

OsloMet – storbyuniversitetet
Fakultet for teknologi, kunst og design
Institutt for maskin, elektronikk og kjemi
 Postboks 4 St. Olavs plass, 0130 Oslo
 Telefon: 67 23 50 00

PROSJEKT NR. 2
2

TILGJENGELIGHET
Åpen

BACHELOROPPGAVE

BACHELOROPPGAVENS TITTEL Human endonuklease V- Isoformer og aktivitet i makrofager og T-celler	DATO 23.05.2019
	ANTALL SIDER / BILAG 37/8
FORFATTERE Marielle Storbråten og Eivind Skurdal	INTERN VEILEDER Tone Berge
UTFØRT I SAMARBEID MED Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet Avdeling for mikrobiologi og institutt for indremedisinsk forskning	EKSTERNE VEILEDERE Ingrun Alseth og Tuva B. Dahl
SAMMENDRAG <p>Human Endonuklease V er et enzym som kutter ved inosiner i RNA <i>in vitro</i>. Den overordnede hensikten med denne oppgaven var å studere isoformene 282, 308 og 309 for å få en bedre forståelse av <i>in vivo</i> funksjonen til human endo V ved å studere isoformene i ulike immunceller.</p> <p>Det relative uttrykket av isoformene ble målt med qPCR. Det ble funnet en generell oppregulering av isoformene i polariserte makrofager fra THP1 cellelinje, og aktiverte T-celler fra Jurkat cellelinje i forhold til kontrollcellene. I primære, polariserte makrofager ble det observert en generell nedregulering av isoformene i forhold til kontrollcellene. Alle isoformene ble påvist i primære T-celler.</p> <p>Fullengdetranskriptet av 282, 308 og 309 ble amplifisert med PCR. Det ble ikke funnet noen fullengdetranskripter for 282. For 308 og 309 ble det funnet fullengdetranskripter i både de primære cellene og cellelinjene og det gir en indikasjon på at disse isoformene produseres i cellene. Det ser ut til å være større variasjon i uttrykt endo V i primære celler enn i cellelinjer.</p> <p>For å studere endogent endo Vs aktivitet ble det gjort et aktivitetsassay. Det ble for første gang vist aktivitet for endo V i THP1- og Jurkat-celler.</p>	

Human endonuklease V (hEndoV)
Isoformer
Immunceller

Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet som en avslutning på vår utdanning som bioteknologi- og kjemiingeniører ved fakultetet for teknologi, kunst og design og institutt for maskin, elektronikk og kjemi ved OsloMet – storbyuniversitetet. Denne oppgaven er utført på Oslo universitetssykehus – Rikshospitalet ved avdeling for mikrobiologi og institutt for indremedisinsk forskning. Det praktiske arbeidet av denne oppgaven begynte i januar 2019 og ble avsluttet i april samme år.

I denne anledningen vil vi først og fremst takke våre eksterne veiledere Dr. Ingrun Alseth og Dr. Tuva B. Dahl for deres tilgjengelighet, oppfølging og gode veiledning i både det praktiske arbeidet og for deres verdifulle innsikt under denne perioden. Takk for gode svar på våre mange dumme, og forhåpentligvis noen gode, spørsmål. Vi vil også rette en stor takk til Natalia Berges Jimenez (PS gratulerer med publikasjonen!), for alle gangene vi har fått «låne» SYBR Green og for all hjelpen vi har fått på laboratoriet.

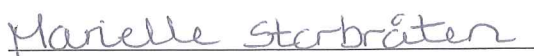
Vi vil også takke vår interne veileder Dr. Tone Berge for tilgjengelighet og støtte.

Vi vil takke samtlige på avdeling for indremedisinsk forskning, med en ekstra oppmerksomhet til Vigdis Bjerkeli og Ellen Lund Sagen som har gitt oss god hjelp på laboratoriet, og Dr. Kari Otterdal og Dr. Sverre Holm for at vi fikk fylle kontoret deres med sekker og yttertøy.

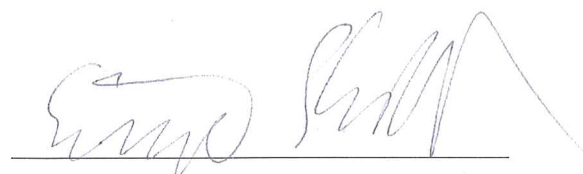
OsloMet – storbyuniversitetet

Fakultetet for teknologi, kunst og design

Oslo, 22.05.2019



Marielle Storbråten



Eivind Skurdal

Sammendrag

Endonuklease V er et enzym som har en sentral rolle for reparasjon av deaminerte baser i *E. coli* DNA, der den kutter fosfodiesterbindinger ved inosiner. I *E. coli* har det også blitt funnet at endo V kutter ved inosiner i både enkelt- og dobbeltrådet RNA. Den biologiske betydningen av RNA-aktiviteten er imidlertid ukjent. En ortolog av endo V finnes i mennesket, og i likhet med *E. coli* endo V kutter human endo V ved inosiner i RNA. Forskning har gitt god kunnskap om *in vitro* funksjonen til endo V, men *in vivo* funksjonen er fortsatt dårlig forstått. Databaser viser at det finnes mange spleisevarianter for human endo V, men det er ukjent hvilke av disse transkriptene som danner funksjonelle proteiner. Tre transkripter har alle eksonene fra 1-8, samt varierende ekson 9-10. De danner funksjonelle proteiner med henholdsvis 282, 308 og 309 aminosyrer. Det er ukjent i hvilke celler endo V funksjonen er viktigst. Nitrogenoksid (NO) fra polariserte makrofager fremmer deaminering og man antar at endo V har en større rolle under disse forholdene.

Den overordnede hensikten med denne oppgaven var å studere isoformene 282, 308 og 309 i makrofager og T-celler for å få en bedre forståelse for *in vivo* funksjonen til human endo V. Dette ble gjort i polariserte makrofager og aktiverte T-celler fra primære celler og cellelinjene Jurkat og THP1. Det ble også undersøkt fullengdetranskriptene av human endo V for de tre isoformene i de samme cellene, samt gjort en analyse av aktiviteten til enzymet isolert fra de ulike celletypene.

Det relative genuttrykket av isoformene ble målt ved kvantitativ real-time PCR (qPCR), der det ble utført en optimalisering av primersekvenser og mastermikser med tilhørende temperaturprogram. Genuttrykket viste at det var en generell oppregulering av isoformene i M1 polariserte celler i forhold til hvilende makrofager fra THP1 cellelinjer. Det ble også vist en generell nedregulering av enkelte isoformer i primære M1 polariserte celler. For THP1 førte polarisering av makrofager til en økning i uttrykket av endo V. I primære celler førte polariseringen til en nedregulering. En kunne imidlertid forventet en oppregulering i disse cellene da M1 produserer nitrogenoksider, som en spekulerer i at kan indusere deaminering i RNA. Denne forskjellen i opp-/nedregulering for cellelinjer og primære celler kan komme av cellelinjenes unormale cellyklus. I primære T-celler ble alle isoformene påvist.

Fullengdetranskriptet av isoformene 282, 308 og 309 med ekson 3 ble amplifisert med PCR. Det ble ikke funnet noen fullengdetranskripter for 282 isoformen, og dette indikerer at denne isoformen ikke uttrykkes. For 308 og 309 isoformene ble det funnet fullengdetranskripter i både cellelinjene og de primære cellene, noe som indikerer at det er disse to isoformene som blir laget i celler. Det ser ut til å være større regulering av uttrykt endo V i primære celler enn i cellelinjer.

For å se om det aktive endo V enzymet ble laget i cellene, ble det gjort aktivitetsassayforsøk. Det ble for første gang vist at både Jurkat- og THP1-cellene har aktivt endo V enzym.

I denne oppgaven ble det vist at ulike isoformer for endo V uttrykkes forskjellig i immunceller fra primære celler og cellelinjer. Dette tyder på at endo V reguleres i disse cellene. Fra denne oppgavens resultater er det fortsatt uklart hva endo V funksjonen *in vivo* er.

Innholdsfortegnelse

Forord	ii
Sammendrag	iii
Forkortelser og benevninger	vii
1. Innledning	1
1.1 <i>Fra DNA til protein</i>	1
1.2 <i>Skader i DNA og RNA</i>	2
1.3 <i>Endonuklease V</i>	3
1.4 <i>Inflamasjon</i>	4
1.5 <i>Leukocytter (hvite blodceller)</i>	4
1.5.1 <i>Polarisering av makrofager</i>	5
1.5.2 <i>Aktivering av T-celler</i>	6
1.6 <i>Cellelinjer</i>	6
1.7 <i>Hensikt med oppgaven</i>	6
2. Materialer og metoder	7
2.1 <i>Isolering av Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) fra buffy coat</i>	7
2.2 <i>Isolering av monocytter og T-celler fra PBMC</i>	7
2.3 <i>Cellepolarisering av monocytter og T-celler fra primære celler og cellelinjer</i>	8
2.4 <i>Isolering av RNA</i>	10
2.5 <i>cDNA syntese</i>	11
2.6 <i>Måling av genespresjonen av endo V med kvantitativ Real-time PCR (qPCR)</i>	12
2.7 <i>Primerdesign</i>	14
2.8 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	14
2.9 <i>PCR og agarose gelelektroforese</i>	16
2.9.1 <i>PCR</i>	16
2.9.2 <i>Separere produkter av fullengdetranskript fra PCR</i>	17
2.9.3 <i>Separasjon av qPCR produkter på agarosegel</i>	17
2.10 <i>Aktivitetsassay</i>	18
2.10.1 <i>Prosedyre for cellelysering og måling av proteinkonsentrasjonen</i>	18
2.10.2 <i>Prosedyre for aktivitetsassay og IP</i>	18
3. Resultater	20
3.1 <i>Optimalisering av metode</i>	20
3.1.1 <i>qPCR</i>	20
3.1.2 <i>Verifisering av makrofagpolarisering og T-celleaktivitet</i>	22
3.2 <i>Isoformer i de ulike celletypene</i>	24
3.3 <i>Analyse av fullengdetranskript på PCR og agarose gelelektroforese</i>	26

3.4 Aktiviteten til <i>endo V</i> i cellelinjer	28
4. Diskusjon	29
4.1 Metodevurdering	29
4.1.1 qPCR	29
4.1.2 ELISA	30
4.1.3 Aktivitetsassay	30
4.1.4 Bruk av cellelinjer	31
4.2 Genuttrykket av de ulike isoformene av <i>endo V</i>	31
4.3 Fullengdetranskript på PCR.....	33
5. Konklusjon	34
6. Referanser	35
Vedlegg	I
Vedlegg 1- Utstysliste	I
Vedlegg 2- Gener med tilhørende primere	VI
Vedlegg 3- Beregning av genuttrykk målt med qPCR	VII
Vedlegg 4- Molekylvektsmarkører	VIII

Forkortelser og benevninger

Endo V	Endonuklease V
DNA	Deoksyribonukleinsyrer
RNA	Ribonukleinsyrer
mRNA	Messenger RNA
Pre-mRNA	«precursor-mRNA»
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
UTR	Utranslaterte regioner
ADAR	«adenosine deaminases acting on RNA»
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
TNF	Tumor nekrosefaktor
M1	Pro-inflammatoriske makrofager
NO	Nitrogenoksid
IL-10	Interleukin-10
M2	Antiinflammatoriske makrofager
T-celler	T-lymfocytter
INF γ	Interferon γ
IL-4	Interleukin-4
IL-13	Interleukin-13
TRC	T-cellereseptor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
CD163	Cluster of Differentiation
miRNA	MikroRNA
RNaser	Ribonukleaser
cDNA	Komplementær DNA
qPCR	Kvantitativ real-time PCR
PCR	Polymerase kjedereaksjon

AI	Alle Isoformer
-e3	Uten ekson 3
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
BSA	Bovine Serum Albumin
BCA	Bichinchoninic acid
PHA	Phytohaemagglutinin
PBS	Phosphate-buffered saline
IP	Immunopresipitering
WR	«working reagent»
APS	Ammonium persulfat
MnCl ₂	Manganklorid
Ctrl	Kontrollcell

1. Innledning

Enzymer er proteiner som er viktige biokjemiske molekyler og har nødvendige funksjoner i biologiske prosesser. De katalyserer reaksjoner i cellen som er nødvendige for at disse skal fungere optimalt (Tymoczko, Berg, & Strayer, 2015). Endonuklease V (endo V) er et enzym som kutter fosfodiesterbindinger i nukleinsyrer ved deaminert adenosin. I *Escherichia coli* (*E. coli*) er endo V en del av reparasjonsmekanismen ved baseskader i deoksyribonukleinsyrer (DNA), i tillegg til at den kutter ved inosiner i ribonukleinsyrer (RNA). Den biologiske betydningen av RNA-aktiviteten er imidlertid ukjent. Enzymet har blitt funnet i de fleste levende organismer, men den samme funksjonen har ikke blitt observert i eukaryote organismer. Forskning har gitt god kunnskap om *in vitro* funksjonen til endo V, men *in vivo* funksjonen er fortsatt ukjent.

Databaser viser at det finnes mange spleisevarianter av endo V, men det er ukjent hvilke av disse transkriptene som danner funksjonelle proteiner. Tre transkripter har alle eksonene fra 1-8, samt varierende ekson 9-10. De danner funksjonelle proteiner med henholdsvis 282, 308 og 309 aminosyrer. Det er ukjent i hvilke celler endo V funksjonen er viktigst. Nitrogenoksid (NO) fra polariserte makrofager fremmer deaminering og man antar at endo V har en større rolle under disse forholdene. Det er også usikkert hvorvidt endo V er aktivt og om isoformene uttrykkes i ulik grad i primære celler og cellelinjer når disse utsettes for inflammasjon. I denne bacheloroppgaven ble forekomsten av isoformene 282, 308 og 309 i makrofager og T-celler fra primære celler og cellelinjer analysert på messenger RNA (mRNA) nivå.

1.1 Fra DNA til protein

DNA er kroppens arvemateriale og er lineære polymere med nukleotider som monomere. Her lagres den genetiske informasjonen, som må oversettes til RNA, før proteiner kan dannes. RNA er i likhet med DNA et polynukleotid bygget opp av lange kjeder av sukker og fosfat, som bindes sammen med fosfodiesterbindinger. Fire ulike baser binder seg til sukkermolekylene og disse er adenin (A), guanin (G), cytosin (C) og uracil (U). RNA molekyler er vanligvis enkeltrådede, men de kan også folde seg med seg selv og danne dobbeltrådede regioner (Clark & Pazdernik, 2012). Under transkripsjonen dannes både kodende og ikke-kodende RNA molekyler, der mRNA inneholder den kodende

informasjonen som overføres ved proteinsyntese. Før det dannes modent mRNA i eukaryote organismer uten introner og utranslaterte regioner (UTR), gjennomgår «precursor-mRNA» (pre-mRNA) spleising, der disse fjernes. Det foregår også alternativ spleising, som gir opphav til ulike isoformer av proteiner ved at eksoner settes sammen på ulike måter. Alternativ spleising kan foregå på ulike måter, som «exon skipping» der eksoner fjernes sammen med introner og UTR, eller alternativ seteseleksjon der deler av eksonene fjernes sammen med intronene. Dette bestemmer hvilke proteiner som dannes og dets funksjon. Et gen i DNA kan dermed kode for flere proteiner. Proteiner syntetiseres i henhold til informasjonen fra mRNA (Brown, 2018).

