



UiT Norges arktiske universitet

Det helsevitenskapelige fakultet  
Institutt for Farmasi  
Forskningsgruppe i Farmakologi

## **Studie av glukokortikoidreseptoren (GR) og transkripsjonsfaktoren PAX6 i linseceller under oksidativt stress**

Viktorja Sareussen Mellem  
Masteroppgave i Farmasi, FAR-3911  
Høst 2020 – Vår 2021

Veileder: Ingvild Mikkola





# Forord

Masteroppgaven ble gjennomført ved Forskningsgruppen for Farmakologi ved IFA – Institutt for Farmasi ved UiT, Norges arktiske universitet i perioden august 2020 - mai 2021. Veileder for masteroppgaven var Ingvild Mikkola.

Arbeidet med masteroppgaven har vært en intensiv, men lærerik periode hvor jeg har fått et innblikk i labmetoder og forskning. Det har vært noen utfordring knyttet til Covid-19, hvor mye av det som ikke var relatert til det praktiske labarbeidet har måtte foregå over Zoom. Likevel synes jeg dette har vært løst på en god måte.

Først og fremst vil jeg takke veilerederen min, Ingvild, for god veiledning underveis, både med labarbeid og under skrivingen.

Jeg vil også rette en stor takk til Rune Hogseth for god opplæring og hjelp på lab, og Hanne Kildalsen for opplæring med qPCR.

I tillegg vil jeg takke min familie, venner og samboer for all støtte og motivasjon gjennom arbeidet med masteroppgaven.

Tromsø, Mai 2021

Viktorija Sareussen Mellem

## Sammendrag

Det er kjent at PAX6 er en transkripsjonsfaktor som spiller en viktig rolle for normal utvikling og funksjon i øyet. Mutasjoner i PAX6 eller langvarig bruk av glukokortikoider er assosiert med patologiske tilstander i øyet, som indikerer at begge faktorene er viktig for øyets normale funksjoner. Øyet utsettes for oksidativt stress, og det er tidligere rapportert at både PAX6 og glukokortikoidreseptoren (GR) i andre vev vil kunne påvirkes av oksidativt stress. I dette studiet ble en linse-epitelcellelinje (B3) brukt som modellsystem for å studere hvilken konsekvens det får for normale funksjoner som vekst og overlevelse dersom PAX6 og/eller GR mangler. Det var også av interesse å utforske hvordan oksidativt stress påvirker vekst og overlevelse til linse-epitelcellelinjen, og om tilstedeværelsen eller fraværet av PAX6 og GR har noe å si for cellelinjens respons. Funksjonen til PAX6 og GR som transkripsjonsfaktorer under oksidativt stress ble også studert.

Det er tidligere utført CRISPR-Cas9 modifikasjoner på linse-epitelceller (B3) for å slå ut PAX6 og/eller GR, hvor PAX6 tidligere er bekreftet slått ut. Denne oppgaven startet med å verifisere GR KO klonene ved bruk av Western blot (WB) og sekvensering. Det ble bekreftet at GR $\alpha$  (MW 97 kDa) var slått ut, men GR KO cellelinjene så fortsatt ut til å inneholde en kortere isoform av GR som i en viss grad var responsiv for Dexametason (Dex). Det ble valgt å gå videre med seks cellelinjer, der en inneholdt både PAX6 og GR (B3 WT), en inneholder GR men mangler PAX6 (B3 3.4), to inneholder PAX6 men mangler GR (B3 WT C9 og B3 WT D10) og to inneholder hverken PAX6 eller GR (B3 3.4 C12 og B3 3.4 G9).

Proliferasjonen til de ulike cellelinjene ble studert ved tilsetning av Dex, Hydrogenperoksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) eller Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for å studere GR og PAX6 sin rolle i proliferasjon, i tillegg til deres funksjon under oksidativt stress.

Aktivert GR (ved stimulering med Dex), og tilstedeværelse av PAX6 viste seg å spille en rolle i vekst, ved å øke celleproliferasjonen i linse-epitelcellene. Når cellene ble utsatt for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indusert oksidativt stress, viste responsen i vekst seg å være doseavhengig. En mindre mengde oksidativt stress (0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) medførte ingen endringer eller en liten økning i proliferasjonen, mens en høyere mengde oksidativt stress (0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) medførte vekststans og celledød. Cellene som inneholdt PAX6 ble mere påvirket av oksidativt stress, sammenlignet med cellene hvor PAX6 var slått ut. Det tyder på at mangelen på PAX6 fører til at cellene blir mer motstandsdyktige for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aktivert GR under oksidativt stress viste seg og ikke å kunne motvirke den negative proliferasjonen forårsaket av oksidativt stress (0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i cellene som inneholdt GR. Derimot viste noen av GR KO cellene en ytterligere

reduksjon i proliferasjon. WB viste at proteinuttrykket av GR ble redusert ved stimulering med Dex, noe PAX6 ikke ble. Proteinuttrykket av PAX6 ble i større grad redusert ved stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sammenlignet med GR.

For å se på funksjonen til GR og PAX6, og eventuelle endringer i funksjonen under oksidativt stress ble det sett på reguleringen av to kjente målgener, GILZ og GJA1. Dette ble gjort ved qPCR der man ser på endogene transkripter av målgenene, og ved bruk av transfeksjon og reporter-gen-assay der man ser på promoteraktiviteten. I begge tilfeller ble de ulike cellelinjene stimulert med Dex, og i reporter-gen-assay ble cellene utsatt for oksidativt stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Resultatene fra qPCR viste at stimulering med Dex i cellene som inneholdt GR økte GILZ-uttrykket i større grad, enn for cellene hvor GR var slått ut. I likhet viste målgenet for PAX6, at tilstedeværelse av PAX6 virket positivt på GJA1-uttrykket. I reporter-gen-assay fungerte PAX6 som en aktivator GJA1-promotoren. Under oksidativt stress ble aktiviteten til transkripsjonsfaktoren PAX6 på GJA1-promotoren negativt påvirket. Cellene hvor PAX6 var slått ut viste seg å være mer motstandsdyktige for oksidativt stress, både i en lengre tidsperiode og ved en høyere dose, før negative konsekvenser i form av lav transkripsjonsaktivitet og degradering av proteiner/celledød ble sett.

Linse-epitelcellelinjene ble påvirket av oksidativt stress. Cellelinjene hvor PAX6 var fjernet var mer motstandsdyktige for oksidativt stress, sammenlignet med celler hvor PAX6 var til stede. Aktivering av GR viste seg og ikke ha betydelig påvirkning for cellelinjenes vekst under oksidativt stress. For cellelinjene hvor GR eller GR og PAX6 var slått ut, ble det i noen av forsøkene vist en ytterligere reduksjon i vekst under oksidativt stress. Promotoraktiviteten til GJA1 så derimot ut til å bli mer påvirket under oksidativt stress når både PAX6 og GR var fjernet, sammenlignet med cellelinjene hvor kun PAX6 var fjernet.

