

Mastergradsoppgave i Molekylær biovitenskap  
studieretning molekylærbiologi.

Anniken Roppen

**hNCU-G1 som koaktivator for hER kontrollert  
ekspressjon fra hSR-B1 promotoren**

Anniken Roppen

Omfang: 60 studiepoeng

**Institutt for molekylær biovitenskap**  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet  
**UNIVERSITETET I OSLO 03/2007**



## Innhold

Forkortelser.....	2
Sammendrag.....	5
1. Introduksjon.....	6
1.1 Genekspresjon og regulering.....	6
1.1.1 Kromatinstruktur.....	7
1.1.2 Histon-modifisering.....	7
1.2 Promotorregion.....	8
1.3 Generelle transkripsjonsfaktorer.....	9
1.4 Kjerne reseptorer.....	10
1.4.1 Steroidhormonreseptorene.....	11
1.4.2 RXR heterodimer familien.....	12
1.4.3 Orphan reseptorer.....	12
1.4.4 Ligander.....	12
1.4.5 Ligand bindende domene.....	13
1.4.6 DNA bindende domene.....	13
1.4.7 Kjerne reseptor koaktivatorer.....	14
1.4.8 Kjerne reseptor korepressorer.....	17
1.5 hSR-B1-promotoren.....	18
1.6 Estrogen reseptor $\alpha$ og $\beta$ .....	18
1.7 Human Kidney Predominant Protein (hNCU-G1).....	20
1.7.1 Tidligere arbeid med hNCU-G1.....	21
2. Målsetting.....	22
3. Eksperimentelle metoder og teknikker.....	23
3.1 Prokaryote celler.....	23
3.1.1 Produksjon av kompetente celler.....	23
3.1.2 Transformasjon av bakterieceller.....	24
3.1.3 Isolering av plasmid DNA fra bakteriekultur.....	24
3.1.4 Miniprep.....	24
3.1.5 Plasmidpreparering ved bruk av CsCl gradienten.....	25
3.2 Molekylærbiologiske teknikker.....	27
3.2.1.1 Restriksjonsanalyse/ enzymfordøyning.....	28
3.2.1.2 Agarosegel elektroforese.....	29
3.2.1.3 Isolering og rensing av DNA fra agarosegel.....	29
3.2.2 Primer design.....	30
3.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	31
3.2.4 Ligering av DNA fragmenter.....	33
3.3 Eukaryote celler.....	35
3.3.1 Initiering av SL-2 celler.....	35
3.3.1.1 Vekst og splitting.....	36
3.3.1.2 Telling av celler.....	37
3.3.4 Transfeksjon.....	38
3.3.4.1 Transfeksjon med FuGENE6 (Roche).....	39
3.3.4.2 Transfeksjon med Lipofectamine 2000 (Invitrogen).....	40

3.3.4.3 Høsting av celler.....	40
3.3.4.4 Nedfrysing av SL-2-celler.....	41
3.3.4.5 $\beta$ -galaktosidase som internkontroll.....	41
3.3.4.6 Kvalitative analyser av $\beta$ -galaktosidase med X-gal metoden.....	43
3.4 CAT-ELISA reporterengenassay.....	43
3.4.1 Utføring av CAT-ELISA reporterengenassay.....	45
3.5 Proteinmålinger ved Bradford-metoden.....	47
3.5.1 SDS-PAGE-gel.....	48
3.6 GST-Pulldown.....	49
3.6.1 Produksjon av GST-fusjonsprotein.....	49
3.6.2 Analyse på SDS-Page-gel.....	49
3.6.3 Rensing av fusjonsproteinet.....	50
3.6.3.1 Vask av Sepharose-kuler.....	51
3.7 Klargjøring av glutathionsepharose-kuler med NETN.....	52
3.7.1 Rensing av fusjonsprotein med glutathion-sepharose-kuler.....	52
3.8 Western.....	53
3.8.1 Filterbehandling.....	54
3.8.1.1 Primært antistoff.....	55
3.8.1.2 Visualisering.....	56
4. Resultater.....	58
4.1 Plasmidkonstruksjon.....	58
4.1.1 Plasmidkonstruksjon av pAc-hER $\beta$ .....	58
4.1.1.1 Sekvensering av pGEM-T-hER $\beta$ .....	60
4.1.2 Konstruksjon av reporterengenvektor.....	64
4.1.3 Plasmikonstruksjon av pAC-hSRC-1.....	66
4.2 Optimalisering av transfeksjonsmodellen.....	67
4.2.1 Titrering av celleantall til transfeksjon.....	67
4.2.2 Kvantitativ analyse av celleantall.....	68
4.2.3 Test av transfeksjonseffektivitet ved X-gal-metoden.....	69
4.2.4 Optimalisering av mengde hER $\alpha$ og hER $\beta$ til transfeksjonsmodellen.....	68
4.2.5 Optimalisering av transfeksjonsreagens, FuGENE6 vs. Lipofectamine.....	70
4.3. Karakterisering av hNCU-G1 som koaktivator for hER $\beta$ .....	72
4.4 Karakterisering av hNCU-G1 som koaktivator for hER $\alpha$ .....	75
4.5 Karakterisering av hSRC-1 som koaktivator hER $\alpha$ .....	75
4.6 Kartlegging av vekstraten til SL-2-celler.....	76
4.7 Test av transfeksjonseffektivitet hos gammel vs. ny cellebatch.....	77
4.8 Kontroll av interaksjon mellom ER $\beta$ -LBD og hNCU-G1.....	78
5. Diskusjon.....	83
5.1 SL-2-celler som modellsystem.....	83
5.2 Optimalisering av transfeksjonsmodellen.....	85
5.3 hNCU-G1s effekt på hER $\beta$ .....	86
5.4 hNCU-G1s effekt på hER $\beta$ .....	86
5.5 hSRC-1 som koaktivator for hER $\alpha$ .....	86
5.6 hSR-B1 promotorfragment og ERE.....	87
5.7 GST-pulldown og Western blot.....	89
6. Konklusjon.....	91

6.1 Fremtidig arbeid.....	91
Appendix.....	92
Materialer og løsninger.....	92
Kjemikalier.....	97
Kit.....	98
Plasmidkart.....	99
Standarder.....	104
Sekvenser.....	105
Referanser.....	116

## Forord

Denne avhandlingen er en avslutning på en mastergrad i molekylærbiologi ved institutt for Molekylær Biovitenskap ved Universitetet i Oslo.

Jeg vil rette en stor takk til Winnie Eskild for svært god veiledning i dette prosjektet, og for at du alltid tok deg tid til å svare på spørsmål. Dette har vært to meget lærerike år.

Jeg vil også rette en stor takk til Hilde Letnes, som har vært til stor hjelp disse to årene. Uten deg hadde det blitt kaos på laboratoriet. Du har en ubeskrivelig god tålmodighet, og tar deg alltid tid til å hjelpe og svare på spørsmål.

Ellers vil jeg takke resten av gruppen, Eileen, Silje, Tor Ole, Richard, Almira og Mariam for å ha delt sine erfaringer og bidratt til et hyggelig arbeidsmiljø.

En spesiell takk til Eileen, Silje og Kristine for å ha bidratt til høy trivselfaktor disse årene, både faglig og sosialt. Det var viktig med en hyggelig kaffepause når dagene var lange. Jeg vil også takke jentene på nabo-laben for hyggelig samvær og faglige utvekslinger.

Ellers vil jeg selvfølgelig takke venner og familie, som har støttet meg gjennom disse krevende årene.

Oslo, februar 2007

Anniken Roppen

## Forkortelser:

Aa:	aminosyre
AF-1:	aktiveringsfunksjon-1
AF-2:	aktiveringsfunksjon-2
Amp:	ampicillin
APS:	ammoniumpersulfat
AR:	androgenreseptor
ATP:	adenosintrifosfat
ATPase:	adenosintrifosfatase
Bp:	basepar
$\beta$ -gal	$\beta$ -galaktisodase
BSA:	bovint serum albumin
CAT:	kloramenikol acetyltransferase
CARM-1:	Coactivator Assosiert Argenin Metyltransferase 1
CBP:	Creb binding protein.
CRBP:	cellulært retinolbindende protein
DBD:	DNA bindingsdomene
dNTP:	deoxyribonukleotid
DMSO:	Dimethyl sulfoxid
DNA:	deoxyribonukleinsyre
DRIP:	vitamin D reseptore interacting protein
E. coli:	Escherichia coli
EDTA:	Etylene di-amintetraacetat
ER $\alpha$ :	Estrogenreseptor $\alpha$
ER $\beta$ :	Estrogenreseptor $\beta$
ERE	Estrogen respons element
EtOH:	etanol
FCS:	føtalt kalveserum
GNAT:	GCN5-related <i>N</i> -acetyltransferase
GTF:	generelle transkripsjonsfaktorer
HAT:	histon acetyltransferase
HDAC:	histon deacetylase
HRE	hormon respons element
HMT:	Histon metyltransferase
HMDT:	Histon demetyltransferase

hSRB-1	human scavenger receptor B
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
Kb:	kilobaser
LBD:	ligandbinding domene
LCor:	Ligandavhengig corepressor
MYST:	MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, og Tip60
NCoA:	Kjerne koaktivator
NCoR:	kjerne korepressor
NES:	Kjerne eksport signal
NLS:	kjerne lokaliseringssignal
NR:	kjernereseptor (nuclear receptor)
ONPG:	O-nitrill-b-galaktopyranosid
ORF:	åpen leseramme (open reading frame)
PCR:	polymerase chain reaction
PPAR:	Peroksisom proliferator aktivert reseptor
PPRE:	PPAR respons element
Rpm:	Rotasjon per minutt
RXR:	Retinoid X reseptor
RNA:	Ribonukleinsyre
SDS:	sodium dodecylsulfat
SRC:	Steroid reseptor coaktivator
TAF:	TBP-assosierte faktorer
TBP:	TATA-bindende protein
TEMED:	N',N',N',N',-tetrametyletylenediamin
TF's:	Transkripsjonsfaktorer
TRAP:	Thyroid hormonreseptor associated protein
TSS:	Transkripsjonsstart
Tween:	Polyetelen- sorbitan monolaurat
X-gal:	5-bromo-4chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galatosid

#### Forkortelser for aminosyrer:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glysin

H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Metionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Argenin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Vailin
W	Trp	Tryptofan
Y	Tyr	Tyrosin

Forkortelser for nitrogenbaser i DNA.

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin



## Sammendrag

hNCU-G1 ble for første gang identifisert som transkripsjonsfaktor for humant CRBP1. Det baserte seg på EMSA forsøk der man så at det interagerer med FP1 (+66, +99) element i denne promotoren.

hNCU-G1 har fire LXXLL motiver som kan binde til AF-2-domene hos ligandbundet kjernereseptor. Basert på pulldownforsøk der det er vist interaksjon mellom hNCU-G1 og hER $\alpha$  og hER $\beta$ , var det derfor interessant å undersøke om hNCU-G1 fungerer som koaktivator for disse kjernereseptorene.

Ved studier av hER $\alpha$  og hER $\beta$  sin interaksjon med et fragment av hSR-B1 promotoren, ble det funnet at hER $\beta$  har lavere affinitet for promotorens ERE, og liten evne til å stimulere til transkripsjon. I samme forsøk med hER $\alpha$  viser reporter gen analyser at ekspresjon som følge av hER $\alpha$  er større enn basale ekspresjonen, noe som ikke er tilfelle i forsøk med hER $\beta$ . I begge forsøkene viser resultatene at ved tilsetning av hNCU-G1 ekspresjonsvektor alene, skjer det et tap av basale ekspresjon, og dette kan indikere at hNCU-G1 har repressor egenskaper.

Ved undersøkelser av en mulig koaktivatorfunksjon av hNCU-G1, ble det funnet at koekspresjon av hNCU-G1 og hER $\alpha$  ikke økte ekspresjon av CAT.

Det ble utført pulldown forsøk på hER $\beta$ -LBD og hNCU-G1, og resultatene her kan indikere at tidligere *in vitro* resultater som oppgaven baserer seg på kan ha vært villedende.

## 1. Introduksjon

### 1.1 Genekspresjon og regulering

Det humane genom inneholder ca. 25000 gener som koder for proteiner. For å kunne lese av informasjon i DNA trenger vi generelle transkripsjonsfaktorer. Disse kan ikke være aktive til en hver tid, men reguleres av ulike faktorer. Dette er en meget kompleks prosess, og modifisering av histoner bestemmer i stor grad om DNA er tilgjengelig for transkripsjon eller ikke. De fundamentale enhetene for genregulering er basert på tre typer spesifikke nivåer; kromatinstruktur, promotorregion og transkripsjonsfaktorer.

#### 1.1.1. Kromatinstruktur

Kromatinstruktur består av DNA som er pakket rundt de positivt ladede proteinene histoner. Kromatinstrukturen er essensiell for å avgjøre om genene er tilgjengelige for transkripsjon eller ikke. Selve strukturen består av repeterte nukleosomer. Et nukleosom består av 146 bp DNA som har en venstredreid superheliks konformasjon som er dreid to ganger rundt en oktamer av histonproteiner. Histonoktameren består av to av hver av de fire histonene H2A, H2B, H3 og H4. Dvs. en H3-H4 tetramer og H2A-H2B dimer [1] [2]. Nukleosomene er tett pakket med en avstand på mellom 10 og 30 nm. Dette hindrer binding av generelle transkripsjonsfaktorer til DNA, og dermed fungerer denne strukturen som en repressor i seg selv. For at DNA skal bli tilgjengelig for transkripsjonsapparatet, må kromatinstrukturen åpnes. Dette skjer ved forskjellig modifisering av histonene i nukleosomene. Åpen kromatin kalles eukromatin, mens tett pakket kromatin kalles heterokromatin.

#### 1.1.2. Histon-modifisering

##### Histon-acetylering

N-terminal ende av de 4 histonene er høyt konservert og spiller en viktig rolle i åpning av kromatinstrukturen. Histon acetyltransferaser (HAT) flytter acetylgrupper fra acetyl-CoA til lysin (K) i histonhalene, og dette resulterer i at histonet mister positiv ladning. Dette svekker bindingen av den negativt ladde DNA tråden, og åpner kromatin strukturen. Histon deacetylasen (HDAC) fjerner acetylgrupper på de samme lysin, slik at histonhalene får tilbake sin positive ladning. Kromatin blir pakket sammen til heterokromatin og DNA blir transkripsjonsinaktivt.

Det finnes en rekke HAT-familier, deriblant GCN5-related *N*-acetyltransferase, GNAT og MYST oppkalt etter sine medlemmer MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, og Tip60 [3].

Kjernerreseptorene har også en assosiert HAT-familie, som inkluderer SRC1 (steroidreseptor coaktivator 1) Dessuten er HAT-aktivitet forbundet med en rekke koaktivatorer, blant andre hTAF250 og p300 [4].

### **Histon-metylering**

Histon metylering kan bidra til både aktivering og inaktivering av gener. Histonenmetyltransferaser (HMT) sørger for å sette metylgrupper på lysin (K) og arginine (R) på histon halene. Metylering av H3-K4 er forbundet med eukromatin hvor genene er tilgjengelige for transkripsjonsapparatet, mens metylering av H3-K9 er forbundet med heterokromatin og hemming av transkripsjon. Metylering av arginine på H3 fremmer acetylering og transkripsjonsaktivitet. Det er også funnet enzymer som demetylerer histonhaler, til tross for at dette lenge var betraktet som en stabil modifikasjon [5] [6].

### **Histon-fosforylering**

Ved fosforylering av serin 10 på H3, rekrutteres HAT til området. Den sørger for acetylering av histonhalen og åpner kromatin strukturen og fremmer transkripsjon av gener [7].

### **Histon-ubiquitinerings**

TAF250 i TFIID har H1 monoubiquitineringsaktivitet, og at dette kan være involvert i aktivering av transkripsjon [8].

### **ATP-avhengig remodelering**

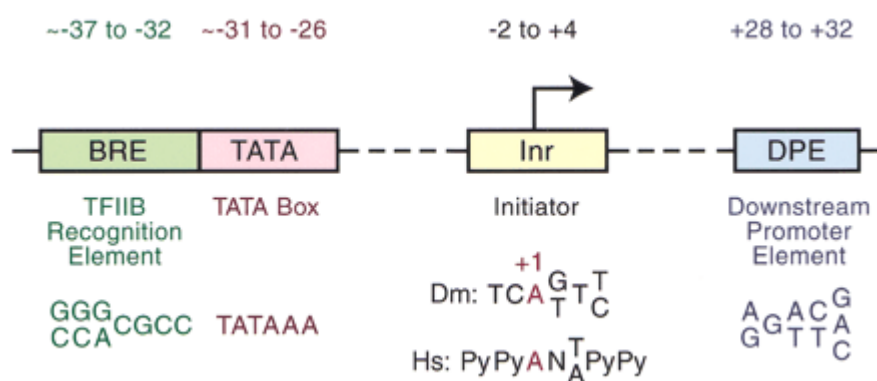
Åpning av kromatin strukturen gjennom mobilisering av nukleosomene skjer ved hjelp av ATP. De første faktorene man identifiserte som driver med denne remodeleringen er SWI/SNF. Funksjonen er å bruke hydrolyse av ATP til å øke tilgangen på nukleosomalt DNA [9]. Det er utviklet ulike modeller for å illustrere hvordan dette foregår. De tar utgangspunkt i om nukleosomstrukturen forandres, eller om oktamerer blir skjøvet/flyttet. Ved at oktameren flyttes frem, eller vippest ut blir det DNA som var kveilet rundt den tilgjengelig for transkripsjonsapparat. Ved å redusere superkoil på DNA-dobbel-heliks, vil tråden sitte noe løsere, og være mer tilgjengelig for transkripsjonsfaktorer.

## 1.2. Promotorregion

Basal promotorregionen omfatter en rekke sekvenser på DNA-tråden som bidrar til binding av det basale transkripsjonsapparatet. Disse sekvensene er templat for multiproteinkompleksene som sørger for transkripsjon av gener. Promotorregionen er satt sammen av flere elementer med ulik plassering og egenskaper. Følgende elementer er med: TFIIB recognition element (BRE) som TFIIB binder direkte til. Det ligger -37 til -32 bp oppstrøms for transkripsjonsstart (TSS). Det har i senere tid også blitt identifisert et BRE nedstrøms for TATA-boksen. Hvilket BRE som er mest sentralt, avhenger av promotorkonteksten.[10].

Etterfulgt av BRE kommer TATA boksen som ligger -31 til -26 oppstrøms for TSS. Dette er en AT rik region som er bindingssete for TATA binding protein (TBP) og TBP+ generelle transkripsjonsfaktorer (TFIID). Dette beskrives i neste avsnitt.

Nedstrøms for TATA-boksen ligger initiator elementet (INR) -2 til +4 bp og overlapper TSS. Dette har en lite restriktiv konsensussekvens, og dette alene er nok til spesifikk initiering av preinitieringskompleks (PIC) uavhengig av TATA-boks. INR bidrar til mer nøyaktig og presis initiering av RNA polymerase II (RNAPII) [11]. Downstream core promotor element (DPE) er plassert +28 til +32 bp nedstrøms for TSS. Det finnes oftest i promotorer uten TATA-boks. DPE og INR fungerer sammen som et eget promotorelement ved at TFIID binder til motiver fra begge elementene.



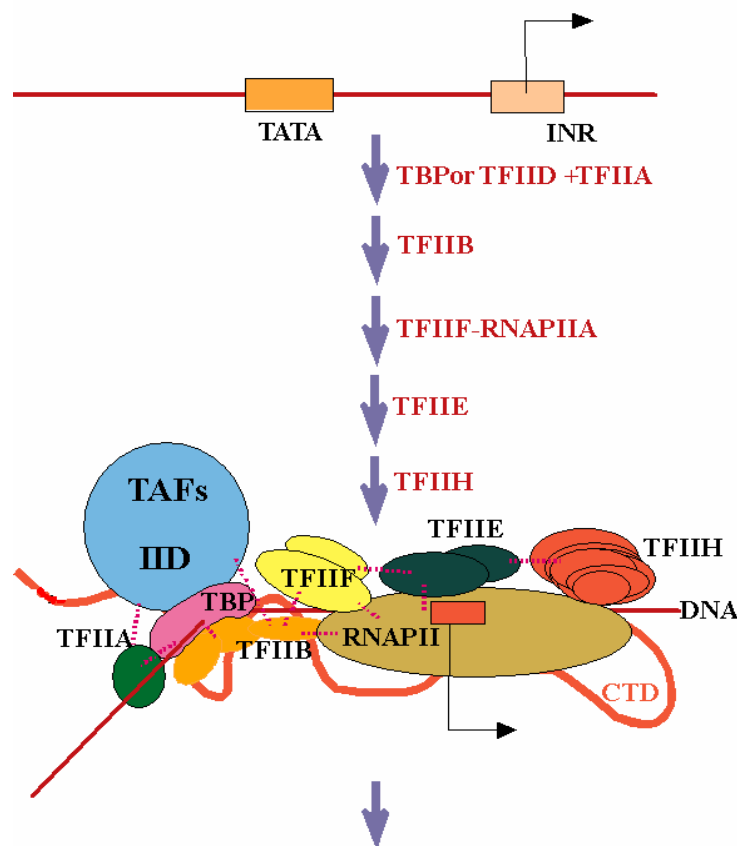
**Figur 1.1** Basalpromotoren. BRE er bindingssete til den generelle transkripsjonsfaktoren TFIIB, TATA-boksen ligger -31 til -26 bp oppstrøms for TSS, og er bindingssete for TATA-bindende protein, som er beskrevet i neste avsnitt. Initiator elementet overlapper TSS [12].

Utenom den basale promotorregionen finnes det elementer oppstrøms for denne som bidrar til transkripsjonsstart. Oppstrøms promotorelementer (UPE) er lokalisert rundt 200 bp oppstrøms for TATA /INR. De fungerer ikke nødvendigvis som direkte aktivatorer eller repressorer, men

kan rekruttere enhancere til den basale promotoren. Enhancere er distale elementer som kan befinne seg både oppstrøms og nedstrøms fra TSS [13]. Posisjonen kan være viktig for dannelsen av enhanceosomet, og dermed aktiveringen av transkripsjonen. Enhanceosomet er et kompleks av proteiner og sekvenser som blir rekruttert fra distale områder på DNA til promotorregionen, og bidrar til transkripsjonsinitiering [14].

### 1.3. Generelle transkripsjonsfaktorer (GTF's)

Ved transkripsjonsinitiering er RNAPII avhengig av proteinkomplekser for å binde DNA og starte transkripsjon av genet. Generelle transkripsjonsfaktorer (GTF) er høyt konserverte proteiner som bistår i transkripsjon av genet og forlengelsen av transkriptet [15]. GTF omfatter mange proteiner som har ulik virkning på DNA, RNAPII og på hverandre. I første omgang bidrar de til et preinitieringskompleks (PIC) som gjør det mulig for RNAPII å binde seg til DNA. Figuren under viser en illustrasjon av preinitieringskomplekset.



**Figur 1.2.** Preinitieringskomplekset består av mange faktorer som bidrar til rekruttering og stabilisering av RNAPII og transkripsjonsstart. Figuren er hentet fra referanse [16].

Transkripsjonsprosessen starter med at TATA-binding protein (TBP) binder til TATA-boksen i promotorregionen. Den setter seg som en sal på responselementet og bøyer DNA.

TBP/TATA-boks komplekset blir gradvis til et bøyd kompleks og dette blir gjenkjent av TFIIB som binder til BRE [17]. TFIIB er en transkripsjonsaktiveringsfaktor som binder DNA på begge sider av TBP-TATA-komplekset, og medierer binding av RNAPII [18].

TFIIB penetrerer det aktive setet i RNAPII med en zinkfingerstruktur. Dette resulterer enten i at RNAPII vinner og transkripsjon gjennomføres, eller at TFIIB vinner, og transkripsjon aborteres.[19]

TFIIA stabiliserer TBP-TATA komplekset, og kan komme inn i alle steg etter at TFIID har bundet seg (TFIID = TPB + multiple transkripsjonsfaktorer).

TFIIF medierer rekruttering av RNAPII og spiller også en rolle i rekruttering av TFIIE +TFIIH. Den bidrar også til å gi fart til RNAPII i forlengelsesfasen [19, 20].

#### 1.4. Kjernereseptorer

Kjernereseptorer er ligandaktivererte transkripsjonsfaktorer, og er den største familien av transkripsjonsregulatorer. De har konserverte domener som er vesentlig for deres konformasjon og funksjon .

Disse domene er:

A/B: Aktiveringsfunksjon-1 (AF-1), som er plassert i N-terminal ende av reseptoren.

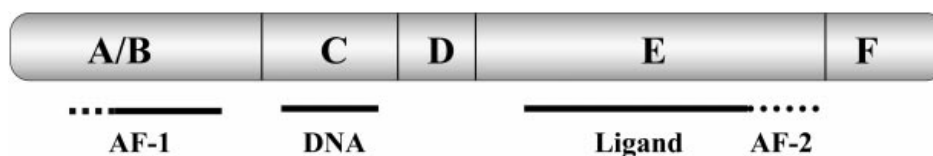
C: Det meget konserverte DNA bindende domenet (DBD), som også ofte har sekvens for kjerne eksport signal (NES)

D: En hengselregion, ofte med sekvens for kjernelokaliseringssignal (NLS)

E: Ligandbindende domene

F: Aktiveringsfunksjon-2 (AF-2) som er plassert i C-terminalen av reseptoren.

Figuren x viser en enkel illustrasjon av kjernereseptoren.



**Figur 1.3:** En enkel modell av en kjernereseptor og de ulike domene. A/B er en aktiveringsfunksjon 1, som er liganduavhengig, C er DNA bindende domene, D er hengselregion som har kjerne lokaliseringssignal, E ligandbindende domene, F aktiveringsfunksjon 2, ligandavhengig. Figuren er hentet fra referanse [21].

Kjernereseptorer er mål for en bred gruppe lipofile signalmolekyler og deltar i normal fysiologisk utvikling og metabolisme. De representerer derfor en bredspektret målgruppe for medisinsk behandling av bl.a. kreft, endokrine og metabolske forstyrrelser [22]. Binding av ligand til reseptoren induserer en konformasjonsendring i LBD som danner en lomme hvor koaktivatorer kan binde.

Bindingen av koaktivator skjer oftest via aktiveringsdomenene AF-1 og AF-2. AF-1 er liganduavhengig, mens AF-2 er ligandavhengig. Når kjernereseptoren er aktivert, kan den binde til sitt hormonresponselement (HRE) på DNA, og fungere som transkripsjonsfaktor. Når kjernereseptoren er aktivert og interagerer med koaktivator, er den komponent i et multi-protein kompleks. Dette komplekset aktiverer det generelle transkripsjonsmaskineriet og øker ekspresjon av målgener vha. prosesser som kromatinremodellering, dannelse av stabilt preinitieringskompleks, samt økt RNAPII reinitiering.

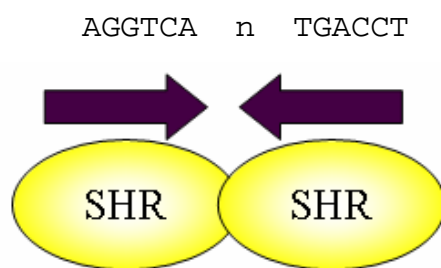
Kjernereseptorer deles inn i tre subfamilier basert på hvilken type ligand de binder, og hvordan de binder DNA. Steroidreseptorfamilien, RXR heterodimer familien og orphan kjernereseptor familien .

#### 1.4.1. Steroidhormonreseptorene (SHR)

Kjernereseptorer som tilhører denne subfamilien binder ligander som er lipider med kolesterolderivater som ”skjellett”.

SHR har lange A/B domener (aktiveringsfunksjon-1).

De binder som homodimerer til DNA på palindrome repeterte sekvenser.

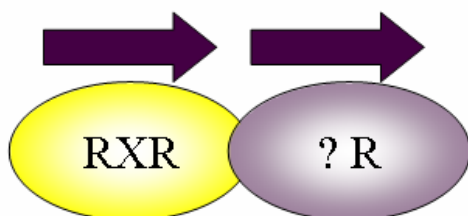


**Figur 1.4** DNA bindende domene til kjernereseptorer binder til bestemte sekvenser. Steroidhormonreseptor binder til palindrome repeterte sekvenser. Antall spacer nukleotider er avgjørende for hvilken homodimer som binder. Figuren er hentet fra referanse [16].

Når steroidhormonreseptorer ikke har bundet ligand, er de oftest assosiert til store multikomplekser av chaperon-proteiner, heat shock protein 90 (Hsp90) kompleks. Dette komplekset spiller vanligvis en viktig rolle i proteinfolding, der det binder til hydrofobe områder som vender ut mot cytoplasma, og hindrer aggregering av proteinet under foldingen. Bindingen mellom Hsp90 chaperon komplekset og steroidhormonreseptoren skjer på det hydrofobe LBD domenet, og Hsp90 binder kun til ligandfrie steroid hormon reseptorer. Når ligand binder til reseptoren, endres konformasjonen til en mer stabil form, og hsp 90 komplekset frigjøres [23].

#### 1.4.2. RXR heterodimer familien

Denne subfamilien binder seg som en heterodimer med RXR til direkte repeterte sekvenser på DNA tråden. Avstanden mellom sekvensene varierer etter hvilken partner RXR er bundet til. Her kan RXR bidra både som en aktiv eller inaktiv partner. Denne familien har en langt bredere kjemisk variasjon i ligander, og de er ikke utelukkende endokrine hormoner. RXR kan også aktiveres og binde til DNA i fravær av ligand. Et eksempel er RXR-RAR, hvor RXR er uten ligandbinding og respons. Heterodimeren blir kun aktivert av RAR ligand.[24]



**Figur 1.5** Figuren viser hvordan RXR binder som heterodimer til direkte repeterte sekvenser på DNA tråden. Her kan RXR både være aktiv og inaktiv partner. Figuren er hentet fra referanse [16].

#### 1.4.3. Orphan reseptorer

Dette er en stor familie av kjernereseptorer hvor ligand er ukjent. Disse har ikke alle de strukturelle konserverte domeneene som de øvrige kjernereseptorene. Noen av dem mangler LBD, mens andre mangler DBD [25].

#### 1.4.4. Ligander

Ligander er ofte vitamin-A metabolitter, kolesterol-metabolitter, gallesyrerspesifikke prostaglandiner eller mange forskjellige xenobiotika[26]. De produseres og skilles ut av

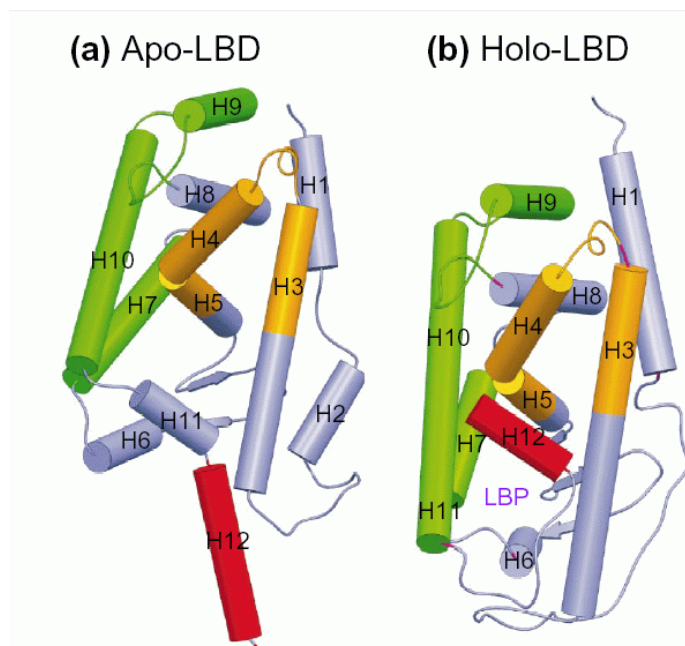


kjertelvev, og fraktes som signalmolekyler til målceller der de binder til sine reseptorer [2]. Ligandene kan fungere som agonister som aktiverer reseptoren, eller som antagonist som inaktiverer reseptoren. Liganden transporteres over plasmamembranen til målcellene, og kan binde til sin respektive reseptor.

Det blir i dag produsert mange syntetiske ligander som brukes i behandling av forskjellige sykdommer blant annet kreft [27].

#### 1.4.5. Ligandbindende-domene

LBD består av 12 helikser, der Heliks 2 – 11 danner et ”sandwich” motiv. Heliks 12 varierer og heliks 1 er ikke med. Ved binding av ligand til domenet skjer en distinkt konformasjonsendring der rearrangering av heliks 3 gjør at heliks 11 vipptes ut, og heliks 12 pakker seg inn mot heliks 3, 5/6 og 11. Dermed går LBD fra en åpen apo-form til en lukket holo-form. Samtidig dannes koaktivator-bindingskløften [26, 28]. Figur 1.6 viser en illustrasjon av konformasjonsendringen ved ligandbinding.



**Figur 1.6.** Ved binding av ligand til domenet skjer en distinkt konformasjonsendring der rearrangering av heliks 3 gjør at heliks 11 vipptes ut, og heliks 12 pakker seg inn mot heliks 3, 5/6 og 11. Figuren er hentet fra referanse [29].

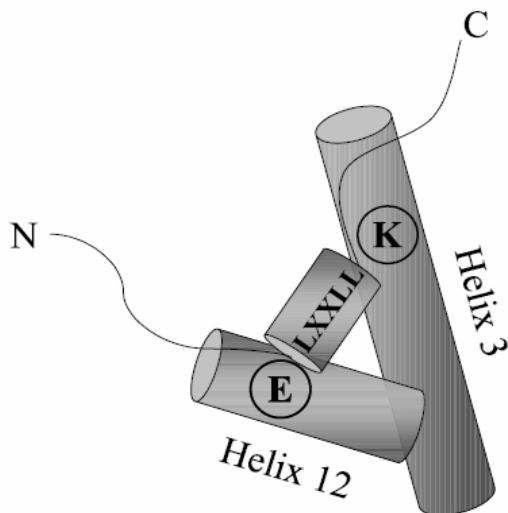
#### 1.4.6. DNA-bindende domene

DBD er et meget konservert domene og er nærmest identiske innen kjernereseptorfamilien. Den grunnleggende strukturen består av to  $Zn^{2+}$  ioner som er koordinert av fire cysteiner. De danner en  $\alpha$ -heliks som pakkes inni domenet ved hjelp av sine hydrofobe overflater. Den ene heliksen er gjenkjennelsessekvensen, der sidekjedene kommer i kontakt med basene i major groove i DNA-tråden, og er ansvarlig for sekvensspesifisitet. Når kjernereseptoren dimeriserer kan gjenkjennelsessekvensen binde sitt DNA-halvsete, og avstanden som oppstår mellom de to monomerene bestemmer antall spacer nukleotider som er mellom responselementene i DNA. Dermed er de ansvarlig for spesifikk binding av kjernereseptor til DNA.

#### 1.4.7. Kjernereseptor koaktivatorer

Koaktivator blir rekruttert til aktiverte kjernereseptorer, og deltar oftest som komponenter i proteinkomplekser som medierer transkripsjon av målgener. Når de er bundet til kjernereseptor kan de både åpne kromatinstrukturen rundt målgenet, og stabilisere samlingen av PIC [30].

Når ligand er bundet til kjernereseptor, og konformasjonsendringen av LBD skjer, kan koaktivatorer binde til den eksponerte hydrofobe kløften som dannes i kjernereseptoren [28]. Dette skjer ved hjelp av NR boksene i koaktivatoren. NR-boksen består av et LXXLL- motiv der L Leucin og X en hvilken som helst annen aminosyre. LXXLL-motivet danner to "turns" av  $\alpha$ -heliks som binder seg i den hydrofobe kløften på overflaten av LBD i reseptoren. Bindingen stabiliseres ved at et konservert glutamatresidue i AF-2 domenet i kjernereseptoren danner kontakt med N-terminal ende av LXXLL- heliksen, og den C-terminale enden av LXXLL-heliksen binder en konservert lysin i heliks 3 i kjernereseptoren. Sammen vil glutamat og lysin residuene lage en ladet "klemme/clamp" som gjør det mulig for sidekjedene til LXXLL å pakke seg inn i den hydrofobe kløften. Dette er vist med en illustrasjon i figur 1.7 [31] [32].



**Figur 1.7.** Koaktivator binder ved hjelp av sin NR-boks, eller LXXLL-motiv. Den C-terminale enden av LXXLL heliksen binder til lysin residuene i heliks 3 i kjernereseptoren. N-terminal ende av LXXLL binder til glutamat i heliks 12 i kjernereseptoren. Glutamat og lysin i kjernereseptoren danner en ladet klemme, som sørger for at leucinene i koaktivatorens NR-boks pakkes inn i en hydrofob kløft. Figuren er hentet fra referanse [31].

Egenskapene til koaktivatorer varierer fra direkte til indirekte histon acetyltransferase aktivitet (HAT), som modifiserer kromatinstrukturen og gjør DNA tilgjengelig for transkripsjon [33]. Mange av de ligandavhengige koaktivatorene inntar først den rette struktur etter binding, mens de liganduavhengige som binder til AF-1 ser ut til å være strukturert før binding med kjernereseptoren. Kjernereseptor koaktivatorer deles inn i flere familier, noen av dem følger under.

**SRC/p160 familien (steroid reseptor koaktivator)** ble oppdaget som et ligandavhengig interagerende protein til progesteron reseptor. Siden det har det blitt beskrevet mange splice varianter av dette proteinet, og disse binder til ulike kjernereseptorer. De inneholder LXXLL motiver [34]. Noen medlemmer av familien er:

- 1) **SRC-1/NCOA-1:** Steroidreseptor koaktivator1/kjernereseptor koaktivator1.
- 2) **TIF2/GRIP1:** Ligand avhengige transaktiverende koaktivatorer, TIF2 står for transkripsjonsaktiverende intermediat faktor, mens GRIP1 står for **GR**-interagerende **protein**.
- 3) **pCIP/ACTR/AIB1** kointerragerende assisterende protein /aktivator TR og RAR. De er amplifisert i brystkreft.