1.2 Skader i DNA og RNA

Genomet er all DNA i en celle. DNA vil med tiden endre seg for å tilpasse seg omgivelsene når det skjer små sekvensalterasjoner fra mutasjoner, som er endringer i nukleotidsekvensen i en kort region av genomet. Mutasjoner kan oppstå som følge av endogene og eksogene faktorer og kan føre til endringer i baserekkefølgen i nukleinsyrene slik at et gen koder for et endret protein, et ufunksjonelt protein og som kan føre til celledød. Dette kan føre til sykdommer som for eksempel kreft (Brown, 2018).

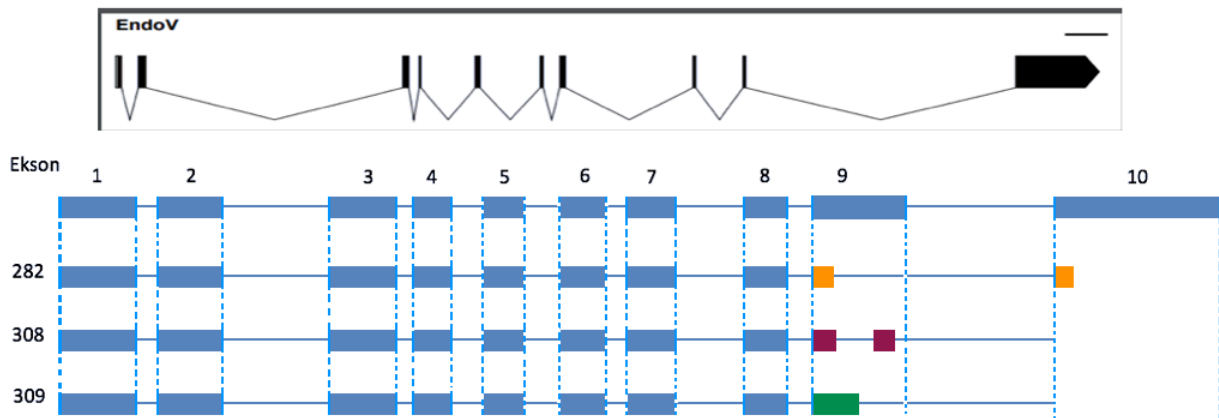
Noen mutasjoner oppstår spontant i cellen grunnet replikasjons- og transkripsjonsfeil, eller ved dannelsen av mutagene forbindelser, som nitritt fra salpetersyring eller deaminerende forbindelser. Disse forbindelsene konverterer aminogruppen i adenosin til en ketogruppe og fører til for eksempel deaminering av adenosin til inosin i DNA og RNA. Denne deamineringen kan også skje enzymatisk i RNA og katalyseres av enzymer som «adenosine deaminases acting on RNA» (ADAR). Inosin har andre baseparingsegenskaper enn adenosin og baseparer med cytosin. I RNA blir dette ansett som en normal og nødvendig hendelse av regulatorisk betydning, mens i DNA er dette regnet som en skade nettopp på grunn av at basene parer seg feil der det dannes en G:C mutasjon ved replikasjon (Vik, et al., 2013). Cellen har ulike reparasjonsmekanismer for baseskader i DNA. For eksempel repareres deaminering ved reparasjonsmekanismen baseeksisjonsreparasjon (BER) (Brown, 2018).

1.3 Endonuklease V

Endo V ble først funnet i *E. coli* i 1977 og er den femte endonukleasen som ble funnet (Linn & Gates, 1977). Endo Vs homologe gener har, ved hjelp av DNA-sekvensering og analyser av proteinet, blitt funnet i omtrent alle levende organismer, som i andre bakterieceller, men også i eukaryote celler som humane celler (Cao, 2012). Dette gir en indikasjon på at proteinet er godt bevart under evolusjonen og at det har en viktig rolle i cellen (Fladeby, et al., 2012).

Forskningsgrupper har tidligere gjort mange studier på endo V *in vitro* og det har blitt funnet at ekson 3 gir den enzymatiske aktiviteten. Dette gir den en sentral rolle for reparasjon av deaminerte baser i DNA i *E. coli*, der adenin deamineres til hypoxantin og kan føre til mutasjoner. Endo V gjør dette ved å binde seg til og kutte ved Mg^{2+} av den andre fosfodiesterbindingen på 3' enden av hypoxantin og genererer en 5'-OH og en 3'-P terminal. Det er ukjent hvordan baseskaden fjernes da endo V ikke gjør dette selv (Fladeby, et al., 2012) og (Yao, Hatahet, Melamede, & Kow, 1994). I tillegg til å kutte deaminerte baser i *E. coli* DNA, kutter endo V ved inosiner i både enkeltrådet og dobbeltrådet RNA. Deaminering i RNA blir imidlertid ikke sett på som en skade i *E. coli*, men induseres av enzymer. Endo V kan opprettholde nivået av deaminering (Vik, et al., 2013).

Det finnes et ortologt gen av endo V i humane celler, der det har blitt funnet at human endo V befinner seg i cytoplasma og i cellekjernen, men at enzymet ikke kutter i DNA slik som i *E. coli* (Fladeby, et al., 2012). I likhet med i *E. coli*, kutter også human endo V ved inosiner i RNA. Forskjellen er at human endo V kun kutter inosiner i enkeltrådet RNA (Vik, et al., 2013). Det dannes ulike spleiseprodukter ved modning av mRNA. Databaser viser at det finnes mange spleisevarianter for human endo V, men det er ukjent hvilke av disse transkriptene som faktisk danner funksjonelle proteiner. Mange av disse transkriptene mangler ulike eksoner ved «exon skipping», som for eksempel når ekson 3 fjernes sammen med introner og UTR. Det er kun tre transkripter som har alle eksonene fra 1 til 8, de har ulike lengder på ekson 9. Dette er isoformene 282, 308 og 309, som har fått navnene sine etter antall aminosyrer de består av. Forskjellen på disse isoformene ligger i 3' enden, der 282 har et kort ekson 9 og et kort ekson 10, 308 isoformen har et kort ekson 9 og ekson 9b, og 309 isoformen har et langt ekson 9 (figur 1-1) (Fladeby, et al., 2012).



Figur 1-1: **Oversikt over spleiseprodukter.** Endo V danner ulike spleiseprodukter på mRNA- nivå som danner de ulike isoformene. Her er sammensetningen av isoformene 282, 308 og 309 vist. Disse isoformene har ulike lengder på ekson 9, der 282 har en kort ekson 9 og et kort ekson 10, 308 har et kort ekson 9 og ekson 9b, og 309 har et langt ekson 9.

1.4 Inflammasjon

Inflammasjon er en del av kroppens immunforsvar, og forekommer dersom en får en infeksjon, et sår eller andre skader på kroppens organer og vev. Ved inflammasjon er flere av kroppens immunceller involvert, blant annet to viktige immunceller; makrofager og T-celler. Ved en infeksjon eller skade vil disse skille ut forskjellige signalmolekyler som ulike cytokiner og nitrogenoksider (NO), og kan også ødelegge patogenene som er involvert (InformedHealth.org, 2010).

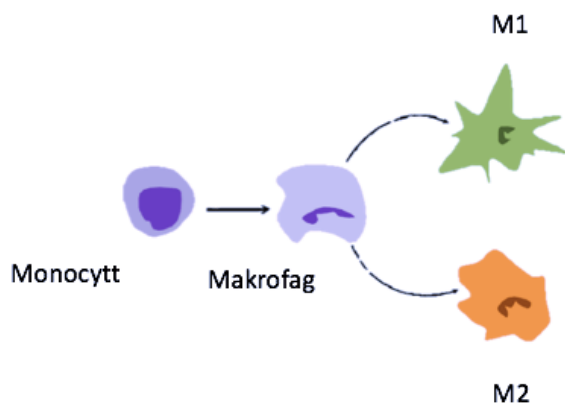
1.5 Leukocytter (hvite blodceller)

Monocytter sirkulerer i kroppens blodårer. Disse cellene er en del av immunforsvaret og er forløpere til makrofager og dendritiske celler. Makrofager er det første forsvaret som interagerer med patogener i kroppen og det finnes et stort antall i flere typer vev. Dersom kroppen får en infeksjon vil monocyttene migrere til det infiserte området og modnes til aktivt fagocytterende makrofager. Dette er celler som kan fagocyttere fremmede mikroorganismer, som vil si at de spiser opp og ødelegger disse organismene. Ved en infeksjon vil makrofagene i det infiserte området produsere pro-inflammatoriske cytokiner som interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) og tumor nekrosefaktor α (TNF α), heretter kalt TNF. De kalles da pro-inflammatoriske makrofager (M1). Patogenene vil ødelegges og mangelen på patogen stimulans vil føre til at inflammasjonen går ned. M1 makrofager produserer også nitrogenoksider (NO). Dette er en gass som kan føre til uønsket deaminering

i RNA (Alseth, Dalhus, & Bjørås, 2014). Makrofager som skiller ut anti-inflammatoriske cytokiner som interleukin-10 (IL-10) kalles anti-inflammatoriske makrofager (M2). En annen type leukocyt er T-lymfocytter (T-celler). De produseres i benmargen fra stamceller og modnes i thymus. Disse inngår i det adaptive immunforsvaret og er avhengig av å få antigener presentert fra f.eks. makrofager for å gjøre jobben sin. Når en T-celle får et antigen presentert starter cellen å kopiere seg og danner mange kloner, alle med samme reaktivitet til det samme antigenet. Den andre gangen disse cellene eller klonene av den originale cellen møter antigenet de er spesialisert mot, settes det i gang en sekundær adaptiv immunrespons. Da vil cellene raskt finne og ødelegge det aktuelle patogenet (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2015).

1.5.1 Polarisering av makrofager

Makrofager er dynamiske celler som kan utvikle seg og spesialisere seg basert på miljørelaterte signaler. Ved riktig stimulans vil monocytter differensiere til makrofager, og videre polariseres til M1 eller M2 (figur 1-2). T-hjelpeceller produserer cytokiner som vil aktivere hvilende makrofager til pro-inflammatoriske celler med interferon γ (IFN γ). I tillegg stimuleres de med lipopolysaccharide (LPS). T-hjelpecellene vil også produsere cytokiner som vil aktivere hvilende makrofager til anti-inflammatoriske celler, med interleukin-4 (IL-4) og interleukin-13 (IL-13). Dette er en del av et friskt og oppegående immunforsvar. På laboratoriet kan dette gjøres kunstig ved å tilsette de samme cytokinene til cellene (Meijer, et al., 2015).



Figur 1-2: *Cellepolarisering av monocytter*. Monocytter differensieres til hvilende makrofager, som videre polariseres til pro- eller anti-inflammatoriske celler (M1 og M2).

1.5.2 Aktivisering av T-celler

T-celler kan aktiveres ved at T-cellereseptorene (TCR) får bundet til seg et antigen. På laboratoriet kan det å stimulere de med phytohemagglutinin (PHA) føre til at de aktiveres. Dette lektinet vil binde seg til TCR og føre til at cellen aktiveres. Den vil da starte celledeling og kopiere seg opp (InvivoGen, u.å) og (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2015).

1.6 Cellelinjer

En cellelinje er en udødeliggjort dyre- eller plantecelle som dyrkes i cellekulturer. Med riktig tilgang på medie, næring, plass og andre forhold vil disse cellene dele seg ubegrenset. På grunn av sin evne til ubegrenset deling benyttes disse ofte i forskning (Fossum, 2018). THP1 er en slik type cellelinje. THP1 stammer fra en spontant udødeliggjort, monocytliknende cellelinje funnet hos et barn med monocytisk leukemi. Disse brukes i stor grad for å studere monocytters strukturer og funksjon (Bosshart & Heinzelmann, 2016). På lik linje med THP1 har Jurkat cellelinje kommet fra blodcellene til et barn med T-celleleukemi. Jurkat er udødelige T-lymfocytter, som brukes i forskning for å studere T-celler nærmere *in vitro* (Molecular Devices, 2019).

1.7 Hensikt med oppgaven

Databaser viser at det finnes mange spleisevarianter for human endo V, men det er ukjent hvilke av disse transkriptene som danner funksjonelle proteiner. Tre transkripter har blitt funnet som translateres til fullengde proteiner. Dette er isoformene kalt 282, 308 og 309 etter antall aminosyrer de består av.

For å få en bedre forståelse for *in vivo* funksjonen til human endo V, ble det i denne oppgaven gjort en analyse av isoformene 282, 308 og 309 i polariserte og aktiverte immunceller fra henholdsvis primære celler og cellelinjer. Cellene som skal studeres er primære monocytter, primære T-celler, Jurkat cellelinje og THP1 cellelinje. Det skal også gjøres en studie av fullengdetranskriptet av human endo V for de tre isoformene i de samme cellene. Videre skal aktiviteten til enzymet isolert fra cellelinjene analyseres.

2. Materialer og metoder

2.1. Isolering av Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) fra buffy coat

PBMC er blodceller med rund cellekjerne, f.eks. lymfocytter, monocytter og makrofager. Blodceller av denne typen er viktige i immunsystemet for å bekjempe ulike infeksjoner (Pourahmad & Salimi, 2015). PBMC kan isoleres fra buffy coat. Buffy coat separeres fra fullblod hos Blodbanken ved å sentrifugere blodet uten tetthetsgradient. Denne sentrifugeringen konsentrerer røde blodceller på bunnen og plasmaen på toppen. Det sjiktet som ligger mellom disse to kalles buffy coat og består hovedsakelig av leukocytter (Ruotsalo, 2019).

Det ble isolert PBMC fra buffy coat som videre skulle isoleres til monocytter eller T-celler for polarisering, aktivering og måling av genuttrykket. Utstyr og kjemikalier til prosedyren er gitt i vedlegg 1 punkt 1a. Buffy coat ble åpnet med en skalpell og overført til en 100 mL flaske. Det ble tilsatt opp til 50 mL natriumkloridløsning (NaCl), noe som ga et 1:1 forhold med blod og NaCl. Til fire rør ble det tilsatt 25 mL buffy coat med NaCl. Til dette ble det tilsatt 13 mL lymfoprep i bunnen av hvert rør. Rørene ble sentrifugert ved romtemperatur i 30 minutter og 1600 rpm uten akselerasjon. Laget med mononukleære celler ble tatt av og tilsatt et nytt 50 mL rør. Røret ble sentrifugert ved 1800 rpm i 15 minutter med full akselerasjon. Det ble tilsatt 1-2 mL RPMI til røret for vasking av cellene og reløsning av pelleten. Det ble deretter tilsatt 20 mL RPMI og dette ble mikset med pipette. Røret ble sentrifugert ved 1800 rpm i ti minutter og full akselerasjon. Laget med RPMI ble forkastet. Denne vaskingen ble gjort to til tre ganger. Pelleten med PBMC ble benyttet videre for å isolere monocytter, eller T-celler.

2.2 Isolering av monocytter og T-celler fra PBMC

For å isolere celler fra PBMC kan en, avhengig av hvilken type celle en skal isolere, bruke positiv eller negativ immunomagnetisk celleseparasjon. Ved positiv immunomagnetisk celleseparasjon merkes de ønskede cellene med antistoff og magnetiske kuler. De uønskede cellene kan da vaskes vekk og en sitter igjen med de interessante cellene. Ved negativ immunomagnetisk celleseparasjon merkes de uønskede cellene med magnetiske kuler og

trekkes ut. Monocyttar isoleres ved positiv celleseparasjon og T-celler isoleres ved negativ celleseparasjon (Stemcell Technologies, 2019).