## Forkortelser

$\beta$ -gal	$\beta$ - galactosidase
Bp	Basepar
cDNA	Komplementær DNA
Ct	Threshold cycle
Dex	Dexametason
DNA	Deoksyribonukleinsyre
EtOH	Etanol
Fw	Forward
g	Gram
GAPDH	Glyceraldehyd 3-fosfat dehydrogenase
GILZ	Glukokortikoid-indusert leucin-zipper
GJA1	Gap junction alpha-1 protein
GR	Glukokortikoidreseptor
GRE	Glukokortikoid responsive elementer
GusB	Beta-Glucuronidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoksid
kDa	Kilo Daltron
L	Liter
Luc	Luciferase
mA	Milliampere
min	Minutt
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Molekylvekt
nM	Nanomolar
NTC	No template control
PAX	Paired box
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
q-PCR	Quantitative polymerase chain reaction
Rev	Revers
RNA	Ribonukleinsyre

ROS	Reaktive oksygensubstanser
rpm	Runder per minutt
RT	Romtemperatur
Sek	Sekunder
μg	Mikrogram
μl	Mikroliter
V	Volt
WB	Western blot
x g	Times gravity

# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>III</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>IV</b>
<b>Forkortelser</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Paired box gener</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Struktur og funksjoner .....	2
1.1.2 PAX6 .....	3
<b>1.2 Glukokortikoider</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Glukokortikoidreseptoren .....	6
<b>1.3 Øyet</b> .....	<b>9</b>
1.3.1 Hornhinnen .....	9
1.3.2 Linsen.....	9
<b>1.4 Oksidativt stress</b> .....	<b>10</b>
1.4.1 Oksidativt stress i øyet .....	11
<b>1.5 GR i øyet</b> .....	<b>12</b>
1.5.1 GR i linseceller .....	12
<b>1.6 PAX6 i øyet og linseceller</b> .....	<b>13</b>
<b>1.7 Formål med oppgaven</b> .....	<b>15</b>
<b>2 Materialer</b> .....	<b>16</b>
<b>3 Metode</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Western blot</b> .....	<b>23</b>
3.1.1 Høste celler til Western blot .....	23
3.1.2 Kjøring av SDS-PAGE gel.....	23
3.1.3 Blotting av membran .....	24
3.1.4 Farging av membran.....	24
<b>3.2 Gelelektroforese</b> .....	<b>25</b>
3.2.1 Tillaging av 0,7 % Agarosegel .....	25
3.2.2 Støping av 0,7 % Agarosegel.....	26
<b>3.3 DNA sekvensering</b> .....	<b>26</b>
3.3.1 Genomisk DNA.....	26
3.3.2 PCR .....	27
3.3.3 Sekvensering .....	28
<b>3.4 Plasmidprep</b> .....	<b>29</b>
<b>3.5 Celledyrkning</b> .....	<b>30</b>
3.5.1 Utsåing av celler .....	30
<b>3.6 Stimulering av celler</b> .....	<b>31</b>
3.6.1 Tillaging av Dex løsninger .....	31
3.6.2 Tillaging av H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> løsninger .....	31
<b>3.7 Proliferasjons-assay ved bruk av IncuCyte</b> .....	<b>32</b>
3.7.1 Titrering av Dex .....	32
3.7.2 Dex stimulering.....	32
3.7.3 Titrering av H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	33
3.7.4 Stimulering med Dex i kombinasjon med H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	33



<b>3.8</b>	<b>Transfeksjon av reporter-gen-plasmider.....</b>	<b>34</b>
3.8.1	Stimulering med Dex .....	35
3.8.2	Stimulering med H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	35
<b>3.9</b>	<b>Real-time qPCR.....</b>	<b>37</b>
3.9.1	RNA høsting .....	37
3.9.2	cDNA.....	38
3.9.3	qPCR.....	39
<b>4</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Verifisering av GR knock out klonene .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Proliferasjons-assay.....</b>	<b>44</b>
4.2.1	Titring med Dex.....	44
4.2.2	Proliferasjons-assay med og uten Dex.....	51
4.2.3	Titring med H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
4.2.4	Stimulering med Dex og H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	60
<b>4.3</b>	<b>Real time PCR (qPCR) .....</b>	<b>66</b>
4.3.1	GILZ som målgen.....	66
4.3.2	GJA1 som målgen.....	69
<b>4.4</b>	<b>Luciferase reporter-gen-assay.....</b>	<b>70</b>
4.4.1	Titring av reporter-gen-plasmidene .....	70
4.4.2	Transfeksjon med plasmidene GJA1 Large og GILZ 1264.....	71
4.4.3	Transfeksjon med GJA1 plasmidet i nærvær og fravær av Dex .....	73
4.4.4	Titring av GILZ promotorplasmider .....	74
4.4.5	Transfeksjon med plasmidene GJA1 og GILZ 927 i nærvær og fravær av Dex.....	76
4.4.6	Stimulering med H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	79
<b>4.5</b>	<b>WB GJA1 .....</b>	<b>85</b>
<b>5</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>87</b>
<b>5.1</b>	<b>Verifisering av GR Knock out.....</b>	<b>87</b>
<b>5.2</b>	<b>Proliferasjon ved tilsetning av Dex .....</b>	<b>89</b>
<b>5.3</b>	<b>Proteinstabilitet .....</b>	<b>90</b>
<b>5.4</b>	<b>Påvirkning ved oksidativt stress.....</b>	<b>91</b>
5.4.1	Celleproliferasjon under oksidativt stress og aktivering av GR .....	93
<b>5.5</b>	<b>Funksjonen til PAX6 og GR ved bruk av qPCR og reporter-gen-assay .....</b>	<b>94</b>
5.5.1	Transfeksjon PAX6 og GR med og uten Dex.....	95
<b>5.6</b>	<b>Funksjonen til transkripsjonsfaktorene PAX6 og GR under oksidativt stress ....</b>	<b>98</b>
<b>5.7</b>	<b>Mulige feilkilder .....</b>	<b>100</b>
<b>5.8</b>	<b>Fremtidige aspekter .....</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>Konklusjon.....</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>Referanseliste.....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>Appendiks.....</b>	<b>107</b>



# 1 Introduksjon

I dette prosjektet ble det brukt linse-epitelceller fra øyet, for å studere hvilken biologisk konsekvens mangel av transkripsjonsfaktorene PAX6 og/eller glukokortikoidreseptoren (GR) vil ha for vekst og overlevelse. I tillegg til hvordan oksidativt stress påvirker funksjonen til PAX6 og GR.

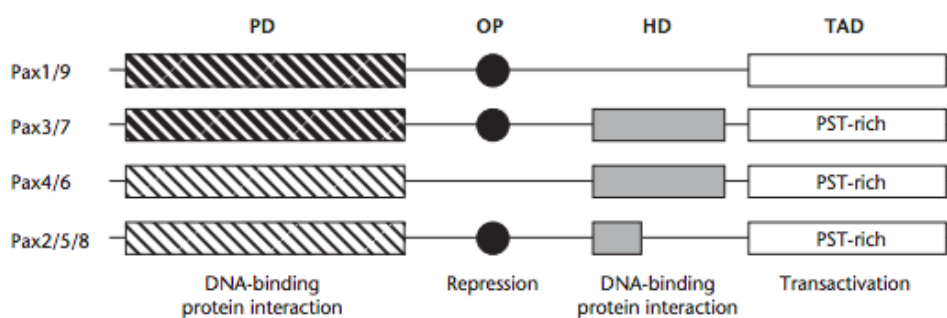
I introduksjonen gjøres det kort rede for transkripsjonsfaktorene PAX6 og GR, i tillegg til oksidativt stress. Videre omtales rollen til GR og PAX6 i linseceller.