**CBP og p300:** Transkripsjonelle ko-integratorer som fungerer som sekundære koaktivatorer, og interagerer med reseptoren via primære koaktivatorer fra SRC familien. De har en essensiell koaktivator rolle for mange av klassene av de sekvensspesifikke transkripsjonsfaktorene [35]. De binder til koaktivatorer og både p300/CBP og medlemmer av SRC koaktivator familien har HAT aktivitet som kan føre til åpning av nukleosomstrukturen og fremme i transkripsjon [34].

**TRAP/DRIP:** Tyroidreseptor assosiert protein / vitamin-D reseptor interagerende protein, ble funnet under studier av TR og vitamin-D reseptoren [36]. Koaktivatorkomplekset består av mer enn et dusin proteiner og binder kjernereseptor ved hjelp av TRAP220/DRIP205. TRAP/DRIP interagerer direkte med RNA PII, og deltar dermed direkte i rekrutteringen og aktiveringen av polymerasen, samt som en brobygger mellom kjernereseptor og RNAPII [37, 38], [39].

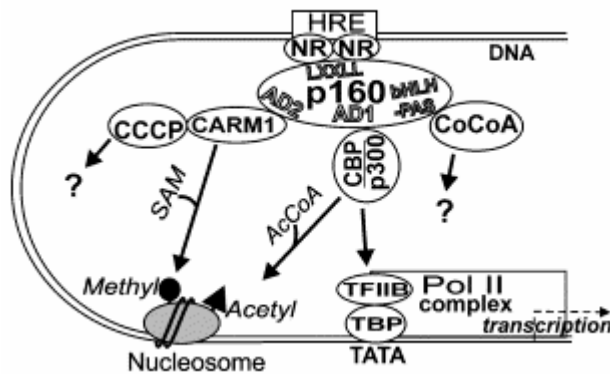
**P/CAF** er en essensiell komponent i multikoaktivator komplekset som kalles ADA eller SAGA [40]. Den er en histon acetylase som kan være en del av koaktivator komplekset med CBP og p300. P/CAF kan rekrutteres direkte av kjernereseptor heterodimeren RXR/RAR.

Den assosierer direkte med DBD i NR, uavhengig av p300/CBP binding

**CARM-1** står for Coactivator Assosiert Argenin Metyltransferase 1, og er en H3 spesifikk metyltransferase. Det virker som en sekundær koaktivator for NR, eksempel AR. Den rekrutteres til promotoren gjennom assosiering med primære koaktivatorer fra p160 familien. Eksempel er SRC-1 og GRIP1 [41].

**Swi/snf** komplekset er et kromatin remodelerings kompleks som benytter hydrolyse av ATP som energikilde for å forandre på kromatinstrukturen. Komplekset øker tilgangen til nukleosomalt DNA [9].

**Multikoaktivatorkomplekser.** Mange av NCoA viser seg å være mer generelle enn først antatt, og sannsynligvis identiske eller varianter av hverandre i ulike mediatorer [42].



**Figur 1.8** Ved binding av agonist vil kjernereseptoren endre konformasjon til en aktiv form og bindingskløften for koaktivatorer vil være tilgjengelig. På figuren er det primære koaktivatoren bundet til kjernereseptor ved hjelp av sitt LXXLL-motiv (NR-boks). De primære koaktivatorene rekrutterer igjen sekundære koaktivatorer som bidrar til økt transkripsjon på forskjellige måter. Eks. CARM-1 metylerer histonhalen og åpner kromatinstrukturen. Figuren er hentet fra referanse [43].

#### 1.4.8. Kjernereseptorer korepressorer

Kjernereseptorene kan nedregulere basaltranskripsjonen ved å hemme basalpromotoraktiviteten i fravær av ligand. Det kan hindre aktivering av transkripsjon ved enten å binde seg til responselementene på DNA, eller ved å blokkere dimeriseringsdomenet til kjernereseptoren. Begge mekanismene sørger for å blokkere tilgangen til aktivatorer eller andre basale transkripsjonsfaktorer. Dette kalles passiv hemming. Ved aktiv hemming vil den ikke-ligandbundne reseptoren enten direkte hemme transkripsjonsinitieringen, eller så vil den rekruttere faktorer som skaper et ugunstig miljø for samling av PIC.

De best karakteriserte korepressorene er Nuclear Receptor Corepressor NCoR og Silencing Mediator for Retinoic acid and Thyroid acid (SMRT). De binder direkte til kjernereseptorer, ved hjelp av LXXI/HIXXXI/L-motiv [44] og kan også rekruttere HDAC som sørger for transkripsjonsinaktivt DNA – heterokromatin.

Steroidhormonreseptorer er ikke bundet til korepressorer i fravær av ligand. Da er reseptoren bundet til hsp 90 chaperonkomplekset, men det rekrutteres korepressorer når de er bundet til antagonist [45].

### 1.5. hSR-B1 (human Scavenger receptor)-promoteren

Scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) er en reseptor for HDL (high density lipoprotein). Den fasiliterer transport av kolesterol til vev, og frakter overflødig kolesterol til lever for utskillelse [46]. hSR-B1 er høyt uttrykt i steroidproduserende vev, der kolesterol er nødvendig som forløperen til steroidhormoner.

Estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) er vist å øke plasma HDL-nivået, og senke LDL nivået i blodet, ved å påvirke ekspresjonen av hSR-B1-reseptoren. En økning i plasma HDL, samt en reduksjon i LDL nivået synes å redusere risikoen for kardiovaskulære sykdommer [46] [47].

Østrogenregulering av hSR-B1 genen ble først rapportert i 1996 av Cohen et al. [48].

### 1.6. Estrogen reseptor $\alpha$ og $\beta$

For over 30 år siden fant man ut at den biologiske effekten til E<sub>2</sub> var mediert av et estrogenreseptor (ER)-protein. Den ”genomiske” mekanismen til estrogenaktivitet er at E<sub>2</sub> diffunderer gjennom plasmamembranen og kjernemembranen og binder seg til ER. Dette komplekset binder seg så til østrogen responselementer (ERE) på DNA, direkte eller indirekte via aktiveringsprotein AP-1 eller Sp-1, som sitter i promotorregionen [49], [50].

Estrogenreseptorene tilhører Class 1 medlemmer av kjernereseptor superfamilien av ligand induerte transkripsjonsfaktorer. Ifølge den klassiske modellen vil ER være bundet til et inhibitorisk multiproteinkompleks enten i cytoplasma eller inn i kjernen i fravær av ligand [51]. I 1995 ble det kjent at det fantes to former av estrogen reseptor, da ER $\beta$  ble klonet fra rotte prostata [52]. Siden den tid er det klonet ER  $\beta$  fra ulike arter, og det er oppdaget mange isoformer av proteinet. I 1998 ble det første cDNA av ER $\beta$  fra mennesket identifisert. Det koder for 530 aminosyrer. Oppdagelsen av ER $\beta$  har satt i gang en revurdering av estrogenets biologi og egenskaper. Den gamle varianten av ER blir nå kalt ER $\alpha$ . Genet for ER $\alpha$  er lokalisert på kromosom 6, mens genen for ER $\beta$  er lokalisert på kromosom 14. Dette bekrefter at det er ulike gener som koder for de to reseptorene, og det utelukker at ER $\beta$  er en spleisevariant av ER $\alpha$  [52].

Forskjeller mellom de to ligger både i AF-1 og LBD. AF-1 domenet hos ER $\alpha$  viser høy aktivitet ved stimulering av reporter genekspresjon med ulike estrogen respons elementer (ERE), mens hos ER $\beta$  er aktiviteten ved samme stimuli ubetydelig [50, 53]. Videre forskning har avslørt at ER $\beta$  mangler det N-terminale AF-1 domenet [51]. Det DNA-bindende domenet inneholder to zinkfingre som spiller en viktig rolle i dimerisering og binding til spesifikke

DNA sekvenser. DBD til ER $\alpha$  og ER $\beta$  er svært homologe med 97 % likhet, mens LBD til de to reseptorene har 57 % likhet [51]. ER $\alpha$  er uttrykt i bryst, livmor og bein, mens ER $\beta$  er primært uttrykt i eggstokker, prostata, testikler, lunger, thymus, milt og lokaliserte områder i hjernen, og er involvert i regulering av eggløsning og noen aspekter ved parringsmønsteret hos ulike arter [51]. Det er også vist at ER $\alpha$  og ER $\beta$  har forskjellige reaksjoner til ulike ligander. Ligander med en struktur med flere sidegrupper, kan fungere som agonister til ER $\alpha$ , men som antagonister til ER $\beta$  [50]. Dette skyldes trolig at bindingskløften til ER $\beta$  er mindre enn hos ER $\alpha$  [21] [54].

ER $\beta$  binder direkte til DNA på ERE, som er palindrome sekvenser med 3 spacer-nukleotider imellom. Konsensus sekvensen er følgende: AGGTCAnnnTGACCT [55]. Det er forsket mye på estrogens effekt på fysiologiske prosesser, som for eksempel modning og opprettholdelse av kvinners reproduksjonsapparat [56]. Det er avdekket at estrogen spiller en viktig rolle i utvikling av forskjellige krefttyper. Det er en kjent årsak til brystkreft, og en hypotese er at binding av estrogen til ER vil stimulere til DNA-replikasjon og celledeling. Når celleantallet øker, vil også sjansen for at det skjer mutasjoner øke. Dette kan resultere i forstyrrelser i f.eks. DNA reparasjonsapparatet, apoptose og celledeling [49].

ER $\beta$  antas å ha en beskyttende effekt i tykktarm, hvor det er målt store tap av reseptoren i kreftsvulster. Medisinsk forskning har utviklet en ER $\beta$ -spesifikk agonist for behandling av Chrons sykdom og reumatoid artritt. Det er også vist at ER $\beta$  ekspresjon er betydelig lavere i prostatakreftvev enn i normalt vev [49].

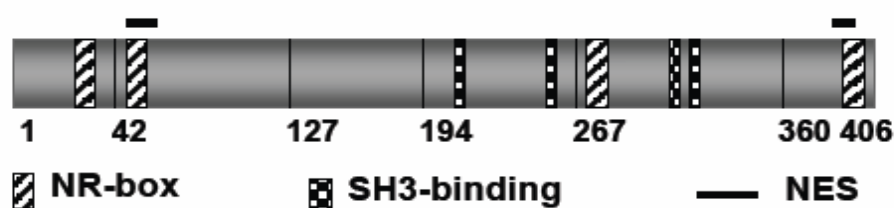
Forskjellige typer medisinsk behandling retter seg mot estrogenreseptorer, siden de deltar i mange signalveier [57].

Estrogener og estrogenantagonister har i dag stor relevans for både bekjempelse og behandling av f.eks brystkreft, samt andre kvinnelige kreftformer som livmor og eggstokkkreft [49]. Hos postmenopausale kvinner, er det endogene estrogennivået betydelig redusert, og det er vist økt risiko for osteoporose og kardiovaskulære sykdommer. Dette er basis for den allmenne holdningen at estrogen har en positiv effekt på hjerte og karsykdom, og på opprettholdelse av beinvev [58]. Estrogen har vært hyppig brukt til behandling av osteoporose, men konsekvensene er at det øker risikoen for brystkreft [59].

### 1.7. Human Kidney Predominant Protein (hNCU-G1)

I forbindelse med studier på promotorregionen fra human cellulær retinolbindende protein type 1. (hCRBP1), utført av Winnie Eskild et al.[60], ble det oppdaget et protein Bp1 som kan binde til promotorområdet og fungere som transkripsjonsfaktor for genet. Søk i den humane genomdatabasen resulterte i at proteinet ble identifisert som Human Kidney Predominant Protein, hNCU-G1. Det er vist at proteinet er uttrykt i de fleste vev, men det finnes spesielt høye nivåer av mRNA for NCU-G1 i lever, nyrer og prostata. Genet er lokalisert på kromosom 1 1q23 og høyt konserverert mellom forskjellige arter. Amplifikasjon eller deleasjoner i dette området er rapportert ved en rekke kreftformer for eksempel bryst-, ovarie-, lunge- og leverkreft. Analyser av aminosyresekvensen viser et høyt innhold av prolin, men ingen spesielt prolinrike områder. hNCU-G1-genet består av seks eksoner med en samlet åpen leseramme (ORF) på 1218 bp, som koder for 406 aminosyrer og gir en molekylvekt på 43,8 kD. Analyser av databaser viser at hNCU-G1 ikke ligner noen andre kjente proteinsekvenser. Det er hittil vist seg å være unikt. Basert på de genomsekvenser som i dag er kjente ser det ut til at NCU-G1 bare finnes hos vertebrater.

Ulike analyseprogrammer viser at proteinet har fire NR-bokser dvs. LXXLL-domener som kan binde til en kjerne reseptors AF-2-domene etter ligandbinding. Dette indikerer at NCU-G1 er en kjerne reseptor koregulator. Det er også funnet to mulige kjerneeksportsignaler (NES), men ingen kjerne lokaliseringssignaler (NLS). Det er funnet tre PXXP-motiver som kan interagere med SH3-domener som finnes på f.eks. Src-kinase [61]. Det er også vist at hNCU-G1 har en rekke mulige forforyleringssteder bl.a. for MAP kinase, et bindingssete for ubiquitin-ligase og for peptidyl-prolyl isomerase. Figur 1.9. viser en modell av hvordan de ulike motivene er plassert på hNCU-G1.



Figur 1.9. NCU-G1 inneholder 4 NR-bokser og et kjerneeksportsignal. SH3-bindende motiv er et PXXP domene som kan interagere med SH3-domener som finnes i f.eks. SRC-kinaser. [62]



Tertiær strukturen til NCU-G1 er fortsatt ukjent, fordi det ikke har vært mulig å krystallisere proteinet. Dette skyldes at det har lett for å aggregere ved høy konsentrasjon. Siden NCU-G1 er unikt, finnes det heller ingen database man kan benytte for å bestemme tredimensjonal struktur.

### 1.7.1. Tidligere arbeid med NCU-G1

Arbeidet med å identifisere og karakterisere NCU-G1 har vist at proteinet fungerer som en ligandavhengig koaktivator for PPAR $\alpha$ . Dette ble vist ved transiente transfeksjoner av S2-celler (Schneiders *Drosophila Melanogaster* cellelinje 2). Mutasjoner av ulike NR-bokser har vist at det er NR-boks 1 som sørger for interaksjon mellom PPAR $\alpha$  og NCU-G1 [60].

Det ligandbindende domenet fra en rekke kjernereseptorer er blitt fusjonert med GST og inkubert med helcelleekstrakt fra 293- eller RPE-celler som inneholder endogent hNCU-G1. Undersøkelsene viste at hNCU-G1 interagerer med ER $\alpha/\beta$ , PPAR $\alpha$  og TR $\alpha$ . hNCU-G1 interagerer ikke med RXR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  eller HNF4 $\alpha$ .

Ko-immunopresipitering utført på ubehandlede 293-celler, med bruk av antistoff mot ER $\alpha$ , PPAR $\alpha$  samt HNF4 $\alpha$ , indikerer at hNCU-G1 deltar i et kompleks med disse kjernereseptorene, og dermed kan ha betydning for funksjonen av disse reseptorene.

Funksjonen av hNCU-G1 på PPAR $\alpha$  er testet ut ved transiente transfeksjoner av SL-2-celler. Cellene ble ko-transfektet med PPAR $\alpha$  og hNCU-G1 ekspresjonsplasmid, samt reporter-genet CAT under kontroll av en PPAR $\alpha$  responsiv promotor. Reporter-genanalyser ved bruk av CAT-ELISA assay, viste at hNCU-G1 øker uttrykket av reporter-genet 10x, sammenlignet med PPAR $\alpha$  alene.

Som nevnt tidligere ble hNCU-G1 ble først identifisert som et ukjent protein som bandt FP1 i hCRBP-promotoren. Gruppen har gjort undersøkelser på hvorvidt hNCU-G1 kan fungere som en selvstendig transkripsjonsfaktor på denne promotoren. Analogt med reporter-genforsøkene utført med PPAR $\alpha$ , ble det vist at hNCU-G1 øker ekspresjonen av CAT 10x når CAT er under kontroll av hCRBP-promotoren. I forbindelse med dette er det også gjort delesjonsanalyser av hNCU-G1 som viser tap av den transkripsjonsaktiverende effekten ved delesjon av ekson 2, mens delesjon av ekson 6 gir økt transkripsjonsaktivering.

Det pågår nå arbeider i gruppen på hNCU-G1s DNA-bindende egenskaper. Det er blitt vist at hNCU-G1 spesifikt binder FP1 i hCRBP-promotoren, og nyere data fra gruppen antyder at hNCU-G1 binder DNA mellom aminosyre nr 99-135.

## 2. Målsetting.

Det er tidligere utført pulldown-forsøk som har vist interaksjon mellom hNCU-G1 og forskjellige ligandaktiverede kjernereseptorer. Det er også utført CAT reporterstudier som viste stimulering av PPAR $\alpha$  i nærvær av hNCU-G1.

I denne masteroppgaven skulle jeg undersøke hER $\alpha$  og  $\beta$  sin evne til å binde ERE i hSR-B1 promotoren og stimulere ekspresjon av reporter-gen, samt hNCU-G1 sine egenskaper som en eventuell koaktivator for hER $\alpha$  og hER $\beta$  kontrollert ekspresjon fra et fragment av hSR-B1 promotoren.

### Arbeidet omfattet:

- Undersøke ligandaktivert hER $\alpha$  og hER $\beta$  sin evne til å uttrykke reporter-gen ved å binde til ERE i hSR-B1 promotoren.
- Undersøkelser av hNCU-G1 sin evne til å stimulere hER $\alpha$  og hER $\beta$  kontrollert ekspresjon fra hSR-B1 promotoren.

### 3. Eksperimentelle metoder og teknikker

#### 3.1. Prokaryote celler:

Transformasjon av prokaryot celler er en vanlig metode for å introdusere DNA inn i bakterieceller. Før man starter med transformasjonen må cellene gjøres kompetente for opptak av DNA.

##### 3.1.1. Produksjon av kompetente celler.

- Stryk ut *E.coli* DH5 $\alpha$  celler på LB skåler uten antibiotika. Inkuber i varmeskap på 37 °C over natt.
- Plukk 10-12 store kolonier og plasser dem i 250 ml SOB medium uten antibiotika
- La gro ved 18 °C til OD<sub>600</sub> = 0,6 (1-2 døgn)
- Sett bakteriene på is i 10 minutter
- Sentrifuger ned bakteriene ved 2500x g i 10 min, 4 °C
- Hell av supernatant og resuspender bakteriene i 80 ml iskald TB-buffer og sett på is i 10 minutter.
- Sentrifuger ved 2500x g i 10 minutter, 4 °C
- Hell av supernatanten og resuspender pelleten på nytt i 10 ml iskald TB-buffer.
- Tilsett deretter 10 ml TB med 14 % DMSO.
- Fordel bakteriene i eppendorfrør. 200  $\mu$ l i hvert, og oppbevar cellene ved -70 °C.
- Test bakterienes kompetanse ved å transformere en alikvot på 50  $\mu$ l med henholdsvis 0,1, 1 og 10 ng DNA-plasmid. Tell antall kolonier.

Kompetansen beregnes ut for hver av de tre DNA konsentrasjonene. Antall kolonier for hver konsentrasjon telles og multipliseres med forholdet mellom 1  $\mu$ g DNA og brukt DNA mengde. En hypotetisk beregning er vist i tabell 3-1. Hvis antall kolonier er 100 ved bruk av 0,1 ng DNA, er bakteriens kompetanse  $100 \cdot 10000 = 1,0 \cdot 10^6$

ng DNA	Forhold $\mu$ g/ $\mu$ l = F	Antall kolonier = A	Cellekompetanse = F*A
0,1	10 0000	100	$1,0 \cdot 10^6$
1,0	1000	1000	$1,0 \cdot 10^6$
10	100	1000	$1,0 \cdot 10^5$

**Tabell 3-1** Hypotetisk beregning av kompetansen til egenproduserte kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  cellene

### 3.1.2. Transformasjon av bakterieceller.

Etter Inove metoden

Protokoll:

- Ta opp kompetente *E.coli* DH5a celler fra -80 °C fryseren, og tin på is.
- Arbeidet foregår på is. Tilsett 10 ng plasmid i nytt rør, og tilsett 50 µl av de kompetente cellene når de har tint nok til å pipetteres.
- Inkuber på is i 30 min.
- Sett så bakteriecellene på 42 °C vannbad i nøyaktig 30 sek.
- La så de transformerte bakteriene stå på is i 2 min
- Tilsett 450µl LB uten antibiotika, og sett på 37 °C vannbad i 1 time.
- Overfør bakteriene til LB-skåler med ønsket antibiotikum, for seleksjon av kolonier, eller i LB med ønsket antibiotikum for amplifisering av plasmid.
- Inkuber over natt ved 37 °C (med risting for amplifisering av plasmid.)

### 3.1.3. Isolering av plasmid DNA fra bakteriekultur.

I dag har finnes det mange kit som er konstruert for effektivt å isolere plasmid DNA. De er oftest basert på alkalisk lysing av bakteriene, og det skjer ved å behandle dem med NaOH og SDS. Ved tilsetning av en nøytraliseringsbuffer (Na-acetat, eller K-acetat med pH 4,8-5,2) felles proteiner og kromosomalt DNA. Supernatanten filtreres og vaskes med etanol for å fjerne andre cellekomponenter enn plasmid DNA. Deretter kan plasmid løses i buffer etter ønske.

### 3.1.4. Miniprep (Promega)

Her ble det brukt standard protokoll for miniprep fra Promega (Wizard® SV Minipreps) [63] for isolering av plasmid DNA etter selektering av kolonier fra LB-skåler.

### 3.1.5. Plasmid preparering ved bruk av CsCl- gradient. ( til transfeksjon av eukaryote celler)

Dette er en metode som baserer seg på alkalisk lysering. Metoden har mange likheter med mini/maxi prep. Forskjellen kommer etter utfelling av proteiner ved tilsetning av Na-acetat eller bufferen (P3) som også er en nøytraliseringsbuffer. Proteiner som er igjen i DNA-løsningen felles ut når det tilsettes cesiumklorid (CsCl) og etidiumbromid (EtBr). I tillegg får man som regel et mye større og renere utbytte enn ved bruk av Qiagen kolonne. Denne metoden er derfor bedre å benytte når DNA skal brukes til transfeksjon av eukaryote celler.

#### Prosedyre:

- Transformer de kompetente *E.coli* cellene med ønsket plasmid-DNA, og overfør deretter cellene til 500 ml LB-medium med ønsket antibiotika tilsatt, her ampicilin 75 µg/ml. La kulturen stå i risteinkubator over natt ved 37 °C.
- Sentrifuger ned bakteriekulturen ved 7000 rpm i 10 min, 4 °C
- Hell av supernatanten, og resuspender cellepelleten i 25 ml løsning 1 (resuspenderingsbuffer)
- La stå i romtemperatur i 5 min.
- Hell løsningen over i sentrifugerør før tilsetning av 25 ml løsning 2. (lyseringsbuffer). Bland ved å vende sentrifugerøret 4-6 ganger, og la stå på is i 5 min.
- Tilsett så 12,5 ml 3 M Na-acetat, pH 4,8. Bland ved å vende 4-6 ganger, og sentrifuger ved 100000 rpm i 30 min, 4 °C
- Filtrer supernatanten gjennom to lag cellestoff. Mål volumet, tilsett så isopropanol som tilsvarer 60 % av supernatantens volum. Bland godt og la stå på is i 10-20 min. DNA vil nå felle ut.
- Sentrifuger ved 100000 rpm i 30 min, 4 °C.
- Hell av supernatanten, tørk pelleten i ca 20 min. Løs pelleten i 2,875 ml TE-buffer, pH 8,0. La rørene stå tildekket ved 4 °C over natt dersom man vil fortsette prosedyren neste dag.

### Bakgrunn for ultrasentrifugering med CsCl- gradient.

Ved ultrasentrifugering dannes en tetthetsgradient av CsCl, og tettheten øker jo lenger ned i røret man kommer. DNA stopper i punktet som tilsvarer tettheten til DNA. CsCl- gradienten tilsettes EtBr for å kunne se plasmid DNA under UV-lys. Ved høye konsentrasjoner av EtBr vil kromosomalt DNA binde større mengder EtBr enn helt sirkulært DNA (plasmid DNA). Binding av EtBr reduserer tettheten, slik at kromosomalt DNA ekvilibrerer ved lavere tetthet i CsCl- gradienten enn plasmid DNA. EtBr kan gi rammeskiftsmutasjoner ved replikasjon og transkripsjon av DNA, pga interkalering med basene i DNA molekylet. Det er derfor meget viktig å få fjernet all EtBr etter bruk av CsCl- gradient.

### Prosedyre:

- Overfør DNA- TE løsning fra to rør over til et rør hvor det er tilsatt 8,1 g CsCl
- Sett røret på varmebad ved 37 °C, og la det stå til CsCl har løst seg i DNA/TE-løsningen. Her kan eventuelt proteiner som er igjen i DNA-løsningen felle ut, på grunn av den høye saltkonsentrasjonen.
- Tilsett 2,475 ml av 2,5 mg/ml EtBr, og sentrifuger ved 5000 rpm i 10 min ved 20 °C. Det er viktig at temperaturen ikke er lavere, da vil DNA og /eller CsCl felle ut.
- Overfør supernatanten til et Beckmann ultrasentrifugerør, 8 ml.
- Forsegl ultrasentrifugerørene ved gjensmelting og sett dem i MLA80 rotoren.  
NB! Nøyaktig vekt på balanserøret er helt nødvendig.

Før man setter i gang ultrasentrifugen, er det viktig å fjerne støv fra rotor, og at den får hvile ca 30 min etter at rotoren er satt inn, for å være sikker på at den står stille før start.

- Sentrifuger ved 700000 rpm i 20 timer ved 20 °C.
- Trekk ut plasmidbåndet med en kanyle. Gjør dette på mørkerom under UV-lys. Når EtBr interkalerer med DNA blir det meget lysømfintlig og det må derfor oppbevares mørkt og ved romtemperatur frem til det blir rensset.

### Prosedyre for rensing av plasmidbånd

- Sug opp samme volum som plasmidbåndet av NaCl- mettet isopropanol og vann i kanylen.
- Rist godt. EtBr vil gå i isopropanolfasen (øverst i kanylen) mens DNA blir værende i vannfasen.
- Sprøyt ut isopropanolfasen.
- Utfør de to punktene til isopropanolfasen blir helt klar, også en gang til.
- Fortynn plasmidfraksjonen med 2x volumet med TE-buffer, pH 8,0.
- Tilsett 3x volumet i røret med kald 96 % EtOH for utfelling av plasmid.
- Sett løsningen på is i 20 min, for optimal utfelling.
- Sentrifuger løsningen ved 10000 rpm i 5 min, 4 °C.
- Vask pelletten i 5 ml kald 70 % EtOH, og sentrifuger ned ved 7500 rpm i 10 min, 4 °C.
- Gjenta etanolfellingen.
- Mål DNA konsentrasjonen.

## 3.2. Molekylærbiologiske teknikker.

### **3.2.1. Kvantifisering av nukleinsyrer ved bruk av spektrofotometer.**

I DNA vil nitrogenbasenes purin og pyrimidinringer kunne absorbere UV-lys. Den maksimale absorpsjonen for nukleinsyrer er på 260 nm, og dette brukes for å kvantitere DNA og RNA mengden ved bruk av spektrofotometer. Konsentrasjonen av DNA bestemmes ved måling av absorpsjon A<sub>260</sub> nm.

Forholdstallet mellom målingene ved 260nm og 280 nm er en indikator på hvor rent DNA i prøven er. Ved 280 nm måles proteinabsorpsjonen, og dette forholdstallet gir et mål på hvor mye protein det er i DNA prøven. Når OD<sub>260</sub>:OD<sub>280</sub> ligger på mellom 1,7 og 1,9 er DNA i prøven rent. Hvis forholdstallet er lavere, er prøven sannsynligvis forurenset med proteiner, eller fenolkontaminering. Er det høyere skyldes det frie nukleotider.

Prosedyre:

- Spektrofotometeret nullstilles ved 260 nm og 280 nm med 500 µl dH<sub>2</sub>O i en kvartskuvette
- Prøven som skal analyseres fortynnes i dH<sub>2</sub>O til et totalvolum på 500 µl.
- Og absorpsjonen måles med samme kuvette som nullprøven.
- DNA konsentrasjonen for den gitte prøven beregnes med følgende formel:

$\frac{\text{OD } 260 \text{ nm} * 500\mu\text{l}}{20 * n \mu\text{l fra DNA prøve}} = \text{DNA } \mu\text{g}/\mu\text{l}$
---

20 = Ekstinksjonskoeffisienten for DNA.

### 3.2.1.1 Restriksjonsanalyse/ enzymfordøyning av DNA.

Restriksjonsendonukleaser finnes i mange forskjellige bakteriestammer, og de isoleres fra disse for å kunne benyttes i arbeid på laboratorium.

Deres biologiske funksjon er å kunne gjenkjenne og kutte ”ukjent” (ikke eget) DNA.

Eksonukleaser er enzymer som kutter fra enden av sekvensen.

Endonukleaser er enzymer som kutter inne i sekvensen

Vi deler endonukleasene opp i I, II og III, hvor type II er den som er viktigst og brukes til arbeid med rekombinant DNA. Restriksjonsenzymet som tilhører denne gruppen, er homodimerer og gjenkjenner palindromsekvenser på 4 til 8 basepar, men ikke alle posisjonene trenger å gjenkjennes eksplisitt. Endonukleasene kan gi DNA fragmenter med 5’ eller 3’ overhengende haler og butte ender.

Standardenheten på enzymer er Unit. Definisjon på units er den nødvendige mengden av enzym som kreves for å kutte 1 µg phage DNA på 1 time, ved ideell temperatur for det bestemte enzymet. Hvert enzym krever optimalisering av pH, saltkonsentrasjon, bæreproteiner og temperatur. Hvis det skal utføres ulike restriksjonskuttinger samtidig, må disse forholdene være like for begge enzymer.

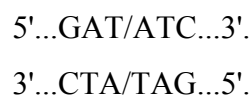
Eksempel på restriksjonskutting som gir overhengende haler;

AgeI



Eksempel på restriksjonskutting som gir butte ender (blunt ends)

EcoRV





### 3.2.1.2. Agarosegel elektroforese

Agarosegel elektroforese er en metode for separering, identifisering og rensing av DNA fragmenter på bakgrunn av størrelse. Agarose er et lineært polysakkarid. Det tilsettes i elektroforesebuffer, og kokes for å løses tilstrekkelig. Når gelen stivner dannes et nettverk hvor tettheten blir bestemt av agarosekonsentrasjonen. Negativt ladet DNA vandrer i det elektriske feltet fra katode mot anode. Når DNA er satt på gelen og utsettes for et elektrisk felt, vil de minste fragmentene vandre raskest mot anoden (dvs. går lengst i gelen.)

#### Prosedyre:

Det ble brukt 1,0 % agarosegel i 1x TAE buffer for separering av DNA fragmenter mellom 0,1 – 10 kb. "Loading" bufferen ble tilsatt prøvene i 1:10 forhold for applisering på gel. 1 kb DNA ladder fra Fermentas ble brukt som standard for å bestemme størrelsen på fragmentene som ble analysert. Etidium bromid (EtBr) ble brukt som det interkalerende reagensen i en konsentrasjon på 0,6 µg/ml/gel for deteksjon av DNA fragmenter under UV-lys.

### 3.2.1.3. Isolering og rensing av DNA fra agarosegel

Her ble det benyttet standard protokoll for GE Healthcare sitt gelekstraksjons kit [64]. Avvik fra protokoll var elueringsvolumet. Jeg bruker 70 µl dH<sub>2</sub>O i stedet for 100µl.

Dette er en rask metode hvor man løser gelbiten i Caption buffer ved 60 °C.

Sentrifugekolonnen har en matrix som har stor affinitet for DNA. Etter å ha sentrifugert ned den løste gelbiten gjennom kolonnen, blir DNA vasket med vaskebuffer tilsatt etanol, og renses ut med enten dH<sub>2</sub>O eller en buffer med lav saltkonsentrasjon (pH 8,0). Eluatet ble brukt videre i kloningsarbeid.

### 3.2.2. Primer design

Ved konstruksjon av primere kreves det at begge (sense og antisense) inneholder sekvens for kuttsete til restriksjonsenzymene som skal brukes senere. I dette tilfellet er det AgeI i sense tråden, og XhoI i anti sense. Disse legges inn i 5'enden på primerne. På denne måten får PCR produktet kuttseter i hver ende og kan lett kuttes ut av pAC 5.1/HIS A vektoren.

Det er viktig at GC innholdet i primeren er på minimum 40 %, for at smeltetemperaturen ikke skal bli for lav. For at primeren skal feste seg best mulig, er det viktig at endene består av enten G eller C. Dette er fordi smeltepunktet er høyest når det er tre hydrogenbindinger mellom basene, i motsetning til to som er mellom A og T. En primer være mellom 20 og 45 nukleotider lang for å være effektiv. Hvis den inneholder for få nukleotider kan man risikere

at den ikke fester seg, og for mange kan resultere i uspesifikk binding.

Formelen jeg benyttet for å beregne smeltetemperatur  $T_m$  og størrelse på primer er følgende:

$$T_m = 81,5 + 0,41 * (\% \text{ GC}) - 675/N$$

N er antall baser i primeren.

Det er viktig å beregne  $T_m$  for primeren både med og uten sekvenser for kuttsetene, fordi smeltepunktet i første syntese blir lavere enn når produktet har med nukleotider for kuttseter.

Ideell smeltepunkt for primere er  $T_m \geq 78^\circ\text{C}$

### 5' primer ERβ:

I 5' enden legger jeg på to stk Guanin før sekvensen for kuttsetet til XhoI. (merket rødt)

5' **GGCTCGAG**ATGACCTTTGTGCCTCTTCTTGCAAGG 3'

Beregning av smeltetemperatur:

$$35 \text{ nt} \quad 675/35 = 19,28$$

$$15 \text{ GC} \quad 19/35 = 0,54 \quad \longrightarrow \quad 54 \% * 0,41 = 22,14$$

$$T_m = 81,5 + 22,14 - 19,28 = \underline{84,36^\circ\text{C}}$$

### Uten ekstra nukleotider:

$$27 \text{ nt} \quad 675/27 = 25$$

$$13 \text{ GC} \quad 13/27 = 0,48 \quad \longrightarrow \quad 48 \% * 0,41 = 19,68$$

$$T_m = 81,5 + 19,68 - 25,0 = \underline{76,18^\circ\text{C}}$$

$T_m$  er uten ekstra nukleotider er tilnærmet lik den ideelle smeltetemperaturen til at det skal fungere

**3' Primer ERβ:**

I 5' enden legger jeg inn to Cytosin før sekvensen for kuttasetet til AgeI. (merket rødt)

5' **CCACCGGT**TCACTGAGACTGTGGGTTCTGGGA 3'

Beregning av smeltetemperatur:

$$32 \text{ nt } \quad 675/32 = 21,09$$

$$19 \text{ GC } \quad 19/32 = 0,59 \Rightarrow 59\% * 0,41 = 24,19$$

$$T_m = 81,5 + 24,2 - 21,1 = \underline{84,6^\circ \text{C}}$$

**Uten ekstra nukleotider:**

$$24 \text{ nt } \quad 675/24 = 28,13$$

$$13 \text{ GC } \quad 13/24 = 0,54 \Rightarrow 54\% * 0,41 = 22,14$$

$$T_m = 81,5 + 22,14 - 28,13 = \underline{75,5^\circ \text{C}}$$

Her er også  $T_m$  for primer uten ekstra nukleotider noe lavere enn  $78^\circ\text{C}$ , men antas å være god nok.

**3.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Polymerase Chain Reaction er en enzymatisk amplifiseringsreaksjon ved bruk av mange sykluser. Hver syklus består av tre trinn; denaturering av dobbheliks templat, annealing og elongiering av primere. To oligosekvenser som er komplementære med en kort del av templat sekvensen blir syntetisert. Disse oligosekvensene er avgjørende for hva man ønsker å amplifisere med PCR.

DNA vil bli denaturert ved oppvarming ( $94^\circ\text{C}$ ), deretter senkes temperaturen slik at oligonukleotidene kan anneale/feste seg til komplementærsekvensen i DNA templatet. Nå kan de fungere som primere for syntesen av DNA som er katalysert av en eller flere termostabile polymeraser. Amplifisert produkt fungerer som templat for neste, og på denne måten vil vi kunne få eksponentiell produksjon av DNA. I dette oppsettet ble Dynazyme polymerase brukt. Det har en hastighet på 1,3 kb i minuttet.

Protokoll:

Generelt oppsett for amplifisering av innskudd:

DNA 5 ng/μl	2 μl
Fwd primer 5pmol/μl	2 μl
Rew primer 5pmol/μl	2 μl
10x reaksjonsbuffer	5 μl
50X MgCl	1 μl
dNTP mix	1 μl
Dynazyme	2 μl
ddH <sub>2</sub> O	35 l
Totalvolum	50 μl

Segment	Syklus	Temperatur	Tid	Reaksjon
1	1	95 °C	1 min og 30 sek	Denaturering
2	20	95 °C	30 sek	Denaturering
		55 °C	1 min	Annealing
3		72 °C	4 min	Elongering
		4 °C	∞	

**Tabell 3-2** Oversikt over tider og temperaturer i PCR reaksjonen.

DyNAzyme™ fra Finnzymes har i følge protokoll en ekstensjonsrate på 1,3 kb pr minutt. Den forventede lengden på innskuddet er 1,5 kb. Elongeringstiden ble satt til 4 minutter, til tross for at det er mer enn det dobbelte av hva som er nødvendig, for å være sikker på at innskuddet ble amplifisert opp.

For å garantere at innskudd er ligert inn i den lineære pGEM-T vektoren, kan man undersøke de positive klonene ved hjelp av PCR med konstruerte primere for innskudd.

Plukk ønsket antall kolonier fra LB-amp skåler med en pipettespiss.

Overfør bakteriene til 35 μl ddH<sub>2</sub>O, og la stå i 15 min.

Merk ny LB-amp skål og stryk spissen på ønsket felt for bevaring av klon til videre arbeid.

Taq polymerasen som benyttes i dette oppsettet har en hastighet på 1 kb i minuttet.