Utstyr og kjemikalier til prosedyren er gitt i vedlegg 1 punkt 1b. Det ble isolert monocyttar og T-celler som skulle polariseres eller aktiveres, før RNA skulle isoleres og genuttrykket av endoV måles. Disse ble isolert fra PBMC. Cellene ble mikroskopert for å finne antall levende celler. Det ble funnet at det var omtrent $2 \cdot 10^7$ celler totalt.

For å isolere monocyttar ble cellene, etter mikroskoperingen, sentrifugert på 300 g i ti minutter. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i 160 μ L buffer. Det ble tilsatt 40 μ L CD14 MicroBeads. Løsningen ble ristet godt og inkubert i 15 minutter i 2-8 °C, i kjøleskap. Cellene ble vasket med 2 mL buffer og sentrifugert på 300 g i ti minutter og supernatanten ble forkastet. Cellene ble resuspendert i 500 μ L buffer, før de ble separert på autoMACS™ Separator.

For å isolere T-celler ble cellepelleten, etter mikroskoperingen, resuspendert i 80 μ L buffer. Det ble tilsatt 20 μ L Pan T Cell Biotin-Antibody Cocktail. Dette ble ristet og inkubert i fem minutter i 2-8 °C, i kjøleskap. Det ble tilsatt 60 μ L buffer og deretter 40 μ L Pan T Cell MicroBead Cocktail. Dette ble godt blandet, før det inkuberte i ti minutter i kjøleskapet ved 2-8 °C. T-cellene ble separert på autoMACS™ Separator.

2.3 Cellepolarisering av monocyttar og T-celler fra primære celler og cellelinjer

Monocyttar fra primære celler og THP1- celler differensieres til makrofager, som polariseres til enten M1 eller M2. THP1-cellelinjene differensieres til makrofager ved stimulering med phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) i seks timer. Makrofagene blir polariserte til M1 makrofager ved LPS og IFN γ stimulering. Til M2 ble makrofagene stimulert med IL-4 og IL-13. Pro-inflammatoriske celler skiller ut blant annet TNF, og anti-inflammatoriske celler skiller blant annet ut IL-10 og Cluster of Differentiation (CD163), som kan brukes som markører og detekteres i cellemediet for å verifisere at polariseringen har vært vellykket. T-celler fra primære celler og Jurkat cellelinjer kan aktiveres ved stimulering med PHA. Aktiverte T-celler skiller blant annet ut IL-2, som kan brukes som markør og kan detekteres i cellemediet for å verifisere at cellene har blitt aktiverte.

Utstyr og kjemikalier til prosedyren er gitt i vedlegg 1 punkt 1c. THP1-cellene ble grodd opp i 12-brønners plater og ble platet ut med en million celler per brønn ved 37 °C med 5% CO₂. For differensiering til makrofager ble de inkubert med PMA (100 nM) i seks timer. Deretter ble cellene inkubert med 10 ng/mL LPS og 5 ng/mL IFN γ for å polarisere de til pro-inflammatoriske M1 makrofager. De anti-inflammatoriske M2 makrofagene ble polariserte ved stimulering med 25 ng/mL IL-4 og 25 ng/mL IL-13. Cellene ble høstet etter 24 timer, der de ble overført til eppendorfrør etter skraping og sentrifugert ved 500 g i fem minutter. Markørene TNF, IL-10 og CD163 ble analysert i mediet. Jurkat-cellene og de primære T-cellene ble sådd ut i seks brønners plater. Det ble tilsatt 3 μ g/mL PHA til Jurkat-cellene og 2 μ g/mL PHA til T-cellene, før de inkuberte i 24 timer i 37 °C med 5% CO₂. De ble deretter høstet og markørene ble analysert i mediet.

2.4 Isolering av RNA

For isolering av total RNA kan miRNeasy mini kit benyttes, der RNA fra 18 nukleotider (nt) og større lar seg isolere. Dette kan være mikroRNA (miRNA) og andre korte RNA-molekyler. Cellene lyses slik at intracellulært RNA frigjøres og kan adskilles fra andre molekyler som DNA og proteiner. Lyseringen gjøres ved hjelp av en lyseringsreagent bestående av fenol og guanidin tiocyanat. Denne kan lysere vev, inhibere ribonukleaser (RNaser), samt fjerne ekstracellulært DNA og proteiner ved å påsette prøvene på en silikamembran i en spinnkolonne. Her vaskes prøvene gjennom flere vasketrinn, før rent RNA elueres (Qiagen, 2019). Når RNA har blitt isolert kan konsentrasjonen måles på NanoDrop for kvantifisering.

Utstyr og kjemikalier til prosedyren er gitt i vedlegg 1 punkt 1d. Primære monocytter og T-celler ble isolert fra PBMC. De primære cellene og cellelinjene ble så polarisert til M1 og M2, eller aktivert, før de ble overført til eppendorfrør og tilsatt 700 μ L QIAzol Lysis reagens. Prøvene ble inkubert ved romtemperatur i fem minutter, før det ble pipettert opp og ned for homogenisering. Prøvene ble deretter tilsatt 140 μ L kloroform, ristet godt for hånd og inkuberte ved romtemperatur i to til tre minutter. Prøvene ble sentrifugert i 15 minutter ved 12 000 g og 4°C. Det vandige sjiktet ble overført til 2 mL oppsamlingsrør. Det ble tilsatt 1,5 ganger volumet av vannfasen med 90-100% etanol. Dette ble blandet godt ved bruk av pipette. 700 μ L av prøvene ble satt på RNeasy spinnkolonne og sentrifugert ved 8000 g i 15 sekunder. Dette ble gjentatt dersom det var mer enn 700 μ L prøve og etanol. Det ble laget en DNase I-miks med 10 μ L DNase I stock-løsning og 70 μ L Buffer RDD per prøve, hvor 80 μ L av denne løsningen ble satt på membranen av hver spinnkolonne. Dette ble inkubert ved romtemperatur i 15 minutter. Vaskingen startet med at det ble tilsatt 350 μ L Buffer RWT og kolonnene ble sentrifugert i 15 sekunder ved 8000 g. Deretter ble 700 μ L Buffer RWT tilsatt og prøvene ble igjen sentrifugert i 15 sekunder ved 8000 g. 500 μ L Buffer RPE ble tilsatt og sentrifugert i 15 sekunder ved 8000 g. Det ble deretter tilsatt nye 500 μ L med Buffer RPE og prøvene ble sentrifugert ved 8000 g i to minutter. For å tørke membranen ytterligere ble kolonnene sentrifugert ved 12 000 g i ett minutt. RNA ble eluert med 30 μ L RNasefritt vann og ett minutt sentrifugering ved 8000 g. Konsentrasjonen av RNA ble målt på NanoDrop spektrofotometer.

Det ble også benyttet Qiagen RNeasy mini kit for isolering av total RNA. Cellesuspensjonen ble tilsatt 350 μL RLT lysis buffer. Cellene ble deretter skrapet av platen slik at ingen celler ble sittende igjen. Dette ble kontrollert ved mikroskopering. Det ble tilsatt 350 μL 70 % etanol, som ble homogenisert med prøvene ved å pipettere opp og ned. 700 μL av hver prøve ble satt på en spinnkolonne og de ble spunnet på 8000 g i 15 sekunder i romtemperatur. Dersom det var mer prøve, ble dette tilsatt og det ble spunnet på nytt. Det ble tilsatt 700 μL Buffer RW1 for vasking og prøvene ble spunnet ved 8000 g i 15 sekunder. Det ble laget Dnase I løsning med 70 μL Buffer RDD og 10 μL Dnase I per prøve. Det ble tilsatt 80 μL av denne blandingen til midten av membranen i kolonnen for hver prøve. Prøvene ble inkubert ved romtemperatur i 15 minutter. For vasking ble det tilsatt 350 μL Buffer RW1, før prøvene ble sentrifugert ved 8000 g i 15 sekunder. Et nytt og rent oppsamlingsrør ble påsatt hver kolonne og prøvene ble tilsatt 500 μL Buffer RPE løst i etanol. Prøvene ble sentrifugert ved 8000 g i 15 sekunder. Det ble tilsatt 500 μL Buffer RPE og prøvene ble sentrifugert ved 8000 g i to minutter. RNA ble eluert med 50 μL RNasefritt vann og sentrifugert ved 8000 g i ett minutt.

2.5 cDNA syntese

De kodende delene av eukaryote gener separeres av introner, noe som blant annet gjør gensekvensene lange og vanskelige å manipulere. I mRNA er intronene fjernet og ved hjelp av revers transkriptase kan mRNA, isolert fra cellen, konverteres tilbake til komplementær DNA (cDNA). Revers transkriptase er et enzym funnet i retrovirus som konverterer RNA til dobbeltrådet cDNA (Clark & Pazdernik, 2012). Dette kan gjøres ved hjelp av qScript cDNA SuperMix, et kit som inneholder en supermiks med qScript revers transkriptase, buffer, dNTPer, MgCl_2 , RNase inhiberende protein, en blanding med oligonukleotider og tilfeldige primere og stabilisatorer. Det benyttes en PCR varmeblokk for at syntesen skal kunne foregå ved spesifikke temperaturer.

Utstyr og kjemikalier til prosedyren er gitt i vedlegg 1 punkt 1e. Isolert og kvantifisert RNA av ulike volumer ble tilsatt i PCR rør sammen med 4 μL qScript cDNA SuperMix og RNasefritt vann slik at sluttkonsentrasjonen ble 50 ng/ μL for hver av prøvene. Deretter ble cDNA syntetisert ved amplifikasjon på PCR. Betingelsene for PCR-reaksjonen med tanke på temperatur ($^{\circ}\text{C}$) og tid (minutter) per trinn er gitt i tabell 2-1.

Tabell 2-1: *Temperaturprogram for cDNA syntese på PCR. Betingelser for de ulike trinnene i PCR reaksjonen i forhold til temperatur gitt i °C og tid gitt i minutter for cDNA syntesen.*

Trinn	Tid (min)	Temperatur (°C)
1	5	25
2	30	42
3	5	85
4	∞	4

2.6 Måling av genekspresjonen av endo V med kvantitativ Real-time PCR (qPCR)

Polymerase kjedereaksjon (PCR) går ut på å kopiere opp en bestemt målsekvens fra et bestemt mål-DNA isolert fra ulike celler, der mRNA isoleres fra cellene og benyttes til å syntetisere cDNA som benyttes i PCR reaksjonen. DNAet som syntetiseres benyttes som templat for å produsere nye DNA-tråder, altså en kjedereaksjon. En forward primer som er komplementær med 5'enden av mål-DNA og en revers primer som er komplementær med 3'enden av mål-DNA er nødvendige for å starte DNA syntesen. Det er også behov for DNA polymerase og dNTPer i syntesen. Ulike primere har forskjellige operasjonelle temperaturer og primernes spesifisitet vil være forskjellig avhengig av temperaturer, nukleotider og polymeraser. DNA-tråden denatureres ved 95 °C og primerne hybridiserer til hver sin flanke av mål-DNA under annealingen ved 50-60 °C. Deretter fortsetter polymeriseringen ved 70 °C. Disse trinnene går i omtrent 30-40 sykluser. I real-time PCR skjer en kontinuerlig måling av nysyntetisert DNA ved hjelp av fluorescerende merkede prober som tilsettes reaksjonsmiksen. Etter hver som trinnene har blitt repetert vil mengden dobbeltrådet DNA øke, som proben kan feste seg på (Clark & Pazdernik, 2012). Ved punktet der PCR reaksjonen er mest effektiv og fluorescenskurven er brattest settes grenseverdien, Th. C_T verdien er den syklusen reaksjonen er i når fluorescenssignalet passerer grenseverdien. C_T verdien for det aktuelle genet relateres til C_T verdien til referansegenet (Livak & Schmittgen, 2001). Det relative genuttrykket kan deretter beregnes. I denne oppgaven er alle beregningene gjort som i eksempelet i vedlegg 3 og med likningene gitt i dette vedlegget.

I denne oppgaven benyttes qPCR for å påvise forekomsten av isoformene 282, 308 og 309 av endo V, alle isoformene (AI) og endo V uten ekson 3 (-e3) i forskjellige typer celler, derav makrofager, pro- og anti-inflammatoriske celler og T-celler. I tillegg ble det utført en smeltepunktanalyse, der renheten til produktet ble analysert vha. en smeltepunktskurve.

Utstyr og kjemikalier til prosedyren er gitt i vedlegg 1 punkt 1f. Ved bruk av SYBR Green FastMix ROX med tilhørende temperaturprogram (tabell 2-2) ble det tilsatt 10 µL Fastmix, 0,25 µL av hver primer og 7 µL vann per prøve til 2,5 µL cDNA. Fordi hver prøve skulle ha en duplikat ble det tilsatt dobbel mengde til prøvebrønnene, blandet godt med pipette og halvparten ble overført til nye brønner. Prøvene ble satt på 96-brønners PCR-plate og kjørt med tilhørende temperaturprogram i qPCR-maskinen.

Tabell 2-2: *Temperaturprogram for SYBR Geen FastMix ROX 5000 Reactions. Temperaturen er gitt i °C og varigheten i hvert trinn er gitt i minutter og sekunder.*

Trinn	Temperatur (°C)	Varighet (min:sek)
Oppvarming	95	3:00
Denaturering	95	0:15
Annealing	60	1:00

Ved bruk av temperaturprogrammet tilhørende PowerUp SYBR Green Master Mix (tabell 2-3) ble det tilsatt 4 µL av SYBR Green-løsningen, 0,033 µL av hver primer og 4,8 µL vann per prøve til 1 µL cDNA. Hver prøve har en duplikat, så dobbel mengde ble tilsatt, blandet godt med pipette og halvparten ble overført til nye brønner.

Tabell 2-3: *Temperaturprogram for PowerUp SYBR Green Master Mix. Temperaturen er gitt i °C og varigheten i hvert trinn er gitt i minutter og sekunder.*

Trinn	Temperatur (°C)	Varighet (min:sek)
Oppvarming	95	10:00
Denaturering	95	0:15
Annealing	60	1:00

2.7 Primerdesign

Primere er korte enkeltrådede DNA molekyler som er komplementære til mål-DNA sekvensen som skal kopieres opp i en PCR reaksjon og de er nødvendige for at DNA polymerase skal starte PCR reaksjonen. Her trengs både en forward primer som er komplementær med starten av genet og en revers primer som er komplementær til slutten av genet. Disse primerne annealer til hver sin side av målsekvensen til et denaturert DNA templat. Det er viktig at primere designes riktig, eller at det brukes riktige primere for at PCR reaksjonen skal være vellykket (Clark & Pazdernik, 2012). For å lage de ulike primersekvensene ble Genome Browseren BLAST benyttet.

