

Sorting Nexin 4 medierer korrekt kromosomoppstilling på ekvatorialplanet

SORTING NEXIN 4 MEDIATES CHROMOSOME CONGRESSION

ANE HOEL HØISETH

Went



UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP
INSTITUTT FOR KEMI, BIOTEKNOLOGI OG MATVITENSKAP (IKBM)
MASTEROPPGAVE 60 STP. 2012



Forord

Det praktiske arbeidet med denne oppgaven har blitt utført ved Institutt for kreftforskning, Avdeling for biokjemi ved Radiumhospitalet.

Takk til mine veiledere, Camilla Raiborg og Hilde Abrahamsen, for å ha delt sin ekspertise, samt god veiledning.

Takk til Harald Stenmark for at jeg fikk gjøre det praktiske arbeidet i forbindelse med min masteroppgave som del av hans gruppe. Ting ble godt lagt til rette for meg.

Takk til alle som har hjulpet meg, spesielt Eva Wenzel for hjelp på mikroskop for mikroskopi av levende celler.

Til slutt takk til min familie og venner, spesielt Simen og Tuva.

Oslo, mai 2012

Ane Hoel Høiseth

Sammendrag

Et screen satt opp i Stenmarklaboratoriet der det ble benyttet siRNA mot 70 proteiner som var potensielle medhjelpere i celledeling plukket opp proteinet Sorting Nexin 4 (SNX4) som en interessant kandidat å studere videre (upubliserte funn fra Stenmarklaboratoriet). Det ble funnet at celler som manglet SNX4 viste tegn til opphopning i prometafase, og det ble derfor bestemt å undersøke om SNX4 er en sann mediator av mitosen.

I denne oppgaven ble HeLa-celler transfektert med siRNA mot SNX4 for å undersøke effektene av SNX4-mangel i cellene. HeLa-kontrollceller og SNX4-knockdownceller ble fiksert på dekkglass og farget med SNX4-antistoffer før mikroskopering for å undersøke hvor SNX4 lokaliserer i cellen og om lokaliseringen av SNX4 var spesifikk i mitosen. Det ble også benyttet mikroskopering av levende celler for å kunne følge SNX4-depleterte celler gjennom mitosen for å grundigere kunne studere effektene av SNX4-knockdown.

Det ble funnet at SNX4-knockdownceller hadde en økning i andelen celler i tidlig mitose og en nedgang i andelen celler i cytokinese sammenliknet med kontrollceller. Ved konfokalmikroskopi av HeLa celler farget med SNX4-antistoff ble SNX4 funnet å lokalisere til spindelpolene i metafase. Cellefilmene fra mikroskopering av levende celler viste at SNX4-depleterte celler brukte lengre tid på å komme til anafase og hadde større andel celler som slet med å gjennomføre mitosen korrekt.

Funnene våre underbygger teorien vår om at SNX4 er en sann mediator av mitosen. Siden en økt andel av de SNX4-depleterte cellene slet med å komme seg til anafase og hadde problemer med å danne et organisert metafaseplan sammenliknet med kontrollcellene var det nærliggende å foreslå at SNX4 spiller en rolle i kromosomcongression. Det ble utarbeidet to ulike teorier om hvordan SNX4 påvirker kromosombevegelse. Den ene går ut på at SNX4 bidrar til å øke stabiliteten av den mitotiske spindelen ved å bringe spindelstabiliserende proteiner til spindelen i tidlig mitose. Den andre teorien er at SNX4 bidrar til motorproteinaktivitet i congression. Motorproteiner omgjør kjemisk energi til bevegelsesenergi og er essensielle for kromosomtransport i congression.

Knockdown av ulike proteiner som bidrar i disse operasjonene som det tenkes at SNX4 kan være med å styre gir de samme fenotypene som SNX4-knockdown. Dette styrker våre teorier ytterligere. Mye tyder på at SNX4 er en sann mediator av congression.

Abstract

A screen performed by members of the Stenmark laboratory where siRNA-mediated knock down of 70 proteins with a potential role in cytokinesis was performed, revealed a potential role for Sorting Nexin 4 (SNX4) in mitosis. Cells that lacked SNX4 seemed to stop up in prometaphase (unpublished findings from the Stenmark laboratory). Based on these initial findings we therefore decided to investigate whether SNX4 is a true mediator of mitosis.

HeLa cells were transfected with siRNA targeting SNX4 to investigate the effects of SNX4 deficiency in the cells. To determine where SNX4 localized in cells and if its localization changed during mitosis, HeLa cells were transfected with and control SNX4 siRNA, fixed on cover slips, and stained with antibodies before SNX4 microscopy. Lastly, we performed live-cell imaging of SNX4 depleted cells through mitosis in order to more thoroughly study the effects of SNX4 knockdown.

We found that SNX4 knock down cells had increased percentage of cells in early mitosis and a decreased percentage of cells in cytokinesis compared with control cells. Confocal microscopy of HeLa cells stained with antibody against SNX4 showed that this protein was localized to the spindle poles in metaphase. The live-cell imaging showed that SNX4 depleted cells spent more time in prometaphase and metaphase and had a higher percentage of cells that struggled to align their chromosomes properly and to complete mitosis.

Altogether our findings support our hypothesis that SNX4 is a true mediator of mitosis. Since a greater proportion of the SNX4-depleted cells were struggling to progress to anaphase and had alignment problems in metaphase compared with control cells, we suggest that SNX4 plays a role in chromosome congression. Knock down of various proteins involved in congression results in the same phenotypes as with SNX4 knock down, further strengthening our hypothesis. We therefore suggest two possible molecular mechanisms for SNX4 function in congression. The first considers that SNX4 contributes to the stability of the mitotic spindle by loading spindle stabilizing proteins on to the spindle in early mitosis. The second theory is that SNX4 contributes to motor protein activity in congression.

Forkortelser

°C	Grader Celsius
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
DDT	Dithithreitol
dsRNA	Dobbeltrådet ribonukleinsyre
LSCM	Laserskannende konfokalmikroskopi
mRNA	messenger ribonucleic acid
PBS	Phosphate buffered saline
RISC	RNA-induced silencing complex
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
FBS	fetal bovine serum (kalveserum)
SMC	Structural maintenance of chromosomes
SCC	Subunit of cohesin complex
CDK	Cyclin-dependent kinases
CENP	Centromere protein
KMN	KNL-1/Mis12 kompleks/Ndc80 kompleks
SAC	Spindle assembly checkpoint
APC/C	Anaphase promoting complex
CEP55	Centrosomal protein of 55 kDa
MAD	Mitotic-arrest deficient gene

BUB	Budding uninhibited by benzimidazole
CDC20	Cell-division cycle protein 20
MCC	Mitotic checkpoint complex
PP1	Protein fosfatase 1
PLK	Polo-like kinases
ESCRTIII	Endosomal sorting complex required for transport III
MKLP1	Mitotic kinesin-like protein 1
PtdIns	Phosphatidyl inositol
TACC3	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3
Ch-TOG	Colonic hepatic tumour overexpressed gene
CHC	Clathrin heavy chain
PI	Phosphoinositides
FYVE	Fab1p, YOTB, Vac1p and EEA1
PX	Phox homology
SNX4	Sorting Nexin 4
Oligo	Oligonukleotid
PVDF	polyvinylidfluorid

Generelle bemerkninger

Teksten er skrevet i «Times New Roman», skriftstørrelse 12, linjeavstand 1,5 og linjeavstand 1,15 i figurtekst.

Så langt det har latt seg gjøre, er norske navn og begreper benyttet, men engelsk er benyttet der det var fare misforståelse eller mangel på bedre ord.

Innholdsfortegnelse

Forord	1
Sammendrag	2
Abstract	3
Forkortelser	4
Generelle bemerkninger	6
Innholdsfortegnelse	7
Introduksjon	10
Celledeling kontrolleres gjennom cellyklus	10
Søsterkromatider separeres i mitosen	12
Kromosom congression	14
Celledeling trinn for trinn	16
Profase.....	16
Prometafase.....	17
Metafase	18
Anafase	19
Telofase.....	20
Cytokinese.....	21
Lipider og lipidassosierte proteiner i celledeling	22
Plasmamembranen	22
Vesikkeltransport	23
Vesikkelkappe-proteinet Klatrin	24
PI3P og PI3P bindende proteiner	26
Sorting nexin 4.....	27
Materialer og metoder	28
Materialer.....	28
A) Cellekultur:	28
B) siRNA/cDNA-transfeksjon:	28
C) Lysering og fiksering:	28
D) SDS-PAGE og western:.....	29
E) Immunfluorescens:	29
F) Mikroskop og visualisering av proteiner på PVDF membran:.....	29
Løsninger	29

A) Cellekultur:	30
B) siRNA transfeksjon:	30
C) cDNA-transfeksjon:	30
D) Lysering og fiksering:	30
E) SDS-PAGE og western:	31
F) Immunfluorescens:	31
G) Mikroskop og visualisering:	31
Metoder.....	32
Cellekultur.....	33
Prosedyre for cellekultur	34
Modulering av genuttrykk ved siRNA-transfeksjon.....	34
Prosedyre for siRNA-transfeksjon	35
cDNA-transfeksjon	35
Prosedyre for cDNA-transfeksjon.....	36
Lysering	36
Prosedyre for lysering	36
SDS-PAGE	37
Prosedyre for SDS-PAGE.....	39
Odyssey infrared imager	41
Prosedyre for odyssey infrared imager	41
Fiksering	42
A) Direkte fiksering i romtemperatur.....	42
Prosedyre for direkte fiksering i romtemperatur	43
B) Fiksering på is før permeabilisering.....	43
Prosedyre for fiksering på is før permeabilisering	43
C) Permabilisering før fiksering på is	43
Prosedyre for permeabilisering før fiksering på is	44
D) Metanolfiksering	44
Prosedyre for metanolfiksering	44
Immunfluorescens.....	44
Prosedyre for immunfluorescens	45
Laserskannende konfokal-mikroskop (LSCM).....	46
Prosedyre for konfokalmikroskopering	46

High throughput mikroskop	47
Prosedyre for high throughput mikroskopering	47
Mikroskopi av levende celler	48
Prosedyre for mikroskopi av levende celler – Delta Vision	49
Kort om statistikk som ble benyttet	50
Resultater.....	51
SNX4-knock down fører til økning av andelen celler i tidlig mitose og reduksjon av antall celler i cytokinese.	51
2 dagers knock down av SNX4 gir størst økning av celler i tidlig mitose	55
SNX4 lokaliserer til spindelpolene.	58
Celler med mindre SNX4 brukte lengre tid i prometafase og har vanskeligheter med å gjennomføre korrekt mitose og cytokinese	63
Diskusjon.....	72
Konklusjon	76
Referanseliste	77

Introduksjon

Mange celler i kroppen har en relativt begrenset levetid, som vil si at de bare kan dele seg noen få ganger. Derfor er cellene avhengig av at mitosen, som er prosessen der cellen deler seg i to like datterceller, foregår korrekt. Slik kan de gi opphav til friske nye celler som etter hvert skal erstatte deres funksjon i kroppen. Mitosen inneholder mange sentrale punkter som er nødt til å foregå korrekt, for at mitosen skal være vellykket. Cellen må for eksempel ikke begynne segregering av arvestoffet (DNA) før alt er festet langs midten av cellen, på ekvatorialplanet. Det er også flere sjekkpunkter i løpet av cellesyklus, som sørger for at alt DNAet i cellen kopieres korrekt og at cellen har alt den trenger for å gå inn i mitose. Dersom noe går galt i mitosen og DNAet blir fordelt ulikt, kan dette føre til celledød eller alvorlig sykdom som kreft.

Det er et velkjent fenomen at kreftceller har et unormalt antall kromosomer. Denne tilstanden, som kalles aneuploidi, oppstår ofte når cellens egne kontrollmekanismer ikke fungerer som de skal og ikke klarer å sørge for at det dupliserte genomet fordeles likt mellom de to dattercellene i mitosen. Det er nylig vist en sammenheng mellom aneuploidi og store genomiske ustabiliteter slik som translokasjon og delesjon^{1,2} noe som kan tyde på at aneuploidi ofte kan være årsaken til kreftutvikling. I denne oppgaven har vi studert hvordan proteinet Sorting Nexin 4 (SNX4) er med på å kontrollere at cellen får sitt genom korrekt fordelt på to datterceller i mitosen.

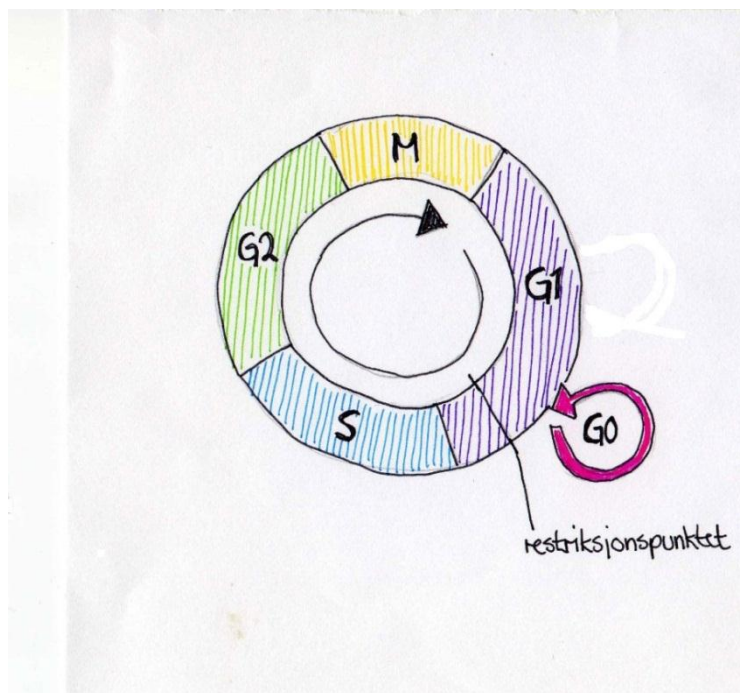
Celledeling kontrolleres gjennom cellesyklus

Hovedoppgaven til cellesyklusen er å kopiere alt DNAet i cellen og fordele kopiene korrekt til to datterceller³. I eukaryote celler består cellesyklus av fire faser; G1-, S-, G2- og M-fase⁴ (Figur A). I mange tilfeller opphører celledelingen og da går cellene ut av aktiv celledeling og inn i en hvilefase som kalles G0⁵.

G1-fasen er begynnelsen på cellesyklus og starter rett etter endt celledeling. Denne fasen er et kontroll- og vekststadium hvor det sjekkes om miljøet er gunstig nok for at cellen skal kunne gjennomføre en ny deling⁶. Hvis forholdene ikke er tilrettelagt for deling går cellen over i en hvilefase (G0), mens hvis cellen kommer seg forbi restriksjonpunktet går den videre til S-fasen hvor DNA replikeres⁵. I slutten av S-fasen er det fordoblede DNAet i cellen sterkt tvunnet sammen og par med dupliserte kromosomer holdes sammen av Kohesin. Kohesin er

et proteinkompleks bestående av proteinene Structural Maintenance of Chromosomes 1 (SMC1), SMC3, Subunit of Cohesin Complex 1 (SCC1) og SCC3 som binder som en ring rundt søsterkromatidene. De binder søsterkromatidene sammen langs hele lengden i prometafase, men i metafase er det kun kohesin igjen ved centromeren. Binding av kohesiner til DNA belyses i ”The sister bonding of duplicated chromosomes” av Hui Zou ⁷. Etter DNA-dupliseringen går cellen videre til den andre vekstfasen (G2) som også er et kontrollstadium ⁶. Her sjekkes det om alt DNAet er replikert og om miljøet er gunstig nok for at cellen skal kunne starte DNA-separasjonen i mitosen (M) ⁶. Avsnøringen av de to cellene er siste steget av celledelingen og sørger for at de to cellene er helt separate når de starter på en ny runde i cellyklusen.

Cyclin-dependent kinases (CDKs) er viktige komponenter i cellykluskontrollsystemet ⁸. Disse kinasene er regulert av en gruppe proteiner som kalles Cykliner ⁸. Når Cyklin er tilstede kan det dannes Cyklin-CDK komplekser ⁸. Avhengig av hvilken Cyklin og CDK som kombineres kan disse aktivere de ulike fasene av cellyklusen ^{8,9}. Det er fire hovedtyper av Cykliner (D, E, A og B) og de ulike Cyklin-CDK kompleksene refereres ofte til som G1-, G1/S-, S- og M-Cyklin/CDK komplekser ^{8,9}. Mitosen, som kontrollerer korrekt separasjon av DNA, settes igang når aktiviteten av CyklinB/CDK1 komplekset er tilstrekkelig høyt ^{9,10}. I denne oppgaven har vi fokusert på prosesser som kontrollerer mitosen. For å sette våre funn i en sammenheng med mitotiske prosesser vil vi derfor videre fremheve viktige hovedtrekk ved mitosen som er relevant for dette arbeidet.



Figur A: Cellyklus

Cellyklus kan deles inn i fasene G1, S, G2 og mitose (M). I G1 gjøres det forberedelser til DNA-replikasjon i S-fase. I G2 kontrolleres det at alt er klart før cellen starter på mitosen. G0 er et hvilestadium som cellen kan innta hvis den ikke er klar for å starte på en ny cellyklus. Cellen må komme seg forbi restriksjonspunktet for å starte på en ny cellyklus.

Søsterkromatider separeres i mitosen

DNAet eller arvestoffet vårt inneholder den genetiske informasjonen eller de gener som alle celler benytter for sin utvikling og overlevelse. For at cellen skal fungere optimalt må alle genene være tilstede og ikke inneholde eller akkumulere mutasjoner som endrer funksjonen til det proteinet genet koder for. Størstedelen av DNAet i cellen er surret rundt oktameriske proteiner som kalles histoner^{11, 12}. Histon med DNA surret rundt kalles et nukleosom og disse pakkes sammen til plassbesparende kromatinfibre i cellen^{12, 13}.

Pakkingen av DNAet i cellen endrer seg i løpet av en celledyklus. I G1 og G2 foregår det aktiv transkripsjon fra DNAet mens i S-fase må DNAet være tilgjengelig for replikasjonsmaskineriet som er ulike proteiner som sørger for replikasjon av DNAet¹². I disse fasene er DNAet løse kromatinfibre¹². Etter replikasjon og når cellene begynner mitosen er det viktig at kromatinfibre blir pakket sammen i kromosomer som inneholder spesielle strukturer, som centromerer og kinetokorer^{14, 15}. Hvert kromosom består da av to søsterkromatider og en sentral region som er med på å holde de to DNA-kopiene sammen. Denne sentrale regionen av kromosomene kalles centromeren og består i all hovedsak av nucleosomer dannet av histonvarianten Centromere protein A (CENP-A)^{15, 16} og fungerer som en plattform for dannelsen av kinetokoren. Kinetokoren er essensiell for korrekt separering av søsterkromatidene i mitosen, ved å mediere kontakt med den mitotiske spindelen^{3, 15-17}.

Kinetokorene består av en indre kinetokor, ytre kinetokor og corona¹⁵. Den indre kinetokoren består av histon 3(H3)-homologen CENP-A og mange andre CENP-proteiner¹⁵. Den ytre kinetokoren utgjøres av blant annet Ndc80 og KNL-1 som er deler av KNL-1/Mis12 kompleks/Ndc80 kompleks (KMN) nettverket, som er viktig for bindingen mellom kinetokor og mikrotubuli og overføring av kraft mellom disse^{18, 19}. Den ytre kinetokoren lager et bindested for Spindle assembly checkpoint (SAC) og motorproteiner i mitosen og dette bindestedet kalles corona¹⁵. SAC er et sjekkpunkt før utgangen av mitosen og hindrer start av prematur anafase^{15, 20}. Hvis et kromosom ikke kan spesifisere hvor kinetokoren skal være, kan ikke kromosomet feste seg på den mitotiske spindelen og vil derfor heller ikke segregeres i mitosen.

Centrosomene koordinerer dannelsen av den mitotiske spindelen

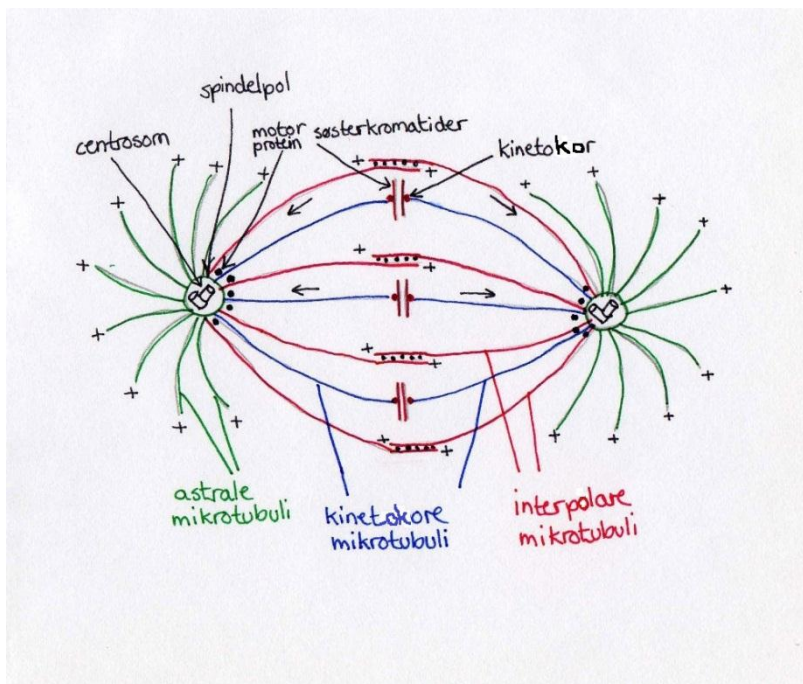
Den mitotiske spindelen består av mikrotubuli og bygges opp fra mikrotubuliorganiserende senter, som også kalles for centrosom²¹. Centrosomet inneholder to centrioler, som står vinkelrett på hverandre og består av ni tripletter av mikrotubuli arrangert i en sirkel. Centriolene blir duplisert i S-fase og følger sin egen centriolesyklus som går parallelt med cellesyklusen²². En proteinmasse kalt perisentriolar materiale (PCM) er også å finne i centrosomet^{23,24}. Når cellene går inn i mitosen modnes centrosomene ved at en rekke PCM proteiner rekrutteres til denne regionen^{25,26}. PCM består av diverse proteiner inkludert gammatubulin-ringkomplekset som fungerer som et templat for polymeriseringen av tubulin og er nødvendig for spindeldannelsen^{25,26}.

Mikrotubuli er dannet av tauliknende polymerer av alfa- og betatubulin¹⁶. Alfa- og betatubulindimerer er satt sammen til protofilamenter, og det er 12-15 protofilamenter i en mikrotubuli¹⁶. Den mitotiske spindelen består av astrale, kinetochore og interpolare mikrotubuli²⁷ (Figur B). Astrale mikrotubuli stråler ut mot periferien av cellen^{27,28}. Kinetokore mikrotubuli binder til kinetokorene på kromosomene, mens interpolare mikrotubuli binder til interpolare mikrotubuli fra motsatt pol²⁹. De kinetokore mikrotubuli går sammen om å danne bunter av 20 til 40 mikrotubuli som kalles k-fibre og stabiliserer bindingen til kinetokoren³⁰. På grunn av polariteten til tubulindimerene får også den mitotiske spindelen en polaritet, der minusenden av mikrotubuli vender inn mot centrosomet og plussenden vender vekk fra dette¹⁶.

Den mitotiske spindelen er også viktig for korrekt segregering av kromosomer i mitosen^{14,21}. Spindelen har en bipolar symmetrisk oppbygning, noe som vil si at den består av to like halvdelar av mikrotubuli fra hvert sitt centrosom²⁹ (Figur B). Spindeloppbygging starter ved at de to centrosomene beveger seg til hver sin pol i cellen²¹. Denne prosessen krever motorproteiner²¹. Motorproteiner har evnen til å omgjøre kjemisk energi i form av ATP til bevegelsesenergi og har ofte en ønsket retning for bevegelse langs polare cytoskjelett²¹. Eksempler på motorproteiner er Dynein som beveger seg mot minusenden til mikrotubuli og Kinesin som beveger seg mot plussenden til mikrotubuli^{16,19,27}. Etter nedbrytningen av kjernemembranen, som avgrensner kjernen i eukaryote celler, blir det mulig for de interpolare mikrotubuli å møtes på ekvatorialplanet^{21,29}. De interpolare mikrotubuli danner en bipolar spindel ved å interagere med hverandre ved hjelp av kryssbindende proteiner^{21,29}. Astrale

mikrotubuli forankrer den mitotiske spindelen i cellecortex og bestemmer dens posisjon i forhold til utkanten av cellen^{28,29}. Cellecortex er et aktinnettverk som bestemmer cellens form og er en basis for spindeloppbygging i tillegg til å styre spindelorientering²⁸.

I dyreceller er det observert at den mitotiske spindelen også kan dannes på en kromosomstyrt måte selv om cellen har centrosomer eller i fravær av centrosomer^{21,31,32}. Denne ikke-centrosomale typen mikrotubulipolymerisering starter etter nedbrytning av kjernemembranen²¹. Polymeriseringen starter da i nærheten av kromosomene og stråler ut i alle retninger²¹. Disse tilfeldig orienterte mikrotubuli oppnår trolig symmetri og bipolaritet ved å bli sortert av ikke-motorproteiner og motorproteiner²¹. Interpolare mikrotubuli sørger for å dytte de to polene fra hverandre og bidrar til kromosomsegregeringen som skjer i anafase av mitosen³³. Spindelen brytes ned senere i mitosen etter segregeringen av kromosomene er fullført²⁹.



Figur B: Den mitotiske spindelen

Den mitotiske spindelen består av astrale, kinetokore og interpolare mikrotubuli. Mikrotubuli polymeriseres ut fra centrosomene. Astrale mikrotubuli stråler ut mot periferien av cellen og forankrer cellen i cellecortex. Interpolare mikrotubuli fra de to centrosomene møtes på midten og binder til hverandre. Kinetokore mikrotubuli fra hvert

centrosom binder til kinetokorene på søsterkromatidene. Motorproteiner omgjør ATP til bevegelsesenergi og kan frakte molekyler i en gitt retning langs mikrotubuli.

Kromosom congression

Den mitotiske spindelen er en viktig strukturell enhet i mitosen som sørger for at kromatidene legger seg på ekvatorialplanet. Prosessen som bidrar til å orientere kromosomene på ekvatorialplanet kalles congression og drives av mikrotubulipolymerisering og kinetokoraktivitet^{27,91}. Det første som må skje i congression er at kinetokorene må fanges opp

av mikrotubuli¹⁴. Kinetokoren fester seg til den første mikrotubulen som den treffer på ved å binde langs mikrotubuli, altså på en lateral måte¹⁴. Den andre kinetokoren på kromosomet kan når som helst bli koblet til mikrotubuli, altså samtidig med den første kinetokoren eller senere²⁷. Den andre kinetokoren kan bli festet til mikrotubuli ved lateral kobling eller ved festing til plussenden av mikrotubuli, men begge kinetokorene skal til slutt ende opp med å være festet til mikrotubuliplussenden¹⁴.

Kinetokorene kan bli monotelisk festet dvs. at det kun er den ene kinetokoren som blir festet til mikrotubuli³⁴. Andre muligheter er at kinetokoren blir syntelisk, merotelisk eller amfitelisk festet^{15, 20, 27, 34, 35}. Amfitelisk festing er når kinetokorene er bundet til mikrotubuli fra hvert sitt centrosom¹⁵. Dette regnes som en riktig festing av kinetokorene til mikrotubuli og gir en biorientering av kinetokorene¹⁵. Det vil si at kromosomet blir trukket i motsatte retninger³⁴. Fordi kinetokorene er festet til motsatte centrosomer blir det en spenning mellom kinetokor og centrosom og mellom kinetokorene³⁴. Ved syntelisk festing er mikrotubuli fra et og samme centrosom festet til begge kinetokorene¹⁵. Dette gir ikke spenning mellom kinetokorene³⁴. Dermed vil kromosomet bli trukket mot den ene spindelpolen og henge løst der, fordi det ikke er forankret til begge centrosomene³⁴. Merotelisk festing har man når mikrotubuli fra begge centromerene binder til samme kinetokor¹⁵. Denne kinetokoren er også biorientert, men her vil en og samme kinetokor bli dratt mot begge centrosomene^{34, 35}.

Mitotic-arrest deficient gene 1 (MAD1), MAD2, Budding uninhibited by benzimidazole R1 (BUBR1) og BUB1 er noen av genene som er viktige for sjekkpunktet som kalles SAC¹⁵. SAC hindrer celler å starte anafase før alle kinetokorene på kromosomene er festet til mikrotubuli på en amfitelisk måte²⁰. Det antas at SAC kan gjenkjenne om alle kinetokorer er festet til mikrotubuli og om denne festingen er biorientert¹⁵. Måten som SAC hindrer anafase på er blant annet ved å hemme Cell-division cycle protein 20 (CDC20) som er en kofaktor av Anaphase promoting complex/Cyclosome (APC/C), som setter i gang anafase¹⁵. I tillegg tenkes det at Mitotic checkpoint complex (MCC), som inneholder SAC-proteinene MAD2, BUBR1 og BUB3, er en SAC-effektor¹⁵. MCC hindrer trolig enzymaktiviteten til APC/C. Andre SAC-proteiner trengs for å forsterke SAC-signalet¹⁵. Det finnes også noen teorier om at SAC bare kan gjenkjenne festing og ikke spenning^{34, 36}.