Generelt oppsett for kontroll av innskudd

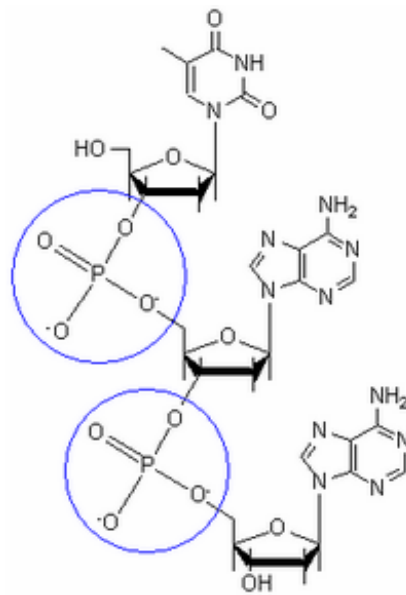
ddH <sub>2</sub> O	35 µl
10X termofil polymerase buffer	5 µl
25 mM MgCl	4 µl
10 mM dNTP	1 µl
Rew primer 5 pmol/µl	2 µl
Fwd primer 5 pmol/µl	2 µl
<u>Taq polymerase (Promega)</u>	<u>1 µl</u>
Totalvolum	50 µl

Segment	Sykluser	Temperatur	Tid	Reaksjon
1	1	94 °C	2 min/ 45 sek	Denaturering
2	20	94 °C	45 sek	Denaturering
		60 °C	45 sek	Annealing
		72 °C	1 ½ min	Elongering
3		72 °C	5 min	Elongering
		4 °C	∞	

**Tabell 3-3** Tabell over PCR tid og temperatur ved kontroll av innskudd

### 3.2.4. Ligering av DNA fragmenter.

Ligase er et enzym som katalyserer ligering mellom fosfatgrupper og hydroksylgrupper, på denne måten dannes nye kjemiske bindinger (fosfodiesterbindinger). De kovalente bindingene som binder fragmentene sammen dannes på bakgrunn av hydrolyse av ATP (eller andre tilsvarende molekyler som NAD<sup>+</sup>/NADP). Ligaseenzymet er klassifisert som EC 6 proteiner. Mange ligaser kan også kalles syntaser eller synthetaser fordi de syntetiserer nye molekyler. Figur 3.2 viser en illustrasjon av fosfodiesterbindingen mellom DNA-molekylene.



**Figur 3.1:** Illustrasjon av bindingen mellom DNA-molekylene oppstår mellom 5'forsfat på en tråd og 3'hydroksylgruppe på det andre fragmentet ved limering.

Den mest brukte ligasen er en T4 ligase som er rensset fra T4 bakteriofag. Denne ligasen katalyserer dannelsen av fosfodiesterbindinger mellom både butte ender og overhengene ender. Den benytter ATP som en kofaktor for å kunne danne fosfodiesterbinding mellom DNA som skal ligeres. Det finnes også DNA ligaser som er rensset fra *E. coli*, men disse er sjelden brukt fordi de bruker  $\text{NAD}^+$  som kofaktor.

Her ble Rapid DNA Ligation Kit fra Roche benyttet. [65]

#### Protokoll:

- Sluttvolumet på ligeringsmixen skal være på 20  $\mu\text{l}$ .
- Bland vektor og innskudd i ønskelig forhold, ved å benytte formelen under.
- Bland røret med 5 x Dilutionbuffer godt, før det tilsettes 2  $\mu\text{l}$  i ligeringsmixen.
- Tilsett 10  $\mu\text{l}$  ligeringsbuffer
- Tilsett 1  $\mu\text{l}$  av T4 DNA ligase enzym
- Inkuber blandingen i 5-10 minutter.

Ligeringsmixen kan brukes direkte i transformasjon av kompetente celler, eller fryses uten varme inaktivering, ved  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  til  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Varmeinaktivering av T4 DNA ligase senker effektiviteten av og transformasjonen drastisk.

$$\frac{100 \text{ ng vektor} * \text{str. på}}{\text{Str. vektor i kb}} * \text{forhold} = \text{ant. gram innskudd}$$

Forhold er hvilken mengde Vektor/innskudd man ønsker, eks. 1:1, 1:2, 5:1.

### 3.3. Eukaryote celler

Schneider Drosophila Melanogaster Embryo celler SL-2.

Tatt fra 20 timer gamle embryoer.

De er enkle å dyrke og bidrar med et enkelt system. De har system med få kofaktorer for kjernereseptorer, men i en mindre skala enn mammalske celler.

I de fleste mammalske celletyper finnes det endogent hNCU-G1, og det er derfor vanskelig å måle den direkte effekten det har på hERβ fordi basalresponsen hadde vært vanskelig å kontrollere. SL-2-celler har hele systemet med alle transkripsjonsfaktorene og posttranslasjonelle modifikasjoner som mammalske celler har, men i langt mindre skala. Dette gjør at man kan utføre undersøkelser uten stor interferens fra cellenes eget apparat. Det er også enklere å stille cellene, fordi de kan spyles løse uten trypsinering og siden de ikke har HCO<sub>3</sub> i mediumet, og trenger derfor ikke CO<sub>2</sub> tilførsel i inkubatoren.

#### 3.3.1. Initiering av SL-2-celler.

- Ta opp cellerør fra nitrogentank som holder -196 °C. Tin røret på vannbad ved 30 °C.
- Vask utsiden av røret med 70 % etanol rett før cellene er tint.
- Overfør cellene til en 25 cm<sup>2</sup> flaske som inneholder 5 ml romtemperert fullstendig SL-2 medium.
- Inkuber cellene ved 28 °C i 30 min.
- Resuspender cellene og overfør dem til 15 ml rør, med nytt fullstendig SL-2 medium, sentrifuger ned ved 1000 x g i 3 min ved 4 °C.
- Fjern supernatant. Løs cellepelleten i 5 ml nytt fullstendig SL-2 medium.

- Inkuber cellene i celleskap ved 28 °C til de når en tetthet på  $6-10 \times 10^6$  celler/ml. Dette tar mellom 3-4 dager. La cellene gå opptil 6 passasjer (18-20) dager før de transfekteres, for å oppnå optimale forhold.

- 

### 3.3.1.1 Vekst og subkultivering.

SL-2-celler fester seg ikke fullstendig til underlaget i en celleskål eller flaske, så det trengs ingen kjemikaler eller trypsin for å løsne cellene fra underlaget. Det holder å spyle cellene ned med eget medium. Cellene blir tette etter 2-3 dager, og må da subkultiveres. Vanlig prosedyre er å subkultivere dem 1:15.

#### Prosedyre:

(foregår på sterilbenk på cellelab)

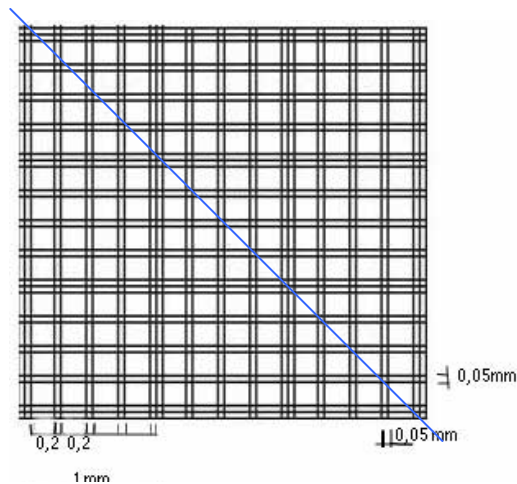
- Løsn cellene fra celleflasken ved å spyle dem ned med mediumet som de vokser i.
- Pipetter celsuspensjonen opp og ned noen ganger slik at celledøsningen blir homogen.
- Splitt løsningen med forhold på 1:15, dvs. 4,75 ml nytt SL-2 medium og 0,25 ml (1/20 del av cellemengde i forrige) celsuspensjon i ny flaske.
- Inkuber cellene ved 28 °C til de er tette. Dette tar vanligvis 2-3 dager, og man ser i lysmikroskop at cellene har dannet et tett teppe som dekker hele flasken før man splitter på nytt.



### 3.3.1.2. Telling av celler.

#### Prosedyre:

Ved celletelling resuspenderes cellene i mediumet, og man benytter en pasteurpipette for å ta ut noen dråper med celler. En dråpe appliseres på Bürker kammeret slik at dråpen trekkes inn under dekkglasset. Når man ser på Bürker kammeret i et lysmikroskop, vil man få frem et rutenett som vist under. Man teller antall celler på begge diagonalene.



**Figur 3.2:** Bürker kammer som benyttes til telling av celler. Ved å applisere en dråpe med celleekstrakt på tellekammeret med dekkglass, kan man observere rutenettet og cellene i lysmikroskop. Jeg talte celler som befant seg inni kvadratet i rutenettet. Til sammen 4 \* 3 ruter diagonalt, der jeg unnlot å telle celler som lå på linjen kvadratets overside og høyre side. Den blå linjen viser de 12 rutene som ble talt.

[http://www.mta-labor.info/front\\_content.php?idcat=25&idart=137](http://www.mta-labor.info/front_content.php?idcat=25&idart=137)

Formelen for å beregne celletettheten er:

$$\text{Celletetthet} = \frac{\text{Gjennomsnitt av diagonalene} \times 2,1}{100} = X * 10^6 \text{ celler/ml}$$

### 3.3.4. Transfeksjon

Det finnes to hovedtyper transfeksjoner. 1) Stabil transfeksjon, en metode hvor man inkorporerer ønsket DNA inn i cellens eget genom, og 2) Transient transfeksjon, en metode hvor man innfører ønskede DNA komponenter i plasmider og ser da enten hvordan de påvirker endogent protein/DNA, dvs. det cellen produserer selv, eller man kan transfektere inn alle komponentene man ønsker å se på, og se hvordan de påvirker hverandre. Den siste metoden kan bare benyttes i systemer der man er sikker på at cellene ikke produserer komponentene man ser på.

Cellene vil uttrykke det transfekterte DNA kontinuerlig hvis genet til det proteinet vi ønsker å undersøke sitter i en vektor med en konstitutiv promotor.

Høsting av cellene skjer ofte 1-3 dager etter transfeksjon slik at man ved ulike metoder kan undersøke hvordan det transfekterte DNA er translatert og hva slags funksjon det har.

#### Prosedyre:

- Så ut cellene i to 75 cm<sup>2</sup> (25 cm<sup>2</sup>) celleflasker.
- Tell cellene når de oppnår rett tetthet (etter 2-3 dager)
- Så ut SL-2-cellene på 6 brønnersplater i et antall på 400 000 celler/brønn. Det brukes 1,5 ml SL-2 medium pr brønn.
- Transfeker cellene etter 24 timer. Da vil cellene være festet tilstrekkelig til bunnen av brønnene, og være i stand til å ta inn DNA som blir tilsatt.

#### 3.3.4.1. Transfeksjon av SL-2-celler med FuGENE6 (Roche)

Transfeksjonsreagensen FuGENE6 er en blanding av lipider og andre komponenter løst i 80 % etanol. Det gir en høy transfeksjonseffektivitet, og viser lav cytotoxicitet på ulike celletyper [66].

Reagensen fungerer like bra med eller uten serum, og det er derfor ikke nødvendig med stripping av serum.

Den lave cytotoxiciteten til FuGENE6 er viktig fordi de fleste celler overlever og resultatene vil derfor reflektere de "sanne" forandringene i genekspressjon. Man trenger ikke ta hensyn til artifakter som man får pga toksisitet fra transfeksjonsreagentet. (Eks. celledød)

Før man starter transfeksjonsforsøkene, er det viktig å titrere seg frem til et celleantall man sår ut hvor transfeksjonseffektiviteten er best. I mitt tilfelle ble det  $0,5 \cdot 10^6$  celler/35 mm brønn.

Prosedyre:

- Så ut gunstig antall celler/35mm brønn, 24 timer før transfeksjon. Dette gir cellene tid til å feste seg til bunn.

Transfeksjonen gjennomføres etter følgende metode:

Ut i fra mengde FuGENE6 man bruker, bestemmes mengden serumfritt medium. TC100 (Schneider Drosophila Medium) (Ved bruk av 3 µl FuGENE6 i hver brønn brukes 97 µl TC100, ved bruk av 4 µl FuGENE6 i hver brønn benyttes 96 µl TC100) Tabell 3-4 viser generelt transfeksjonsoppsett.

- Ta ut 97 (96)µl T100(serumfritt medium)/brønn, og overfør til eppendorfrør. Sørg for at mediet er romtemperert før transfeksjon gjennomføres. (Dersom man jobber med duplikater eller triplikater, dobler man eller tredobler dette volumet i samme eppendorfrør.)
- 10 av de 97 (96)µl skal over i rør med DNA mix som skal transfekteres inn i cellene. (det er viktig at DNA mengden ikke overstiger 1 µg pr brønn, ref FuGENE6 protokoll) De 10 µl skal fortynne løsningen slik at alt DNA kommer med. Det er viktig å homogenisere DNA/TC100 blandingen.
- Tilsett 3 (4) µl romtemperert FuGENE6 i røret med 86 (87) µl TC100 medium. Det er viktig at FuGENE6 ikke kommer nær kantene på eppendorfrøret når man pipetterer. Reagensen skal ikke være i kontakt med plast.
- Overfør DNA løsningen til FuGENE6 løsningen. (det er viktig at DNA tilsettes FuGENE6 løsning og ikke omvendt for å få optimal binding av transfeksjonsreagensen)
- Bland godt, og la stå på benken i 20 min ved romtemperatur. Bland prøvene etter 10 min.
- Overfør DNA/FuGENE6/medium blandingen på cellene. Fordel dråper over hele brønnen, slik at det treffer alle cellene. Tabell 3-4 viser et eksempel på mengde plasmider jeg transfekterte cellene med

	1	2	3	4	5
pAc-hERβ	0ng	110 ng	0 ng	110ng	110ng
pAc-hNCU	0ng	0 ng	10 ng	10ng	20ng
pAc-lacZ	250ng	250ng	250ng	250ng	250ng
pCAT-hSRB1	350ng	350ng	350ng	350ng	350ng
pAc5.1/V5-His A	400ng	290ng	390ng	280ng	280ng
E2	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM

**Tabell 3-4.** Eksempel på mengde av hvert plasmid i de forskjellige prøvene.

### 3.3.4.2. Transfeksjon av SL-2-celler med Lipofectamine 2000

SL-2-cellene ble også forsøkt transfektert med Lipofectamine 2000 (Invitrogen). I motsetning til ved transfeksjon med FuGENE 6, skal cellene være 90-95 % konfluente ved transfeksjon[67].

- Så ut 500 000 celler i 6 brønnersplater, i 2 ml fullstendig medium.
- Cellene inkuberes til de er 90-95 % konfluente.
- Plasmidløsning med totalt 4 µg DNA fortynnes i 250 µl serumfritt medium.
- Bland godt, og inkuber i 5 minutter ved romtemperatur.
- Tilsett 10 µl Lipofectamine 2000 til 250 µl serumfritt medium.
- Bland Lipofectamine og DNA-blandingen, og inkuber 20 minutter ved romtemperatur.
- Tilsett løsningen til cellene og fordel godt ved å bevege platen frem og tilbake.
- Høst cellene etter 18-48 timer og undersøk ekspresjon av reporter-gen, i dette tilfellet med CAT-ELISA reporter-gen assay.

### 3.3.4.3. Høsting av celler

Cellene blir høstet og det benyttes forskjellige metoder som internkontroll på hvor effektiv transfeksjonen har vært.  $\beta$ -galaktosidase og X-galaktosidase er to av dem. CAT-ELISA er en reporter-genanalyse som brukes for å undersøke uttrykk av transfektert DNA i cellen.

- Resuspender cellene ved å spyle dem løs fra brønnene med en mikropipette.
- Overfør i celleeksrakt i 1,5 ml eppendorfrør
- Sentrifuger ned cellene ved 4500 rpm, i 3 min ved 4 °C.
- Fjern supernatant/medium (viktig at alt blir fjernet.) og lyser cellene i 1x lyseringsbuffer, 300 µl pr brønn. Vortex prøvene for å løse pelleten.
- La lyseringen av cellene skje på is i 20 min.
- Sentrifuger ved 6000 rpm i 2 minutter, 4 °C
- Sett prøvene direkte på is, dette er viktig fordi CAT enzymet lett degraderer ved for høye temperaturer.

Celleekstraktet benyttes nå til CAT-ELISA.

#### 3.3.4.4 Nedfrysing av SL-2-celler.

Cellene fryses ned i et eget frysemedium som inneholder 10 % DMSO (dimetyl sulfoxid). DMSO tilsettes for å beskytte cellene under nedfrysning. Ved lave temperaturer vil væsken i cellene danne iskrystaller som ødelegger organeller. DMSO beskytter cellene slik at cellene ikke skal sprekke når de fryses ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  og flytende nitrogen ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) Frysemedium består av 45 % ”gammelt” (kondisjonert) fullstendig medium, 45 % ”nytt” medium og en sluttkonsentrasjon av DMSO på 10 %

#### Protokoll:

- Gro cellene til en tetthet på mellom  $4,0\text{-}5,0 \times 10^6$  i en  $25\text{ cm}^2$  flaske.
- Bestem eksakt mengde celler/ml ved å telle dem i Bürker kammeret. (se side 13.)
- Pipetter forsiktig av det kondisjonerte mediet, og sentrifuger ned for å fjerne løse celler.
- Resuspender cellene i det kondisjonerte mediet i et volum som gir en tetthet på  $1,1 \times 10^7$  celler/ml i frysemediet.
- Løs 10 % DMSO i nytt medium, og bland godt ved å pipettere løsningen.
- Tilsett dette til cellesuspensjonen med kondisjonert medium.
- Alikvoter ut cellesuspensjonen i 1 ml pr cryo rør.

Oppbevar cellene ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 24 timer før de overføres til nitrogentanken. Dette gjøres for at cellene skal få en langsom fryseprosess. Optimal rekonvalesens av SL-2-cellene krever at det er vekstfaktorer i mediet. Derfor er det viktig at det benyttes kondisjonert medium i frysemediet.

#### 3.3.4.5 $\beta$ - galaktosidase som internkontroll

For å kunne sammenligne og trekke slutninger av reporter-genassay, er det nødvendig med en internkontroll i systemet som kan fortelle hvor stor variasjon der er i transfeksjonseffektiviteten mellom prøvene.

Ved alle transfeksjonsforsøk som er relatert til protein- DNA interaksjoner i denne oppgaven, blir  $\beta$ -galaktosidase brukt som internkontroll. LacZ genet sitter i pAC 5.1/V5 His vektor. Vektoren er spesielt konstruert for transfeksjon av insektceller, og benyttes her i SL-2-celler. pAC.5.1/V5-His har en actin promotor som er konstitutiv.

Reaksjon:

LacZ genet koder for  $\beta$ -galaktosidase ( $\beta$ -gal)

$\beta$ -galaktosidase driver reaksjonen;

Laktose  $\longrightarrow$  galaktose + glukose

ONPG (o-nitrofenyl- $\beta$ -galaktopyranosid)  $\longrightarrow$  galaktosidase + o-nitrofenol

ONPG er substrat for  $\beta$ -galaktosidase. o-nitrofenol gir gul farge og intensiteten kan måles i en mikroplateleser ved  $A_{420\text{nm}}$ .

Prosedyre:

Forsøket utføres i en mikroplate. Etter høsting av transfekterte celler (ref side) tilsetter man henholdsvis;

- Ta ut 5-50  $\mu\text{l}$  celleekstrakt (avhengig av hvor lenge man skal inkubere, og hvor stor mengde pAc 5.1/V5 His-LacZ som er tilsatt.)
- Tilsett 150  $\mu\text{l}$  Z-buffer med 40 mM  $\beta$ -merkaptoetanol.
- Tilsett 50  $\mu\text{l}$  ONPG (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) enten i  $\text{dH}_2\text{O}$  eller 100 mM fosfatbuffer pH 7

Mikroplaten inkuberes i varmeskap ved 30 °C i fra 15 min inntil 1 time. ( til prøvene får en tydelig gul farge.) Reaksjonen stoppes ved å tilsette 100  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Intensiteten av gulfargen til o-nitrofenol måles så i mikroplateleser ved  $A_{420\text{nm}}$ .

Formel for å beregne antall  $\beta$ -gal enheter per minutt per ml;

$$X = \frac{A_{420\text{nm}}/0,0045}{\text{Reaksjonstid (min)} * \text{Volum celleekstrakt}}$$

### 3.3.4.6. Kvalitative analyser av $\beta$ -galaktosidaseaktivitet med X-gal metoden

Ved bruk av X-gal farging kan man få et inntrykk ikke bare av hvor stor  $\beta$ -galaktosidase aktiviteten er, som i 3.4.1, men også et inntrykk av hvor mange celler som sørger for denne aktiviteten, ved å uttrykke LacZ-genet.

Cellene blir sådd ut og transfektert etter prosedyre i kapittel 3.x.

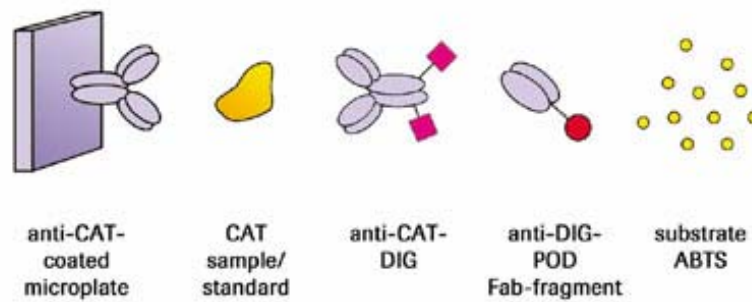
Prosedyre:

- Løsne cellene fra celleskålene/brønnene, og overfør cellesuspensjonen til 10 ml rør med rund bunn. Pelleter dem ved sentrifugering ved 1000 rpm i 3 min ved 4°C.
- Fjern mediet
- Resuspender cellen, og fikser dem ved å tilsette 2 ml glutaraldehyd-løsning.
- Overfør cellesuspensjonen tilbake til cellebrønnene, og la dem inkubere i 15 min i romtemperatur.
- Fjern glutaraldehyd-løsningen og vask cellene med 1x PBS to ganger. Mellom vaskestegene pelletteres cellene ved sentrifugering ved 1000 rpm i 3 min ved 4°C.
- Fjern så all PBS fra cellene.
- Resuspender cellene ved tilsetning av 1 ml X-gal løsning til hver av rørene.
- Overfør cellene tilbake i brønnene og innkuber dem ved 28 °C i 4 timer.

### 3.4. CAT-ELISA reporteragenassay

CAT-ELISA reporteragenassay er en metode som gir kvantitative målinger av CAT (Chloramfenicol acetyltransferase) ekspresjon. Cellene blir transfektert med plasmid DNA som bærer et reporteragen som koder for CAT. Assayet er basert på ”sandwich” ELISA prinsippet, hvor antistoffet til CAT, anti-CAT, er bundet til mikroplatebrønnene. Cellene lyses og celleekstraktet som inneholder CAT enzym appliseres i mikrotitrerplatebrønnene. CAT i celleekstraktet vil nå binde seg til anti-CAT i mikrotitrerplatebrønnene.

Det polyklonale antistoffet til CAT-Digoxigenin (anti-DIG-POD) blir tilsatt, og binder CAT. Ved tilsetning av antistoff mot digoxigenin, vil det føre til at digoxigenin konjugerer til peroksidase. Når man da tilsetter peroksidase substratet ABTS, vil peroksidaseenzymet katalysere spaltingen av substratet som fører til en farge reaksjon. Absorbansen måles i mikroplateleser ved  $A_{405\text{nm}} - A_{492\text{nm}}$ . Figur 3.x viser en skisse over reaksjonen.



**Figur 3.2.** En enkel skisse over reaksjonen i CAT assayet. Mikroplatebrønnene er dekket med antistoff som binder til CAT proteinet i cellelysate. Etter vask og inkubasjon i 37°C i 2 timer tilsettes anti-CAT-DIG som binder det primære antistoffet på mikroplatene. Etter neste inkubasjon tilsettes anti-DIG-POD med en peroxidase koblet til seg. Denne binder til anti-CAT-DIG, og når ABTS substratet tilsettes i siste trinn, vil peroxidasen spalte dette til et produkt som er grønt, og man kan måle absorbansen ved  $A_{405\text{nm}} - A_{492\text{nm}}$ .

### Standardkurve for CAT enzym

CAT enzymet er frysetørket, og må løses i 500  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O. Det fordeles i 40  $\mu\text{l}$  alikvoter. Det er viktig at standard CAT- enzym fortynningen er nylaget, og at standardløsningen ikke tines for mange ganger.

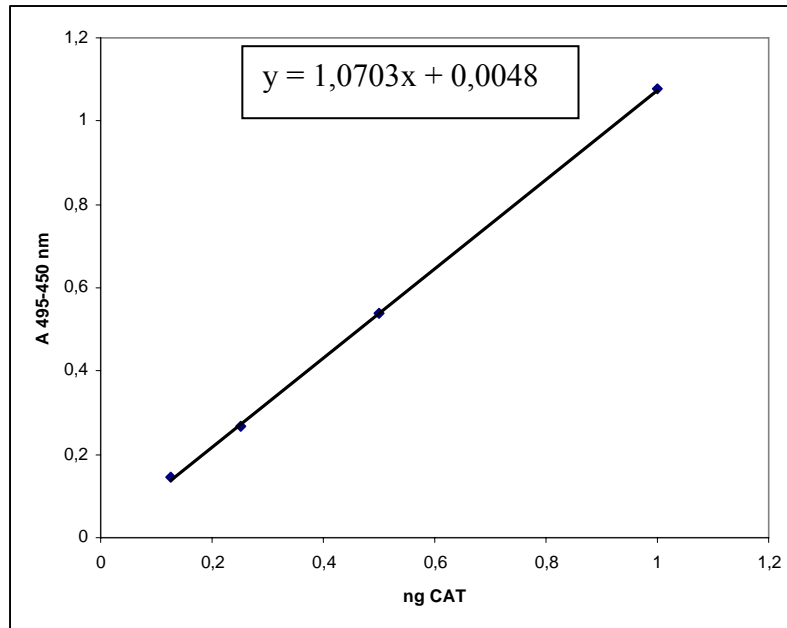
- Ta ut en alikvot på 40  $\mu\text{l}$  av CAT enzymets standardløsning (**løsning 1**) og overfør det til 3,96 ml Sample buffer (**løsning 7**) Sluttkonsentrasjonen på CAT- enzym blir på 1 ng/ml.
- Ta ut 1,0 ml av den fortynnete CAT-enzym løsningen, med konsentrasjon på 1 ng/ml, og overfør til et nytt eppendorfrør.
- Ta ut 500  $\mu\text{l}$  fra løsningen over og overfør til et nytt eppendorfrør som inneholder 500  $\mu\text{l}$  løsning 7 (sample buffer), konsentrasjonen til den nye prøven vil være på 0,5 ng/ml.
- Fortsett fortynningsrekken som vist i tabell.
- Løsning 7 (sample buffer) brukes som nullprøve.

Prøve nr.	ng CAT/ml	CAT- enzym- fortynningen i $\mu\text{l}$	Tilsetting av løsning 7 (sample buffer) i $\mu\text{l}$
0	0	0 $\mu\text{l}$	1000 $\mu\text{l}$
1	1,0	1000 $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{l}$
2	0,5	500 $\mu\text{l}$ fra steg 1	500 $\mu\text{l}$
3	0,25	500 $\mu\text{l}$ fra steg 2	500 $\mu\text{l}$
4	0,125	500 $\mu\text{l}$ fra steg 3	500 $\mu\text{l}$

**Tabell 3-5** standard kurve til CAT reportergenassay

- Lag duplikat av fortynningsrekken. Standardkurve plottes.





**Figur 3.3.** Et eksempel på CAT standard kurve, målt etter 15 minutter etter tilsatt ABTS substrat ved  $A_{405\text{nm}}$ - $A_{495\text{nm}}$ . Den er plottet i Excel regneark, hvor y viser likning for regresjonslinjen  $y = ax + b$ .

### 3.4.1 Utføring av CAT-ELISA reporterengenassay. (Roche)

#### Prosedyre:

Ta ut 200  $\mu\text{l}$  celleekstrakt/standard fra hver av prøvene som ønskes analysert, og overfør til 96-brønnersplaten.

- Inkuber prøvene i varmeskap i 2 timer ved 37 °C.
- Vask hver av brønnene med 250  $\mu\text{l}$  1x vaskebuffer, i 30 sekunder, 5 ganger.
- Tilsett så 200  $\mu\text{l}$  av **løsning 2a**), som inneholder anti-CAT-DIG, til hver av brønnene.
- Inkuber platen i 1 time ved 37 °C
- Vask hver av brønnene med 250  $\mu\text{l}$  1x vaskebuffer, i 30 sekunder, 5 ganger.
- Tilsett så 200  $\mu\text{l}$  **løsning 3a**), som inneholder anti-DIG-POD, til hver av brønnene
- Inkuber platen i 1 time ved 37 °C
- Vask hver av brønnene med 250  $\mu\text{l}$  1x vaskebuffer, i 30 sekunder, 5 ganger.
- Tilsett til slutt 200  $\mu\text{l}$  ABTS<sup>®</sup> substrat, **løsning 4**, til hver av brønnene. Det vil nå oppstå en fargereaksjon, på bakgrunn av binding til mengde CAT i prøven hvor den observerte grønnfargen (ABTS) måles på en mikroplateleser ved absorbansen ( $A_{405\text{nm}} - A_{492\text{nm}}$ )

### 3.4.2. Utregning av CAT ekspresjonsverdier

Formel for utregning av CAT ekspresjon er

$$\frac{(A_{\text{CAT}}-b)/a * (\text{totalvolum} / \text{anvendt volum til CAT}) * \text{Tid}}{A_{\beta\text{-gal}} * (\text{totalvolum} / \text{anvendt volum til } \beta\text{-gal}) * \text{Tid}} * 1000 = \text{pg CAT} / \text{OD } \beta\text{-gal}$$

**a** : Verdi **a** fra standardkurveformel ( $y = ax + b$ ) ved gitt tid

**b** : Verdi **b** fra standardkurveformel ( $y = ax + b$ ) ved gitt tid.

$A_{\text{CAT}}$  : Absorbansen av CAT ved  $A_{405\text{nm}} - A_{492\text{nm}}$

$A_{\beta\text{-gal}}$  : Absorbansen av  $\beta$ -gal ved  $A_{420\text{ nm}}$

Tid: inkuberingstid før OD måling. (enten 15 min, 30 min, 45 min eller 60 min)

1000: omregning fra ng til pg

Totalvolum: Volum på lysat pr prøve (300  $\mu\text{l}$ )

Totalvolum = antall  $\mu\text{l}$  cellelysat fra hver brønn, mens anvendt er antall  $\mu\text{l}$  av cellelysatet brukt til CAT ELISA assay. (Det samme gjelder for  $\beta$ -gal volumene.)

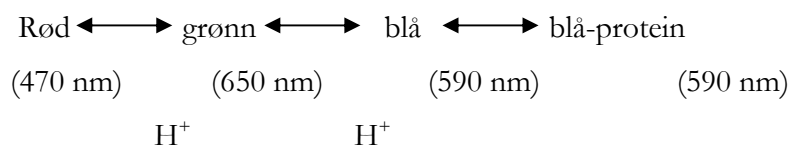
Anvendt volum: volum som appliseres pr brønn. (200  $\mu\text{l}$  til CAT, og 25  $\mu\text{l}$  til  $\beta$ -gal.)

Standardavviket er utregnet med formel:

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

### 3.5. Proteinmålinger ved Bradford-metoden.

Bradford proteinassay benyttes for å bestemme totalmengde protein i en prøve. Metoden baserer seg på den proporsjonelle bindingen av fargen coomassie til proteiner. Under sure forhold er fargen mest stabil som en dobbeltprotonert form. Etter binding til protein er den derimot mer stabil som en uprotonert blå form, som absorberer ved 590nm [68].



#### Prosedyre

- Lag to blindprøver av 500 µl, ved å blande 400µl dH<sub>2</sub>O med 100µl Bradford proteinassay løsning. Lag en standardkurve ved å bruke 400µl av BSA-fortynninger, 1,5,10,15 og 20µg/ml, og tilsett så 100µl bradfordreagens. Lag to paralleller av hver prøve.
- Lag fortynninger av prøvene som skal måles på 1:50, 1:100, 1:200 og 1:400 hvor totalvolumet er 400µl, og tilsett så 100µl Bradford proteinassay-løsning.lag to paralleller av hver prøve.
- Tilsett reagensen først til blindprøvene, så til standardprøvene, og deretter til proteinprøvene. Vortex umiddelbart i 2-5 sekunder. Det er gunstig å tilsette Bradfordløsningen med 30 sek mellomrom mellom prøvene, slik at alle får stått like lenge før måling i spektrofotometer.
- Inkuber prøvene i 10-40 minutter ved romtemperatur.
- Mål absorbansen ved 595nm i samme rekkefølge som Bradford løsningen ble tilsatt. Beregn proteinmengde i prøvene ut fra standardkurven.

#### 3.5.1. SDS-PAGE-gel

SDS (sodium didecyl sulfat) binder de hydrofobe delene av proteinet slik at det denaturerer til en utfoldet konformasjon og blir stabilt i løsning. Proteinets lengde blir da proporsjonal med dets molekylvekt. Når det appliseres på SDS-gel og blir utsatt for et elektrisk felt, blir proteinene først samlet i stacking-gel og deretter separert etter størrelse i den separerende gelen. Små proteiner vandrer lengst i gelen.

Man kan ha to tykkelser på gel: 0,75 mm og 1,5 mm

I 0,75 mm gel appliseres 25µl prøve → 25 µg protein pr brønn

I 1,5 mm gel appliseres 50µl prøve → 70 µg protein pr brønn

Det er best å benytte den tykkeste gelen hvis man skal kjøre Western Blott på proteinene.

#### Prosedyre:

- Vask platene godt med dH<sub>2</sub>O og 96 % EtOH, og tørk dem.
- Velg spacere ut i fra hvilken tykkelse du ønsker på gel
- Lag først den 10 % separerende gelen, og deretter den 4 % konsentrerende gelen.
- Fyll opp 4,5 cm av platene med den separerende gelen med pasteurpipette.
- Etterfyll med litt dH<sub>2</sub>O, for å sørge for fullstendig polymerisering (Blandingen polymeriserer ikke i nærvær av O<sub>2</sub>.)
- La gelen polymerisere i 30 min.
- Hell av vannet, og fjern restene med Whatman paper.
- Tilsett den konsentrerende gelen og plasser kammen forsiktig for å unngå luftbobler.
- La gelen polymerisere i 30 min.
- Sett gelen i elektroforesestativet, overfør det til kammeret som fylles med 1 x SDS running-buffer.

#### Prosedyre for protein applisering

- Tilsett ønsket mengde av 1x, 2x eller 3x SDS loadingbuffer til proteinløsningen.
- Stikk hull i lokket på eppendorfrøret med en kanyle, og kok prøven på varmeblokk i 3 min ved 100°C.
- Sentrifuger ned ved 10000 rpm i 1min
- Appliser 30-40µl på en 10 % SDS-PAGE gel.
- Gelen kjøres på 80-90 V til prøvene har vært igjennom den konsentrerende gelen, og deretter på 100 V til blåfargen har forlatt gelen.
- Farg gelen med Coomassie blue og se etter bånd
- Legg gelen i avfargingsløsning til bakgrunnsfargen har avtatt.

### 3.6. GST-Pulldown

Gluthatione-S-Transferase fusjonsproteiner har fått et bredt bruksporåde etter at det ble introdusert som verktøy for produksjon for rekombinante proteiner i bakterier.

Metoden benyttes til å undersøke interaksjon mellom probeprotein og dets interaksjonspartnere. Probeproteinet er GST-fusjon klonet inn i en IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) induserbar ekspresjonsvektor. De transformerte bakteriene produserer GST-fusjonsprotein i stor skala etter induksjon med IPTG. Det resulterende fusjonsproteinet har stor affinitet for fri, redusert glutathion, og kan dermed renses ved bruk av glutathione-agarose kuler, og elueres ved bruk av redusert glutathion.

#### 3.6.1. Produksjon av GST-fusjonsprotein.

- Transformer de BL-21(DE3) E. coli bakterier fra Novaen® med det aktuelle konstrukt, samt en kontroll (kun pGEX)
- Stryk ut på LB-Amp skåler og inkuber over natt på 37 °C.
- Plukk ønsket antall kolonier til videre vekst og induksjon.
- Gro opp i 2 ml LB-amp over natt. Sentrifuger ned 1 ml og frys ved -20 °C til SDS-PAGE analyse
- Overfør 50µl av overnatt kulturen til nye 5ml LB-amp, og la gro til mid-log fase, dvs. OD<sub>550nm</sub> 0,5-1,0. (jeg induserte ved OD<sub>550nm</sub> 0,6). Ta ut 1 ml til SDS-PAGE analyse
- Induser kulturen med 0,1-1,0mM IPTG. (jeg brukte 1,0 mM). Promotoren i pGEX er IPTG induserbar, og BL-21 bakteriecellene begynner å produsere GST-fusjonsproteinet etter induksjon.
- Inkuber ved 22-37°C i 1-5 timer med resting. (jeg inkuberte ved 37 °C i 3 timer)
- Sentrifuger ned ved 10000rpm, og fjern alt LB-amp.

#### 3.6.2. Analyse på SDS-PAGE-gel.

For å undersøke hvilken av klonene som produserer mest av fusjonsproteinet, kan man nå analysere prøvene på en SDS-PAGE gel.

- Tilsett 100 µl 1 x SDS loading buffer til bakteriepelleten.
- Kok prøven på varmeblokk i 3 min
- Sentrifuger ned ved full hastighet i 1 min
- Appliser 30-40 µl på 10 % SDS-gel.

Etter å ha kjørt gelen må den farges med Coomassie Blue, for å detektere båndet på størrelse med det induerte proteinet.

Når man så har funnet den ideelle inkuberingstid og temperatur, samt den beste klonen, kan denne gros opp i større skala for storproduksjon av fusjonsprotein.

#### Prosedyre for storproduksjon av fusjonsprotein

- Overfør litt av bakteriepelletten til 50ml LB-amp.
- Inkuber over natt ved 37°C med risting.
- Overfør 5ml til en 2 l kolbe med 400ml LB-amp.
- Inkuber ved 37°C til mid-log.
- Induser med ideell konsentrasjon av IPTG, (1 mM i mitt tilfelle, og inkuber ved valgt temperatur og tid.)
- Høst cellene ved å sentrifugere ned kulturen ved 10000 rpm i 3min ved 4°C.
- Pelletten kan oppbevares ved -80°C.