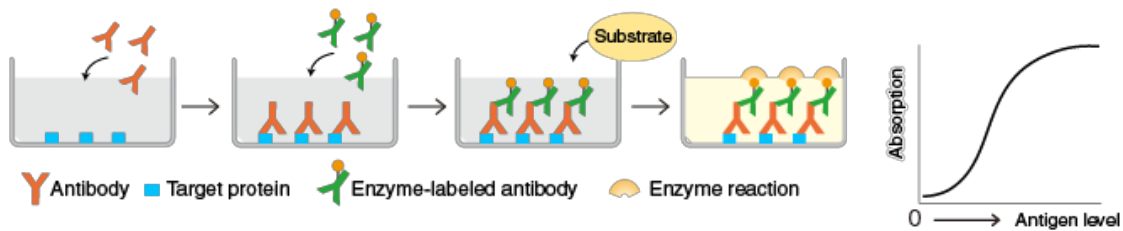
På PCR eller qPCR ble genuttrykket av isoformene 282, 308 og 309 av endo V målt, i tillegg AI og -e3. Det ble laget to forward primere som var felles for alle formene av endo V til optimaliseringen av qPCR, samt en forward primer til -e3 (tabell 1 i vedlegg 2). Revers primerne ble laget til å være spesifikke for hver enkelt isoform. Dette tok utgangspunkt i figur 1-1 i kapittel 1.3, som viser de ulike ekson kombinasjonene som danner de ulike isoformene. Det ble laget to revers primere for hver isoform til optimaliseringen av qPCR (tabell 1 i vedlegg 2). For å sikre at primerne kun amplifiserte ett produkt på qPCR ble det gjort en smeltepunktsanalyse.

Stamløsninger for hver av primerne ble laget ved å tilsette ulike mengder MQ-vann til hvert av rørene til konsentrasjonen ble 100 mM. Det ble så laget arbeidsløsninger for bruk i real-time PCR og PCR, der konsentrasjonen var 30 mM.

2.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA er en teknikk som baserer seg på flere antistoff som settes sammen med proteinet som måles, som en sandwich og fører til en nøyaktig måling av analytter i biologiske væsker (R&D systems, u.å). Et primært antistoff bindes til mikrobørnplaten og er spesifikt til proteinet. Dette danner den faste fasen. Antistoff som ikke bindes til platen vaskes bort med vaskebuffer og en blokkerende buffer tilsettes platen. Proteinene, standardene og kontroller fester seg til antistoffet. Det tilsettes deretter et sekundært antistoff som er et biotin konjugert detekteringsantistoff og som bindes til et annet bindingssete på proteinet, standarden eller kontrollen. Det tilsettes så et deteksjonsreagens, som i dette tilfellet er Streptavidin-HRP.

Streptavidin-HRP binder seg til biotin på detekteringsantistoffet. En substratløsning tilsettes og konverteres av HRP enzymet til et blått fargekompleks. Fargereaksjonen stoppes ved tilsetning av en stoppløsning og intensiteten til fargen kan måles ved å måle den optiske tettheten spektrofotometrisk ved 450 nm (figur 2-1) (R&D Systems , u.å).



Figur 2-1: **Prinsippet for ELSIA.** Trinnene og prinsippet med ELISA, der Capture Antibody, analytt/standard/kontroll og detekteringsantistoff danner en sandwich-liknende struktur (MBL Life science, 2017).

Utstyr og kjemikalier til prosedyren er gitt i vedlegg 1 punkt 1g. ELISA forsøkene ble utført i henhold til DuoSet ELISA Development protokollene tilhørende hvert enkelt kit, ut fra hvilke markører som ble analysert. Det ble utført ELISA på IL-2, TNF og IL-10 markører i 96-brønners plater. Alle reagenser i forsøkene ble laget til arbeidsløsninger i henhold til hvert enkelt kit. Alle brønnene ble forberedt med 100 μ L Capture Antibody i Phosphate-buffered saline (PBS) uten bæreprotein og platen inkuberte i romtemperatur over natten. Platene ble vasket i en automatvasker, der hver brønn ble vasket tre ganger med 300 μ L vaskebuffer. Platene ble deretter blokkert ved å tilsette 300 μ L Block Buffer til hver brønn. Platen inkuberte ved romtemperatur i en time, før den ble vasket som beskrevet over. Assayet startet med å tilsette 100 μ L prøve eller standard i Reagent Diluent per brønn. Platen inkuberte ved romtemperatur i to timer. Platene ble vasket som beskrevet over. Det ble tilsatt 100 μ L Detection Antibody til hver brønn og platen inkuberte i romtemperatur i to timer. Platen ble vasket som beskrevet over. Det ble tilsatt 100 μ L Streptavidin-HRP til hver brønn og platen ble inkubert mørkt, ved romtemperatur i 20 minutter. Det ble tilsatt 100 μ L Substrate Solution til hver brønn og platen inkuberte mørkt i 20 minutter ved romtemperatur til det ble observert en blå farge. Det ble tilsatt 50 μ L Stop Solution til hver brønn og platen ble knipset forsiktig for å sikre god blanding. Den optiske tettheten ble målt spektrofotometrisk ved 450 nm og med bakgrunnsstøy mål ved 540 nm.

2.9 PCR og agarose gelelektroforese

PCR brukes for å amplifisere DNA-sekvenser til en rekke forskjellige analyser. PCR utføres på samme måte som qPCR (ref. kap. 2.6) med denaturering, annealing og polymerisering, og med primere som binder seg opp- og nedstrøms fra målgenet. Forskjellen er at PCR gir mulighet til amplifikasjon av lengre transkripter (Brown, 2018), (Clark & Pazdernik, 2012).

Agarose gelelektroforese benyttes for å sjekke størrelsen på fragmentene amplifisert i PCR-reaksjonen. Prøvene settes til en agarosegel og gelen påsettes en spenning. Fordi DNA er negativt ladet vil fragmentene bevege seg fra katoden (negativ pol) til anoden (positiv pol). Vandringshastigheten avhenger av fragmentenes størrelse, spenningen over gelen og konsentrasjon av gelmaterialet samt porestørrelse. Mindre fragmenter møter mindre motstand og vandrer lettere gjennom gelen. En molekylvektsmarkør med fragmenter av kjent størrelse settes til gelen sammen med prøvene. En kan da sammenlikne prøvefragmentene med molekylvektsmarkøren og på den måten bestemme fragmentenes størrelse (Universitetet i Oslo, 2011).

2.9.1 PCR

Utstyr og kjemikalier til prosedyren er gitt i vedlegg 1 punkt 1h. Det ble valgt ut en kontroll, en M1 og en M2 av de primære monocyttene og THP1-cellene, en kontroll og en PHA-stimulert fra Jurkat-cellene og en prøve fra de primære T-cellene for å se på fullengdetranskriptet av endo V. 5 μ L cDNA fra prøvene som skulle amplifiseres på PCR ble tilsatt mastermiks bestående av 12,5 μ L GoTaq Green Mix, 5 μ L MQ-vann og 1,25 μ L forward og revers primer for hver av genene, per prøve. Prøvene ble kjørt på PCR med temperaturprogram gitt i tabell 2-4 der trinnene som er uthevet ble gjentatt 35 ganger.

Tabell 2-4: *Temperaturprogram til PCR. Betingelser for temperatur gitt i °C og tid gitt i minutter, der de uthevede trinnene ble gjentatt 35 ganger på PCR maskinen.*

Temperatur (°C)	Tid
94°C	3 min
94°C	30 sek
55°C	30 sek
72°C	30 sek
72°C	5 min
4°C	∞

2.9.2 Separere produkter av fullengdetranskript fra PCR

Utstyr og kjemikalier til prosedyren er gitt i vedlegg 1 punkt 1h. PCR-produktene ble separert på 1,5% agarosegel. For å lage denne gelen ble det veid inn 0,75 g ultra pure agarose til en erlenmeyerkolbe og fylt opp med 50 mL 1xTAE-buffer. Dette ble varmet opp i mikrobølgeovn til agarosen var fullstendig løst i bufferen. Deretter ble løsningen kjølt ned til 40-50°C og tilsatt 1,5 µL SYBR Safe. Gelene ble dekket med aluminiumsfolie mens de størknet. Prøvene ble satt på gelene sammen med molekylvektsmarkøren (figur 1 i vedlegg 4) og påsatt en spenning på 200 V i 30 minutter. Gelene var dekket med aluminiumsfolie under hele separasjonen. Gelen ble deretter skannet.

2.9.3 Separasjon av qPCR produkter på agarosegel

Utstyr og kjemikalier til prosedyren er gitt i vedlegg 1 punkt 1h. Det ble veid inn 4 g ultra pure agarose til en erlenmeyerkolbe og fylt opp til 100 mL med 1xTAE- buffer. Innholdet ble varmet opp i mikrobølgeovn til agarosen var løst i bufferen. Løsningen ble kjølt ned til rundt 40-50 °C og tilsatt 3 µL SYBR Safe før den ble overført til støpeformen. Gelen ble dekket med aluminiumsfolie til den var størknet. Prøvene ble tilsatt 10 µL 6x DNA loading dye og satt på gelen, i tillegg til molekylvektsmarkøren (figur 2 i vedlegg 4) og elektroforesen ble utført ved 200 V i 30 minutter. Gelen ble deretter skannet.

2.10 Aktivitetsassay

Aktivitetsassay brukes for å se om et protein har enzymatisk aktivitet. Det brukes et radioaktivt merket substrat som man vet enzymet vil kutte i. Substratet brukt til endo V er i dette tilfellet enkelttrådet RNA med deaminerte adenosiner, altså inosin. Det aktuelle substratet brukt her inneholder denne rekkefølgen; IIUI (5'-ACUGGACA[rI][rI]U[rI]CUCCGAGG). De aktuelle cellene ble først lysert og proteinkonsentrasjonen ble målt i lysatet, før endo V ble trukket ut fra lysatet ved immunopresipitering (IP). Det brukes da antistoff som binder seg spesifikt til endo V og agarosekuler som binder seg til antistoffet. Prøvene separeres på denaturerende ureagel før de blottes over på fosforskjerm og skannes (Summer, Grämer, & Dröge, 2009). Utstyr og kjemikalier til prosedyrene er gitt i vedlegg 1, punkt 1i.

2.10.1 Prosedyre for cellelysering og måling av proteinkonsentrasjonen

Til lyseringen ble det laget en lysesbuffer av NTEN-buffer, med 10 μL PIC, 2 μL VRC og 1 μL DTT per mL buffer. Det ble deretter tilsatt ti ganger prøvenes volum med lysesbuffer, og satt på is i 60 minutter. Cellerestene ble fjernet med sentrifugering i 15 minutter, 4°C og 12 000 rpm. Supernatanten ble overført til et nytt rør og proteinkonsentrasjonen i lysatet ble målt med Pierce™ BCA Protein Assay Kit. For måling av proteinkonsentrasjon ble det laget en «working reagent» (WR-løsning), bestående av reagens A og reagens B i forholdet 20:1. Til standardbrønnene ble det tilsatt 0 μL , 1,5 μL , 3 μL , 5 μL , 8 μL og 16 μL BSA. Til prøvebrønnene ble det tilsatt 1 μL av de ukjente prøvene. Alle brønnene ble fylt opp til 50 μL med H₂O og tilsatt 200 μL WR-løsning. Platen ble inkubert ved 37°C i 30 minutter før absorbansen ved 560 nm ble målt spektrofotometrisk.

2.10.2 Prosedyre for aktivitetsassay og IP

Endo V ble trukket ut av cellelysatet og isolert fra de andre proteinene vha IP. Dette ble gjort ved å pipettere ønsket mengde protein, to ganger så mye antistoff og NTEN-buffer til «low protein bind»-ependorfrør, slik at totalvolumet ble 1 mL. Prøvene ble inkubert på vippestativ i to timer ved 4°C. Det ble deretter tilsatt 20 μL «beads protein A/G Plus Agarose» og inkubert over natt ved 4°C. Prøvene ble vasket tre ganger med 1 mL NTEN vaskebuffer samt sentrifugert i fem minutter ved 2500 rpm. For det siste vasketrinnet ble det tatt ut omtrent 950 μL buffer og spunnet ned på nytt før resten av supernatanten ble tatt ut.

Det ble laget en gel med 6,4 g urea, 750 μL 20x taurine, 6 mL «Long Ranger» (LR) og 3 mL MQ-vann. Denne blandingen ble varmet opp i mikrobølgeovn til urea løste seg opp. Deretter ble det tilsatt 75 μL ammonium persulfat (APS) og 7,5 μL TEMED. Det ble laget en mastermiks med 4 μL reaksjonsbuffer (vedlegg 1 punkt 1i), 8 μL H_2O og 2 μL substrat per prøve, samt 1 μL RNaseout totalt. Det ble tilsatt 12 μL av mastermiksen til hver prøve og deretter inkubert ved 37°C i 15 minutter. Det ble tilsatt 20 μL stopp-buffer til prøvene og de inkuberte ved 50°C i fem minutter. Prøvene ble sentrifugert ved 1500 rpm i tre minutter før prøvene ble påsatt gelen. Gelelektroforesen ble utført ved 200 V i en time. Gelen ble deretter tørket ved 80°C under vakuum i 45 minutter. Gelen ble så plassert i en kassett med en fosforskjerm over natt. Fosforskjermen ble deretter skannet på Typhoon 9410 Variable mode imager.

3. Resultater

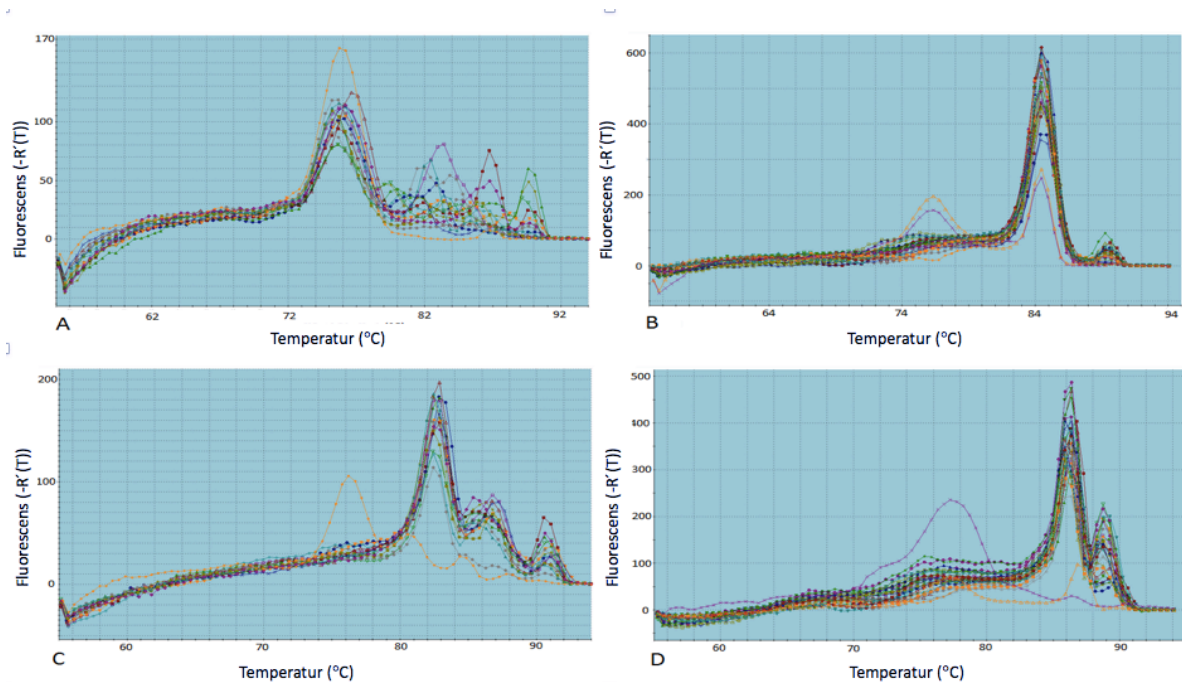
I denne oppgaven ble det studert primære monocytter og T-celler isolert fra buffy coat, samt enkelte cellelinjer. Makrofager fra primære celler og THP1-cellelinje ble differensiert til hvilende makrofager og polarisert til pro- og anti-inflammatoriske celler. T-celler fra primære celler og Jurkat-cellelinje ble aktivert med PHA. RNA fra disse ble isolert og det ble syntetisert cDNA. cDNAet ble analysert med qPCR for å bestemme genuttrykket av endo V isoformene. Det relative genuttrykket ble målt i de primære cellene og cellelinjene med primere for endo V uten ekson 3 (-e3), alle isoformene (AI) og isoformene 282, 308 og 309 av endo V (tabell 1 i vedlegg 2). Fullengdetranskriptet av endo V for isoformene 282, 308 og 309 ble amplifisert på PCR og disse produktene ble analysert med agarose gelelektroforese. Aktiviteten til endo V i cellelinjene ble analysert med aktivitetsassay.