Dersom SAC er aktivert vil dette bremse ned cellen slik at den ikke begynner anafase, men får tid til å fikse problemet før den kan fortsette til anafase. Ved feil festing mellom kinetokor og mikrotubuli må bindingen brytes av kinasen Aurora B^{19, 20}. Aurora B har sin kinaseaktivitet

konsentrert ved centromeren³⁵. Når det er spenning mellom kinetokorene vil KMN-nettverket, som sitter på kinetokoren og er ansvarlig for bindingen mellom kinetokor og mikrotubuli, bli dratt vekk fra centromeren^{18,35}. Dette gjør at Aurora B ikke lenger når komponenter av KMN-nettverket og ikke kan fosforylere disse. Dermed blir ikke bindingen mellom KMN og mikrotubuli brutt, men stabilisert³⁵. Hvis det derimot ikke er spenning mellom kinetokorene som ved monotelisk, syntelisk eller merotelisk kobling vil KMN-nettverket være nær nok Aurora B-aktiviteten slik at det blir fosforylert og kontakten kan rettes opp³⁵. Slik får kromosomet et nytt forsøk på å bli festet korrekt til mikrotubuli via kinetokoren.

Etter at kinetokoren har blitt festet til mikrotubuli, kan kromosomet bli fraktet av det kinetokorlokaliserte motorproteinet Dynein i minusretning til centromeren^{16,19,27}. Inne ved centrosomet sørger kinasen Aurora A for å aktivere den kinetokorlokaliserte kinesinen CENP-E^{15,19}. Dette skjer ved at protein fosfatase 1 (PP1) fosforyleres slik at denne kan slippe taket på CENP-E armene som så kan binde til mikrotubuli^{19,27}. Hvis kinetokorene er amfitelisk festet kan kromosomet transporteres til ekvatorialplanet ved mikrotubulidepolymerisering i kombinasjon med CENP-Eaktivitet²⁷. Alternativt kan kromosomer, der kun en kinetokor er festet til mikrotubuli, bli transportert mot ekvatorialplanet av CENP-E og få den andre kinetokoren festet til mikrotubuli under denne transporten²⁷. Det finnes diverse ulike teorier om hvordan transporten av kromosomene til ekvatorialplanet foregår i detalj, og sannsynligvis er transporten til hvert enkelt kromosom unik²⁷.

I det øyeblikket alle kromosomene har oppnådd biorientering kan cellene gå videre til anafase der separasjonen av søsterkromatidene finner sted. Da strippes SAC-proteiner av kinetokoren¹⁵. Når biorientering er oppnådd begynner dessuten ødeleggelsen av kohesin, et protein som holder søsterkromatidene sammen, og derigjennom tillates separasjonen av DNAet^{7,15}. Når kromosomene er tilstrekkelig langt fra hverandre kan de pakkes inn i separate kjerner i telofase.

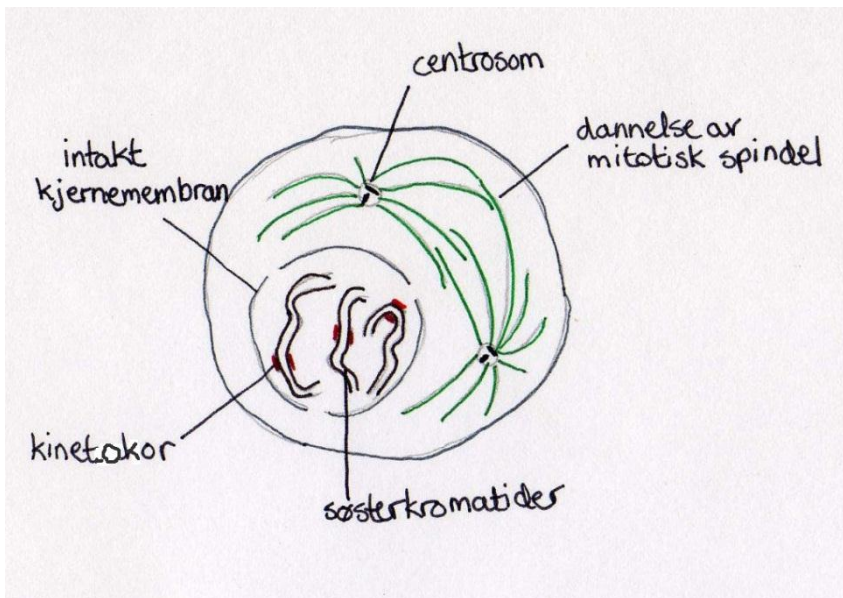
Celledeling trinn for trinn

Profase

I profase kondenseres kromosomene og de to centrosomene begynner å bevege seg til hver sin pol i cellen^{22,37} (Figur C). Samtidig polymeriseres tubulin fra gammatubulin-ringkomplekset^{25,26} i de to centrosomene og den mitotiske spindelen bygges opp¹⁶.

Cyklin avhengig kinase 1 (CDK1) er en kinase som driver cellen inn i mitose^{9,38}. Aktiviteten til CDK1 øker som følge av en økning i CyklinB⁹. CDK1 fosforylerer ulike proteiner i samarbeid med andre mitotiske kinaser for eksempel Polo-like kinases (PLK) og Aurorakinaser^{4,37}. Disse fosforyleringene fører blant annet til oppbygging av den mitotiske spindelen³⁷. PLK er viktig for at den bipolare mitotiske spindelen skal bli satt riktig sammen³⁷. Proteiner som styrer oppbygging og stabilitet av spindelen kontrolleres av Aurora A³⁷. Aurora B derimot sørger for at søsterkromatidene korrekt festes til spindelen³⁷.

Aurora A- og Aurora C-kinasene finnes på centrosomer³⁹. Aurora B-kinasen er lokalisert til kinetokorer i profase før den forflytter seg til sentralspindelen og cytokinesebroen senere i M-fasen^{39,40}. Disse kinasene er kun fosforylert i M-fase og antistoffer som gjenkjenner den fosforylerte formen brukes ofte som markører for å identifisere mitotiske celler i mikroskopet⁴¹.



Figur C: Profase

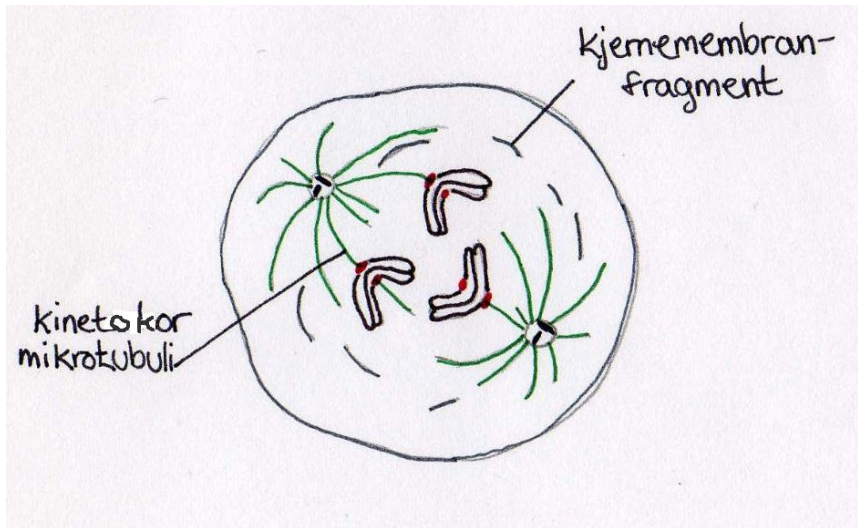
I profase beveger centrosomene seg til hver sin pol og den mitotiske spindelen bygges opp. Kjernemembranen er fortsatt intakt og søsterkromatidene holdes sammen over hele deres lengde.

Prometafase

Nedbrytning av kjernemembranen markerer starten av prometafase³⁷. Kjernemembranen består av to adskilte membraner som omslutter det genetiske materialet i cellen⁴². Den ytre membranen er kontinuerlig med kornet endoplasmatiske retikulum, som er en organelle som danner membrantubuler og -cisterner og blant annet er et sted for proteinsyntese^{42,43}.

Nedbrytningen av kjernemembranen gjør at kromosomene kan festes til spindelen og i prometafase er det en dynamisk aktivitet i spindelapparatet som resulterer i at søsterkromatidene blir koblet til hver sin spindelpol gjennom forankring til kinetokorene¹⁶

(Figur D). Festing av søsterkromatidene til spindelen, kondensering av kromosomene og reorganisering av søsterkromatidene er også et resultat av CDK1-, Aurorakinase- eller PLK-aktivitet^{8-10, 37, 38}. I dyreceller trigger CDK1 også reorganisering av Aktin og golgi og nedbrytning av kjernemembranen³⁷.

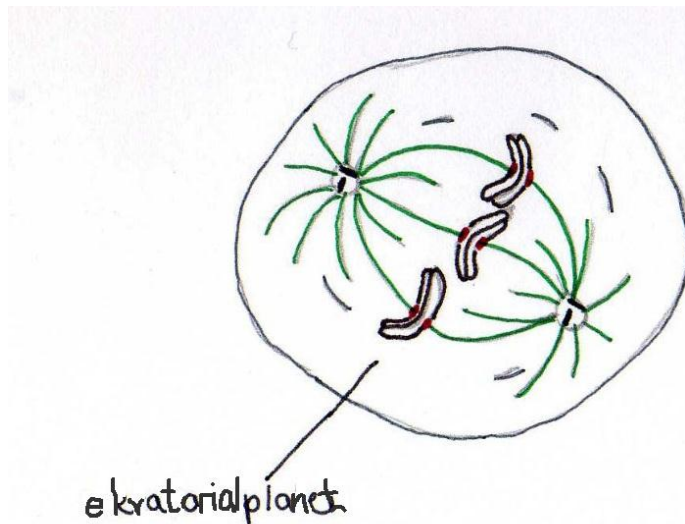


Figur D: Prometafase

I prometafase brytes kjernemembranen ned og kinetokorene festes til mikrotubuli.

Metafase

Alle kromosomene er oppstilt med centromeren langs ekvator av cellen i metafase¹⁶ (Figur E). Ekvator er en imaginær linje midt mellom spindelpolene som deler cellen i to like deler³⁷. I metafase er kromosomene festet til begge spindelpolene via kinetokore mikrotubuli^{15, 37}. Metafase utgjør et viktig sjekkpunkt før anafase¹⁵. Det vil si at det ikke kan skje noen separasjon av søsterkromatider før alle kromosomer er festet til mikrotubuli¹⁵. Dette er for å hindre prematur anafase¹⁵. Når betingelsene for metafase er oppfylt, vil CDK1 aktivere APC/C³⁷. Dette komplekset setter i gang nedbrytning av Securin, A- og B1-Cycliner noe som er en forutsetning for at anafase kan begynne⁴⁴.



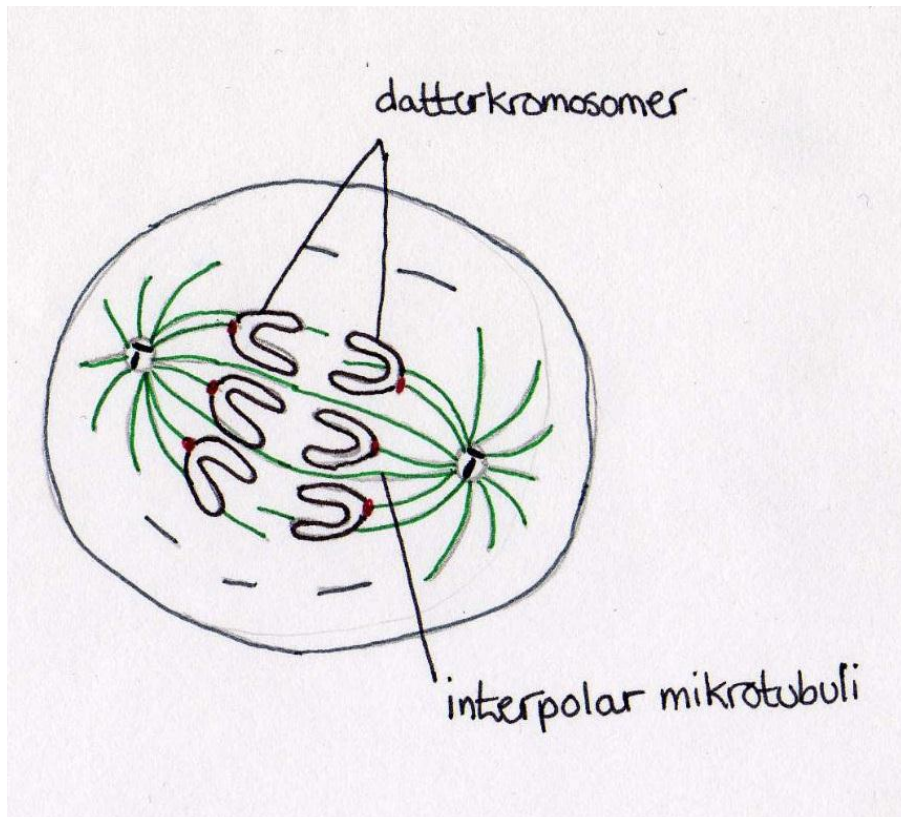
Figur E: Metafase

I metafase er alle kromosomene oppstilt langs cellens ekvatorialplan.

Anafase

APC/C er medlem av Ubiquitin-ligasefamilien av enzymer og er en viktig regulator av overgangen fra metafase til anafase ^{15, 44, 45}. Securin binder seg til proteinet Separase i cytosol. Når Securin er bundet til Separase, er Separase inaktivt ¹⁵. Separase er en protease som degraderer Kohesin, som er et stort proteinkompleks som sørger for at søsterkromatider holdes sammen ^{7, 15}. Kohesin består av to SMC-proteiner og to SCC-proteiner ⁷. SMC-proteinene er coiled coil-proteiner med ATPasedomene i den ene enden ⁷. SCC-proteinene binder sammen SMC-proteinene til en ring ⁷. Når APC/C degraderer Securin, frigir Securin Separase ¹⁵. Separase kan så degradere Kohesin, slik at søsterkromatidene skilles ¹⁵.

Søsterkromatidene separeres til datterkromosomer i anafase ³⁷ (Figur F). Dette skjer synkront for alle kromatidene. Anafase deles inn i anafase A og B ⁴⁶. I anafase A depolymeriseres kinetokore mikrotubuli og i anafase B skyves spindelpolene fra hverandre ved hjelp av interpolare mikrotubuli ⁴⁶.

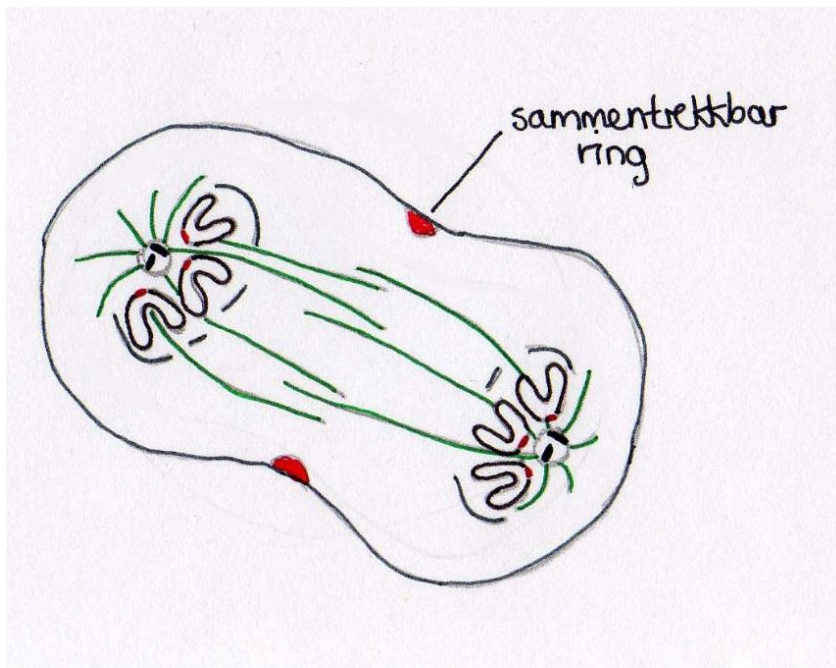


Figur F: Anafase

I anafase segregeres datterkromosomene til hver sin pol.

Telofase

Ved telofase har datterkromosomene nådd spindelpolene ^{27, 47} (Figur G). Telofase markeres av at den mitotiske spindelen brytes ned som en følge av CyklinB-ødeleggelse og defosforylering av mitosepromoterende proteiner ⁴⁴. Så skjer det gjenoppbygging av kjernemembranen og kjernelamina ^{27, 37}. Kjernelamina er et nettverk av intermediære filamenter inne i eukaryote cellekjerner ⁴⁸. Dette nettverket støtter kjernemembranen strukturelt ⁴⁸. Kromosomene dekondenserer til løse kromatinfibre og kjernen vokser ¹⁶. Alt dette gjør at cellen kan starte med transkripsjon av gener igjen ¹³. Telofase markerer slutten på mitosen ²⁷.



Figur G: Telofase

I telofase har datterkromosomene nådd spindelpolene og kjernemembranen gjendannes.

Cytokinese

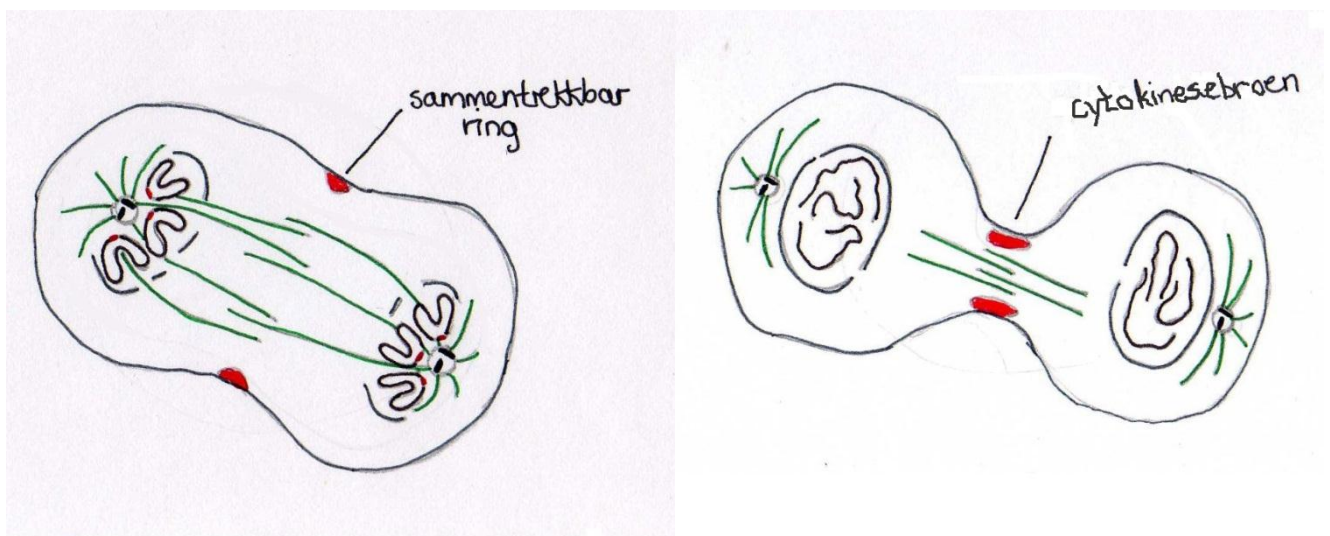
Cytokinesen initieres i anafase og er delingen av cytoplasma, slik at de to dattercellene deles fullstendig, ved hjelp av en sammentrekkbar ring^{49,50} (Figur H). Cytoskjelettet har en viktig oppgave i å definere midten av den mitotiske cellen, og dette gjøres ved dannelse av cytokinesebroen med overlappende antiparallelle mikrotubuli i overgangen mellom anafase og telofase⁴⁹. Den sammentrekkbare ringen, som består av aktinfilamenter, myosin II-filamenter og ulike regulatoriske og strukturelle proteiner, settes sammen under plasmamembranen i anafase og deler gradvis cellen i to når den trekker seg sammen^{4,49,51}.

PLK er nødvendig for initiering av cytokinesen^{52,53}. RhoA-GTPasen aktiverer oppbyggingen av den sammentrekkbare ringen og selve sammentrekningen og blir selv rekruttert av PLK⁵³. PLK er også, i tillegg til bl.a. CDK1, nødvendig for rekruttering av proteinet Centrosomal protein of 55 kDa (CEP55) til cytokinesebroen⁵⁴. CEP55 har som oppgave å rekruttere diverse proteiner som bidrar til kløvingen av cellen ved cytokinesebroen, som er den tynne koblingen mellom de to delende cellene som oppstår mot slutten av cytokinesen⁴⁹.

Endosomal Sorting Complex Required for Transport III (ESCRTIII) rekrutteres av CEP55 og har som oppgave å snøre sammen cytokinesebroen mot et kuttsted ved en av endene til

cytokinesebroen^{49, 55, 56}. ESCRTIII rekrutterer Spastin som kutter over mikrotubulibunten i cytokinesebroen på dette stedet^{47, 49, 57}. Hvordan membranen så splittes for å dele cellen fullstendig er fortsatt usikkert.

Det finnes et avsnøringssjekkpunkt i cytokinesen som kalles NoCut som stopper avsnøring av dattercellene når det er kromosomer som henger igjen i broen^{49, 58}. Aurora B har en sentral rolle i NoCut ved at det fosforilerer det sentrale spindelproteinet Mitotic kinesin-like protein 1 (MKLP1), som fører til forlengelse av avsnøringen av cytokinese^{49, 59}. PLK er også ansvarlig for å inaktivere CEP55 ved fosforilering, slik at CEP55 ikke lokaliserer for tidlig til cytokinesebroen^{49, 60}. På denne måten kan det hindres en for tidlig cytokinese⁴⁹.



Figur H: Cytokinese

Cytokinese er deling av cytoplasma og denne prosessen foregår parallelt med siste del av mitosen.

Lipider og lipidassosierte proteiner i celledeling

Plasmamembranen

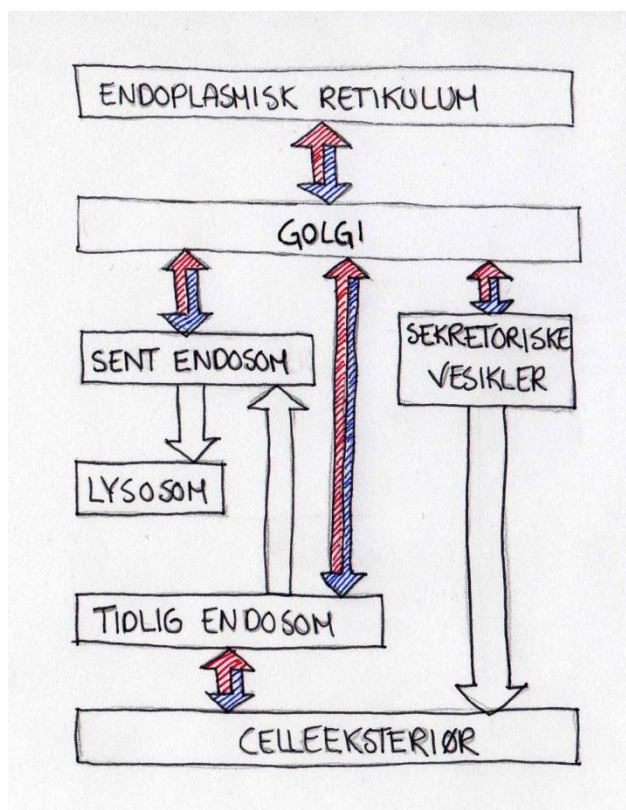
Plasmamembranen består av et dobbeltlag av lipider som omringer cellen. Plasmamembranen er en barriere mellom cytoplasma og ekstracellulært rom og holder dermed vedlike forskjellene mellom disse. Plasmamembranens oppgave i mitosen er blant annet å være et forankringssted for astrale mikrotubuli, slik at den mitotiske spindelen forankres i cellecortex^{27, 28}. Plasmamembranen holder også alle bestanddeler i cellen samlet til en hver tid og deler

også de to cellene i to datterceller i cytokinese ved hjelp av cytoskjelettet og den sammentrekkbare ringen.

Vesikkeltransport

I interfase sørger aktiv membrantransport for utveksling av makromolekyler og membraner mellom ulike membranomsluttede rom i cellen (vesikler) og plasmamembranen^{61, 62}. Dette systemet inkluderer både den biosyntetiske-sekretoriske transportveien og den endocytiske transportveien⁶³.

Den biosyntetiske-sekretoriske transportveien utgjør transport mellom endoplasmatisk retikulum (ER) og Golgiapparatet av makromolekyler syntetisert i cellen og videre sekresjon av disse via vesikler til plasmamembranen^{43, 63, 64}. Endocytose går ut på at proteiner i plasmamembranen eller komponenter fra ekstracellulært rom pakkes i en innbuktning av plasmamembranen, som snøres av til en endocytisk vesikkel^{61, 62}. Disse komponentene kan være makromolekyler, partikler eller andre celler i noen tilfeller^{61, 62}. Den endocytiske vesikkelen smelter sammen med tidlige endosomer⁶¹. Fra tidlige endosomer kan komponentene fraktes via vesikler til sene endosomer og lysosomer, til Golgiapparatet eller resirkuleres tilbake til plasmamembranen⁶¹ (Figur I).



Figur I: Vesikkeltransport

Figuren viser de ulike transportveiene som en vesikkel kan benytte seg av i cellen. Fra sene endosomer kan vesikkelen fraktes til Golgiapparatet eller lysosomer. Lysosomene er membranomsluttede rom fylt med enzymer som degraderer innholdet i vesikkelen⁶³. Golgiapparatet er en organelle som er et viktig sted for karbohydratsyntese i tillegg til modifisering, sortering og pakking av ulike makromolekyler for sekresjon⁶⁴. Fra Golgiapparatet kan vesikkelen transporteres til endoplasmatisk retikulum (ER), tilbake til sene endosomer eller via sekretoriske vesikler til plasmamembranen^{43, 64}. Hvor den blir fraktet avhenger av hva den inneholder.

Under mitose og cytokinese foregår det dramatiske strukturelle endringer av cellens fasong²⁸. Fra å være flat og utstrakt i interfase, runder den seg opp i metafase og strekker seg igjen ut fra anafase til cytokinese²⁸. Denne modelleringen krever dynamisk aktivitet av cytoskjelettstrukturer og cellens membransystem²⁸.

Cellen runder seg opp og cellecortex strammes tidlig i mitosen som følge av endringer i aktincytoskjelettet. Blokkering av eksocytose bidrar også ved å gi en endring i forholdet mellom overflate og volum. Den mitotiske spindelen må forankres i cellecortex og dette gjøres trolig ved at endene på astrale mikrotubuli interagerer med aktinnettverket. Dette gjør at spindelen spennes fast slik at gunstig posisjonering og orientering av spindelen kan oppnås. Rollen til aktin i mitose belyses i ”The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning” av Patricia Kunda et al²⁸.

Fordi to celler skal dannes fra én i løpet av cellesyklusen, må alle bestandeler i cellen fordobles. Dette gjelder også for plasmamembranen. I cytokinesen er innsetting av ny membran nødvendig for at celleoverflaten skal bli stor nok for hver celle og for at hullet mellom dattercellene skal tettes. Det er litt uenighet om hvor disse vesiklene kommer fra. Noen mener at disse vesiklene kommer fra Golgi^{72,73}, mens andre mener at dette er endosomvesikler⁴. Det er vist at ulike lipider akkumuleres ved den sammentrekkbare ringen og at disse er aktive medhjelpere i cytokinese. De kan ha oppgaver som å bygge om cytoskjelettet, kontrollere signalveier og styre rekruttering av proteiner. Det er vist at konsentrasjonen PtdIns(4,5)P₂ øker ved den sammentrekkbare ringen og PtdIns(4,5)P₂ er nødvendig for korrekt gjennomføring av cytokinese⁵¹. Det er vist i senere tid at også PI3P lokaliserer til den sammentrekkbare ringen og er nødvendig for cytokinese⁵¹. Fosfoinositidenes rolle i cytokinese belyses i ”Devidé and ProsPer: The emerging role of PtdIns3P in cytokinesis” av Ioannis P. Nezis et al⁵¹.