#### **3.6.3. Rensing av fusjonsprotein:**

- Pelletten resuspenderes i 4ml 1xPBS pr 100ml kultur.
- Tilsett lysozym til 1mg/ml, og lyser på is i 30min.
- Tilsett så Triton X-100 til 1 %, rist/bland godt.
- Tilsett proteasehemmer til 1x
- Tilsett DNase til en sluttkonsentrasjon på 5µg/ml, og fortsett inkuberingen ved 4 °C i 10 minutter med forsiktig risting.
- Sentrifuger ved 5000 rpm i 30 min ved 4°C
- Overfør supernatanten til et nytt rør og tilsett Dihiotheirol DTT til en sluttkonsentrasjon på 1mM.
- Tilsett Glyserol til 10 %
- Oppbevar ved -80°C

### 3.6.3.1. Vask av Sepharosekuler

Kulene oppbevares i en 20 % etanol-løsning, og må vaskes nøye før bruk.

Bedvolumet i kolonnen skal alltid være 1/100 av totalvolum lysat, og mengden slurry som skal benyttes er 2x bedvolumet. I mitt tilfelle var det 16 ml lysat, og det tilsvarer et bedvolum på 160  $\mu$ l, og totalt volum 50 % slurry blir da 320  $\mu$ l.

- Ta ut nødvendig volum av løsningen, og sentrifuger ned ved 3000 rpm. Fjern supernatanten forsiktig.
- Tilsett 1 x PBS til 2 ml.
- Sedimenter ved å sentrifugere ved 3000 rpm i 3 min ved 4 °C, fjern supernatant forsiktig.
- Gjenta 2 ganger.
- Resuspender pelletten til 50 % slurry i NETN-buffer.

### 3.6.3.2 Videre rensing av fusjonsprotein.

- Tilsett så ønsket mengde 50 % slurry til supernatanten.
- Inkuber i 30 min ved romtemperatur med vugging.
- Overfør til affinitetskolonnen, og la renne igjennom.
- Vask kolonnen med 10x bedvolumet (dvs 160\* 10, i dett tilfellet er det på 1,6 ml) 1x PBS, og gjenta 2 ganger til totalt 3 vask.
- Tilsett 1x bedvolumet elueringsbuffer, steng søylens utløp og la stå i romtemperatur i 10 minutter. Åpne kolonnen og la renne gjennom. Gjenta til en total av 3 elueringer.
- Tilsett proteasehemmer til 1x.
- Oppbevar eluatene ved -80 °C

Analyser den trinnvise vask og eluering på SDS-gel. Der ser man hvor rent det siste eluatet er i forhold til fraksjonen man startet med i affinitetskolonnen.

### 3.7 Klargjøring av glutathion-sepharose-kuler med bindingsbuffer (NETN-buffer)

- Ta ut et volum glutathion-sepharose kuler som tilsvarer 50  $\mu$ l 50 % slurry per prøve.
- Tilsett 1 x PBS til 1 ml
- Sentrifuger ved 3000 rpm i 3 min, kast supernatanten
- Resuspender glutathion-sepharose kulene i 1 ml NETN buffer (bindingsbuffer).
- Sentrifuger ved 3000 rpm i 3 min, kast supernatanten
- Resuspender til 50 % slurry av sepharose kuler i NETN-buffer.

#### 3.7.1 Rensing av fusjonsprotein med glutathion-sepharose-kuler (fra *E.coli* lysat)

##### Prosedyre for preparering av bakterielysat med fusjonsprotein

- Tilsett 50  $\mu$ l med 50% slurry, (sepharose kuler og NETN-buffer), bland med 50  $\mu$ l *E. coli* lysat, proteasehemmer til 1x og NETN-buffer til et totalvolum på 300  $\mu$ l
- Inkuber i 1,5 timer ved 4°C i roterende hjul.
- Sentrifuger ned ved 3000 x g. Vask 3 ganger med 600  $\mu$ l NETN buffer.
- Løs pellet i 50  $\mu$ l NETN-buffer.
- Fortsett med prosedyren for GST-Pulldown fra punkt 2. (under)

##### Prosedyre GST-pulldown

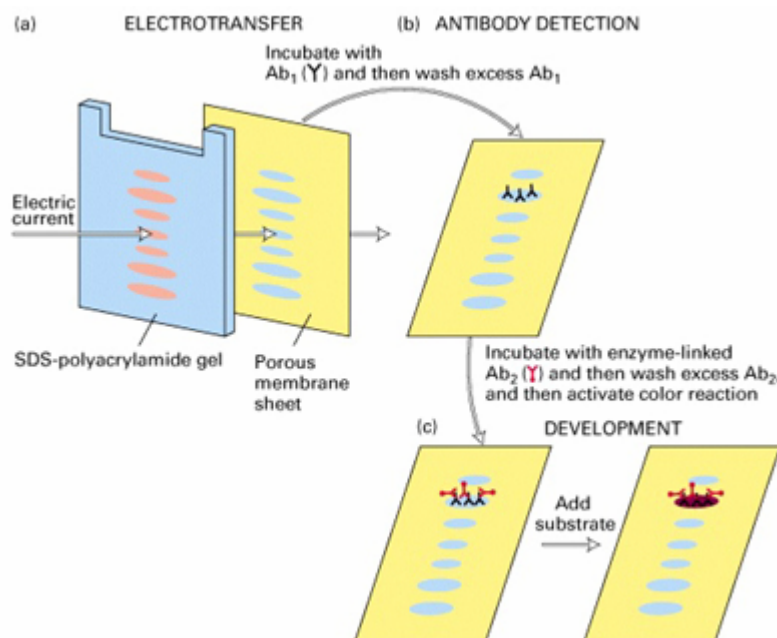
- Ta ut ønsket volum av fusjonsproteinet (avhengig av proteinmåling) slik at 10  $\mu$ g fusjonsprotein benyttes i pulldown prosedyren.
- Tilsett i ønsket volum av cellelysat med interaksjonsprotein. I mitt tilfelle JEG3 helcellelysat med endogent hNCU-G1.
- Tilsett 50  $\mu$ l 50 % slurry.
- Tilsett proteasehemmer til 1x og NETN-buffer til et totalvolum på 300  $\mu$ l
- Inkuber i 2 timer ved 4 °C i roterende hjul.
- Sentrifuger ved 3000xg ved 4°C i 3 min, vask med 600  $\mu$ l NETN-buffer, gjør dette 2 ganger.
- Gjenta trinnet over, men siste gang ved 5000 x g i 5 min.
- Fjern forsiktig all supernatant, slik at det kun er 25  $\mu$ l sepharose kuler igjen i røret.
- Tilsett 50  $\mu$ l 2 x SDS loadingbuffer, og resuspender pelleten.



- Kok prøven i 5 min på 95°C, husk å stikke hull i lokket på røret.
- Sentrifuger ned ved max hastighet i 1 min
- Prøven kan nå appliseres på 10 % SDS-PAGE gel.

### 3.8. Western

Western blotting er en teknikk der man overfører de separerte proteinene til membran etter SDS-PAGE. Etter overføring kan spesifikke proteiner merkes med antistoffer og detekteres ved bruk av sekundært antistoff.



**Figur 3.5.** En oversikt over Western Blot analyse [69].

Etter transfeksjon av JEG3 celler med NCU-G1, brukes dette lysatet til GST-pulldown med fusjonsproteinet GST-hER $\beta$ -LBD. Interaksjonen mellom NCU-G1 og GST-ER $\beta$  skal analyseres ved Western blotting.

- Tilsett 50  $\mu$ l 2 x SDS loadingbuffer til proteinprøven som er sentrifugert ned, og resuspender pelleten.
- Kok prøven i 5 min på 95°C, husk å stikke hull i lokket på røret.
- Sentrifuger ned ved max hastighet i 1 min
- Prøven kan nå appliseres på 10 % SDS-PAGE gel.

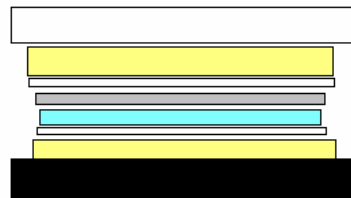
Etter å ha kjørt proteinprøvene på 10 % SDS-PAGE gel, skal gelen frigjøres fra glassplatene og plasseres i kald transferbuffer i 30 min for å trekke ioner ut av gelen.

- Fukt 2 fiberputer og 2 Whatman papir per gel i transferbuffer. PVDF membranen fuktes først med sprit og deretter legges den i transferbuffer.
- Vask elektroforesekammeret, plasser en liten røremagnet i bunnen.
- Plasser blottepakkeholderen og legg kjøleelement ned i kammeret og fyll opp kald transferbuffer. Dersom man ikke bruker kjøleelement, må blottingen foregå på kjølerom.
- Gjør i stand blottepakken, dette må gjøres i et kar med kald transfer buffer. Fiberputene på bankes frie for luft før pakkingen. Dette gjøres med et plastrør mens fiberputene ligger i transferbuffer.
- Overfør raskt til blottekammeret.
- Sett blottekammeret på en magnetrører til svak røring og la elektroblottingen gå ved 20 V over natt.

**Figur 3.4**

Blottepakken pakkes i følgende rekkefølge, fra bunn til topp:

1. svart del av blottekassett
2. fiberpute
3. 2 x Watman-paper
4. Protein gel
5. Membran
6. 2 x Watman-paper
7. Fiberpute
8. Blank del av blottekassett



### 3.8.1. Filterbehandling:

#### Blokkering

Før membranen utsettes for primært antistoff, blokkeres de frie bindingssetene med et protein som ikke reagerer med antistoffene som skal bindes. Dette trinnet kalles ”blokking” av uspesifikk binding.

Overfør filteret til et kar med 5 % tørrmelk i 1 x PBS med 0,1 % Tween 20 (blokkingbuffer) med proteinsiden opp. Husk å klippe av hjørnet øverst til venstre, for å vite rekkefølgen. La stå på middels vugging i 1 time.

Gelen farges etter vanlig protokoll med Coomassie-Blue, for å se om overføringen til filteret har vært fullstendig.

### 3.8.1.1. Primært antistoff.

Etter vellykket overføring til membranen, er det kvaliteten på antistoffet som avgjør hvor godt sluttresultatet blir. Monoklonale antistoff inneholder kun en klon av antistoff som er rettet mot en enkel epitop. Polyklonale antistoff inneholder flere antistoff-kloner og er derfor affinitet for flere epitoper på mål proteinet. Monoklonale antistoffer er mer spesifikke enn polyklonale antistoffer.

#### Protokoll:

- Hell blokkebufferen av membranen, og tilsett ny blokkebuffer med ønsket primært antistoff. Anbefalt forhold til Kanin-anti-NCU-G1 er 1:1000.
- La stå i 2 timer med vugging ved romtemperatur.
- Hell av løsningen og skyll membranen et par ganger med 1 x PBS med 0,1 % Tween.
- Vask membranen med 1 x PBS med 0,1 % Tween i 3 x 5 min, og 3 x 15 min i et eget kar med kraftig vugging.
- Overfør membranen tilbake til det opprinnelige karet.
- Tilsett så sekundært antistoff i ønsket forhold til blockingbuffer. Anbefalt forhold til goat-anti-rabbit antistoff er 1:3000.
- La stå i 2 timer med svak vugging ved romtemperatur
- Hell av løsningen og skyll membranen et par ganger med 1 x PBS med 0,1 % Tween.
- Vask membranen med 1 x PBS med 0,1 % Tween i 3 x 5 min, og 3 x 15 min i et eget kar med kraftig vugging.
- La deretter filteret vugge i 15 min i ren 1x PBS for å fjerne alle detergenter.

Ved dette trinnet kan man å stoppe prosedyren og til å vente til neste dag. Membranen kan ligge i 1 x PBS ved 4 °C over natt før visualisering. Da kan man i større grad sikre at alle detergenter er fjernet fra membranen.

### 3.8.1.2 Visualisering:

Vi bruker både kjemiluminescens og diaminobenzedin for å påvise proteinene.

Kjemiluminescens er en mer sensitiv og holdbar. Det sekundære antistoffet er konjugert med en peroksidase fra pepperrot. I nærvær av hydrogenperoksid  $H_2O_2$  vil peroksidasen oksidere substratet luminol. Det oksiderte produktet vil emittere lys, og derfor sverte en fotofilm.

Luminiscens:

Luminiscense kit fra Pierce. Arbeidet utføres på mørkerom under rødt lys.

**Protokoll:**

Sørg for at membranen får plass i karet som skal brukes til denne prosedyren og at det er skylt gjentatte ganger med dH<sub>2</sub>O slik at det ikke finnes detergenter fra såpe der.

Flaskene fra Pierce inneholder hhv. ”Stable peroxidase solution” og ”Luminol/ Enhancer solution”. (Det er meget viktig å ikke bruke samme pipettespiss i de to flaskene)

- Ta ut 2 ml av hver av de romtempererte flaskene i et lite kar.
- Legg membranen i karet med proteinsiden opp og la løsningen dekke den ved å holde karet i bevegelse. Man vil etter kort tid se bånd som lyser på membranen.
- Legg så membranen med proteinsiden ned på et stykke plastfolie, og plasser en svampkloss oppå membranen.
- Pakk plasten rundt, slik at svampen tørker membranen. Røntgen filmen tåler ikke fuktighet.
- Press svampen med membranen forsiktig på røntgenfilmen. Ta flere avtrykk der man holder membranen mot filmen med ulike tidsintervaller. (Fra 2 sek til 15 sek anbefales, da øker sjansene for å få en vellykket fremkalling.)
- Legg så membranen tilbake i 1 x PBS for å stoppe reaksjonen. Substratet løsner da fra peroksidasen, og membranen kan visualiseres på nytt med luminiscens eller diaminobenzedin.

**3.8.1.4. Diaminobenzedin**

Ved visualisering med diaminobenzedin får man raskt resultater direkte på membranen, men de er ikke holdbare fordi de grållilla båndene blekner og forsvinner med tiden.

Membranen kan ikke visualiseres på nytt etter bruk av diaminobenzedin, så denne metoden utføres derfor etter luminiscens metoden hvis man skal benytte begge to.

**Protokoll:**

- Bland følgende:

46 ml dH <sub>2</sub> O
2,5 ml 1 M NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
0,5 ml 3 % NiCl <sub>2</sub>
1,0 ml 2,5 % diaminobenzedin

- Umiddelbart før bruk tilsettes 0,5 ml 2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for å katalysere reaksjonen
- Hell blandingen i et lite kar og legg membranen opp i det med proteinsiden opp
- Vugg karet forsiktig til du ser tydelige grålige bånd.
- Stopp reaksjonen i 1 x PBS.
- La membranen lufttørke

## 4. Resultater

Resultatene er basert på ulike forsøk som er utført i denne oppgaven, der metoder fra kapittel 3 er benyttet. Det deles inn i følgende emner:

- Plasmidkonstruksjon
- Titrering av celleantall til transfeksjon
- Vurdering av transfeksjonsreagenser, Lipofectamine 2000 vs FuGENE 6
- Forsøk med NCU-G1 som koaktivator for ER $\beta$
- Forsøk med hSRC-1 som koaktivator for ER $\beta$
- Kartlegging av vekstraten til SL-2-cellene
- Sammenligning av transfeksjonseffektivitet, gamle vs. nye celler.

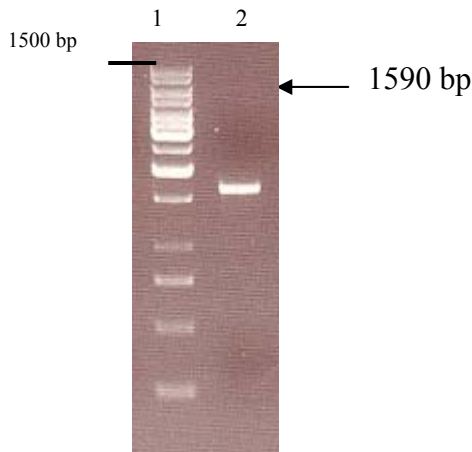
### 4.1. Plasmidkonstruksjon

#### 4.1.1 Plasmidkonstruksjon av pAc-hER $\beta$

Før det planlagte arbeidet med transfeksjon og reporter-genassay startet, var det viktig at alle plasmider som skulle brukes var egnet til SL-2-cellene.

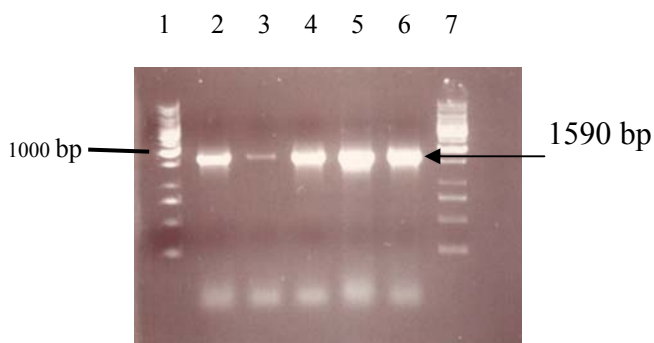
hER $\beta$  cDNA satt i pSG5 vektoren, en eukaryot ekspresjonsvektor, med SV40 promotor som ikke fungerer i SL-2-celler. Det var derfor nødvendig å klonere hER $\beta$  cDNA inn i en pAc5.1/V5-His A som har en sterk konstitutiv promotor fra *Drosophila* aktin 5C gen. pSG5 har kun tre kutteseter, og siden enzymene som kutter i MCS også kutter i cDNA sekvensen til hER $\beta$ , ble innskuddet amplifisert opp med PCR (beskrevet i kap 3 xx). Det ble konstruert primere med sekvenser for kutteseter i 5' endene slik at det oppamplifiserte cDNA kunne liggeres inn i pAc5.1/V5-His A til et ferdig konstrukt. Restriksjonsanalyse ved hjelp av bioinformatiske verktøy på [www.justbio.com](http://www.justbio.com) ble benyttet for å finne enzymer som ikke kutter i hER $\beta$  cDNA, men som har kutteseter i pAc5.1/V5-His A MCS. Analysen viste at AgeI og XhoI tilfredstilte disse kravene, og var gunstige å bruke videre i kloningsarbeidet.

Gjenkjennelsesekvensen for hhv AgeI og XhoI ble derfor lagt inn i 5' endene på hver sin primer. (kap 3 xx ) Etter oppamplifisering med PCR ble produktet analysert på agarosegel, og størrelsen på båndene tilsvarer 1590 bp som er størrelsen til hER $\beta$  cDNA. Figur 4.x viser bilde av PCR produkt.



**Figur 4.1.** Etter PCR med pGEM-T-hER $\beta$  med konstruerte primere, ble produktet analysert på agarosegel. Båndet i lane 2 er på 1590 bp, som stemmer med hER $\beta$  cDNAs størrelse.

PCR-produktet ble isolert fra gel og ligert inn i pGEM-T vektoren før sluttkonstruktet skal lages. Ved å ligere inn i pGEM-T først oppnår man både å amplifisere opp produktet, og man får et renere kutt fordi restriksjonsenzymene har god bindingsflate. Samtidig kan man garantere fullstendig kutting, ved å analysere produktet på agarosegel før man ligerer inn i pAc5.1/V5-His A. Den termostabile polymerasen Taq polymerase (kap 3xxx) som ble benyttet lager et 5' A overheng på PCR produktet. pGEM-T vektoren. Denne vektoren er linearisert og har en 3' T i hver ende, og "sticky ends" gir vanligvis en mer vellykket ligering enn "blunt" ends. Etter ligering av pGEM-T og hER $\beta$ , ble det transformert inn i kompetente *E.coli* DH5 $\alpha$  celler, og plattet ut på LB-amp skåler. Vekst på plater med negativ kontroll tydet på at pGEM-T her religert, og PCR med primere for hER $\beta$  ble benyttet på positive kloner for å kontrollere om det var innskudd. (kap 3 xx) Produktet ble analysert på agarosegel, figur 4.x, og det viste bånd på 1590 bp i alle prøvene. Klonen fra lane 3 i figur 4.x ble forkastet siden båndet var svakt. De andre prøvene ble sendt til sekvensering.



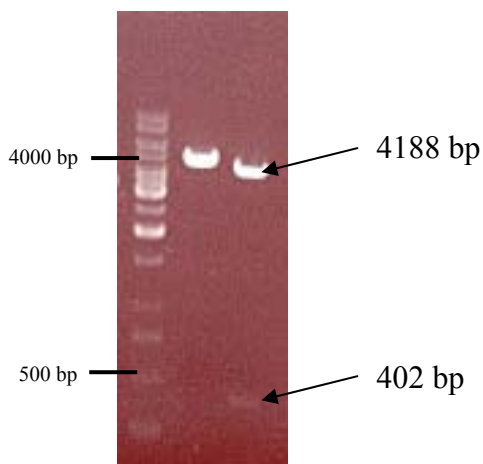
**Figure 4.2.** PCR produkt av de positive klonene ble analysert på agarosegel, i lane 1 og 7 er 1 kb DNA ladder, mens i de øvrige er et bånd på 1590 bp. Dette betyr at det er innskudd i alle prøvene. Båndet i lane 3 er svakt, og denne klonen blir forkastet. De andre prøvene sendes til sekvensering.

#### 4.1.1.1 Sekvensering av pGEM-T-hER $\beta$ .

Før liguering inn i pAc5.1/V5-His A ble ulike pGEM-T-hER $\beta$  plasmider sendt til sekvensering, for å sikre at det ikke har skjedd mutasjoner under PCR amplifisering.

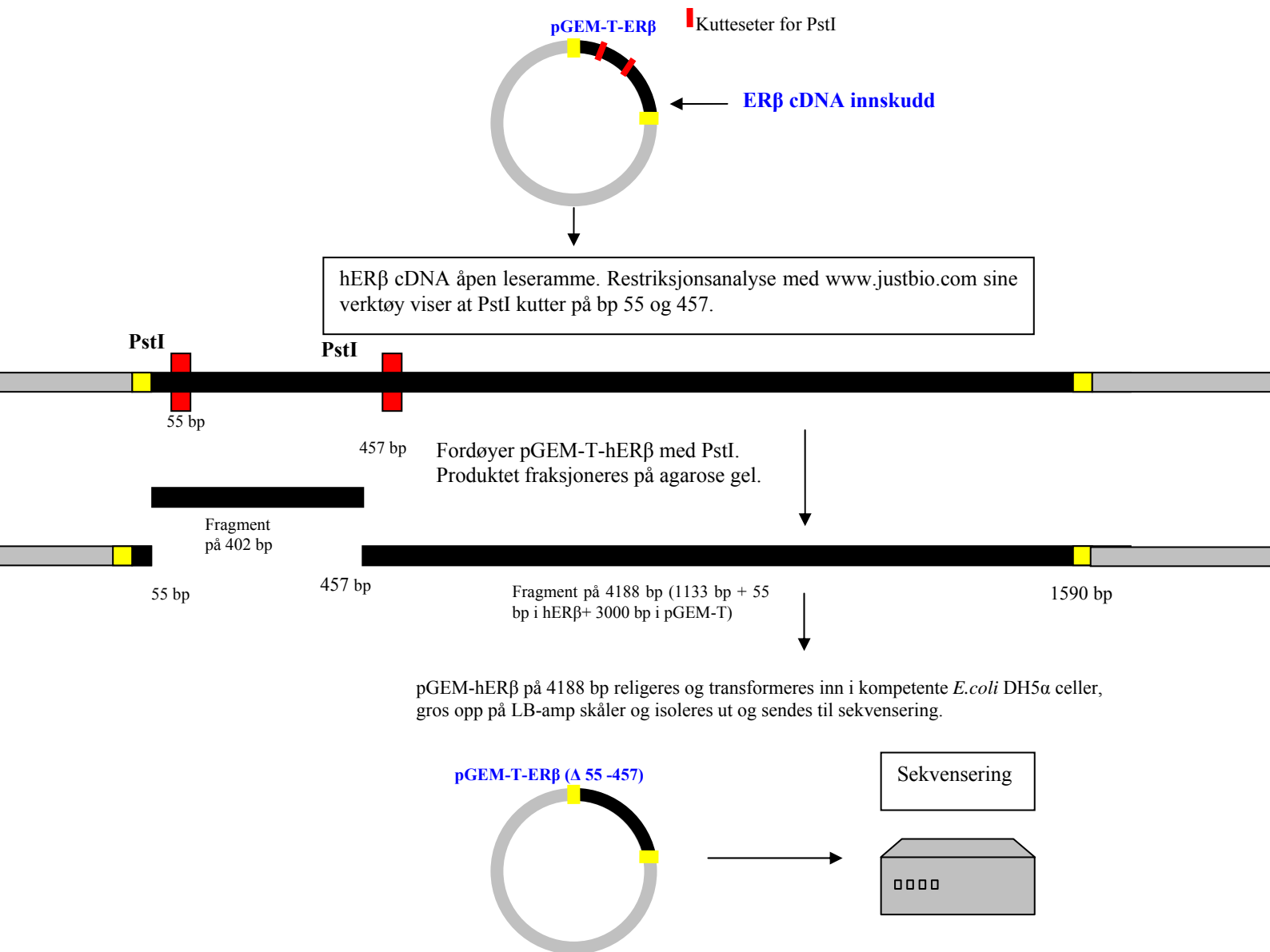
pGEM-T har primerseter for T7 5' primer og Sp6 3' primer.

Sekvenseringsresultatene ble analysert med [www.justbio.com](http://www.justbio.com) sine bioinformatiske verktøy. Det viste seg at det var mutasjoner i sekvensene. Nukleotidesequensen ble translateret til proteinsequens og det viste at prøve nr 1 kun hadde en stille mutasjon og denne klonen ble derfor brukt videre. (sequenssammenstilling appendix s.x.) Et område på 255 bp i midten av innskuddet ble ikke sekvensert og for å sikre at det ikke var mutasjoner i denne delen også, ble et fragment av 5' ende på hER $\beta$  cDNA fjernet, slik at den ukjente delen ble flyttet nærmere primersetet for SP6 3' primer. Ved hjelp av restriksjonsanalyse i [www.justbio.com](http://www.justbio.com) fant jeg ut at PstI kuttet hER $\beta$  cDNA i åpen leseramme 2 steder, på bp 55 og 457. Da kuttet det vekk 402 bp som allerede er sekvensert, og etter religering av plasmidet vil den delen som ikke ble sekvensert være nærmere SP6 3' primersete. Etter restriksjonsfordøyning ble prøven fraksjonert på agarosegel (figur 4.x) og pGEM-T-hER $\beta$   $\Delta$  55-457 ble isolert fra gel, religert, transformert inn i kompetente DH5 $\alpha$  celler og plates ut på LB-amp skåler og etter å ha grodd opp positive kloner ble plasmidet isolert ut. (kap 3 xx) (Dette er vanlig posedyre ved restriksjonsfordøyning og religering av DNA) og sendt til ny sekvensering.



**Figur 4.3.** pGEM-T-hER $\beta$  restriksjonsfordøyd med PstI. Fragment på 4188 bp er trunkert pGEM-T-hER $\beta$  og båndet på 402 bp er biten som fjernes fra cDNA sequensen. Det største fragmentet brukes videre til sekvensering.

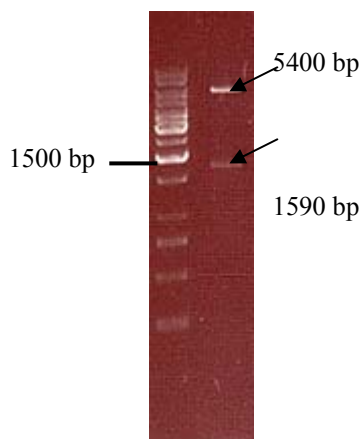


Figur 4.3 gir en enkel skisse av sekvenseringsarbeid med pGEM-T-hER $\beta$ .

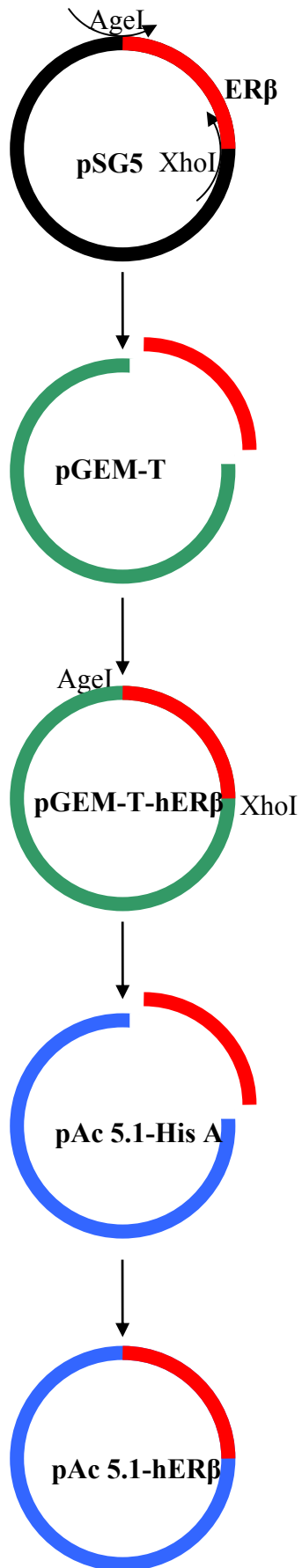
**Figur 4.4:** Restriksjonsfordøying med PstI gir fragmenter på 402 bp og 4188 bp. Det største fragmentet blir isolert fra agarosegel etter storforsdøying, og religert med. hER $\beta$  var da på 1133 bp. Ligering blir så transformert inn i *E. Coli* DH5 $\alpha$  celler, og grodd opp på LB-amp plater. Det plukkes ulike kloner som gros opp over natt i 5 ml LBamp, for å isolere plasmid DNA neste dag. Prøver med isolert plasmid ble sendt til sekvensering. Disse prøvene inneholder nå pGEM-T-ER $\beta$  hvor bp 55-457 er fjernet. Resterende 1133 bp av ER $\beta$  skal analyseres for mutasjoner.

Sekvenseringsresultatene viste ingen mutasjoner, og denne klonen med hER $\beta$  kunne derfor brukes til det ferdige plasmidkonstruktet. hER $\beta$  cDNA ble kuttet ut av pGEM-T vektoren i en storfordøyning med restriksjonsenzymene AgeI og XhoI beskrevet i kap 3 s...).

Ekspresjonsvektoren pAc5.1/V5-His A ble kuttet med de samme enzymene og begge produktene ble fraksjonert på agarosegel, og ekstrahert til videre ligering av sluttkonstruktet pAc-hER $\beta$  ved samme prosedyre som nevnt tidligere. (kap 3 s...) For å bekrefte vellykket ligering ble pAc-hER $\beta$  kuttet med AgeI og XhoI og analysert på agarosegel. (figur 4.x) Deretter ble det ferdige konstruktet transformert, dyrket opp, isolert og renset med CsCl gradient (kap 3.xx) for kunne brukes til transient transfeksjon.



**Figur 4.5.** Restriksjonsfordøyning av pAc-hER $\beta$  med AgeI og XhoI gir forventede fragmenter på hhv. 5,4 kb pAC og 1590 bp hER $\beta$  cDNA.



Lager primere med sekvensen for egnede restriksjonsenzymmer i 5' endene, AgeI og XhoI.

Amplifiserer opp hERβ cDNA med PCR.

Ligerer hERβ inn i pGEM-T vektoren  
Transformerer inn i kompetente *E. coli* DH5α celler.

Isolerer plasmid DNA  
Kutter med valgte restriksjonsenzymmer i en storfordøyning. Isolerer innskudd fra agarosegel.

Ligerer hERβ inn i pAc5.1/V5-His A vektoren som er tilpasset SL-2-cellene jeg skal bruke videre. Transformerer inn i kompetente *E. coli* DH5α bakterieceller, gror opp og isolerer og renser plasmid med CsCl-gradient.

Ferdig plasmid konstrukt.

**Figur 4.6.** En enkel skisse over plasmidkonstruksjon av pAc-hERβ.

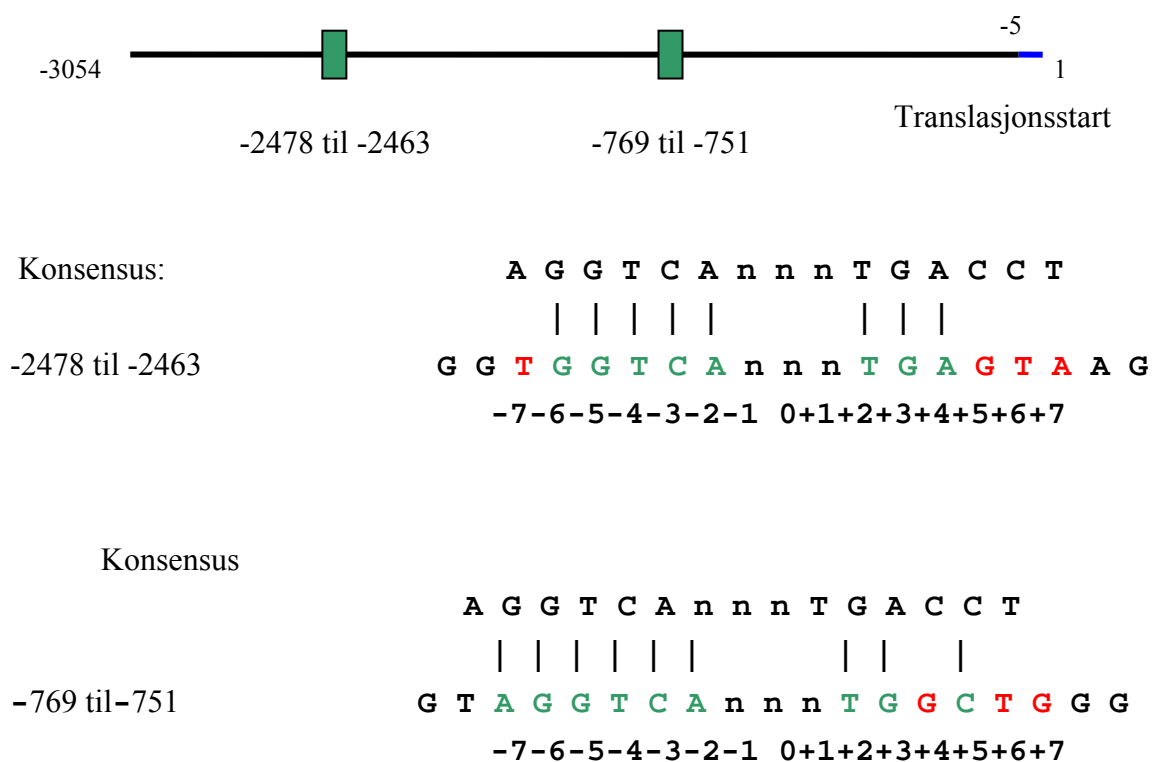
### 4.1.2 Konstruksjon av reportervektor

I lageret til gruppen fantes en pGL-3 ekspresjonsvektorvektor som inneholdt et fragment av hSR-B1 (Human Scavenger Receptor B class 1) promotoren. Det er kjent at dette genet er estrogensensitivt *in vivo* [70]. Fragmentet er lokalisert fra bp -3054 til basepar -5 i forhold til translasjonsstart av genet for hSR-B1 med nummer. Sekvensen ble undersøkt ved hjelp av bioinformatiske verktøy på <http://www.genomatix.de/>. Det viste at fragmentet inneholder to potensielle ERE. Det første ERE er plassert i posisjon -2478 til -2463 relativt til translasjonsstart med sekvensen GTTGGTCActgTGAGTAGG. Det andre ERE i posisjon -769 til -751 relativt til translasjonsstart med sekvensen GGAGGTCAgagTGGCTGAG. Konsensussekvensen for ERE er AGGTCAnnnTGACCT, som danner en palindrom sekvens fra -7 til +7 bp der 0 bp er den midterste spacernukleotiden, se figur 4.x.

Figur 4.7 gir en enkel skisse av ERE i hSR-B1-promotorsekvensen

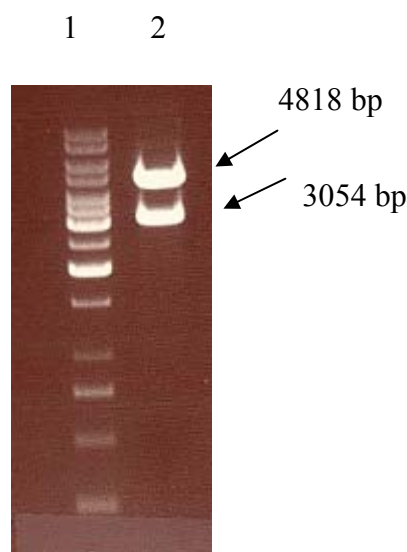
Spacernukleotidene er vist i små bokstaver, og avvik fra konsensusen er merket med rødt.

Konsensussekvensen for ERE er AGGTCAnnnTGACCT, som danner et perfekt palindrom fra +7 til -7 bp. I det ERE lengst oppstrøms for translasjonsstart er det 4 avvik fra konsensus, i bp -7, +5,+6 og +7, mens i det andre ERE er det tre avvik på bp +4, +6 og +7.



**Figur 4.7.** Konsensussekvensen til ERE sammenstilt med ERE sekvens i hSR-B1. Den viser 4 avvik i den ene og 3 avvik i den andre.

pGL3 er en reporter-gen vektor som uttrykker Luciferase, og kan ikke benyttes i SL-2-celler. Derfor må promotorfragmentet kuttes ut av pGL3 og liggeres inn i pCAT basic som uttrykker CAT-genet til senere bruk av CAT-ELISA reporter-genassay. hSR-B1-fragmentet ble kuttet ut av pGL3 vektoren med restriksjonsenzymene BglII og KpnI. Restriksjonsanalyse på [www.justbio.com](http://www.justbio.com) viste at BglII kutter hSR-B1 fragmentet på bp 3057 i 5'ende, fragmentet på ikke relevant for promotor egenskapene til fragmentet. Etter restriksjonsfordøyning ble det analysert på agarosegel og hSR-B1 fragmentet på 3057 ble isolert fra gel til videre ligering i pCAT. Bildet er vist i figur 4.x. BglII kutter vekk 24 bp i 5' ende av hSR-B1, og det nye fragmentet er på 3054 bp.