3.1 Optimalisering av metode

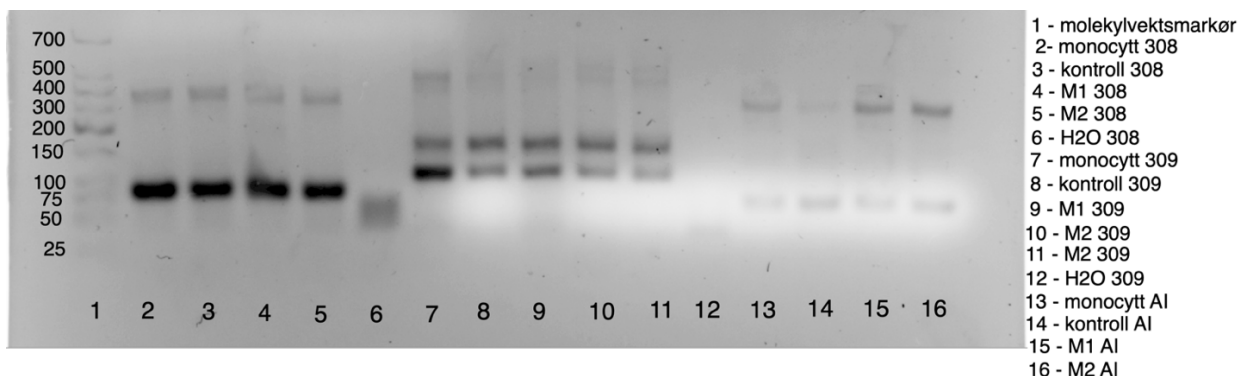
Det ble gjort en optimalisering av primerne i forhold til mastermiks med tilhørende temperaturprogram til qPCR, da primernes spesifisitet og sekvens kan påvirkes av temperatur og inkuberingstid. I tillegg ble det gjort en verifisering av makrofagpolariseringen og T-celleaktiveringen.

3.1.1 qPCR

For optimalisering av qPCR ble cDNA syntetisert fra THP1-cellelinje benyttet og primere for 308 og 309 isoformen ble designet og testet (tabell 1 vedlegg 2). Det ble gjort en smeltepunktanalyse for å verifisere primernes spesifisitet. Det ble testet for to ulike mastermikser som var SYBR Green FastMix ROX 5000 Reactions og PowerUP SYBR green Master Mix med tilhørende temperaturprogram. Med SYBR Green FastMix ROX 5000 Reactions ble det amplifisert flere uspesifikke produkter (figur 3-1 A-D). Etter qPCR ble produktene separert på agarose gel, der flere tydelige fragmenter svarte til ulike produkter (figur 3-2).



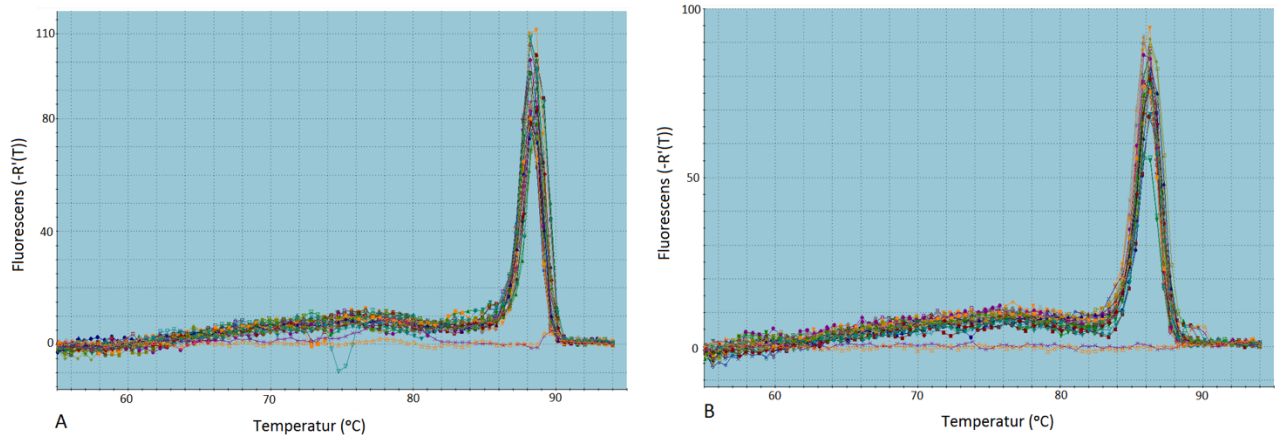
Figur 3-1: *Optimalisering av qPCR*. Smeltepunktanalyse fra qPCR med temperatur (°C) på x-aksen og fluoescens (-R'(T)) på y-aksen, der A og B viser resultatet av 308 isoformen med de to primerparene og C og D viser resultatene av 309 isoformen. Her ble mastermiksen SYBR Green FastMix ROX 5000 Reactions brukt med tilhørende temperaturprogram.



Figur 3-2: *qPCR produkter separert ved agarose gelelektroforese*. Agarosegel med qPCR produkter for 282, 308 og 309 isoformen med cDNA fra THP1 cellelinjen. Molekylvektmarkøren er prøven helt til venstre, i brønn 1.

SYBR Green FastMix ROX 5000 Reactions ga ikke spesifikke produkter. Derfor ble PowerUP SYBR green Master Mix med et tilhørende temperaturprogram testet, som hadde fungert med primerne tidligere. Smeltepunktanalysene av 308 (figur 3-3 A) og 309 isoformene (figur 3-3 B) viste ett spesifikt produkt med denne mastermiksen. Det ble ikke gjort noen optimalisering for primersettene for 282 isoformen, AI eller -e3. Det ble imidlertid vist at primerne for 282 isoformen kun ga ett produkt i agarosegelen (figur 3-2). Primerparene og mastermiksen som fungerte best ble benyttet videre til måling av

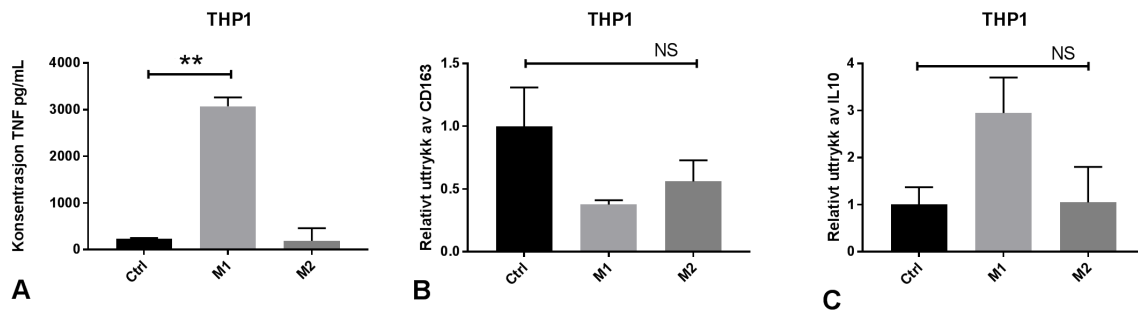
genuttrykket av endo V i både THP1 og Jurkat cellelinjene, samt de primære monocyttene og de primære T-cellene.



Figur 3-3: *Optimale qPCR betingelser*. Smeltepunktanalyse fra qPCR etter optimaliseringen med temperatur (°C) på x-aksen og fluorescens (-R'(T)) på y-aksen, der A viser 308 isoformen og B viser 309 isoformen. Her ble PowerUP SYBR green Master Mix brukt med tilhørende temperaturprogram.

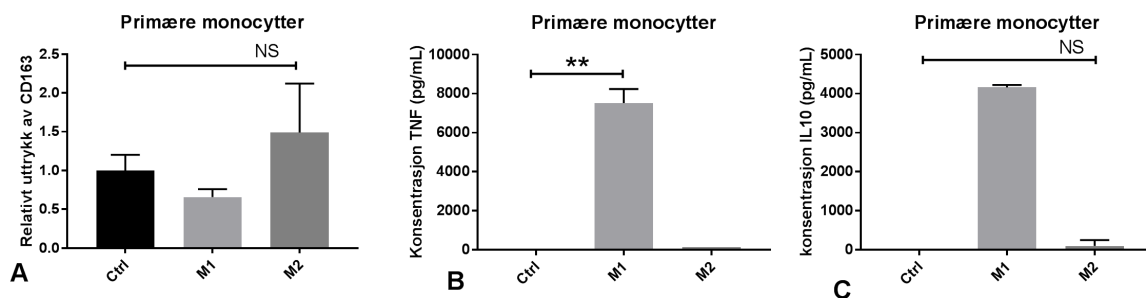
3.1.2 Verifisering av makrofagpolarisering og T-celleaktivitet

Ved *in vitro* stimulering for å polarisere og aktivere makrofager og T-celler, brukes ulike markører for å verifisere at cellene har blitt polariserte eller aktiverte. For å se om THP1 cellelinjen var polarisert, ble konsentrasjonen av TNF, IL-10 og IL-2 målt med ELISA og det relative genuttrykket av CD163 ble målt på qPCR. Pro-inflammatoriske celler polariseres med LPS og $\text{INF}\gamma$ og skiller ut TNF i cellemediet. Konsentrasjonen av denne markøren kan måles med ELISA. Det ble funnet at TNF konsentrasjonen var mye høyere i M1 ($P < 0,0001$, **) i forhold til kontrollcellene, som var hvilende makrofager (Ctrl) (figur 3-4 A). Disse cellene hadde derfor blitt polariserte til pro-inflammatoriske celler. Anti-inflammatoriske celler polariseres med IL-4 og IL-13 og skiller ut IL-10 og uttrykker et høyt nivå av CD163. Det relative genuttrykket av CD163 og IL-10 for THP1-cellelinjen ble målt på qPCR (figur 3-4 B og C). Her ble det ikke funnet noen forskjell i genuttrykket av M2 i forhold til hvilende makrofager. Dette vil si at disse ikke ble polariserte til anti-inflammatoriske celler i dette forsøket og det ble valgt å ikke bruke disse cellene videre.



Figur 3-4: *Cellepolarisering av monocyter til M1 og M2 makrofager i THP1. Polarisering av THP1 til M1 og M2, der A er TNF konsentrasjonen (pg/mL) målt på ELISA, B er genuttrykket av CD163 målt på qPCR og C er IL-10 konsentrasjonen (pg/mL) målt på ELISA. *= $P < 0,05$, **= $P < 0,001$ og NS= $P > 0,05$.*

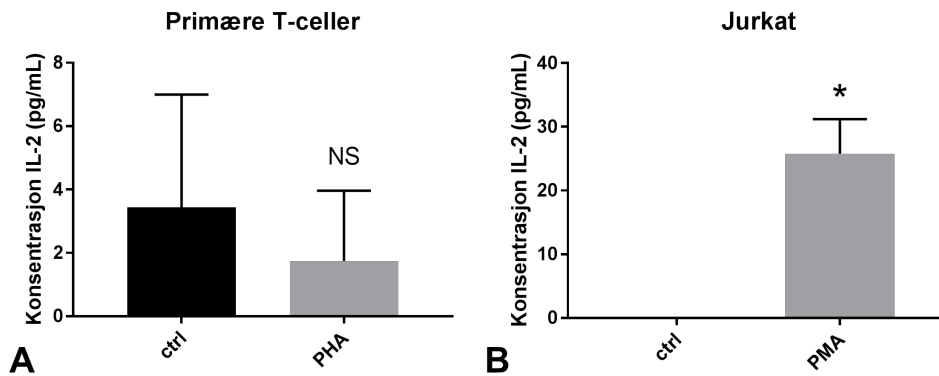
De samme markørene som ble målt for THP1 cellelinjen, ble også målt for polariserte primære monocyter. Konsentrasjonen av TNF og IL-10 i mediet ble målt med ELISA (figur 3-5 B og C). Konsentrasjonen av TNF ble funnet til å være mye høyere i M1 ($P < 0,0001$, **) enn i kontrollcellene, som var hvilende makrofager. Disse hadde dermed blitt polariserte til pro-inflammatoriske celler. Det ble derimot funnet at IL-10 konsentrasjonen var lav i M2, som vil si at disse ikke ble polariserte til anti-inflammatoriske celler. Det relative uttrykket av CD163 ble målt på qPCR (figur 3-5 A), men oppreguleringen var ikke signifikant høyere i M2 enn i hvilende makrofager. De hadde derfor ikke blitt polarisert i dette forsøket og ble ikke brukt i videre analyser.



Figur 3-5: *Cellepolarisering av primære monocyter til M1 og M2 makrofager i primære monocyter. Polarisering av primære monocyter til M1 og M2, der A er genuttrykket av CD163 målt på qPCR, B viser TNF konsentrasjonen (pg/mL) målt på ELISA og C er IL-10 konsentrasjonen (pg/mL) målt på ELISA. **= $P < 0,001$ og NS= $P > 0,05$.*

PHA aktiverte T-celler vil en ha høy utskillelse av IL-2. Det ble funnet at de PHA-behandlede primære T-cellene ikke hadde økt utskillelse av IL-2 i forhold til kontroll T-cellene (figur 3-6 A) og dermed ikke var aktivert. Disse cellene ble derfor ikke brukt ved måling av genuttrykket for de ulike isoformene på qPCR. I likhet med de primære T-cellene,

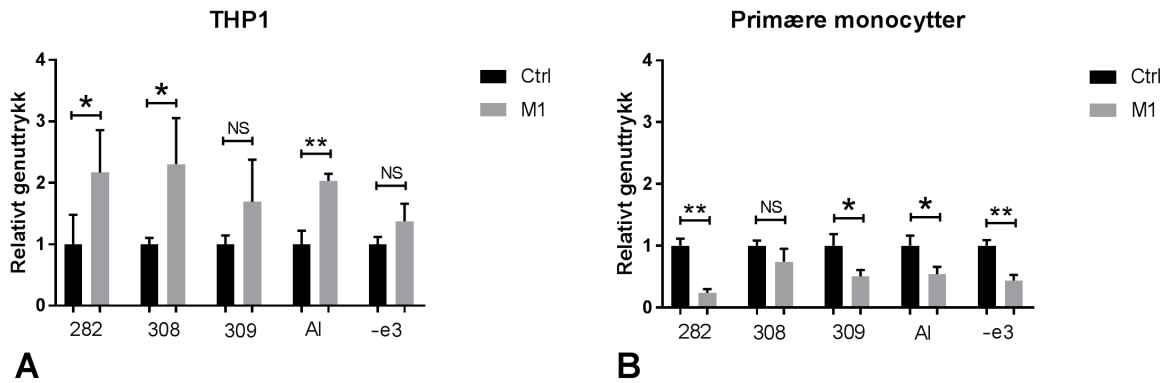
vil Jurkat-cellelinjene behandlet med PHA skille ut IL-2. Konsentrasjonen av IL-2 i Jurkatmediet, ble målt med ELISA og viste høy konsentrasjon i mediet til de behandlede cellene i forhold til kontroll T-cellelinjene ($P=0,0012$, *) (figur 3-6 B). Disse cellene hadde blitt aktiverte T-celler.