## 1.1 Paired box gener

Paired box- (PAX) gener ble først identifisert i bananfluen, *Drosophila melanogaster* (1). Senere har PAX-gener også blitt identifisert hos mennesker og dyrearter som blant annet rotter, kylling, mus, vaktler og sebrafisk (2).

PAX-gener fungerer som transkripsjonsfaktorer, og spiller en viktig rolle under utvikling av blant annet sentralnervesystemet (CNS), bukspyttkjertelen, skjoldbruskkjertelen, skjelettmuskulatur, nyrene, og øyet (1-3). De spiller også en viktig rolle i organogenese under embryonal utvikling i forbindelse med regulering av proliferasjon og fornyelse av celler, samt for å unngå apoptose og migrering av celler tidlig i embryogenesen (3).

I pattedyr består PAX-familien av 9 gener, hvor hver koder for PAX proteiner som fungerer som spesifikke transkripsjonsfaktorer (4). Disse 9 genene kan klassifiseres i 4 subgrupper avhengig av proteinets strukturelle domener, slik de er illustrert i *Figur 1.1* (1).



*Figur 1.1* I pattedyr består PAX familien av 9 gener som kan deles inn i 4 subgrupper. Klassifiseringen av de 4 subgruppene avhenger av hva PAX genene består av. Subgruppene består av et paired domain (PD), med eller uten homeodomain (HD) og/eller oktapeptid (OP). Figuren er gjengitt med tillatelse (1).

### 1.1.1 Struktur og funksjoner

Felles for alle PAX-genene er at de har et paired domain (PD) i den N-terminale enden, som består av 128 aminosyrer (1). PD er et DNA bindende domene, som består av to strukturelle subdomener, hvorav disse kalles PAI og RED (3). PAI domene, som er det N-terminale underdomenet, interagerer direkte med DNA. Det C-terminale underdomenet, RED, interagerer ikke direkte med DNA, men bidrar til de generelle bindingsinteraksjonene til PD (3).

Subgruppene som består av PAX 3/7 og PAX 4/6 inneholder et fullstendig HD, PAX 2/5/8 inneholder en mindre del av HD, mens PAX 1/9 ikke inneholder noen HD (1;3). HD er et høyt konservert DNA-bindende domene som består av 60 aminosyrer, og øker mangfoldet av DNA-sekvenser som kan bindes av PAX-proteinene som har et HD og et PD (1;5). HD er likevel avhengig av at PD binder seg samtidig til DNAet, mens PD kan alene bindes til DNAet (5). Mellom PD og HD har alle PAX-proteinene, med unntak av PAX 4/6 et konservert oktapeptidmotiv (OP). Funksjonen til OP er at PAX-proteinene kan fungere som en transkripsjonsrepressor, altså hemmer transkripsjonen (1;3). Den C-terminale enden består av en region rik på aminosyrene prolin, serin og treonin (PST). Denne fungerer som et transaktiveringsdomene (TAD) (1). TAD bindes ikke til DNA, men inneholder bindings seter for andre proteiner, som koaktivatorproteiner. Den generelle funksjonen til TAD er å rekruttere koaktivatorproteiner og bidra til å aktivere målgener (1;6).

Alle PAX-genene, med unntak av PAX1 og PAX9 spiller en rolle innenfor utvikling av sentralnervesystemet (CNS) (1). PAX1 uttrykkes under utviklingen av thymus (2), og både PAX1 og PAX9 spiller en rolle under utvikling av skjelett (1;2). PAX5 er viktig for utvikling av B-celler, og kan både aktivere B-celle spesifikke genuttrykk, samt undertrykke transkripsjoner av gener som er uønsket (1;2). PAX8 spiller en viktig rolle under utviklingen av follikulære celler, som utskiller thyreoideahormoner fra skjoldbruskkjertelen (thyreoidea) (1;2). PAX3 og PAX7 er viktig for muskeldannelse (1;2). PAX2 og PAX8 spiller en viktig rolle for utvikling av nyrene (1;2). Både PAX4 og PAX6 er viktige for utviklingen av den endokrine pankreas, hvor PAX4 uttrykkes i de insulinproduserende  $\beta$ -cellene, og PAX6 i de glukagonproduserende  $\alpha$ -cellene (1;2). PAX6 er i tillegg viktig for øyeutvikling (1;2), og det er dette PAX-proteinet jeg skal gå nærmere inn på videre i dette studiet.

### 1.1.2 PAX6

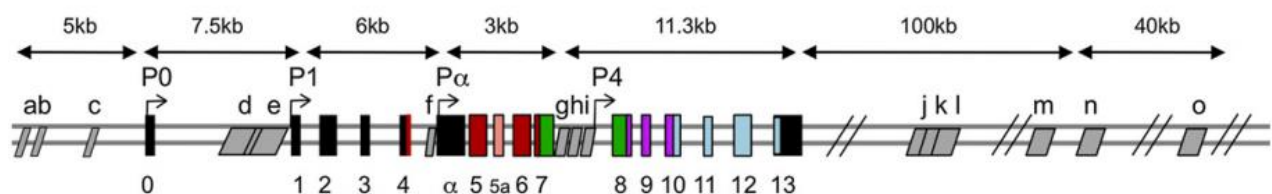
Lenge før PAX6-genet ble identifisert var det oppdaget mutasjoner i bananfluen, *Drosophila*, som førte til at øynene ikke ble utviklet (7). Denne fenotypen ble kalt for *eyeless*. Mer enn 10 år senere, og uavhengig av denne oppdagelsen, ble det oppdaget en mutasjon i mus som fører til sykdommen *small eye* (7). Denne homozygote sykdommen fører til mangel på utvikling av linsen i mus. Det ble også funnet en heterozygot variant som fører til underutvikling av linsen (7).

Den sjeldne sykdommen medfødt aniridia hos mennesket ble beskrevet allerede i 1818 av den italienske øyelegen Barratta (8). Denne sykdommen fører til helt eller delvis mangel av iris, og er forårsaket av en heterozygot mutasjon i et gen (7). Den homozygote varianten av aniridia er en dødelig sykdom (7). Den semidominante og heterozygote versjonen gir utgangspunktet for mange ulike lidelser knyttet til øyet (7-9). Som for eksempel *kongenital aniridi*, grå stær, glaukom og hypoplasi.

Basert på blant annet genetisk kartlegging, og fenotypiske likheter ble det tenkt at det kunne være en sammenheng mellom *small eye* hos mus, og aniridia hos mennesker som et resultat av mutasjon i ortologe gener, gener som vi har til felles (7). Det ble funnet at genet for aniridia hos menneske inneholdt PAX6, slik som det også ble identifisert i *Drosophila* (7;10). Det ble videre demonstrert at mutasjon i Pax6-gen er årsaken til øyesykdommen *small eye* hos mus. I de påfølgende tiårene ble det rapportert hundrevis av mutasjoner innenfor PAX6, som har ført til ulike lidelser knyttet til aniridia. PAX6-genet er å finne i virveldyr, men det har også blitt identifisert i bananfluer som er et leddyr (1;7;10). Dette viser at det er et høyt konservert gen på tvers av dyreriket, og er en veldig viktig transkripsjonsfaktor i øyeutviklingen i alt fra mennesker til insekter. Derfor er det høyst interessant å forske på hvilke andre transkripsjonsfaktorer som interagerer med PAX6.

