star. Standard som brukt her er spectra broad low range standard. P1: prøve av lysisbuffer etter pH måling. P2: co-mac bindingsbuffer. P3: co-mac wash buffer. P4: co-mac eluate (proteinet vårt). P5: protein lysate (er proteiner som rant gjennom kolonne, dvs alt som ikke bandt Co-MAC kolonna, derfor skal vise at S100A4 båndet er borte her). Proteinet av interesse skal vises i p4, siden det er eluate. Det kraftigeste båndet i p4 er under 14 kDa (standard).

Resultatet viste at vi hadde et sterk bånd under 14 kDa på standard fraksjonen. Det indikerer at proteinet som kom ut med eluate hadde lavere kDa enn 14 (standard). SDS-PAGE separerer proteiner basert på primærstrukturen og ikke aminosyresekvensen. For å være presis på at sterke båndet i eluate er His-S100A4 proteinet kunne man ta en massespektrometre av eluate. Men i våres tilfelle vi antar at sterke båndet ved p4 er his-S100A4 proteinet, fordi Co-MAC kolonne er veldig spesifikk. Dermed kan vi si at proteinet som kom ut i eluate er rS100A4. p4 skulle egentlig ha vært ikke 100% ren, det var andre svakke bånd på gelen. Det indikerer i at det finnes andre proteiner i eluate enn S100A4. Det kan være andre bakterieproteiner som er renset frem sammen med His-S100A4 proteinet.

5.3. Andre runde med His-S100A4 produksjon og rensing

I første runde ble Oslo-protokollen fulgt(se material og metode (avsnitt)). I 2. runde skulle det gjøres noen endringer i protokollen, får se om det har noe betydning for protein produksjon:

Dag 1:

produksjon for dyrking og rensing av Oslo- protokollen ble fulgt (material og metode)

Dag 2:

Målingene under dag 2 er i tabell 8

Tabell 8: viser inkubasjonstid for de ulike bakteriestammene før absorbentene ble målt ved OD600. Deretter tilsettes IPTG og inkuberer videre for protein uttrykkelse.

Bakteriestamme	Inkubasjons tid før OD-måling	OD600 før IPTG tilsetting	IPTG tilsettes
BL-21 de3	1 time 30 min	0,9 og 0,9	0,8 ml av 0,5mM til hver kolbe. Inkuberte i 4 timer
M15	1minutt 15 min	0,9 og 0,9	0,75 ml av 0,5mM til hver kolbe. Inkuberte i 4 timer

M15 og BL-21 ble inkubert litt lenger enn anbefalt i Oslo-protokollen(30-60 min). for å kunne se om flere bakterier tilstede i kulturen, hadde noe å si for IPTG målingen. En høyere abs ved OD600 ble målt, bakteriekulturen ble fortennet til OD600 var på 0.6

$$C1 \cdot v2 = c2 \cdot v2$$

BL21: bakteriekulturen på 250 ml ble fortennet med 156 ml LB-medium med spesifikk antibiotika.

M15: bakteriekulturen på 250 ml ble fortenner med 125 ml LB-medium med spesifikk antibiotika.

Sluttkonsentrasjonen til IPTG skulle være på 1mM til 500 ml bakteriekultur med His-S100A4 proteinet. Derfor ble 0,75 µl IPTG tilsatt til bakteriestammene.

DAG 3:

Rensing av His-S100A4 proteinet:

M15: pH: 7.99. utfelling. først ble NaOH tilsatt til pH nær 8. men pH gikk litt over 8 derfor ble HCl. Utfelling skjedde etter at HCl ble tilsatt.

BL-21 des: pH: 8 litt uklar løsning/ utfelling. først ble NaOH tilsatt til pH nær 8. men pH gikk litt over 8 derfor ble HCl. Utfelling skjedde etter at HCl ble tilsatt.

Endringene som ble gjort med M15 bakteriestamme som har pQE30-His-S100A4 vektoren i seg:

Endringene ble gjort etter Co-mac eluate med His-S100A4 proteinet. Pga lav protein utbytte etter pd-10 kolonne i de tidligere forsøkene med andre bakteriestamme, ble halve av co-mac eluate kjørt på pd-10 kolonne, mens andre halv delen ble kjørt på Dialyse kassett. Resultat i tabell 8

Endringene som ble gjort med BL-21 de3 bakteriestamme som har His-S100A4 vektoren i seg:

tilsatt Ca²⁺ til PBS bufferløsning som brukes til eluering av his-S100A4 proteinet under Pd-10 desalting kolonne. Tanken bak det var at S100A4 er en kalsium bindende protein som vil ha ulik konformasjon med og uten Ca²⁺ tilstedet, og at dette kanskje kunne påvirke en eventuell uspesifikk binding til PD-10 matriksen. Resultat i tabell 9 og 10

Tabell 9: viser konsentrasjon av His-S100A4 proteinet i M15 og BL-21 de3 stammene etter co-mac, pD-10 kolonne og Dialysse kassett

Bakteriestamme	Kons: µg / µl Etter co-mac	Total utbytte: µg etter co-mac	Kons µg / µl pd-10 kolonne	Total utbytte µg. Etter pd-10 kolonne	Kons:ug/ µl dialyse kassett	Total utbytte: µg:Dialyse kassett
M15	0,68	4066	0,10	260	0,31	785
BL-21	1,07	6426	0,10	261	0,50	1506

Tabell 10: viser vunnet prosent av His-S100A4 proteinet fra Co-MAC eluate til PD10 desalting og dialyse kassett.

	% vunnet fra co-mac til pd-10 kolonne	% vunnet fra Co-mac til dialyse kassett	
M15	6	19	
BL-21	4	23	

Oppsummering av andre runde:

Det oppstå problemer under pH justering til M15 stamme. Både NaOH og HCl ble brukt til å justere pHen. justeringen gikk opp og ned, det stoppa ikke ved pH 8. Slutt pH var på 7,99. prøven ble tilsatt til Co-mac kolonne, men pga utfellingen gikk ikke prøven gjennom kolonna. protienløsningen ble sentrifugert, mistet en del av proteinet under dette steget. Proteiner er vanligvis veldig sensitiv til pH endringer, for det kunne føre til irreversibelt ødeleggelse av proteiner. I videre forsøk vil det derfor ikke bli justert for pH om pH er i nærheten av 8.

pD-10 desalting kolonne vs dialyse kassett:

Ingen av proteinene gikk videre til sterilfiltrering, pga av lav His-S100A4 utbytte etter pd-10 kolonne og dialyse kassett. Det virker som om tilsatt Ca^{2+} til PBS virket ikke slik vi trodde. Det må være et eller annet i kolonne som stopper His-S100a4 i å renne gjennom kolonne. For eksempel i) His-S100A4 proteinet har dannet flere bindinger til dekstran enn det vi trodde. His-S100A4 proteinet vil da ikke binde seg så sterk til Ca^{2+} molekylet. ii) Konsentrasjon av Ca^{2+} er lavere enn det som er nødvendig for å danne sterke bindinger med S100A4. konsentrasjon av Ca^{2+} som ble tilsatt til PBS var 100ug/ml, men det burde vært testet flere ulike konsentrasjoner. Dialyse kassett ga litt bedre resultat enn pD-10 kolonne, men det var ikke nok for å gå videre til sterilfiltrering. Vi fortsetter med å bruke både dialyse kassett og PD-10 kolonne, for å se om vi vil se en signifikant forskjell.

5.4. Tredje runde med His-S100A4 produksjon og rensing:

Resultatene til His-S100A4 protein rensingen har vist at mye av his-S100A4 proteinet tapet skjer under pD-10 kolonne. Flere tiltak ble satt i gang, for å forbedre prosessen, uten hell. Derfor i 3.runde skulle det bli lagt mer vekt på å få ut mer protein av co-Mac kolonne. Om vi

har mye av proteinet vil tape av S100A4 i pd-10 desalting kolonne, ikke være en avgjørende faktor for protein rensing.

Dag 1

Produksjon for dyrking og rensing av HUM+MUS A4 protokolen ble fulgt (material og metode)

Dag 2

Produksjon for dyrking og rensing av HUM+MUS A4 protokolen ble fulgt (material og metode). Målingene under dag 2 er i tabell 11

Tabell 11: viser inkubasjonstid for de ulike bakteriestammene før absorbansen ble målt ved OD600. deretter tilsettes IPTG og inkuberer videre for protein uttrykkelse

Bakteriestamme	Inkubasjons tid før OD-måling	OD600 før IPTG tilsetning	IPTG tilsettes
BL-21 des	1 time	0,775 og 0,720	0,5 ml av 0,5mM til hver kolbe. Inkuberes i 4 timer
M15	1time	0,554 og 0,616	0,5ml av 0,5mM til hver kolbe. Inkuberes i 4 timer
BL-21star de3	Ca 2 timer	0,540 og 0,569	0,5ml av 0,5ml IPTG ble tilsatt til 250ml bakteriekultur i 3,5timer
Rosette-gami de3	Ca 2 timer 30 minutter	0,539 og 0,530	0,5ml av 0,5ml IPTG ble tilsatt til 250ml kultur i 3,5 timer

Dag 3

BL21 star: pH: 8,02

Endringer som ble gjort i dag var at co-Mac ble fortynnes med 2 ml milli-q-vann, Tanken bak det var at co-mac eluate kunne inneholde imidazole, selv om imidazole skulle i utgangspunktet ikke være tilstede i eluate. likevel kan imidazole komme ut i eluate (som forklart tidligere under co-Mac teorien. Imidazol kan føre til protein aggregering om det kommer ut under co-mac eluate. om eluate blir fortynnet i løsningen rett etter eluate kommer ut av co-mac kolona, vil imidazol ha mindre innflytelse på proteinet.

Videre halveres co-mac eluate: halvparten settes på dialyse kassett og halv settes til PD-10 kolonne. Begge PBS bufferne har Ca²⁺. Tabell 12 viser tallene. Tabell 13 viser % vunnet av His-S100A4 proteinet fra Co-MAC eluate til PD-10 desalting og Dialyse kassett. Mengde His-S100A4 proteinet som kom ut under det steget var nok til å fortsette videre med sterilfiltrering. vi fikk en slutt konsentrasjon på 0,393 µg/µl og 0,37 µg/µl, i henhold til PD-10 kolonne og dialyse kassett.

Tabell 12: viser total utbytte av rensed His-S100A4 i bl-21 de3 stammen.