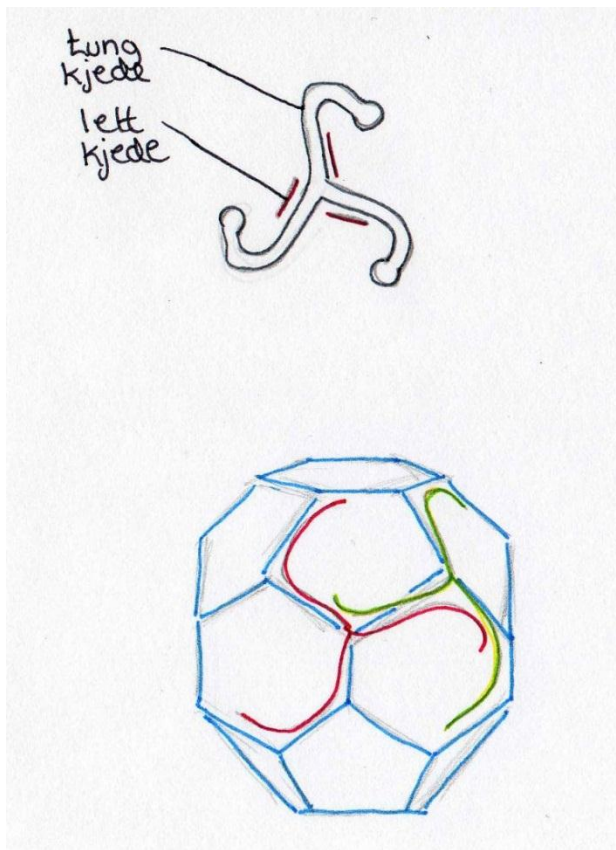
Vesikkelkappe-proteinet Klatrin

De fleste transportvesikler dannes i kappedekkede områder av membraner. En kappe er et proteinlag som hjelper til med å forme vesikkelen før den frigis fra membranen. Tre vanlige typer proteinkapper er COPI-kappe, COPII-kappe og Klatrinkappe^{61,74}. COPII-vesikler bryter løs fra ER og COPI-vesikler bryter løs fra Golgiapparatet⁷⁴. Klatrindekkede vesikler transporterer materiale fra plasmamembranen til endosomer og Golgiapparatet⁶¹.

Klatrinmediert endocytose benyttes i signaltransduksjon, næringsopptak og i synapser^{30, 66}. En Klatrin-dekket vesikkel har et Klatrinnett rundt seg, og dette nettverket er bygget opp av triskelion, en trebenet proteinstruktur bestående av tre lette og tre tunge kjeder⁶¹. Triskelion settes sammen til et fotballiknende gitter bestående av femkanter og sekskanter⁶¹ (Figur J).

Når Klatrinmediert endocytose stopper opp i mitosen, frigjøres Klatrin til andre oppgaver^{65, 66, 67}. Blant annet stabiliserer Klatrin kromatinfibre i tidlig mitose^{30, 68, 75}. Denne funksjonen utføres i samarbeid med to andre proteiner, Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 (TACC3) og Colonic hepatic tumour overexpressed gene (Ch-TOG)⁶⁸. TACC3 fosforyleres og aktiveres av Aurora A kinase⁶⁶. Det er denne aktiveringen som gjør at TACC3-proteinet kan binde seg til de tunge kjedene til klatrin (CHC), og CHC/TACC3 komplekset binder seg til den mitotiske spindelen og spindelpolene⁶⁶. ch-TOG rekrutteres deretter til spindelen av TACC3 og bidrar til videre stabilisering av kinetokore mikrotubuli⁶⁶.

CHC/TACC3/Ch-TOG-komplekset er trolig også nødvendig for korrekt spindeloppbygging⁶⁶. Det er nemlig observert defekter i spindeloppbygging ved knock down av klatrin⁶⁶. I denne sammenheng er TACC3 trolig viktig for mikrotubuli-kinetokoreinteraksjon, mens klatrin må være tilstede når kromosomoppstilling finner sted⁶⁶. CHC må binde til fosforylert TACC3, for at TACC3 skal kunne regulere kromosomoppstilling⁶⁶. Frakting av TACC3 til polene og spindelen er det også CHC som sørger for⁶⁶.



Figur J: Klatrin

Kappeproteinet klatrin består av tre tunge kjeder og tre lette kjeder satt sammen til en trebenet struktur kalt triskelion. Triskelion settes sammen til runde nettverk av femkanter og sekskanter som hjelper å forme vesikler i endocytose.

PI3P og PI3P bindende proteiner

Fosfoinositider (PI) dannes ved fosforylering av fosfatidylinositol (PtdIns) og er lipider som styrer celledisignalisering, membrantrafikk, cytoskjelettet, prosesser i cellekjernen, vekst og overlevelse^{70, 71, 76}. De er vendt ut mot cytosol i membraner inne i cellen og har som hovedoppgave å aktivere og/eller rekruttere proteiner her^{71, 76}. Disse proteinene inneholder PI-bindende domener og kalles PI-effektorer^{70, 71, 76}. Det er mye interesse rundt fosfoinositider, fordi feil i PI-metabolisme kan føre til ulike sykdommer^{70, 71}. Dette gjelder for eksempel noen typer kreft, immunsvikt og hjertelidelser⁷¹.

En 1D-myoinositolfosfatgruppe bundet til diacylglyserol er bestandelene i PtdIns⁷⁷. Det er fosforyleringer av 1D-myoinositolfosfatgruppen i posisjon 3, 4 og/eller 5 som gir fosfoinositider og klasse III PtdIns kinase (human vacuolar protein sorting 34 homologue (hVps34)) er ansvarlig for dannelsen av fosfoinositidet PI3P^{77, 78}. PI3P finnes i hovedsak i det ytre lipidlaget på tidlige endosomer^{70, 71}. Det er to ulike proteindomener som medierer spesifikk binding til PI3P, (Fab1p, YOTB, Vac1p og EEA1)-domenet (FYVE) og Phox homologi-domenet (PX)⁷⁷. Proteiner som rekrutteres til endosomer via binding til PI3P er viktige for kontroll av endosomsammensmelting, -dynamikk og -sortering⁷⁰. Det er kjent at PI3P-positive vesikler nedregulert under mitose og da kan PI3P-bindende bindende proteiner frigis til andre oppgaver⁶⁹.

Lipidkinasen hVps34 og PI3P lokaliserer også til cytokinesebroen mellom to datterceller⁷⁹. Ved å slå ned ekspresjonen av hVps34 (og derved syntesen av PI3P) med siRNA teknologi, ble det vist at celler ikke gjennomfører korrekt cytokinese⁷⁹. Dette åpnet muligheten for at PI3P-bindende proteiner kunne være med på å regulere celledeling. Det humane genomet koder for ca 70 proteiner som i følge sekvensen har et PX domene eller et FYVE domene og som potensielt kan binde PI3P⁷⁹. Ved hjelp av et screen, der det ble benyttet siRNA mot alle de 70 potensielt PI3P bindende proteinene, ble proteinet FYVECent identifisert som en medhjelper i cytokinesen⁷⁹.

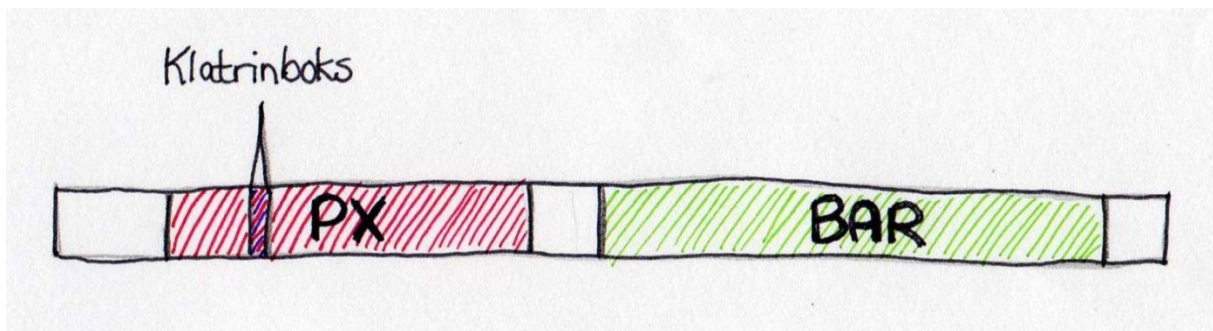
Men det var flere interessante proteiner fra screenet, og et av dem var PX-proteinet sorting nexin 4 (SNX4)⁷⁹. Celler som manglet SNX4 viste tegn på opphopning i prometafase (upubliserte data fra Stenmark laboratoriet). Siden et slikt screen kan gi falske positive, var

det viktig å undersøke om dette funnet fra screenet var riktig. Denne oppgaven har som hensikt å kvalitetssikre/validere SNX4 som en sann regulator av mitose og forsøke å finne ut mer detaljer om hva som eventuelt går galt i mitose når cellene mangler SNX4.

Sorting nexin 4

SNX4 tilhører en proteinfamilie med 28 medlemmer som kalles Sorting nexiner. SNX-proteinene er oligomere proteiner som inneholder PX-domene og i tillegg ulike protein:protein- interaksjonsdomener^{80,81} (Figur K). De er fordelt mellom membraner og cytosol og har viktige funksjoner i endosomal transport^{80,81}. Ingen SNX-proteiner har så langt vært vist å spille en rolle i mitosen.

SNX4 lokaliserer til endosomer via binding til PI3P ved hjelp av sitt PX-domene^{77,78,82}. Ved å binde seg til Klatrin, tubulin og motorproteinene Dynein medierer SNX4 mikrotubuli-avhengig retrograd transport av PI3P-rike endosomer tilbake til Golgiapparatet^{78,82}. Siden PI3P, Klatrin, mikrotubuli og Dynein i tillegg har viktige funksjoner i mitose og cytokinese, er det en mulighet for at SNX4, gjennom å interagere med disse molekylene, også har en funksjon i mitosen.



Figur K: SNX4

Flere sorting nexin proteiner inneholder også ekstra bindingsdomener i tillegg til PX-domenet⁸⁰. Et av disse domene kalles Bin/Amphiphysin/Rvs(BAR)-domene og binder til veldig kurvede membraner^{80,81,83,84}. I tillegg til å gjenkjenne kurvede membraner kan BAR-domenet også skape kurving i membraner^{80,83,84}. SNX4 har i tillegg til PX- og BAR-domene et klatrinbindesete.

Materialer og metoder

Materialer

A) Cellekultur:

- Cellekulturplater og -flasker: Falcon (BD Bioscience)
- Cellekulturplater: Nunclon (Sigma-Aldrich)
- Automatpipetter: Pipetboy comfort (IBS INTEGRA Biosciences) og pipettespisser: Fischerbrand (Fischer scientific)
- Lysmikroskop: Nikon Eclipse TX100
- Celletallteller: Z1 Coulter counter (Beckman Coulter Inc.)
- Varmebad: Julabo Tw8

B) siRNA/cDNA-transfeksjon:

- Eppendorfrør (SARSTEDT AG & Co)
- Cellekulturplater og -flasker: Nunclon (Sigma-Aldrich) og Falcon (BD Bioscience)
- 8 brønners minibrett (*155409 LAB-TEK Nunc, Thermo Scientific Inc.)
- Lang pinsett
- Dekkglass (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co)
- Automatpipetter: Pipetboy comfort (IBS INTEGRA Biosciences) og pipettespisser: Fischerbrand (Fischer scientific)
- Manuelle pipetter (Finnpipette Labsystems og Eppendorf Research) og pipettespisser (SARSTEDT AG & Co)

C) Lysering og fiksering:

- Plastskrape (SARSTEDT AG & Co)
- Vakuumsug
- Eppendorfrør (SARSTEDT AG & Co)
- Manuelle pipetter og pipettespisser (SARSTEDT AG & Co)
- Kjølesentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415C)

D) SDS-PAGE og western:

- Geler;, 4-20 % Precise Protein Gels (Pierce Thermo Scientific), Mini Protean TGX Gels 4-20 % (BIORAD)
- Membran; Odyssey Immobilon -FL membran, porestørrelse 0,45 µm, Millipore
- Gelkjøringskar med lokk med kobling til strømkilde (BIORAD)
- Gelholder som settes i gelkjøringskaret (BIORAD)
- Klemme til Western-blotting
- Filterpapir (Whatman, GE-healthcare)
- Plastfilter
- Plastrør (10 og 50 ml) (SARSTEDT AG & Co)
- Manuelle pipetter (Finnpipette Labsystems og Eppendorf Research) og pipettespisser (SARSTEDT AG & Co)

E) Immunfluorescens:

- Fuktekammer (plastboks med lokk og filterpapir som fuktes inni)
- Parafilm (Pechiney plastic packaging)
- Lang pinsett
- Manuelle pipetter (Finnpipette Labsystems, Eppendorf Research) og pipettespisser (SARSTEDT AG & Co)
- Vakuumsug
- Objektglass (Thermo scientific, MENZEL-GLÄSER, Gerhard Menzen GmbH)

F) Mikroskop og visualisering av proteiner på PVDF membran:

- Konfokalmikroskop: LSM 710, Carl Zeiss
- High throughput lys mikroskop: scanR Olympus IX81
- Lysmikroskop for mikroskopi av levende celler : Delta Vision, Applied Precision
- Odyssey infrared imager: LI-COR Biosciences

Løsninger

Alle kjemikalier benyttet hadde en renhetsgrad på 95-100 % hvis ikke annet er oppgitt.

A) Cellekultur:

- Trypsin/EDTA; 0,4 g KCl, 0,8 g NaCl, 1 g glucose, 0,01 g fenol rød, 0,5 g trypsin og 0,2 g EDTA i 1 l destillert vann
- DMEM-fullmedium for Hela celler; Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) med Glutamax og 4,5 g/l glukose, (Invitrogen/GIBCO, Life technologies Corp.), 10 % FBS (blodserum fra kalv) (Sigma-Aldrich), streptomycin og penicillin (Invitrogen) ble tilsatt før bruk.
- DMEM fullmedium for stabile HelaK celler med mCherry-H2B og GFP-tubulin: DMEM som beskrevet for HeLa celler tilsatt X ng/ml puromycin og X ug/ml puromycin.

B) siRNA transfeksjon:

- Lipofectamin RNAi-max (Invitrogen)
- siRNA; (Invitrogen) SNX4 Oligo #1 kodende tråd 5' GCGGCGAUUAUAGUGAAU 3', Cat No: 10620310, SNX4 Oligo #1 anti-kodende tråd 5' AAAUUCACUAUAUCGCCGC 3', Cat No: 10620310, SNX4 Oligo #2 kodende tråd 5' UUACUGACCUUAAGCACUA 3', Cat No: 10620310, SNX4 Oligo #2 anti-kodende tråd 5' UAGUGCUUAAGGUCAGUAA 3', Cat No: 10620310,

C) cDNA-transfeksjon:

- X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent (Roche Applied science)

D) Lysering og fiksering:

- PBS; 1,1 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 5,5 mM NaH₂PO₄ x 12 H₂O, 2,9 M NaCl i dH₂O
- 10 % formalin (4 % formaldehyd i 1X PBS)
- 50 mM NH₄Cl i 1X PBS
- K-Pipes (PEM) buffer; 80 Mm KPipes pH 6.8 (HCl), 5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂
- Metanol 100 %
- Lysisbuffer; 125 mM Kaliumacetat, 25 mM HEPES, 2,5 mM Magnesiumacetat, 5 mM EGTA, Triton (detergent) til 0,5 %, pH 7,2 (1 tabl. complete proteasehemmer (Roche AG) pr 50 ml lysisbuffer), 1 µM DTT

- SDS samplebuffer; 0,3 M Sigma 7-9 Tris base, 8 % SDS, 0,01 % bromfenolblått, 40 % glycerol, 0,4 M DTT

E) SDS-PAGE og western:

- PBS; 1,1 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 5,5 mM NaH₂PO₄ x 12 H₂O, 2,9 M NaCl i dH₂O
- Gelkjøringsbuffer; Pierce (1 M Sigma 7-9 Tris base, 0,1 M HEPES, 3,5 mM SDS), BIO-RAD (1x løsning; 25 mM Tris, 192 mM glycine og 0,1 % (w/w) SDS, pH 8,3)
- Westernbuffer; Pierce (0,2 mM Sigma 7-9 Tris base, 0,2 mM glycine, dH₂O, 15% (v/v) methanol)
- T-PBS; 0,05 % tween (detergent) i 1X PBS
- Primære antistoffer; SNX4(E-18) sc-10622 (Santa Cruz biotechnology Inc.), SNX4 katalognr. H00008723-M01 (Abcam), betaaktin produktnr. A5316 (Sigma), alfatubulin produktnr. SAB4500087 (Sigma)
- Sekundære antistoffer; (800) esel-anti-mus, (680) esel-anti-mus, (800) esel-anti-geit, (680) esel-anti-geit (LI-COR)

F) Immunfluorescens:

- Mowiol med 2 microgram/mL Höechst. Mowiolblandingen som ble benyttet; 6,9 g 87 % glycerol i 50 ml-rør, 2,4 g Mowiol, 6 ml destilert vann, 12 ml Tris 0,2 M pH 8,5, 10 min. 50 °C bland av og til, sentrifuger 5000 g i 15', oppbevar ved -20 °C
- Saponin (10 % fortynnet til 0,05 % i 1X PBS)
- Primære antistoffer; SNX4(E-18) sc-10622 (Santa Cruz biotechnology Inc.), SNX4 katalognr. H00008723-M01 (Abcam), alfatubulin produktnr. T5168 (Sigma), fosfoAurora-ABC # 2914 (Cell signaling), alfatubulin produktnr. SAB4500087 (Sigma), HA katalognr. MMS-101R

Sekundære antistoffer; Cy3 esel-anti-geit (Jackson), Cy2 esel-anti-mus (Jackson), Cy2 esel-anti-kanin (Jackson), Cy5 esel-anti-menneske (Jackson), DyLight 549 (555) esel-anti-kanin (Jackson), DyLight 549 (555) esel-anti-mus (Jackson)

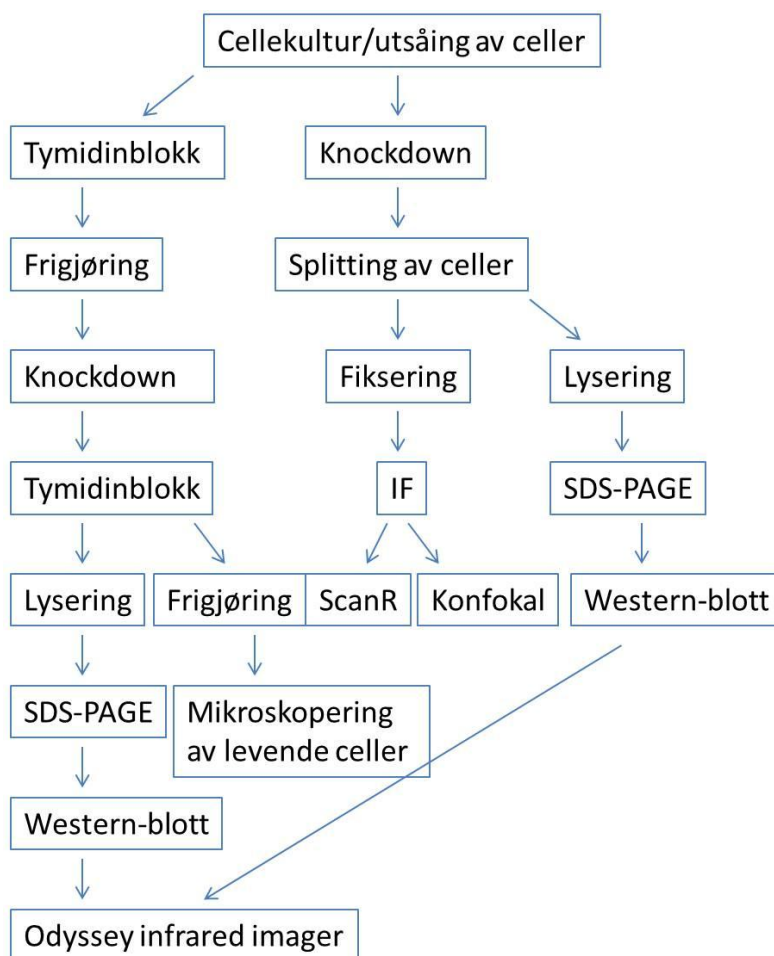
G) Mikroskop og visualisering:

Konfokalmikroskop

- Olje på 63X-objektiv, Immersol™ 518F (ZEISS)

- 70 % etanol
- Delta Vision-mikroskop (live imaging)
- 1.520 olje (Applied precision)
- 70 % etanol
- Odyssey infrared imager
- 1X PBS
- 70 % etanol

Metoder



Figur L: Metoder

Dette er en oversikt som viser gangen i de ulike forsøkene sett under ett.

Cellekultur

For å kunne gjennomføre vellykkede forsøk med cellekulturer, er det viktig å lære seg fundamentalt celledarbeid først. Hvis man klarer å unngå kontaminering av cellekulturen er det et tegn på at man jobber sterilt.

Forskjellige celler stiller ulike krav til næring for å kunne oppnå optimal vekst. Ulike vekstmedier har derfor forskjellig innhold av salter, aminosyrer og vitaminer, som er cellens basisnæring. Aminosyrene er viktige forløpere for aminosukker, pyrimidiner, puriner og asparagin, i tillegg til at de er en kilde til redusert karbon mens glutamin er viktig i sitronsyresyklus. I tillegg tilsettes ofte blodserum, antibiotika og glutamin til vekstmediet for å optimalisere vekst. Proteiner, elektrolytter og veksthormoner som finnes i blodserumet gir økt vekst for en del celletyper. For at det ikke skal skje bakteriell kontaminering, tilsettes også antibiotika, men det kan være gunstig å unngå dette når cellene skal transfekteres, fordi det i noen tilfeller kan gi økt celledød. Cellene bør ellers være så friske som mulig før en transfeksjon og i eksponentiell vekst. Ved å passe på at cellene til enhver tid har nok næring og plass vil man sørge for at de har de beste vekstforhold. Fenol rød er en pH-indikator, som er rød ved pH 7,4 og er ofte tilstede i næringsmediet. Fenol rød endrer farge til oransje og gul i sur pH og til lilla i basisk pH. Stort avvik i pH mens cellene er i kultur er ikke gunstig for cellene og er en viktig indikator som jevnlig må sjekkes. Celler oppbevares i et varmeskap, som holder en temperatur på 37 grader celsius og som har et 5 % CO₂-innhold for å holde pH-en i vekstmediet stabil, siden det benyttes en bikarbonatbuffer i mediet ⁸⁵.

Trypsin er en serinprotease som kløyver peptidkjeder på karboksylisk side av aminosyrene lysin og arginin. Et unntak er hvis residuene er ved siden av en prolinresidue. Serinproteasen er mest aktiv ved 37 grader celsius og finnes derfor i fordøyelsessystemet til mange virveldyr. Trypsin hindrer cadheriner og integriner å binde celler sammen og til omgivelsene og brukes for å løsne cellene fra plastskålen som de vokser i, når man for eksempel splitter cellene ⁹². Det praktiske resultatet av behandling av celler med trypsin er at cellene løsner fra bunnen de vokser på slik at man kan telle cellene og så ut det ønskede antall i en ny skål eller for et forsøk.



Figur M:
Trypsin/EDTA og DMEM cellemedium
 Til venstre på figuren vises trypsin som brukes til å løsne cellene fra hverandre og underlaget de vokser på. Til høyre vises DMEM-fullmedium som inneholder den næringen som cellene trenger for å leve og vokse.

Prosedyre for cellekultur

Valgt celletype ble sådd ut i ønsket tetthet i celleflasker i DMEM-fullmedium. Når cellene fikk ønsket tetthet (oftest 80-90 %), ble cellene først vasket en gang i trypsin/EDTA.

Kulturflasken ble satt i varmeskap (37 grader celsius) fram til cellene løsnet fra bunnen. Så fort cellene hadde løsnet ble de resuspendert med DMEM-fullmedium. Det ble så tatt ut 40 μ l celledøsning, og dette ble tilsatt i en kyvette med 20 ml isoton. En celledelteller ble brukt til å telle antall celler per milliliter (celleantallet). Deretter ble ønsket antall celler overført til en ny celleflaske. Det ble så fylt opp ønsket mengde med DMEM-fullmedium i den nye flasken.

Den gamle flasken og resten av cellene ble kastet.

Modulering av genuttrykk ved siRNA-transfeksjon

RNA-interferens er teknikken, der man ved hjelp av small interfering RNA (siRNA), manipulerer genaktiviteten i celler og organismer. SiRNA kalles av og til for short interfering RNA eller silencing RNA. Det er et dobbeltrådet RNA-molekyl som ofttest har en lengde på mellom 19-21 nukleotider^{86, 87}. Ved spesifikk knockdown av et ønsket genprodukt, inføres et syntetisert siRNA ved transfeksjon. Aktivt, enkelttrådet siRNA dannes deretter i cellen ved at endoribonucleasen Dicer splitter siRNA i to enkelttrådede sekvenser og mater den ene sekvensen inn proteinkomplekset RNAi induced silencing kompleks (RISC)^{86, 87}. Dicer er med i RISC-komplekset, som passer på at ikke RNA-sekvensen degraderes av enzymer (RNAsere)⁸⁶. Det er også RISC sin oppgave å finne det komplementære området til siRNA-sekvensen på mRNA⁸⁸. Dette dobbeltrådede komplekset av siRNA-enkelttråddsekvensen og

mRNA degraderes av endonukleaser i RISC⁸⁶. Nitten av nukleotidene i siRNA er vanligvis komplementære med det mRNAet man ønsker å degradere mens det i tillegg er et overheng på to nukleotider i 3'-enden.

Ved siRNA-transfeksjon benyttes kontroll-siRNA i tillegg til siRNA-oligoer som gir knock down av ønsket protein. Kontroll-siRNA har ingen homologi med noen kjente pattedyrgener og vil derfor ikke binde til proteinet man vil undersøke. Dette er dermed en negativ kontroll. Ved siRNA-transfeksjon er det viktig at cellene er friske og har et godt utgangspunkt før transfeksjonen. Det vil si at de ser bra ut, har rikelig med medium å vokse på og at det ikke er for tett med celler.

Prosedyre for siRNA-transfeksjon

Det ble først laget transfeksjons-mastermix i eppendorfrør med 250 µl DMEM uten FBS og 6,25 µl transfeksjonsreagens (RNAimax) per antall brønner som skulle transfekteres (6 brønners brett). Nye 250 µl DMEM uten FBS ble tilsatt siRNA i et annet eppendorfrør. Dette ble gjort for hver type siRNA som ble brukt. Hvert eppendorfrør med siRNA fikk deretter tilsatt 250 µl av transfeksjons-mastermixen. Transfeksjonskomplekser av siRNA og RNAimax ble dannet de neste 20 minuttene før det hele (0,5 ml) ble fordelt over cellene til et sluttvolum på 3 ml. Sluttkonsentrasjon av siRNA var på 50, 75 og 100 nM. Etter ca 20 timer ble mediet byttet ut med DMEM-fullmedium, og cellene ble splittet etter ønsket forsøksoppsett.

cDNA-transfeksjon

I cellen kan komplementært DNA eller cDNA produseres fra mRNA. Denne reaksjonen katalyseres da av revers transkriptase og DNA polymerase. For å utrykke et protein av interesse i en celle (eksogent uttrykk) bruker man ofte cDNA klonet inn i en ekspresjonsvektor/plasmid tilpasset uttrykk i pattedyrceller. I modent mRNA, som er klart for translasjon, er introns fjernet og exons spleiset sammen. Det er også vanlig å merke proteiner som tilføres cellen fra plasmidvektorer. Disse merkelappene er ofte små eller inneholder en spesiell egenskap man vil tilegne et protein. Typiske eksempler på slike merkelapper er varianter av grønt fluoriserende protein (GFP) eller rødt fluoriserende protein (RFP) og Hemagluttinin (HA). Når man ønsker å merke et protein kloner cDNA for merkelappen og ønsket protein inn i samme leseramme og uttrykkes derfor som en og samme protein i cellen. En merkelapp vil hjelpe til med å verifisere identiteten og tilstedeværelsen av et protein ved lokalisasjon i cellen eller ved hjelp av Western.

Prosedyre for cDNA-transfeksjon

Transfeksjonsreagenset ble fortynnet etter protokoll fra forhandler. Kort fortalt ble det benyttet 3 μl X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent per 100 μl serumfritt medium. Til dette tilsatte vi 1 μg HA-SNX4 DNA per 3 μl X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent. Mixen stod så for å danne transfeksjonskomplekser i 15 min før 25 μl transfeksjonskompleks ble tilsatt til hver enkelt brønn (2 ml celler per brønn)(24 brønners brett).

Lysering

I forskning er lysering av celler en måte å åpne cellene på uten å ødelegge sensitive makromolekyler, som DNA og proteiner. I lysering benyttes en detergent til å løse opp plasmamembranen til cellene. En detergent har evnen til å senke overflatespenningen av en væske eller spenningen mellom væsker. De kan også benyttes som vaskemidler hvis de fortynnes. De er amfifile, altså delvis hydrofile og delvis hydrofobe. Dette gjør at de kan interagere med hydrofile og hydrofobe løsninger, for eksempel fettsyrer i plasmamembranen og cytoplasma. Lysering brukes feks i prosesser som Western og Southern blotting, for å bestemme oppbyggingen av nukleinsyrer, lipider og proteiner.