PAX6 har vist seg å spille en veldig viktig rolle i utviklingen av høyt spesialiserte vevstyper (7;11). PAX6 spiller en sentral rolle i øyeutvikling og er i tillegg sentral for normal utvikling av sentralnervesystemet, hypofysen, bukspyttkjertel, luktesans, og neurogenese hos voksne (7;11). I tillegg til sin kjente rolle som aktivator, har PAX6 også vist seg å inhibere transkripsjon av flere gener (7).

I pattedyr består PAX6-genet av 16 eksoner, og har en lengde på omtrent 28 kB (7). 14 eksoner nummereres fra 0-13, og de to resterende eksonene nummereres som  $\alpha$  og 5a, som illustreres i *Figur 1.2*. Det er flere forskjellige transkripter som syntetiseres fra PAX6-genet gjennom utvalget av forskjellige promotorer (7). Det kan også lages flere varianter av PAX6-proteiner gjennom alternativ spleising. Promotor 0 og promotor 1 (P0 og P1) er to av de viktigste startpunktene for transkripsjon av PAX6 (7). Man forstår ikke fullt ut den biologiske betydningen av transkripter derivert fra promotorene P0 og P1. Men det kan tenkes at siden det er flere promotorer for samme gen så åpner dette opp for intrikate reguleringer av genet, siden hver promotor har sitt eget sett med tilhørende regulerende sekvenser. Det finnes også en tredje promotor, kalt  $P\alpha$ , som benyttes for en alternativ transkripsjon av et avkortet PAX6-protein, kalt PAX6 $\Delta$ PD. PAX6 $\Delta$ PD er en variant som mangler PD, men har HD og TAD (7). Denne proteinvarianten kan også lages ved bruk av et alternativt startsted for translasjon. PAX6 $\Delta$ PD er funnet i noen typer øyevev, selv om dens fysiologiske aktivitet i øyet ikke er fullt ut forstått, så vet man at overuttrykk av PAX6 $\Delta$ PD vil resultere i forstyrrelser i linse- og hornhinneutviklingen (7).



*Figur 1.2* Oversikt over gen, transkripsjon, og proteinstrukturen til Pax6 i mus. De grå rombene med tilhørende små bokstaver er regulerende elementer, mens de fargede og svarte rektanglene med tilhørende tall er de 16 eksonene. De fargede rektanglene viser de kodende eksonene, og de svarte de ikke-kodende eksonene. De røde/rosa koder for PD, de lilla for HD og de blå for PST. Figuren er gjengitt med tillatelse (7).

PAX6 er en vevsspesifikk transkripsjonsfaktor og har en kompleks aktivitet, da PAX6 er oppbygd av flere funksjonelle domener (7). Som tidligere nevnt består PAX6 av to DNA-bindende domener; PD, og HD, i tillegg til en PST-rik region i den C-terminale enden (1;11). Disse funksjonelle domene legger til rette for DNA-binding og protein-protein interaksjoner. Ved å ha et utvalg av promotorer som benyttes og alternativ spleising, kan proteiner som er oppbygd av ulike funksjonelle domenekombinasjoner kodes av det samme genet. Post-translasjonelle modifikasjoner og protein-protein interaksjoner som utløses av ytre signaler og naturlig oppbygning, kan føre til at funksjonen til proteinene moduleres (7).

PAX6(5a) er en annen form av PAX6, hvor det har skjedd en alternativ spleising av ekson 5a som er et segment på 42 basepar som ligger mellom ekson 5 og ekson 6 (7). Således vil PAX6(5a) varianten av PAX6 ha en annen DNA-bindings spesifisitet enn det PAX6 har. Forholdet mellom PAX6 og PAX6(5a) hos pattedyr varierer mellom vevstypene. Mutasjoner som endrer forholdet mellom disse to proteinene, fører også til ulike øyelidelser. Studier har vist at PAX6(5a) spiller en rolle i linse- og irisutviklingen (7).

## 1.2 Glukokortikoider

Glukokortikoider er essensielle stresshormoner, som regulerer flere fysiologiske prosesser i kroppen for å opprettholde homeostase. Steroidhormonene syntetiseres og frigjøres fra binyrebarken sirkadisk og som respons på stress (12). Det er hypothalamus-hypofyse-binyreaksen som kontrollerer sekresjonen av hormonene (12;13). Hypothalamus overvåker stressnivået i kroppen, og frigjør det kortikotropin-frigjørende hormonet (CRH). CRH sender signal til binyrene via hypofysen og hormonet ACTH (adrenokortikotropisk hormon) for å stimulere produksjonen og utskillelsen av stresshormoner. Som for eksempel kortisol, som er den biologiske aktive formen av glukokortikoid i menneskekroppen. Gjennom en negativ feedback loop kan glukokortikoider hemme sekresjonen av CRH fra hypothalamus, som gjør at sekresjonen av ACTH slås av. Dette vil resultere i at produksjonen og utskillelsen av glukokortikoider reduseres (12). Det meste av de utskilte glukokortikoidene er bundet til kortikosteroidbindende globuliner i blodet. Glukokortikoider diffunderer lett over membraner, og kan derfor nå nesten alle vev i kroppen. De utfører sin funksjon ved å binde til glukokortikoidreseptoren (13).

Glukokortikoider har en antiinflammatorisk og immunsuppressiv virkning, i tillegg til at hormonene regulerer blant annet glukose-, protein- og fettmetabolisme, immunfunksjon, skjelettvekst, og kardiovaskulær funksjon (12;14). På grunn av deres antiinflammatoriske og immunsuppressive virkninger brukes glukokortikoider i behandling av inflammatoriske og autoimmune sykdommer, som blant annet allergi, astma, revmatoid artritt, ulcerøs kolitt, multippel sklerose, dermatologiske, og okulære sykdommer (12-15). Glukokortikoider spiller en rolle i induksjon av apoptose, og grunnet denne funksjonen brukes de som en komponent i kjemoterapeutiske regimer av kreftformer med hematologisk opprinnelse (13).

Glukokortikoider som brukes klinisk inkluderer naturlige glukokortikoider, som kortisol og kortison, og syntetiske glukokortikoider, som Dexametason (Dex) og Prednisolon (16).

Behandling med glukokortikoider kan føre til alvorlige bivirkninger, særlig for pasienter som behandles hyppig med disse steroidene eller ved bruk av høye doser (12;13). Bivirkninger som kan forekomme er blant annet glaukom, grå stær, osteoporose, abdominal fedme, diabetes, og veksthemning hos barn. I tillegg til bivirkninger ved langvarig bruk, kan også vevspesifikk glukokortikoidresistens oppstå (12;13;17).