Bakterie- stamme	Kons: µg / µl Etter co-mac	Total utbyt- te: µg/ etter co-mac	Kons ug/ul pd- 10 kolun- ne	Total utbytte: µg Etter pd-10 kolonne: 3,5ml	Kons: µg / µl dia- lyse ka- sett	Total utbyt- te: µg (ul):Dialyse kassett: 3ml
Bl-21 star de3	0,7531	6025,10	0,5104	1786,4	0,4518	1355,4

Tabell 13: viser % vunnet av His-S100A4 proteinet fra Co-MAC eluate til PD-10 desalting og Dialyse kassett

	% vunnet fra co-mac til pd-10 kolonne	% vunnet fra Co-mac til dialyse kassett
BL-21 star de3	29,649	22,50

Konsentrasjon (µg/µl) etter sterilfiltrering av pd-10 kolonne eluate: 0,393µg/µl

Konsentrasjon (µg/µl) etter sterilfiltrering av dialyse kassett eluate: 0,37µg/µl

BL-21-de3:

PH ble justert til 7,55. co-mac kolonne fortynt med 2 ml milli- vann som forrige forsøk med BL-21 star de3. Halve co-mac eluate ble kjørt på PD-10 kolonne og halve brukt i dialyse kassett. PBS brukt her inneholder Ca²⁺. Alle PBS bufferne som brukes fremover inneholder Ca²⁺. Resultat er i tabell 14, og tabell 15 viser prosent tap fra Co-MAC til PD-10 desalting og dialyse kassett.

Tabell 14: viser total utbytte av rensset His-S100A4 i bl-21 star de3 stammen.

bakterie- stamme	Kons:ug/ ul Etter co-mac	Total utbyt- te: ug/total (ul) etter co- mac: 8ml	konsentra- sjon: ug/ul pd-10 kolonne	Total utbytte: ug/ total (ul). Etter pd-10 kolonne: 3,5ml	Kons:ug/u l dialyse kassett	Total utbytte: ug/total (ul):Dialyse kassett: 3ml
BL-21	1,698	13584	0,6108	2137,8	0,7029	2108,7

Tabell 15: viser % vunnet av His-S100A4 proteinet fra Co-MAC eluate til PD-10 desalting og dialyse kassett

	% vunnet fra co-mac til pd-10 kolonne	% vunnet fra Co-mac til dialyse kassett
BL-21	15,737	15,5

Konsentrasjon (ug/ul) etter sterilfiltrering av pd-10 desaltings eluate: 0,54µg/µl

Konsentrasjon (ug/ul) etter sterilfiltrering av dialyse kassett eluate: 0,606µg/µl

M15: Under denne rensing skulle ikke endre pH. Dvs verken NaOH eller HCl ble tilsatt til løsningen for å justere pH. Det skulle ses om pH endring kunne føre til større variasjon av protein utbytte.

pH: 6,80.

En annen endring her var co-MAC eluate. Her ble flere fraksjoner av co-MAC eluate tatt på 1 ml, for å se om det trenges å tilsette så mye eluate som er anbefalt i co.mac purifikasjons Kit dvs 6ml (tabell 16). I tillegg skal fraksjonene fortyntes i PBS-bufferet i stedet for milli-Q vann. PBS har nesten samme pH som imidazol, og i tillegg mammaliske celler som vi skal

teste S100A4 proteinet på, tåler PBS mer enn milli-q vann. Eluate skulle fortynnes i totalt 2 ml PBS, dvs 333 ul per fraksjon.

Tabell 16: viser ulike fraksjoner av Co-MAC eluate med His-S100A4 proteinet.

Fraksjon	F1	F2	F3	F4	F5	F6	Total
Abs	0,157	0,273	0,197	0,146	0,116	0,085	0,165
Kons etter co-mac ug7ul	0,656	0,9916	0,824	0,6108	0,485	0,355	0,690
Total utbytte: ug/total per fraksjon	874,44	1321	1098	814,19	646,505	473,2	5520

Protein utbytte etter co-mac kolonne var greit, og deretter ble det kjørt videre til pD-10 kolone. Pd-10 desalting kolonne ga en abs på 0,003 ved OD280. dvs en konsentrasjon på 0,0125 ug/ul. Vi fikk ikke noe protein utbytte av dialyse kasett. Det var ingen vits å fortsette videre med sterilfiltrering.

Rosette-gami de3:

Endringer som ble gjort: Forrige forsøk med M15 stammen, viste at lav pH kunne føre til protein tap. Derfor skal pH være rundt 8. samtidig ga siste fraksjon av co-mac eluate fra forrige forsøk med M15 lav protein utbytte, derfor ble 5 ml elueringsbuffer brukt i stedet for 6ml under co-mac kolonne. Fortsetter med å fortynne hver fraksjon i 333 ul PBS med Ca²⁺. Resultat er i tabell 17

pH: 7,60 klar løsning, uten felling.

Tabell 17: viser konsentrasjon av his-S100A4 proteiner i rosette-gami de3 i flere fraksjoner etter co-mac rensing.

Fraksjon	F1	F2	F3	F4	F5
Abs	0,017	0,034	0,060	0,032	0,032
Kons etter comac ug7ul	0,071	0,14225	0,25	0,134	0,134
Total utbytte ug/total per fraksjon 1,3ml	94,64	189,61	333,25	178,47	178,47

Resultatet var litt uforventet. Samtidig tidligere rensing av S100A4 proteinet i rosette-gami ga lav utbytte. Det kan være 3 grunner til lav utbytte:

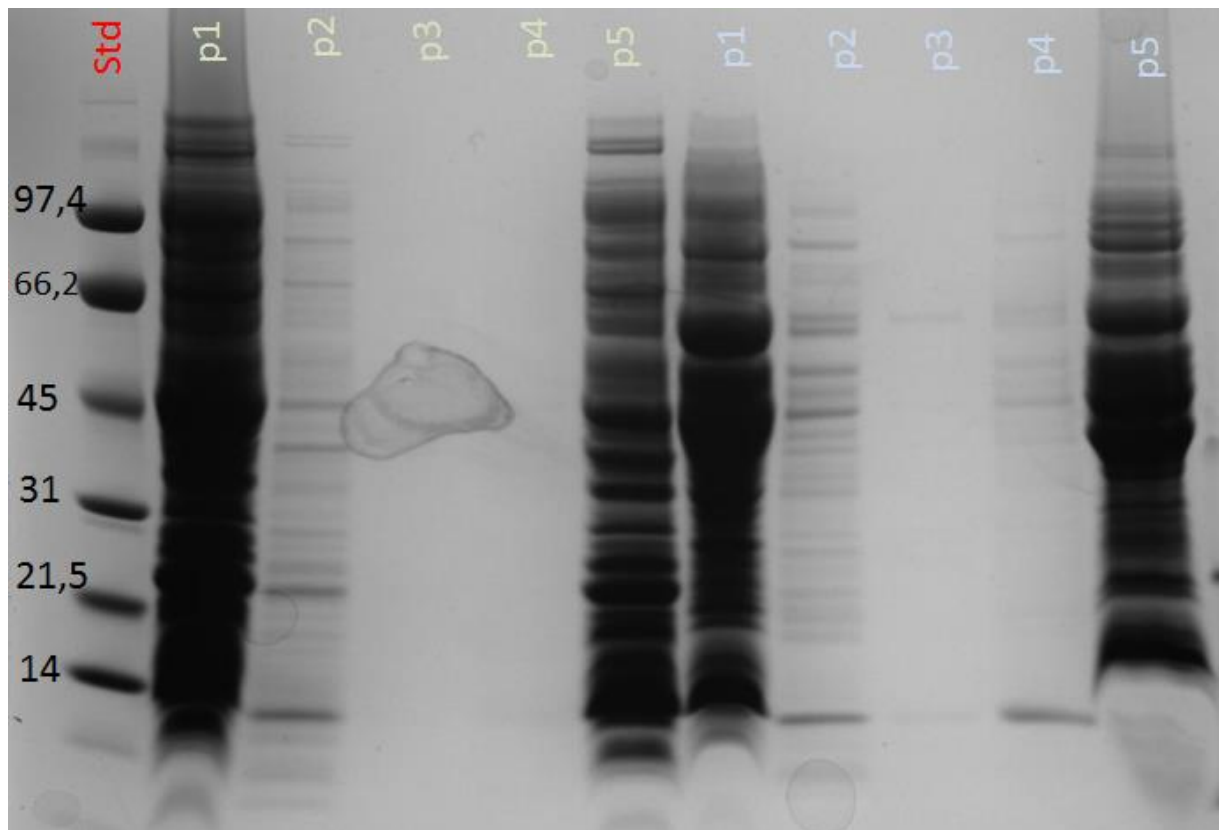
IPTG som skal uttrykke his-tag S100A4 vektor har ikke fungert under dag 2,

Lysisbuffer under dag 3 har ikke virket,

Rosette-gami er ikke en stamme for S100A4 protein produksjon. For resultatene har ikke bedret seg fra sist gang vi produserte og rensset S100A4 proteinet i rosette-gami. Den gangen tenkte vi at lysisbuffer har ikke fungert som det skulle.

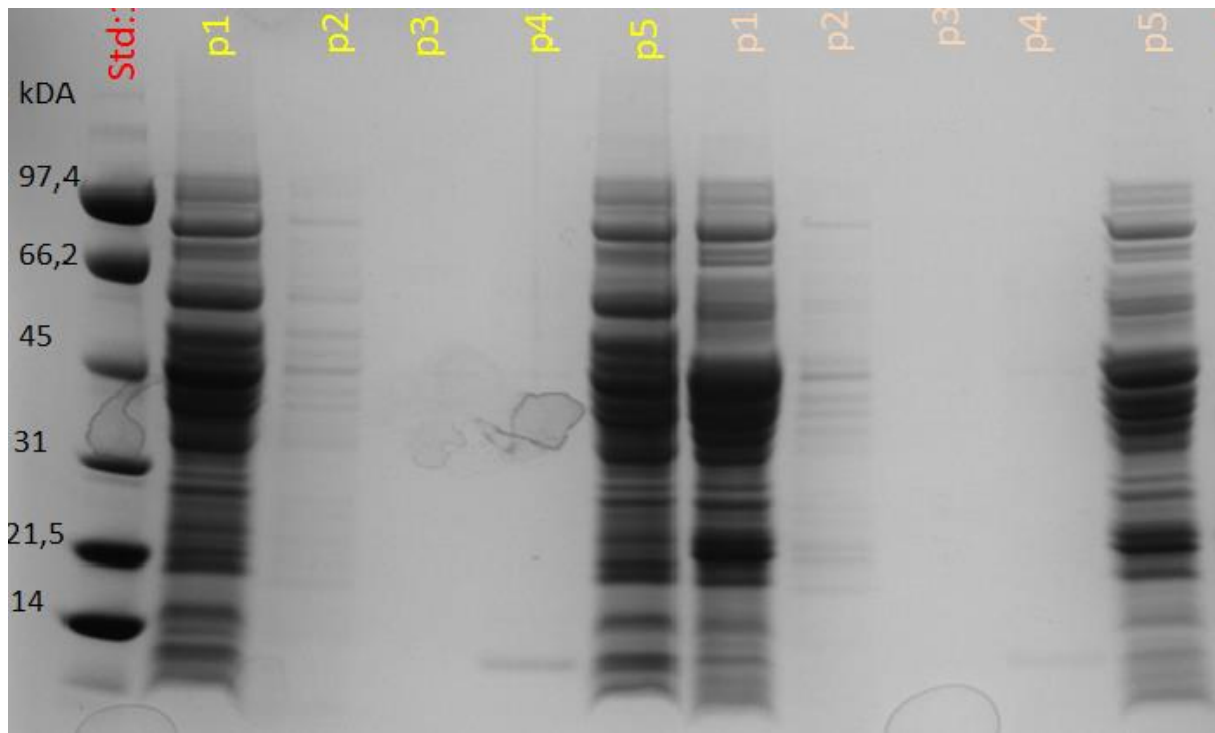
Rekombinant His-S100A4 kjørte på SDS-PAGE

SDS-page gel ble kjørt av rensset his-S100A4 protein fra alle bakteriestammene.