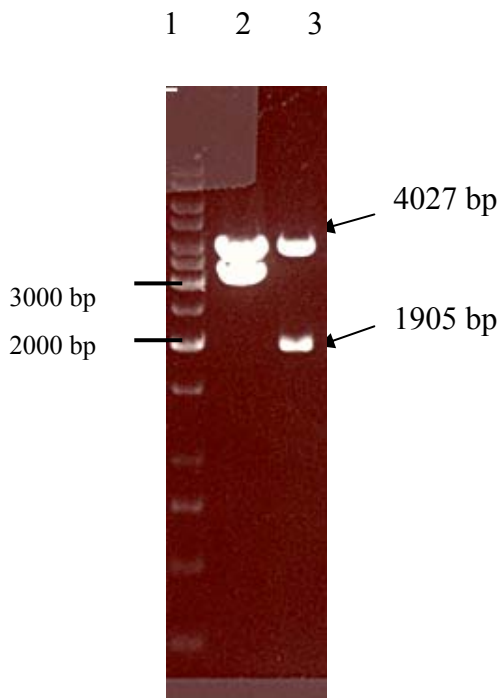


**Figur 4.8.** Analyse av restriksjonsfordøyning. Lane 2 viser pGL3-hSR-B1, kuttet med BglII og KpnI. Det største båndet er lineær pGL3 vektor på 4818 bp, mens det andre båndet er hSR-B1 promotor fragment på 3057 bp.

pCAT-basic vektoren ble fordøyd med de samme restriksjonsenzymene før hSR-B1 promotorfragmentet ble ligert inn like oppstrøms for CAT-genet.

Erfaringsmessig er store promotorfragmenter ikke effektive i transient transfeksjon. Det ble derfor utført en trunkering av hSR-B1 promotorfragmentet. For å beholde begge de potensielle ERE sekvensene i promotorfragmentet, var det ønskelig å kutte ut en del mellom disse sekvensene. Restriksjonsanalyse med bioinformatiske verktøy på [www.justbio.com](http://www.justbio.com) viste at EcoR81 kutter på bp -770 og til -1913 i hSR-B1 fragmentetsekvensen. pCAT-hSR-B1 plasmidet ble derfor restriksjonsfordøyd med EcoR81 og analysert på agarosegel. Båndet med pCAT-hSR-B1  $\Delta$  -770 -1913 ble isolert fra gel og religert. (fulgte samme prosedyresom tidligere, kap 3 xx)

Figur 4.x viser pCAT-hSR-B1 kuttet med BglII og KpnI før og etter trunkering av fragmentet.



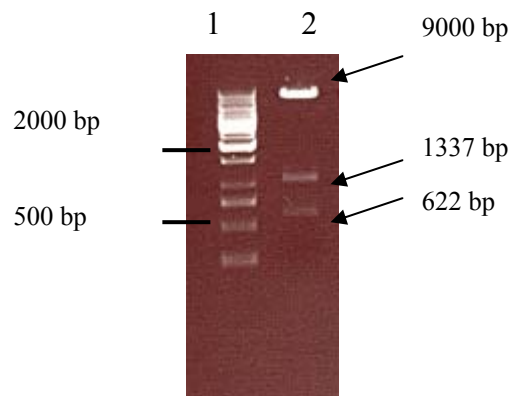
**Figur 4.9.** Analyse på agarosegel viser i lane 2 pCAT-hSR-B1 fullengde promotorfragment kuttet med BglII og KpnI, der vises pCAT-basic på 4027 bp og hSR-B1 fullengde promotorfragment på 3054 bp. I lane 3 av pCAT-hSR-B1  $\Delta$  -770 til -1913, kontrollkuttet med de samme enzymene. Det trunkerte fragmentet er på 1905 bp.

#### 4.1.3. Plasmidkonstruksjon av pAc-hSRC-1

hSRC-1 er en kjent koaktivator for steroidhormonreseptor familien [34], og det er ventet at den skal øke uttrykk av CAT når den opptrer sammen med hER $\beta$ .

I gruppens lager fantes hSRC-1 cDNA som var kuttet ut av pCR-3 vektor med Bstx1 og XbaI. Dette skulle inn i ekspresjonsvektoren pAc5.1/V5-His A benyttes til transfeksjon. Vektoren ble åpnet med restriksjonsenzymene Bstx1 og XbaI før limering med hSRC-1 cDNA. ( kap 3 xxx). Fulgte så samme prosedyre som tidligere

Etter limering ble det ferdige plasmidkonstruktet kuttet med EcoRI for kontroll av vellykket limering. Fordøyingen ble analysert på agarosegel og bildet er vist i figur 4.3. Plasmidet ble

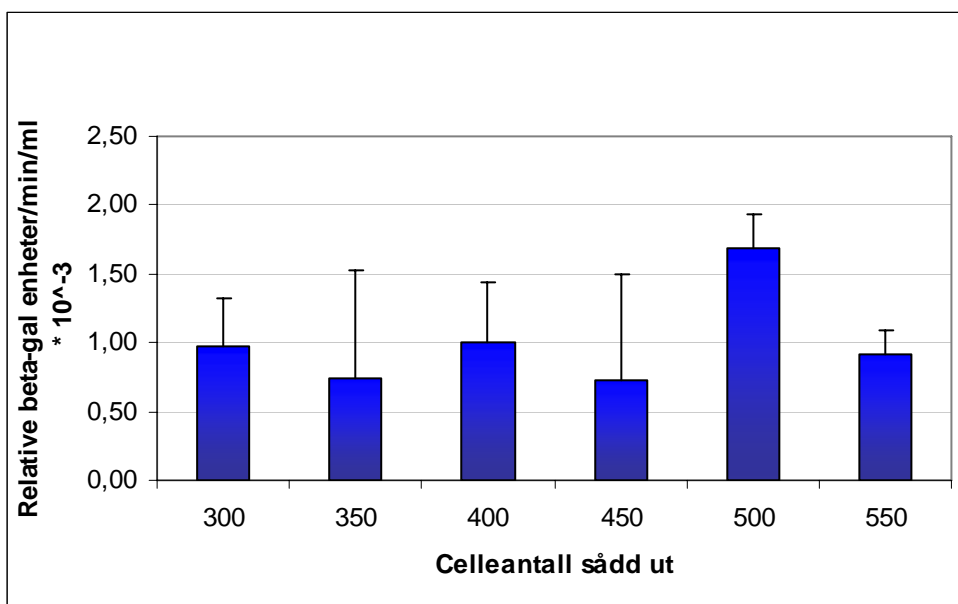


**Figur 4.10.** Viser pAc5.1-hSRC1 kuttet med EcoRI. Det frigjøres fragmenter, på 1337 bp og 622 bp fra hSRC-1 cDNA.

## 4.2 Optimalisering av transfeksjonsmodellen.

### 4.2.1 Titrering av celleantall til transfeksjon:

I tidligere arbeid med SL-2-celler utført av Mariam Bouzga på gruppen, ble det sådd ut 400 000 celler som standard for å oppnå god transfeksjonseffektivitet. Det er ingen fasit på hvordan man teller celler i Bürker kammer (kap 3 xxx), og hvert øye kan telle forskjellig. Det ble derfor utført titrering av celleantall for å finne optimalt antall å så ut før transfeksjon. Cellene ble sådd ut med 50 000 intervaller, fra 300 000 til 550 000. Formelen for celleantall ved telling i Bürker kammer er beskrevet i (kap 3.3.1.2).



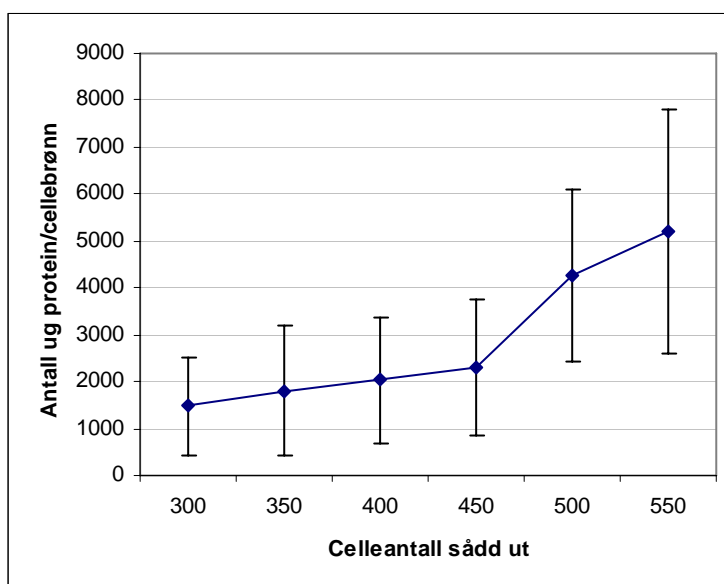
**Figur 4.11:** Relative  $\beta$ -gal verdier mot 400 000 celler utsådd. Forsøket ble gjennomført tre ganger i duplikater og standardavvik er beregnet fra disse målingene. Mengde  $\beta$ -gal produsert av 400 000 celler ble satt til 1. X-aksen viser celleantall som er sådd ut i brønn  $\cdot 10^3$ , mens y-aksen viser antall  $\beta$ -gal enheter/min/ml  $\cdot 10^{-3}$ .

Hvert antall ble sådd ut i duplikater, og transfektert med 250 ng pAc-LacZ som uttrykker  $\beta$ -galaktosidase ( $\beta$ -gal) reporter-gen, og pAc5.1/V5-His A opp til 1  $\mu$ g med FuGENE6 som transfeksjonsreagens. 48 timer etter transfeksjon ble cellene høstet, (kap 3.3.4.3) og hver cellebrønn ble det foretatt duplikate  $\beta$ -galaktosidase målinger på mikroplateleser ved  $A_{420nm}$ . Verdiene brukes i formel for beregning av  $\beta$ -gal enheter / min/ ml.(kap 3 .3.4.5). Figur 4.11 viser relative  $\beta$ -gal verdier til 400 000 celler utsådd, og standardavviket er vist i figuren.

I prøvene med 500 000 celler var transkripsjonseffektiviteten størst, og dette ble brukt som en standard i resten av forsøkene.

#### 4.2.2 Kvantitativ analyse av celleantall.

Det ble målt protein mengde på alle cellelysatenes fra de forskjellige celleantallene. Det gir et kvantitativt inntrykk, fordi proteinmengde øker med celleantall.



**Figur 4.12.** Proteinmengde som funksjon av celleantall. Beregningene av antall  $\mu$ g protein/brønn baserer seg på et gjennomsnitt av verdiene fra alle tre forsøkene. X-aksen viser celleantall sådd ut  $\cdot 10^3$  og y-aksen antall  $\mu$ g protein pr brønn.

Det ble tatt proteinmålinger i duplikater fra hver prøve. Verdiene er presentert i figur 4.12 og baserer seg på et gjennomsnitt og standardavvik av målingene (kap 3. s xx). Kurven stiger jevnt frem til 450 000 celler, mens det er 2 ganger så mye protein i brønnene med 500 000 celler i forhold til 400 000.



### 4.2.3 Test av transfeksjonseffektivitet ved X-gal-metoden.

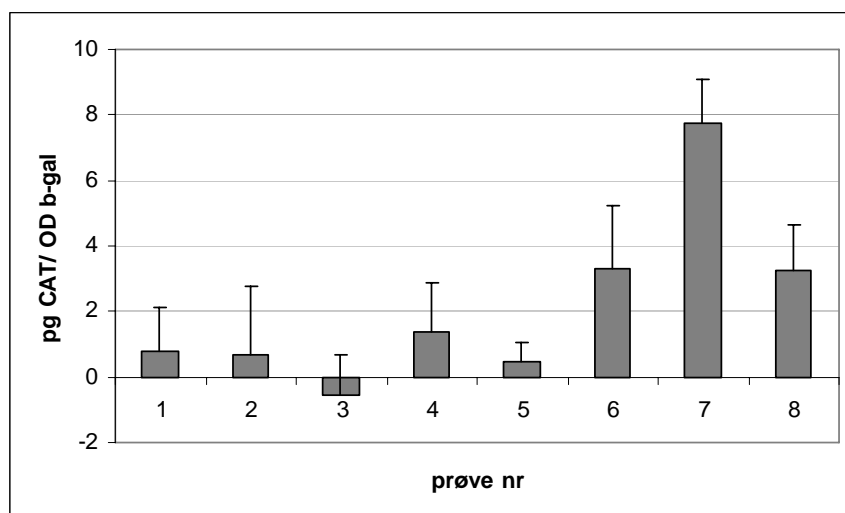
Hvor mange  $\beta$ -galaktosidase-enheter pr/ml/min som oppnås ved transfeksjon av et bestemt antall celler sier noe om hvor mye  $\beta$ -galaktosidase cellene samlet har produsert, men ikke hvor mange av det totale antallet som har bidratt. Det ble gjennomført X-gal analyser etter prosedyre i kap. 3.x. og cellene ble undersøkt i mikroskop. Ved transfeksjon av 500 000 celler, var det anslagsvis 30 % celler som var farget blå. Ved en annen anledning lå det anslåtte antallet blå celler mellom 15 og 20 %. Cellene ble fotografert, men filmen ble skadet, og fremkalling lot seg dermed ikke gjøre.

### 4.2.4 Optimalisering av mengde hER $\alpha$ og hER $\beta$ til transfeksjonsmodellen.

Tidligere GST-pulldown forsøk utført av Martin Enger på gruppen, har vist at hNCU-G1 og hER $\beta$  interagerer in vitro. Det var derfor interessant å undersøke interaksjonen mellom de to proteinene in vivo. Hensikten med dette forsøket var å karakterisere hNCU-G1 som en mulig koaktivator for hER $\beta$ . Dette ble undersøkt i transient transfektert SL-2-celler med reportergenvektor pCAT basic under kontroll av hSR-B1  $\Delta$  -770 -1913. (Dette promotorfragmentet ble brukt i alle forsøk videre i oppgaven, og blir referert til som hSR-B1-promotorfragmentet) Ekspresjon av CAT i hver prøve ble målt og  $\beta$ -gal ble brukt som internkontroll. Metodene er beskrevet i kap 3.3.4.5 og 3.4.

I tidligere in vivo undersøkelser av hNCU-G1 sin effekt på hPPAR $\alpha$ , utført på gruppen, ble 10 ng pAc-hNCU-G1 regnet som optimal mengde. Basert på disse resultatene ble det avgjort at samme mengde skal brukes som standard i dette oppsettet.

Etter å ha funnet optimalt celleantall, ble det utført titrering av forskjellig mengde pAc-hER $\beta$  for finne hvilken som gir god CAT-ekspresjon. Parallelt med dette forsøket ble det titrert inn optimal mengde pAc-hER $\alpha$  til samme formål. Oppsettene var like bortsett fra pAc-hER $\alpha$  og pAc-hER $\beta$ , og er vist i tabell 4-1. Prøvene med hER $\beta$  viste imidlertid altfor lave verdier av CAT ekspresjon til å kunne beregne pg CAT/OD  $\beta$ -gal. Figur 4.13 presenterer CAT ekspresjon under kontroll av hER $\alpha$ . Forsøket ble utført en gang i triplikater og standardavviket er beregnet ut i fra absorbansen ved  $A_{402nm-492nm}$  fra alle prøvene. Beregninger av pg CAT/ OD  $\beta$ -gal og standardavvik er beskrevet i kap 3.4.1 og denne formelen blir benyttet i alle forsøk med CAT ekspresjon videre i oppgaven.



**Figur 4.13:** Ekspresjon av CAT reporter gen etter transfeksjon med ulike mengder pAc-hER $\alpha$ . Verdiene er beregnet fra triplikater. I prøve nr 7 med 110 ng pAc-hER $\alpha$  er det mest ekspresjon av CAT reporter gen. Det bestemmes at denne mengden gir best resultat, og det brukes i alle forsøk videre. I prøve nr 3 er verdien negativ fordi a i likningen for regresjonslinjen i standardkurven er høyere enn CAT verdien ved  $A_{405nm}-A_{492nm}$ .

DNA	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4	Prøve 5	Prøve 6	Prøve 7	Prøve 8
pAc-hER $\alpha$	0 ng	50 ng	0 ng	10 ng	50 ng	70 ng	110 ng	150 ng
pAc-hNCU-G1	0 ng	0 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
pAc-LacZ	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng
pCAT basic-hSR-B1	350 ng	350 ng	350 ng	350 ng	350 ng	350 ng	350 ng	350 ng
pAc5.1/V5-His A	400 ng	350 ng	390 ng	380 ng	340 ng	320 ng	280 ng	240 ng
E2	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM
<b>Sum</b>	<b>1 <math>\mu</math>g</b>	<b>1 <math>\mu</math>g</b>	<b>1 <math>\mu</math>g</b>	<b>1 <math>\mu</math>g</b>	<b>1 <math>\mu</math>g</b>	<b>1 <math>\mu</math>g</b>	<b>1 <math>\mu</math>g</b>	<b>1 <math>\mu</math>g</b>

**Tabell 4-1** Mengde av hvert plasmid i hver prøve.

I prøve 3 er verdien under null. Det skyldes at absorbansen målt ved  $A_{402nm}-A_{492nm}$  er lavere enn verdien for a i likning for regresjonslinjen  $y = ax + b$  i standardkurven. Her er SL-2-celler transfektert med pAc-hNCU-G1 uten pAc-hER $\alpha$ , og her skjer det et tap av CAT ekspresjon i forhold til prøve 1 som viser basale ekspresjonen i SL-2-cellene. I prøve 7 med 110 ng pAc-hER $\alpha$  er det høyest uttrykk av CAT, og det bestemmes at denne mengden benyttes som standard i transfeksjonsmodellen.

Samme mengde ble brukt som standard i oppsettene med pAc-hER $\beta$ , fordi det antas at transfeksjonsmodellen for de to kjernereseptorene er like, ettersom SL-2-cellene tilbyr et enkelt system.

#### 4.2.5 Optimalisering av transfeksjonsreagens.

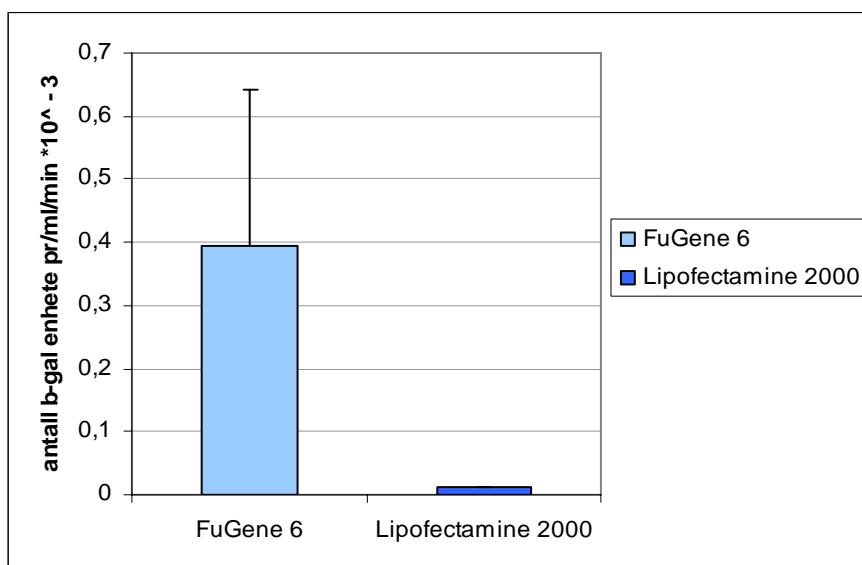
##### FuGENE6 vs Lipofectamine som transfeksjonsreagens.

I optimaliseringsarbeidet som er gjort hittil, ble FuGENE6 fra Roche benyttet som transfeksjonsreagens. Denne reagensen har blitt brukt på SL-2-celler i tidligere arbeid på gruppen. For å sikre at denne er å best til denne transfeksjonsmodellen, ble det kjørt et parallelt oppsett med Lipofectamine 2000 som transfeksjonsreagens. Både FuGene6 og Lipofectamine 2000 består av kationer og lipider, og skal fungere effektivt på primære cellelinjer. (kap 3

Verdiene i figur 4.14 er basert på et forsøk i duplikater og standardavviket er vist i figuren.

Det ble brukt standard transfeksjonsoppsett for hver reagens, som vist i kap 3.3.4.1.

Her presenteres antall  $\beta$ -gal enheter/ml/min for hver transfeksjonsreagens. Det er mer en 25 ganger flere  $\beta$ -gal enheter/min/ml i prøvene transfektert med FuGene6 i forhold til prøvene transfektert med Lipofectamine. FuGene6 blir derfor brukt som standard transfeksjonsreagens i modellen.

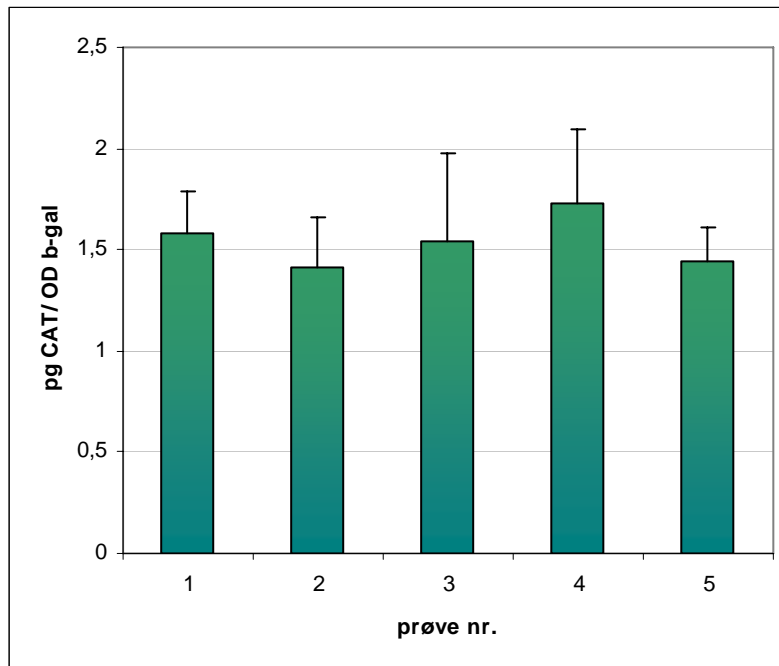


**Figure 4.14.** X-aksen viser transfeksjonsreagenset, mens Y-aksen antall  $\beta$ -gal enheter/ml/min  $\cdot 10^{-3}$ . Verdiene baserer seg på 20  $\beta$ -gal målinger fra hvert transfeksjonsreagens.

#### 4.3. Karakterisering av hNCU-G1 som koaktivator for ER $\beta$ .

Etter at de ulike parametere var optimalisert, dvs celleantall, mengde pAc-hER $\beta$  og transfeksjonsreagens, kunne arbeid med karakterisering av hNCU-G1 som koaktivator begynne. Det ble tilsatt E<sub>2</sub> som ligand for å aktivere hER $\beta$ . Figur 4.15 viser resultatene over CAT ekspresjon og tabell 4-4 viser en oversikt over de ulike plasmidene i hver prøve. Det er ingen vesentlige forskjeller i ekspresjon av CAT i de ulike prøvene. Verdiene fra figur 4.15 er

svært lave gir ikke sikre data man kan trekke slutninger ut i fra. Det blir derfor nødvendig å gjennomføre forsøket på nytt.

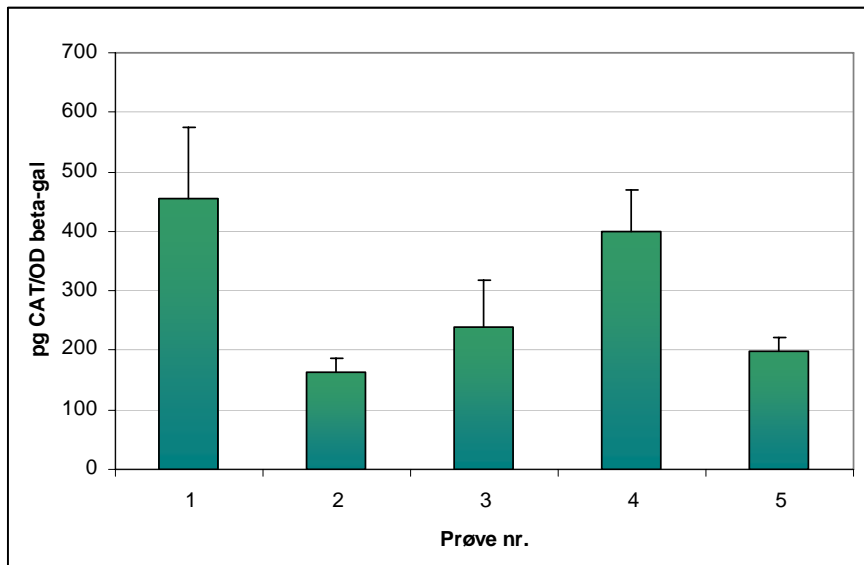


**Figure 4.15.** Verdiene baserer seg på  $\beta$ -gal og CAT målinger gjort etter 60 min. Det er unormalt lav ekspresjon av CAT, og basalekspressjonen i prøve 1 er nesten like stor som prøven med både pAc-hER $\beta$  og pAc-hNCU-G1.

	1	2	3	4	5
pAc-hER $\beta$	0ng	0 ng	110 ng	110ng	110ng
pAc-hNCU	0ng	10ng	0 ng	10ng	20ng
pAc-lacZ	250ng	250ng	250ng	250ng	250ng
pCAT-hSRB1	350ng	350ng	350ng	350ng	350ng
pAc5.1/V5-His A	400ng	390ng	290ng	280ng	280ng
E <sub>2</sub>	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM

**Tabell 4-2** en oversikt over hvor mye av hvert plasmid det er i hver prøve til figur 4.12

Forsøket ble repetert med noen forandringer. Tabell 4.4 viser oversikt over oppsettet og resultatene er vist i figur 4.16. Det ble utført en gang i triplikate prøver, og standardavvik er vist i figuren. Prøve 1 viser basalekspressjonen og denne prøven har høyest CAT ekspresjon. Prøve 3 som representerer celler transfektert med pAc-hER $\beta$ , viser lavere uttrykk av CAT enn basalekspressjonen. I prøve 4 og 5 med pAc-hER $\beta$  og hhv 10 og 20 ng pAc-hNCU-G1, er ekspresjonen også lavere enn basalekspressjonen. Dermed antas det at hER $\beta$  ikke har noen effekt på ekspresjonen av reprotorgenet under kontroll av hSR-B1-promotor. Dette kan skyldes at hER $\beta$  har dårlig affinitet til ERE i promotorsekvensen, og ikke binder tilstrekkelig[71].



**Figur 4.16.** Resultater fra triplikate prøver og standardavviket er vist i figuren. Prøve 1 viser den basalekspressjon av CAT under kontroll av hSR-B1 promotor. I prøver med pAc-hER $\beta$  er det ikke høyere CAT uttrykk enn basalekspressjonen.

	1	2	3	4	5
pAc-hER $\beta$	0ng	0ng	110 ng	110ng	110ng
pAc-hNCU	0ng	10 ng	0 ng	10ng	20ng
pAc-lacZ	250ng	250ng	250ng	250ng	250ng
pCAT-hSR-B1	350ng	350ng	350ng	350ng	350ng
pAc5.1/V5-His A	400ng	390ng	290ng	280ng	280ng
E <sub>2</sub>	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM

**Tabell 4-3.** En oversikt over hvor mye av hvert plasmid som var i hver prøve til figur 4.16.

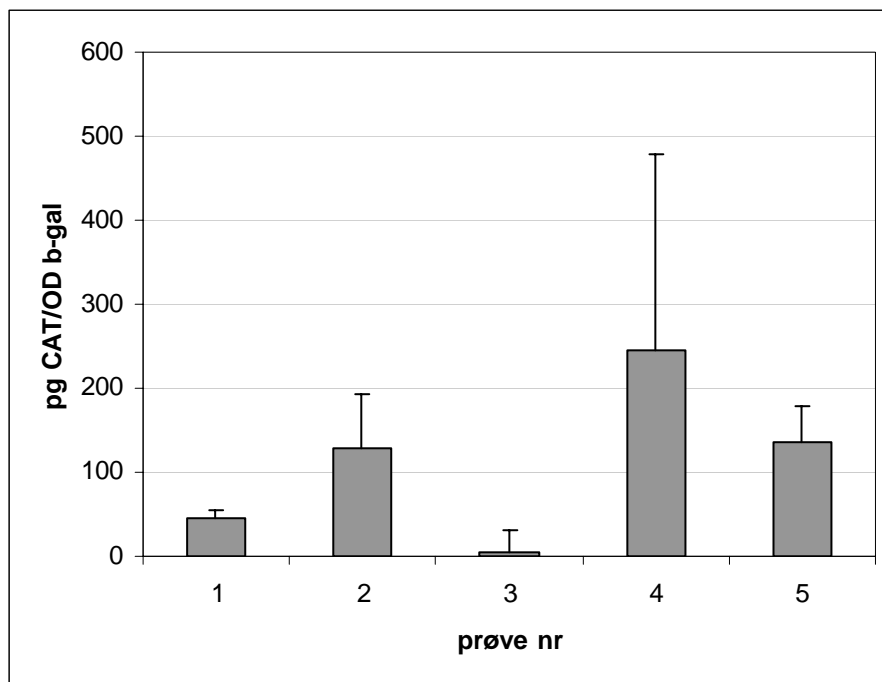
I oppsettene med hER $\alpha$  er ekspresjon av CAT i prøvene med pAc-hER $\alpha$  vesentlig høyere enn basalekspressjonen (figur 4.17 og 4.18). Denne reseptoren kan dermed se ut til å ha høyere affinitet til ERE i promotoren. Det er dokumentert at E<sub>2</sub>-aktivert hER $\alpha$  har høyere affinitet enn hER $\beta$  til ERE sekvenser, og stimulerer ekspresjon av målgener i større grad enn hER $\beta$  [72]. Ettersom oppgaven går ut på å undersøke hNCU-G1 som en mulig koaktivator for hER under kontroll av hSR-B1 promotoren var det mer interessant å fortsette forsøkene på hER $\alpha$ .

#### 4.4 Karakterisering av hNCU-G1 som koaktivator for hER $\alpha$

Figur 4.17 viser hER $\alpha$  stimulert CAT ekspresjon under kontroll av hSR-B1-promotoren.

Tabell 4-4 gir en oversikt over oppsettet. Forsøket er utført to ganger i duplikate prøver, og standardavviket er vist i figuren.

Prøve 1 viser basalekspressjonen og prøve 2 viser ekspressjon av CAT stimulert av hER $\alpha$ . I prøve 3 er cellene transfektert med pAc-hNCU-G1 alene, og her skjer det et betydelig tap av CAT uttrykk i forhold til basalekspressjon. I prøve 4 hvor det er tilsatt både pAc-hER $\alpha$  og pAc-hNCU-G1 er det noe økt ekspressjon av CAT. I prøve 5 ble det tilsatt 20 ng pAc-hNCU-G1, og det har negativ effekt på CAT ekspressjon.

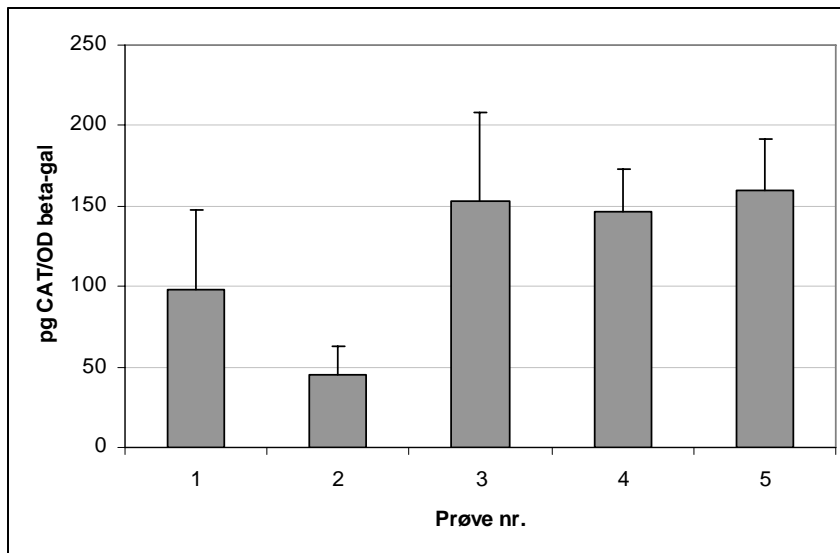


**Figur 4.17.** Resultater fra to like forsøk hvor hver prøve ble kjørt i duplikat. Resultatene baserer seg på målinger av CAT ekspressjon fra 4 målinger, og gjennomsnitt og standardavvik er beregnet fra disse verdiene. Dette er beskrevet i kap 3.5

	1	2	3	4	5
pAc-hER $\alpha$	0ng	110 ng	0 ng	110ng	110ng
pAc-hNCU	0ng	0 ng	10 ng	10ng	20ng
pAc-lacZ	250ng	250ng	250ng	250ng	250ng
pCAT-hSR-B1	350ng	350ng	350ng	350ng	350ng
pAc5.1/V5-His A	400ng	290ng	390ng	280ng	280ng
E2	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM

**Tabell 4-4.** Oversikt over hvor mye av hvert plasmid som var i de ulike prøvene til figur 4.17

Forsøket ble repetert med noen forandringer. Figur 4.18 viser CAT ekspressjon fra et forsøk i triplikate prøver hvor standardavviket er vist i figuren, og tabell 4-5 gir en oversikt over oppsettet.



**Figur 4.18.** CAT-ekspressjon i transferte celler. Prøve 1 viser basalekspressjon av CAT i SL-2-cellerne under kontroll av hSR-B1 promotorfragment. I prøve 2 med kun pAc-hNCU-G1 uten pAc-hER $\alpha$  observeres det et tap i ekspressjon, mens i prøve 3 med pAc-hER $\alpha$  er det høyere uttrykk av CAT enn i prøve 1.

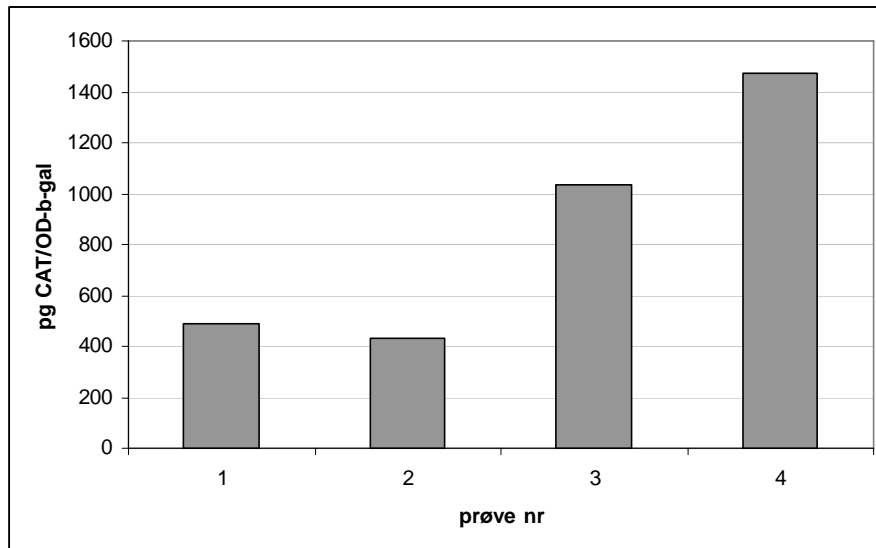
	1	2	3	4	5
pAc-hER $\alpha$	0ng	0 ng	110 ng	110ng	110ng
pAc-hNCU-G1	0ng	10 ng	0 ng	10ng	20ng
pAc-lacZ	250ng	250ng	250ng	250ng	250ng
pCAT-hSRB1	350ng	350ng	350ng	350ng	350ng
pAc5.1/V5-His A	400ng	290ng	390ng	280ng	280ng
E <sub>2</sub>	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM

**Tabell 4-5.** Tabellen viser hvor mye av hvert plasmid som ble brukt i hver prøve til figur 4.18.

Figur 4.18. viser at prøve 2 hvor det er tilsatt pAc-hNCU-G1 alene observeres det også her et betydelig tap av CAT ekspressjon i forhold til basalekspressjonen. I prøve 3 med pAc-hER $\alpha$  øker uttrykket med 1,5 i forhold til basalekspressjon. I prøve 3, 4 og 5 er det ingen nevneverdige forskjeller i CAT ekspressjon, og det ser ikke ut til at hNCU-G1 påvirker hER $\alpha$  stimulert CAT ekspressjon i noen grad. I prøve 4 og 5 er det tilsatt hhv. 10 og 20 ng pAc-hNCU-G1 i tillegg til pAc-hER $\alpha$ .

#### 4.5 Karakterisering av hSRC-1 som koaktivator for hER $\alpha$

hSRC-1 er en kjent koaktivator for hER $\alpha$  [34], og det ble utført et forsøk hvor pAc-hSRC-1 ble kotransfektet med pAc-hER $\alpha$ . Forsøket ble utført en gang i duplikate prøver og gjennomsnittet av CAT ekspressjon fra hver prøve er presentert i figur 4.19. Tabell 4-6 gir en oversikt over oppsettet.



**Figur 4.19.** CAT ekspresjon i transfekterte celler med pAc-hER $\alpha$  og pAc-hSRC-1. De viser effekten av hSRC-1 som koaktivator på hER $\alpha$ . Prøve 1 viser basalekspressjonen av CAT, og der er uttrykket lavere enn i prøve 4 med både pAc-hER $\alpha$  og pAc-hSRC-1.