### 1.2.1 Glukokortikoidreseptoren

Glukokortikoidreseptoren (GR) er en intracellulær reseptor, som tilhører kjernereseptorfamilien av transkripsjonsfaktorer (12). GR er en ligandavhengig transkripsjonsfaktor som aktiverer eller undertrykker gentranskripsjon (12;13). Det finnes flere isoformer av GR, hvor  $\alpha$ -isoformen er den mest vanlige. Når GR omtales i denne studien, er det alfa ( $\alpha$ )- isoformen av GR det snakkes om, dersom ikke annet spesifiseres.

Den aktive GR påvirker transkripsjonen gjennom ulike mekanismer. Effektene til GR kan deles inn i genomiske og ikke-genomiske glukokortikoidresponser. De mest undersøkte mekanismene er de genomiske. GR virker som en transkripsjonsfaktor gjennom den genomiske mekanismen, ved at glukokortikoider bindes til GR og tar seg inn i kjernen hvor de påvirker transkripsjon av gener (genomet). I fravær av hormon befinner GR seg normalt i cytosol, og er en del av et stort multiproteinkompleks som inkluderer chaperon proteiner og immunofiliner (12;17). Proteinene i dette komplekset opprettholder reseptoren i en konformasjon som gjør reseptoren transkripsjonelt inaktiv, men favoriserer ligandbinding med høy affinitet (12). Som tidligere nevnt er kortisol det mest utbredte endogene glukokortikoidet i menneskekroppen. Kortisol transporteres i blodet, og er hovedsakelig bundet til kortikosteroidbindende globulin (CBG) (12). De fleste syntetiske glukokortikoidene binder ikke til CBG (12). CBG letter kortisoldistribusjon, i tillegg til å spille en rolle i frigjøringen til vev. Når glukokortikoider binder til GR, gjennomgår GR en konformasjonsendring (12). Denne konformasjonsendringen resulterer i oppløsning av proteinkomplekset, som fører til at de to kjernelokaliseringssignalene avdekkes (12). GR transporteres gjennom porer i kjernemembranen til kjernen. GR dimeriserer og binder seg til glukokortikoidresponsive elementer (GRE) i promotorregionen av målgenene for å direkte modulere transkripsjon, ved å indusere eller undertrykke gentranskripsjon (12;14;16-18). Endring av genuttrykk via aktivering av GR er en mer tidskrevende prosess enn de ikke-genomiske effektene.



Ikke-genomiske effekter ble av Losel og Wehling definert som en hvilken som helst handling som ikke påvirker genuttrykket direkte, men som induserer raske effekter, for eksempel signaltransduksjonsveier (19). Disse effektene oppstår raskt da effekten ikke påvirkes av transkripsjons inhibitorer og proteinsyntese. De ikke-genomiske effektene kan også foregå i celler uten kjerne, som blodplater og erythrocytter (19). Ikke-genomiske effekter av glukokortikoider involverer uspesifikke interaksjoner med cellemembranen, eller spesifikke interaksjoner med cytosolisk GR eller membranbundet GR (20).

### 1.2.1.1 Struktur, oppbygning og funksjon

GR er oppbygd som et modulært protein, og er lokalisert på kromosom 5 (15). GR er en ligandindusert transkripsjonsfaktor og består av tre funksjonelle domener fra N- til C-terminalen (17;21). Domenene er et N-terminalt transaktiveringsdomene (NTD), et konservert DNA-bindende domene (DBD), og et C-terminal ligandbindende domene (LBD). I tillegg er det en hengselregion (HR) mellom DBD og LBD, illustrert i *Figur 1.3*. DBD inneholder to sinkfingermotiver som gjenkjenner og binder glukokortikoidresponsive elementer (GRE) (15;21).



*Figur 1.3 Oppbygningen av GR. GR er oppbygd av en N-terminal transaktiveringsdomene (NTD), et konservert DNA-bindende domene (DBD), en hengselregion (HR), og et C-terminal ligandbindende domene (LBD). Figuren er gjengitt med tillatelse (21).*

GR-genet i mennesket (hGR) består av ti eksoner, 1 til 9 $\beta$  (15). Det første eksonet, ekson 1, representerer den 5'-utranslerte regionen (13). Eksonet består av tre transkripsjonsinitierende startsteder, hvor disse er promotor 1A, 1B og 1C, og har syv alternative spleisepunkter (13;15). Ekson 2 koder for NTD, ekson 3 og 4 koder for DBD, ekson 5-9 koder for LBD og den 3'-utranslerte regionen (13;15).

### 1.2.1.2 Isoformer av GR

GR kan forekomme som flere isoformer og genereres fra ett enkelt gen (12;13). Årsaken er alternativ spleising og alternativ translasjon initiering. Det er blant annet identifisert to isoformer av GR i mennesket (hGR), hvorav disse er hGR $\alpha$  og hGR $\beta$ . Disse oppstår som et resultat av alternativ spleising, og bruk av ekson 9 $\alpha$  eller 9 $\beta$  (13). Grunnet alternativ spleising har proteinene ulik lengde av LBD. LBD til  $\alpha$ -isoformen består av aminosyrene 527-777.  $\beta$ -isoformen av GR er identisk  $\alpha$ -isoformen til og med aminosyre 727. Deretter er de siste 50 aminosyrene i  $\alpha$ -isoformen byttet ut med 15 ikke-homologe aminosyrer i  $\beta$ -isoformen. Noe som resulterer i at  $\beta$ -isoformen har en total lengde på 742 aminosyrer (13). De 15 ikke-homologe aminosyrene koder for en unik sekvens, som resulterer i at  $\beta$ -isoformen ikke er i stand til å binde til ligand, noe  $\alpha$ -isoformen gjør (12;13;16). hGR $\alpha$  er den mest uttrykte isoformen og uttrykkes i nesten alle celler og vev, og fungerer som en ligandavhengig transkripsjonsfaktor (16). For at glukokortikoider skal kunne fremkalle en biologisk respons, er tilstedeværelse av hGR $\alpha$  nødvendig (16). hGR $\beta$  er å finne i en rekke celletyper og vev, for eksempel nøytrofiler og epitelceller (12). Det er generelt funnet lavere nivåer av  $\beta$ -isoformen enn  $\alpha$ -isoformen i celler og vev. Det er foreløpig ikke vist at hGR $\beta$  kan binde glukokortikoider eller er transkripsjonelt aktiv (13).

Noen studier har vist at hGR $\beta$  kan fungere som en dominant negativ inhibitor og motvirke aktiviteten til hGR $\alpha$  på flere glukokortikoid-responsive målgener (12;13;15;22). Enkelte studier har vist at høye nivåer av hGR $\beta$  kan føre til glukokortikoidresistens. Man antar dette kommer av  $\beta$ -isoformens evne til å inhibere aktiviteten av  $\alpha$ -isoformen (12).

Proinflammatoriske cytokiner og andre immunaktivatorer har blitt vist å kunne øke uttrykket for hGR $\beta$  selektivt. Noe som videre kan føre til redusert følsomhet av glukokortikoider (12). I noen inflammatoriske sykdommer, blant annet astma, ulcerøs kolitt og revmatoid artritt kan forhøyede nivåer av hGR $\beta$  være assosiert med resistens mot glukokortikoider (12;13).