Figur 7: SDS-PAGE gel som viser rekombinant S100A4 protein produsert i BL-21 star (til venstre) og BL-21-des (til høyre). Standard 1: som brukt her er spectra broad low range. P1: prøve av lysisbuffer etter pH måling. P2: co-mac bindingsbuffer. P3: co-mac wash buffer. P4: co-mac eluate (proteinet vårt). P5: protein lysate (inneholder andre proteiner enn vårt). Protein av interesse skal vises i p4 (eluate). Det er vist litt svak bånd i p4 til BL-21- (til høyre). Båndet ved p4 er under 14 kDa (standard1). Det indikerer at proteinet som kom ut med eluate hadde lavere kDa enn 14. S100A4 har en molekylstørrelse på 10-12 kDa. Dermed kan vi si at proteinet som kom ut i eluate til BL-21 des er rS100A4. samme svake båndet viser også ved p2 dvs ved bindingsbufferen. Det indikerer at en del av his-tag proteinet har kommet ut sammen med bindingsbufferen. Det kan forklare lav utbytte av S100A4. vi fikk også ut litt S100A4 ved BL-21 star stammen, men det vises ikke i p4 i elueringsbufferen (til venstre). Gelet viser at litt av his-tag proteinet har kommet ut under bindingsbufferet (p2).

SDS-page gel 2:



Figur 8: SDS-PAGE gel som viser rekombinant S100A4 protein produsert i M15 (til venstre) og Rossette-gami (til høyre). Standard 1: som brukt her er spectra broad low range. P1: prøve av lysis-buffer etter pH måling. P2: co-mac bindings buffer. P3: co-mac wash buffer. P4: co-mac eluate (proteinet vårt). P5: protein lysate (inneholder andre proteiner enn vårt). Protein av interesse skal vises i p4 (eluate). til venstre M15-stammen er det vist litt svak bånd i p4. Båndet ved p4 er under 14 kDa (standard 1). Det indikerer at proteinet som kom ut med eluate hadde lavere kDa enn 14. S100A4 har en molekylstørrelse på 11 kDa. Dermed kan vi si at proteinet som kom ut i eluate til M15-stammen (til venstre) er rS100A4. det stemmer med resultatet vi har. Til høyre er det ingen bånd i p2-4, det viser at det er absolutt ingen His-tag protein var til stedet i prøven. P5 viser at det er andre proteiner tilstede i løsningen, det indikerer at rosette-gami er ikke en stamme for S100A4 protein produksjon.

Oppsummering av 3. runde:

BL-21 star de3 og Bl-21 de3 ga best utbytte. Endringen som ble gjort her var fortytning av Co-MAC eluate i milliQ-vann. His. S100A4 proteiner i M15 stammen ga dårlig utbytte fordi vi hadde ikke endret pH. Samtidig ble Co-MAC eluate fortynt i PBS og eluate ble fordelt i fraksjoner på 1 ml. Det viser at pH endring kan ha en stor betydning under Co-MAC rensing. pH bør helst endres til nærheten av 8. His-S100A4 proteinet i rosette gami-de3 ga ikke noe

utbytte, selv om vi hadde en pH som var i nærheten av 8. i tillegg mindre mengde av Co-MAC elueringsbuffer ble brukt her enn det var anbefalt og Co-MAC eluate ble fortynnet i PBS. resultatene har ikke endret seg betydelig, de bakteriestammene som pleier å gi utbytte har gitt utbytte og de stammene som har ikke gitt utbytte i forrige rundene, har heller ikke gitt noe utbytte her. Fordelen med å fortynne Co-MAC eluate er at vi får ut mer protein enn det vi fikk i forrige gangene, derfor anbefales det å gjøre flere rensinger med denne endringen. Det er usikkerheter ved om eluate bør fortynnes med PBS eller Milliq-vann. Fordi som sagt tydeligere resultatene var forventet. Det beste var å rense BL-21 star de3 og BL-21 de3 igjen og denne gangen fortynne Co-MAC eluate med PBS med Ca^{2+} . da kunne man si noe om hvilken av milliq- vann og PBS er best.

5.5. Fjerde runde med His-S100a4 produksjon og rensing:

I 3. runde ble av his-S100A4 protein produksjon og rensing, ble flere parametere endret. Til nå har vi lært at produksjon og rensing av S100A4 proteinet er veldig komplisert. S100a4 oppfører seg veldig ulikt innenfor samme stamme. En bakteriestamme som gir bra resultat denne gangen, kan gi uforventet negativ resultat en annen gang. I 4. runde endres Oslo-protokollen på en annen måte. Endringene skjer under dag 2, nemlig å forlenge IPTG tiden. IPTG induserer transkripsjon i bakteriene, derfor tiden for IPTG til å virke er en avgjørende faktor for hvor mye protein vil bli produsert. IPTG tiden ble forlenget fra 4 timer til 24 timer.

Så langt har BL-21 star stammen gitt best resultat. 4.runde blir først testet med BL-21 star

Dag 1:

Oslo-protokollen ble fulgt (material og metode)

Dag 2:

forlengelse av IPTG tiden for uttryk av His-S100A4 vektor. Tabell 18:

Tabell 18: viser inkubasjonstid for BL-21de3 bakteriestammene med His-S100A4 vektor i seg, før absorbansen ble målt ved OD600. deretter tilsettes IPTG og inkuberer videre for protein uttrykkelse

Bakterie- stamme	Inkubasjons tid før OD-måling	OD600 før IPTG tilsetning	IPTG tilsettes
BL-21star	Ca 18 timer	0,664 og 0,65	0,5ml av 0,5ml IPTG ble tilsatt til 250ml bakteriekultur i 18 timer

Dag 3:

Gjorde ikke noen endringer. Oslo-protokollen ble følget.

pH: 7,64 klar løsning

vi kjørte alt eluate fra co-mac gjennom pD-10 kolonne siden det ikke var så stor forskjell mellom dialyse-kassett og pd-10 kolonne. Tabell 19 og 20.

Tabell 19: viser total utbytte av rensed His-S100A4 i bl-21 de3 stammen.

Bakte- riestam- stam- me	Kons:ug/u l Etter co- mac	Total utbytte: ug/total mengde (6ml) etter co-mac	Kons ug/ul pd- 10 kolonne	Totak utbytte: ug/ total mengde (5ml). Etter pd- 10 kolonne: 3,5ml
Bl-21 star	5,175	31050	3,414	17070

Tabell 20: viser prosent vunnet av His-S100A4 rensed protein fra co-mac

	% vunnet fra co-mac til pd-10 kolonne	Slutt kons etter sterillfiltre- ring (ug/ul)
BL-21 star	54,97%	1,841

Det beste resultatet vi har fått hittil. Sluttkonsentrasjon var høy, men vi mistet en del proteiner under pd-10 kolonne og sterillfiltrering. Samme sterilfilter har blitt brukt under alle prosedyrene, men denne gangen hadde vi mange proteiner, og kanskje proteinene har bundet

seg til filteret. Derfor fikk vi mindre utbytte etter sterilfiltrering. Et anna sterilfilter fremover. Sterilfilter som vi brukte før: pall life sciences acrodisc syringe filter 0,2um supor membran. Fremover brukes millex gv 0,22unit filter unit. Likevel ser det ut som om 24 timers IPTG virket veldig bra, resultatet fra dette forsøket ga uforventet bra resultat, derfor kjører vi denne prosessen på alle bakteriestammene, for å se om de også vil gi bra utbytte.

Dag 1

Oslo protokolen ble fulgt

Dag 2

IPTG forlenges fra 4 timer til ca 24 timer. Tabell: 21

Tabell 21: viser inkubasjonstid for BL-21de3 bakteriestammene med His-S100A4 vektor i seg, før absorbansen ble målt ved OD600. deretter tilsettes IPTG og inkuberer videre for protein uttrykkelse

Bakteriestamme	OD600 før IPTG tilsetning	Inkubasjons tid før OD-måling	IPTG tilsettes
BL-21 des	0,829 og 0,812	1 time	0,5 ml av 0,5mM til hver kolbe. Inkuberes i 24 timer
M15	0,995 og 0,955	1 time 15 minutter	0,5 ml av 0,5mM til hver kolbe. Inkuberes i 24 timer
BL-21star	0,9 og 0,92	4 timer	0,5ml av 0,5ml IPTG ble tilsatt til 250ml bakteriekultur i 24 timer
Rosette:	1,080 og 1,020	3,5 timer	0,5ml av 0,5ml IPTG ble tilsatt til 250ml kultur i 24 timer

Kommentar til tabellen: selv om OD600 målingene var mer enn 0,6 fortynnet ikke

bakteriekulturen. Vi økte heller ikke mengde IPTG.

Dag 3

Bl-21 de3

pH: 7,60

Resultat i tabell 22

Tabell 22: viser total utbytte av rensset His-S100A4 i bl-21 de3 stammen.

bakte-riestam-stam-me	Kons:ug/u l Etter co-mac	Total utbytte: ug/total mengde (6ml) etter co-mac:	Kons ug/ul pd-10 kolonne	Total utbytte: ug/ total mengde (5ml). Etter pd-10 kolonne: 7 ml
Bl-21	1,8744	11246	0,2677	1873,9

Tabell 23: viser prosent vunnet fra co-mac til pD-10 kolonne

	% vunnet fra co-mac til pd-10 kolonne
BL-21	16,6%

Pga lav protein konsentrasjon etter Pd-10 kolonne, gikk ikke videre til sterilfiltrering.

Dag 3:

Rosette gami-de3

pH:7,90

co-mac kolonnene vi brukte tidligere, hadde blitt brukt mange ganger. Co-mac kolonne hadde gått ut av produksjonen, fremover brukes en annen kolonne, HiTrap Talon crude columns GE healthcare life technology. Her blir 8 ml elueringsbuffer benyttet i stedet for 6 ml som blir

brukt ved co-mac kolonne (tabell 24). Bufferne til co-mac blir brukt her. Vi vet fra før at imidazole kan føre til protein aggregering, derfor tenkte vi å dele elueringsbuffer på forskjellige fraksjoner på 1 ml, slik at vi skulle se om det var nødvendig å tilsette så mye elueringsbuffer.