Prosedyre for lysering

Siden cellene satt fast til glasset ble mediet først forsiktig sugd av med vakuumsug. Suget ble plassert i kanten av brønnen slik at færrest mulig celler ble sugd med. Cellene ble så vasket en gang i iskald PBS som deretter ble fjernet med vakuumsug før cellene ble plassert på is og lysert i lysisbuffer. For celler i 6 brønnersplater ble cellene lysert i 100 μl lysisbuffer. Cellene stod på is under hele lyseringen (ca 15 minutter) for at proteaser og andre enzymer som kunne degradere proteiner skulle holdes så lite aktive som mulig. Lysisbufferen inneholdt dessuten proteasehemmere slik at nedbrytningen av proteiner ble holdt til et minimum. Etter lysering ble det benyttet en plastskape til å skrape alle cellene og avfallet løs fra brønnene. Lysatet ble så overført til et eppendorfrør, satt på is og sentrifugert i kjølesentrifuge i 5 minutter på 4 grader Celcius ved 13000 rpm. Sentrifugeringen gjorde at DNA og annet som ikke har gått i løsning ble samlet på bunnen av eppendorfrøret som en pellet. Supernatanten ble overført til et nytt rør og 100 μl 2X loadingbuffer ble tilsatt. Prøvene ble tilslutt kokt i ca 5 minutter før de ble plassert på $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hvis de ikke ble benyttet omgående.

SDS-PAGE

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) er en måte å separere proteiner på en gel der lengden som proteinene vandrer er en funksjon av ladning og lengde av polypeptidkjeden⁹³. SDS er en detergent som har negativ ladning, som denaturerer sekundære og non-sulfid-linkede tertiære strukturer og gir proteinene en netto negativ ladning som er proporsjonal med massen. SDS tilsettes i loadingbufferen, som igjen tilsettes til cellelysaten. I loadingbufferen er det også DTT, et reduksjonsmiddel som denaturerer proteinene ved reduksjon av disulfidbroer.



Figur N: Gel til SDS-PAGE

Figuren viser en ny SDS-PAGEgel. Nye geler er dekket av buffer og pakket inn i plast. Denne typen gel hadde også en kam i brønnene og en teip på bunnen som begge må fjernes før bruk.

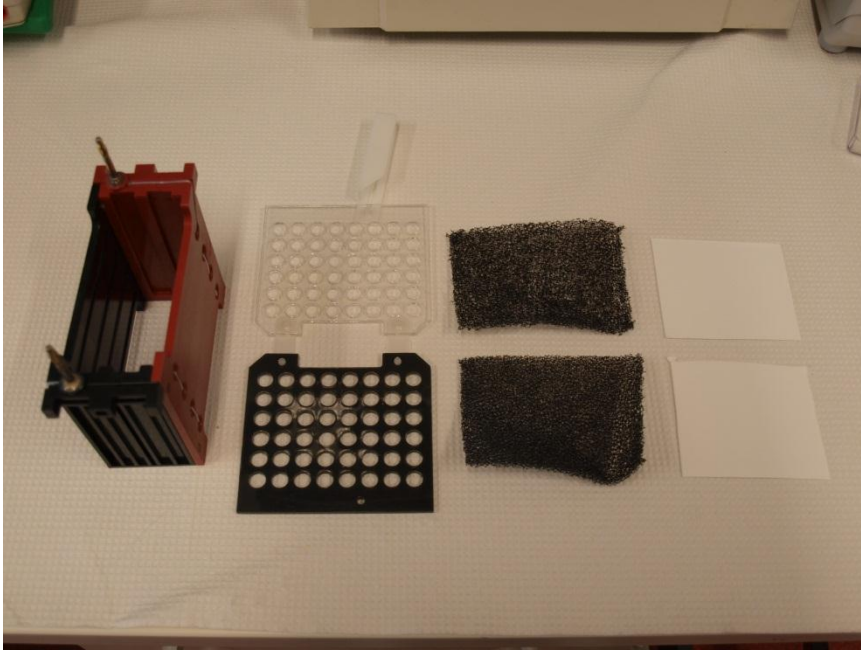
Etter loading av prøvene, kobles gelen til en strømkilde. Den delen av gelen, der prøvene appliseres er koblet til negativ pol. Motsatt ende er koblet til positiv pol. Siden proteinene er negativt ladd, vil de vandre mot positiv pol i motsatt ende. På grunn av at små proteiner beveger seg lettere igjennom gelen enn store proteiner, kan man bestemme proteinstørrelsen ut i fra lengden de har vandret. De ulike proteinene i prøven viser seg som bånd på gelen ved bruk av immunfluorescens og Odyssey infrared imager. En standard med proteiner av kjent størrelse tilsettes ved hver kjøring. Båndene til standarden vises ofte i ulik farge, slik at man lettere kan skille dem fra hverandre.



Figur O: Gelkjøringskar og maskin

Her vises et plastkar som inneholder en kassett til å sette geler oppi og runningbuffer. På maskinene i bakgrunnen stilles det inn om det skal benyttes konstant ampere, volt eller watt og hvilken styrke.

Western-blotting er en prosess, der det brukes strøm til å overføre proteiner fra en elektroforesegel til en membran, som siden kan inkuberes med antistoffer mot proteinet man vil detektere samt sekundære antistoffer for deteksjon. Det er viktig at det ikke er luft mellom gel og membran, fordi overføringen ikke vil fungere i disse områdene. Det finnes ulike typer Western-blotting blant annet våt type og semi-tørr type. Tid, utstyr og buffere varierer med type blotting. I turbo-Western-blotting, som er en semi-tørr blotting, brukes en forpakning der membraner og buffer er ferdiglaget og klare til bruk. Dersom man vil fremkalle membranen på odyssey infrared imager etter ferdiggjort transfer, må membranen som følger med forpakningen byttes ut med en odyssey-membran (immobilon-FL).



Figur P: Kassetten for Western-blotting, klemme til Western-blotting, plastfiltere og filterpapir

Bildet viser den type klemme (svart/hvit) som ble benyttet til å holde sammen plastfiltere (svart), filterpapir (hvitt), SDS-PAGEgel (Figur N) og Odysseymembran. Dette ble montert i et kar med Westernbuffer og er en type våt blotting. Klemma ble plassert i kassetten (svart/rød) i et gelkjøringskar fylt med Westernbuffer og kjøleelement for at temperaturen ikke skulle bli for høy.

Etter endt Western-blott tilsettes antistoffer, som skal gjenkjenne proteinene av interesse. I indirekte immunfluorescens benyttes to typer antistoffer. De primære antistoffene tilsettes først og bruker lengst tid på å gjenkjenne epitopene. Deres oppgave er å gjenkjenne proteinet og binde seg til det. De sekundære antistoffene bruker kortere tid på å finne epitopene, som er det stedet på antigenet som gjenkjennes av antistoffet. Deres oppgave er å finne de primære antistoffene og binde seg til dem. De sekundære antistoffene inneholder en fluorescerende agent, dvs et molekyl, som når bestrålt med lys av en gitt bølgelengde, emitterer lys av en lengre bølgelengde tilbake. Dette gjør at vi kan se proteinene av interesse i et fluorescensmikroskop.

Prosedyre for SDS-PAGE

Ferdigstøpt gel (Pierce, BIORAD) ble hentet fra kjølerom, før den ble gjort klar til bruk. Dette innebar at buffer ble tømt ut, og kam og teip ble fjernet forsiktig hvis gelen var utstyrt med

slike. Brønnene ble rensert med destillert vann, som så ble ristet ut. Gelen ble så festet i en holder som hadde strømledere. Holderen ble så plassert i et gelkjøringskar. I karet ble det fylt gelelektroforesebuffer før prøvene ble applisert i de små brønnene i gelen som vendte opp av karet. Et lokk som ledet strømmen videre til maskinen som styrte kjøringen ble plassert oppå karet. Gelen ble kjørt ved konstant volt, med en styrke på 100-150 volt (Pierce)/150-200 volt (BIORAD) til væskefronten var ute av gelen.

Bufferen ble tømt ut av gelkjøringskaret og gelen ble tatt ut av holderen. Plastikkveggene på sidene av gelen ble fjernet. Odyssey-membran og pappmembran ble klippet til før den ble aktivert med 100 % metanol og vasket i 1XPBS. Gelen, Odysseymembranen, filterpapir og plastmembran ble lagt i en plastklemme i et gelkjøringskar fylt med Westernbuffer. De ulike delene ble lagt på følgende måte;

- plastmembran
- filterpapir
- gel
- odyssey-membran
- filterpapir
- plastmembran

Plastklemmen klemte alle delene sammen. Plastklemmen med alle membranene ble satt i kassetten for Western-blotting som hadde en pluss (rød) side og en minus (svart) side. Odyssey-membranen ble plassert vendt mot positiv side slik at proteinene vandret fra gelen til membranen under blottingen. Holderen ble plassert i et gelkjøringskar som ble fylt med Westernbuffer. Et kjøleelement ble plassert i karet for at det ikke skulle bli for varmt under kjøring. Lokket ble satt på og det ble kjørt transfer ved konstant ampere, med en styrke på 3,50 mA i én time.

I semitørr turbo-Western-blotting ble Odyssey-membranen aktivert med metanol og vasket i 1X PBS. Dette var på samme måte som i våt transfer. De ulike membranene ble lagt i følgende rekkefølge i et kammer for turbo-Western-blotting, der bunnen var positiv pol, og lokket var negativ pol;

- Lokket (-)
- Membran
- Gel
- Odyssey-membran
- Membran
- Bunnen (+)

Bufferen som lå igjen i plastikkboksen ble dryppet over den øverste membranen. Lokket ble trykket ned og låst før kammeret ble satt inn i maskinen som kjørte prosessen. Turboblottet ble kjørt i 3 min hvis man hadde én gel, eller 7 minutter hvis man hadde to geler.

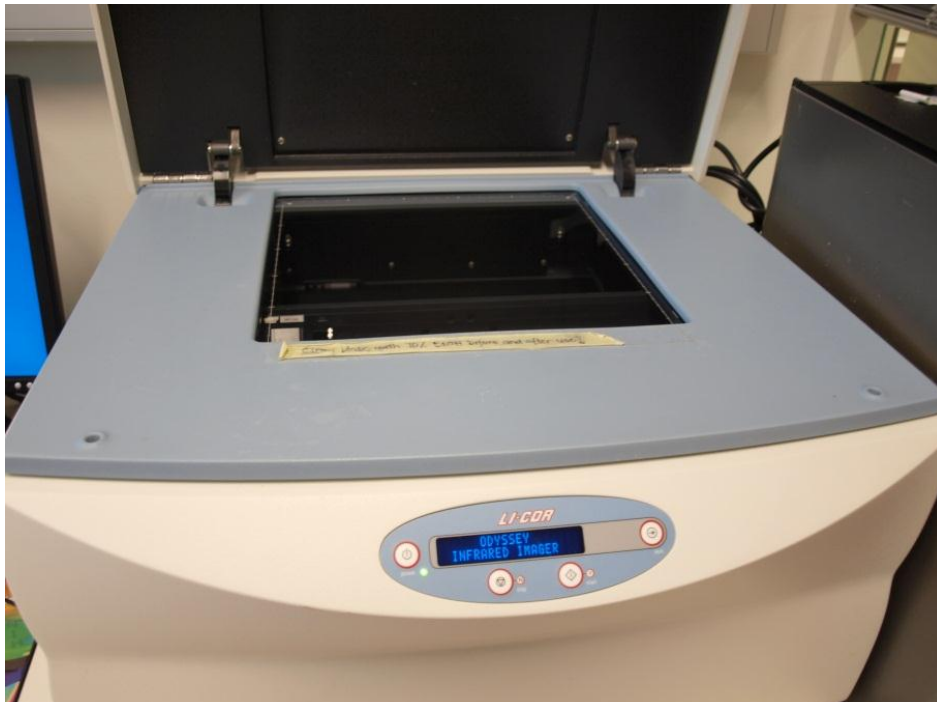
Etter avsluttet Western-blotting ble Odyssey-membranen blokkert i 5 % melk i T-PBS i ca 10 min. Membranen ble plassert i et 50 ml rør. Melkeløsningen ble så fjernet, og det ble tilsatt primære antistoffer i 5 % melk T-PBS. Det hele måtte stå på en rulle i ca 2 timer. Membranen ble så vasket i T-PBS tre ganger før sekundære antistoff i T-PBS ble tilsatt. Igjen måtte røret settes på en rulle, denne gangen i ca 1 time. Så ble membranen vasket tre ganger i T-PBS og to ganger i PBS før den var klar til fremkalling.

Odyssey infrared imager

Det finnes ulike måter å fremkalle en Westernmembran på, og en metode er å bruke en Odyssey infrared imager. Med Odyssey imager benyttes et sekundært antistoff som ved bestråling med IR emitterer en farge som kan detekteres av Odyssey. Det kan detekteres to ulike farger med bølgelengde 680 (rød) og 800 (grønn) nm. Til odyssey benyttes egne transfermembraner og egne antistoffer til Western-blotting.

Prosedyre for odyssey infrared imager

Membranen som hadde gjennomgått Western blotting ble plassert på glassflaten under lokket på en Odyssey infrared imager med framsida og toppen ned. Odyssey software på PC måtte åpnes, og det ble bestemt hvor nytt skann skulle lagres. Så ble det bestemt parametere for nytt skann, som intensiteten på bestrålingen av prøven og størrelsen på området som skal skannes. Etter avsluttet skann kunne det stilles på blant annet kontrast og lysstyrke, for at båndene skulle komme mest mulig tydelig fram.



Figur Q: Odyssey infrarød imager

Odyssey infrarød imager brukes for å visualisere proteiner på Odysseymembraner etter endt Western og inkubering med antistoffer.

Fiksering

Fiksering er en metode som benyttes for å fryse biologiske prosesser i cellen i en tilstand som likner på det man ser i levende celler⁸⁹. De to fikseringsreagensene vi har brukt for immunfluorescens er metanol og formaldehyd. Disse to reagensene tilhører gruppen av aldehydbaserte og dehydrerende fikseringsreagenser, respektivt. Aldehyd fikserer ved å kovalent kryssbinde proteiner i cellen mens metanol bytter ut vann fra overflaten til proteiner og fører til denaturering av proteinene. Når man fikserer med aldehyd er det nødvendig å permeabilisere membranen for å komme til med antistoffer. Metanol løser også opp membranlipider og har derfor også en lyserende effekt i seg selv, så da trenger man ikke permeabilisere cellen etter fiksering.

A) Direkte fiksering i romtemperatur

Direkte formaldehyd-fiksering i romtemperatur er en kraftig fikseringsmetode. Denne fikseringsmetoden ble derfor mye brukt i analyser, der vi viste at epitopene som antistoffene våre gjenkjente ikke ble ødelagte eller endret av fikseringen. For oss ble dette typisk brukt når celler ble preparert til bruk i scanR-mikroskopering der vi talte mitotiske profiler etter alfa-tubulin og fosfo-AuroraABC farging. Cellene rundes opp når de går gjennom mitosen og

sitter da dårligere fast på underlaget. Hvis mange celler detter av, vil dette forstyrre resultatet. Vi erfarte at en direkte formalin fikseringer i romtemperatur også var nyttig for å bedre bevare flest mulig mitotiske celler på coverslipsen. Frie aldehydgrupper blir fjernet ved 15 minutter 50 mM ammoniumklorid (NH_4Cl) behandling på romtemperatur etter fikseringen. Prøvene ble så oppbevart i kjøleskapet, eller de ble tilsatt 0,05 % Saponin i 1X PBS før IF-farging.

Prosedyre for direkte fiksering i romtemperatur

Celler ble inkubert direkte i 4 % formaldehyd i romtemperatur i 30 min, før formaldehydet ble fjernet og det ble tilsatt 1X PBS til hver brønn. Frie aldehydgrupper blir fjernet ved 15 minutter 50 mM ammoniumklorid(NH_4Cl)-behandling på romtemperatur etter fikseringen. Prøvene ble så oppbevart i kjøleskapet, eller de ble tilsatt 0,05 % Saponin i 1X PBS før IF-farging.

B) Fiksering på is før permeabilisering

Fiksering på is før permeabilisering er en fikseringsmetode som er mildere enn direkte formaldehydfiksering i romtemperatur. Fordi fikseringen gjøres på is, blir det dannet færre kryssbindinger mellom protein og aldehyd. En kortere inkuberingstid i formaldehyd bidrar også til en mildere fiksering. NH_4Cl ble tilsatt for å fjerne overflødig aldehyd etter fikseringen.

Prosedyre for fiksering på is før permeabilisering

Cellene ble vasket én gang med 1X PBS som ble fjernet før inkubering med 4 % formaldehyd på is i 15 min. Cellene ble vasket igjen én gang med 1X PBS som ble fjernet før inkubering i 50 mM NH_4Cl i 1X PBS i 10 min. Prøvene ble så oppbevart i kjøleskapet, eller de ble tilsatt 0,05 % Saponin i 1X PBS før IF-farging.

C) Permeabilisering før fiksering på is

Permeabilisering med PEM-buffer med 0,05 % saponin gjør at cytosoliske proteiner som ikke er polymerisert blir vasket vekk før fiksering med formaldehyd. Dette er fordi saponin som er en detergent lager hull i plasmamembranen. Hvis man er interessert i å studere et protein som man tror lokaliserer til cytoskjelettet eller spesifikke organeller, kan man dermed fjerne eventuelle forstyrrende cytosoliske proteiner. Når man permeabiliserer eller vasker med PBS før fiksering kan det være lett å vaske vekk celler som ikke sitter godt festet til underlaget, slik som runde mitotiske celler.

Prosedyre for permeabilisering før fiksering på is

Cellene ble inkubert i 0,05 % Saponin i K-Pipes (PEM)-buffer i 5 min på is. Detergenten ble så forsiktig fjernet før inkubering i 4 % formaldehyd på is i 15 min. Cellene ble vasket med 1X PBS, inkubert i 50 mM NH₄Cl i 1X PBS i 10 min og 1X PBS og lagret i kjøleskapet. Hvis det skulle fortsettes direkte med IF-farging fjernet vi PBS og permeabiliserte cellen i 0,05 % Saponin i 1X PBS.

D) Metanolfiksering

Metanolfiksering er på en måte en mellomting mellom direkte formaldehyd-fiksering på is og permeabilisering før formaldehydfiksering, fordi det skjer fjerning av cellekomponenter og fiksering samtidig. Metanolen vasker vekk lipider slik at plasmamembranen vaskes vekk, men fikserer samtidig slik at resten av cellen fikseres.

Prosedyre for metanolfiksering

Cellene ble vasket én gang med 1X PBS som ble fjernet før inkubasjon i iskald metanol ved -20 °C i 10 min. Etter metanolbehandlingen ble cellene igjen vasket én gang med 1X PBS før de ble satt til lagring i kjøleskapet, hvis ikke det skulle fortsettes direkte med IF-farging.

Immunfluorescens

Teknikken som kalles immunfluorescens blir brukt i kombinasjon med ulike former for mikroskoperinger. Det er spesifisiteten mellom antistoff og antigen som ligger til grunn for teknikken, og man utnytter denne når man farger et molekyl av interesse ved å bruke antistoff for dette ⁹². Dette antistoffet kan selv være farget eller man kan tilsette et ekstra farget antistoff til cellene ⁹⁴. Dette gjør at man kan se hvor proteinet lokaliserer i cellen.

Immunfluorescens er en type immunfarging, og kan brukes til å analysere fordeling av proteiner, glycaner og små biologiske og ikke-biologiske molekyler. Immunfluorescens kan brukes i kombinasjon med andre ikke-antistoffmetoder av fluorescerende farging feks bruk av 4'-6'-Diamidino-2-fenylindol (DAPI) eller Høchst til å farge DNA.

Epifluorescensmikroskop og konfokalmikroskop er eksempler på mikroskop som kan benyttes til å studere immunfluorescerende prøver.

Antistoffer tilhører en gruppe proteiner kalt immunglobuliner (Ig) ⁹². De er bygget opp av to identiske tunge kjeder og to identiske lette kjeder som danner en Y-form ⁹². De to armene til antistoffet dannes av tunge og lette kjeder og inneholder Fv-domene som kan binde til et antigen ⁹². Den nederste delen av Y-formen (Fc) lages av bare tunge kjeder og kan binde til Fv-domenet til et annet antistoff ⁹². Ved indirekte immunfluorescens benyttes fluorescerende

sekundærantistoffer, som binder til tungkjedehalen på primærantistoffene. Det finnes også direkte immunfluorescens, og da er primærantistoffet fluorescerende.

I SDS-PAGE har vi benyttet betaaktin som en kontroll på lik applisering. Dette er fordi betaaktin er et husholdningsprotein, dvs. si at det er et protein som uttrykkes i høy grad. Derfor fungerer dette proteinet godt som appliseringskontroll. Ved immunfluorescensfarging for mikroskopering i high throughputmikroskop og konfokalmikroskop benyttet vi primære antistoffer for alfatubulin og fosfoAurora-ABC. Dette var fordi alfatubulin viser den mitotiske spindelen og fosfoAurora-ABC viser godt mitotiske celler, fordi Aurora A, B og C kun er fosforylert i mitosen. Aurora C er finnes kun i spesialiserte celler og var ikke relevant i dette studiet, men antistoffet vi benyttet kunne altså farget dette proteinet også.

Antistoff/PBS-blandingen som benyttes ved immunfluorescensfarging inneholder saponin. Denne detergenten (saponin) sørger for at antistoff/PBS-blandingen fordeler seg jevnt utover dekkglasset og dekker hele flaten og at antistoffene trenger gjennom cellemembranen. Når dekkglassene monteres til objektglass ved hjelp av Mowiol trenger Mowiol-løsningen inn i cellene og hindrer uttørking. I monteringsmediet tilsatte vi dessuten Hoechst som også trenger inn i cellen og farger DNA. Hoechst eksiteres ved ultrafiolett lys ved 405 nm.

Prosedyre for immunfluorescens

Dekkglass med fikserte celler ble plassert i et fuktekammer på parafilm lagt oppå filterpapir. Dette papiret hadde blitt fuktet med vann. Dekkglassene ble lagt slik at cellene vendte opp. 20 µl av blandingen med primært antistoff i 0,05 % saponin i PBS ble tilsatt hvert dekkglass og inkubert i et lukket fuktekammer i romtemperatur i 60 min.

Etter inkubering med primært antistoff ble hvert dekkglass lagt tilbake i hver sin brønn med celledisken opp. Så ble dekkglassene vasket tre ganger i 0,05 % saponin i PBS. Dekkglassene ble så lagt tilbake i fuktekammeret med celledisken opp.

20 µl av blandingen med det sekundære antistoffet i 0,05 % saponin i PBS ble så tilsatt hvert dekkglass og fikk binde i ca 45 min. Etter endt inkubering ble dekkglassene plassert i brønnene med saponin/PBS med celledisken opp, og denne vaske-løsningen ble byttet to ganger. Så ble dekkglassene vasket i PBS uten saponin to ganger.

Dekkglassene ble så dyppet i vann, for å rense vekk saltene fra PBS-løsningen før vannet fikk renne av på et papir. Så ble dekkglassene fiksert til merkede objektglass ved hjelp av fikseringsmediet Mowiol.

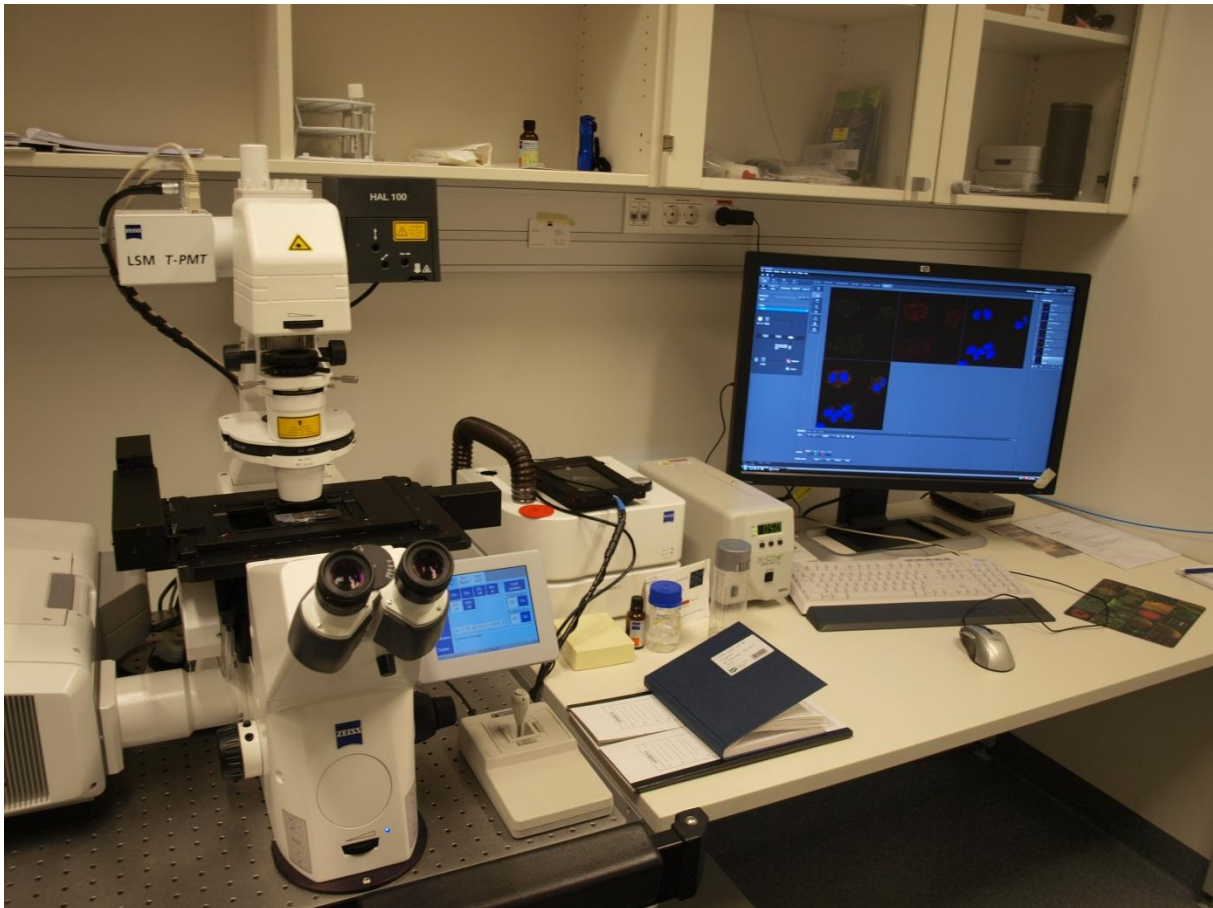
Laserskannende konfokal-mikroskop (LSCM)

Prøver som undersøkes i konfokalmikroskop har blitt merket med fluorescerende antistoffer og kan være både levende eller fiksert og montert på objektglass. Originalt hadde konfokalmikroskop en lyskilde og to nåløyer, der det andre nåløyet hindret lys som ikke traff fokusplanet å treffe detektoren⁹⁰. Denne detektoren kunne være av typen photo multiplier tube (PMT) eller digital charge coupled device (CCD)⁹⁰.

LSCM er en moderne type konfokalmikroskop som bruker laser (monokromt lys) som lyskilde og har et normalt lysfeldtmikroskop som basis⁹⁰. Ved bruk av okularet er mikroskopet som et widefield mikroskop med ulike byttbare filter som filtrerer ved lys av uønsket bølgelengde. Ved skanning er mikroskopet et konfokalmikroskop med nålehull som fjerner «ut av fokus-lys»⁹⁰. Den har datamaskiner som styrer skanningen og speilene og som viser og lagrer bildene⁹⁰. Mikroskopet bruker en objektlinse til å fokusere på et gitt punkt i prøven som bestråles med laseren og en detektor av type PMT⁹⁰. Detektoren detekterer det emitterte lyset fra prøven som gjengis som et bilde av datamaskinen⁹⁰. Mikroskopet kan bli benyttet til å ta bilder av seksjoner av celler, såkalte Z-stacks, uten at det er nødvendig med matematisk fjerning av støy i seksjonene etterpå (deconvolution).

Prosedyre for konfokalmikroskopering

Konfokalmikroskop med alle tilhørende deler (vifter, pc, kvikksølvlampe, laser) måtte skrues på i riktig rekkefølge. Alle de ulike delene måtte starte opp fullstendig før man startet med å ta bilder. På PCen, som var tilkoblet mikroskopet, var mikroskopets software å finne. Her ble det bestemt hvilke bølgelengder cellene skulle bestråles ved, oppløsningen på bildene og hvilket område det skulle tas bilde av. Bildene ble så studert manuelt i Zen software. Bildene ble også ofte overført til photoshop for å lage bildeserier der hver enkelt farge (grønn, rød, blå) ble separert.



Figur R: Laserskannende konfokalmikroskop (LSCM)

Laserskannende konfokalmikroskop (LSCM) bruker laser som lyskilde og bruker nålehull til å fjerne ut av «ut av fokus»-lys. På grunn av dette kan det tas klare bilder av seksjoner av celler.