Det er blitt påvist andre hGR-isoformer forårsaket av alternativ spleising, i vev og i noen kreftcellelinjer (13). Noen av disse er hGRP, hvor ekson 8 og 9 mangler, og hGRA hvor ekson 5, 6 og 7 mangler. Disse to isoformene er sett i høye nivåer hos glukokortikoidresistente myelompasienter. En annen isoform er hGR $\gamma$ , som er oppdaget i akutt lymfoblastisk leukemi (13). Denne isoformen skiller seg fra de andre, da denne

inkluderer 3 basepar som koder for Arginine i intronet mellom ekson 3 og 4. Dette fører til at reseptorens transaktiveringspoteinsial reduseres (13).

## **1.3 Øyet**

Øyet er et komplekst organ, som utvikles under embryogenesen. Genetiske endringer kan føre til alvorlige øyelidelser (23). Øyet har direkte kontakt med det ytre miljøet gjennom hornhinnen. I tillegg er øyet knyttet til nervesystemet gjennom netthinnen. Øyet er ett av stedene i kroppen som har immunprivilegium, som betyr at ved innføring av antigener kan øyet være i stand til å hemme at en inflammatorisk immunrespons fremkalles (17). Noen okulære rom, som hornhinnen, linsen og ytre netthinnen er avaskulær (uten blodårer), og har en viktig anatomisk funksjon for immunforsvarets egenskaper i øyet, og for normal visuell funksjon. Unormal vekst av blodårer i avaskulære områder, kan blant annet føre til forstyrrelse i den normale visuelle funksjonen i forbindelse med regulering av lysoverføring. Dette kan føre til flere sykdommer, som hornhinnedekning og proliferativ diabetisk retinopati (17).

### **1.3.1 Hornhinnen**

Hornhinnen er den sirkulære gjennomsiktige hinnen som dekker det fremre kammeret, foran regnbuehinnen (iris) og pupillen. Denne hinnen danner en fysisk barriere mellom det indre øyet og det ytre miljøet. Behandling med glukokortikoider påvirker hornhinnens immunrespons, reduserer betennelse og inhiberer vekst av blod og lymfekar (17). Det syntetiske glukokortikoidet Prednisolon brukes i behandling av sykdommer på øyeoverflaten. Det har blant annet vist seg å undertrykke proinflammatoriske cytokiner, indusere produksjon av reaktive oksygenforbindelser fra mitokondrie, og dermed øke apoptose (17).

### **1.3.2 Linsen**

Linsen er et gjennomsiktig, bikonvekst legeme som ligger inni øyet. Linsen i mennesket består av tre ulike metabolske soner; epitel, cortex og linsekjernen (24). Epitelcellene er cellene som er mest metabolsk aktive, og inneholder de viktigste genproduktene til linsen hvor krystalliner produseres (17;24). Oppgavene linsen har er å bryte lyset til netthinnen i samarbeid med hornhinnen, i tillegg til å regulere fokus (17).

## 1.4 Oksidativt stress

Oksidativt stress er en ubalanse mellom reaktive oksygensubstanser (ROS) og antioksidanter i kroppen. Kroppens metabolisme fører til produksjon av ROS-forbindelser (24). ROS inkluderer superoksidradikal ( $O_2^-$ ), hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) og hydroksylradikal ( $OH^\cdot$ ) (24;25). Begrepene frie radikaler og ROS blir ofte brukt om hverandre. Frie radikaler er molekyler eller atomer som i ytterste elektronskall har ett eller flere frie uparrede elektroner, for eksempel superoksidradikal. De uparrede elektronene resulterer i økt reaktivitet (25). ROS inngår i samme type reaksjoner som frie radikaler, men inneholder ikke uparrede elektroner. Hydrogenperoksid er et eksempel på en slik ROS-forbindelse. Cellenes metabolisme produserer hele tiden ROS-forbindelser (25).

Oksygen er en sterk oksidant, og det er essensielt for kroppen å bryte ned disse radikalene (24). Dersom det blir en ubalanse i hastigheten på oksidantproduksjonen og nedbrytningshastigheten resulterer det i oksidativt stress (24). Oksidativt stress kan føre til unormal metabolisme, molekulære skader som mutasjoner i DNAet eller oksidering av lipider og proteiner, skader på celler og vev, tap av fysiologisk funksjon, sykdom og eventuelt død (24;26). Oksidativt stress kan motvirkes av antioksidanter, som kan inhibere skaden på strukturelle og funksjonelle molekyler i kroppen, som proteiner, DNA, karbohydrater og lipider (24). ROS som ikke motvirkes av antioksidanter i kroppen vil kunne binde til celler, og dermed føre til endringer i cellenes funksjoner (24).

I nesten alle celler og vev spiller ROS en sentral rolle som regulator i flere reversible og biologiske prosesser (26). ROS fungerer blant annet som signalmolekyler for cytokiner, veksthormoner og G-protein koblede reseptorer. De regulerer også flere transkripsjonsfaktorer som for eksempel Nuclear factor  $\kappa B$ , og genekspressjon (26). ROS har også en rolle i regulering av transportproteiner og ionekanalene  $K^+$  og  $Ca^{2+}$ , og i immunfunksjoner (26). I regulering av celleproliferasjon spiller ROS en viktig rolle. Ved lave nivåer av ROS blir celledeling og proliferasjonen induert, men ved høye nivåer av ROS indueres apoptose (27).

### **1.4.1 Oksidativt stress i øyet**

Linsen er et av organene som er mest utsatt for oksidativt stress (28). Hovedårsaken er kontakt med eksogene kilder, i tillegg til sin funksjon ved å overføre lys til netthinnen. For å beskytte seg mot oksidativt stress inneholder linsen noen ikke-enzymatiske og enzymatiske mekanismer, som kan reparere oksidativt skadede cellekomponenter (28). Disse er blant annet redusert glutation (GSH), høye konsentrasjoner av askorbat, krystalliner og frie UV-filtre. Glutation er et tripeptid som består av aminosyrene glutamat, cystein og glycin, og er en essensiell antioksidant (24). Når oksidativt stress overstiger cellenes evne til å reparere de oksyderte cellekomponentene, kan apoptose oppstå (28).

Alder er en risikofaktor for oksidativt stress, som kan føre til utvikling av øyelidelser, og kan gå ut over linsens funksjon (24). En yngre linse har betydelig med reserver av antioksidanter, som bidrar til å forhindre skader på linsen. I tillegg har de proteolytiske enzymer (proteaser) som selektivt fjerner proteiner som er skadet (24). I en eldre linse, kan antioksidantreservene være redusert, i tillegg til reduserte enzymegenskaper og proteaser. Når øyet utsettes for UV-lys medfører det oksidativt stress. UV-lyset kan fremme oksidasjon som videre kan resultere i grå stær. Aldersrelatert nukleær grå stær er i tillegg assosiert med tap av glutation (24).

En hypotese om glukokortikoider i linsen og oksidativt stress, er at glukokortikoider kan påvirke de beskyttende antioksidative systemene i linsen (29). Dette vil føre til at linsen blir mer utsatt for oksidativt stress. Oksidativt stress er en av faktorene som kan forårsake depolarisering av mitokondriene (29). Studier har vist at membranpotensialet til mitokondriene i humane linseepitelceller forstyrres av behandling med hydrogenperoksid (29).