Tabell 24: viser konsentrasjon av his-tag proteinet i 8 forskjellige fraksjoner

Fraksjon	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	Total: 8ml
Abs	0,087	0,024	0,006	0,028	0,020	0,30	0,012	0,025	0,18
Kons etter Hitrap kolonne ug/ul	0,351	0,10	0,025	0,117	0,084	1,255	0,050	0,105	0,75
Kons: ug/total mengde per fraksjon	351	100	25	117	084	1255	50	105	6000

Gikk ikke videre til pD-10 kolonne.

Dag 3:

Bl-21 star de3:

pH:7,91

her skulle første fraksjon på 1 ml være ufortynnet elueringsbuffer. Mens de andre fraksjoner skulle være fortynnet. Fra forrige forsøk ser vi at vi får bra protein utbytte til 6 ml, etter det går protein konsentrasjonen ned, derfor tilsettes bare 6ml. (tabell 25)

Tabell 25: viser konsentrasjon av his-tag proteinet i 6 forskjellige fraksjoner.

Fraksjon	F1	F2	F3	F4	F5	F6	Tot: f1+f2+f3
Abs	0,771	0,761	0,530	0,184	0,117	0,100	0,422
Kons etter Hitrap kolonne ug/ul	3,23	3,184	2,218	0,769	0,490	0,418	1,765
Kons: ug/total mengde per fraksjon	3230	3184	2218	769	490	418	5295

F1-f3 gir høy konsentrasjone, etter f3 får vi lav konsentrasjon. F1-F3 blir kjørt gjennom pD-10 kolonne, vi ser bort fra F4-F6, pga lav protein utbytte. Tabell 26

Tabell 26: viser konsentrasjon av S100A4 etter sterilfiltrering.

	Konsentrasjon etter sterilfiltrering:
BL-21	0,548 ug/ul

Fordeles i eppendorfrør, merket med navn, dato og konsentrasjon og legges i fryseboksen ved -70 grader celcius.

Dag 3:

M15

pH: 7,96

Under Hitrap kolonne: tilsatt 8 ml elueringsbuffer. Resultat i tabell 27

tabell 27: viser konsentrasjon av S100A4 i hitrap eluate.

	Konsentrasjon Hitrap kolonne ug/ul	Konsentrasjon Hitrap kolonne ug/total mengde eluat (8ml)
M15	0,769	6159

Oppsummering av 4. runde:

I 4. runde skulle endringene skjer i dag 2 av Oslo-protokollen. IPTG skulle forlenges fra 4 timer til ca 24 timer. Runde begynte bra med å få det høyeste utbytte av His-S100A4 proteinet som var i BL-21 star de3 hittil i prosjektet. Vi skulle teste samme endringer på de andre bakteriestammene som hadde pQE30-His-S100A4 vektoren i seg. Resultatet var ikke som forventet. Verken M15, rosette-gami de3, eller BL-21 de3 ga noen utbytte av rensed His-S100A4 proteinet. Bl-21 star de3 ga utbytte. Forskjellen mellom første gang og andre gang rensing av His-s100a4 protein rensing fra Bl-21 star de3 var OD600 målingene som ble gjort før IPTG ble tilsatt til bakteriekulturen under dag 2. absorbansen ved OD6000. OD600 verdi korresponderer med celle tetthet eller antall celler i en gitt *E.coli* bakteriekultur. OD600 =1 vanligvis betyr: 1×10^9 celler per 1 ml. i prosedyren som radiumhospitalet sender står det at OD600 skal være i nærheten av 0,6 før vi tilsetter IPTG til bakteriekulturen. *E.coli* bakterier vokser ulikt, under ulike tilstander. *E.coli* går gjennom 4 faser før den dør. 1. fase eller kalt lag fase: deler bakterie seg veldig sakte. 2. log fase: bakterie er veldig frisk og å deler seg veldig rask, i løpet av 20 minutter kan bakterie har delt seg dobbelt. Bakterie i denne fasen er best til å uttrykke proteinet. Høsting av bakterie celler sent i dette fase kan føre til lav protein utbytte, og protein nedbrytning. 3. fase stasjonær fase også kjent som mettet fase. Under dette fase blir næringsstoffer i mediet begrenset, og metaboliske produkter akkumulerer til en høy nivå som gjør at de hemmer bakterie delingen. OD600 er høyest her. Denne fasen er brukt til plasmid produksjon, de er generelt ikke brae for protein produksjon. 4. fase: død fase: her er næringsstoffene i mediumet ferdig, og nivået til toksisk metabolittene er så høye at cellene dør. I våres tilfelle vi tilsetter IPTG sendt i fase 2 og i begynnelsen av 3. fase. Bakteriene våre har begrenset mediet, og har begrensningen med å få næringsstoffer, og oksygen. Jeg tror det som har skjedd under OD600 over 0,6 er at bakteriekulturen vår har ikke hatt nok næring til 24 timer tid, noe som har gjort at bakteriestammen har gått fra 3. fase til 4. fase. Mangel på O₂ i mediet fører til at mye syre blir dannet pga lav pH i mediet og antibiotika eks ampicillin vil nedbryte ved lav pH. Protein og plasmid mengden vil redusere fordi de fleste bakteriene vil

ikke inneholde selektert plasmid. Dermed må vi være forsiktig når vi skal øke IPTG tiden og samtidig har økt OD600 i utgangspunktet.

Konklusjon:

Tabell 28: viser de beste utbyttene vi har fått og endringene som ble gjort under de dagene.

runde	bakteriestamme	Utbytte i ug/ul	Endringer
1.	Bl-21 star de3	1,163	Ingen endring
2.	-	Ingen utbytte	Endringer i pD-10 desaltings kolonne
3.	Bl-21 star de3	0,39 og 0,37	Co-mac eluate ble fortynnet med 2 ml milliq-vann. Brukt både pD-10 desalting og dialyse kassett.
3.	BL-21 de3	0,77 og 0,7	pH: 7,55. Co-mac eluate ble fortynnet med 2 ml milliq-vann. Brukt både pD-10 desalting og dialyse kassett.
4.	Bl21 star de3	1,841	Forlenget IPTG til 18 timer
4.	Bl-21 star de3	0,548	Høyt OD600. forlenget IPTG til 24 timer.

Viktig punkt:

Bl-21 star de3 var bakteriestammen som ga best resultat. Uansett hvilken endring ble gjort ga His-S100A4 proteinet som var produsert i Bl-21 star de3, det beste resultatet.

Forlenget

pH endring til sur område på pH-skala fører til lav utbytte av S100A4.

Fortynning av co-mac eluate med milliq-vann ga bedre resultat enn PBS med Ca²⁺.

Dialyse kassett og pD-10 desalting kolonne ga nesten samme resultat.

Del 2:

Dette prosjektet går ut på å etablere en prosedyre for produksjon av rekombinant His-S100A4 proteinet, og deretter teste de på mammaliske celler, for å se om proteinet er i stand til å aktivere NFκB. Hvor mye NFκB blir aktiv, er avhengig om hvor biologisk aktiv er rekombinant His-S100A4 proteinet.

S100a4 kan mediere effekter via aktivering av NFκB. Derfor må først NFκB- 3x kb luc og pmaxGFP plasmidene bli produsert. PmaxGFP plasmid er en referanse på om transfeksjon er vellykket. Deretter renses vi plasmidene for å bruke det videre, når vi skal teste S100A4 for biologisk aktivitet.

5.6 produksjon og rensing av NFκB plasmid og GFP plasmid

Vi hadde kompetente DH-5-α bakteriestamme i laben med NFκB 3x-kB-luc og pmaxGFP. Utførelsen er skrevet under material og metode.

Dag 1:

En liten del av kompetent DH-5 α med NFκB 3x-kB-luc og pmaxGFP ble stryket på en agar-plate med selektiv antibiotika.

Dag 2:

Tok en kolonni fra hver LB-plate med DH-5α og NFκB 3x-kB-luc, og en koloni fra DH-5α med pmaxGFP, og tilsatt til 4 ml LB-medium med selektiv antibiotika. inkuberte i 4 timer ved 37°C.

Bakterie kulturen til begge plasmidene hentet og fortynnet i 100 ml LB-medium med selektiv antibiotika. Absorbansen ble målt ved OD600. I kitet til endotoxin-free plasmid DNA purification manual user (midi-prep). Står at ved 100ml bakteriekultur skal OD600 være 4. vi fikk litt lavere enn absorbans ved OD600 enn det som er forventet i kittet. Tabell 29 og 30.

Tabell 29: viser absorbansen av bakteriene ved OD600

Plasmid	Absorbans	Referanse abs ved OD600.
NFκB 3x-kB-luc	2,6	4
pmaxGFP	2	4

Tabell 30: viser konsentrasjon og total utbytte av renses NFκB 3x-kB-luc og pmaxGFP

Plasmid	Referanse konsentrasjon i $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i følge protokollen	Konsentrasjon: $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Total utbytte: $\mu\text{g}/600\mu\text{l}$
NF κ B 3x-kB-luc	0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ på 75% utbytte	813,6ng/ μl	488160
pmaxGFP	0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ på 75% utbytte	796,3 ng/ μl	477780

Referanse er hentet fra protokollen til endotoxin-free plasmid DNA purification manual user (midi-prep).

1.7. Transfeksjon:

Så langt har vi isolert NF κ B 3x-kB-luc og pmaxGFP plasmidet som koder for NF κ B og GFP proteinene. Neste steget var å teste plasmidene på mammaliske celler. Mammaliske celler er ikke som bakterie celle. De er ikke i stand til å ta opp nakent ekstracellulært DNA. En måte å få ekstracellulært plasmid i mammaliske celler, er ved å bruke transfeksjons reagensen.