Figur 3-6: *Cellepolarisering av primære T-celler og Jurkat cellelinjer.* A viser konsentrasjonen (pg/mL) av IL-2 i mediet til kontroll T-celler, som ikke var behandlet og PHA-behandlede primære T-celler. B viser konsentrasjonen (pg/mL) av IL-2 i mediet til kontroll celler og PHA-behandlede Jurkat-celler. *= $P<0,001$.

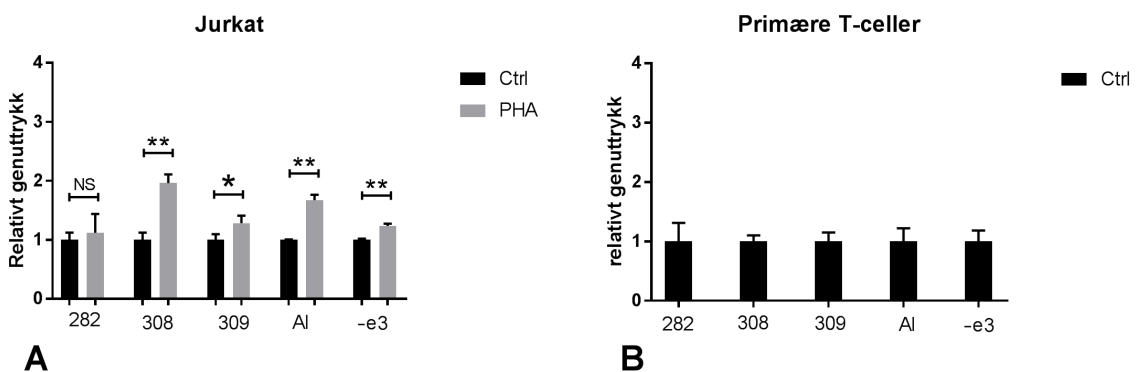
3.2 Isoformer i de ulike celletypene

For å måle nivået av 282, 308 og 309 transkripter i de ulike celletypene ble qPCR benyttet. I tillegg til å analysere uttrykket av isoformene i de ulike cellene, ble også uttrykket av $-e3$ og AI målt på samme måte. I THP1 cellelinjen var genuttrykket av 282 ($P=0,0318$, *), 308 ($P=0,0139$, *) og AI ($P=0,0002$, **) oppregulert i M1 i forhold til kontrollene, hvilende makrofager (figur 3-7 A). Det ble funnet at oppreguleringen av 282 i disse cellene var 2,17 ganger høyere enn i kontrollcellene, for 308 var den 2,30 ganger høyere enn i kontrollene og i AI var den 2,04 ganger høyere enn i kontrollene. Den signifikante forskjellen var størst for AI. I primære monocyttene var det nedregulering i M1 i forhold til hvilende makrofager av 282 ($P<0,0001$, **), 309 ($P=0,0037$, *), AI ($P=0,0040$, *) og $-e3$ ($P=0,0001$, **) (figur 3-7 B). Det ble funnet at nedreguleringen av 282 i disse cellene var 0,24 ganger så høy som for kontrollcellene, for 309 var den 0,50 ganger så høy som for kontrollene, i AI var den 0,54 ganger så høy som for kontrollene og i $-e3$ var den 0,44 ganger så høy som for kontrollene. Den signifikante forskjellen var størst for 282 og $-e3$.



Figur 3-7: Det relative genuttrykket av endo V i monocytter. Det relative genuttrykket i forhold til hvilende makrofager av isoformene 282, 308 og 309, samt AI og -e3 i kontroller og M1, der A viser uttrykket i THP1-celler og B viser uttrykket i primære monocytter. Hvilede makrofager er satt til 1 for hver isoform. *= $P < 0,05$, **= $P < 0,001$ og NS= $P > 0,05$.

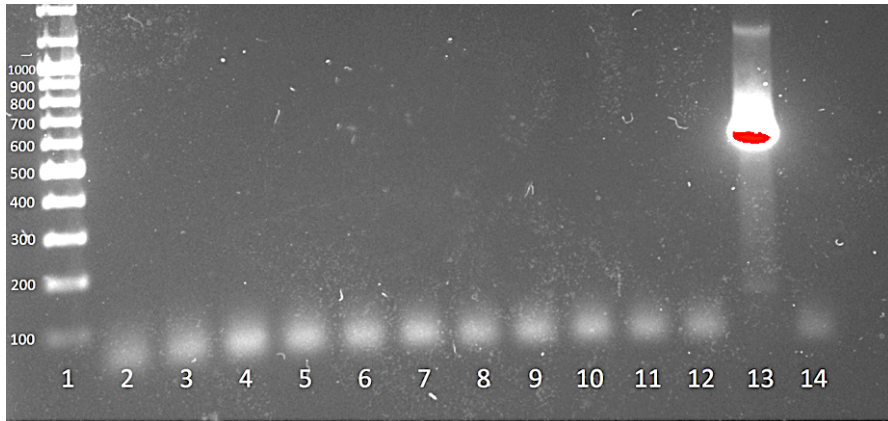
I de aktiverte Jurkat-cellene, ble det funnet en oppregulering av det relative uttrykket av isoformene 308 ($P=0,0010$, **), 309 ($P=0,0379$, *), AI ($P=0,0002$, **) og -e3 ($P=0,0006$, **) i forhold til ikke-aktiverte Jurkat-celler (figur 3-8A). Det ble funnet at oppreguleringen av 308 var 1,96 ganger høyere enn i kontrollcellene, for 309 var den 1,29 ganger høyere enn i kontrollene og i -e3 var den 1,24 ganger høyere enn i kontrollene. Den signifikante forskjellen var størst for 308, AI og -e3. Fordi de primære T-cellene ikke ble aktivert er det kun mulig å si at isoformene er påvist (figur 3-8 B).



Figur 3-8: Det relative genuttrykket av endo V i T-celler. Det relative genuttrykket i forhold til kontroll T-cellene av isoformene 282, 308 og 309, samt AI og -e3 i T-celler. A viser uttrykket i Jurkat-celler og B viser at isoformene er påvist ut i primære T-celler. Kontroll T-cellene er satt til 1 for hver isoform. *= $P < 0,05$, **= $P < 0,001$ og NS= $P > 0,05$.

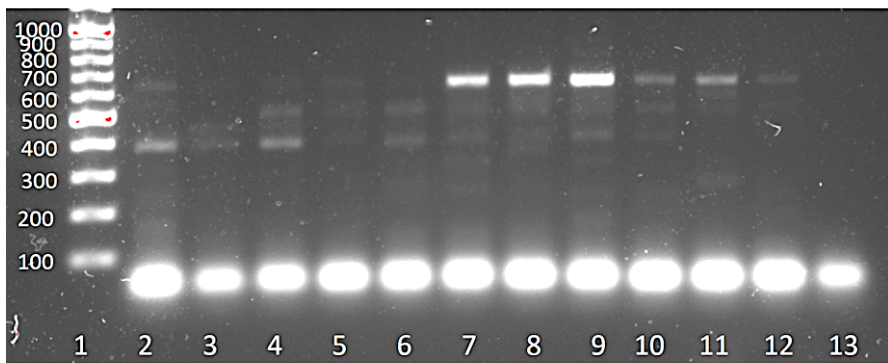
3.3 Analyse av fullengdetranskript på PCR og agarose gelelektroforese

I qPCR ble genuttrykket av isoformene 282, 308 og 309 målt i de primære cellene og cellelinjene med primere for de ulike isoformene i 3'enden av transkriptet (tabell 1 i vedlegg 2). Ekson 3 koder for konserverte aminosyrer som er nødvendig for å lage enzymatisk aktivt endo V protein. For å måle om transkript med ekson 3 finnes i disse isoformene, ble cDNA fra både primære monocytter og T-celler, samt THP1 og Jurkat amplifisert med PCR. PCR produktene ble separert på agarosegel ved agarose gelelektroforese. Vann ble brukt som negativ kontroll for alle isoformene, 282 plasmid ble benyttet som positiv kontroll for 282 isoformen og 309 plasmid ble benyttet som positiv kontroll for 309 isoformen. For 282 isoformen ble det ikke funnet noen bånd (figur 3-9 A). PCR produktene av 308 (figur 3-9 B) og 309 (figur 3-9 C) isoformen ble sammenliknet med molekylvektsmarkøren (figur 1 i vedlegg 4). De største fragmentene var på omtrent 650 basepar og svarer til fullengdetranskriptet av endo V. Det ble også dannet mindre fragmenter som representerer kortere produkter. Det ble observert at det var færre fullengdetranskripter i de primære cellene enn i cellelinjene for 308 og 309 isoformene.



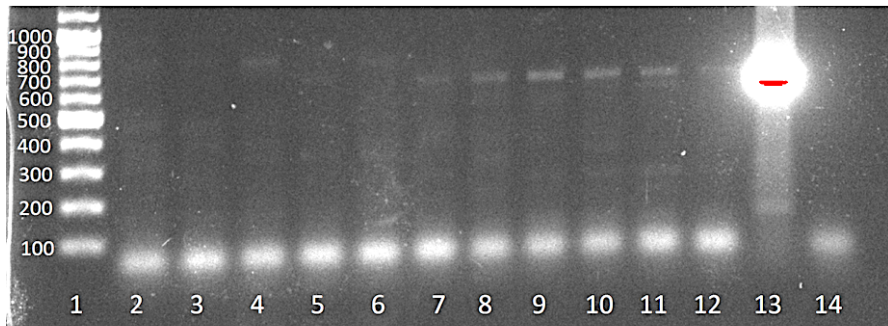
- 1 - Molekylvektsmarkør
- 2 - Primære monocytt kontroll
- 3 - Primære monocytt M1
- 4 - Primære monocytt M2
- 5 - Primære T-celler kontroll
- 6 - Primære T-celler aktivert
- 7 - THP1 kontroll monocytt
- 8 - THP1 kontroll
- 9 - THP1 M1
- 10 - THP1 M2
- 11 - Jurkat kontroll
- 12 - Jurkat aktivert
- 13 - Positiv kontroll
- 14 - negativ kontroll

A



- 1 - Molekylvektsmarkør
- 2 - Primære monocytt kontroll
- 3 - Primære monocytt M1
- 4 - Primære monocytt M2
- 5 - Primære T-celler kontroll
- 6 - Primære T-celler aktivert
- 7 - THP1 kontroll monocytt
- 8 - THP1 kontroll
- 9 - THP1 M1
- 10 - THP1 M2
- 11 - Jurkat kontroll
- 12 - Jurkat aktivert
- 13 - Negativ kontroll

B



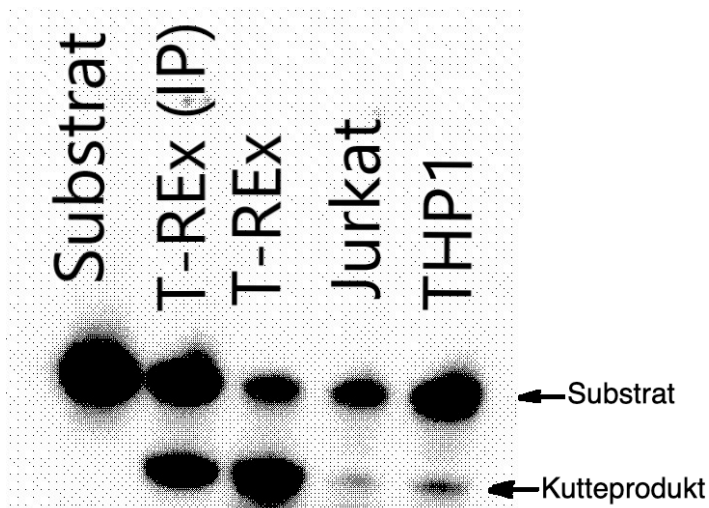
- 1 - Molekylvektsmarkør
- 2 - Primære monocytt kontroll
- 3 - Primære monocytt M1
- 4 - Primære monocytt M2
- 5 - Primære T-celler kontroll
- 6 - Primære T-celler aktivert
- 7 - THP1 kontroll monocytt
- 8 - THP1 kontroll
- 9 - THP1 M1
- 10 - THP1 M2
- 11 - Jurkat kontroll
- 12 - Jurkat aktivert
- 13 - Positiv kontroll
- 14 - negativ kontroll

C

Figur 3-9: PCR analyse av fullengde endo V transkripter. Agarosegel med PCR produkter for 282 isoformen i A, 308 isoformen i B og 309 isoformen i C. Her er molekylvektsmarkøren prøven helt til venstre, i brønn 1. Her ble cDNA fra de primære monocytterne, THP1 cellelinjen, de primære T-cellene og Jurkat cellelinjen amplifisert i PCR reaksjonen.

3.4 Aktiviteten til endo V i cellelinjer

All forskning på enzymatiske egenskaper for human endo V har blitt gjort på rekombinant protein lagd i *E. coli*. For å studere endogent endo V, ble det utført et aktivitetsassay i ekstrakter fra makrofager og T-celler fra henholdsvis THP1 og Jurkat cellelinjer. Cellene ble lysert og endo V ble trukket ut fra lysatet med IP. Prøvene ble separert på denaturerende ureagel. Det radioaktivt merkede substratet ssIIUI uten tilsatt endo V ble benyttet som negativ kontroll. Videre ble T-REx celler benyttet som positive kontrollen da disse har et overuttrykk av endo V. De positive kontrollene ga et tydelig kutteprodukt og det ble observert et bånd med samme størrelse for THP1 og Jurkat (figur 3-10). Det ble bekreftet endo V aktivitet i Jurkat- og THP1-celler.



Figur 3-10: Kutteprodukt etter aktivitetsassay. Kutteprodukter fra endo V separert på ureagel, der det radioaktive merkede substratet ssIIUI ble brukt. T-REx uten IP ble benyttet som kontroll for IP.

4. Diskusjon

I denne oppgaven ble genuttrykket av isoformene 282, 308, 309, varianter uten ekson 3 og alle isoformene av endo V i makrofager og T-celler målt med qPCR. Både primære celler og cellelinjer ble brukt. Uttrykket ble undersøkt i hvilende makrofager og makrofager polarisert til pro-inflammatoriske celler. I tillegg ble de samme isoformene undersøkt i aktiverte og ikke-aktiverte T-celler fra Jurkat cellelinje. Monocyttene ble differensiert til hvilende makrofager og videre stimulerte med $\text{INF}\gamma$ og LPS for polarisering til pro-inflammatoriske makrofager, og stimulerte med IL-4 og IL-13 for polarisering til anti-inflammatoriske makrofager. Jurkat ble aktivert ved stimulering med PHA. Polarisering og aktivering ble verifisert med ELISA og qPCR. qPCR for endo V ble optimalisert for to primersett og to mastermikser med tilhørende temperaturprogram. Det ble utført et aktivitetsassay for å teste om cellene hadde aktivt enzym. Aktiviteten ble undersøkt i Jurkat og THP1 cellelinjene. I tillegg ble fullengdetranskripter for endo V isoformene 282, 308 og 309 amplifisert med PCR og produktene separert på agarose gelelektroforese.