#### **1.4.1.1 Grå stær**

Grå stær er en vanlig sykdom blant den eldre befolkningen. Sykdommen oppstår også hos den yngre delen av befolkningen, oftest på grunn av skader, ved sykdom og i sjeldne tilfeller er den medfødt (30). Grå stær gjør at linsen mister sin klarhet, og resulterer i nedsatt syn, ofte kalt «Tåkesyn», og kan føre til blindhet (30). Krystalliner (proteiner i linsefibrene) spiller en viktig rolle i øyets opasitet og brytningsindeks (31). Alder og stressfaktorer som oksidativt stress kan påvirke krystalliner slik at de aggregerer og påvirker opasiteten til linsen (31). UV-lys er et eksempel på oksidativt stress som øyet utsettes for. Eldre er mer utsatt for UV-skade,

da nivået av UV filtre i linsen reduseres lineært med alder (24). Grå stær fører til at linsen ikke får utført sin oppgave normalt. Lyset blokkeres når det passerer linsen, som fører til at det ikke dannes et klart bilde på netthinnen (32).

## 1.5 GR i øyet

Syntetiske glukokortikoider er mye brukt i oftalmologi, og brukes til behandling av flere øyesykdommer, som akutte og kroniske inflammatoriske tilstander i øyet (17). For behandling av inflammasjon på øyeoverflaten, som postoperativ betennelse og allergisk konjunktivitt brukes gjerne glukokortikoider som topikal administrasjon (17). Intravitreal injeksjon av glukokortikoider brukes ofte for behandling av øyesykdommer i den bakre delen av øyet. Okulære bivirkninger som kan oppstå ved bruk av glukokortikoider er grå stær, og forhøyet intraokulært trykk som videre kan føre til glaukom (17).

Mekanismen for glukokortikoid signalisering i de ulike lagene i øyet, deres fysiologiske og terapeutiske effekter og bivirkninger er fortsatt lite kjent (17). Det har blitt vist at funksjonelt aktiv GR uttrykkes i ulike celletyper i øyet, som linse, hornhinne og netthinne (16;17). Terapeutiske effekter av glukokortikoider prosesseres via GR (17).

### 1.5.1 GR i linseceller

Det er vist at  $\alpha$ -isoformen av GR er den mest dominerende isoformen i humane linseceller (16). Det er observert en langvarig glukokortikoid respons (opptil 72 timer) i linse celler, og man tenker dette er forårsaket av redusert nedbrytning av GR (16). Det finnes to isoformer av GR $\alpha$ , hvorav disse er GR $\alpha$ A og GR $\alpha$ B, som er forskjellige i det N-terminale domenet på grunn av forskjellige startkodon (33). Den korteste isoformen (GR $\alpha$ B) har vist seg å være mest responsiv for glukokortikoider og følsom for degradering, sammenlignet med den lengre GR $\alpha$ A-isoformen (16). Uttrykk av GR $\alpha$ A-isoformen i linsecellene kan derfor være en mulig årsak til forlenget glukokortikoidrespons. En annen årsak kan være at GR-proteinuttrykket stabiliseres grunnet redusert proteasomaktivitet (16).

En bieffekt som er sett hos pasienter som har blitt behandlet med glukokortikoider for okulære og ikke-okulære sykdommer, er utvikling av grå stær (17;34). Mekanismen og patogenesen for glukokortikoidindusert grå stær er lite kjent. Den aktive GR-isoformen er

funnet i linseepitelceller både hos mus og mennesket, noe som demonstrerer at det finnes en spesifikk og direkte virkningsmekanisme (17). Det er antydning at glukokortikoider kan forstyrre normale funksjoner til linseceller, som proliferasjon, vekst, migrasjon, celledifferensiering, apoptose og overlevelse (16;17;34).

Differensiering av epitellinseceller i linsefibre er en prosess for utvikling og vekst av linsen (29). En forstyrrelse i denne differensieringsprosessen kan føre til at linsen ikke blir transparent, som kan føre til utvikling av grå stær. Noen studier har antydning at endringer i produksjonen av vekstfaktorer i øyet induseres av steroider (29). Dette kan videre føre til endringer av differensieringen av linse-epitelceller hvor vekstfaktorene har en innvirkning. En annen hypotese som tidligere nevnt, er at glukokortikoider kan påvirke de beskyttende antioksidative systemene i linsen, som resulterer i at linsen blir mer utsatt for oksidativt stress (29).

Glukokortikoider har en effekt på epitelceller i linsen, som blant annet endringer i genuttrykk. Et endret genuttrykk kan medføre endring i proteinuttrykk (16). Gjennom studier med humane linseepitelcellelinjer er det blitt observert en signifikant økning i luciferaseaktiviteten til reportergener etter stimulering med Dex allerede etter 2 timer, som ble opprettholdt over en 24 timers periode (16). Dette tyder på en tidlig glukokortikoidrespons, og at en endring i genuttrykket kan forekomme etter 2 timer (16;35). Ved bruk av mikroarray-teknologi har glukokortikoidinduserte endringer i genuttrykk i linsene blitt identifisert fra 4 til 48 timer ved bruk av cellekulturer fra mennesket (16).

## 1.6 PAX6 i øyet og linseceller

PAX6 koder for en transkripsjonsfaktor som er avgjørende for normal øyeutvikling (36). I øyeutvikling er PAX6 et hovedkontrollgen, og er nødvendig for induksjon av øyeutvikling. PAX6 spiller en viktig rolle i utviklingen av netthinnen, linsen, iris og hornhinnen (30). PAX6 inducerer dannelse av det ommatidale øyet hos insekter og linse hos pattedyr (23). Hos mus har heterozygote mutanter små øyne (*small eye*), mens homozygote kun har rester av okulært vev, og dør kort tid etter fødsel på grunn av nesedysfunksjon. Som tidligere nevnt forårsaker heterozygot mutasjon av PAX6 i mennesket øyedefekter som aniridia, grå stær og glaukom (23;37). I tidligere studier er det vist at aniridia ofte er forbundet med en mutasjon i PAX6 genet på kromosom 11p13, eller ekson 6 eller 9 (38). Det er rapportert over 334 unike

sekvensendringer spredt over genet PAX6 (30). Det antas at de fleste av disse sekvensendringene forstyrrer transkripsjon eller translasjon. De fleste punktmutasjonene fører enten til innføring av et prematur termineringskodon, forlengelse av C-terminalen, eller aminosyresubstitusjoner (missense endringer), og dermed endring av proteinfunksjonene (30).