	1	2	3	4
pAc-hER $\alpha$	0ng	0ng	110 ng	110ng
pAc-hSRC-1	0ng	10ng	0ng	10ng
pAc-lacZ	250ng	250ng	250ng	250ng
pCAT-hSR-B1	350ng	350ng	350ng	350ng
pAc5.1/V5-His A	400ng	290ng	390ng	280ng
E <sub>2</sub>	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM

**Tabell 4-6.** Tabellen viser hvor mye av hvert plasmid som er benyttet i hver prøve.

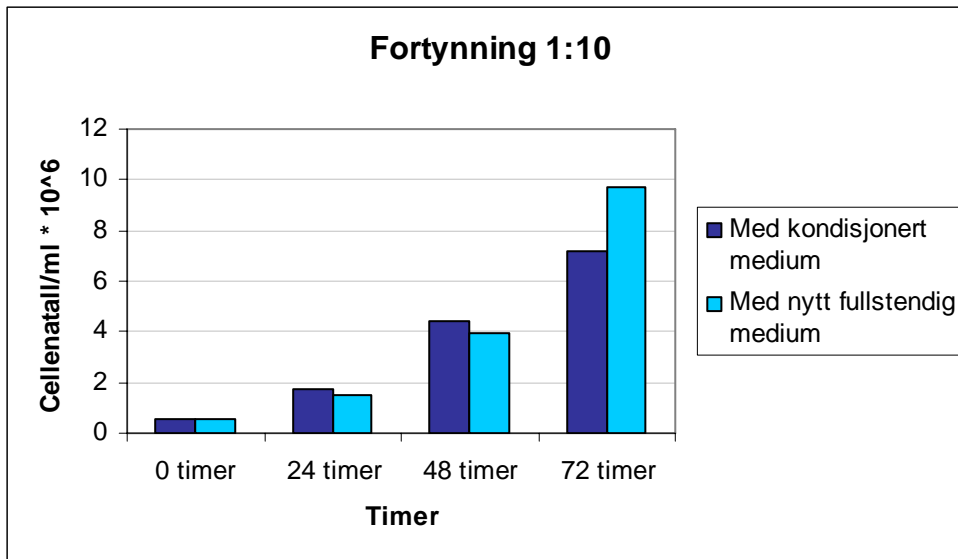
Prøve 1 viser basalekspresjon av CAT i SL-2-cellene, uten pAc-hER $\alpha$  og pAc-hSRC-1. I prøve 2 uttrykkes kun hSRC-1 uten hER $\alpha$ , og det er ingen vesentlig forandring av ekspresjon av CAT mellom de to første prøvene. I prøve 4 observeres en økning av CAT ekspresjon i forhold til prøve 3 med pAc-hER $\alpha$  alene.

#### 4.6 Kartlegging av vekstraten til SL-2-celler samt betydning av kondisjonert medium.

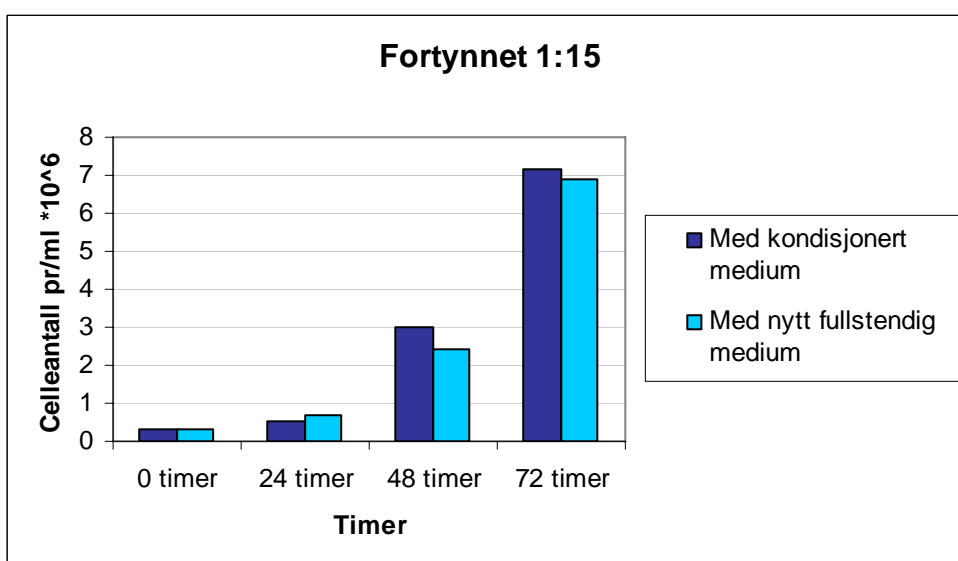
Ved arbeidets start overtok jeg en batch med SL-2-celler overtok jeg en cellebatch som gruppen hadde allerede gående. Denne batchen fungerte til transfeksjonsarbeid i noen måneder, men etter en tid sluttet cellene å fungere optimalt. Det er vanlig at en cellebatch kan brukes til forsøk i opptil 6 mnd. Det ble tatt opp nye celler fra nitrogentank. For å kartlegge veksthastigheten, ble det laget et oppsett. Det ble laget to oppsett der celler fortynnet 1:10 og 1:15 ble sådd ut i 4 stk 6 brønners plater, og monitorert i 72 timer. Det var også interessant å se om veksthastigheten til SL-2-celler forandret seg dersom jeg appliserte kondisjonert



medium, hvor konsentrasjonen av vekstfaktorer er høyere. Det ble derfor applisert 1/10 volum av kondisjonert medium i duplikate prøver av hver fortytning. Ved å sammenligne veksthastighetene mellom de to oppsettene ville jeg få et inntrykk av hvordan vekst og subkultivering burde gjennomføres. Resultatene over de to fortytningene er presentert i figur 4.21. og 4.22. Hver 24 time ble det høstet og talt celler fra to brønner (kap 3 xx), og gjennomsnittet er presentert i figurene 4.20 og 4.21.



**Figur 4.20.** Vekstraten over celler fortynnet 1:10 ganger. Lilla stolpe presenterer cellene som har fått tilsatt 1/10 volum kondisjonert medium, mens stolpene farget blått presenterer cellene som vokser med nytt fullstendig medium. Cellene ble talt hver 24. time. Frem til 48 timer er det ingen vesentlig forskjell i vekstrate. Ved 72 timer har cellene tilsatt 1/10 volum kondisjonert medium en konsentrasjon på 9,7 mill celler/ml sammenlignet med 7,2 mill celler/ml for kun nytt fullstendig medium.



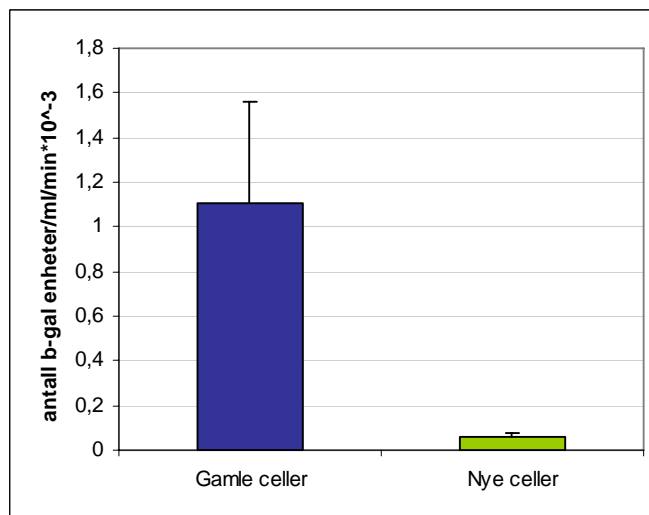
**Figur 4.21.** Figuren viser cellekonsentrasjon som funksjon av tid ved 1:15 fortytning., hvor cellene er talt hver 24. timer. Ved 0 timer er konsentrasjonen på cellene 0,36 mill celler /ml. Etter 72 timer er cellekonsentrasjonen på 7,15 mill/ml i celler med kondisjonert medium, mens den er 6,9 mill/ml i celler med nytt fullstendig medium.

Det er ingen vesentlig forskjell på celler som har fått 1/10 volum kondisjonert medium i forhold til cellene som kun ble tilsatt nytt fullstendig medium. Det ser derfor ut til at kondisjonert medium hadde lite å si for veksthastigheten til cellene.

Veksthastigheten er imidlertid bedre i brønnene med 1:10 fortykning enn i 1:15 fortykning. I den førstnevnte er det en tredobling i celleantall etter 24 timer, mens i 1:15 fortyningen er det mindre en dobbelt så mange celler etter samme tidsintervall. Slik fortsetter det ved hver måling, men etter 72 timer er forholdet mellom antall celler ved start og slutt i de to fortykningene forholdsvis likt.

#### 4.7 Test av transfeksjonseffektivitet hos gammel vs. ny cellebatch

Den nye cellebatchen som ble tatt opp fra nitrogentank fungerte dårlig til transfeksjon. Det ble derfor kjøpt nye celler fra Invitrogen. Etter tre uker med vekst og subkultivering, ble de nye SL-2-cellebatchene testet med transfeksjon og måling av antall  $\beta$ -gal enheter/min/ml. Figur 4.22. viser en sammenligning mellom transfeksjonseffektiviteten til nye celler, mot et forsøk med gammel cellebatch da disse cellene fungerte optimalt. (fra titrering av celleantall) Forsøket baserer seg på 6 prøver, og standardavviket er vist i figuren. Tabell 4-7 gir en oversikt over. Det var 18 ganger flere  $\beta$ -gal enheter/min/ml i cellene fra start batchen i forhold til i de nye cellene.



**Figur 4.22.** Resultatene viser antall  $\beta$ -gal enheter/ min/ ml. Gamle celler er fra batch som gruppen hadde gående ved arbeidets start, mens nye celler ble kjøpt fra Invitrogen. De gamle cellene uttrykker 18 ganger så mange  $\beta$ -gal enheter/min/ml som de nye cellene. X-aksen viser hvilken cellebatch forsøket er utført på, og y-aksen viser antall  $\beta$ -gal enheter /ml/min \* 10<sup>-3</sup>.

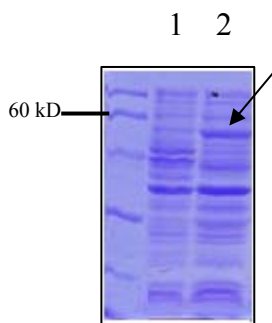
Plasmid	Gamle celler	Nye celler
pAc-LacZ	250 ng	250 ng
pAc5.1/V5-His A	750 ng	750 ng

**Tabell 4-7:** Oversikt over hva cellene er transfektert med i figur 4.18.

#### 4.8 Kontroll av interaksjon mellom ER $\beta$ -LBD og hNCU-G1

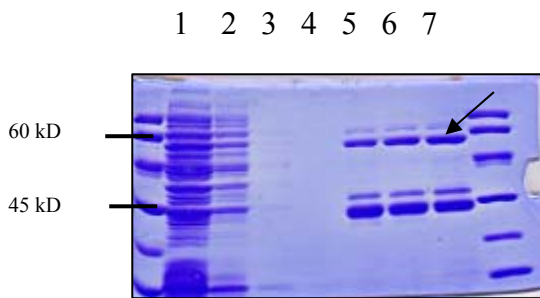
Etter gjentatte forsøk med transient transfeksjon og målinger av CAT ekspresjon for å karakterisere hNCU-G1 sin effekt på hER $\beta$ , gir ikke resultatene noen indikasjon på at de to proteinene interagerer. Det er derfor grunn til å repetere pulldown forsøkene som ble utført på gruppa tidligere, der det er vist interaksjon mellom hER $\beta$  og hNCU-G1.

Det ble kjørt GST-pulldown på ER $\beta$ -LBD (ligandbindende domene) og helcellelysat fra ubehandlet JEG3 celler som har endogent hNCU-G1. (Metoden er beskrevet i kap 3.6) Det fantes et ferdig konstrukt av GST-ER $\beta$ -LBD i en pGEX vektor i gruppens lager. Denne vektoren har en IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) induserbar promotor som er plassert like oppstrøms for genet som koder ER $\beta$ -LBD i fusjon med GST (Glutathion S-Transferase). pGEX-GST-hER $\beta$ -LBD ble transformert inn i kompetente *E.coli* BL 21 celler, (kap 3.1.2) og induisert med IPTG neste dag, slik at fusjonsproteinet ble uttrykt i cellene. Det var flere bakteriekulturer som ble induisert for å finne en klon som var effektiv til produksjon av fusjonsproteinet (kap 3.6.1). Prøvene ble analysert med SDS-PAGE (kap 3.5.1) og figur 4.23. viser bilde av Coomassie farget gel hvor prøven i lane 2 er prøve uten induksjon av IPTG, mens lane 3 viser prøve med induksjon og uttrykk av fusjonsproteinet. Der er det et bånd på 58 kD som er størrelsen på GST-hER $\beta$ -LBD. Denne klonen ble brukt videre til GST-pulldown.



**Figur 4.23.** Etter induksjon av IPTG startet ekspresjon av GST-hER $\beta$ -LBD. Prøvene ble analysert med SDS-PAGE. I lane 1 er kontroll uten induksjon med IPTG, mens båndet på 58 kD i lane 2 tilsvarer størrelsen til GST-ER $\beta$ -LBD.

Isolering av GST-ER $\beta$ -LBD ble utført ved trinnvis rensing på affinitetskolonne. (kap 3.7). Prøver fra vært trinn ble analysert med SDS-PAGE og resultatet er presentert i figur 4.24.



**Figur 4.24.** Båndet er på ca 58 kD tilsvarer GST-ER $\beta$ -LBD  
I prøve 1 er første lysat før vask, i prøve 2,3 og 4 prøve fra vaske trinnene, og prøve 5, 6, og 7 er rensed hER-LBD.

Det ble utført en proteinmåling på det ferdig rensede GST-hER $\beta$ -LBD (kap 3.6). Ut i fra den Coomassie fargede SDS-gelen antas det at GST-hER $\beta$ -LBD tilsvarer omkring 30 % av prøven som er applisert. Konsentrasjon beregnes ved hjelp av ligning for regresjonslinjen for BSA standardkurven kap 3. Det estimeres da at konsentrasjonen på det rensede fusjonsproteinet er på 0,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Det ble utført GST-pulldown på rensed fusjonsprotein GST-ER $\beta$ -LBD, samt på fusjonsproteiner jeg fikk fra Martin Enger i gruppen. Han hadde ferdige *E.coli* BL 21 lysater med GST-ER $\beta$ -LBD oppbevart ved  $-80^{\circ}\text{C}$ . Fusjonsproteinet ble rensed ut med GST kuler (3.7) før det ble utført GST-pulldown på prøvene. Det ble tilsatt lysat fra ubehandlet JEG3 celler (fra placenta choriocarcinoma) med endogent hNCU-G1. hNCU-G1 vil da binde til det ligandaktiverede fusjonsproteinet ved hjelp av sine NR-bokser, og dermed følge med GST-kulene og fusjonsproteinet til videre Western analyse.

Etter tilsetning av primært antiserum SNO215 fra kanin og sekundært antistoff goat anti-rabbit IgG, ble membranen visualisert med luminiscens og diaminobenzidin metoden (kap 3.8.1.4) Resultatet er presentert i figur 4.25 og en oversikt over oppsettet er vist i tabell 4-8.



**Figur 4.25.** Visualisert membran med Diaminobenzidin metoden etter Western blot. Lane 1 GST-ER $\beta$  fusjonsprotein fra lager med hNCU-G1, viser et bånd på ca 97 kD. I de øvrige prøvene eget vises der vises ingen bånd.

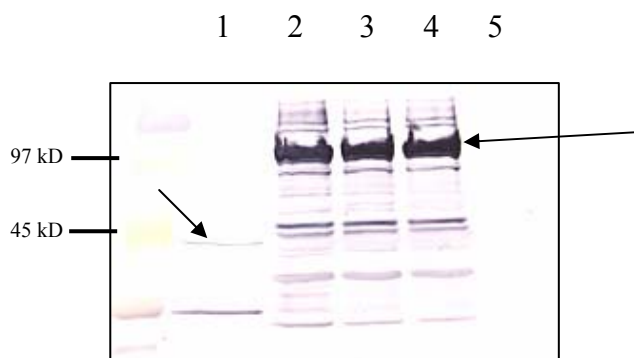
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4
GST-ERβ-LBD fra lager	50µl	50 µl		
GST-ERβ-LBD eget			20 µl	20 µl
E2	20 µM		20 µM	
GST-kuler	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
NETN-buffer	180 µl	155 µl	155 µl	200 µl

Tabell 4-8. gir en oversikt over oppsettet til forsøket presentert i figur 4.20.

Membranen i figur 4.25 og viser kun ett bånd på 97 kD i prøven med fusjonsprotein fra gruppens lager. Data fra tidligere arbeid i gruppen, har antydnet at hNCU-G1 kan være ubiquitinert og derfor øker i molekylvekt. Det var dårlige signaler ved luminiscens fremkalling (kap 3.8.1.5), og membranen sværtet røntgenfilmen dårlig. Jeg antar derfor at årsaken til at jeg ikke får visualisert bånd i begge prøvene er fordi det er for lite protein på membranen. Dette kan skyldes for dårlig overføring fra gel til membran eller at det bandt lite protein til GST- kulene i selve pulldownprosedyren.

Det ble utført ny GST-pulldown med nødvendige kontroller til videre Western analyse.

Her ble 25 µl lysat fra ubehandlet JEG3 celler brukt som kontroll, for å gi en indikasjon på hvor mye hNCU-G1 som var tilstede før GST-pulldown. Tabell 4-9 viser en oversikt over oppsettet. Figur 4.25 viser bilde av membranen.

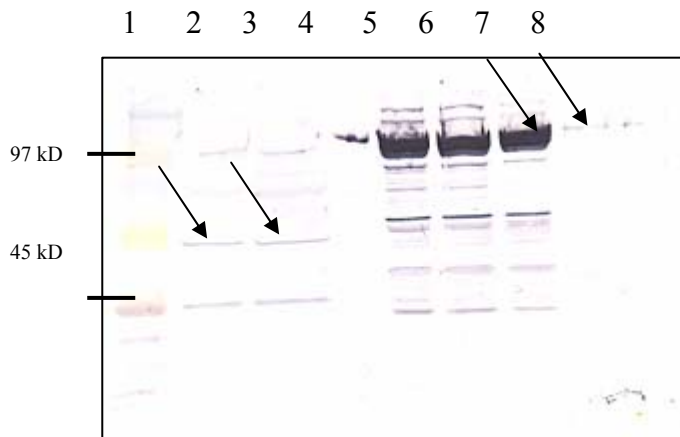


**Figur 4.26.** Membranen er visualisert med diaminobenzedin metoden. I prøve 1 er det et svakt bånd som tilsvarer størrelsen til hNCU-G1 på 43,8 kD. I lane 2-4 er det et tydelig bånd på 97 kD, og det er samme størrelse som på membranen i figur 4.25.

	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4	Prøve5
JEG3 lysat med hNCU-G1	25 µl	25 µl	25 µl		25 µl
GST-ERβ-LBD fra lager		50 µl	50µl	50µl	
GST-ERβ-LBD eget					
E2		20 µM			
GST-kuler		50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
NETN-buffer		155 µl	155 µl	200 µl	225 µl

**Tabell 4-9.** viser en oversikt over oppsettet i figur 4.26

Forsøket ble gjentatt, fusjonsproteinet jeg rensset ut på affinitetskolonne ble tilsatt med og uten ligand for å se om de samme båndene kunne detekteres her. Tabell 4-9 viser hva hver prøve inneholdt. Membranen er visualisert med diaminobenzedin metoden.



**Figur 4.27.** Membranen er visualisert med diaminobenzedin metoden og tabell 4-8 viser hva som er i hver prøve. Båndet i prøve 1 og 2 er på ca 44 kD og tilsvarer størrelsen på hNCU-G1. I prøve 4-8 er det et bånd på 97 kD med ulik intensitet.

	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4	Prøve 5	Prøve 6	Prøve 7	Prøve 8
JEG3 lysat med hNCU-G1	25 µl	50 µl	25 µl	25 µl	25 µl		25 µl	25 µl
GST-ERβ-LBD fra lager				50µl	50µl			
GST-ERβ-LBD eget							50 µl	50 µl
E2				20 µM		20 µM		
GST-kuler			50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
NETN-buffer			225 µl	155 µl	200 µl	225 µl	225 µl	225 µl

Tabell 4-8 oversikt over hva som er i hver prøve i resultatene presentert i figur 4.22

Bildet i figur 4. 27 viser lane 1 og 2 er det prøver med lysat fra ubehandlet JEG3 celler. Der er et svakt bånd på ca 44 kD som tilsvarer størrelsen på hNCU-G1. I lane 4 og 5 er det et tydelig bånd på ca. 97 kD. I negativ kontroll i lane 6 hvor GST-pulldown er utført med GST-ERβ-LBD og GST-kuler uten hNCU-G1 er det visualisert samme bånd på 97 kD. I lane 7 og 8, hvor eget rensset fusjonsprotein er det et svakt bånd på samme størrelse som i lane 4-6.

## 5. Diskusjon

### 5.1 Schneider *Drosophila melanogaster* embryo celler (SL-2) som modellsystem.

I de fleste mammalske celletyper finnes det endogent hNCU-G1, og det er derfor vanskelig å måle den direkte effekten det har på hER $\alpha$  og hER $\beta$ , fordi basalresponsen er vanskelig å kontrollere. SL-2-celler har hele systemet som trengs med transkripsjonsfaktorer og posttranslasjonelle modifikasjoner, men ikke så komplekst og omfattende som det mammalske celler har. Dette gjør at man kan utføre undersøkelser uten stor interferens fra cellenes eget apparat [73].

I prosjektet ble det utført transiente transfeksjoner av SL-2 cellene som er en rask metode hvor det går ca 72 timer fra utsåing til høsting av cellene. Hvis man utfører stabil transfeksjon innebærer mye mer arbeid fordi da blir DNA inkorporert i cellenes genomiske DNA, og dette kan ta flere måneder.

I forbindelse med arbeid med *Drosophila Melanogaster* SL-2 cellene, dukket det opp ulike problemer. Dette gjaldt både uttrykk av  $\beta$ -gal i internkontrollen, og av ekspresjon av CAT stimulert av hSR-B1 promotorfragmentet. Å jobbe med levende celler er utfordrende, og det er viktig at de har optimale levevilkår for å fungere i forsøk. Problemene med SL-2 cellene har gjort arbeidet med å frembringe pålitelige og sikre data vanskelig. Målinger av antall  $\beta$ -gal enheter/min/ml, hvor verdier lå under 0,100A<sub>420</sub> ved bruk av 25 $\mu$ l i 60 minutter, ble regnet som for lave til å bruke videre. Under transiente transfeksjoner med FuGENE6 som transfeksjonsreagens, var verdiene ofte for lave til å kunne bruke prøvene videre. Etter å ha tatt opp en initiert cellebatch fra nitrogentank (kap 3.3.1) som ikke fungerte til transfeksjon, ble det kjøpt inn nye SL-2-celler fra Invitrogen. Etter 3 uker med subkultivering av cellene skulle det være mulig å oppnå god transfeksjonseffektivitet. Det ble derfor utført transfeksjon av cellene og målt  $\beta$ -gal på dem. Figur 4.22 sammenligner antall  $\beta$ -gal enheter/min/ml mellom cellebatch jeg overtok fra gruppen ved oppgavens start og nye celler. Det var 18 ganger flere  $\beta$ -gal enheter/min/ml i de gamle cellene sammenlignet med de nye, og da ble de transfektert med samme ekspresjonsvektorer og transfeksjonsreagens (FuGENE6). Andre grupper i miljøet har også hatt dårlige erfaringer med nye cellebatcher. Dette gjaldt *Cercopithecus aethiops* celler (monkey, African green) (CV1) som var levert av ATCC. De brukte FuGENE6 som transfeksjonsreagens på begge batchene, men fikk mer enn 60 %

dårligere transfeksjonseffektivitet på nye celler. Leverandøren kan garantere for at cellene er frie for infeksjon og har stabil veksthastighet, men de gir ingen garanti for optimal transfeksjonseffektivitet.

Jeg fulgte produktinformasjon til fra Invitrogen, hvor inkuberingstemperatur for SL-2 cellene er satt til 28°C [74]. Denne temperaturen har vært standard for alle transfeksjonsforsøk som har vært utført av gruppen tidligere. Det er imidlertid rapportert i litteraturen at flere velger å inkubere SL-2-cellene ved 25°C [75, 76]. Det betyr at temperaturen vi benytter er 12 % høyere som hva andre forskningsgrupper bruker. For mammalske celler som holder 37°C som sin optimale temperatur, tilsvarer dette en temperaturøkning til 41,44°C, noe som ville vært kritisk. I lys av denne informasjonen er det grunn til å vurdere om temperaturen har vært for høy, og at det kan være en mulig årsak til at ekspresjon av  $\beta$ -gal og CAT har vært lav i SL-2-cellene. Under oppgavens løp har morfologien og veksthastighet vært oppfattet som god, og blitt antatt å være normal. Dersom temperaturen har vært for høy, kan det imidlertid tenkes at cellenes apparat har brukt all sin kapasitet på proliferering, og at dette har overtatt for andre mekanismer som å uttrykke  $\beta$ -gal. I produktinformasjon fra ATCC, som også leverer SL-2-celler, er anbefalt inkubasjonstemperatur mellom 16°C – 28 °C [77]. Ut i fra denne informasjonen er det vanskelig å tolke en spesifikk temperatur som SL-2 cellene trives best i, men vi har beveget oss i øverste sjikt av det de har anbefalt. I videre arbeid kan det være interessant å senke inkubasjonstemperaturen til 25 °C.

Empirisk er det et klart samsvar mellom løse celler, og lavere vekstrate, og en påfølgende lavt uttrykk av  $\beta$ -gal/min/ml. Det er ikke funnet noe entydig svar på hvorfor cellene hadde slik ujevn vekst. I tilfeller hvor cellene ble subkultivert for tynt og for tidlig, ble det observert i fasekontrastmikroskop at det tok lenger tid enn normalt før cellene grodde tette, samt at de løsnet fra underlaget og klumpet seg. Grunnen til dette kan være at konsentrasjonen av vekstfaktorer var for lav når det ble med for lite kondisjonert medium fra den foregående flasken. De parakrine signalene vil dermed ikke fungere som normalt og på bakgrunn av denne antagelsen ble effekten av kondisjonert medium undersøkt. Det ble også undersøkt ulike fortyninger av celler, for å se hvilken effekt det har på vekstraten til cellene. Figur 4.20 og 4.21 presenterer celleantall hver 24. time frem til 72 timer. Det er ingen vesentlig forskjell på celler som har fått 1/10 volum kondisjonert medium i forhold til cellene som kun ble tilsatt nytt fullstendig medium. Det ser derfor ikke ut til at høyere konsentrasjon av vekstfaktorer har noen stor betydning for veksthastighet. I 1:10 fortyningen prolifererer cellene hyppigere enn



i 1:15 fortynningen ved alle tidsintervaller frem til 72 timer. Ut i fra disse observasjonene kunne jeg bestemme hvilke fortynninger jeg ville subkultivere å få den tettheten jeg ønsket til en gitt tid. Det var viktig i planleggingen av transfeksjonsarbeid som tar 4 døgn fra utsåing til høsting og gjennomføring av CAT-ELISA assay.

## 5.2 Optimalisering av transfeksjonsmodellen.

Det ble gjennomført titrering av celleantall for å finne det optimale antall å så ut til transfeksjon. Dette viste seg å være 500 000 celler, som vist i figur 4.2. Samme figur viser en nedgang i antall betagalenheter/ml/min hos 550 000 celler relativt til 400 000 celler. Det er vanskelig å uttale seg om årsaken til denne nedgangen. Ved proteinmålinger av lysatene fra de samme prøvene, var det antatt at det skulle bli en lineær funksjon. Imidlertid viser kurven en mer bifasisk form. Erfaringsmessig løsner cellene fra underlaget når de gror tette, mens de sitter godt festet til bunnen når de ikke er overgrodd. En mulig forklaring kan dermed være at en større andel av det totale celleantallet er med i høstingen av 550 000 celler, enn ved høstingen av de øvrige brønnene.

Ved optimalisering av mengde hER $\alpha$  og  $\beta$  viste det lave CAT verdier, og i hER $\beta$  forsøket var de for lave til å jobbe videre med. Figur 4.13. viser at det er høyest uttrykk av CAT i prøven med 110 ng pAc-hER $\alpha$ . Det var mer enn 2 ganger så mye CAT uttrykk i denne prøven i forhold til både prøven med 70 ng og 150 ng pAc-hER $\alpha$ . På grunnlag av dette ble 110 ng pr transfeksjonsprøve satt til standard i transfeksjonsmodellen. Ved optimalisering av hERalfa og beta mengde, ble det kun utført forsøk i nærvær av hNCU-G1. Dette kan være en ulempe, og det kunne være interessant å undersøke hver av konsentrasjonene i nærvær og fravær av hNCU-G1. Det kan tenkes at hNCU-G1 har større innvirkning på hER ved bruk av suboptimale mengder av kjernereseptoren.

Gruppen har tidligere brukt FuGENE6 som transfeksjonsreagens ved transfeksjon av SL-2-celler. Etter å ha fått informasjon av grupper i miljøet som har hatt god transfeksjon med Lipofectamine 2000 på mammalske COS-1 (monkey, African green, kidney) celler ble det utført en sammenligning mellom de to reagensene. Figur 4.14. viser at transfeksjon med FuGene6 har 35 ganger høyere uttrykk av  $\beta$ -gal enn cellene transfektert med Lipofectamine 2000. Cellene ble observert i lysmikroskop under fasekontrast, og det var ingen forskjell i morfologien hos cellene som var transfektert med Lipofectamine 2000.

### 5.3 hNCU-G1s effekt på hER $\beta$

I figur 4.15 og 4.16 er det presentert verdier over CAT-ekspresjon. Siden basalekspressjonen av CAT var høyere enn i prøver med pAc-hER $\beta$  var det interessant å gå over til forsøk med hER $\alpha$ . Dersom hER $\beta$  ikke har bundet tilstrekkelig til ERE i hSR-B1 promotor fragmentet, er det mulig at den hydrofobe lommen som hNCU-G1 kan binde til ved hjelp av sin NR-boks ikke har vært tilgjengelig [78]. I litteraturen er det rapportert resultater fra studier på hER $\beta$  sin konformasjon ved binding til ulike ERE, hvor forskjellige bindings seter for proteaser er tilgjengelig på kjernereseptoren ettersom hvordan den binder til DNA [71]. Dette er diskutert mer i avsnittet om hSR-B1 promotorfragment og ERE.

### 5.4 hNCU-G1s effekt på hER $\alpha$

Resultatene fra til sammen 4 forsøk, presentert i kapittel 4 figur 4.13, 4.17 og 4.18 viser en tydelig trend der basalekspressjonen av CAT er mer enn 50 % lavere enn ekspresjonen i prøvene med celler transfektert med pAc-hNCU-G1 uten pAc-hER $\alpha$ . Dette åpner for en hypotese om at hNCU-G1 fungerer som en repressor i transkripsjonsmodellen, og opptrer som en direkte aktør i transkripsjonsapparatet. Vi vet at hNCU-G1 binder til hCRBP1 promotor og fungerer som en transkripsjonsfaktor for dette genet [60]. Ny data fra Winnie Eskilds gruppe (ikke publisert) viser at hNCU-G1 binder DNA mellom aminosyrene 99-135. Repressorer kan binde direkte til DNA, og hindre PIC i å binde til promotorregionen [79]. I litteraturen er det rapportert at Late Simian Virus 40 promoter factor (LSF), fungerer både som aktivator og repressor [80, 81]. Dette proteinet har flere felles egenskaper med hNCU-G1, som f.eks. at det er lokalisert i kjernen og fungerer som en transkripsjonsfaktor, men kjernelokaliseringssignalet er fortsatt ukjent [80]. I kinetiske analyser viser at LSF øker raten av TFIIB assosiert med DNA templat *in vitro* [80]. LSF sine repressor egenskaper er også vist *in vitro* der den hemmer transkripsjon fra HIV-LTR [80]. Dette skjer ved sterisk hemming der LSF hindrer TBP i å binde seg til TATA-boksen, og ved at den inhiberer transkripsjonselongering [80]. Det er også dokumentert *in vivo* forsøk med transfekterte celler der de målte CAT ekspresjon under kontroll av HIV-1 promotoren. Studiene viste at LSF bundet til DNA rekrutterer YY1 (en HDAC1), som resulterte i tap av CAT ekspresjon [82]. I lys av disse studiene er det interessant å fremme en hypotese om at hNCU-G1 kan ha en repressor funksjon på hSR-B1 promotoren.

### 5.5 hSRC-1 som koaktivator for hER $\alpha$

hSRC-1 er en kjent kjernereseptor koaktivator fra SRC/p160 familien (steroid receptor koaktivator) som er beskrevet i introduksjonen. Det er dokumentert at hSRC-1 fungerer som koaktivator for ER $\alpha$  og  $\beta$  [34, 83].

Det ble utført transfeksjon med hSRC-1 og hER $\alpha$ , hvor hSRC-1 skulle fungere som koaktivator og øke ekspresjon av CAT reporter-genet i celler med begge aktører. Dette forsøket brukes som en kontroll på oppsettet. Figur 4.19 viser at prøve nr. 4 viser at ekspresjon av reporter-genet øker med 1,4 når hER $\alpha$  og hSRC-1 opptrer sammen, i forhold til prøven med pAc-hER $\alpha$  alene. Dette er imidlertid ingen stor økning sammenlignet med andre resultater fra litteraturen hvor det er 17 ganger mer ekspresjon av reporter-genet når hSRC-1 opptrer sammen med hER $\alpha$ . [84]. Det kan dermed synes som om det er noe i systemet som ikke fungerer tilfredsstillende, da hSRC-1 var forventet å gi en større transkripsjonsøkning. En rekke av eventuelle mangler i transkripsjonsmodellen diskuteres i senere avsnitt.

Det ble gjennomført flere transfeksjoner med samme oppsett for å repetere resultatene og gi mer og nøyaktig data.  $\beta$ -gal internkontrollen viste imidlertid altfor lave verdier til at prøvene kunne benyttes videre til målinger av CAT ekspresjon.

### 5.6. hSR-B1 promotorfragment og ERE

Det er kjent at estrogen stimulerer ekspresjon av hSR-B1, som nevnt tidligere i oppgaven [48]. På bakgrunn av dette ble hSR-B1 promotorfragmentet benyttet i transfeksjonsmodellen. De kjente ERE sekvensene i promotoren viser noe avvik fra konsensussekvensen til DNA (kap 4.1.2), og det var interessant å se hvordan disse avvikene påvirket aktiviteten til hER $\alpha$  og  $\beta$ . Det viste seg imidlertid at hER $\beta$  ikke stimulerte ekspresjon av CAT i SL-2-cellen da CAT ekspresjonen var lavere i prøver med pAc-hER $\beta$  enn basalekspressjonen i cellene (kap 4.3, figur 4.15 og 4.16). Dette indikerer at hER $\beta$  ikke er i stand til å initiere transkripsjon fra denne promotoren. Forsøkene fortsatte derfor med hER $\alpha$ , figur 4.16. Her viste basalekspressjonen seg å være betydelig lavere enn i prøvene med pAc-hER $\alpha$ , og det antas at hER $\alpha$  stimulerer til ekspresjon av CAT. Årsaken til at ekspresjonen er større med hER $\alpha$  kan være at den har større affinitet til ulike ERE enn hER $\beta$ . I litteraturen er det rapportert at hER $\beta$  generelt har en lavere E<sub>2</sub> industert transkripsjonsaktivitet enn hER $\alpha$  i transient transfekterte celler [85]. Det er også utført studier på hER $\beta$  sin evne til å binde ulike ERE som har vist at den er dårligere enn ER $\alpha$ . [71, 85]. *In vitro* forsøk med baculovirus uttrykt hER $\alpha$  og  $\beta$  hvor

transkripsjonsaktivitet ble målt på et konstruert kromatin templat, viste at den var 40 % -50 % lavere hos hER $\beta$  [85]. Dette til tross for at DBD er 97 % homologe hos de to kjernereseptorene [51] [86], men hengsel regionen i de to reseptorene har signifikant forskjellig aminosyresammensetting, og det er trolig dette området som gir reseptorene de ulike egenskapene når det gjelder binding og bøyning av DNA [72]. Ved sammenligning av de to kjernereseptorene er det N-terminal ende som divergerer mest [85] og ettersom den N-terminale enden er større hos hER $\alpha$  enn hER $\beta$  (som mangler AF-1) [30], har hER $\alpha$  flere aminosyrer til rådighet til å binde øvrige transkripsjonsfaktorer etter DNA-binding. Et eksempel er interaksjon mellom N-terminal ende av hER $\alpha$  og TBP vist *in vitro*, mens denne mekanismen ikke finnes i hER $\beta$  [85]. Det er også vist at interaksjonene mellom ERE og E<sub>2</sub> aktivert hER $\alpha$  resulterer i en bøyning av DNA, og dermed sørger for en bedre initiering av transkripsjon [72, 87]. Undersøkelser av ulike ERE sin effekt på ligandbundet hER $\alpha$  og  $\beta$ , har vist at hER som ikke binder tilstrekkelig til sitt ERE taper evne til å binde koaktivatorer, fordi den hydrofobe kløften som koaktivator binder til ikke blir tilgjengelig. Det betyr at ERE er med på å bestemme den allosteriske moduleringen kjernereseptorens interaksjon med koaktivator [88].

I lys av tidligere studier av rotter behandlet med estrogen, har det vist seg at det ikke var mulig å detektere hSR-B1 ekspresjon i binyrene til disse rottene. Årsaken til dette var fravær av adrenocorticotropic hormone (ACTH)[89]. Det viste seg at estrogenreseptoren ikke kan uttrykke SR-B1 uten stimuli fra ACTH.

Ettersom transfeksjonsmodellen min består av SL-2-celler som tilbyr et enkelt system, er det sannsynlig at ikke alle faktorer som er nødvendig for binding av hER til hSR-B1 promotoren var til stede. Det er tidligere vist at SL-2 systemet fungerte til undersøkelser av PPAR $\alpha$  under kontroll av acetyl-CoA oksidase promotoren, utført av Mariam Bouzga i gruppen. Dette garanterer ikke for at systemet fungerer for hER $\alpha$  og  $\beta$ . I litteraturen er det rapportert at studier på Hepatocyt Nuclear Factor HNF3 $\alpha$  og  $\beta$  i ko-transfekterte SL-2-celler, der det var forventet økt ekspresjon av reportergen under kontroll av uteroglobin/CC10 promotoren. Dette ga ikke resultater, og forfatterene konkluderte med at SL-2 cellene mangler nødvendige mammalske transkripsjonsfaktor homologer som bidrar til aktivering uteroglobin/CC10 promotoren [90]. I lys av disse studiene, må SL-2-cellene som transfeksjonsmodell vurderes. CAT ekspresjonen i SL-2 cellene var stort sett for lav, noe som har gitt meg lite data å jobbe med. Det kan tenkes at hER $\alpha$  og  $\beta$  er avhengig av kofaktorer for å stimulere hSR-B1 promotoren, og at SL-2-cellene mangler disse.