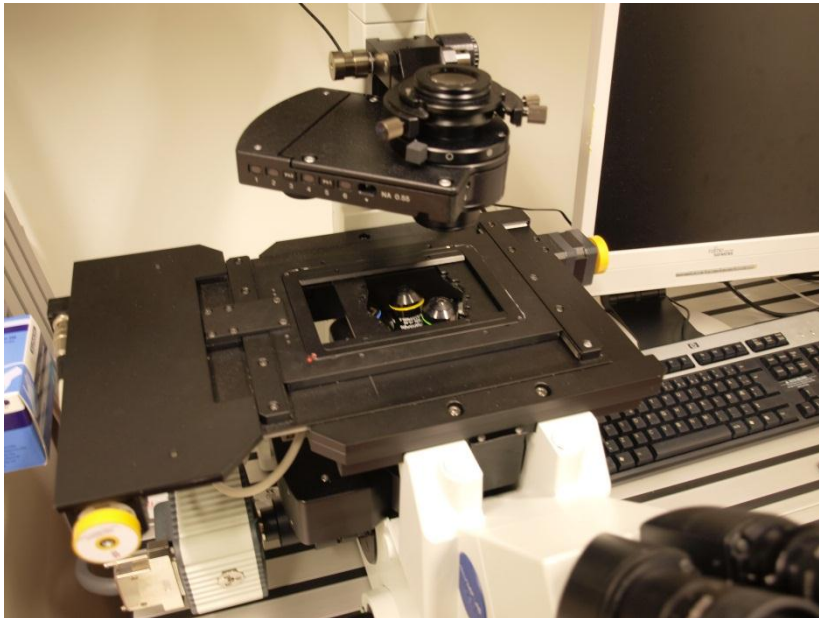
High throughput mikroskop

ScanR fra Olympus er en mikroskop-basert bildetakningsplattform der ulike deler kan byttes ut for eksempel ulike brett i plattformen der blant annet objektglass kan plasseres⁹⁵. Den kan brukes til helautomatisk bildetaking. I scanR kan det feks benyttes flerbrønnsplater eller objektglass. Det er et fluorescens- og wide-field-mikroskop, som innebærer at prøven bestråles med lys som fører til fluorescens som detekteres gjennom objektivet. Det benyttes ulike filtere som filtrerer vekk lys med uønskede bølgelengder for å gi monokromt lys. Siden det ikke er et konfokalmikroskop, får man ikke fjernet alt ”ut av fokus”-lys. Fordelen er at man får tatt bilder hurtig og analysert på mange celler.

Prosedyre for high throughput mikroskopering

I aquisition-delen av ScanR programmet ble det bestemt hvor på objektglasset mikroskopet skulle begynne å ta bilder, hvor mange bilder som skulle tas og hvor langt bildene i en serie

skulle være fra hverandre. I analyse-delen av programmet ble bildene studert og det ble kjørt analyser på bildene. Analyseprogrammet ble stilt inn til å gjenkjenne cellekjerner og dermed kunne man få oppgitt totalt antall celler på bildene. Dette ble gjort. Bildene ble studert i Olympus ScanR analyseprogram og antall celler i ulike faser av mitose ble talt manuelt. Det ble så funnet andelen celler i en gitt fase av totalt antall celler på det bestemte dekkglasset.



Figur S: High throughput mikroskop (scanR)

ScanR er en type widefieldmikroskop som kan brukes til helautomatisk bildetakning.

Mikroskopi av levende celler

Delta Vision er en type mikroskop, som kan benyttes til time-lapse-mikroskopering. I time-lapse-mikroskopering fotografieres celler ved faste tidsintervall over flere timer for å kunne lage en film av cellene. Mikroskopet er bygget inn i en boks som man kan lukke dørene til der man har tilgang på karbondioksid. Her plasseres cellene og temperatur og karbondioksidtilførsel stilles slik at cellene har det optimalt for sunn vekst. Objektivt står under brettet med cellene. Det er 37 grader celsius og en karbondioksidkonsentrasjon på 5 % i rommet.

Tymidin er et kjemikaliet som blir benyttet for å synkronisere celler i S-fase. Cellene kommer seg ikke lenger enn til S-fase ved bruk av tymidin og dette er fordi tilsetning av høye konsentrasjoner av tymidin inhiberer biosyntese av nukleotider. Derfor må tymidinmediet byttes ut med fullmedium etter ønsket tid med blokkering (vi benyttet 19-timers

tymidinblokk) for å løse fri cellene. En slik synkronisering kan være veldig nyttig når man skal filme cellene ved live imaging. Da vil cellene passere gjennom mitosen nesten synkront og i tillegg kan man planlegge når cellene vil gå inn i mitose. På den måten slipper man å få en film med mange celler i interfase og et par i mitose. Dette er fint når det er mitose man studerer.

Prosedyre for mikroskopi av levende celler – Delta Vision

Celler med cherrymerket(rød) histon2B og GFP-merket (grønn) tubulin ble sådd ut i 6 brønners cellekulturbrett. Når cellene hadde festet seg ble tymidin tilsatt (2,5 mM). Frigjøringen av cellene ble gjort 19 timer senere ved at cellene ble vasket tre ganger i DMEM fullmedium (1,5 ml). Etter siste vask tilsatte vi 2 ml DMEM fullmedium og lot cellene komme seg ut av arresten i ca en time før cellene ble transfektert med siRNA (0,5 ml transfeksjonskompleks per brønn - se punkt for siRNA-transfeksjon). I følge forhandlers protokoll er opptaket av siRNA fullstendig etter fem timer. Fem tider etter transfeksjonsstart ble derfor cellene fra hver siRNA trypsinert, talt og sådd ut igjen i en 8 brønners celleskål for mikroskopi av levende celler. Når cellene hadde festet seg ble det satt i gang en ny 19 timers-tymidinblokk. De resterende cellene ble splittet til hver sin brønn i et 6 brønners brett. Cellene ble frigjort fra tymidinblokkeringen ved å vaske de tre ganger i DMEM tilpasset mikroskopering av levende celler (uten fenolrødt og med Hepes). Mikroskoperingen ble startet 4 timer etter frigjøring fra tymidin. Resten av cellene ble lysert til verifisering av knockdown med Western-blotting.

Det ble plassert en liten glassplate, som hadde blitt varmet i mikroskopet for å unngå kondens, oppå brettet med cellene. Glassplaten ble teipet fast til åttebrønnersbrettet som også ble teipet til en liten metallplate som det skulle stå på. En liten plastplate ble plassert oppå glassplaten og alt ble satt inn i rommet i mikroskopet. Metallplaten som cellebrettet stod på passet akkurat inn på en bestemt måte over objektivet.

Cellene i prøven måtte lokaliseres i objektivet ved å stille på fokuset. Når cellene var i fokus måtte det bestemmes et godt sted i prøven der mikroskopet skulle starte å ta bilder. Dette vil si et sted der det var minst fire celler og cellene så friske og normale ut. Det ble funnet fire slike punkter for hver oligo, og det ble benyttet Z-stack med total dybde på 16 μm og 0,8 μm seksjoner. Bilder ble tatt hvert femte minutt i 16 timer.



Figur T: Delta Vision

Delta Visionmikroskop benyttes til mikroskopi for levende celler. Til venstre vises boksen rundt objektivet der det er regulert CO₂-tilgang og temperatur. Det er inne i denne boksen at cellene plasseres. Pcen styrer bildetakningen.

Kort om statistikk som ble benyttet

Standardavviket (Stdev) viser hvor stor variasjonen i målingene er ut i fra gjennomsnittet. Standardfeilen (SEM) er en vanlig måte å oppgi avviket eller feilen til en måling. Dette er en funksjon av standardavviket og antall målinger. T-test en statistisk hypotesetest. Den brukes for eksempel til å teste om gjennomsnittsverdien i et normalfordelt datasett er signifikant forskjellig fra en nullhypotese eller om det er signifikant forskjell mellom gjennomsnittsverdiene i to datasett. En parret test brukes når de to datasettene er hentet fra samme utvalget, eller når det er høy korrelasjonskoeffisienten mellom settene. En kumulativ graf kan benyttes for å vise prosentvis mengde individer av i en gitt populasjon som har oppfylt et gitt kriterium (y-aksen) over tid (x-aksen).

Resultater

SNX4-knock down fører til økning av andelen celler i tidlig mitose og reduksjon av antall celler i cytokinese.

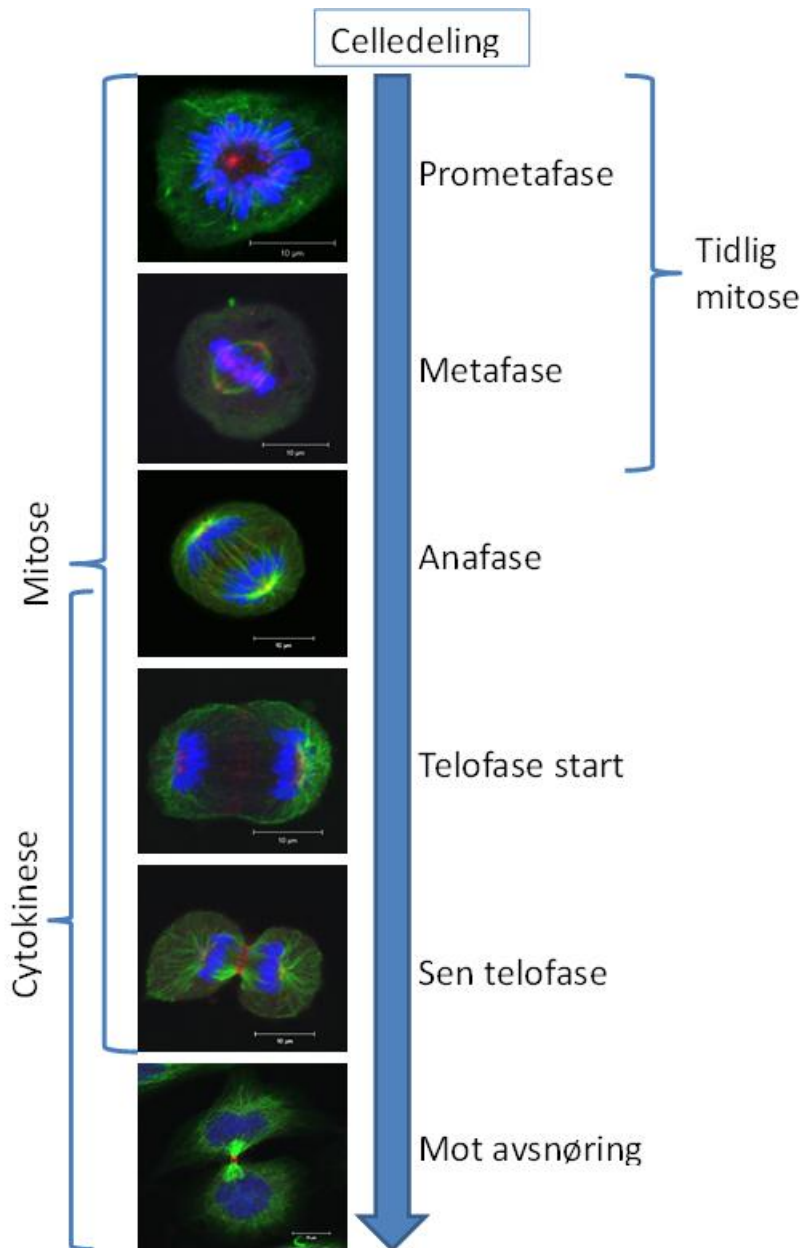
Proteiner som inneholder de PtdIns(3)P bindende domenene Phox homologi (PX-domene) og (Fab1p, YOTB, Vac1p og EEA1)-domene (FYVE) har viktige roller tidlig i cytokinesen (Sagona, Nature cell biol 2010). I tillegg antyder upubliserte data fra Stenmark-laboratoriet at PX-domeneproteinet Sorting nexin 4 (SNX4) er viktig tidlig i mitosen. I denne oppgaven ønsket vi å verifisere disse tidligere upubliserte data og i tillegg bestemme hvor og når i mitosen SNX4 utøver sin funksjon.

For å undersøke om SNX4 spiller en rolle i mitose og/eller cytokinese, ønsket vi å sammenlikne de ulike celledelingsfasene i kontrollceller og i celler transfektert med SNX4-siRNA. Ved å fikse cellene på dekkglass, kunne vi telle antall celler i ulike faser av mitose/cytokinese i mikroskop. Dette var for å se om andelen celler i en bestemt fase var annerledes i SNX4 knockdownceller kontra kontrollceller. For at kvantiteringer av de ulike fasene i mitosen skulle bli pålitelige, måtte vi først sette en standard for hvordan vi kunne kvantitere de ulike mitotiske fasene. HeLa-celler ble sådd ut på dekkglass i 24-brønnersbrett, og disse vokste i ett døgn før de ble direkte fiksert med 4 % formaldehyd (FA) i 30 min og farget med antistoffer mot fosfo-AuroraABC og alfatubulin. Disse antistoffene gjorde det lett å identifisere mitotiske celler. Etter farging ble dekkglassene studert i et konfokalmikroskop, og det ble tatt bilder. Figur 1 viser et representativt utvalg av mitotiske celler og indikerer hva vi karakteriserte som prometafase, metafase, anafase og telofase i våre videre studier.

Etter den første karakteriseringen gjorde vi så en siRNA-transfeksjon, for å slå ned uttrykket av SNX4. Det ble benyttet et SNX4-siRNA-oligonukleotid (oligo #1) og cellene ble transfektert med 50 nM, 75 nM eller 100 nM siRNA slik at vi kunne bestemme hvilken siRNA-konsentrasjon som ga best knockdown av SNX4 og om den eventuelle cellulære effekten korrelerte med graden av knockdown.

HeLa-celler ble sådd ut fulgt opp av transfeksjon med kontroll- og SNX4-siRNA to timer etter. For at ikke cellene skulle vokse for tett og for å få celler over på dekkglass til mikroskopering, ble cellene splittet til nye brønner med dekkglass i etter en dag. Det vil si at

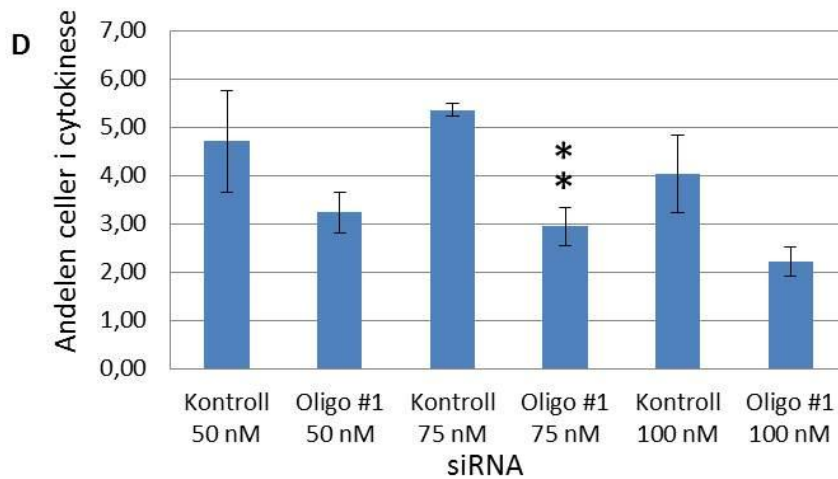
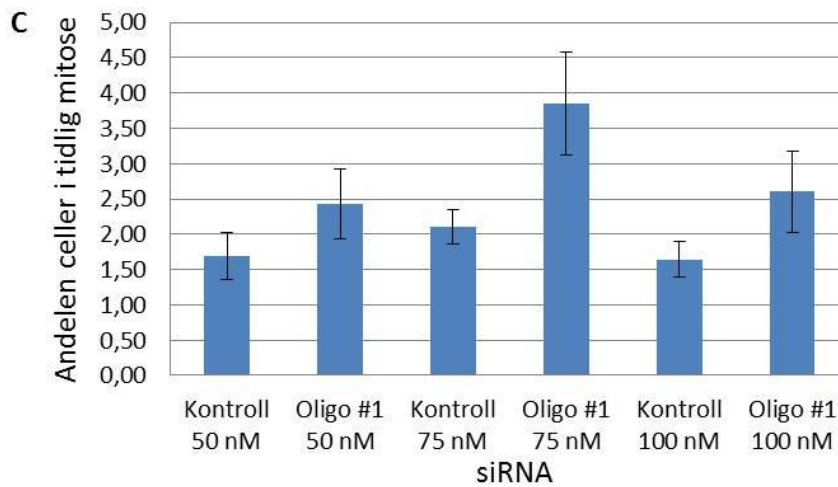
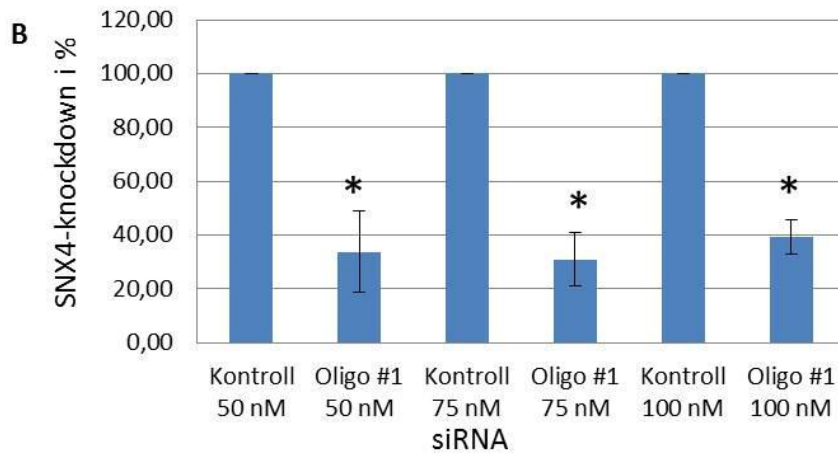
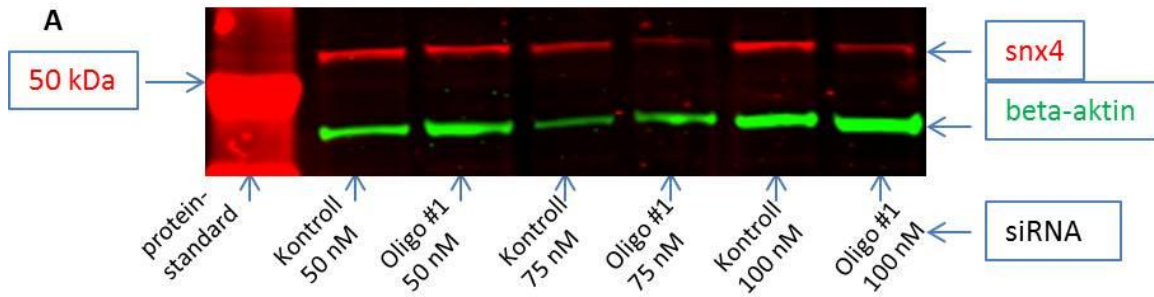
halvparten av cellene var igjen i originalbrønnene og den andre halvparten ble fordelt på dekkglass. To dager etter siRNA transfeksjonen ble cellene i originalbrønnene lysert og



Figur1: Representative bilder av prometafase, metafase, anafase og telofase.

Formaldehydfikserte HeLa celler ble utsatt for indirekte totrinn immunfluorescensfarging som beskrevet i metodekapittelet. Fosfo-AuroraABC vises i rødt, alfa-tubulin i grønt og DNA i blått. Her karakteriserer vi tidlig mitose som celler i prometafase og metafase, mens cytokinesen begynner når separasjon av cytoplasma starter og avsluttes når cellene er helt avsnørt fra hverandre. Størrelsesmarkøren viser 10 μm.

cellene på dekkglass ble fiksert i 4 % PFA ved romtemperatur (30 min). Proteinene i hvert lysat ble så separert etter størrelse ved sodium dodecyl sulfat-polyakrylamidgel-elektroforese (SDS-PAGE).



Figur 2: Reduksjon i SNX4-uttrykk fører til økt antall celler i tidlig mitose og færre celler i cytokinese.

A) Westernblot for SNX4-knock down i HeLa-celler etter transfeksjon med 50 nM, 75 nM, og 100 nM av SNX4-siRNA oligo #1. For deteksjon av proteiner på membranen ble det brukt indirekte totrinns immunfluorescens visualisert ved hjelp av Odyssey-systemet som beskrevet i metodekapittelet. SNX4 vises i rødt og beta-aktin i grønt. Lengst til venstre i figuren vises proteinstandarder med proteiner av kjente størrelser (rødt). Vi ser at SNX4 båndet på 55 kDa blir svakere i siRNA behandlede celler sammenliknet med kontrollceller, særlig i prøvene som er behandlet med 75 nM og 100 nM si-RNA oligonukleotid.

*B) Graden av knock down i tre uavhengige doseresponsforsøk som vist i A ble kvantifisert ved hjelp av Odyssey programvaren. Alle verdier for SNX4 intensitet ble først justert i forhold til mengden beta-aktin i hver prøve (kontroll for lik loading) og grafen viser mengden gjenværende SNX4 intensitet presentert som % av SNX4 nivået i kontrollceller. Error bars viser SEM. Vi ser at 75 nM av oligo #1 gir best knock down. Det ble benyttet uparret student t-test for beregning av signifikans. * $p < 0,05$.*

C) HeLa celler transfektert med control RNA eller siRNA mot SNX4 i ulike konsentrasjoner ble fiksert i 4% PFA og farget med antistoffer mot alfa-tubulin og fosfo-Aurora ABC. Andelen celler i tidlig mitose ble talt manuelt fra bilder tatt med Olympus ScanR mikroskopet og presentert som % av totalt antall celler. Error bars viser SEM fra tre uavhengige forsøk. Vi ser at SNX4 depleterte celler gir en økning i andelen celler i tidlig mitose sammenliknet med kontrollceller. Økningen er størst for 75 nM.

*D) HeLa celler transfektert med control RNA eller siRNA mot SNX4 i ulike konsentrasjoner ble fiksert i 4% PFA og farget med antistoffer mot alfa-tubulin og fosfo-Aurora ABC. Andelen celler i cytokinese ble talt manuelt fra bilder tatt med Olympus ScanR mikroskopet og presentert som % av totalt antall celler. Error bars viser SEM fra tre uavhengige forsøk. Vi ser at SNX4 depleterte celler viser reduksjon i andelen celler cytokinese sammenliknet med kontrollceller. Reduksjonen er tydeligst for 75 nM. Det ble benyttet uparret student t-test for beregning av signifikans. ** $p < 0,01$.*

Etterpå ble proteinene overført til en polyvinyldifluorid(PVDF)-membran ved Western blotting, og visualisert med SNX4- og aktin-antistoffer ved hjelp av en Odyssey infrared imager (Figur 2A). Resultatene viste at alle testede konsentrasjoner av siRNA-oligo #1 ga effektiv knock down av SNX4 sammenliknet med kontroll-siRNA (Figur 2B). Selv om knock downen hadde fungert med alle konsentrasjonene, var den mest effektiv ved 75 nM sammenliknet med de andre konsentrasjonene av oligonukleotid. Derfor ble det bestemt å benytte konsentrasjonen 75 nM av SNX4-siRNA oligo #1 i videre forsøk.

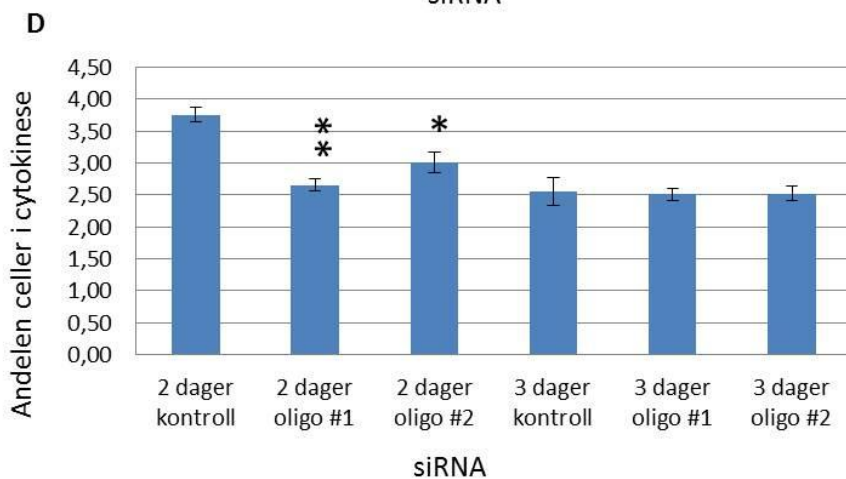
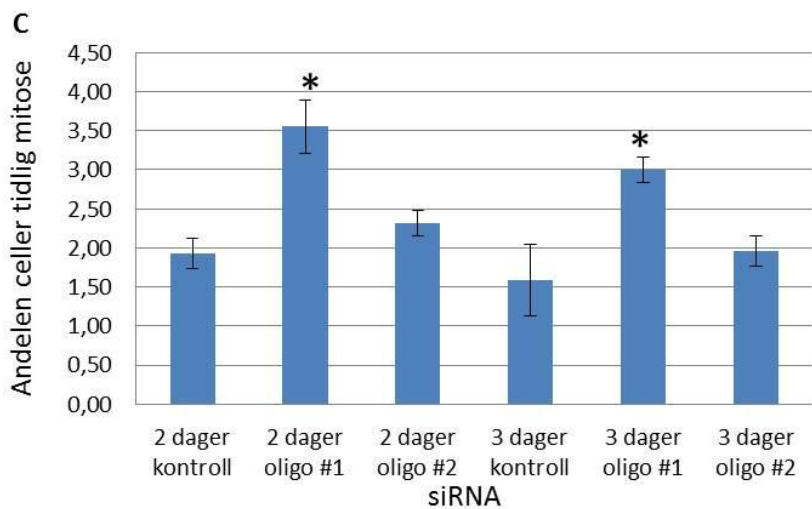
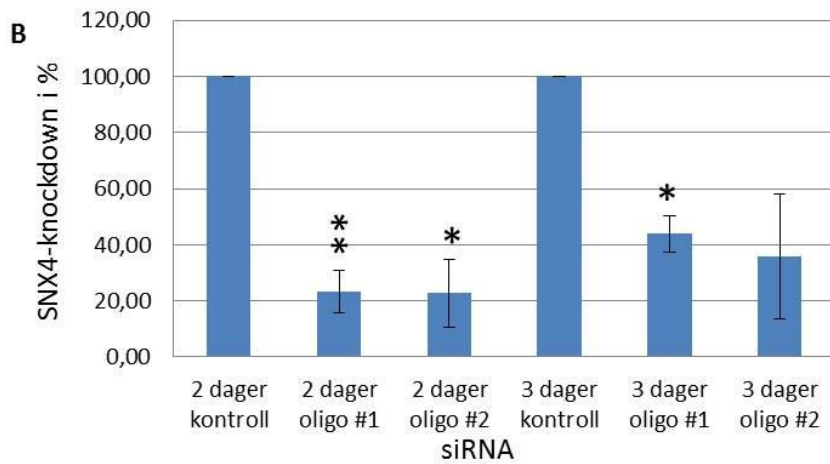
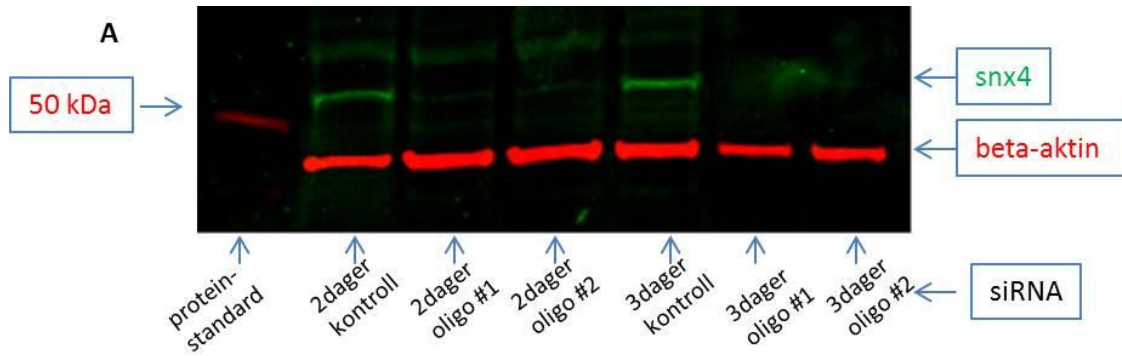
Den halvparten av cellene som ble PFA-fiksert på dekkglass ble farget med primære antistoffer for fosfoaurora-ABC og alfa-tubulin og fluorescerende sekundære antistoffer. Deretter ble det tatt bilder ved hjelp av et high throughput automatisert mikroskop (Olympus ScanR). Totalt antall celler ble automatisk talt ved hjelp av analyseprogramvaren, mens

andelen celler som var i tidlig mitose og i cytokinese ble talt manuelt etter standarden som vist i figur 1. Vi fant en økning av andelen celler i tidlig mitose ved bruk av 50 nM, 75 nM og 100 nM SNX4-siRNA sammenliknet med kontroll siRNA (Figur 2C). Økningen var størst og hadde minst variasjon ved 75 nM. Det var således god korrelasjon mellom effekt og nivå av knock down, siden 75 nM SNX4-siRNA gav mest effektiv knock down av SNX4 (Figur 2B). Videre så vi en nedgang i antall cytokineseprofiler for både 50 nM, 75 nM og 100 nM SNX4-siRNA sammenliknet med kontrol siRNA, og igjen var effekten størst for 75 nM (Figur 2D). Grunnen til at 50 nM og 100 nM ga en mindre effekt kan være at 50 nM var en for lav konsentrasjon til å gi effektiv knockdown i alle forsøk, mens 100 nM var en for høy konsentrasjon slik at enkelte celler døde på grunn av mangel på SNX4. Så langt tyder våre resultater på at SNX4 er nødvendig for at celler skal komme seg fra tidlig mitose til cytokinese.