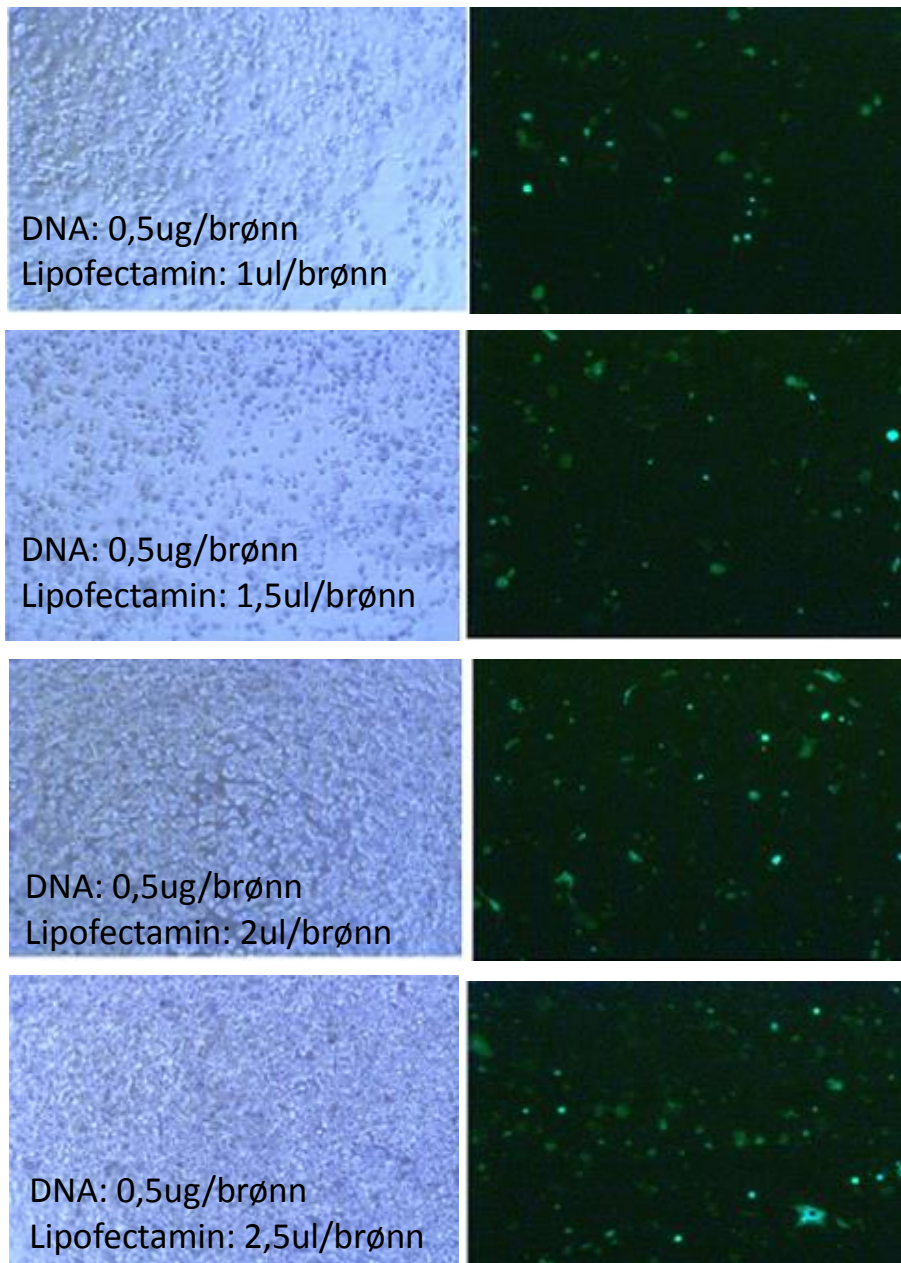
Transfeksjons reagensen danner porer i cellene, slik at plasmidene kan gå inn i cellene. Først måtte vi optimalisere mengde pmaxGFP plasmidet, antall celler og mengde transfeksjons reagens. Under transfeksjonene ble 24-brønner brukt.

1.7.1. Transfeksjons reagens lipofectamin 2000

Transfeksjons reagensen som ble brukt var lipofectamin 2000: cellene var ca 65 % konfluente.

Tabell 31: viser optimalisert mengde av pmaxGFP, transfeksjons reagens og antall celler.

Celletype	Antall celler	GFP plasmid mengde (ug)	Lipofectamin 2000 mengde(ul)
UTSCC-14 NS	$1,0 \cdot 10^5$	0,5ug	1,2,3,4



Figuren 9: viser transfeksjons effektivitet til transfeksjons reagensen lipofectamin 2000. alle brønnene hadde 0,5ug av pmaxGFP, og tallene i bildene viser hvor mye lipofectamin 2000 er tilsatt til hver brønn. Antall celler her var $1,0 \cdot 10^5$. det som skal ses her er antall grønne celler. Pmax GFP koder for proteinet GFP. Under mikroskopet vil de cellene som har tatt opp pmaxGFP lyse grønn, ved en vis bølgelengde. Jo flere grønne celler destе bedre er transfeksjonen.

Tabell 32: forklaring til figur 9

Mengde Lipofectamin	Kommentar
2000	
1 ul	Få døde celler. cellene tåler lipofectamin og ca 20% av cellene lyste grønn, eller transfekttert
1,5 ul	Flere celler lyste grønn her ca 25%, samtidig flere døde celler her.
2 ul	Mange grønne celler her ca 40%, men flere døde celler her enn ved over nevnte mengder
2,5 ul	Litt mer grønne celler her enn ved 2 ul, men flere døde celler her enn ved 2 ul.

Konklusjon: 2ul lipofectamin 2000 reagens ga bedre resultat enn de andre mengdene av lipofectamin 2000. selv om det var flere grønne celler i 2.5 ul lipofetamin 2000 brønnene, men antall døde celler var mye mindre ved 2,5 ul enn ved 2 ul lipofectamin 2000. derfor brukte 2 ul lipofectamin 2000 reagens senere når vi skulle transfekterere cellene med NFκB 3x-kB-luc plasmidet.

1.7.2. Transfeksjons reagens Jetprime:

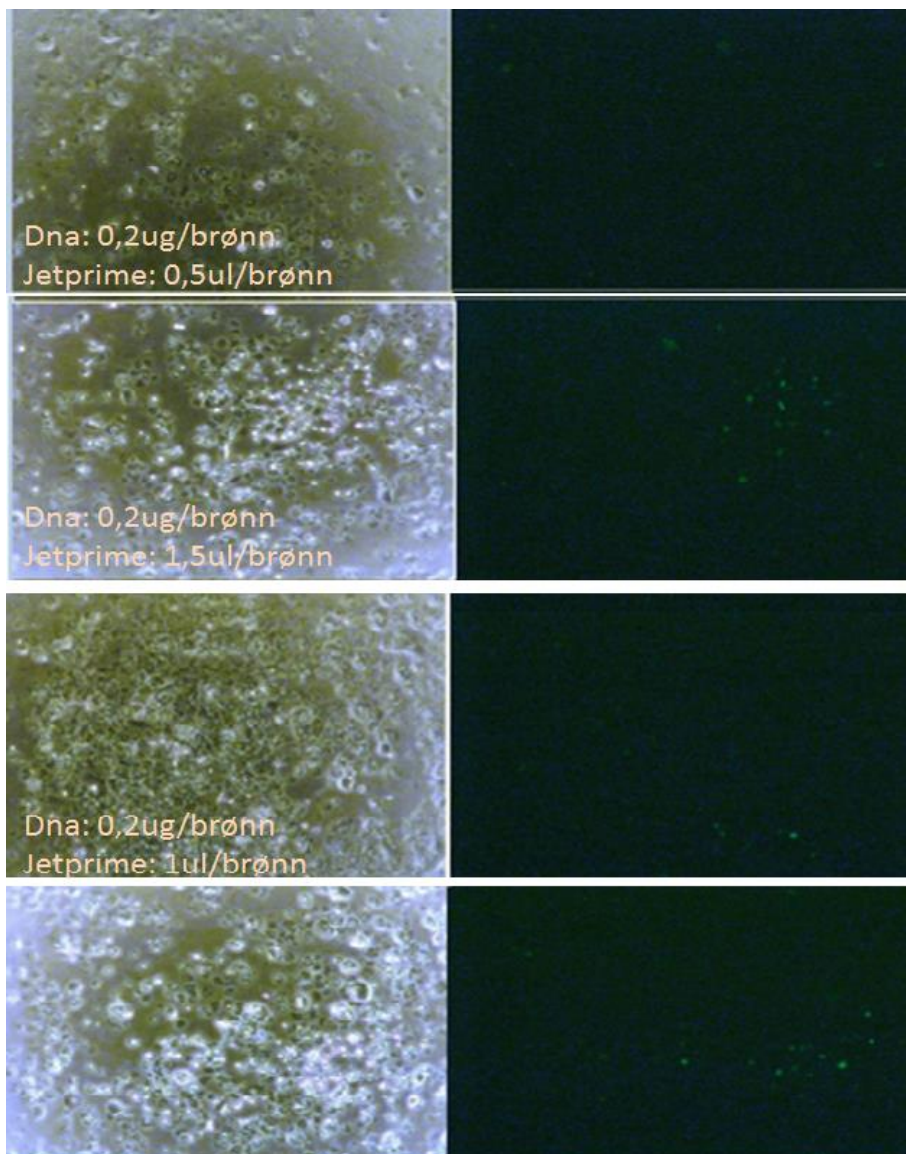
Under lipofectamin transfeksjons reagens døde en del celler, selv om transfeksjonseffektivitet var bra. For å unngå masse celledød, brukes en annen reagens, Jetprime transfeksjons reagens fra polyplus. jetPRIME® er svært skånsom mot celler. Det kreves lave mengder av reagens og DNA under transfeksjon, og er heller ikke toksisk for cellene. Jetprime er i tillegg kostnadseffektiv i forhold til lipofectamin 2000. Vi måtte optimalisere mengde DNA og transfeksjonsreagensen for å se om hvilken mengde passet best til våre celler UTSCC-14NS. Tabellene 33 og 34 viser to forskjellige mengder av DNA/pmaxGFP plasmid og Jetprime.

Figuren10 og 11 viser transfeksjons effektiviteten.

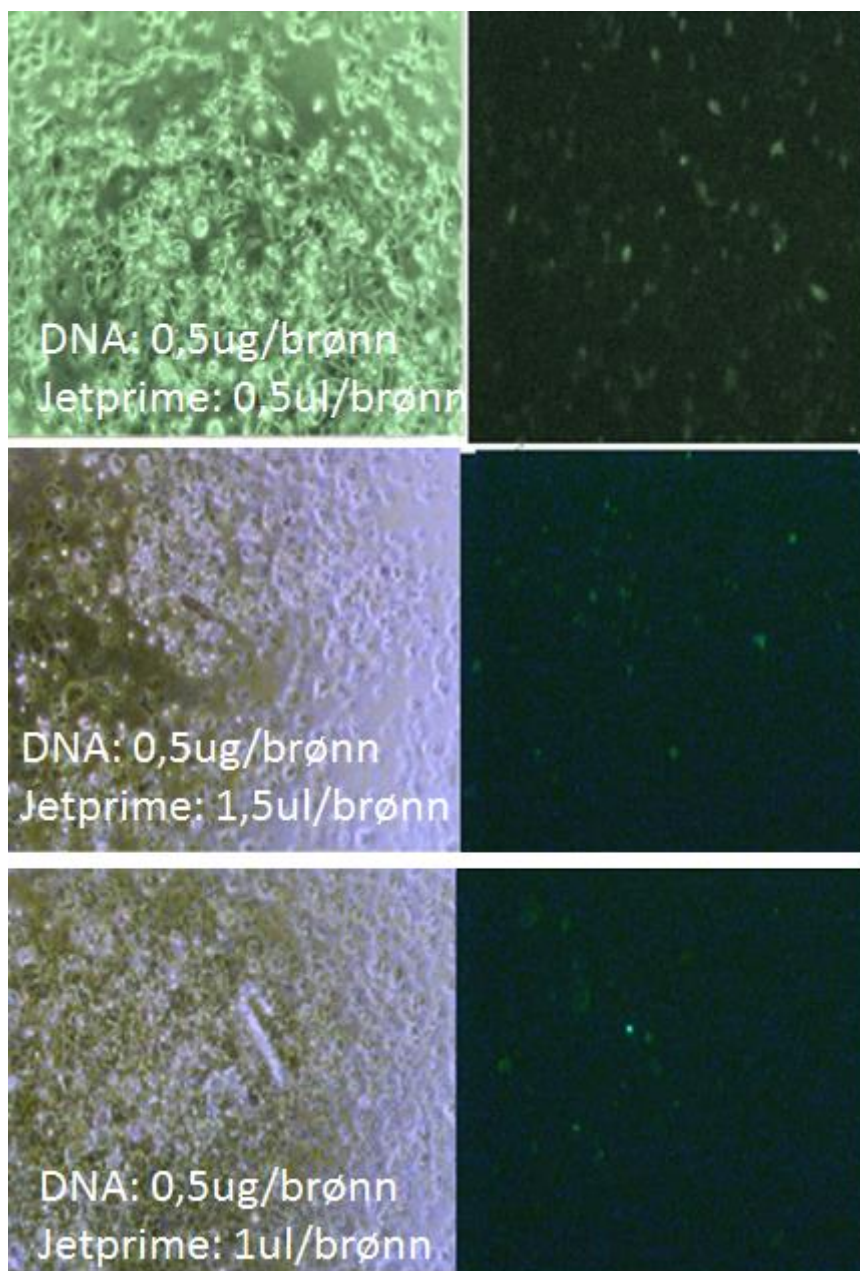
24-wells ble brukt under transfeksjonen: cellene var ca 65% konfluente