### 5.7. GST-pulldown og Western blot.

Etter gjentatte forsøk på å observere hNCU-G1 som koaktivator for ER $\beta$  *in vivo* uten hell, ønsket jeg å bekrefte interaksjonen som var vist med GST-pulldown i tidligere forsøk. Jeg produserte fusjonsprotein og rensset GST-hER $\beta$ -LBD og resultatene er presentert i figur 4.24. I gruppens lager var det et *E. coli* BL 21 lysat med GST-hER $\beta$ -LBD som jeg overtok fra Martin Enger. Etter å ha rensset ut fusjonsproteinet fra bakterielysattet utførte jeg pulldown med lysat fra ubehandlet JEG3 celler som har endogent hNCU-G1, i nærvær og fravær av ligand. På denne måten skulle ligandbundet GST-hER $\beta$ -LBD fungere som agn i prosedyren, og binde hNCU-G1 til videre deteksjon med antistoff og Western analyse. Antiserum SNO215 fra kanin ble brukt som primært antistoff og goat anti-rabbit IgG FAB ble brukt som sekundært. Det primære antistoffet er basert på et peptid mot de 15 siste aminosyrene i hNCU-G1 sekvensen. Det er et antiserum fra kanin og inneholder også andre antistoffer som kan detektere proteiner i tillegg til hNCU-G1.

Resultatet fra det første forsøket er presentert i figur 4.25 og bildet viser kun ett bånd, på 97 kD, i prøven med fusjonsprotein fra gruppens lager. Data fra tidligere arbeid på gruppen har antydnet at hNCU-G1 kan være ubiquitinert og derfor øker i molekylvekt. Det var dårlige signaler ved luminiscens fremkalling, og membranen svertet røntgenfilmen dårlig. Jeg antar derfor at årsaken til at jeg ikke får visualisert bånd i begge prøvene er fordi det er for lite protein på membranen. Dette kan skyldes for dårlig overføring fra gel til membran eller at det bandt lite protein til GST- kulene i selve pulldownprosedyren.

Jeg gikk derfor videre med prøvene jeg fikk resultat på og repeterte hele forsøket med noen forandringer. I figur 4.26 og 4.27 vises et tydelig bånd ved ca 97 kD, i tillegg til en rekke andre bånd av ulik størrelse og intensitet. Det mest bekymringsfulle er imidlertid at de samme båndene dukker opp også i prøven som var ment å være negativ kontroll, dvs. der hNCU-G1 ikke er tilsatt. Det kan dermed tyde på at de båndene som detekteres er uspesifikk binding til protein fra *E. coli* BL 21 bakterielysattet. Det er mulig at andre proteiner i bakterielysattet har bundet uspesifikt til glutathion og GST-hER $\beta$ -LBD under prosedyren, og at antiserumet SNO215, eller det sekundære goat anti-rabbit IgG har bundet til disse peptidene. (figur 4.26). I prøven der det er tilsatt JEG3 lysat og GST-kuler, er det ingen bånd, noe som antyder at det ikke er noe i JEG3 lysattet som binder til glutathione.

I prøvene der det kun er tilsatt lysat fra ubehandlede JEG3 celler, dukker det opp et bånd i riktig størrelse, men også et bånd på ca 30 kD. Det er vanskelig å uttale seg om hva dette siste

båndet er. Dette båndet skulle også være mulig å observere i alle brønner der JEG3 lysat er tilsatt. I forsøket vist i figur 4.27, er det også lagt til to prøver med den egenproduserte GST-fusjonen (tabell 4.8), og her er et svakt bånd på ca 97 kD. Siden dette fusjonsproteinet også er rensset fra *E.coli* BL 21 lysat, antar jeg at dette kommer fra bakterielysattet.

Den tidligere antagelsen om at hNCU-G1 får en molekylvekt på 97 kD etter en eventuell ubiquitinerings av proteinet er svekket, siden de samme båndene vises i negativ kontroll uten hNCU-G1. Jeg har lite informasjon om hva som egentlig har blitt gjort med BL-21 lysatet fra gruppens lager, da Martin Enger ikke er tilgjengelig for informasjon.

Et problem som ofte oppstår når man kjører GST-pulldown på proteiner er at genomisk DNA og RNA i cellelysattet interagerer med målproteiner. De negativt ladde nukleinsyrene binder seg til positivt ladde proteiner, og da særlig transkripsjonsfaktorer som har DNA-bindende domener [43]. Fordi hNCU-G1 er vist å binde DNA, kan det være tilfelle at den har bundet genomisk DNA og frie nukleinsyrer fra JEG3 cellene. Dermed får man ikke fanget hNCU-G1 med fusjonsproteinet, og andre proteiner binder uspesifikt til GST-ER $\beta$ -LBD og glutathion i kulene. Man kan forsøke å unngå dette problemet ved å tilsette DNase og RNase samtidig med lyseringsbuffer ved lysing av JEG3 celler. Da jeg rensset GST-fusjonen, ble det tilsatt DNase, men ikke RNase. RNA vil også binde positivt ladde proteiner, og for å hindre dette kan man tilsette RNase i bakterielysattet.

## 6. Konklusjon

Ut i fra resultatene oppnådd her, kan det synes som om hER $\alpha$  har høyere affinitet for ERE i hSR-B1-promotoren sammenlignet med hER $\beta$ .

Det virker ikke som om hNCU-G1 fungerer som en koaktivator for verken hER $\alpha$  eller hER $\beta$ , men derimot ser det ut som hNCU-G1 fungerer som en repressor på hSR-B1 promotoren.

### 6.1 Fremtidig arbeid:

- Ved å lage ulike mutanter av ERE i hSR-B1 promotorfragmentet kan man se hvor lite avvik fra konsensus sekvensen ERE må være for at hER $\beta$  kan binde og stimulere ekspresjon av reportergen.
- I GST pulldown forsøk kan man tilsette DNase og RNase i tidlig i lyseringen av JEG3 celler og *E.coli* B1 21 lysat, og undersøke om dette hindrer uspesifikk binding av proteiner til glutathion.
- Utføre Western Blot der man sammenligner prøver som kun blir tilsatt sekundært antistoff med samme prøver som blir tilsatt både primært og sekundært. Dermed kan det detekteres om goat anti-rabbit binder til andre proteiner enn primært antistoff.
- Utføre Western blot med preimmunt serum, for å detektere de proteinene som andre antistoffer fra kaninen har bundet.

## Appendiks

Matrealer og løsninger.

### **Løsninger**

#### **1% Agarosegel**

50 ml 1X TAE buffer

0,50 g Agarose

12 µl EtBr 2,5 mg/ml

#### **100 mg/ml ampicilin (stock løsning)**

0,5 g ampicilin salt

5 ml milliQ / ddH<sub>2</sub>O

Fordel i alikvoter

Oppbevares ved – 20 ° C

#### **10% Ammoniumpersulfat (APS)**

0,10 g ammoniumpersulfat

1,0 ml milliQ

Oppbevares i alikvoter i kjøleskap,

I løst form har den en holdbarhet på 7 dager.

#### **Avfargingsløsning:**

450 ml metanol

100 ml eddiksyre

450 dH<sub>2</sub>O

#### **β-galactosidase stoppløsning.**

1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

β-galactosidase stanses ved økning i pH

#### **Coomaise brilliant blue fargeløsning:**

450 ml metanol

100 ml eddiksyre

450 dH<sub>2</sub>O

0,25 g Coomaise Brilliant Blue R-250

Coomaise BB løses i metanol før tilsetning av vann og eddiksyre.



**Fresh complete Medium til Drosophila S2 celler.**

49% Schreiner's Drosophila medium.

10 % FCS Fatal Calf Serum (varmeinaktivert på 56°C i 30 min)

1% Glutamin

1% antibiotika (pen-strep)

**Frysemedium til S2 celler:**

45% kondisjonert fullstendig Schneider's Drosophila medium. (fra cellekultur)

45 % nytt fullstendig Schneider's Drosophila medium

10% DMSO

**Lyseringsbuffer pH 4,8 (Løsning II)**

2 ml 1 M NaOH

1 ml 10% SDS

7 ml dH<sub>2</sub>O

**LB-medium**

10 g baktotrypton

5 g gjærekstrakt

10 g NaCl

dH<sub>2</sub>O til en liter

1 ml 1M NaOH

Autoklaveres ved 121°C i 20 min.

Etter avkjøling til under 50 °C tilsettes ønsket antibiotikum.

Eks. Ampicilin: 75 µg/ ml

**LB-skåler**

500 ml LB-medium

10 g baktoagar

Autokleveres ved 121 °C i 20 min.

Etter avkjøling til under 50 °C tilsettes ønsket antibiotikum.

Fordeles så i skåler. Oppbevares mørkt i 4°C inntil 2 uker.

**Vann og NaCl mettet isopropanol**

Tilsett vann og NaCl til isopropanol

Rist godt og la det stå litt

Fortsett tilsetning av vann og NaCl til det er en tydelig vannfase nederst, og en del uløst NaCl på bunnen.

**NETN-buffer:**

50 mM Tris pH 7,4

100 mM NaCl

MgCl 1mM

10% glyserol

0,5% NP-40

**ONPG stockløsning 4 mg/ml**

4 mg/ml løses i dH<sub>2</sub>O.

Oppbevares ved -20 °C

**10x PBS (Fosfatbufret Saline):**

80 g NaCL

2 g KCL

7,64 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

milliQ til 1 l

**1x PBS med Tween**

50 ml 10 x PBS

0,5 ml Tween (0,1 %)

dH<sub>2</sub>O til 500 ml

(pH justeres automatisk fra pH 8 til pH 7,4 ved fortykning til 1 x PBS)

**1x PBS med Tween med 5 % melkepulver**

50 ml 1x PBS Tween

2,5 g melkepulver

**Resuspenderingsbuffer (Løsning 1)**

12,5 ml 2M glukose

12,5 ml 1M tris

10 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

**SDS-PAGE****Separerende gel 10%**

3,60 ml milliQ

3,75 ml 1,5 Tris/0,4 % SDS pH 8,8.

2,50 ml 40% 29:1 acrylamid/bisacrylamid

Umiddelbart før støping av gel tilsettes

5 µl TEMED

50 µl 10%APS

Gelen støpes. For jevn overflate tilsettes litt dH<sub>2</sub>O. Etter at gelen har polymerisert fjernes vannet med Whatman papir.

**Konsentrerende (stacking gel) 4%**

3,30 ml milliQ

1,25 ml 0,5M Tris/ 0,4% SDS pH 6,8

Umiddelbart før støping av gel tilsettes

5 µl TEMED

25 µl 10% APS

**10X SDS running buffer:**

30 g Trizma base

144 g Glycin

100 ml 10% SDS

dH<sub>2</sub>O til 1 liter**SDS loading buffer**

	<b>1X</b>	<b>2X</b>	<b>3X</b>
0,5 M Tris, pH 6,8	1,25 ml	2,5 ml	3,75 ml
10% SDS	2,3 ml		
SDS tørrstoff		0,46 ml	0,69 ml
Glycerol	1,00 ml	2,00 ml	3,00 ml
Bromfenylblått	0,10 mg	0,20 mg	0,30 ml
B-merkaptolanol	0,50 ml	1,00 ml	1,50 ml
dH <sub>2</sub> O	4,95 ml	4,50 ml	1,75 ml

**SOB- medium**

10 g baktotrypton

2,5 g gjærekstrakt

0,29 g NaCl

625 µl 2M KCl

milliQ til 490 ml

Autoklaveres ved 121 °C i 20 min, og oppbevares ved 4 °C

Rett før bruk tilsettes følgende sterilfiltrerte løsninger:

5 ml 1M MgCl<sub>2</sub>

5 ml 1M MgSO<sub>4</sub>

**50X TAE buffer**

242 g Tris base

57,1 ml iseddik

37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA \* 2H<sub>2</sub>O

dH<sub>2</sub>O til en liter

**1M Tris:**

60,55 g Tris 7

450 ml dH<sub>2</sub>O

**TE-buffer**

0,61 g Tris-base

0,186 g EDTA Na<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O

dH<sub>2</sub>O til 500 ml

Juster til ønsket pH med NaOH eller HCl

**Transferbuffer**

15 g Trizma base

72,5 glycin

1 l metanol

dH<sub>2</sub>O til 5 l

**Z-buffer**

60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1 mM MgSO<sub>4</sub>

40 mM β-merkapttoetanol

dH<sub>2</sub>O til X volum

Oppbevares ved 4 ° C opp til en måned

Uten tilsetning av  $\beta$ -merkaptoetanol kan buffere oppbevares over lengre tid.

### **X-gal solution**

0,2 % X-Gal

2mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> x 3H<sub>2</sub>O

5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>

### **Kjemikalier**

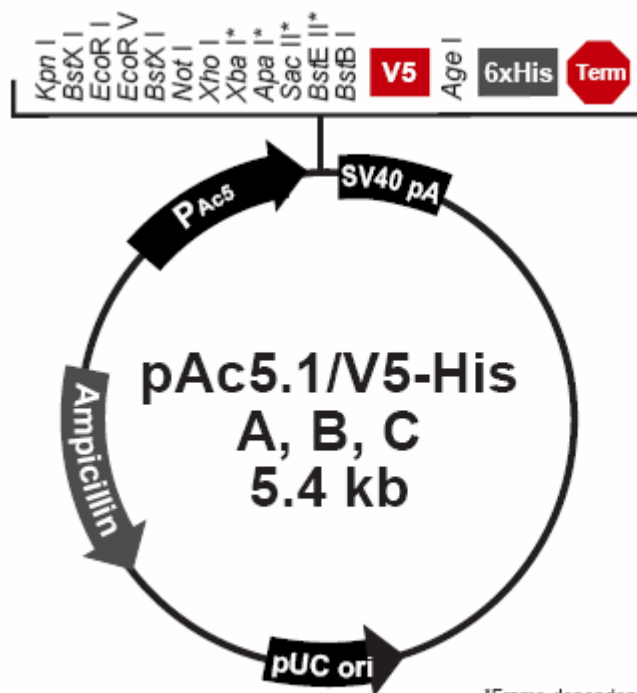
Agarose, LE	Seakem
40% 29:1 Acrylamid	Biosolve
Agar Bacteriological	Oxoid
Ampicilin, Na- salt	Sigma
Bradford protein assay	Biorad
Bovint serum albumin, BSA	Sigma
Ceciumklorid	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250	
DMSO: Dimethyl sulfoxid	Sigma
EDTA	AppliChem
Eddiksyre	Arcus
Etanol	Arcus
Etidiumbromid	Sigma
Fatal Calf Serum	BioWittaker
L-Glutamin	BioWittaker
Glutaraldehyd (25%)	BioWittaker
Glyserol	MERCK
Isopropanol, 2-Propanol	MERCK
Kalium heksacyano-ferrat(III) K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> (99%)	Sigma
Kalium heksacyano-ferrat(II) trihydrat (K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> x 3H <sub>2</sub> O	Sigma
Kaliumklorid (KCL)	Sigma
Lysosym	Sigma
Magnesiumklorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma
Magnesiumsulfat (MgSo <sub>4</sub> )	Sigma
Metanol	MERCK
B-merkaptoetanol	MERCK
Natriumhydroksid (NaOH)	SDS

Natriumkarbonat (NaCO <sub>3</sub> )	MERCK	
Natriumklorid (NaCl)	MERCK	di-
Natriumhydrogenfosfat dihydrat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	MERCK	
di-Natriumhydrogenfosfat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MERCK	
Natriumdihydrogenforfat, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MERCK	
ONPG	Sigma	
Pen/Strep Fungozone mix	BioWittager	
Proteasehemmer		
Proteasehemmer		
Schneider Drosophila Medium, modifisert	BioWittager	
SDS		
TEMED	Sigma	
Triton X-100	Sigma	
Trypton	Oxoid	
Tween 100	Sigma	
Yeast extract	Oxoid	
X-gal	Promega	

**Kit:**

Minipreps Wisard ®	Cat no: 12163
Rapid DNA ligation Kit	Cat no: 1 635 329
CAT-ELISA	Cat no: 1 363 727
FuGENE6 Transfection Reagent	Cat no: 27-9602-01
Chemiluminescentt substrat,	
Hyperfilm ECL:	Cat no: RPN313103K
High performance chemiluminisence film:	
Bulk GST Purification module	Cat. no: 27-4570-01
Antiserum SNO215	
Goat-anti-rabbit IgG	Zymed

## Plasmidkart



B-000808

\*Frame-dependent variations.

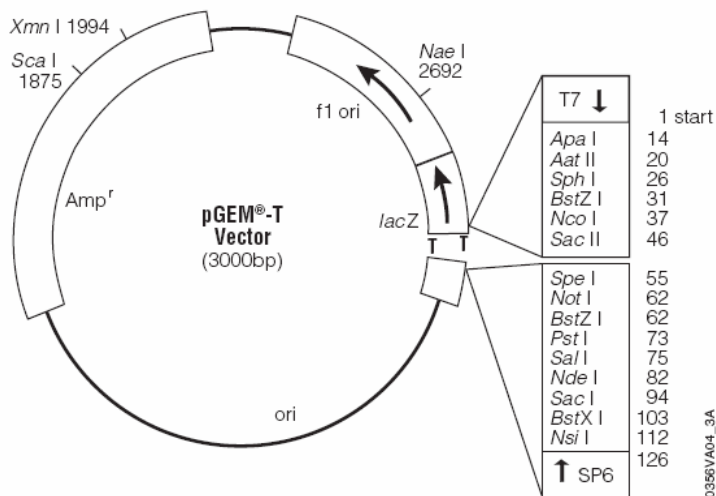
Xba I and Apa I are found only in versions A and B.

Sac II is found only in version B.

BstE II is found only in version C.

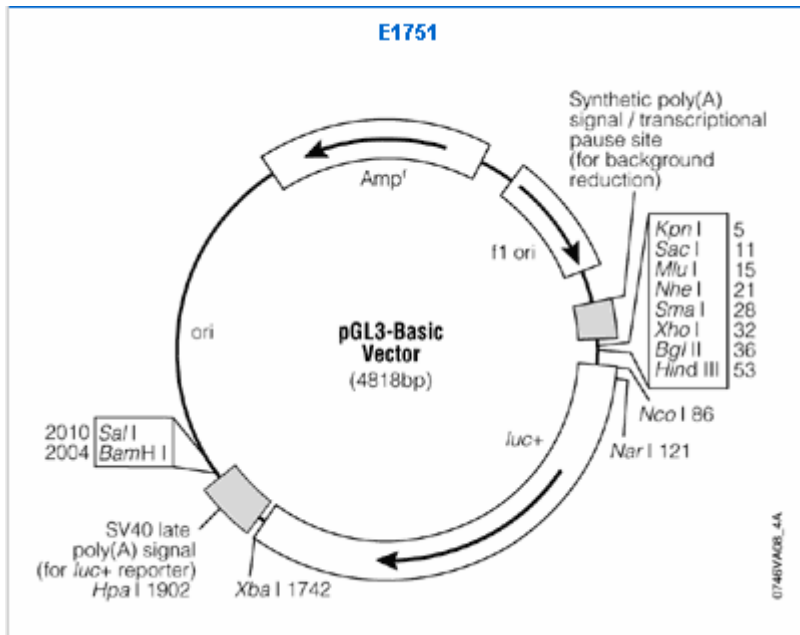
pAc5.1/V5-His fra Invitrogen har en sterk konstitutiv promoter fra *Drosophila* aktin 5C gent. Denne promoteren gir høy konstitutiv ekspresjon av rekombinant protein i SL-2-celler.

pSG5 er en eukaryot ekspresjonsvektor med

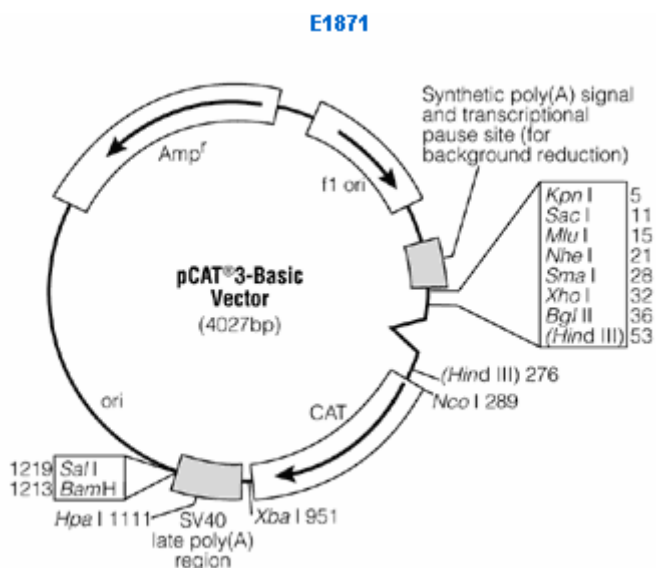


pGEM-T Easy vektoren ble brukt til konstruksjon av pAc.5.1-ER $\beta$ . Dette systemet gir en enkel måte bearbeide et PCR produkt. ER $\beta$  ble kuttet ut fra pGEM med AgeI og XhoI, og deretter ligert inn i pAc.5.1 med de rette overheng.



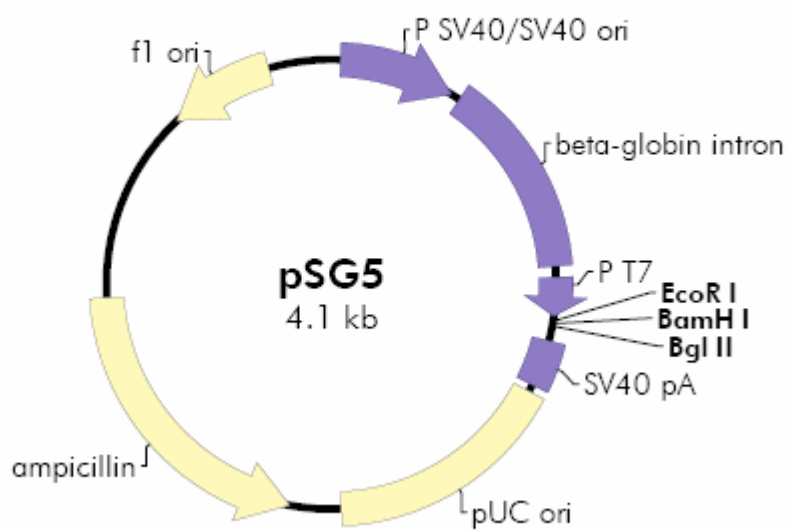


Eukatot ekspresjonsvektor som uttrykker Luciferase.



pCAT-basic vektoren fra Promega inneholder ikke eukaryote promoter eller enhancersekvenser. Uttrykk av CAT i transfekterte celler avhenger dermed av insersjonen av en funksjonell promoter oppstrøms for CAT-genet. Her er hSRB1-promoterens klonet inn mellom KpnI og BglII setet i MCS.

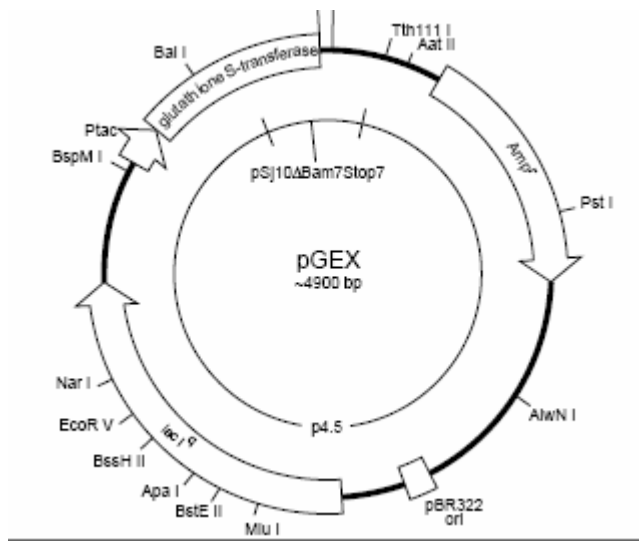
### The pSG5 Vector



pSG5 fra Stratagene. Eukaryot ekspresjonsvektor med SV40 promotor. hER $\beta$  var klonet inn i denne vektoren ved arbeidets start.

**pGEX-5X-3 (27-4586-01)**

Factor Xa  
 Ile Glu Gly Arg Gly Ile Pro Arg Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp  
 ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCG AGG AAT TCC CCG GTC GAC TCG AGC GGC CGC ATC GTG ACT GAC TGA  
 BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I Stop codons

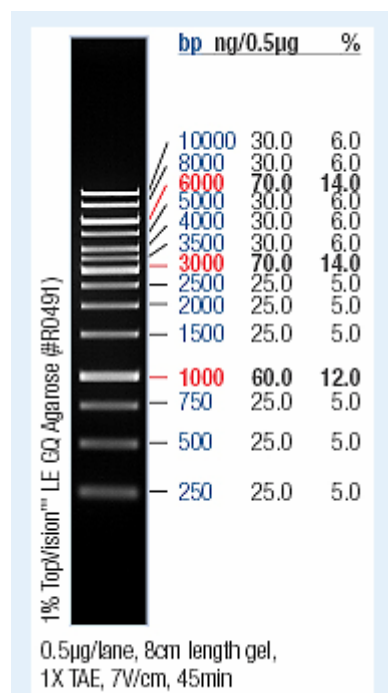
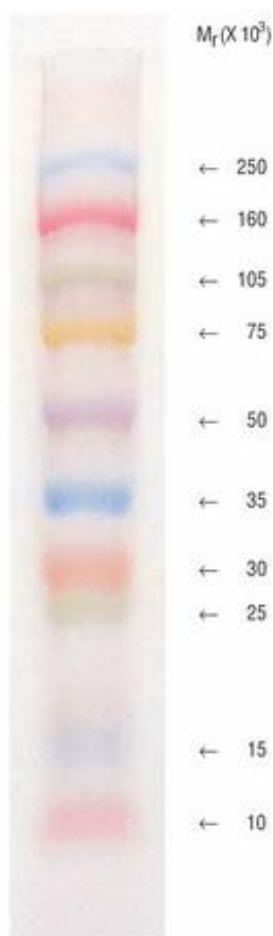


pGEX-5X-3 fra Amersham Pharmacia Biotech er benyttet til å produsere hERβ-LBD i fusjon med GST(gluthatione S-transferase)

Standarder

Rainbow <sup>14</sup>C Protein Vekts Markør.

DNA markør , Fermentas.



Tabell over de Mw på proteinene i Rainbowmarkøren som benyttet i prosjektet.

Protein	M	CFA626	CFA756
Myosin	220 000	-	-
Fosforylase b	97 000	-	-
BSA	66 000	-	-
Ovalbumin	45 000	-	-
Carbonic anhydrase	30 000	-	-
Trypsin inhibitor	20 100	-	-
Lysozym	14 300	-	-

## Sekvenser

**hERβ cDNA ORF, 1590 bp.**

ATGGATATAA AAAACTCACC ATCTAGCCTT AATTCTCCTT CCTCCTACAA CTGCAGTCAA  
 TCCATCTTAC CCCTGGAGCA CGGCTCCATA TACATACCTT CCTCCTATGT AGACAGCCAC  
 CATGAATATC CAGCCATGAC ATTCTATAGC CCTGCTGTGA TGAATTACAG CATTCCCAGC  
 AATGTCACTA ACTTGGAAGG TGGGCCTGGT CGGCAGACCA CAAGCCCAAA TGTGTTGTGG  
 CCAACACCTG GGCACCTTTC TCCTTTAGTG GTCCATCGCC AGTTATCACA TCTGTATGCG  
 GAACCTCAAA AGAGTCCCTG GTGTGAAGCA AGATCGCTAG AACACACCTT ACCTGTAAAC  
 AGAGAGACAC TGAAAAGGAA GGTTAGTGGG AACCGTTGCG CCAGCCCTGT TACTGGTCCA  
 GGTTCAAAGA GGGATGCTCA CTTCTGCGCT GTCTGCAGCG ATTACGCATC GGGATATCAC  
 TATGGAGTCT GGTCGTGTGA AGGATGTAAG GCCTTTTTTTA AAAGAAGCAT TCAAGGACAT  
 AATGATTATA TTTGTCCAGC TACAAATCAG TGTACAATCG ATAAAAACCG GCGCAAGAGC  
 TGCCAGGCCT GCCGACTTCG GAAGTGTTAC GAAGTGGGAA TGGTGAAGTG TGGCTCCCGG  
 AGAGAGAGAT GTGGGTACCG CCTTGTGCGG AGACAGAGAA GTGCCGACGA GCAGCTGCAC  
 TGTGCCGGCA AGGCCAAGAG AAGTGGCGGC CACGCGCCCC GAGTGCGGGA GCTGCTGCTG  
 GACGCCCTGA GCCCCGAGCA GCTAGTGCTC ACCCTCCTGG AGGCTGAGCC GCCCCATGTG  
 CTGATCAGCC GCCCCAGTGC GCCCTTCACC GAGGCCTCCA TGATGATGTC CCTGACCAAG  
 TTGGCCGACA AGGAGTTGGT ACACATGATC AGCTGGGCCA AGAAGATTCC CGGCTTTGTG  
 GAGCTCAGCC TGTTGACCA AGTGCGGCTC TTGGAGAGCT GTTGGATGGA GGTGTTAATG  
 ATGGGGCTGA TGTGGCGCTC AATTGACCAC CCCGGCAAGC TCATCTTTGC TCCAGATCTT  
 GTTCTGGACA GGGATGAGGG GAAATGCGTA GAAGGAATTC TGGAAATCTT TGACATGCTC  
 CTGGCAACTA CTTCAAGGTT TCGAGAGTTA AACTCCAAC ACAAAGAATA TCTCTGTGTC  
 AAGGCCATGA TCCTGCTCAA TTCCAGTATG TACCCTCTGG TCACAGCGAC CCAGGATGCT  
 GACAGCAGCC GGAAGCTGGC TCACTTGCTG AACGCCGTGA CCGATGCTTT GGT'TTGGGTG  
 ATTGCCAAGA GCGGCATCTC CTCCAGCAG CAATCCATGC GCCTGGCTAA CCTCCTGATG  
 CTCCTGTCCC ACGTCAGGCA TCGGAGTAAC AAGGGCATGG AACATCTGCT CAACATGAAG  
 TGCAAAAATG TGGTCCCAGT GTATGACCTG CTGCTGGAGA TGCTGAATGC CCACGTGCTT  
 CGCGGGTGCA AGTCCTCCAT CACGGGGTCC GAGTGCAGCC CGGCAGAGGA CAGTAAAAGC  
 AAAGAGGGCT CCCAGAACCC ACAGTCTCAG

**pGEM-T-hERβ alligment mot hERβ cDNA.**

sequence1	-----
sequence2	GGGGCGCGCGCCGGGAGACCCCCCTAATGCGGGAAAAGCACGTGTCCGCATTTTAGAGA
sequence1	-----TCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGCGCCGCGACTAGTGATTGGC
sequence2	AGGCAAGGCCGGTGTGTTTATCTGCAAGCCATTATACTTGCCACGAATCTTTGAGAACA * * * * * * * * * * * * * * *
sequence1	TCGAGATGACCTTTGTGCCTCTTCTTGCAAGGTGTTTTCTCAGCTGTTATCTCAAGACAT
sequence2	TTATAATGACCTTTGTGCCTCTTCTTGCAAGGTGTTTTCTCAGCTGTTATCTCAAGACAT * * * * * * * * * * * * * * *
sequence1	GGATATAAAAACTCACCATCTAGCCTTAATTCTCCTTCCTCTACAACCTGCAGTCAATC
sequence2	GGATATAAAAACTCACCATCTAGCCTTAATTCTCCTTCCTCTACAACCTGCAGTCAATC * * * * * * * * * * * * * * *
sequence1	CATCTTACCCCTGGAGCACGGCTCCATATACATACCTTCCTCCTATGTAGACAGCCACCA
sequence2	CATCTTACCCCTGGAGCACGGCTCCATATACATACCTTCCTCCTATGTAGACAGCCACCA * * * * * * * * * * * * * * *
sequence1	TGAATATCCAGCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATTCCCAGCAA
sequence2	TGAATATCCAGCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATTCCCAGCAA * * * * * * * * * * * * * * *
sequence1	TGTCACTAACTTGAAGGTGGGCCTGGTCGGCAGACCACAAGCCCAAATGTGTTGTGGCC
sequence2	TGTCACTAACTTGAAGGTGGGCCTGGTCGGCAGACCACAAGCCCAAATGTGTTGTGGCC * * * * * * * * * * * * * * *
sequence1	AACACCTGGGCACCTTTCTCCTTTAGTGGTCCATCGCCAGTTATCACATCTGTATGCGGA
sequence2	AACACCTGGGCACCTTTCTCCTTTAGTGGTCCATCGCCAGTTATCACATCTGTATGCGGA * * * * * * * * * * * * * * *
sequence1	ACCTCAAAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAGATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAG
sequence2	ACCTCAAAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAGATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAG * * * * * * * * * * * * * * *
sequence1	AGAGACACTGAAAAGGAAGGTTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCTGTTACTGGTCCAGG
sequence2	AGAGACACTGAAAAGGAAGGTTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCTGTTACTGGTCCAGG * * * * * * * * * * * * * * *
sequence1	TTCAAAAGAGGGATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGGATATCACTA
sequence2	TTCAAAAGAGGGATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGGATATCACTA * * * * * * * * * * * * * * *
sequence1	TGGAGTCTGGTCTGTGAAGGATGTAAGGCCTTTTTTAAAAGAAGCATTCAAGGACATAA
sequence2	TGGAGTCTGGTCTGTGAAGGATGTAAGGCCTTTTTTAAAAGAAGCATTCAAGGACATAA * * * * * * * * * * * * * * *
sequence1	TGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGATAAAAACCGGCGCAAGAGCTG
sequence2	TGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGATAAAAACCGGCGCAAGAGCTG * * * * * * * * * * * * * * *
sequence1	CCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTTACGAA-----
sequence2	CCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTTACGAAAGTGGGAATGGTGAAGTGTGGCTCCCGGAG * * * * * * * * * * * * * * *

```

sequence1 -----
sequence2 CGCCCTGAGCCCCGAGCAGCTAGTGCTCACCTCCTGGAGGCTGAGCCGCCCATGTGCT

sequence1 -----TGTCCCTGACCAAGTT
sequence2 GATCAGCCGCCCCAGTGCGCCCTTCACCGAGGCCTCCATGATGATGTCCTGACCAAGTT
*****

sequence1 GGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAGCTGGGCCAAGAAGATTCCCGGCTTTGTGGA
sequence2 GGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAGCTGGGCCAAGAAGATTCCCGGCTTTGTGGA
*****

sequence1 GCTCAGCCTGTTTCGACCAAGTACGGCTCTTGGAGAGCTGTTGGATGGAGGTGTTAATGAT
sequence2 GCTCAGCCTGTTTCGACCAAGTACGGCTCTTGGAGAGCTGTTGGATGGAGGTGTTAATGAT
*****

sequence1 GGGGCTGATGTGGCGCTCAATTGACCACCCCGCAAGCTCATCTTTGCTCCAGATCTTGT
sequence2 GGGGCTGATGTGGCGCTCAATTGACCACCCCGCAAGCTCATCTTTGCTCCAGATCTTGT
*****

sequence1 TCTGGACAGGGATGAGGGGAAATGCGTAGAAGGAATTCTGGAAATCTTTGACATGCTCCT
sequence2 TCTGGACAGGGATGAGGGGAAATGCGTAGAAGGAATTCTGGAAATCTTTGACATGCTCCT
*****

sequence1 GGCAACTACTTCAAGGTTTCGAGAGTTAAAACCTCCAACACAAAAGAATATCTCTGTGTCAA
sequence2 GGCAACTACTTCAAGGTTTCGAGAGTTAAAACCTCCAACACAAAAGAATATCTCTGTGTCAA
*****

sequence1 GGCCATGATCCTGCTCAATTCCAGTATGTACCTCTGGTCAACAGCGACCCAGGATGCTGA
sequence2 GGCCATGATCCTGCTCAATTCCAGTATGTACCTCTGGTCAACAGCGACCCAGGATGCTGA
*****

sequence1 CAGCAGCCGGAAGCTGGCTCACTTGCTGAACGCCGTGACCGATGCTTTGGTTTGGGTGAT
sequence2 CAGCAGCCGGAAGCTGGCTCACTTGCTGAACGCCGTGACCGATGCTTTGGTTTGGGTGAT
*****

sequence1 TGCCAAGAGCGGCATCTCCTCCCAGCAGCAATCCATGCGCCTGGCTAACCTCCTGATGCT
sequence2 TGCCAAGAGCGGCATCTCCTCCCAGCAGCAATCCATGCGCCTGGCTAACCTCCTGATGCT
*****

sequence1 CCTGTCCCACGTCAGGCATGCGAGTAACAAGGGCATGGAACATCTGCTCAACATGAAGTG
sequence2 CCTGTCCCACGTCAGGCATGCGAGTAACAAGGGCATGGAACATCTGCTCAACATGAAGTG
*****

sequence1 CAAAAATGTGGTCCCAGTGTATGACCTGCTGCTGGAGATGCTGAATGCCACGTGCTTCG
sequence2 CAAAAATGTGGTCCCAGTGTATGACCTGCTGCTGGAGATGCTGAATGCCACGTGCTTCG
*****

sequence1 CGGGTGCAAGTCTCCATCACGGGGTCCGAGTGCAGCCCGGCAGAGGACAGTAAAAGCAA
sequence2 CGGGTGCAAGTCTCCATCACGGGGTCCGAGTGCAGCCCGGCAGAGGACAGTAAAAGCAA
*****

sequence1 AGAGGGCTCCCAGAACCACAGTCTCANNAACCGGTGGATCCCGCGG
sequence2 AGAGGGCTCCCAGAACCACAGTCTCAGTGA-----
*****