2 dagers knock down av SNX4 gir størst økning av celler i tidlig mitose

Ved knock down av proteinet av interesse, kan det hende at det genetiske uttrykket til andre proteiner slås ned. Dette kalles for en off-targeteffekt. Dermed kan det hende at effektene man ser er et resultat av knock down av et annet protein enn det man er interessert i. Ved å bruke to ulike SNX4-siRNAoligoer, kan vi sjekke om vi får samme effekter ved knock down og da er det trolig ikke en off-targeteffekt. For å forsikre oss om at resultatet vi observerte med SNX4 siRNA oligo #1 ikke skyltes en off-target effekt valgte vi å inkudere en ekstra SNX4-siRNA oligo. I tillegg til å sammenlikne effekten av å slå ned SNX4 med de to oligoene, ønsket vi å bestemme om en knock down som gikk over 2 eller 3 dager hadde samme effekt.

HeLa-celler ble sådd ut og to timer senere ble cellene transfektert med 75 nM oligo #1 og oligo #2 av SNX4 siRNA. Etter et døgn ble cellene splittet. Halvparten av cellene ble sådd ut på dekkglass, mens den andre halvparten var igjen i originalbrønnene som beskrevet for tidligere forsøk. To dager etter transfeksjon med SNX4-siRNA ble halvparten av cellene lysert og fiksert, mens resten fikk vokse videre ett døgn til før disse også ble lysert og fiksert. Fiksering ble begge dager gjort direkte i PFA i romtemperatur i 30 minutter.



Figur 3: Problemene i celledelingen er tydeligst to dager etter transfeksjon med SNX4 siRNA

A) Westernblot for 2 dagers og 3 dagers knock down av SNX4 etter transfeksjon av SNX4-siRNA i HeLa celler transfektert med 75 nM SNX4-siRNA oligo #1 og oligo #2 eller kontroll-RNA. For deteksjon av proteiner på membranen ble det brukt indirekte totrinns immunfluorescens visualisert ved hjelp av Odyssey-systemet som beskrevet i metodekapittelet. SNX4 vises i grønt og beta-aktin i rødt. Lengst til venstre i figuren vises proteinstandarden med proteiner av kjente størrelser (rødt). Vi ser at SNX4 båndet på 55 kDa blir svakere i siRNA behandlede celler sammenliknet med kontrollceller.

*B) Graden av knock down i tre uavhengige tidskurveforsøk som vist i A ble kvantifisert ved hjelp av Odyssey programvaren. Alle verdier for SNX4 intensitet ble først justert i forhold til mengden beta-aktin i hver prøve (kontroll for lik loading) og grafen viser mengden gjenværende SNX4 intensitet presentert som % av SNX4 nivået i kontrollceller. Error bars viser SEM. Vi ser at 2 dagers transfeksjon gir best knock down for begge oligonukleotider. . Det ble benyttet uparret student t-test for beregning av signifikans. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.*

*C) HeLa celler transfektert med kontrol RNA eller siRNA mot SNX4 i 2 eller 3 dager ble fiksert i 4% PFA og farget med antistoffer mot alfa-tubulin og fosfo-Aurora ABC. Andelen celler i tidlig mitose ble talt manuelt fra bilder tatt med Olympus ScanR mikroskopet og presentert som % av totalt antall celler. Error bars viser SEM fra tre uavhengige forsøk. Vi ser at SNX4 depleterte celler viser en økning i andelen celler i tidlig mitose sammenliknet med kontrollceller. Økningen er større for oligo #1 enn for oligo #2 både etter 2 og 3 dagers transfeksjon, men den største økningen ser vi med oligo #1 etter 2 dagers knock down. . Det ble benyttet uparret student t-test for beregning av signifikans. * $p < 0,05$.*

*C) HeLa celler transfektert med kontroll RNA eller siRNA mot SNX4 i 2 eller 3 dager ble fiksert i 4% PFA og farget med antistoffer mot alfa-tubulin og fosfo-Aurora ABC. Andelen celler i cytokinese ble talt manuelt fra bilder tatt med Olympus ScanR mikroskopet og presentert som % av totalt antall celler. Error bars viser SEM fra tre uavhengige forsøk. Vi ser at SNX4 depleterte celler viser en reduksjon i andelen celler i cytokinese sammenliknet med kontrollceller for begge oligonukleotider etter 2 dagers transfeksjon. . Det ble benyttet uparret student t-test for beregning av signifikans. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.*

Proteinene i 2 og 3 dagers lysatene ble så separert ved SDS-PAGE, overført til PVDF-membran ved Western blotting, og detektert med SNX4- og actin-antistoffer ved hjelp av Odyssey infrarød imager (Figur 3A). Begge SNX4-siRNAoligoene resulterte i en tydelig knock down både etter 2 og 3 dager med SNX4-siRNAtransfeksjon. Graden av Knock down for tre uavhengive forsøk er kvantitert og slått sammen i figur 3B. Figuren viser at det var størst knock down etter 2 dager både for oligo #1 og oligo #2. Vi observerte også at variasjonen i knockdowneffektivitet var større for oligo #2 enn oligo #1.

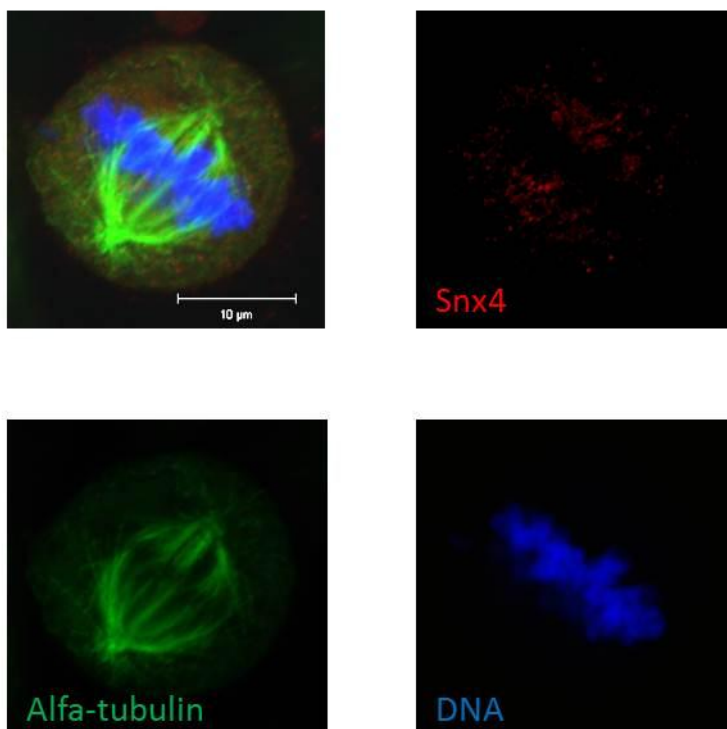
Cellene på dekkglassene ble farget med primære antistoffer mot fosfoaurora-ABC og alfa-tubulin og sekundære fluorescerende antistoffer. Som i tidligere forsøk ble det tatt bilder av cellene ved hjelp et high throughput automatisert mikroskop (Olympus Scan^R). Totalt antall celler ble automatisk talt ved hjelp av analyseprogramvaren mens antall celler i tidlig mitose

og i cytokinese ble talt manuelt etter standarden som vist i figur 1. Resultatene fra tre uavhengige tellinger som viser andelen celler i tidlig mitose ble slått sammen og presentert i figur 3C. Vi fant at både 2 og 3 dagers SNX4 knock down økte antallet celler i tidlig mitose sammenliknet med kontrollen. Økningen var større etter 2 dager enn etter 3 dager. I tillegg ga transfeksjon med oligo #1 generelt større økning i prometa- og metafase enn transfeksjon med oligo #2. Vi fant videre at det var en nedgang i cytokineseprofiler i celler transfektert med SNX4-siRNAoligo #1 og -oligo #2 ved 2 dagers knock down sammenliknet med kontrollceller. Det var ingen synlig effekt etter 3 dager. De tre uavhengige tellingene av cytokineseprofiler er slått sammen og presentert i figur 3D. Siden både nivået av SNX4 knockdown og de mitotiske endringene var størst etter 2 dager konkluderte vi med at det var god korrelasjon mellom graden av SNX4 knock down og cellulær effekt. Det ble derfor bestemt at det skulle benyttes 2 dagers SNX4-knock down videre. Det kan tenkes at cellene akkumulerer ulike typer sekundære effekter etter 3 dager. Oligo #2 ga den samme tendensen til effekt som oligo #1 bare ikke like fremtredende. Ved bruk av oligo #2 observerte vi økt celledød. Det kan tenkes at oligo #2 gir en så effektiv knockdown at enkelte celler runder seg opp og dør og derved maskerer effekten på mitose noe. Siden det ble klart at begge SNX4 siRNA oligoene gav tilsvarende mitotiske problemer så vi konkluderte med at de cellulære effektene ikke skyldtes off-target knock down. Disse resultatene forsterker foreløpig konklusjon om at SNX4 har en rolle i de tidlige fasene av mitosen.

SNX4 lokaliserer til spindelpolene.

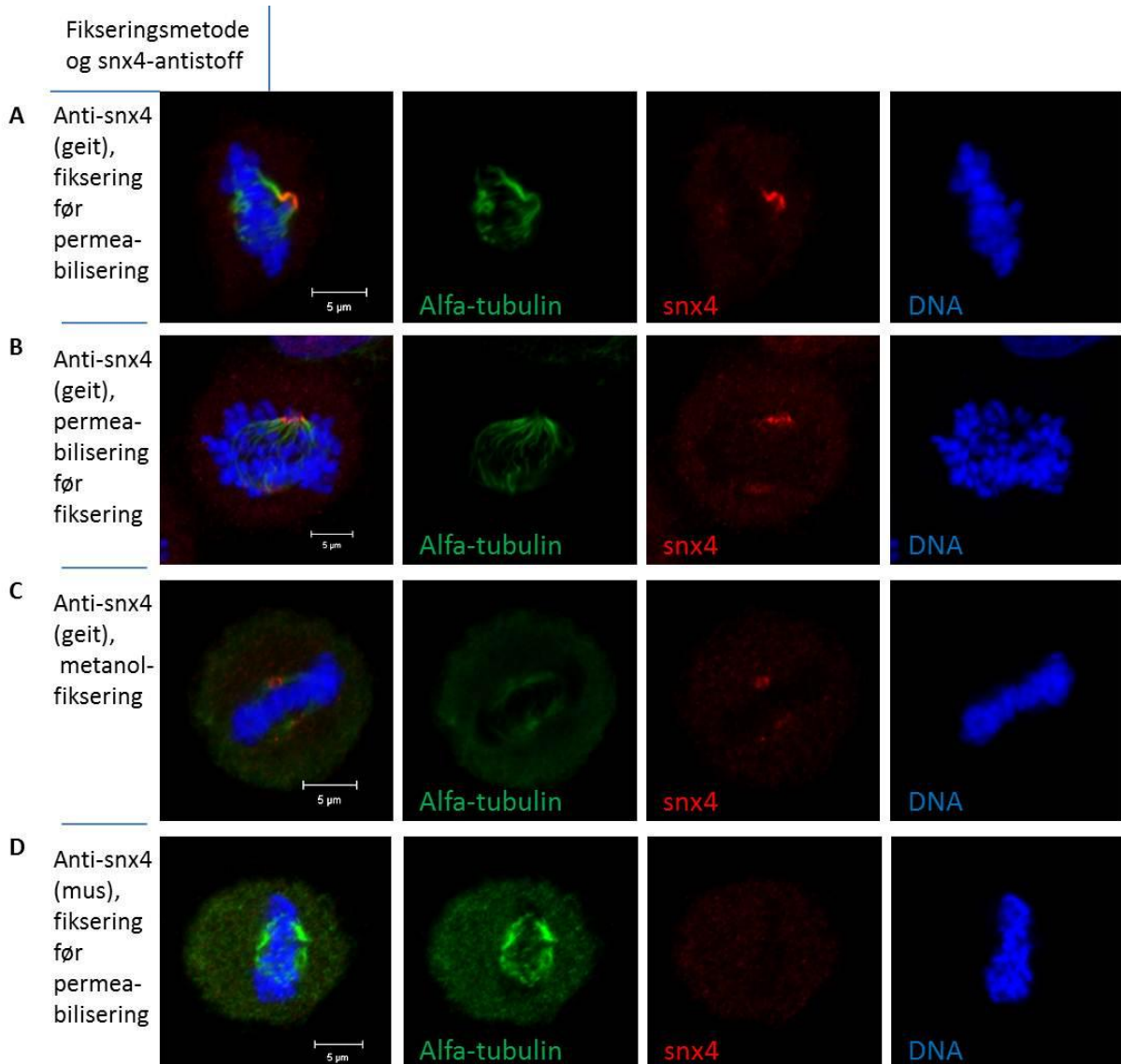
Siden våre resultater tydet på at SNX4 har en rolle i tidlig mitose, ønsket vi å finne ut om SNX4 lokaliserer til mitotiske strukturer i cellen, og valgte å gjøre dette ved hjelp av konfokal mikroskopi. SNX4 har tidligere vært vist å lokaliserer til tidlige endosomer⁷⁸ men det finnes ingen publikasjoner som har undersøkt om SNX4 lokaliserer til mitotiske strukturer. HeLa-celler ble sådd ut på dekkglass og fiksert i 4 % formaldehyd (30 min i romtemperatur) et døgn senere. Vi valgte først å teste et antistoff mot SNX4 som var produsert i geit og fortynnet dette 1:50. Dette er det samme antistoffet som ble brukt for Western i figur 2 og 3. Vi farget også mikrotubulene ved å bruke anti-alfatubulin. Det ble tatt bilder av cellene i konfokal mikroskop, og et representativt bilde er vist figur 4. Under disse fikseringsforhold ga ikke antistoffet noe tydelig bilde av hvor SNX4 lokaliserer i mitotiske celler, men vi fikk en indikasjon på at SNX4 muligens lokaliserer til den mitotiske spindelen.

Direkte fiksering i romtemperatur, som benyttet i figur 4, danner mange kryssbindinger mellom protein og aldehyd så det kan tenkes at SNX4-antistoffet ikke lenger gjenkjenner epitopene etter fiksering. Vi bestemte oss derfor for å optimalisere fikseringsprotokollen for SNX4 antistoffet ved å teste noen mildere former for fiksering. Vi ønsket også å prøve ut flere SNX4-antistoffer. Det ble sådd ut HeLaK-celler på dekkglass, og cellene fikk vokse ett døgn før de ble fiksert. Cellene ble enten fiksert direkte i 4 % PFA på is i 15 min (Figur 5A og D), prepermeabilisert med saponin før fiksering med PFA på is i 15 min (Figur 5B) eller fiksert i metanol ved -20°C i 10 min (Figur 5C). Cellene ble farget med antistoff mot SNX4 produsert i geit (Santa Cruz, 1:25) eller i mus (AbCam, 1:25) som indikert i figur 5 og antistoff mot alfa-tubulin. Det ble tatt bilder av cellene i konfokalmikroskop og et representativt utvalg av celler er vist i figur 5. Antistoffet mot SNX4 produsert i mus ga ingen spesifikk farging for noen av fikseringsmetodene (Figur 5D og ikke vist). SNX4-antistoffet produsert i geit ga derimot spindelpolfarging i alle de tre ulike fikseringsmetodene. Den sterkeste SNX4-fargingen fant vi etter direkte PFA-fiksering på is i 15 min og vi bestemte derfor å bruke denne type fiksering for det polyklonale SNX4 antistoffet videre. Hypotesen om at SNX4 har en rolle tidlig i mitosen passer bra med lokaliseringen av SNX4 til spindelpolene i denne fasen av cellyklus.



Figur 4: SNX4 detekteres svakt på mitotisk spindel i kraftig fikserte celler

HeLa-celler ble direkte fiksert med formaldehyd i romtemperatur i 30 min. Det ble benyttet indirekte totrinns immunfluorescens. Det ble brukt primært antistoff mot SNX4 fra geit og Cy3 merket sekundærantistoff (rødt). Det ble brukt primært antistoff for alfa-tubulin fra mus og Cy2 merket sekundærantistoff (grønt). DNA vises i blått. Vi skimter SNX4-farging på mitotisk spindel. Størrelsesindikatoren viser 10 μm .



Figur 5: SNX4 detekteres på mitotisk spindel og spindelpolene ved mildere former for fiksering

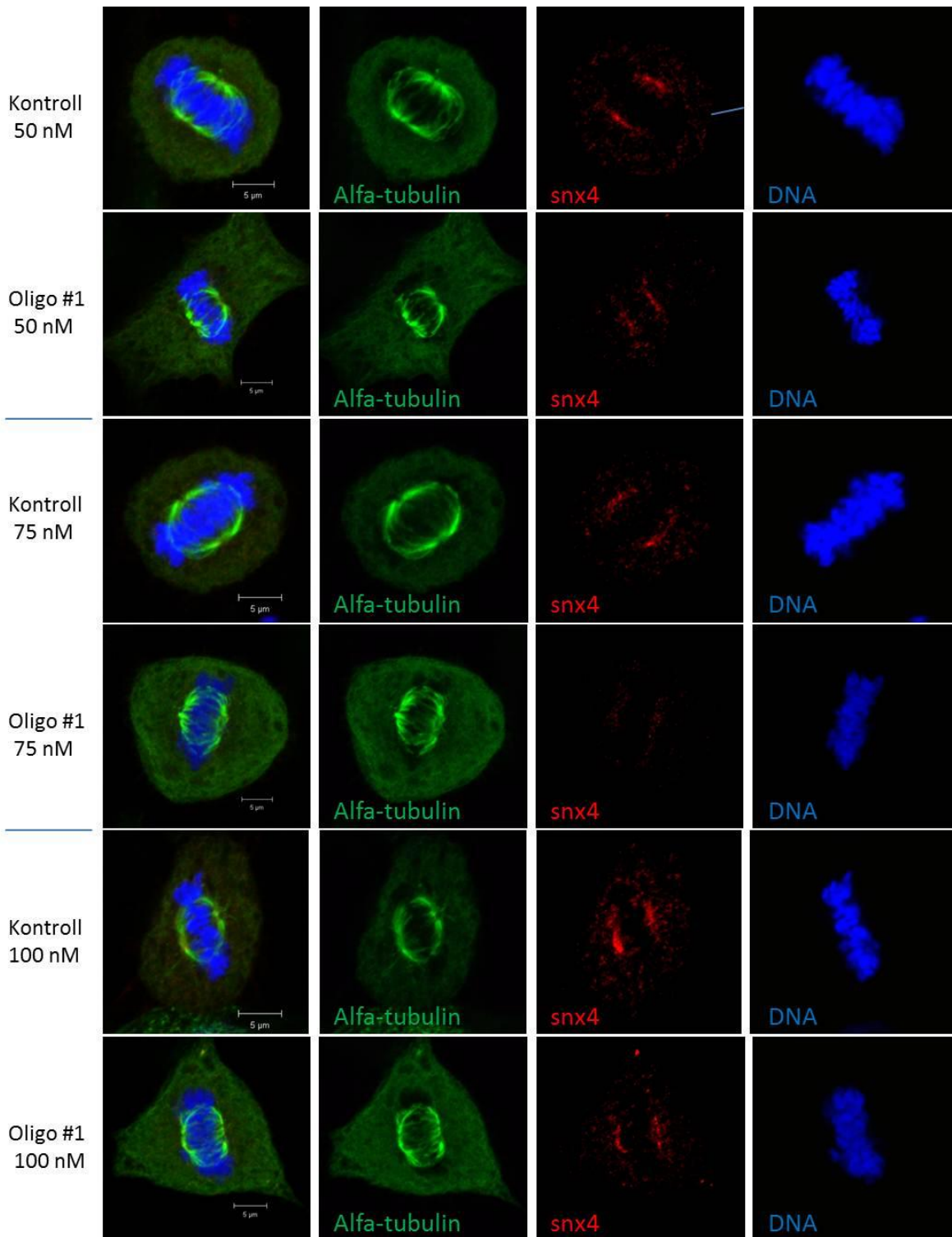
HeLa-celler ble fiksert med ulike metoder som indikert på figuren. Det ble benyttet indirekte totrinns immunfluorescens og konfokalmikroskopi. SNX4 vises i rødt, alfa-tubulin i grønt og DNA i blått. A-C) Primærantistoff for SNX4 fra geit (Santa Cruz) D) Primærantistoff for SNX4 fra mus (AbCam). Vi ser at SNX4-antistoffet fra Santa Cruz gir sterk SNX4-farging ved spindelpolene ved bruk av hver av de milde fikseringsmetodene, mens AbCam-antistoffet ikke viser noen spesifikk farging. AbCam-antistoffet ble også testet på celler fiksert ved andre fikseringsmetoder, men ga ingen SNX4-farging i noen tilfeller (ikke vist).

For å finne ut om SNX4 lokaliseringen til spindelpolene var spesifikk, bestemte vi oss for å teste om signalet på spindelpolene ble svakere etter SNX4 knock down.

Hela-celler ble sådd ut og transfektert med 50 nM, 75 nM og 100 nM SNX4-siRNA oligo #1. En dag etter transfeksjonsstart ble halvparten av cellene splittet over på dekkglass mens den andre halvparten fikk vokse videre i originalbrønnene. Vi fant tidligere at optimal knock down av SNX4 var etter 2 dagers transfeksjon. I dette forsøket ble derfor cellene fiksert direkte i 4 % PFA på is i 15 min (celler på dekkglass) eller lysert for Western blotting (celler i original brønnene) to dager etter transfeksjonsstart. Det ble gjort immunfluorescensfarging med et polyklonalt antistoff for SNX4 fra geit (Santa Cruz, 1:50) og antistoff for alfa-tubulin. Det ble tatt bilder av cellene i et konfokal-mikroskop, og et representativt utvalg av de mitotiske cellene kan sees i figur 6. Knock downen fungerte godt ved alle siRNA konsentrasjonene som ble benyttet, men var igjen mest effektiv etter transfeksjon med 75 nM siRNA oligonukleotid (ikke vist). Vi observerte at SNX4 spindelpolfargingen var svakere i knock down-celler enn i kontrollceller. Ved bruk av 75 nM SNX4 siRNA kunne vi tydelig se at SNX4 antistoffet ikke lenger farget spindelpolene. Det var således god korrelasjon mellom graden av knock down og styrken på antistofffargingen. Dette kan tyde på at SNX4-antistoffet spesifikt gjenkjenner endogent SNX4 i cellene. Spindelpollokalosering av SNX4 passer godt med hypotesen om at SNX4 har en rolle i mitosen og stemmer overens med våre tidligere resultater.

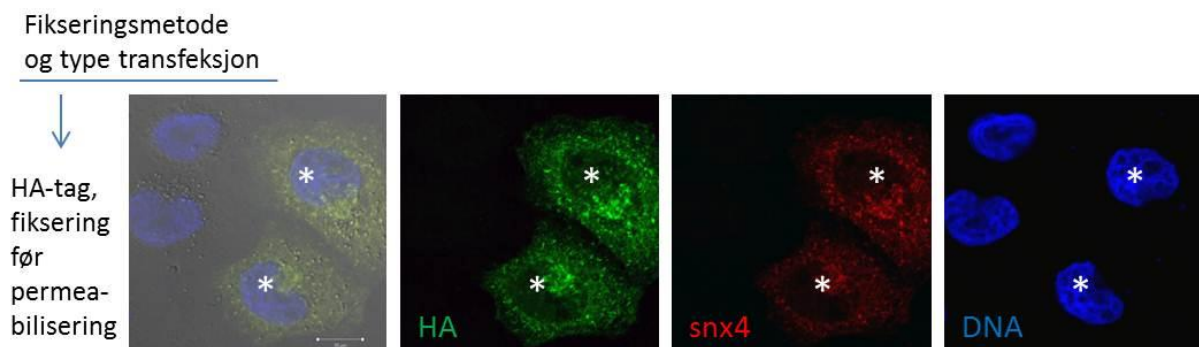
En annen måte å bestemme antistoffspesifisiteten på var å undersøke om det polyklonale SNX4-antistoffet fra Santa Cruz (geit) kunne gjenkjenne overuttrykt SNX4.

Hela-celler ble sådd ut på dekkglass, og da cellene hadde festet seg ble de transfektert med Hemagglutinin (HA)-tagget SNX4 cDNA. 24 timer etter transfeksjonen ble cellene direkte fiksert med 4 % formaldehyd på is i 15 min før farging med polyklonalt antistoff mot SNX4 produsert i geit (1:50) og antistoff mot HA. Det ble tatt bilder av cellene i konfokalmikroskopet og figur 7 viser to transfekterte celler og to utransfekterte naboceller, alle i interfase. Vi fant fullstendig overlapp mellom HA og SNX4 antistoffene i de transfekterte cellene og dette underbygger vårt tidligere funn om at SNX4-antistoffet spesifikt gjenkjenner SNX4. HA-SNX4 viste en lokalisering som kunne passe med vesikulære strukturer, muligens endosomer, i samsvar med tidligere publiserte funn ⁷⁸. Vi klarte ikke å finne HA-SNX4 transfekterte celler i mitose. Således var det ikke mulig å bestemme om transfektert SNX4 også lokaliserer til spindelpolene.



Figur 6: Spindelfargingen med SNX4 antistoffer er svakere i SNX4 knock down-celler enn i kontrollceller.

HeLa-celler ble transfektert med 50, 75 og 100 nM av SNX4-siRNAoligo #1. Cellene ble fiksert i 15 minutter på is. Det ble benyttet indirekte totrinns immunfluorescens og konfokalmikroskopi. SNX4 vises i rødt, alfa-tubulin i grønt og DNA i blått. Primærantistoff for SNX4 fra geit (Santa Cruz) ble benyttet. Vi ser at SNX4-antistoffet gir sterk SNX4-farging ved spindelpolene og at denne spindelfargingen er svakere i knockdownceller sammenliknet med kontrollceller. Nedgangen er størst for 75 nM.



Figur 7: Det polyklonale SNX4-antistoffet gjenkjenner overuttrykt SNX4

*HeLa-celler ble transfektert med Hemagglutinin(HA)-tagget SNX4-cDNA i 24 timer. Cellene ble fiksert med PFA i 15 minutter på is. Det ble benyttet indirekte totrinn immunfluorescens og konfokalmikroskopi. SNX4 vises i rødt, HA i grønt og DNA i blått. Primærantistoff mot SNX4 fra geit (Santa Cruz) ble brukt. Vi ser at SNX4 overlapper fullstendig med HA. Transfektete celler er indikert med *.*

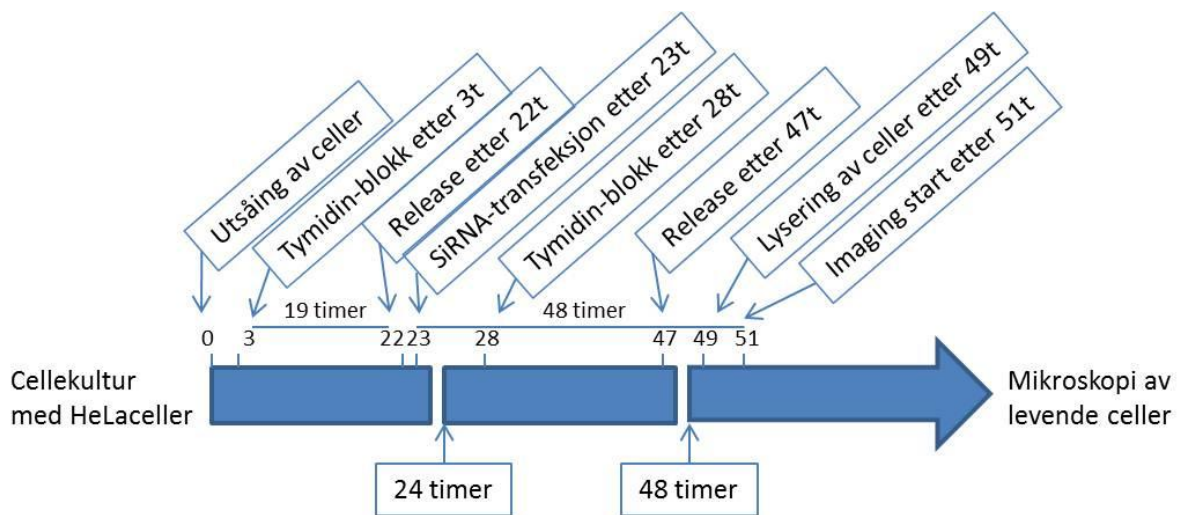
Celler med mindre SNX4 brukte lengre tid i prometafase og har vanskeligheter med å gjennomføre korrekt mitose og cytokinese

For bedre å kunne studere kinetikken og detaljene i den cellulære effekten av SNX4-knockdown, ville vi følge kontroll og SNX4-knockdown celler ved mikroskopi av levende celler.