4.1 Metodevurdering

4.1.1 qPCR

qPCR er en teknikk som kan brukes for å kvantifisere mengden av et bestemt DNA i en prøve. Dette er regnet for å være en enkel metode som er lite tidkrevende. PCR-reaksjoner er dog veldig utsatte for kontaminering da hver syklus dobler mengde produkt, og det skal veldig lite til før en kontaminering forstyrrer resultatene. En annen ulempe er at primerne er temperatursensitive. Dette kan føre til at primerne ikke hybridiserer til cDNAet og dermed ikke gir noen amplifikasjon, eller at de hybridiserer uspesifikt og gir amplifikasjon av et uønsket produkt. Det kan også dannes primerdimerer ved at primerne hybridiserer til seg selv. Dette kan imidlertid påvises med en smeltepunktsanalyse som kjøres etter PCR reaksjonen. Primerdimerene vil være mindre i størrelse enn produktene man ønsker å amplifisere og vil, litt avhengig av G/C-forholdet, ha lavere smeltepunkt enn større fragmenter.

I denne oppgaven ble det utført en optimalisering av qPCR da primerne som først ble benyttet ga mange produkter i stedet for ett spesifikt produkt. Da det ikke var tilstrekkelig å bytte primersett, ble det testet to forskjellige mastermikser med tilhørende temperaturprogram.

4.1.2 ELISA

For å verifisere polarisering/aktivering ble sekresjonen av TNF, IL-10 og IL-2 målt med ELISA, og genuttrykket av disse markørene og CD163 målt med qPCR. Det ble i denne oppgaven sett på TNF for M1 polarisering og IL-10 samt uttrykket av CD163 for M2 polarisering. ELISA-analyser gir konsentrasjonen av cytokiner i cellemediet etter polarisering. Denne analysemetoden baserer seg på antistoff. Fordi antistoff er kostbart og ulike antistoff er spesifikke for proteiner vil det være kostbart å opprettholde et godt antistoffbibliotek for ELISA-analyser. En fordel er at det er en nøyaktig og direkte måling av cytokinkonsentrasjonen som faktisk befinner seg i mediet. Til dette benyttes en standardkurve, der den optiske tettheten måles av standardløsningene med kjent konsentrasjon. Konsentrasjonen av de ukjente prøvene beregnes ut fra den målte optiske tettheten med likningen fra standardkurven. I denne oppgaven opplevdes det at antistoffene ikke festet seg i prøvebrønnene. Dette førte til at den optiske tettheten av markørene ikke ble målt og forsøket ble mislykket. Metoden er tidkrevende og av den grunn ikke alltid praktisk gjennomførbar.

4.1.3 Aktivitetsassay

Aktivitetsassay er en analysemetode for å teste et enzyms aktivitet. Enzymet tilsettes merket substrat og prøvene separeres på gel. Fordi nivået av endo V er lavt i cellene gjøres det IP for å sikre at en får observerbar aktivitet. Dette er en tidkrevende og relativt dyr prosess da antistoff er kostbart og det krever overnattsinkubering. Det er også en risiko ved vaskeprosessen da proteinpelleten ikke nødvendigvis er synlig med det blotte øyet. Det kan derfor være fort gjort at proteinene en egentlig vil beholde forstyrres under vaskingen og blir fjernet med supernatanten. I denne oppgaven ble det etter noen forsøk besluttet å ikke ta ut all supernatanten i siste vasketrinn, og heller spinne ned en ekstra gang før resten av bufferen ble tatt ut.

Substratet må også merkes for å kunne sees i gelen, og i denne oppgaven ble det benyttet et radioaktivt merket substrat (^{32}P), ssIIUI. Det er ikke fordelaktig, sett fra et HMS-perspektiv, å

benytte radioaktive molekyler. Det gir derimot sterkere signaler enn de betydelig mindre helseskadelig fluorescerende probene.

I denne oppgaven vises det for første gang at både Jurkat- og THP1-cellene har aktivt endogent endo V enzym. Båndene er svake, men med videre optimalisering av for eksempel pH og hvilket type salt som brukes i reaksjonsbufferen, kan resultatene forbedres. I dette forsøket ble det benyttet manganklorid ($MnCl_2$), men det kan tenkes at andre salter kan gi bedre resultater. Endo V er avhengig av toverdige ioner for å være aktivt, og det kan være at for eksempel magnesium vil være et bedre alternativ. For videre studier vil det kunne være interessant å gjøre et tilsvarende aktivitetssassay på de primære cellene i tillegg til celler fra cellelinjer med optimalisert metode.

4.1.4 Bruk av cellelinjer

Cellelinjer er immortaliserte celler som vokser så lenge det er tilgang til næring og medie. De er uten programmert celledød og er nærmest udødelige. Flere cellelinjer stammer fra kreftceller og har flere likhetstrekk med kreftceller. Fordelen ved bruken av denne typen celler i forskningen er at det kan være humane celler. De er også lett tilgjengelige da de ikke stopper å vokse. En ulempe er at de på grunn av deres udødelige egenskap, ikke alltid reflekterer biologiske prosesser slik de foregår i friske celler.

4.2 Genuttrykket av de ulike isoformene av endo V

Det ble funnet en signifikant oppregulering av 282 ($P=0,0318$, *), 308 ($P=0,0139$,*) og AI ($P=0,0002$, **) i M1-stimulerte celler fra THP1 cellelinje i forhold til kontrollcellene, som var hvilende makrofager. Det ble funnet at oppreguleringen av 282 i disse cellene var 2,17 ganger høyere enn i kontrollcellene, for 308 var den 2,30 ganger høyere enn i kontrollene og i AI var den 2,04 ganger høyere enn i kontrollene. For de primære cellene ble det funnet en signifikant nedregulering av 282 ($P<0,0001$, **), 309 ($P=0,0037$, *) , AI ($P=0,0040$, *) og -e3 ($P=0,0001$, **) i forhold til kontrollcellene, hvilende makrofager. Det ble funnet at nedreguleringen av 282 i disse cellene var 0,24 ganger så høy som i kontrollcellene, for 309 var den 0,50 ganger så høy som i kontrollene, i AI var den 0,54 ganger så høy som i kontrollene og i -e3 var den 0,44 ganger så høy som i kontrollene. De største forskjellene ble funnet i AI i M1 fra THP1, og -e3 og 282 i primære M1. Da cellelinjer har kreftliknende egenskaper er en del resultater ikke direkte overførbare til primære celler. De aktiverte T-

cellene fra Jurkat cellelinjen viste en signifikant oppregulering av 308 ($P=0,0010$, **), 309 ($P=0,0379$, *), AI ($P=0,0002$, **) og -e3 ($P=0,0006$, **) i forhold til de ikke-aktiverte Jurkat-cellene. Det ble funnet at oppreguleringen av 308 var 1,96 ganger høyere enn i kontrollcellene, for 309 var den 1,29 ganger høyere enn i kontrollene og i -e3 var den 1,24 ganger høyere enn i kontrollene. De tydeligste forskjellene var i 308, AI og -e3, som kan tyde på at for aktiverte T-celler fra cellelinje er disse isoformene viktige for disse cellenes livssyklus eller funksjon. Dette er heller ikke nødvendigvis overførbart til primære, friske celler. De primære T-cellene ble ikke aktiverte og ble derfor ikke studert videre, men alle isoformene ble påvist i disse cellene.

Det ble observert en generell og signifikant oppregulering av flere av isoformene i M1 polariserte THP1-celler i forhold til kontrollene. Videre ble det observert en nedregulering av enkelte isoformer i primære M1-celler. Fordi pro-inflammatoriske celler produserer NO som kan føre til deaminering av RNA var det forventet å finne en oppregulering av endo V i disse cellene. Resultatene fra denne oppgaven viser imidlertid at dette ikke er tilfellet. Fordi cellelinjer er celler uten programmert celledød, kan det være at disse har endret uttrykk av proteiner og enzymer som er viktige for normal cellefunksjon. I primære T-celler ble alle isoformene påvist. Det kan i videre studier være interessant å se på forskjeller i genuttrykket mellom aktiverte og ikke-aktiverte primære T-celler, samt se om det er noen likheter mellom uttrykket av disse og de primære monocytene og forskjellene fra cellelinjer. qPCR resultatene viste en nedregulering av transkripter uten ekson 3 i primære M1 og det er derfor tenkelig at det er flere funksjonelle enzymer i de friske cellene. En ser derimot en oppregulering av transkripter uten ekson 3 i Jurkat-celler og man kan spekulere i om det lages endo V uten ekson 3, som sannsynligvis ikke er enzymatisk aktivt, men som kan ha andre funksjoner i cellen, for eksempel RNA-binding.

4.3 Fullengdetranskript på PCR

PCR av fullengdetranskripter viste ingen bånd for 282-isoformen, noe som betyr at det var for lite transkripter til å detekteres, eller at de ikke finnes. Dersom man sammenlikner disse resultatene med qPCR resultatene for 282 isoformene i dette studiet og i andre studier, vil en se at det også her er vanlig at 282 uttrykkes i liten grad. Gelen viste et tydelig fragment for den positive kontrollen, noe som vil si at PCRen har fungert. Derfor tyder dette på at det ikke var mange fullengdetranskripter av 282 isoformen.

For 308 og 309 isoformen ble det funnet at det var flere små fragmenter i agarosegelen, noe som svarte til kortere produkter fra PCR. Det kan være at det ble dannet andre spleiseprodukter i tillegg til fullengde 308 og 309. Det er derfor mulig at det finnes andre isoformer av endo V enn de som er påvist i denne studien. Det er også bemerkelsesverdig at det for 308 og 309 isoformen i primære celler er flere mindre spleiseprodukter enn i cellelinjer. Det kan bety at det er større variasjon i uttrykt endo V i primære celler enn i cellelinjer. Dette kan komme av at celler fra cellelinjer ikke har normal cellesyklus kontroll. Fordi analysene er på mRNA-nivå er det usikkert om det faktisk blir translatert til protein. Det ble observert sterkere bånd i gelen for cellelinjene. Fordi dette ikke er en kvantitativ analyse er dette bare en indikasjon på at disse har flere fullengdetranskripter av isoformene 308 og 309 med ekson 3.

5. Konklusjon

qPCR-analysene av human endo V viste at det var signifikante forskjeller på uttrykket av isoformene i primære makrofager og primære M1, samt makrofager og M1 fra THP1 cellelinje. Det var også forskjeller i aktiverte og ikke-aktiverte T-celler fra Jurkat cellelinje. Det ble vist en generell oppregulering av isoformene i cellelinjer og det kan tenkes at dette kommer av at de ikke lenger har normalt uttrykk av proteiner og enzymer som er viktige i normal cellyklus. Det ble også vist en nedregulering av enkelte isoformer i primære M1 polariserte celler. Det var imidlertid forventet en oppregulering i disse cellene da M1 produserer nitrogenoksider som fører til deaminering. I primære T-celler ble alle isoformene påvist.

Studiet av fullengdetranskriptet av isoformene 282, 308 og 309 viste et lavt nivå av 282 under deteksjonsgrensen for metoden. qPCR resultatene for 282 isoformene viste i denne studien og også i andre studier at det også her er vanlig at 282 nedreguleres eller at den uttrykkes i liten grad. For 308 og 309 isoformen ble det funnet flere mindre PCR-produkter som trolig kommer av ulike spleiseprodukter. Det kan tenkes at disse kommer av andre isoformer av endo V som ikke er studert her. Det ble observert flere slike spleiseprodukter i primære celler enn i cellelinjer, i tillegg til at det var flere fullengdetranskripter i cellelinjer enn i primære celler. Det ser derfor ut til å være større variasjon i uttrykket endo V i primære celler enn i cellelinjer, i tillegg til at cellelinjene har flere aktive proteiner enn primære celler. Om proteinet er aktivt eller ikke kan ikke bekreftes fra denne studien da dette er gjort på mRNA nivå.

Aktivitetsassay viste at både Jurkat- og THP1-cellene har aktivt enzym. For videre studier vil det kunne være interessant å gjøre et tilsvarende aktivitetsassay på de primære cellene i tillegg til celler fra cellelinjer med optimalisert metode.

Denne oppgaven viste at ulike isoformer for endo V uttrykkes forskjellig i immunceller fra primære celler og cellelinjer. Dette tyder på at endo V reguleres i disse cellene. Det kan være interessant å studere ekspresjonen av de samme isoformene av endo V i M2 polariserte makrofager. I tillegg kan det være interessant å se på uttrykket i aktiverte og ikke-aktiverte primære T-celler. Det er fortsatt uklart hva funksjonen til endo V *in vivo* er.

6. Referanser

(u.d.).

Alseth, I., Dalhus, B., & Bjørås, M. (2014, Juni). Inosine in DNA and RNA. *Current opinion in genetics & development*, Vol. 26, ss. 116-23.

BioNinja . (u.å). *BioNinja*. Hentet fra Transcription and translation : <http://www.old-ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-chemicals-of-life/35-transcription-and-transl.html>

Bosshart, H., & Heinzelmann, M. (2016, November 4). THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals Translational Medicine* , Vol. 21, ss. 438.

BPS Bioscience. (2018). *HEK293 - T-REx Recombinant Cell Line*. Hentet fra BPS Bioscience: <http://bpsbioscience.com/hek293-t-rex-cell-line-71227>

Brown, T. (2018). *Genomes 4*. New York: Garland Science.

Cao, W. (2012, Desember 20). Endonuclease V: an unusual enzyme for repair of DNA deamination . *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol.70 ss.3145–3156.

Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2012). *Molecular Biology*. Oxford: Elsevier Academic Press.

Fladeby, C., Vik, E. S., Laerdahl , J. K., Neurauter, C. G., Heggelund, J. E., Thorgaard, E., . . . Alseth, I. (2012, November 5). The Human Homolog of Escherichia coli Endonuclease V Is a Nucleolar Protein with Affinity for Branched DNA Structures. *Plos One*, Vol.7, Issue 1, ss.1-11.

Fossum, S. (2018, Desember 31). *Store Medisinske Leksikon*. Hentet fra Cellelinjer: <https://sml.snl.no/cellelinjer>

InformedHealth.org. (2010, November 23). *Institute for Quality and Efficiency in Health Care* . Hentet fra What is an inflammation?: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279298/>

InvivoGen. (u.å). *InvivoGen*. Hentet fra PHA-P: <https://www.invivogen.com/phap>

Linn, S., & Gates, F. T. (1977, Mars 10). Endonuclease V of Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 252, ss. 1647-1653.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 CT Method. *Methods*, 25:402-408.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Brock Biology of microorganisms*. Harlow: Pearson Education Limited.