```

pGEM-T-hER $\beta$   $\Delta$  55-457

-----

sequence2 TTATAATGACCTTTGTGCCTTCTTCAAGGTGTTTTCTCAGCTGTTATCTCAAGACAT

sequence1 -----CCCATATGGTCGACCTGCAGTCAATC

sequence2 GGATATAAAAACTCACCATCTAGCCTTAATCTCCTTCTCCTACAACCTGCAGTCAATC

\*\*\* \*\*

sequence1 CATCTTACCCCTGGAGCACGGCTCCATATACATACCTTCTCCTATGTAGACAGCCACCA

sequence2 CATCTTACCCCTGGAGCACGGCTCCATATACATACCTTCTCCTATGTAGACAGCCACCA

\*\*\*\*\*

sequence1 TGAATATCCAGCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATCCCAGCAA

sequence2 TGAATATCCAGCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATCCCAGCAA

\*\*\*\*\*

sequence1 TGCTACTAACTTGAAGGTGGCCTGGTCGGCAGACCACAAGCCCAAATGTGTTGTGGCC

sequence2 TGCTACTAACTTGAAGGTGGCCTGGTCGGCAGACCACAAGCCCAAATGTGTTGTGGCC

\*\*\*\*\*

sequence1 AACACCTGGGCACCTTCTCCTTTAGTGGTCCATCGCCAGTTATCACATCTGTATGCGGA

sequence2 AACACCTGGGCACCTTCTCCTTTAGTGGTCCATCGCCAGTTATCACATCTGTATGCGGA

\*\*\*\*\*

sequence1 ACCTCAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAGATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAG

sequence2 ACCTCAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAGATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAG

\*\*\*\*\*

sequence1 AGAGACTGAAAAGGAAGGTTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCTGTTACTGGTCCAGG

sequence2 AGAGACTGAAAAGGAAGGTTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCTGTTACTGGTCCAGG

\*\*\*\*\*

sequence1 TTCAAAGAGGGATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGGATATCACTA

sequence2 TTCAAAGAGGGATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGGATATCACTA



```

*****
sequence1      TGGAGTCTGGTCGTGTGAAGGATGTAAGGCCTTTTTTAAAAGAAGCATTCAAGGACATAA
sequence2      TGGAGTCTGGTCGTGTGAAGGATGTAAGGCCTTTTTTAAAAGAAGCATTCAAGGACATAA
*****

sequence1      TGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGATAAAAACCGGCGCAAGAGCTG
sequence2      TGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGATAAAAACCGGCGCAAGAGCTG
*****

sequence1      CCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTACGAAGTGGGAATGGTGAAGTGTGGCTCCCGGAG
sequence2      CCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTACGAAGTGGGAATGGTGAAGTGTGGCTCCCGGAG
*****

sequence1      AGAGAGATGTGGGTACCGCCTTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTG
sequence2      AGAGAGATGTGGGTACCGCCTTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTG
*****

sequence1      TGCCGCAAGGCCAAGAGAAGTGGCGGCCACGCGCCCCGAGTGCGGGAGCTGCTGCTGGA
sequence2      TGCCGCAAGGCCAAGAGAAGTGGCGGCCACGCGCCCCGAGTGCGGGAGCTGCTGCTGGA
*****

sequence1      CGCCCTGAGCCCCGAGCAGCTAGTGCTCACCTCCTGGAGGCTGAGCCGCCCATGTGCT
sequence2      CGCCCTGAGCCCCGAGCAGCTAGTGCTCACCTCCTGGAGGCTGAGCCGCCCATGTGCT
*****

sequence1      GATCAGCCGCCCCAGTGCGCCCTTCACCGAGGCCTCCATGATGATGTCCCTGACCAAGTT
sequence2      GATCAGCCGCCCCAGTGCGCCCTTCACCGAGGCCTCCATGATGATGTCCCTGACCAAGTT
*****

sequence1      GGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAGCTGGGCCAAGAAGATTCCCGGCTTTGTGGA
sequence2      GGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAGCTGGGCCAAGAAGATTCCCGGCTTTGTGGA
*****

sequence1      GCTCAGCCTGTTCGACC-----
sequence2      GCTCAGCCTGTTCGACCAAGTGGGCTCTTGGAGAGCTGTTGGATGGAGGTGTTAATGAT
*****

```

```

sequence1 -----
sequence2 GGGGCTGATGTGGCGCTCAATTGACCACCCCGCAAGCTCATCTTTGCTCCAGATCTTGT

sequence2 AGAGGGCTCCCAGAACCCACAGTCTCAGTGA

```

### hSR-B1-promotorfragment 3081 bp

```

GAATTCAATGAAGTGATATTAATTAATTAATCAATCGATCAGTTACTTGATTAATTAATGAGTTAATTAGCTGAT
TGAGTAAAGTATTTATTGAGTACCTGCTATGTGCCAGGCATTTTTCCAGGTGCTGGAGATACATCGATAAGCAAA
ACAGGGTCAGCTTCTGTCTCTCGGGAGCTGGAGGAGATGAACAAGGAAACAGATAAGACCATTTACACAAAAGCA
AGGTGGCCTGACAGAGTGGGCTGGGACTCCTGTTTTCAACAGATGCAACAGCAAAGGCTTCTCTGAGGAGTGGGT
TTCAGCTGAGCCCAGAAGAGGAGAGTGGGGAGCCATGGAAGGATCTAGGGGAAGCGTATCCTAGACAGAGGAACA
GGAAGTGCAAAGTTCCTGACACAAGAAAAAGCTGGGGATGCTCAATGAACTGAAACAATGGGGGAGAGGGCAGGA
GATGGAGGCAGAGAGATGGGCAGGCGCCAGTTCATGTGGGTCCGGAAAATAACGACGACACTCCCAGCTCAGTT
GCACTGACACATTCCAGGGACTGTTCTAAGCACTGGCACATTTTTTTGACTTGTTAATCCTCATGGTAGCCCTTG
GAAAGGGGCTCTTCTAATCCCCGTTTTCGTAGATGAGGAGACTGAGGCACAGAAAGGCCAAACCACTTGCCCCAG
GACTCCAATGTGGGAAACCCAGAGCCTGGATTTCTCTGAACCTGTCCCCGGGGCTACCACAGTCTCACCTCAG
CCACTCTGACCTCCCTCAGGAGTTGGGCCCTGCCCCTTGGGGCACTGGACCATATTCGGCCTCCTTAGAGGAAGG
CAGTGCCAGGCAAAGCTGTCTAACGAGAACATAGCAGGTGCTCTGTAAATATTGGTTCAGGCGAAGACATGTTGC
TTAAGGATGGCCCTGCGAGAAGGCTGCTTTCTTCTGGAGTTAAATAAGAGGTTTAGAAAGCCTCCCTCGGAGCAC
TCAAGGACTGAGCCTGCCTTACCCACGTGCTGGGGACACCACCTCCTGTCCCTGTGTAACCCAGGAGTCTCTTC
TCAGTAACTTCATTCAGAAAATGAGGGGACTGGCCAGCACTTCAGGGACCAGAAGGCAGGCCAGGTGGGGTGTGG
TGGAGGACTTCAGGGGGGCGTGGAGGGCTTCAGGGATACACTCACCCATCTAAGGGCAACTGCCACTTAGTGCCA
GCCACTTCTCTCCCTTTTTTCTTTTTTCTTTTTTCCCCAGGGTCTTGCTGTCACCCAGGCTGGAGTGCGGTGGT
AAGATCAGGGCTCACTGCAGCCTTGAACCTCTGGGACTCAAGGGATCCTTCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGG
GCGACAAGCGCATGCCACTGTGGCTGGTTAATCTTTTCATTTTCTGTAGAGACTGGTCTCACTATGTTGCCAGG
CTGGTCTCCAAGTAGTGGCCTCAAGTGATCCCTCACCTGGACCTTCCAAAGTGCTGGGATTACAGTTGTGGGCCA
CCATGCACCGGGCCTGTTCTGTTTTCTTGGAGCACTTGCCCTGCAATTATCCTTCATTCATTTGCTCACGTGCTCA
TCATTGGTTTTCCCTCTTCATTAGAAAAGTGGGGACTTGGTTTTGGGTTAACTAAGCTTCCCTGTGCATCAGTTTTCA
TTTTTTCTTTCTTTTTCTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGATGGAGTTTCGCTCTTGTGCCCAGGCT
GGAGTGCAATGGCGCTATCTCGGCTCGCCACAACCTCCGCCTCCCGGGTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTC
CCGAGTAGCTGAGATTACAGGCATGCGCCACTACGCCTGGCTAATTTTGTATTGTTAGTAGAGACGGGGTTTCGC
CATGTTGGTCAGGCTGGTCTCCAACCTCCCGACCTCAGGTGATCCATGAAGTCCACCCGCTCGGCCCTCCAAAGT
GCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCTCCCAGTTTTCTTATTGTAAAATGGAGCCATTGTGTGCAAAGCACTCAGG
ACAGGGGCCAGCACCTAGAAGGCTCCTCAGTCATTCATTCTAGAATATTTACTGTGAGCAGGCATTCCTGCCAG
GCCACGTTCTAGAGCTCAGGACGCGTGGGGGGGGGGCCCCGCTCACGGGTGGCATCCCAGTTGGAGCACATGG

```

TCAGAATGCAAGGACGCAAATGAACGTGAACCTGCCAGGGGGTGCTCAGTCATAGGGTGATGGTGGCACCAGCGT  
TACGAAGGATAGGGCCAGGCGGATACCTGGGAGAACAGAATTGCCTGTGCAGGGTGATGGAGGCCCTGGGGCTG  
GAGCCTGCGGGGCTTCTTCCAGGGACAGTGAGGCTGGAGATGGACTGCGGAGATGAGGGTCTAGAAGGTGGTGGC  
GGGGCATGTGGACCGTTGTAAGGGCTCTGGGGTTCTGGGTGGGCTGGCGAAGTCTACTCACAGTGACCAACCA  
TGATGATGGTCCCGATAGAGGAGGAGAGGGAGGAGGGAAAAGGAAGGGTGAGGGGCTCAGAGGGGAGAGCTG  
GGAGGAGGGGAGACATAGGTGGGGGAAGGGTAGGAGAAAAGGGGAAGGGAGCAAGAGGGTGAGGGGCACCAGGCC  
CCATAGACGTTTTTGGCTCAGCGGCCACGAGGCCTCCTCAGCTCCCGCCCCAAAACGGAAGCGAGGCCGTGGGGGC  
AGCGGCA

GCATGGCGGGGCTTGTCTTGGCGGCCATGGCCCCGCCCCCTGCCCGTCCGATCAGCGCCCCGCCCCGTCCCCGCC  
CCGACCCCCGCCCCGGGCCCCGCTCAGGCCCGCCCCCTGCCGCCGAATCCTGAAGCCCAAGGTGCCCGGGGGCGG  
TCCGGCGGCGCCGGCGATGGGGCATAAAACCACTGGCCACCTGCCGGGCTGCTCCTGCGTGCGCTGCCGTCCCGG  
ATCCACCGTGCCTCTGCGGCCTGCGTGCCCGGAGTCCCCGCTGTGTGCTCTGTGCGCGTCCCCGTCTCTCTGC  
CAGGCGCGGAGCCCTGCGAGCCGCGGGTGGGCCCCAGGCGCGGGGCTCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGG

**Human Scavenger receptor cDNA**

CGTCGCCGTCCCCGTCTCCTGCCAGGCGCGGAGCCCTGCGAGCCGCGGGTGGGCCCCAGGCGCGCAGACA  
TGGGCTGCTCCGCCAAAGCGCGCTGGGCTGCCGGGGCGCTGGGCGTCCGCGGGGCTACTGTGCGCTGTGCT  
GGGCGCTGTCATGATCGTGATGGTGCCGTGCTCATCAAGCAGCAGGTCTTAAGAACGTGCGCATCGAC  
CCCAGTAGCCTGTCTTCAACATGTGGAAGGAGATCCCTATCCCCTTCTATCTCTCCGTCTACTTCTTTG  
ACGTCATGAACCCCAGCGAGATCCTGAAGGGCGAGAAGCCGCAGGTGCCGGGAGCGCGGGCCCTACGTGTA  
CAGGGAGTCCAGGCACAAAAGCAACATCACCTTCAACAACAACGACACCCGTGTCTTCCCTCGAGTACCGC  
ACCTTCCAGTTCCAGCCCTCCAAGTCCCACGGCTCGGAGAGCGACTACATCGTCATGCCCAACATCCTGG  
TCTTGGGTGCGGCGGTGATGATGGAGAATAAGCCCATGACCCTGAAGCTCATCATGACCTTGGCATTAC  
CACCTCGGCGAACGTGCCTTTCATGAACCGCACTGTGGGTGAGATCATGTGGGGCTACAAGGACCCCTT  
GTGAATCTCATCAACAAGTACTTTCCAGGCATGTTCCCCTTCAAGGACAAGTTCGGATTATTTGCTGAGC  
TCAACAACCTCCGACTCTGGGCTCTTACGGTGTTACGGGGGTCCAGAACATCAGCAGGATCCACCTCGT  
GGACAAGTGAACGGGCTGAGCAAGGTTGACTTCTGGCATTCCGATCAGTGCAACATGATCAATGGAAC  
TCTGGGCAAATGTGGCCGCCCTTTCATGACTCCTGAGTCCCTCGCTGGAGTTCTACAGCCCGGAGGCTGCC  
GATCCATGAAGCTAATGTACAAGGAGTCAAGGGTGTGTTGAAGGCATCCCACCTATCGCTTCTGTTGGCTCC  
CAAAACCCTGTTTGCCAACGGGTCCATCTACCCACCCAACGAAGGCTTCTGCCCGTGCCTGGAGTCTGGA  
ATTCAGAACGTGACACCTGCAGGTTGAGTCCCCCTTGTCTTCTCTCCCATCCTCACTTCTCAACGCCG  
ACCCGGTTCTGGCAGAAGCGGTGACTGGCCTGCACCCTAACCCAGGAGGCACACTCCTTGTTCCTGGACAT  
CCACCCGGTACGGGAATCCCATGAACTGCTCTGTGAAACTGCAGCTGAGCCTCTACATGAAATCTGTC  
GCAGGCATTGGACAAACTGGGAAGATTGAGCCTGTGGTCTGCCGCTGCTCTGGTTTGCAGAGAGCGGGG  
CCATGGAGGGGGAGACTCTTACACATTCTACACTCAGCTGGTGTGATGCCCAAGGTGATGCACTATGC  
CCAGTACGTCCTCCTGGCGCTGGGCTGCGTCTGCTGCTGGTCCCTGTCTATCTGCCAAATCCGGAGCCAA  
GAGAAATGCTATTTATTTTGGAGTAGTAGTAAAAAGGGCTCAAAGGATAAGGAGGCCATTCAGGCCTATT  
CTGAATCCCTGATGACATCAGCTCCCAAGGGCTCTGTGCTGCAGGAAGCAAACTGTAGGGTCTCTGAGGA  
CACCGTGAGCCAGCCAGGCCTGGCCGCTGGGCTGACCGGCCCCCAGCCCTACACCCCGCTTCTCCCG

GACTCTCCCAGCAGACAGCCCCCAGCCCCACAGCCTGAGCCTCCCAGCTGCCATGTGCCTGTTGCACAC  
 CTGCACACACGCCCTGGCACACATACACACATGCGTGCAGGCTTGTGCAGACACTCAGGGATGGAGCTGC  
 TGCTGAAGGGACTTGTAGGGAGAGGCTCGTCAACAAGCACTGTTCTGGAACCTTCTCTCCACGTGGCCCA  
 CAGGCTGACCACAGGGGCTGTGGGTCTGCGTCCCCTTCTCGGGTGAGCCTGGCCTGTCCCGTTCAGCC  
 GTTGGGCCAGGCTTCTCCCCTCCAAGGTGAAACTGCAGTCCCGGTGTGGTGGCTCCCCATGCAGGAC  
 GGGCCAGGCTGGGAGTGCCGCCTTCTGTGCCAAATTCAGTGGGGACTCAGTGCCAGGCCCTGGCACGA  
 GCTTTGGCCTTGGTCTACCTGCCAGGCCAGGCAAAGCGCCTTTACACAGGCCCTCGGAAAAAATGGAGTG  
 AGCACAAGATGCCCTGTGCAGCTGCCCGAGGGTCTCCGCCACCCCCGGCCGGACTTTGATCCCCCGAAG  
 TCTTACAGGCACTGCATCGGGTTGTCTGGCGCCCTTTTCTCCAGCTAAACTGACATCATCTATGGA  
 CTGAGCCGGCCACTCTCTGGCCGAAGTGGCGCAGGCTGTGCCCCGAGCTGCCCCACCCCCTCACAGGG  
 TCCCTCAGATTATAGGTGCCAGGCTGAGGTGAAGAGGCCTGGGGGCCCTGCCTTCCGGGCGCTCTGGA  
 CCCTGGGGCAAACCTGTGACCCTTTTCTACTGGAATAGAAATGAGTTTTATCATCTTTGAAAAATAATTC  
 ACTCTGAAGTAATAAACGTTTAAAAAATGGAAAAAATAAAAAA

**hNCU-G1 cDNA**

1 gaattgcggc cgtatgcgcg gctctgtgga gtgcacctgg ggttgggggc actgtgcccc  
 61 cagccccctg ctcccttggga ctctacttct gtttgcagcc ccatttggcc tgctggggga  
 121 gaagaccgcg caggtgtctc tggaggatcat ccctaactgg ctgggcccccc tgcagaacct  
 181 gcttcatata cgggcagtggt gcaccaatc cactactgcac tatgtgtgga gcagcctggg  
 241 gcctctggca gtggtaatgg tggccacca cccccccac agcaccctga gcgtcaactg  
 301 gagcctcctg ctatccctg agcccgatgg gggcctgatg gtgctcccta aggacagcat  
 361 tcagtcttct tctgcccctg tttttaccag gctgcttgag ttgacagca ccaactgtc  
 421 cgatacggca gcaaagcctt tgggaagacc atactcctca tactccttgg ccgatttctc  
 481 ttggaacaac atcactgatt cattggatcc tgccaccctg agtgccacat tcaaggcca  
 541 ccccatgaac gaccctacca ggacttttgc caatggcagc ctggccttca gggccaggc  
 601 cttttccagg tccagccgac cagcccaacc ccctcgcctc ctgcacacag cagacacctg  
 661 tcagctagag gtggccctga ttggagcctc tccccgggga aaccgttccc tgtttgggct  
 721 ggaggtagcc acattgggccc agggccctga ctgcccctca atgcaggagc agcactccat  
 781 cgacgatgaa tatgcaccgg ccgtcttcca gttggaccag ctactgtggg gctccctccc  
 841 atcaggcttt gcacagtggc gaccagtggc ttactcccag aagccggggg gccgagaatc  
 901 agccctgccc tgccaagctt cccctcttca tctgcctta gcatactctc ttcccagtc  
 961 acccattgtc cgagccttct ttgggtccca gaataacttc tgtgccttca atctgacgtt  
 1021 cggggcttcc acaggccctg gctattggga ccaacactac ctcagctggt cgatgctcct  
 1081 ggggtgtggg ttccctccag tggacggcct gtccccacta gtcctgggca tcatggcagt  
 1141 ggccctgggt gccccagggc tcatgctgct agggggcggc ttggttctgc tgctgcacca  
 1201 caagaagtac tcagagtacc agtcataaaa ttaaggcccg ctctctggag ggaaggacat  
 1261 tactgaacct gtcttgctgt gcctcgaaac tctggaggtt ggagcatcaa gttccagccg  
 1321 gccccttcac tccccatct tgcctttctg tggaaacctc gagggcagcc tcgacttctc  
 1381 ggagaccccc aggtggggct tccttcatac ttgttgggg gactttggag gcgggcaggg  
 1441 gacagggcta ttgataaggt ccccttgggt ttgccttctt gcactctcac acatttccct  
 1501 tggatgggac ttgcaggcct aatatgagag cattctgact ggttggctgc cctggaaggc  
 1561 aagaaaatag atttatTTTT tttcaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

**hNCU åpen leseramme på 1218 bp translert til aa sekvens.**

1 - GAATTGCGGCCGTATGCGCGGCTCTGTGGAGTGCACCTGGGGTTGGGGGCACTGTGCCCC - 60  
 1 - N C G R M R G S V E C T W G W G H C A P - 20  
  
 61 - CAGCCCCCTGCTCCTTTGGACTCTACTTCTGTTTGCAGCCCCATTTGGCCTGCTGGGGGA - 120  
 21 - S P L L L W T L L L F A A P F G L L G E - 40  
  
 121 - GAAGACCCGCCAGGTGTCTCTGGAGGTCATCCCTAACTGGCTGGGCCCCCTGCAGAACCT - 180  
 41 - K T R Q V S L E V I P N W L G P L Q N L - 60  
  
 181 - GCTTCATATACGGGCAGTGGGCACCAATTCCACACTGCACTATGTGTGGAGCAGCCTGGG - 240  
 61 - L H I R A V G T N S T L H Y V W S S L G - 80  
  
 241 - GCCTCTGGCAGTGGTAATGGTGGCCACCAACACCCCCACAGCACCTGAGCGTCAACTG - 300  
 81 - P L A V V M V A T N T P H S T L S V N W -  
 100  
  
 301 - GAGCCTCCTGCTATCCCCTGAGCCCGATGGGGGCTGATGGTGCTCCCTAAGGACAGCAT - 360  
 101 - S L L L S P E P D G G L M V L P K D S I -  
 120  
  
 361 - TCAGTTTTCTTCTGCCCTTGTTTTTACCAGGCTGCTTGAGTTTGACAGCACCAACGTGTC - 420  
 121 - Q F S S A L V F T R L L E F D S T N V S -  
 140  
  
 421 - CGATACGGCAGCAAAGCCTTTGGGAAGACCATATCCTCCATACTCCTTGCCGATTTCTC - 480  
 141 - D T A A K P L G R P Y P P Y S L A D F S -  
 160  
  
 481 - TTGGAACAACATCACTGATTCATTGGATCCTGCCACCCTGAGTGCCACATTTCAAGGCCA - 540  
 161 - W N N I T D S L D P A T L S A T F Q G H -  
 180  
  
 541 - CCCCATGAACGACCCTACCAGGACTTTTGCCAATGGCAGCCTGGCCTTCAGGGTCCAGGC - 600  
 181 - P M N D P T R T F A N G S L A F R V Q A -  
 200

601 - CTTTTCCAGGTCCAGCCGACCAGCCCAACCCCTCGCCTCCTGCACACAGCAGACACCTG - 660  
 201 - F S R S S R P A Q P P R L L H T A D T C -  
 220

661 - TCAGCTAGAGGTGGCCCTGATTGGAGCCTCTCCCCGGGAAACCGTTCCTGTTTGGGCT - 720  
 221 - Q L E V A L I G A S P R G N R S L F G L -  
 240

721 - GGAGGTAGCCACATTGGGCCAGGGCCCTGACTGCCCTCAATGCAGGAGCAGCACTCCAT - 780  
 241 - E V A T L G Q G P D C P S M Q E Q H S I -  
 260

781 - CGACGATGAATATGCACCGCCGTCTTCCAGTTGGACCAGCTACTGTGGGGCTCCCTCCC - 840  
 261 - D D E Y A P A V F Q L D Q L L W G S L P -  
 280

841 - ATCAGGCTTTGCACAGTGGCGACCAGTGGCTTACTCCCAGAAGCCGGGGGCGGAGAATC - 900  
 281 - S G F A Q W R P V A Y S Q K P G G R E S -  
 300

901 - AGCCCTGCCCTGCCAAGCTTCCCCTCTTCATCCTGCCTTAGCATACTCTCTTCCCAGTC - 960  
 301 - A L P C Q A S P L H P A L A Y S L P Q S -  
 320

961 - ACCCATTGTCCGAGCCTTCTTTGGGTCCCAGAATAACTTCTGTGCCTTCAATCTGACGTT -  
 1020

321 - P I V R A F F G S Q N N F C A F N L T F -  
 340

1021 - CGGGGCTTCCACAGGCCCTGGCTATTGGGACCAACACTACCTCAGCTGGTTCGATGCTCCT -  
 1080

341 - G A S T G P G Y W D Q H Y L S W S M L L -  
 360

1081 - GGGTGTGGGCTTCCCTCCAGTGGACGGCTTGTCCCCACTAGTCTGGGCATCATGGCAGT -  
 1140

361 - G V G F P P V D G L S P L V L G I M A V -  
 380

---

1141 - GGCCCTGGGTGCCCCAGGGCTCATGCTGCTAGGGGGCGGCTTGGTTCTGCTGCTGCACCA -  
1200

381 - A L G A P G L M L L G G G L V L L L H H -  
400

1201 - CAAGAAGTACTCAGAGTACCAGTCCATAAATTAAGGCCCGCTCTCTGGAGGAAGGACAT -  
1260

401 - K K Y S E Y Q S I N \*

## Referanser

1. Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* *116*, 259-272.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2004). *The Molecular Biology of the Cell*.
3. Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* *64*, 435-459.
4. Utley, R.T., Ikeda, K., Grant, P.A., Cote, J., Steger, D.J., Eberharter, A., John, S., and Workman, J.L. (1998). Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* *394*, 498-502.
5. Schneider, J., and Shilatifard, A. (2006). Histone demethylation by hydroxylation: chemistry in action. *ACS Chem Biol* *1*, 75-81.
6. Peters, A.H., and Schubeler, D. (2005). Methylation of histones: playing memory with DNA. *Curr Opin Cell Biol* *17*, 230-238.
7. Nowak, S.J., and Corces, V.G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* *20*, 214-220.
8. Pham, A.D., and Sauer, F. (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* *289*, 2357-2360.
9. Muchardt, C., and Yaniv, M. (1999). ATP-dependent chromatin remodelling: SWI/SNF and Co. are on the job. *J Mol Biol* *293*, 187-198.
10. Deng, W., and Roberts, S.G. (2005). A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes Dev* *19*, 2418-2423.
11. Gross, P., and Oelgeschlager, T. (2006). Core promoter-selective RNA polymerase II transcription. *Biochemical Society symposium*, 225-236.
12. Butler, J.E., and Kadonaga, J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* *16*, 2583-2592.
13. Kadonaga, J.T. (2004). Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* *116*, 247-257.
14. Merika, M., and Thanos, D. (2001). Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev* *11*, 205-208.
15. Huh, J.R., Park, J.M., Kim, M., Carlson, B.A., Hatfield, D.L., and Lee, B.J. (1999). Recruitment of TBP or TFIIB to a promoter proximal position leads to stimulation of RNA polymerase II transcription without activator proteins both in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* *256*, 45-51.
16. Gabrielsen, O.S. Responselement til kjernereseptorer. In Powerpoint. (ikke publisert).
17. Li, X.Y., Virbasius, A., Zhu, X., and Green, M.R. (1999). Enhancement of TBP binding by activators and general transcription factors. *Nature* *399*, 605-609.
18. Strahs, D., Barash, D., Qian, X., and Schlick, T. (2003). Sequence-dependent solution structure and motions of 13 TATA/TBP (TATA-box binding protein) complexes. *Biopolymers* *69*, 216-243.
19. Thomas, M.C., and Chiang, C.M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* *41*, 105-178.
20. Wu, S.Y., and Chiang, C.M. (2001). TATA-binding protein-associated factors enhance the recruitment of RNA polymerase II by transcriptional activators. *J Biol Chem* *276*, 34235-34243.
21. Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G.,



- Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81, 1535-1565.
22. Nettles, K.W., and Greene, G.L. (2005). Ligand control of coregulator recruitment to nuclear receptors. *Annu Rev Physiol* 67, 309-333.
  23. Manninen, T., Purmonen, S., and Ylikomi, T. (2005). Interaction of nuclear receptors with hsp90 in living cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96, 13-18.
  24. Rastinejad, F. (2001). Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol* 11, 33-38.
  25. Khorasanizadeh, S., and Rastinejad, F. (2001). Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem Sci* 26, 384-390.
  26. Nagy, L., and Schwabe, J.W. (2004). Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci* 29, 317-324.
  27. Hoffmann, J., and Sommer, A. (2005). Steroid hormone receptors as targets for the therapy of breast and prostate cancer--recent advances, mechanisms of resistance, and new approaches. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93, 191-200.
  28. Edwards, D.P. (2000). The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, 307-324.
  29. Kjernereseptor Aop-form og Holo-form. In [www.cmbi.kun.nl/edu/bioinf4/fri-Prac/nr.shtml](http://www.cmbi.kun.nl/edu/bioinf4/fri-Prac/nr.shtml).
  30. Hall, J.M., McDonnell, D.P., and Korach, K.S. (2002). Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol* 16, 469-486.
  31. Savkur, R.S., and Burris, T.P. (2004). The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res* 63, 207-212.
  32. Barkhem, T., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (2004). Molecular mechanisms, physiological consequences and pharmacological implications of estrogen receptor action. *Am J Pharmacogenomics* 4, 19-28.
  33. Fu, M., Wang, C., Zhang, X., and Pestell, R. (2003). Nuclear receptor modifications and endocrine cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 133-138.
  34. Leo, C., and Chen, J.D. (2000). The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245, 1-11.
  35. Brown, C.E., Lechner, T., Howe, L., and Workman, J.L. (2000). The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci* 25, 15-19.
  36. Xu, L., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9, 140-147.
  37. Matthews, J., and Gustafsson, J.A. (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 3, 281-292.
  38. Belakavadi, M., and Fondell, J.D. (2006). Role of the mediator complex in nuclear hormone receptor signaling. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 156, 23-43.
  39. Xu, J., and Li, Q. (2003). Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol* 17, 1681-1692.
  40. Wallberg, A.E., Flinn, E.M., Gustafsson, J.A., and Wright, A.P. (2000). Recruitment of chromatin remodelling factors during gene activation via the glucocorticoid receptor N-terminal domain. *Biochemical Society transactions* 28, 410-414.
  41. Xu, W., Cho, H., and Evans, R.M. (2003). Acetylation and methylation in nuclear receptor gene activation. *Methods Enzymol* 364, 205-223.
  42. Lewis, B.A., and Reinberg, D. (2003). The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *J Cell Sci* 116, 3667-3675.
  43. Stallcup, M.R., Kim, J.H., Teyssier, C., Lee, Y.H., Ma, H., and Chen, D. (2003). The

- roles of protein-protein interactions and protein methylation in transcriptional activation by nuclear receptors and their coactivators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 139-145.
44. Fernandes, I., and White, J.H. (2003). Agonist-bound nuclear receptors: not just targets of coactivators. *J Mol Endocrinol* 31, 1-7.
  45. Jenster, G. (1998). Coactivators and corepressors as mediators of nuclear receptor function: an update. *Mol Cell Endocrinol* 143, 1-7.
  46. Srivastava, R.A. (2003). Scavenger receptor class B type I expression in murine brain and regulation by estrogen and dietary cholesterol. *J Neurol Sci* 210, 11-18.
  47. Moore, K.J., and Freeman, M.W. (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1702-1711.
  48. Cohen, J., Gaw, A., Barnes, R.I., Landschulz, K.T., and Hobbs, H.H. (1996). Genetic factors that contribute to interindividual variations in plasma low density lipoprotein-cholesterol levels. *Ciba Found Symp* 197, 194-206; discussion 206-110.
  49. Deroo, B.J., and Korach, K.S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 116, 561-570.
  50. Howell, A. (2006). Pure oestrogen antagonists for the treatment of advanced breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 13, 689-706.
  51. Hall, J.M., and McDonnell, D.P. (2005). Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv* 5, 343-357.
  52. Pearce, S.T., and Jordan, V.C. (2004). The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 50, 3-22.
  53. Klinge, C.M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 29, 2905-2919.
  54. Katzenellenbogen, B.S., and Katzenellenbogen, J.A. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2, 335-344.
  55. Gruber, C.J., Gruber, D.M., Gruber, I.M., Wieser, F., and Huber, J.C. (2004). Anatomy of the estrogen response element. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 15, 73-78.
  56. Gupta, P.B., and Kuperwasser, C. (2006). Contributions of estrogen to ER-negative breast tumor growth. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102, 71-78.
  57. Singh, R.R., and Kumar, R. (2005). Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. *J Cell Biochem* 96, 490-505.
  58. Kloosterboer, H.J., and Ederveen, A.G. (2002). Pros and cons of existing treatment modalities in osteoporosis: a comparison between tibolone, SERMs and estrogen (+/- progestogen) treatments. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83, 157-165.
  59. Bruno, D., and Feeney, K.J. (2006). Management of postmenopausal symptoms in breast cancer survivors. *Semin Oncol* 33, 696-707.
  60. Eskild, W. (2006). Prosjektbeskrivelse.
  61. Chong, Y.P., Mulhern, T.D., and Cheng, H.C. (2005). C-terminal Src kinase (CSK) and CSK-homologous kinase (CHK)--endogenous negative regulators of Src-family protein kinases. *Growth Factors* 23, 233-244.
  62. Steffensen, K.R., Enger, M.d.V., Bouzga, M., Karahasan, A., Orby, R., Guérin, S., and Eskild, W. Human NCU-G1 functions as a co-activator of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha.
  63. Miniprep Wizard DNA Plasmid Purification Protocol. In <http://www.promega.com/tbs/tb117/tb117.pdf>. (Promega).
  64. Product information, Gel Band Purification Kit. In

- <http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&parentid=27960201&moduleid=39955#content>. (GE Healthcare).
65. Rapid Ligation Kit, Protocol. In <http://www.rpgroup.caltech.edu/courses/aph162/2006/Protocols/RocheRapidDNALigation.pdf>. (Roche).
  66. Roche, H.-L. <http://www.bris.ac.uk/biochemistry/stephens/fugene.pdf>. p. FuGene 6 Protocol.
  67. Lipofectamine 2000, Protocol. In [http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/ProtocolFile.cgi/afcs\\_PP00000182.pdf?pid=PP00000182](http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/ProtocolFile.cgi/afcs_PP00000182.pdf?pid=PP00000182). (Invitrogen).
  68. Protein assay, Bradford. In [http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C10/C10Links/www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem\\_353/BRADFORD.html](http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C10/C10Links/www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/BRADFORD.html).
  69. NTNU Western Blot analyse. In <http://boneslab.bio.ntnu.no/BI211/WesternBlotting.html>.
  70. Landschulz, K.T., Pathak, R.K., Rigotti, A., Krieger, M., and Hobbs, H.H. (1996). Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest* 98, 984-995.
  71. Klinge, C.M., Jernigan, S.C., Mattingly, K.A., Risinger, K.E., and Zhang, J. (2004). Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. *J Mol Endocrinol* 33, 387-410.
  72. Schultz, J.R., Loven, M.A., Melvin, V.M., Edwards, D.P., and Nardulli, A.M. (2002). Differential modulation of DNA conformation by estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 277, 8702-8707.
  73. Suske, G. (2000). Transient transfection of Schneider cells in the study of transcription factors. *Methods Mol Biol* 130, 175-187.
  74. Invitrogen <https://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/3912.pdf>. In *Drosophila melanogaster* S-2 cells.
  75. Johansson, D.X., Drakenberg, K., Hopmann, K.H., Schmidt, A., Yari, F., Hinkula, J., and Persson, M.A. (2007). Efficient expression of recombinant human monoclonal antibodies in *Drosophila* S2 cells. *J Immunol Methods* 318, 37-46.
  76. Henriksen, M.A., Betz, A., Fuccillo, M.V., and Darnell, J.E., Jr. (2002). Negative regulation of STAT92E by an N-terminally truncated STAT protein derived from an alternative promoter site. *Genes Dev* 16, 2379-2389.
  77. Product Information SL-2 Cells. In <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CRL-1963>. (ATCC).
  78. Loven, M.A., Likhite, V.S., Choi, I., and Nardulli, A.M. (2001). Estrogen response elements alter coactivator recruitment through allosteric modulation of estrogen receptor beta conformation. *J Biol Chem* 276, 45282-45288.
  79. Kumar, R., Wang, R.A., and Barnes, C.J. (2004). Coregulators and chromatin remodeling in transcriptional control. *Mol Carcinog* 41, 221-230.
  80. Veljkovic, J., and Hansen, U. (2004). Lineage-specific and ubiquitous biological roles of the mammalian transcription factor LSF. *Gene* 343, 23-40.
  81. Coull, J.J., Romerio, F., Sun, J.M., Volker, J.L., Galvin, K.M., Davie, J.R., Shi, Y., Hansen, U., and Margolis, D.M. (2000). The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. *J Virol* 74, 6790-6799.
  82. Drouin, E.E., Schrader, C.E., Stavnezer, J., and Hansen, U. (2002). The ubiquitously expressed DNA-binding protein late SV40 factor binds Ig switch regions and

- 
- represses class switching to IgA. *J Immunol* 168, 2847-2856.
83. Lee, J.W., Lee, Y.C., Na, S.Y., Jung, D.J., and Lee, S.K. (2001). Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. *Cell Mol Life Sci* 58, 289-297.
  84. Gee, A.C., Carlson, K.E., Martini, P.G., Katzenellenbogen, B.S., and Katzenellenbogen, J.A. (1999). Coactivator peptides have a differential stabilizing effect on the binding of estrogens and antiestrogens with the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 13, 1912-1923.
  85. Ramsey, T.L., Risinger, K.E., Jernigan, S.C., Mattingly, K.A., and Klinge, C.M. (2004). Estrogen receptor beta isoforms exhibit differences in ligand-activated transcriptional activity in an estrogen response element sequence-dependent manner. *Endocrinology* 145, 149-160.
  86. Melvin, V.S., Harrell, C., Adelman, J.S., Kraus, W.L., Churchill, M., and Edwards, D.P. (2004). The role of the C-terminal extension (CTE) of the estrogen receptor alpha and beta DNA binding domain in DNA binding and interaction with HMGB. *J Biol Chem* 279, 14763-14771.
  87. Klinge, C.M., Jernigan, S.C., Smith, S.L., Tyulmenkov, V.V., and Kulakosky, P.C. (2001). Estrogen response element sequence impacts the conformation and transcriptional activity of estrogen receptor alpha. *Mol Cell Endocrinol* 174, 151-166.
  88. Geserick, C., Meyer, H.A., and Haendler, B. (2005). The role of DNA response elements as allosteric modulators of steroid receptor function. *Mol Cell Endocrinol* 236, 1-7.
  89. Stangl, H., Graf, G.A., Yu, L., Cao, G., and Wyne, K. (2002). Effect of estrogen on scavenger receptor BI expression in the rat. *J Endocrinol* 175, 663-672.
  90. Braun, H., and Suske, G. (1998). Combinatorial action of HNF3 and Sp family transcription factors in the activation of the rabbit uteroglobin/CC10 promoter. *J Biol Chem* 273, 9821-9828.