For å kunne observere eventuelle problemer med kromosomoppstilling og måle hvor lang tid cellene brukte gjennom de ulike fasene av celledelingen, ble det brukt HeLa celler med stabilt uttrykk av Cherrymerket Histon 2B og GFP-merket tubulin (HeLa-Cherry H2B, GFP tubulin) og et fluorescensmikroskop spesielt tilpasset studier av levende celler (DeltaVision).

Siden celler behandlet med SNX4-siRNA i mer enn 2 dager kan vise tegn på sekundære effekter etter defekt mitose, ønsket vi å følge SNX4-knockdown celler gjennom den første celledelingen etter at proteinet ble borte. For å få dette til måtte vi synkronisere cellene. Cellene ble synkronisert slik at cellene gikk gjennom mitose nesten likt og slik at SNX4 uttrykket var slått godt ned da mitosen begynte. Forsøksoppsettet kan sees i figur 8. Kort fortalt ble cellene først synkronisert i S-fase ved hjelp av en tymidinblokkering som varte i 19 timer. En time etter frigjøringen fra tymidinblokkeringen ble cellene transfektert med kontroll- og SNX4- (oligo #1 og oligo #2) siRNA. Fem timer senere ble cellene splittet over

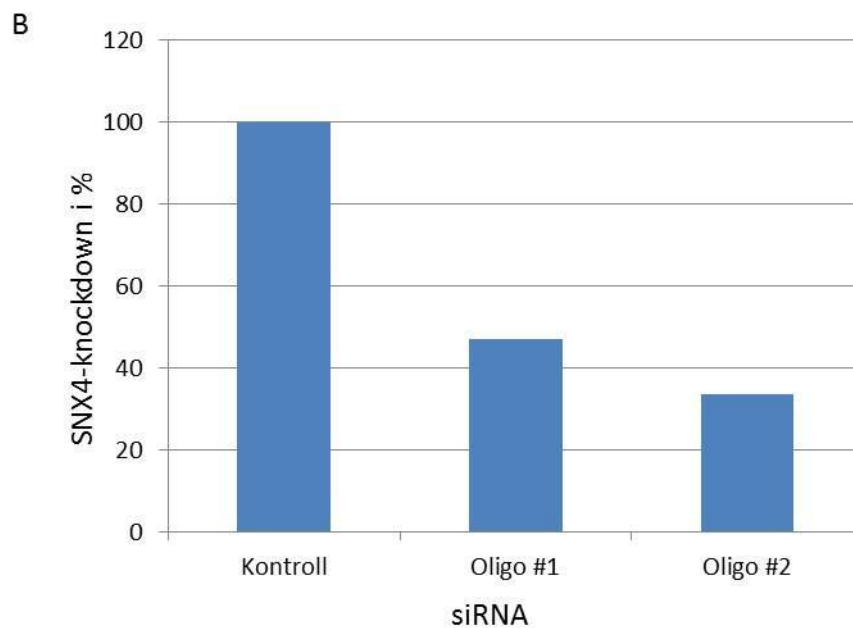
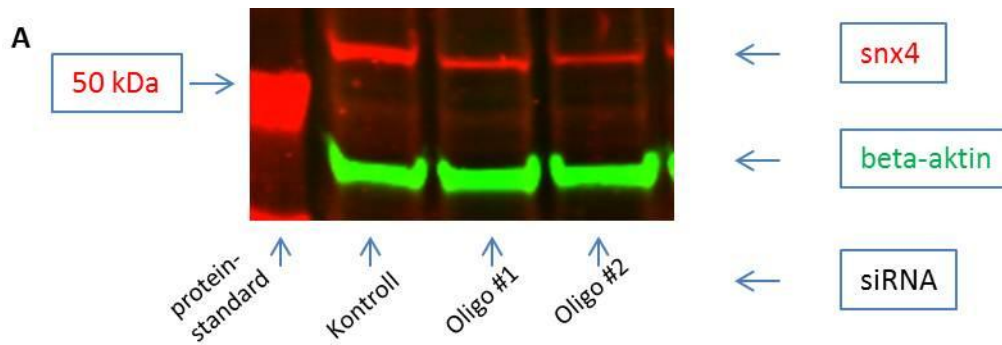
til celleskåler for studie av levende celler og utsatt for en ny 19 timers tymidinblokkering. De resterende cellene ble også utsatt for 19 timers tymidinblokkering og sådd ut til verifikasjon av knock down til dagen etter. Etter frigjøringen fra den andre tymidin behandlingen fikk cellene hvile i fire timer før vi startet bildetakningen. Det ble så tatt fire bilder med minst fem celler på hvert bilde for hver siRNA. Bildene ble tatt hvert femte minutt i 16 timer. Etter forsøkets avslutning ble tidsserien studert manuelt ved hjelp av SoftWorx programvaren samtidig som graden av knock down ble sjekket ved hjelp av Western blotting.



Figur 8: Prosedyre for studie av levende celler

Det ble benyttet HeLa-Cherry H2B GFP tubulin-celler (H2B-tub). Cellene ble utsatt for tymidinblokk med påfølgende frigjøring 19 timer senere. H2B-tubcellene ble så transfektert med kontroll- og SNX4(oligo #1 og oligo #2)-siRNA. Det ble utført en ny (19 timer) tymidinblokk 5 timer etter transfeksjonen før cellene ble splittet til celleskåler for studie av levende celler. Bildetakningen ble startet 4 timer etter frigjøring fra tymidin. Resten av cellene ble lysert før verifisering av knock down med Western blotting.

Proteinene i de ulike lysatene ble separert ved SDS-PAGE, overført til PVDF-membran ved Western blotting og detektert med betaaktin- og SNX4 antistoffer. Proteinene på membranen ble visualisert med Odyssey infrared imager (Figur 9A). Figuren viser at cellene som vi fulgte gjennom mitosen har en effektiv SNX4-knockdown. Blottet for SNX4 ble kvantitert, og er presentert i figur 9B.



Figur 9 Verifisering av knock down med Western blotting

A) Westernblot for SNX4-knockdown i H2B-tubceller etter transfeksjon med kontroll- og SNX4-siRNA (oligo #1 og oligo #2). For deteksjon av proteiner på membranen ble det brukt indirekte totrinn immunfluorescensvisualisert ved hjelp av Oddysey-systemet. SNX4 vises i rødt og beta-aktin i grønt. Lengst til venstre i figuren vises proteinstandard med proteiner av kjente størrelser (rødt). Vi ser at SNX4-båndet på 55 kDa blir svakere i siRNA-behandlede celler sammenliknet med kontrollceller.

B) Graden av knock down, som vist i A, ble kvantifisert ved hjelp av Oddysey programvaren. Alle verdier for SNX4-intensitet ble først justert i forhold til mengden beta-aktin i hver prøve (kontroll for lik ladning) og grafen viser mengden gjenværende SNX4-intensitet presentert som % av SNX4-nivået i kontrollceller. Vi ser at oligo #2 ga best knock down.

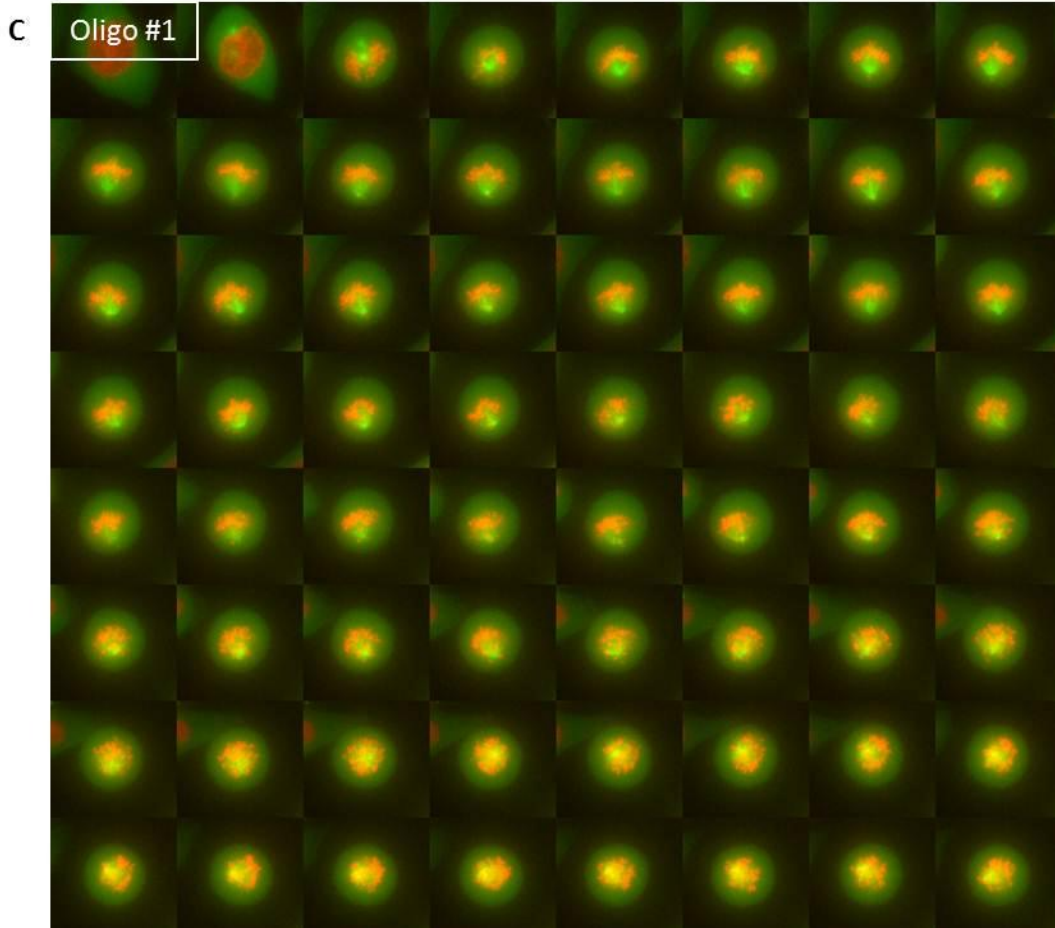
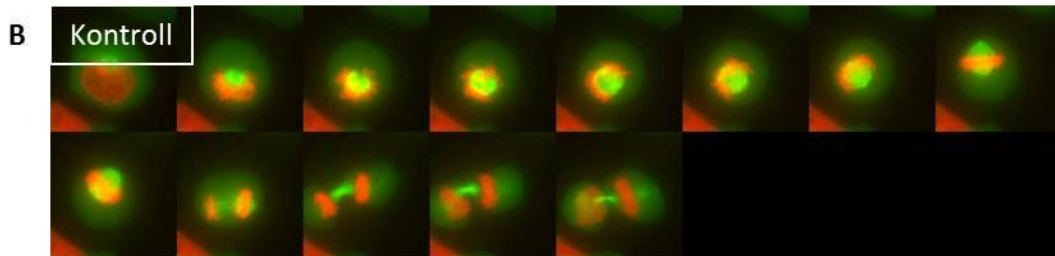
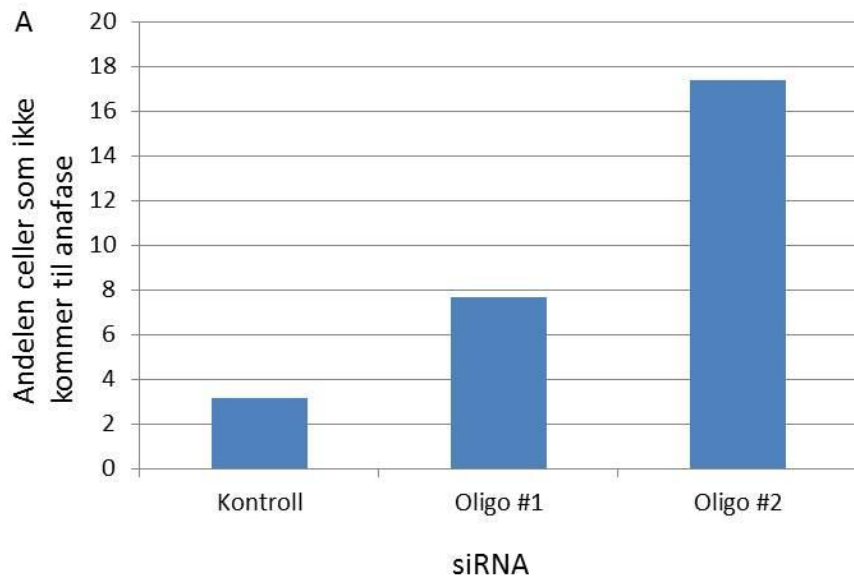
For å teste hypotesen vår om at SNX4-knockdown fører til problemer i prometafase og forsinket starten av anafase, telofase og cytokinese, valgte vi å studere den 16 timer lange bildeserien av kontroll- og knockdownceller i detalj. Først fokuserte vi på hvor lang tid cellene brukte på å komme seg fra prometafase til anafase. I denne prosessen observerte vi at

et stort antall av SNX4-knockdown celler ikke kom seg til anafase i det hele tatt og valgte derfor først å bestemme andelen celler arrestert i denne tidlige fasen av mitosen. Vi fant at 2,4 ganger flere celler transfektert med SNX4 oligo #1 og 5,5 ganger flere celler transfektert med SNX4 oligo#2 var arrestert i overgangen til anafase sammenliknet med kontrollen (figur 10A). En representativ bildeserie av en kontrollcelle (Figur 10B) og en celle transfektert med SNX4 oligo #2 som ikke kommer seg til anafase (Figur 10C). Disse bildene viser tydelig at mens overgangen fra prometafase til anafase tar ca 45 minutter i kontrollcellen blir knockdowncellen værende i prometafase i mer enn 4 timer.

Etter å ha ekskludert de cellene som ikke kommer seg til anafase, bestemte vi hvor lang tid de resterende cellene brukte på å komme seg fra prometafase til anafase og oppdaget at celler transfektert med SNX4 oligo #1 var betraktelig forsinket sammenliknet med kontrollen (Figur 11A). Etter 50 minutter hadde 77 % av kontrollcellene begynt anafasen, mens bare 57 % av SNX4-knockdowncellene hadde begynt anafase selvom de hadde vært i mitose like lenge som kontrollen. Først etter 120 minutter hadde 77 % av SNX4-siRNAbehandlede celler kommet seg til anafase. De få SNX4 oligo#2-behandlede cellene som ikke var blitt arrestert i prometafase gav ikke noen tydelig forsinkelse i overgangen til anafase. Siden graden av SNX4-knockdown var best med oligo #2 i dette forsøket (Figur 9), kan dette funnet tyde på at tapet av SNX4-protein var så stort at feilen ikke lot seg reparere. Disse resultatene korrelerte med det vi fant i våre tidligere forsøk, hvor vi viste at SNX4-knockdown økte andelen celler i tidlig mitose.

Representative bildeserier fra kontroll og to SNX4-siRNAtransfekteerte celler er vist i figur 11B-D. I denne bildeserien ser vi at kontrollen bruker ca 120 minutter fra prometafase til anafase (Figur 11B) mens cellene behandlet med SNX4 siRNA oligo#1 brukte ca 320 på å komme seg til anafase (Figur 11C). Cellene behandlet med SNX4 oligo #2 viste en liten forsinkelse og brukte ca 160 min på overgangen fra prometafase til anafase (Figur 11D).

For at celler i mitose skal gå videre fra metafase til anafase og begynne avsnøringen, må alle kromosomene være bi-orientert. Når cellen oppdager at bi-orientering ikke er oppnådd starter en prosess som hindrer cellen i å gå over til anafase. Denne prosessen kalles spindelkontrollpunkt (SAC).



Figur 10 Celler transfektert med SNX4-siRNA hadde en større andel celler som ikke kom til anafase

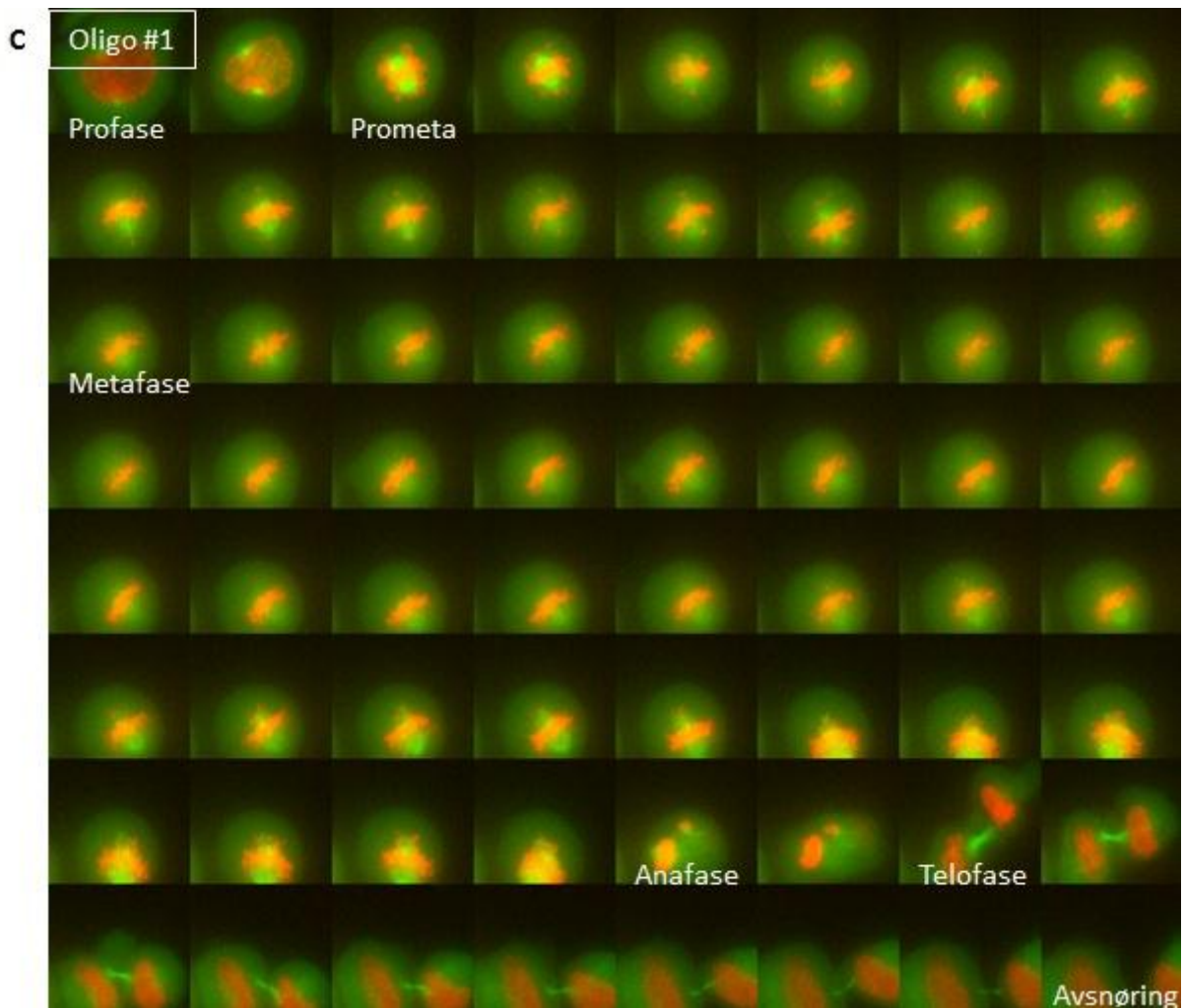
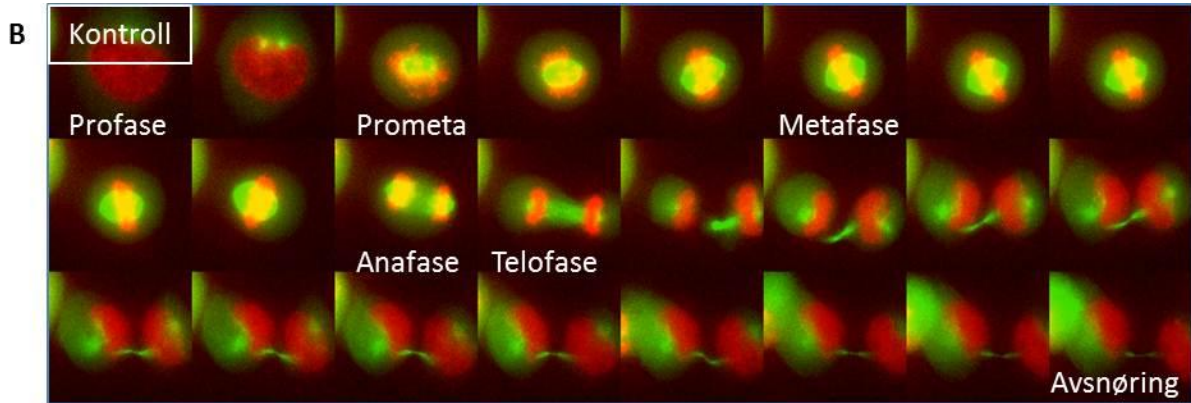
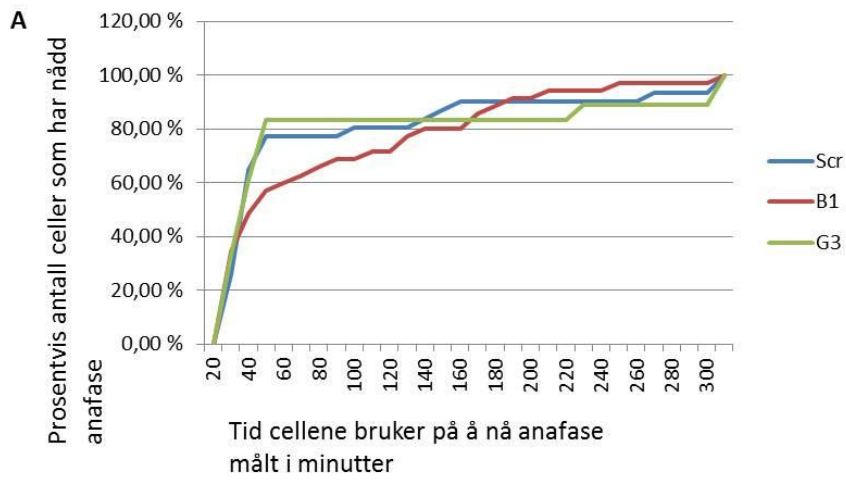
A) Cellefilmene fra mikroskopi av levende celler ble studert manuelt i SoftWorks-programvaren. Andelen celler (prosent av totalt antall celler transfektert med en gitt siRNA) som ikke kom til anafase ble kvantifisert. Cellene var transfektert med kontroll og SNX4-siRNA(oligo #1 og oligo #2). Vi ser at oligo #2 hadde den største andelen celler som ikke kom til anafase.

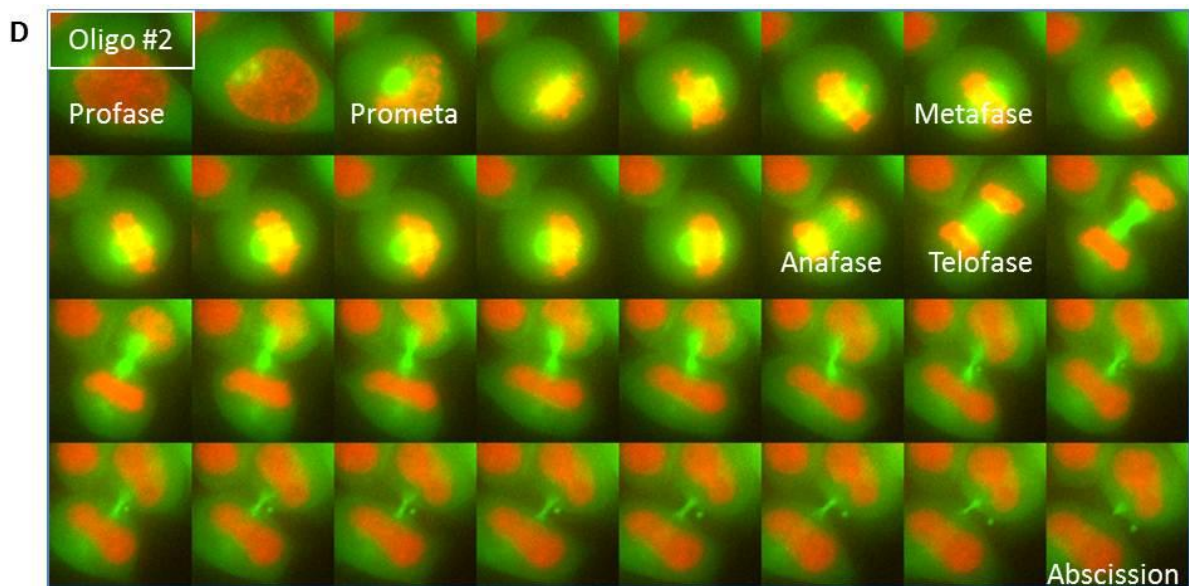
B) H2B-Tubceller ble utsatt for tymidinblokk, transfeksjon med siRNA og ny tymidinblokk før mikroskopi av levende celler. Det ble tatt bilder av gitte områder av celler. Bildene ble tatt hvert femte minutt i 16 timer. DNA vises i rødt (Cherry) og tubulin vises i grønt (GFP). Figuren viser en bildeserie av en typisk kontrollcelle fra mikroskopering av levende celler. Cellen brukte ca 45 min på å komme seg fra profase til anafase.

C) H2B-Tubceller ble utsatt for tymidinblokk, transfeksjon med siRNA og ny tymidinblokk før mikroskopi av levende celler. Det ble tatt bilder hvert femte minutt i 16 timer. DNA vises i rødt (Cherry) og tubulin vises i grønt (GFP). Figuren viser en bildeserie av en typisk oligo #1-transfektet celle som ikke kommer til anafase i løpet av cellefilmen. Cellen var i prometafase i over 4 timer.

Først når alle kromosomene er bi-orientert og SAC skrues av kan cellen gå over til anafase. Siden SNX4 knock down celler bruker lang tid på å komme seg videre fra metafase til anafase bestemte vi oss for å sjekke om det var noen celler som ikke hadde biorienterte kromosomer under SNX4 knock down. Et nærbilde av en kontrollcelle og en SNX4-siRNAbehandlet celle viste tydelig at den SNX4-depleterte cellen hadde kromosomoppstillingsfeil (Figur 12A). Andelen celler med kromosomoppstillingsfeil er kvantitert i figur 12B. Omtrent 36 og 26 % av cellene transfektert med henholdsvis SNX4 oligo#1 og oligo#2 har problemer med å få alle kromosomene bi-orienterte.

Som en oppsummering kan vi si at celler som har mindre SNX4 bruker lengre tid i prometafase og har vanskeligheter med å få alle kromosomene bi-orienterte på ekvatorialplanet og derved gjennomføre korrekt mitose og cytokinese.





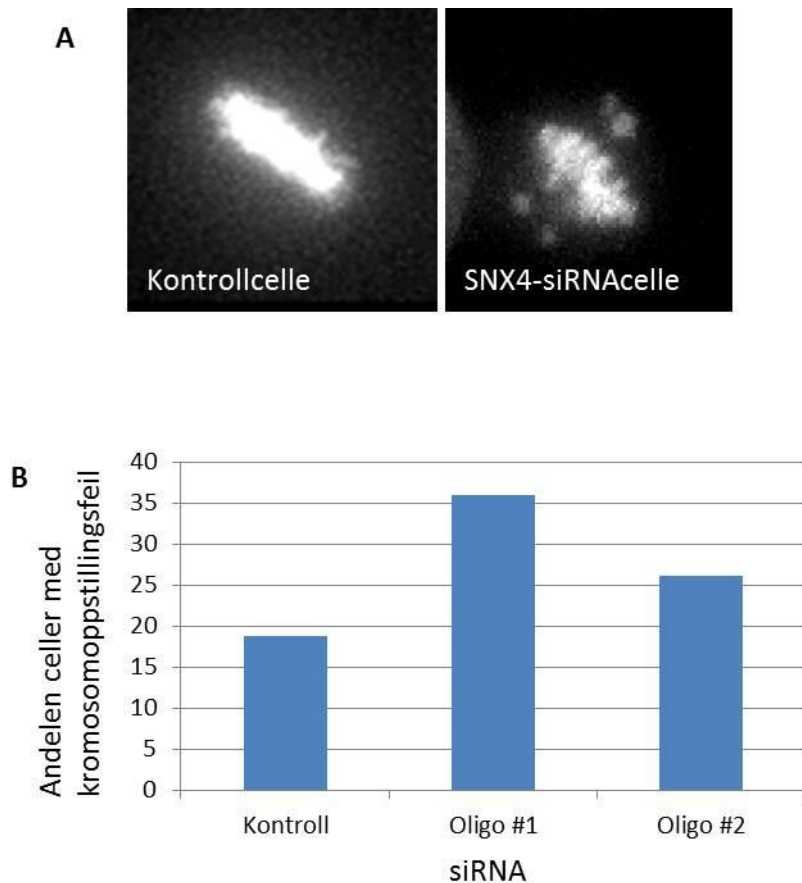
Figur 11 Celler transfektert med SNX4-siRNA har en økning i celler som ikke kommer til anafase og celler med kromosomoppstillingsfeil

A) De samme cellefilmene som det ble hentet eksempler fra i figur 10 ble studert manuelt i SoftWorks-programvaren. Cellene var transfektert med kontroll og SNX4-siRNA(oligo #1 og oligo #2). Det ble tatt bilder hvert femte minutt i 16 timer. DNA vises i rødt (Cherry) og tubulin vises i grønt (GFP). Grafen viser hvor lang tid de ulike cellene (kontroll, oligo #1 og oligo #2) bruker på å nå anafase. Vi ser at oligo #1-celler bruker lengst tid på å nå anafase.