- MBL Life science. (2017). *MBL Life science*. Hentet fra The principle and method of ELISA: <http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html>
- Meijer, K., Weening, D., de Vries, M. P., Priebe, M. G., Vonk, R. J., & Roelofsen, H. (2015, Oktober 14). Quantitative proteomics analyses of activation states of human THP-1 macrophages. *Journal of Proteomics*, Vol. 128, ss. 164-172.
- Molecular Devices. (2019). *Molecular Devices*. Hentet fra At the Cell Counter: Jurkat Cells: <https://www.moleculardevices.com/cell-counter-jurkat-cells#gref>
- Pourahmad, J., & Salimi, A. (2015). Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, s. 980.
- Qiagen. (2019). *miRNeasy Mini Kit*. Hentet fra Qiagen: <https://www.qiagen.com/no/shop/sample-technologies/rna/mirna/mirneasy-mini-kit/#productdetails>
- R&D Systems . (u.å). *DuoSet® ELISA Development Systems*. Hentet fra R&D Systems : <https://www.rndsystems.com/products/duoset-elisa-development-systems>
- R&D systems. (u.å). *R&D Systems* . Hentet fra ELISA Development Guide: <https://resources.rndsystems.com/images/site/edbapril025670.pdf>
- Ruotsalo, K. (2019, mai 17). *Buffy Coat Examination for Mast Cells*. Hentet fra VCA Hospitals: <https://vcahospitals.com/know-your-pet/buffy-coat-examination-for-mast-cells>)
- Stemcell Technologies. (2019). *EasySep™ Human Monocyte Isolation Kit*. Hentet fra Stemcell Technologies: <https://www.stemcell.com/easysep-human-monocyte-isolation-kit.html>
- Summer, H., Grämer, R., & Dröge, P. (2009, Oktober 29). Denaturing Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Urea PAGE). *Journal of Visualized Experiments*, Vol. 32, ss. 1485.
- ThermoFisher Scientific. (u.å). *ThermoFisher Scientific*. Hentet fra GeneRuler DNA Ladders: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-nucleic-acid-electrophoresis-purification/dna-electrophoresis-thermo-scientific/dna-ladders-thermo-scientific/generuler-dna-ladders.html?gclid=EAIaIQobChM>

Tymoczko, J. L., Berg, J. M., & Strayer, L. (2015). *Biochemistry- A Short Course*. New York: W.H. Freeman and Company.

Universitetet i Oslo. (2011, Februar 4). Hentet fra Gelelektroforese:

<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/g/gelelektrofor.html?fbclid=IwAR1ie5ZoLVVnSSfHDPC3Xfrddqe26mIyzjOZHtsLI99aGR5rYyCaHHI Q8tY>

Vik, E. S., Nawaz, M., Andersen, P. S., Fladeby, C., Bjørås , M., Dalhus, B., & Alseth, I. (2013, Mars 13). Endonuclease V cleaves at inosines in RNA. *Nature Communications*, ss. 1-7.

Yao, M., Hatahet, Z., Melamede, R. J., & Kow, Y. W. (1994, Januar 7). Purification and Characterization of a Novel Deoxyinosine-specific Enzyme, Deoxyinosine 3' Endonuclease, from *Escherichia coli**. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, ss. 16260-16268.

Vedlegg

Vedlegg 1- Utstysrliste

1a Utstyr og kjemikalier til punkt 2.1 Isolering av Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) fra Buffy Coat

- Buffy Coat fra Blodbanken
- Cellemedium- RPMI 1640 fra Sigma
- Fysikalsk NaCl 9 mg/mL fra B.Braun
- Sentrifuge- Megafuge 2.R fra Heraeus Instruments
- Sterilbenk- ThermoFisher Scientific Safe 2020
- Inkubator- ThermoFisher Scientific Heracell 150i CO₂ incubator

1b Utstyr og kjemikalier til punkt 2.2 Isolering av monocytter og T-celler fra PBMC

- Mikroskop- EVE Automatic Cell counter NanoEnTek
- CD14 MicroBeads fra MACS Miltenyi Biotec
- Pan T Cell Biotin –Antibody Cocktail fra MACS Miltenyi Biotec
- Buffer fra MACS Miltenyi Biotec
 - Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7,2
 - 0,5 % bovine serum albumin (BSA)
 - 2mM EDTA fra MACS BSA Stock Solution og autoMACS Rinsing Solution
- MACS Miltenyi Biotec
 - autoMACS^{Pro}
 - mini sampler
 - 5 x 2 autoMACS Columns
 - MACS Running Buffer

1c Utstyr og kjemikalier til punkt 2.3 Cellepolarisering av monocytter og T-celler fra primære celler og cellelinjer

- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 100 nM) fra Sigma Aldrich
- Lipopolysaccharide (LPS, 10 ng/mL) fra Sigma Aldrich
- Interferon γ (INF γ , 5ng/mL) fra R&D Systems
- Interleukin 4 (IL-4, 25 ng/mL) fra R&D Systems

- Interleukin 13 (IL-13, 25 ng/mL) fra R&D Systems
- Phytohemagglutinin (PHA, 3 µg/mL) fra remel og Sigma Aldrich
- Sentrifuger- ThermoFisher Scientific Heraeus Megafuge 16 centrifuge og ThermoFisher Scientific Heraeus Multifuge 3SR+ Centrifuge
- Inkubator- Sanyo Electric CO₂ incubator MCO-18AIC og ThermoFisher Scientific Heracell 150i CO₂ incubator
- Mikroskop- Digital Bio JuLI Smart fluorescent cell analyzer

1d Utstyr og kjemikalier til punkt 2.4 Isolering av RNA

- miRNeasy Mini Kit (50) fra Qiagen
 - RNeasy Mini Spin Columns
 - QIAzol Lysis Reagent
 - Buffer RWT
 - Buffer RPE
- RNeasy Mini Kit fra Qiagen
 - RNeasy Mini Spin Columns
 - Buffer RLT Lysis buffer
 - Buffer RPE løst i etanol
 - Buffer RW1
- Buffer RDD fra Qiagen
- Dnase I fra Qiagen
- Kloroform (CHCl₃) fra EMD Millipore Corporation
- Etanol (C₂H₆O, 96%) fra antibac
- Mikroskop- Motic AE 2000
- Sentrifuge- ThermoFisher Scientific Heraeus Fresco 21 Centrifuge
- NanoDrop- DeNovix NanoDrop DS-11 Spectrophotometer

1e Utstyr og kjemikalier til punkt 2.5 Syntetisering av cDNA

- qScript cDNA SuperMix fra Quanta Biosciences, 5x
- RNA templat med varierende konsentrasjon, avhengig av hvor mye RNA som ble isolert
- PCR- Labnet International Inc. MultiGene

1f Utstyr og kjemikalier til punkt 2.6 Måling av genekspressjonen av endo V med kvantitativ real-time PCR

- Forward og revers primer fra Sigma Aldrich og eurofins, tabell 1 i vedlegg 2
- Quanta bio PerfeCT SYBR Green FastMix ROX 5000 Reactions
- Applied Biosystem life Technologies PowerUP SYBR Green Master Mix
- Agilent Technologies Stratagene Mx 3005P med MxPro
- 96-brønnersbrett- Applied Biosystems, MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate 0,1 mL

1g Utstyr og kjemikalier til punkt 2.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

- Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7,4 (1x) fra Sigma
- Automatvasker: Skan Washer 300 med PBST (0,05% tween 20) fra Molecular Devices
- DuoSet Human IL-2 Catalog no. DY202-05 og DY202 fra R&D Systems
 - Capture Antibody
 - Detection Antibody
 - Block Buffer
 - Reagent Diluent (0,1% BSA)
 - Streptavidin-HRP
 - Substrate Solution (H₂O₂ og tetramethylbenzidine)
 - Stop Solution (2N H₂SO₄)
- DuoSet Human TNF Catalog no. DY210 fra R&D Systems
 - Capture Antibody
 - Detection Antibody
 - Reagent Diluent (1% BSA)
 - Streptavidin-HRP
 - Substrate Solution (H₂O₂ og tetramethylbenzidine)
 - Stop Solution (2N H₂SO₄)
- DuoSet Human IL-10 Catalog no. DY317B-05 fra R&D Systems
 - Capture Antibody
 - Detection Antibody
 - Reagent Diluent (1% BSA)

- Streptavidin-HRP
 - Substrate Solution (H₂O₂ og tetramethylbenzidine)
 - Stop Solution (2N H₂SO₄)
-
- Biotek Synergy H1 Hybrid Reader
 - Sentrifuge- ThermoFisher Scientific Heraeus Fresco 21 Centrifuge
 - 96-brønnersbrett, Corning, Costar Assay Plate

1h Utstyr og kjemikalier til punkt 2.9 Polymerase kjedereaksjon (PCR) og agarose gelelektroforese

- GoTaq Green Mix fra Promega
- Forward og revers primer, 10 µM fra Sigma Aldrich og eurofins, tabell 1 i vedlegg 2
- TAE buffer (1x TAE, 0,04 M Tris-Acetat, 0,001 M EDTA pH 8,0)
- Ultra Pure agarose fra ThermoFisher Scientific
- SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen 10 000x in DMSO*, C₂₈H₂₈N₂O₃S₂) ThermoFisher Scientific
- PCR-maskin PTC-200 Peltier Thermal Cycler fra MJ Research
- DNA loading dye fra ThermoFisher Scientific
- Molekylvektsmarkør- ThermoFisher Scientific Gene Ruler Ladder Mix, 0,05 µg/mL (se vedlegg 4)
- Spenningskilde, EPS301 fra Amersham
- Geldokumentasjonsutstyr- Alpha Innotech, AlphaImager

1i Utstyr og kjemikalier til punkt 2.10 Aktivitetsassay

- BSA måling- ThermoFisher Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit
 - Pierce BCA Protein Assay Reagent A
 - Pierce BCA Protein Assay Reagent B
- NTEN lysis buffer (20mM Tris-HCl, pH 8,0)
- 100 mM NaCl
- IGEPAL for lysis fra Sigma Aldrich
- Antistoff, polyclonal: FIJ35220, 0,5 µg/µL fra Anti-FLJ35220 Antibody, AB69400 Abcam
- Agarosekuler, protein A/G Plus Agarose sc-2003 fra Santa Cruz Biotechnology
- NTEN wash buffer (150 mM NaCl, pH 8,0)

- Protease inhibitor cocktail (PIC) fra Merck
- Vanadyl ribonucleoside complex (VRC) fra NEB
- Dithiothreitol (DTT)) fra BioNordica
- Urea gel
 - Urea fra Sigma Aldrich (BioUltra for molecular biology, 99,5%)
 - 20 x Taurin
 - Long Ranger (LR) fra Lonza (Fischer Scientific)
 - 10% Ammonium persulfate (APS), OUS
 - TEMED fra Sigma Aldrich
- Reaksjonsbuffer, 50mM Tris-HCl pH 7,5, 2,5 mM MnCl₂, 250 mM KCl, 5 mM DTT, 25% glycerol
- RNaseout fra Life
- Stop Solution , 5% Bromfenolblå, 5% Xylen Cyanol, 10 mM EDTA i formamid
- Substrat, ssIIUI (5'-ACUGGACA[rI][rI]U[rI]CUCCGAGG)
- Spenningskilde, EPS301 fra Amersham
- Skanner: Typhoon 9410 Variable mode imager

Vedlegg 2- Gener med tilhørende primere

Tabell 1: Primersekvenser til gener målt på qPCR og PCR.

Gen	Navn på primer	Sekvens (5' -> 3')
Beta actin	B-act F	AGGCACCAGGGCGTGAT
Beta actin	B-act R	TCGTCCCAGTTGGTGACGAT
Endo V	Endo V –e3 F	CCTTCGTGAAAGGGGACAGT
Endo V	Endo V –e3 R	CCCCGTTTCCATCCACAAGA
Endo V	Endo V felles F1	ACCCACACCGAGGAGCC
Endo V	Endo V felles F2	ACCCACACCGAGGAGCC
282	282 F	TTGCCTGAGTCACTGTATTCC
Endo V	Endo V med ex3 F	Kan oppgis ved henvendelse
282	282 R	CTGGCTCCGAAGTTACATTA
308	308 R1	GTGCTCCACCTGAGGACTCT
308	308 R2	GGGTGCTCCACCTGAGGA
309	309 R1	TGGGCTGTGGTCCTGTG
309	309 R2	TCCTTGCCCGCCTGCTC
Alle isoformene (AI)	AI R1	ACTCTCCGGAGTCTCCTTTG
Alle isoformene (AI)	AI R2	GGAGTCTCCTTTGGGGCAT
TNF	TNF F	CCAGGCAGTCAGATCATCTTCTC
TNF	TNF R	GGAGCTGCCCCTCAGCTT
IL-10	IL-10 F	CTACGGCGCTGTCATCGAT
IL-10	IL-10 R	TGGAGCTTATTAAAGGCATTCTTCA
CD163	CD163 F	GCTGCAGTGAATTGCACAGATAT
CD163	CD163 R	CGGGATGAGCGACCTGTT

Vedlegg 3- Beregning av genuttrykk målt med qPCR

ΔC_T ble beregnet ved hjelp av formel 1, ved å subtrahere C_T verdien til referansegnet fra C_T verdien til målgenet.

$$\Delta C_T = (C_T)_m - (C_T)_r \quad (1)$$

C_T : Antall sykluser som skal til før fluorescenssignalet når grenseverdien

r: Referansegnet

m: Målgenet

$\Delta\Delta C_T$ ble beregnet ved bruk av formel 2, der den gjennomsnittlige ΔC_T verdien av kontroll cellene ble trukket fra ΔC_T verdiene til prøvene.

$$\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T)_m - \overline{(\Delta C_T)_k} \quad (2)$$

p: kontroll celler

Til slutt ble genuttrykket funnet ved å beregne $2^{-\Delta\Delta C_T}$, slik som i formel 3. Disse verdiene ble delt på gjennomsnittet av $2^{-\Delta\Delta C_T}$ verdiene for kontrollene.

$$G = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (3)$$

G: Genuttrykk

Eksempel:

Beregning av genuttrykket av 282 isoformen av endo V i THP1 celler, der beta actin er brukt som målgenet.

$$(C_T)_r = 15,75 \quad (C_T)_m = 28,065 \quad \overline{(\Delta C_T)_k} = 12,03666667$$

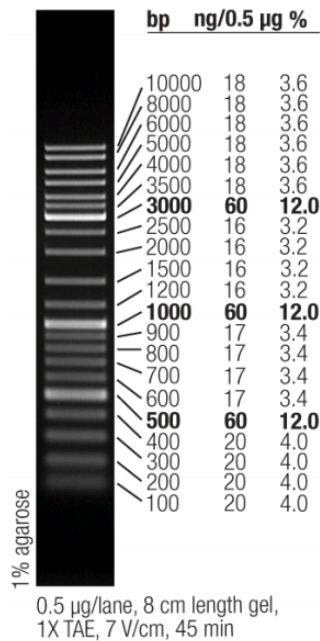
$$(\Delta C_T)_m = 28,065 - 15,75 = 12,315$$

$$\Delta\Delta C_T = 12,315 - 12,03666667 = 0,278333333$$

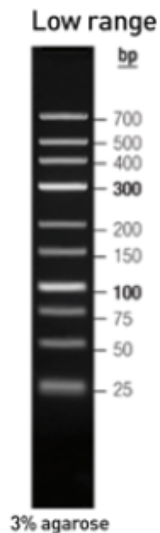
$$G = 2^{-0,278333333} = 0,824543017$$

Vedlegg 4- Molekylvektsmarkører

GeneRuler DNA Ladder Mix



Figur 1: **GeneRuler DNA Ladder Mix molekylvektsmarkør.** Denne molekylvektsmarkøren er for separasjon av DNA fragmenter mellom 100 og 10 000 basepar i 1% agarosegel med 1xTAE buffer. Den ble brukt til å identifisere PCR fragmenter på 1,5% agarosegel (ThermoFisher Scientific, u.å).



Figur 2: **GeneRuler DNA Ladder Mix Low range.** Denne markøren er for separasjon av DNA fragmenter mellom 25 og 700 basepar i 3% agarosegel med 1xTAE buffer. Den ble brukt til å identifisere qPCR produkter under optimaliseringen (ThermoFisher Scientific, u.å).