Tabell 33: optimalisering av antall celler, mengde pmaxGFP og jetPRIME.

Celletype	Antall celler	GFP plasmid mengde (ug)	JetPRIME mengde(ul)
UTSCC-14 NS	$3,0 \cdot 10^5$	0,25ug, 0,50 ug	0.5, 1, 1.5, 2 ul



Figur 10: transfeksjonseffektivitet av Jetprime reagensen i UTSCC-14NS cellelinje: mengde pmaxGFP plasmid var 0,2ug/brønn med 4 ulike mengder av jetprime reagensen. Antall grønne celler avgjør hvor bra transfeksjonen er. Hvis figuren skal sammenlignes med figuren som tilhører lipofectam 2000 reagensen, kan man si at det var flere levende celler her enn ved lipofectamin 2000 reagensen, men mye mindre antall grønne celler her enn under transfeksjonen med lipofectamin 2000 reagensen.



Figur 11: viser transfeksjonseffektivitet av jetPRIME reagensen i UTSCC-14NS cellelinje: mengde pmaxGFP plasmid var 0,5µg/brønn med 4 ulike mengder av jetPRIME reagensen. Antall grønne celler avgjør hvor bra transfeksjonen er. Transfeksjons effektiviteten her var mye bedre enn transfeksjons effektiviteten ved 0,2µg/brønn pmaxGFP plasmid. Antall døde celler økte med økt mengde jetprime reagensen. Det som ga best resultat med hensyn på antall døde celler vs. antall grønne celler var 1,5µl/brønn jetPRIME med 0,5 µg/brønn av pmaxGFP plasmid.

Overgang fra UTSCC-14 NS til II-11b cellelinjer

UTSCC-14NS celler vokste treig. For rask å finne en optimalisert mengde av pmaxGFP plasmid/jetprime og antall celler, ble en annen cellelinje brukt kalt for II-11b.

Radiumhospitalet i Oslo brukte disse cellelinje, når de skulle teste stimuleringen av rS100A4 proteinet. Derfor brukes disse cellene fremover til vi finner en optimalisert mengde av alle parameterne. Detaljene blir ikke presentert her.

Konsentrasjon til plasmidene NFκB 3x kb luc plasmid og pmaxGFP plasmid endret seg etter hvert. Derfor ble konsentrasjonen av plasmidene målte igjen

Tabell 34: viser gamle og nye målinger av NFκB og GFP målingene.

	NFκB 3x kb-luc	pmaxGFP
Gammel måling	812,6 ng/μl	796,3ng/μl
Ny måling	953,7 ng/μl	2104,9 ng/μl.

Konsentrasjonen til plasmidene hadde endret seg en del, særlig pmaxGFP plasmidet. Det var det vi brukte mest av i laben. Under første gangs rensing av plasmidene, fikk vi problemer i siste steget, plasmidene skulle renses med etanol, og deretter tørkes i 15 minutter. Det tok ca 45 minutter før plasmidene ble tørket. Tørket plasmid dannet seg som hvit hinne i begerglasset. Deretter ble tørket plasmid løst i TE-buffer. løsningen var klar, men det betydde ikke at alt plasmid var løst. Om NFκB 3x kb-luc plasmidet og pmaxGFP plasmidet er veldig tørket vil det være vanskelig å løse alle aggregatene. Aggregatene løser seg litt og litt etter hver gang plasmid løsningen blir tinet. Det er nok det som har skjedd i våres tilfelle derfor har konsentrasjon av plasmidene økt. Særlig pmaxGFP plasmidet, det kan være fordi vi tinet den flere ganger, pga transfeksjonene. Det ble bestemt at NFκB 3x kb-luc plasmidet og pmaxGFP plasmidet skulle renses igjen.

5.8 Ny produksjon og rensing av NFκB plasmid og GFP plasmid

Følger endotoxin free DNA plasmid purification. Se material og metode:

Dag 1:

Frysestocket med Kompetente bakteriestamme DH5-α med NFκB 3x kb-luc plasmidet og pmaxGFP plasmidet ble hentet fra -70°C.

Dag 2:

Laget en forkultur på 4 ml, inkuberes ved 37°C i 4 timer.

4 ml akteriekulturen var på 100 ml . absorpsjonen ble målt ved OD600(tabell 35).

Tabell 35: målt absorpsjonen ved OD 600

Bakteriekultur med plasmid	Abd ved OD600
NFkB 3x kb-luc	2,515
pmaxGFP	2,64

Plasmidene ble rensset, og tørket i etanol. Ingen problemer med tørkingen denne gangen
Deretter ble de løst i 600ul TE-buffer

Konsentrasjonen til plasmidene ble målt to dager etter hverandre, fordi jeg ville være sikkert på at jeg har riktig konsentrasjon av plasmidene (NFkB 3x kb-luc og pmaxGFP) (tabell 36). Plasmidstocket i dag 2 ble først vortekset, og spinnet før jeg målt konsentrasjonen ved UV-spektrometeret. Tallene var litt endret men det er så pass lite at vi ikke trenger å rense NFkB 3x kb-luc og pmaxGFP plasmidene på nytt. For å slippe å tine og fryse hele plasmid stocket hver gang, ble 200 ul plasmid Stock med 0,5µg/µl laget av begge plasmidene. Fremover under transfeksjonen av UTSCC-14 NS celledinjene ble disse plasmidstockene brukt.

Tabell 36: viser slutt konsentrasjonen til plasmidene, dag 1 og dag 2(etter at plasmid løsningen ble frys og tint igjen, vertekser og sentrifugert).

Plasmid	Dag1:Sluttkonsentrasjon	Dag 2:
NFkB 3x kb-luc	628,2 ng/µl	634ng/µl
pmaxGFP	703,8ng/µl	689ng/µl

5.9 Stimulering av His-S100A4 protein i NFκB aktivitet reporter-genassay

II-11 b ga nyttige resultater som blir ikke diskutert her. Ved videre optimalisering av protokollen evt. uttesting av andre alternativer for transfeksjon kanskje kunne vi få en enda høyere transfeksjons effektivitet, men fordi jeg hadde begrenset med tid så gikk jeg tilbake til UTSCC cellene og gjorde stimuleringsforsøkene med de.

I begynnelsen av prosjektet transfekterte vi UTSCC-14 NS celler med lipofectamin 2000. Vi hadde optimalisert både mengde DNA/plasmid og lipofectamin 2000. Antall 150000 celler/brønn var best for å holde cellene i vekst fasen i 4 dager. Dag 1: så ut, dag 2: transfektere, dag 3: 24 timer stimulering, dag 4: 8/6 og 4/3 timer stimulering, deretter fryset i -70C fryseren.

Både lipofectamin 2000 og jetprime transfeksjons reagens ble brukt for å transfektere UTSCC-14NS cellelinjene med NFκB- 3x kb-luc vektor og pmaxGFP vektor. Det som ga best transfeksjonseffektivitet var lipofectamin 2000, derfor brukes lipofectamin 2000 under stimulering av UTSCC-14NS cellelinjer med His-S100A4 proteinet.

Flere stimuleringer ble tatt for å justere mengde av antall celler, DNA, transfeksjons reagens og S100A4 konsentrasjon.

Vi tok to konsentrasjoner av rS100A4 proteinet: 20 µg/µl og 50µg/µl. Forskjellen mellom brønnene som var stimulert med 20 µg/µl var veldig lite i forhold til de brønnene som var stimulert med 50µg/µl His-S100A4 proteinet. I enkelte brønner var ca 5% forskjell i stimuleringen, mens i andre brønner ga 20 µg/µl brønnene bedre stimulering enn 50µg/µl brønnene. Derfor ble lavest konsentrasjon av His-S100A4 proteinet bruk til stimuleringen av UTSCC-14NS cellelinjene.

Neste steg var å stimulere forskjellige His- S100A4 proteiner mot hverandre. S100A4 protein som var kjøpt (produsert i M15 stammen) ble testet mot His-S100A4 proteiner produsert og rensset i laben. Bedre forklart under material (5.9.). Grafen:1 og 2 under viser stimuleringen av ulike batch av rekombinant His-S100A4 proteinet. Tabell 37 og 38 tilsvarer graf 1.

Første stimulering:

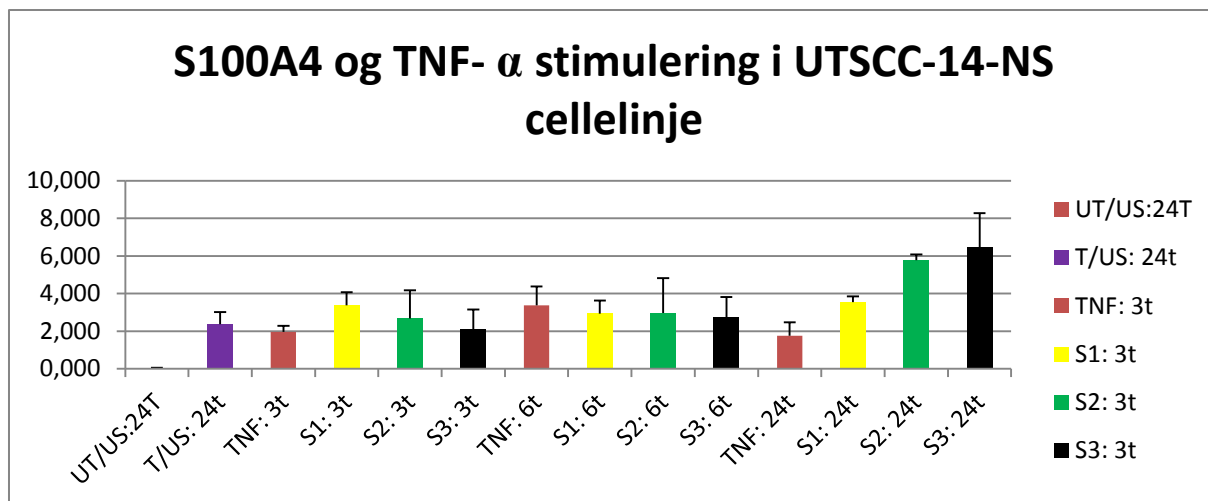
Tabell 37 : viser TNF-alpha og rS100A4 stimulering fra ulike bakteriestammer.