B) De samme cellefilmene som det ble hentet eksempler fra i figur 10 ble studert manuelt i SoftWorks-programvaren. Cellene var transfektert med kontroll og SNX4-siRNA(oligo #1 og oligo #2). Det ble tatt bilder hvert femte minutt i 16 timer. DNA vises i rødt (Cherry) og tubulin vises i grønt (GFP). Bildeserien viser en typisk kontrollcelle fra profase til avsnøring. Cellen brukte ca 120 minutter på å komme seg fra profase til avsnøring.

C) De samme cellefilmene som det ble hentet eksempler fra i figur 10 ble studert manuelt i SoftWorks-programvaren. Cellene var transfektert med kontroll og SNX4-siRNA(oligo #1 og oligo #2). Det ble tatt bilder hvert femte minutt i 16 timer. DNA vises i rødt (Cherry) og tubulin vises i grønt (GFP). Bildeserien viser en typisk celle transfektert med SNX4-siRNA(oligo #1) fra profase til avsnøring. Cellen brukte ca 320 minutter på å komme seg fra profase til avsnøring.

D) De samme cellefilmene som det ble hentet eksempler fra i figur 10 ble studert manuelt i SoftWorks-programvaren. Cellene var transfektert med kontroll og SNX4-siRNA(oligo #1 og oligo #2). Det ble tatt bilder hvert femte minutt i 16 timer. DNA vises i rødt (Cherry) og tubulin vises i grønt (GFP). Bildeserien viser en typisk celle transfektert med SNX4-siRNA(oligo #2) fra profase til avsnøring. Cellen brukte ca 160 minutter på å komme seg fra profase til avsnøring.



Figur 12: Celler transfektert med SNX4-siRNA har en høyere andel celler med kromosomoppstillingsfeil

A) Figuren viser to nærbilder av to ulike celler fra den samme cellefilmen som nevnt i Figur 10. Det ene nærbildet viser en typisk kontrollcelle. Det andre nærbildet viser en typisk SNX4-siRNAcelle med kromosomoppstillingsfeil.

B) De samme cellefilmene som det ble hentet eksempler fra i figur 10 ble studert manuelt i SoftWorks-programvaren. Andelen celler (prosent av totalt antall celler transfektert med en gitt siRNA) med kromosomoppstillingsfeil i metafase ble kvantifisert. Cellene var transfektert med kontroll og SNX4-siRNA(oligo #1 og oligo #2). Vi ser at oligo #1 hadde den største andelen celler med kromosomoppstillingsfeil i metafase.

Diskusjon

I denne oppgaven har vi studert om SNX4 spiller en rolle i mitose. Vi så en økning i andelen celler i tidlig mitose og reduksjon av andelen celler i cytokinese for celler som hadde redusert uttrykk av SNX4 sammenliknet med kontrollceller. Mikroskopering av levende celler viste at celler som hadde redusert uttrykk av SNX4 brukte lengre tid i prometafase og hadde vanskeligheter med å gjennomføre korrekt mitose og cytokinese sammenliknet med kontrollceller. SNX4-knockdowncellene hadde også en økt andel celler som ikke kom seg til anafase og økt andel celler som hadde kromosomoppstillingsfeil. Disse funnene korrelerte godt med SNX4-lokalisering til spindelpolene i mitosen. Til sammen tyder funnene på at SNX4 har en rolle i kromosomcongression, prosessen som forflytter kromosomene mot metafaseplaten ved hjelp av motorproteiner, mikrotubuli og kinetokorer.

Våre innledende studier viste at SNX4 depleterte celler hadde en tydelig økning i andelen celler i tidlig mitose og reduksjon av andelen celler i cytokinese sammenliknet med kontroll. Disse funnene indikerte at cellene slet med å komme seg til anafase. Siden anafase ikke kan starte før alle kromosomene er biorienterte på ekvatorialplanet vil celler som sliter med å gjennomføre congression bruke lengre tid i prometafase/metafase. Filming av celler uten SNX4 bekreftet at disse cellene brukte lengre tid i tidlig mitose sammenliknet med kontrollceller og hadde vanskeligheter med å gjennomføre korrekt mitose og cytokinese. Forsinket start av anafase observert i SNX4-knockdownceller korrelerte ofte med kromosomoppstillingsfeil, altså at cellene hadde problemer med å samle kromosomene på metafaseplaten. En slik effekt kan tyde på at kromosomene ikke var biorienterte, men var festet til kun en av spindelpolene, via syntelisk eller monotelisk festing av kinetokorene til mikrotubuli¹⁵. Dette gjør at kromosomet opplever mangel på spenning mellom kinetokorene til søsterkromatidene og mellom kinetokor og centrosom fordi de ikke er biorienterte og kan da ikke starte anafase³⁴. En monotelisk kobling i seg selv er helt normalt, fordi kinetokorene ofte er monoteliske i løpet av deres forsøk på å bli biorienterte^{15, 34}. Både en monotelisk og en syntelisk kobling vil normalt sett bli rettet opp av cellen når kontrollmekanismer settes i gang for å stoppe inngangen til anafase tilstrekkelig lenge til at feilen rettes opp. Siden cellene med kromosomoppstillingsfeil brukte så lang tid på å nå anafase, må det ha skjedd en feil i prosessen med å gi disse kinetochorene en korrekt amfitelisk binding.

Grunnen til at cellene som hadde kromosomoppstillingsfeil ble arrestert før anafase er trolig at spindelkontrollpunktet (SAC) ikke lar celler gå inn i anafase før alle kinetochorene er

biorientert og festet til mikrotubuli. En viktig komponent av SAC er mitotisk sjekkpunktkompleks (MCC) som består av MAD2, BUBR1/Mad3, BUB3 og CDC20¹⁵. MCC hemmer Anafasepromoterende kompleks/Cyclosome (APC/C) og forhindrer prematur start av anafase^{20, 35}. Hvis SAC ikke er aktiv og lar syntetisk koblede kinetochorer segregere til samme spindelpol, vil søsterkromatidene ikke bli separert^{15, 35}. Dette vil resultere i at en av dattercellene får et ekstra kromosom, og dette er en kjent kilde til aneuploidi som er typisk for kreftceller³⁵. Cellene som mangler SNX4 har trolig blitt arrestert ved at SAC aktiveres og hindrer at cellene starter anafase. Dette kan testes eksperimentelt ved å bruke antistoffer mot komponenter i MCC komplekset og vil være viktig å undersøke i fremtidige prosjekter for å forstå detaljene omkring SNX4 sin funksjon i mitosen. Det vil også være viktig å studere effekten av SNX4-tap i normale celler, siden våre studier er gjort i en kreftcellelinje (HeLa) som i utgangspunktet er aneuploid, der enkelte sjekkpunkter kanskje ikke fungerer optimalt.

I liveforsøkene ble det registrert to ulike fenotyper blant SNX4-knockdownceller. Den ene var kromosomoppstillingsfeil-fenotypen som er diskutert over. Den andre var en fenotype der kromosomene rullet rundt som en ball i midten av cellen. Denne siste fenotypen virket mer som en prometafasearrest i motsetning til den første fenotypen som virket som en metafasearrest. Mange av cellene som hadde denne prometafasearresten kom seg ikke til metafase og mange døde. En mulig forklaring på at det ble observert to ulike fenotyper kan være at graden av knockdown var ulik fra celle til celle. Kanskje representerer prometafasearresten celler med høy grad av knockdown der det er mye kromosomoppstillingsfeil, mens metafasearresten representerer en lavere grad av knockdown der det er mindre kromosomoppstillingsfeil. I fremtidige studier vil det være interessant å undersøke hvordan kinetochorene er festet til spindelen i SNX4 depleterte celler. Dette kan studeres i mikroskopet ved å benytte antistoffer som merker kinetokorene og mikrotubuli. Videre ville det være aktuelt å teste om SAC er aktiv eller ikke. Antistoffer mot MAD2 og BUBR1 er ofte brukt i slike studier.

SNX4 er tidligere funnet å lokalisere til endosomer i interfaseceller og har en funksjon i endosometransport^{78, 82}. Våre studier av mitotiske celler viste at SNX4 også kan lokalisere til spindelpolene og den mitotiske spindelen i prometafase og metafase. Sett i sammenheng med våre funksjonelle data, støtter dette opp om teorien om at SNX4 spiller en hittil uidentifisert rolle i mitosen. Spindelfargingen var svakere i SNX4-knockdownceller enn i kontrollceller, noe som tilsier at SNX4-antistoffet farget spesifikt og viser korrekt lokalisering. SNX4-fargingen strakk seg mer innover mot ekvatorialplanet enn ut i retning cellecortex. Dette tyder

på at SNX4 kanskje ikke har en rolle på astrale mikrotubuli, men heller påvirker congression gjennom å ha en forbindelse med den mitotiske spindelen.

SNX4 lokaliserer til PI3P-positive clathrin-dekkede vesikler, ved å binde seg til PI3P ved hjelp av sitt PX-domene^{78, 80, 82}. I tillegg kan SNX4 binde seg til klatrin på endosomer⁷⁸. Klatrin er et viktig kappeprotein i endocytose, men har i tillegg en viktig funksjon i stabilisering av kinetochore-fibre i den mitotiske spindelen. Der danner Klatrin et kompleks med TACC3 og ChTOG som kryssbinder de enkelte mikrotubuliene i k-fibre^{30, 66, 68}. En mulig rolle for SNX4 i congression er å bidra til stabilitet av k-fibre gjennom sin interaksjon med Klatrin. Det er interessant å merke seg at knock down av Klatrin fører til en forsinkelse i mitosen på grunn av defekt kromosomcongression⁷⁵, akkurat som vi observerer med SNX4-knockdown.

I mitosen nedreguleres aktiviteten av PI3P-kinasen Vps34 og fører til at nivået av PI3P på vesikler forsvinner⁶⁹. Det har også blitt publisert at Klatrinmediert endocytose stopper opp i mitosen, til tross for noe uenighet om temaet⁶⁵⁻⁶⁷. En spennende spekulasjon er derfor at proteiner som ellers er involvert i endocytose, som Klatrin og SNX4, frigjøres og får en ny rolle i mitosen. Når mengden PI3P reduseres i mitosen, vil mye av SNX4 som tidligere var bundet til PI3P på vesikler kunne flytte seg til et nytt sted. Det kan tenkes at SNX4 da trekker ut i cytosol og så blir fraktet til spindelen hvor den kan interagere direkte med Klatrin. I tillegg til å binde Klatrin, er SNX4 også vist å binde til mikrotubuli og motorprotein Dynein^{78, 82}, og det er derfor nærliggende å spekulere at SNX4 har en stabiliserende rolle på kinetokorfibre ved å mediere binding av Klatrin til mikrotubuli. Ved å benytte et superresolusjonsmikroskop, kan det bli mulig å se på den relative lokaliseringen til SNX4, i forhold til klatrin og dynein på den mitotiske spindelen. Dette er forsøk som vil kunne gjøres i Stenmarkslaben senere. I tillegg vil det være interessant å finne ut om SNX4 kan binde klatrin og PI3P samtidig, siden klatrinbindingsmotivet i SNX4 sitter i PX domenet.

En annen mulig rolle som SNX4 kan ha i congression er å påvirke motorproteinene dynein og/eller CENP-E. Dynein står for transporten av kromosomer fra astrale mikrotubuli til centrosomet (mot minusenden av mikrotubuli) mens CENP-E, som er en kinetokorlokalisert kinesin, står for transporten fra centrosomet til metafaseplaten (mot plusenden av mikrotubuli). KMN-nettverket er viktig for koblingen mellom mikrotubuli og kinetokor¹⁸ og består av blant annet Ndc80-komplekset, Mis12-komplekset og KNL1¹⁹. For at Dynein skal kunne frakte kromosomet via astrale mikrotubuli til centrosomet må koblingen mellom mikrotubuli og KMN-nettverket først brytes. Bindingen brytes ved at Aurora B fosforylerer

KMN¹⁹. Knockdown av komponenter i KMN-nettverket gir liknende fenotype som ved SNX4-knockdown, så kanskje SNX4 er viktig for at bindingen mellom kinetokor og mikrotubuli stabiliseres. Ved centrosomet fosforylerer og aktiverer Aurora A CENP-E slik at denne kinasen kan transportere kromosomene mot ekvatorialplanet¹⁹. En spekulativ hypotese er at SNX4 indirekte er med på å aktivere CENP-E-drevet transport av kromosomer ved at den hemmer Dynein og hindrer transport av kromosomene tilbake mot spindelpolene. Det kan være verdt å notere seg at knockdown av CENP-E gir en liknende fenotype som det vi har observert ved knockdown av SNX4.

Forhåpentligvis kan våre funn bidra til at det blir økt klarhet rundt funksjonen til SNX4 i kromosombevegelse til ekvatorialplanet. Om denne kunnskapen da kan benyttes i kreftdiagnostikk/behandling er vanskelig å si på nåværende tidspunkt. Det er ikke sikkert at en mutasjon i SNX4 genet eller mangel på SNX4 i seg selv er kreftfremkallende, men hvis cellen i tillegg mangler adekvate kontrollpunkter og repareringsmekanismer kan det tenkes at SNX4 mangel kan få fatale følger. Sett at en person får konstatert at han eller hun har en SNX4-defekt og mangel på SNX4 blir en kjent kilde til kreft, så kan denne personen kanskje bli fanget opp av helsevesenet før sykdommen slår ut. Da må det selvfølgelig i utgangspunktet være en bekymring hos personen som fører til legebesøket for eksempel at det har vært kreft i familien. Dette blir på lik linje med dagens undersøkelser av pasienter som har anlegg for kreft. For en person med brystkreft i familien kan det for eksempel skannes etter gener for brystkreft, såkalte BRCA. Dersom pasienten har disse genene kan en fjerning av brystene minke sjansene for å få kreft betraktelig. Dette er med på å redde liv.

Konklusjon

Økningen i andelen celler i prometafase og nedgangen i andelen celler i cytokinese blant SNX4-knockdownceller ble observert både ved mikroskopi av fikserte og levende celler. Sett i sammenheng med at en økt andel av de SNX4-depleterte cellene hadde defekte metafaseplan sammenliknet med kontrollcellene tydet på en funksjon for SNX4 i kromosomcongression.

Det at knockdown av ulike proteiner som bidrar i operasjonene som det tenkes at SNX4 kan være med å styre (de to teoriene våre om SNX4 sin funksjon) gir de samme fenotypene som SNX4-knockdown styrker våre teorier ytterligere. Mye tyder på at SNX4 er en sann mediator av congression.

Referanseliste

1. Janssen,A., van der Burg,M., Szuhai,K., Kops,G.J.P.L., & Medema,R.H. Chromosome Segregation Errors as a Cause of DNA Damage and Structural Chromosome Aberrations. *Science* **333**, 1895-1898 (2011).
2. Sheltzer,J.M. *et al.* Aneuploidy Drives Genomic Instability in Yeast. *Science* **333**, 1026-1030 (2011).
3. Magidson,V. *et al.* The Spatial Arrangement of Chromosomes during Prometaphase Facilitates Spindle Assembly. *Cell* **146**, 555-567 (2011).
4. Sagona,A.P. & Stenmark,H. Cytokinesis and cancer. *FEBS Letters* **584**, 2652-2661 (2010).
5. COOPER,S.T.E.P. Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G₀, and G₁ phase arrest points. *The FASEB Journal* **17**, 333-340 (2003).
6. Bucher,N. & Britten,C.D. G₂ checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br J Cancer* **98**, 523-528 (2008).
7. Zou,H. The sister bonding of duplicated chromosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**, 566-571 (2011).
8. Kapuy,O. *et al.* System-level feedbacks control cell cycle progression. *FEBS Letters* **583**, 3992-3998 (2009).
9. Gavet,O. & Pines,J. Progressive Activation of CyclinB1-Cdk1 Coordinates Entry to Mitosis. *Developmental Cell* **18**, 533-543 (2010).
10. O'Farrell,P.H. Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends in Cell Biology* **11**, 512-519 (2001).
11. Nevels,M., Nitzsche,A., & Paulus,C. How to control an infectious bead string: nucleosome-based regulation and targeting of herpesvirus chromatin. *Rev. Med. Virol.* **21**, 154-180 (2011).
12. Li,G. & Reinberg,D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current Opinion in Genetics & Development* **21**, 175-186 (2011).
13. Fransz,P. & de Jong,H. From nucleosome to chromosome: a dynamic organization of genetic information. *The Plant Journal* **66**, 4-17 (2011).
14. Tanaka,T.U., Stark,M.J.R., & Tanaka,K. Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 929-942 (2005).
15. Musacchio,A. & Salmon,E.D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-393 (2007).
16. Cheeseman,I.M. & Desai,A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 33-46 (2008).

17. Mchedlishvili, N. *et al.* Kinetochores accelerate centrosome separation to ensure faithful chromosome segregation. *Journal of Cell Science* **125**, 906-918 (2012).
18. Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M., & Desai, A. The Conserved KMN Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochore. *Cell* **127**, 983-997 (2006).
19. Kim, Y., Holland, A.J., Lan, W., & Cleveland, D.W. Aurora Kinases and Protein Phosphatase 1 Mediate Chromosome Congression through Regulation of CENP-E. *Cell* **142**, 444-455 (2010).
20. Fuller, B.G. & Stukenberg, P.T. Cell Division: Righting the Check. *Current Biology* **19**, R550-R553 (2009).
21. Gatlin, J.C. & Bloom, K. Microtubule motors in eukaryotic spindle assembly and maintenance. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **21**, 248-254 (2010).
22. Nigg, E.A. & Stearns, T. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol* **13**, 1154-1160 (2011).
23. Moser, J.J., Fritzler, M.J., Ou, Y., & Rattner, J.B. The PCMGÇôbasal body/primary cilium coalition. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **21**, 148-155 (2010).
24. Ou, Y., Zhang, M., & Rattner, J.B. The centrosome: The centriole-PCM coalition. *Cell Motil. Cytoskeleton* **57**, 1-7 (2004).
25. Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L., & Agard, D.A. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 709-721 (2011).
26. Raynaud-Messina, B. & Merdes, A. γ -tubulin complexes and microtubule organization. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 24-30 (2007).
27. Walczak, C.E., Cai, S., & Khodjakov, A. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 91-102 (2010).
28. Kunda, P. & Baum, B. The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends in Cell Biology* **19**, 174-179 (2009).
29. Woodruff, J.B., Drubin, D.G., & Barnes, G. Spindle assembly requires complete disassembly of spindle remnants from the previous cell cycle. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 258-267 (2012).
30. Royle, S.J. The role of clathrin in mitotic spindle organisation. *Journal of Cell Science* **125**, 19-28 (2012).
31. Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B.R., & Rieder, C.L. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Current Biology* **10**, 59-67 (2000).
32. Maiato, H., Rieder, C.L., & Khodjakov, A. Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *The Journal of Cell Biology* **167**, 831-840 (2004).
33. Goshima, G. & Scholey, J.M. Control of Mitotic Spindle Length. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 21-57 (2010).

34. Khodjakov,A. & Pines,J. Centromere tension: a divisive issue. *Nat Cell Biol* **12**, 919-923 (2010).
35. Matos,I. & Maiato,H. Prevention and Correction Mechanisms behind Anaphase Synchrony: Implications for the Genesis of Aneuploidy. *Cytogenetic and Genome Research* **133**, 243-253 (2011).
36. Nicklas,R.B., Waters,J.C., Salmon,E.D., & Ward,S.C. Checkpoint signals in grasshopper meiosis are sensitive to microtubule attachment, but tension is still essential. *Journal of Cell Science* **114**, 4173-4183 (2001).
37. Ferrari,S. Protein kinases controlling the onset of mitosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 781-795 (2006).
38. Takizawa,C.G. & Morgan,D.O. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 658-665 (2000).
39. Eves,E.M. *et al.* Raf Kinase Inhibitory Protein Regulates Aurora B Kinase and the Spindle Checkpoint. *Molecular Cell* **23**, 561-574 (2006).
40. Petsalaki,E., Akoumianaki,T., Black,E.J., Gillespie,D.A.F., & Zachos,G. Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. *The Journal of Cell Biology* **195**, 449-466 (2011).
41. Fu,J., Bian,M., Jiang,Q., & Zhang,C. Roles of Aurora Kinases in Mitosis and Tumorigenesis. *Molecular Cancer Research* **5**, 1-10 (2007).
42. Zuleger,N., Robson,M.I., & Schirmer,E.C. The nuclear envelope as a chromatin organizer. *Nucleus* **2**, 339-349 (2011).
43. Parmar,V.M. & Schröder,M. Sensing Endoplasmic Reticulum Stress Self and Nonself (ed. Lopez-Larrea,C.) 153-168 (Springer US, 2012).
44. Irniger,S. Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Letters* **532**, 7-11 (2002).
45. Wolf,F., Sigl,R., & Geley,S. The End of the Beginning: Cdk1 Thresholds and Exit from Mitosis. *Cell Cycle* **6**, 1407-1410 (2007).
46. Civelekoglu-Scholey,G. & Scholey,J. Mitotic force generators and chromosome segregation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 2231-2250 (2010).
47. Guizetti,J. & Gerlich,D.W. Cytokinetic abscission in animal cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **21**, 909-916 (2010).
48. Chow,K.H., Factor,R.E., & Ullman,K.S. The nuclear envelope environment and its cancer connections. *Nat Rev Cancer* **12**, 196-209 (2012).
49. Caballe,A. & Martin-Serrano,J. ESCRT Machinery and Cytokinesis: the Road to Daughter Cell Separation. *Traffic* **12**, 1318-1326 (2011).
50. Barr,F.A. & Gruneberg,U. Cytokinesis: Placing and Making the Final Cut. *Cell* **131**, 847-860 (2007).

51. Nezis,I.P., Sagona,A.P., Schink,K.O., & Stenmark,H. Divide and ProsPer: The emerging role of PtdIns3P in cytokinesis. *Trends in Cell Biology* **20**, 642-649 (2010).
52. Burkard,M.E. *et al.* Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 4383-4388 (2007).
53. Randall,C.L., Burkard,M.E., & Jallepalli,P.V. Polo Kinase and Cytokinesis Initiation in Mammalian Cells: Harnessing the Awesome Power of Chemical Genetics. *Cell Cycle* **6**, 1713-1717 (2007).
54. Fabbro,M. *et al.* Cdk1/Erk2- and Plk1-Dependent Phosphorylation of a Centrosome Protein, Cep55, Is Required for Its Recruitment to Midbody and Cytokinesis. *Developmental Cell* **9**, 477-488 (2005).
55. Carlton,J.G. & Martin-Serrano,J. Parallels Between Cytokinesis and Retroviral Budding: A Role for the ESCRT Machinery. *Science* **316**, 1908-1912 (2007).
56. McDonald,B. & Martin-Serrano,J. No strings attached: the ESCRT machinery in viral budding and cytokinesis. *Journal of Cell Science* **122**, 2167-2177 (2009).
57. Reid,E. *et al.* The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B. *Human Molecular Genetics* **14**, 19-38 (2005).
58. Mendoza,M. *et al.* A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint. *Nat Cell Biol* **11**, 477-483 (2009).
59. Steigemann,P. *et al.* Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Protects against Tetraploidization. *Cell* **136**, 473-484 (2009).
60. Bastos,R.N. & Barr,F.A. Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission. *The Journal of Cell Biology* **191**, 751-760 (2010).
61. McMahon,H.T. & Boucrot,E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 517-533 (2011).
62. Sandvig,K., Pust,S., Skotland,T., & van Deurs,B. Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Current Opinion in Cell Biology* **23**, 413-420 (2011).
63. Lakkaraju,A. Endo-Lysosome Function in the Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease Retinal Degenerative Diseases (eds. LaVail,M.M., Ash,J.D., Anderson,R.E., Hollyfield,J.G. & Grimm,C.) 723-729 (Springer US, 2012).
64. Cottam,N. & Ungar,D. Retrograde vesicle transport in the Golgi. *Protoplasma* **1-13** .
65. Boucrot,E. & Kirchhausen,T. Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 7939-7944 (2007).
66. Fu,W., Jiang,Q., & Zhang,C. Novel functions of endocytic player clathrin in mitosis. *Cell Res* **21**, 1655-1661 (2011).
67. Fielding,A.B., Willox,A.K., Okeke,E., & Royle,S.J. Clathrin-mediated endocytosis is inhibited during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 6572-6577 (2012).

68. Booth,D.G., Hood,F.E., Prior,I.A., & Royle,S.J. A TACC3/ch-TOG/clathrin complex stabilises kinetochore fibres by inter-microtubule bridging. *EMBO J* **30**, 906-919 (2011).
69. Furuya,T. *et al.* Negative Regulation of Vps34 by Cdk Mediated Phosphorylation. *Molecular Cell* **38**, 500-511 (2010).
70. Vicinanza,M., DGÇÖAngelo,G., Di Campli,A., & De Matteis,M. Membrane traffic in the secretory pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 2833-2841 (2008).
71. Rusten,T.E. & Stenmark,H. Analyzing phosphoinositides and their interacting proteins. *Nat Meth* **3**, 251-258 (2006).
72. Kaplan,A. & Reiner,O. Linking cytoplasmic dynein and transport of Rab8 vesicles to the midbody during cytokinesis by the doublecortin domain-containing 5 protein. *Journal of Cell Science* **124**, 3989-4000 (2011).
73. Simon,G.C. *et al.* Sequential Cyk-4 binding to ECT2 and FIP3 regulates cleavage furrow ingression and abscission during cytokinesis. *EMBO J* **27**, 1791-1803 (2008).
74. Spang,A. On vesicle formation and tethering in the ER-Golgi shuttle. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 531-536 (2009).
75. Royle,S.J., Bright,N.A., & Lagnado,L. Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature* **434**, 1152-1157 (2005).
76. Kutateladze,T.G. Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat Chem Biol* **6**, 507-513 (2010).
77. Seet,L.F. & Hong,W. The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1761**, 878-896 (2006).
78. Skånland,S.S., Wälchli,S.+, Brech,A., & Sandvig,K. SNX4 in Complex with Clathrin and Dynein: Implications for Endosome Movement. *PLoS ONE* **4**, e5935 (2009).
79. Sagona,A.P. *et al.* PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat. Cell Biol.* **12**, 362-371 (2010).
80. Carlton,J., Bujny,M., Rutherford,A., & Cullen,P. Sorting Nexins GÇô Unifying Trends and New Perspectives. *Traffic* **6**, 75-82 (2005).
81. Carlton,J.G. & Cullen,P.J. Sorting nexins. *Current Biology* **15**, R819-R820 (2005).
82. Skånland,S.S., Wälchli,S.+, Utskarpen,A., Wandinger-Ness,A., & Sandvig,K. Phosphoinositide-Regulated Retrograde Transport of Ricin: Crosstalk Between hVps34 and Sorting Nexins. *Traffic* **8**, 297-309 (2007).
83. Johannes,L. & Wunder,C. The SNXy flavours of endosomal sorting. *Nat Cell Biol* **13**, 884-886 (2011).
84. Graham,T.R. & Kozlov,M.M. Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 430-436 (2010).
85. Freshney,I. Application of Cell Cultures to Toxicology. *Cell Biology and Toxicology* **17**, 213-230 (2001).

86. Umbach,J.L. & Cullen,B.R. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes & Development* **23**, 1151-1164 (2009).
87. Arenz,C. & Schepers,U. RNA interference: from an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application? *Naturwissenschaften* **90**, 345-359 (2003).
88. Nykänen,A., Haley,B., & Zamore,P.D. ATP Requirements and Small Interfering RNA Structure in the RNA Interference Pathway. *Cell* **107**, 309-321 (2001).
89. Schnell,U., Dijk,F., Sjollema,K.A., & Giepmans,B.N.G. Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nat Meth* **9**, 152-158 (2012).
90. Paddock,S. Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Molecular Biotechnology* **16**, 127-149 (2000).
91. Kops,G., Saurin,A., & Meraldi,P. Finding the middle ground: how kinetochores power chromosome congression. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 2145-2161 (2010).
92. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
93. Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, Losick, et al. *Molecular biology of the Gene*. 6th edition. Pearson Education Inc. publishing as Benjamin Cummings; 2008.
94. Robinson J, Sturgis J, Kumar G, *Immunofluorescence, IHC Staining Methods*, Fifth edition.
95. http://www.olympus.co.uk/microscopy/22_scan_R.htm