TNF-alpha: kjøpt, konsentrasjon 100ug/ul
S1: kjøpt S100a4 (1,04µg/µl)
S2: S100A4 produser fra Bl-21, 0,54µg/µl
S3: produsert fra Bl-21star (0,606µg/µl)

Tabell 38: viser stimulering av S100A4 proteinet. Antall celler: 150000celler/brønn.

Lipofectamin :2ul/brønn, DNA: 0,5 ug, S100A4: 20ug/ml. TNF-alpha: 50ug/ml ga best resultat.

UT/US	T/US	TNF: 3t	S1: 3t	S2: 3t	S3: 3t	TNF: 6t	S1: 6t	S2: 6t	S3: 6t	TNF: 24t	S1: 24t	S2: 24t	S3: 24t
0,005	2,609	2,268	3,790	2,910	3,112	4,555	3,075	3,636	1,672	2,701	3,508	5,496	7,711
0,004	2,800	1,585	3,704	3,865	1,836	2,009	3,200	5,076	2,458	1,568	3,723	5,945	4,744
0,008	3,066	2,163	3,166	2,979	0,984	3,370	2,820	2,861	3,336	2,261	3,109	5,978	7,536
0,001	1,719	2,147	2,236	0,091	3,279	2,879	3,715	3,237	4,284	1,158	3,941	5,429	4,180
0,064	1,676	1,614	3,953	3,541	1,228	4,058	1,836	0,000	1,910	1,043	3,436	6,056	8,042



Graf 1: viser ulike stimuleringer av Hia-S100A4 proteinet over ulike tidskurver. Med standardavvik. TNF- α positiv kontroll til His-S100A4 proteinet. Tabell 37 viser hvilken stimuleringer er i grafen.

Andre stimulering:

Antall celler: 150000celler/brønn. Lipofectamin :2ul/brønn, DNA: 0,5 ug, S100A4: 20ug/ml.
TNF-alpha: 50ug/ml

tabell 39: viser hvilken stimulanter og hvilken konsentrasjon vi har brukt

S1: kjøpt S100a4
S2: S100A4 produsert fra Bl-21, 0,54ug/ul
S3: produsert fra Bl-21star (0,606ug/ul)
S4: rS100A4 produsert fra BL-21star: 1,841 ug/ul

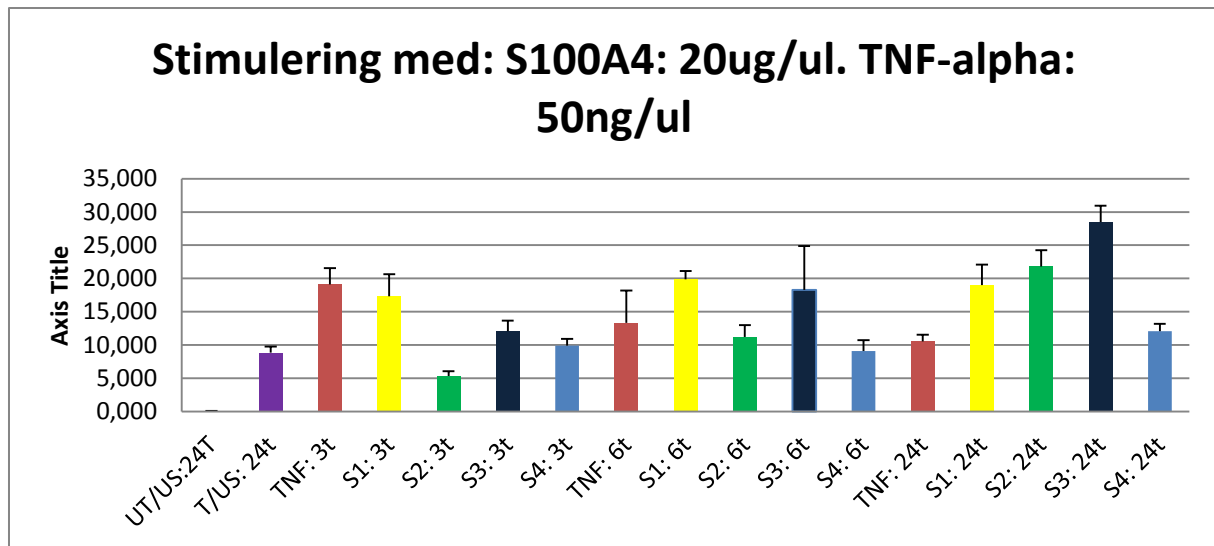
Tabell40: viser stimulering av S100A4 proteinet. Antall celler: 150000celler/brønn.

Lipofectamin :2ul/brønn, DNA: 0,5 ug, S100A4: 20ug/ml. TNF-alpha: 50ug/ml ga best resultat.

UT/US:24T	T/US: 24t	TNF: 3t	S1: 3t	S2: 3t	S3: 3t	S4: 3t	TNF: 6t	S1: 6t	S2: 6t	S3: 6t	S4: 6t
0,013	8,225	18,540	14,340	4,656	12,030	8,867	11,760		8,693	21,010	7,627
0,026	7,980	22,060	13,510	5,241	14,150	9,764	8,091	21,480	12,850	18,020	7,000
0,070	9,658	16,120	21,270	6,222	11,000	8,993	9,693	20,160	12,400	10,045	10,470
0,039		17,580	19,530	5,933	10,140	11,050	18,210	18,490	10,020	27,580	9,850
0,064	9,566	21,160	17,820	4,651	13,080	10,830	18,720	19,360	12,110	14,670	10,430

Tabell 41: er fortsettelse av tabell 40

TNF: 24t	S1: 24t	S2: 24t	S3: 24t	S4: 24t
10,580	19,150	20,410	29,890	11,160
9,678	23,270	20,500	27,500	11,000
10,680	14,620	20,790	28,780	13,360
9,576	18,300	25,470	31,340	13,120
12,070	19,660		24,980	11,810



Graf 2 : viser ulike stimuleringer, og over ulike tidskurver. Med standardavvik. Luciferase aktiviteten av T/US, s1, s2 og S3 ble målt samme dag, mens TNF, UT/US og S4 ble analysert på samme dag.

Oppsummering: S100A4 stimulering har vært komplisert. Det er avhengig av mange faktorer. Alt må gjøres rett for at vi skal få samme svar. Steger som vil påvirke His-S100A4 protein stimulering :

- Mengde celler som sådd ut, % konfluenitet.
- Hvor mange celler er transfektert under dag 2. I gjennomsnittet hadde vi 40% grønne celler
- Hvor stor evne har rS100A4 til å stimulere NFκB proteinet. Deretter til å aktivere luciferase gene.

Graf 1 og 2 viser at rekombinant His-S100A4 som er produsert i laben gir bedre NFκB aktivitet enn rekombinant His-S100A4 som var hentet inn. Rekombinant His-S100A4 som var produsert i BL-21 star de3 stammen ga best resultat blant rekombinant His-S100A4 som var produsert i andre stammene(S3 i begge grafene). Rekombinant His-S100A4 aktiverte NFκB mye bedre enn det TNF-alpha gjorde. Grafen 2 viser S4 som var også produsert i BL-21 star de3 stammen, men luciferase aktiviteten der var ikke så mye. Forskjellen mellom begge S100A4 proteinene var at IPTG virket i 18 timer i S4, mens S3 ble fortynnet i milli-q-vann. Forlenget IPTG vil kanskje påvirke His-S100A4 proteinets biologisk aktivitet, jo lenger IPTG desto mindre vil S100A4 proteinet være aktiv, men det er bare en hypotese. Flere produksjoner må til for at vi skal kunne si noe om IPTG forlengelse vil påvirke biologisk

aktiviteten til His-S100A4 proteinet. En annen ting som kan ha påvirket biologisk aktiviteten til His-S100A, er His-tagene som er foran S100A4 proteinet. Disse sekvensene kan gjøre at S100A4 proteinet binder seg med ulike konformasjoner til bindingssete når den kommer inn i celle, noe som vil gjøre at ulike mengder NFκB aktiveres, derfor vi får så variert NFκB aktivitet i de ulike stimuleringene. Det er bare en hypotese. men etter hvert kan man kanskje prøve å ta bort Histidin sekvensene på N-terminale til S100A4, og deretter teste de i NFκB aktivitetens reportergenassay. For å se om den kan ha en betydning for hvor sterk er NFκB aktiviteten. Ut fra grafene ser det ut som om vi hadde klart og produsere aktiv S100A4. men det er ikke slutten. Eksakt mekanisme for S100A4 produksjon er fortsatt ikke etablert. Vi er bare et steg nærmere produksjonen og biologiske aktiviteten.

Konklusjonen:

Metastase utgjør 90% av mortalitet hos kreftsyke pasienter. Det er viktig å ha kunnskap om hva som er mekanismen bak disse prosessene, for å forstå sykdommen og utvikle nye behandlingsmetoder. S100A4 er et protein som er assosiert med prognose av kreft. studier har vist at S100A4 påvirker syntese av MMPer. Men mye gjenstår før man har et klar beskrivelse av mekanismen. Bakgrunnen for dette prosjektet var å etablere en ny prosedyre for produksjon og rensing av biologisk aktivt S100A4 protein. For deretter å bruke de i studier fremover for å kartlegge ekstracellulært bindingspartnere for S100A4 proteinet. Produksjonen og rensingen av S100A4 proteinet var komplisert. Vi har prøvd forskjellig måter for å øke protein produksjon og rensing av S100A4 proteinet på. Prosedyren for hvordan S100A4 protein skulle produseres og renses fikk vi fra Mælandsmo's forskningsgruppe ved Radiumhospitalet i Oslo. Tidligere har S100A4 ekspresjonsvektor bare blitt brukt i M15 *E.coli* stammen. I denne oppgven ble fire ulike *E.coli* stammer brukt, BL-21 star de3, BL-21 de3, M15 og resseta-gami de3 . Alle stammene blir vanligvis brukt til protein produksjon. De stammene som ga nesten alltid dårlig utbytte var rosette-gami og M15. M15 var noen tilfeller bedre enn rosette-gami. BL-21 star de3 var best til å uttrykke våres protein. mye av proteinet ble tapt under Pd-10 desalting. flere tiltak satt i gang for å øke utbytte av S100A4 proteinet. Flere av tiltakene ga bra resultat. Alle proteinrensingene ble kjørt på SDS-PAGE, og det virker som om Rosette-gami de3 produserte ikke S100A4. SDS-PAGE viste at de stammene som ga bedre resultat var BL-21 star de3 og BL-21 de3. Renset S100A4 ble testet i NFκB-aktivitetens reportergen assay. Biologisk aktiviteten til S100A4 var veldig ustabil. Det virket

som om alle S100A4 som ble produsert i laben ga NF κ B aktivitet, dvs at de var biologisk aktive. S100A4 produsert i laben ga høyere aktivitet enn TNF- α og S100A4 som er kjøp inn. Men aktivitet varierte mye fra gang til gang. Det må flere stimuleringer til for å vite hvor mye biologisk aktivt er S100A4 proteinet.

Fremover:

Produksjon og rensing av S100A4 proteinet:

- Kjøre SDS-PAGE av rensed His-S100A4 proteinet fra fjerde runde.
- Kombinere endringene i alle rundene som ble gjort i første del av resultatet.
- Dag 2: ikke ha OD600 over 0,6, øke IPTG tiden til 17-18 timer. Endre pH til mellom 7,5-8.
- Dag 3: Fortynne co-mac eluate med milliQ- vann og kjøre på både PD-10 kolonne og dialyse kassett. For å se om utbytte blir mer i den ene enn i den andre. Under sterilfiltrering bruk millex gv 0,22unit filter, for å få minst mulig tap av proteinet.
- Bestemme biologisk aktivitet av ulike batcher rS100A4.
- Vi brukte bare UTSCC-14 (har RAGE) under stimuleringen av S100A4. fremover
- Dyrke UT-SCC14 (har RAGE) og UT-SCC24A (har ikke RAGE), transfektere cellene med reporterplasmid for NF κ B, og stimulere med ulike batcher rS100A4
- Analysere luciferase aktivitet som indikator for NF κ B aktivering
- Dyrke UT-SCC14 og UT-SCC24A celler i serumfritt medium og stimulere med ulike batcher rS100A4
- Analysere kondisjonert medium for uttrykk av MMP-9 ved substrat zymografi
- Analysere uttrykk av MMP-9 protein ved Western blotting og for MMP-9 mRNA ved RT-qPCR
- Analysere ved bruk av xCelligence-instrumentet effektene på celle migrasjon og invasjon gjennom Matrigel

Referanser:

Folkehelseinstituttet: fakta om kreft –forekomst og dødelighet

Store norske leksikon: angiogenese

Aggarwal, B. B. (2004). "Nuclear factor-kappaB: the enemy within." Cancer Cell 6(3): 203-208.

Barracough, R., et al. (1987). "Molecular-Cloning and Sequence of the Gene for P9ka a Cultured Myoepithelial Cell Protein with Strong Homology to S-100, a Calcium-Binding Protein." J Mol Biol 198(1): 13-20.

Baud, V. and M. Karin (2009). "Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls." Nat Rev Drug Discov 8(1): 33-40.

Mathisen, B., R. I. Lindstad, J. Hansen, S. A. El-Gewely, G. M. Maelandsmo, E. Hovig, O. Fodstad, T. Loennechen and J. O. Winberg (2003). "S100A4 regulates membrane induced activation of matrix metalloproteinase-2 in osteosarcoma cells." Clin Exp Metastasis 20(8): 701-711.

Cabezon, T., et al. (2007). "Expression of S100A4 by a variety of cell types present in the tumor microenvironment of human breast cancer." International Journal of Cancer 121(7): 1433-1444.

Dejardin, E. (2006). "The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development." Biochem Pharmacol 72(9): 1161-1179.

Emberley, E. D., et al. (2004). "S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in

cancer." Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire 82(4): 508-515.

Gongoll, S., et al. (2002). "Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer." Gastroenterology 123(5): 1478-1484.

Goto, K., et al. (1988). "Cloning of the Sequences Expressed Abundantly in Established Cell-Lines - Identification of a Cdna Clone Highly Homologous to S-100, a Calcium-Binding Protein." Journal of Biochemistry 103(1): 48-53.

Gribenko, A. V. and G. I. Makhatadze (1998). "Oligomerization and divalent ion binding properties of the S100P protein: a Ca²⁺/Mg²⁺-switch model." J Mol Biol 283(3): 679-694.

Gupta, G. P. and J. Massague (2006). "Cancer metastasis: building a framework." Cell 127(4): 679-695.

Ilg, E. C., et al. (1996). "Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors." International Journal of Cancer 68(3): 325-332.

Keirsebilck, A., et al. (1998). "E-cadherin and metastasin (mts-1/S100A4) expression levels are inversely regulated in two tumor cell families." Cancer Res 58(20): 4587-4591

Marenholz, I., et al. (2004). "S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature)." Biochem Biophys Res Commun 322(4): 1111-1122.

Mishra, S. K., et al. (2012). "S100A4 calcium-binding protein is key player in tumor

progression and metastasis: preclinical and clinical evidence." Cancer and Metastasis Reviews 31(1-2): 163-172.

Perkins, N. D. (2007). "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function." Nat Rev Mol Cell Biol 8(1): 49-62.

Rudland, P. S., et al. (2000). "Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer." Cancer Res 60(6): 1595-1603.

Strutz, F., et al. (1995). "Identification and Characterization of a Fibroblast Marker - Fsp1." Journal of Cell Biology 130(2): 393-405.

Takenaga, K., et al. (1994). "Cellular-Localization of Pel98 Protein, an S100-Related Calcium-Binding Protein, in Fibroblasts and Its Tissue Distribution Analyzed by Monoclonal-Antibodies." Cell Structure and Function 19(3): 133-141.

Tergaonkar, V. (2006). "NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target." Int J Biochem Cell Biol 38(10): 1647-1653.

Wang, G. Z., et al. (2000). "Interaction in vivo and in vitro of the metastasis-inducing S100 protein, S100A4 (p9Ka) with S100A1." Journal of Biological Chemistry 275(15): 11141-11146.

Watanabe, Y., et al. (1992). "Isolation and Characterization of a Calcium-Binding Protein Derived from Messenger-Rna Termed P9ka, Pel-98, 18a2, or 42a by the Newly Synthesized Vasorelaxant W-66 Affinity-Chromatography." Archives of Biochemistry and Biophysics 292(2): 563-569.

Watanabe, Y., et al. (1992). "Calvasculin, an Encoded Protein from Messenger-Rna Termed Pel-98, 18a2, 42a, or P9ka, Is Secreted by Smooth-Muscle Cells in Culture and Exhibits Ca²⁺-Dependent Binding to 36-Kda Microfibril-Associated Glycoprotein." Journal of Biological Chemistry 267(24): 17136-17140.

Zimmer, D. B., et al. (1995). "The S100 protein family: history, function, and expression." Brain Res Bull 37(4): 417-429.

Ambartsumian, N., J. Klingelhofer, M. Grigorian, C. Christensen, M. Kriajevskaja, E. Tulchinsky, G. Georgiev, V. Berezin, E. Bock, J. Rygaard, R. Cao, Y. Cao and E. Lukanidin (2001). "The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor." Oncogene 20(34): 4685-4695.

Chuong, C., J. Katz, K. M. Pauley, M. Bulosan and S. Cha (2009). "RAGE expression and NF-kappaB activation attenuated by extracellular domain of RAGE in human salivary gland cell line." J Cell Physiol 221(2): 430-434.

Grotterod, I., G. M. Maeldansmo and K. Boye (2010). "Signal transduction mechanisms involved in S100A4-induced activation of the transcription factor NF-kappa B." Bmc Cancer 10.

Ma, L. and R. A. Weinberg (2008). "Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis." Trends Genet 24(9): 448-456.

Nienhuis, H. L., K. de Leeuw, J. Bijzet, A. Smit, C. G. Schalkwijk, R. Graaff, C. G. Kallenberg and M. Bijl (2008). "Skin autofluorescence is increased in systemic lupus

erythematosus but is not reflected by elevated plasma levels of advanced glycation endproducts." Rheumatology 47(10): 1554-1558.

Schmidt-Hansen, B., D. Ornas, M. Grigorian, J. Klingelhofer, E. Tulchinsky, E. Lukanidin and N. Ambartsumian (2004). "Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity." Oncogene 23(32): 5487-5495.

Avery, O. T., et al. (1944). "Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii." J Exp Med 79(2): 137-158.

Berge, G., et al. (2011). "Osteopontin--an important downstream effector of S100A4-mediated invasion and metastasis." International Journal of Cancer 129(4): 780-790.

Bjornland, K., et al. (1999). "S100A4 involvement in metastasis: deregulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in osteosarcoma cells transfected with an anti-S100A4 ribozyme." Cancer Res 59(18): 4702-4708.

Bond, M., et al. (2001). "Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells." Cardiovasc Res 50(3): 556-565.

Gross, J. and C. M. Lapiere (1962). "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay." Proc Natl Acad Sci U S A 48: 1014-1022.

Lacks, S. A. (2003). "Rambling and scrambling in bacterial transformation--a historical and personal memoir." J Bacteriol 185(1): 1-6.

Lorenz, M. G. and W. Wackernagel (1994). "Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment." Microbiol Rev 58(3): 563-602.

Mehier-Humbert, S. and R. H. Guy (2005). "Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells." Adv Drug Deliv Rev 57(5): 733-753.

Pfeifer, A. and I. M. Verma (2001). "Gene therapy: promises and problems." Annu Rev Genomics Hum Genet 2: 177-211.

Schmidt-Hansen, B., et al. (2004). "Functional significance of metastasis-inducing S100A4(Mts1) in tumor-stroma interplay." J Biol Chem 279(23): 24498-24504.

Semov, A., et al. (2005). "Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation." J Biol Chem 280(21): 20833-20841.

Sun, S. C. (2011). "Non-canonical NF-kappaB signaling pathway." Cell Res 21(1): 71-85.

Takenaga, K., et al. (1994). "Involvement of S100-related calcium-binding protein pEL98 (or mts1) in cell motility and tumor cell invasion." Jpn J Cancer Res 85(8): 831-839.

Tarabykina, S., et al. (2007). "Metastasis-associated protein S100A4: spotlight on its role in cell migration." Curr Cancer Drug Targets 7(3): 217-228.

Woods, N. B., et al. (2003). "Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis." Blood 101(4): 1284-1289.

Zhou, A., et al. (2003). "Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference." Oncogene 22(13): 2054-2064.

IPTG (Biochemical Reagents): <http://labscientific.com/Biochemical-Reagents/X-gal-X-Glu-IPTG-X-a-gal-Salmon-gal-and-Magenta-gal/IPTG-Biochemical-Reagents/>