Aniridia kjennetegnes av fullstendig eller delvis hypoplasi av iris. Aniridia er ofte assosiert med endringer i hornhinnen, utvikling av grå stær eller glaukom (23;36). Grå stær oppstår hos rundt 50-85 % hos personer med aniridia (30). Tilstanden glaukom kjennetegnes ved at det intraokulære trykket er skadelig forhøyet. Det er økt risiko for utvikling av glaukom hos personer med aniridia, hvor det er en prevalens på rundt 30-50 %. Ubehandlet glaukom vil medføre et varig synstap (30). Mekanismene for utvikling av progressiv hornhinesykdom i aniridia ser ut til å være multifaktorell (36). Disse inkluderer unormal differensiering av hornhinneepitel som resulterer i skjørhet av epitelceller, unormal epitel migrasjon, og at cellene blir mer utsatt for naturlig tæring, grunnet en reduksjon i celleadhesjonsmolekyler i den heterozygote tilstanden av Pax6 (36).

En studie av Pax6 gjort med salamandere (*Notophthalmus viridescens*) og dyrkede irisceller, viste at Pax6 er en regulator for celleproliferasjon og differensiering av linsefibre under regenerering av linsen (39). Det ble vist at nedregulering av Pax6 betydelig reduserte proliferasjon og hemmet regenerering av linsen (39). Under linseutviklingen regulerer Pax6 ekspresjonen av krystalliner, som er et vannløselig protein i linsen som gjør linsen transparent (39). Det er antydning at Pax6 blant annet fungerer som en repressor av krystallinsk uttrykk (40). Ved å regulere det krystallinske uttrykket, er Pax6 nødvendig for linsefibre-differensiering. I det nevnte forsøket ble det antydning at Pax6 ikke er nødvendig for regulering av krystalliner etter initiering av linsedifferensieringen, men hadde fortsatt en vedvarende effekt på proliferasjon. Resultatene fra studiet indikerer at Pax6 spiller en viktig rolle for proliferasjon og differensiering av regenerering av linsen (39).

PAX6 regulerer ekspresjon av gener involvert i blant annet celleproliferasjon, differensiering, håndtering av oksidativ stress og inflammasjon (41). Linsen inneholder antioksidanter og enzymer for å beskytte linsen mot ROS-forbindelser (41). Eksponering for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i kultiverte linser har vist å inducere grå stær (42). Oksidativt stress har vist å ha en innvirkning på PAX6, men virkningsmekanismen er ikke kjent (41). Oksidativt stress har i flere studier vist å føre til undertrykkelse av PAX6 (41;43).



## 1.7 Formål med oppgaven

PAX6 er en transkripsjonsfaktor som er viktig for den normale utviklingen og funksjonen til øyet. Forskningsgruppen i Farmakologi (IFA) har oppdaget at glukokortikoidreseptoren (GR) interagerer synergistisk med PAX6 i regulering av gener.

Mutasjoner i PAX6 eller langvarig bruk av glukokortikoider er assosiert med patologiske tilstander i øyet, noe som indikerer at begge faktorene er viktig for øyets normalfunksjon. Øynene utsettes for oksidativt stress, og det er rapporter på at både PAX6 og GR i andre vev vil kunne påvirkes av oksidativt stress.

I dette prosjektet blir en linse-epitelcellelinje brukt som modellsystem for å studere hvilken konsekvens det får for vekst og overlevelse at PAX6 og/eller GR mangler. Det er også av interesse å finne ut hvordan oksidativt stress påvirker vekst og overlevelse til linse-epitelcellelinjen, og om tilstedeværelsen eller fraværet av PAX6 og GR har noe å si for cellelinjens respons. Funksjonen til PAX6 og GR som transkripsjonsfaktorer under oksidativt stress vil også bli studert.

## 2 Materialer

**Tabell 2.1 Oversikt over B3 Linseepitelcellelinjer.** Knock out (KO) cellene er modifisert ved bruk av CRISPR-Cas9 av Forskningsgruppe i Farmakologi ved IFA. Kortnavnene til cellelinjene vil videre bli brukt i oppgaven. X markerer KO av GR og/eller PAX6.

Cellelinje	Cellelinje kortnavn	GR knock out	PAX6 knock out
B-3	B3 WT		
B3 WT GR KO 21/1 C9	B3 WT C9	X	
B3 WT GR KO 21/1 D10	B3 WT D10	X	
B3 WT GR KO 21/1 E2	B3 WT E2	X	
B3 WT GR KO 21/1 E3	B3 WT E3	X	
B3 3.4	B3 3.4		X
B3 3.4 GR Arm 1 8/1-20 A12 28/2-20	B3 3.4 A12	X	X
B3 3.4 GR Arm 1 8/1-20 C12	B3 3.4 C12	X	X
B3 3.4 GR Arm 1 8/1 sortert 11/2 G9 3/4-20	B3 3.4 G9	X	X
B3 3.4 GR Arm 1 8/1 sortert 11/2 E3 30/3-20	B3 3.4 E3	X	X
B3 3.4 GR Arm 1 8/1 sortert 11/2 H7 30/3-20	B3 3.4 H7	X	X
B3 3.4 GR Arm 1 8/1 sortert 11/2 E10 30/3-20	B3 3.4 E10	X	X

B-3 cellene er fra ATCC®, og har produktnummeret CRL-11421. De resterende cellelinjene i Tabell 2.1 er fremstilt ved CRISPR-Cas9 teknologien med utgangspunkt i B-3 cellene fra ATCC®. KO cellelinjene er fremstilt av Forskningsgruppen i Farmakologi ved IFA.

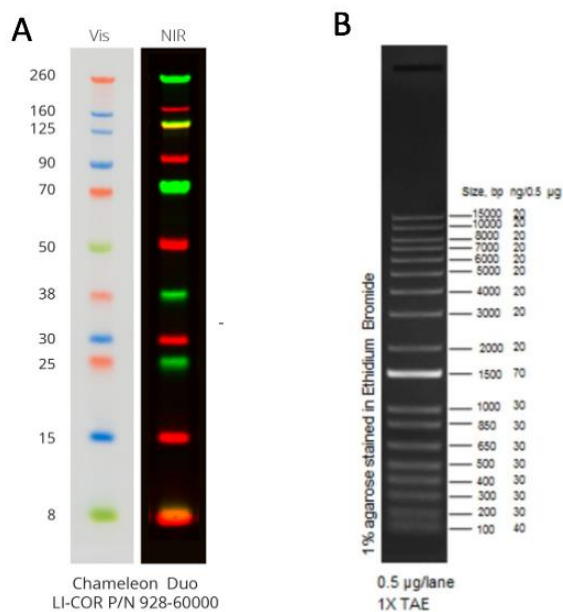
**Tabell 2.2 Diverse buffere og løsninger**

Buffere/løsninger	Bruksområde	Innholdsstoffer
TBS-T buffer	Vasking av membraner og fortynning av sekundære antistoffer	<p>For å lage 5 L 10 x TBS brukes følgende:</p> <p>10 g KCl 400 g NaCl 200 ml 1M TrisCl pH 7,5 Ad 5 L dH<sub>2</sub>O</p> <p>For å lage 5 L 1 x TBS-T buffer brukes følgende:</p> <p>500 ml 10 x TBS 5 ml (0,1%) Tween 20 Ad 5 L dH<sub>2</sub>O</p>

Bolt MES SDS Running Buffer	Elektroforese	For å lage 1 L brukes følgende:  50 ml Bolt MES SDS Running Buffer (20X) Ad 1 L dH <sub>2</sub> O
Blotting buffer	Blotting	For å lage 5 L brukes følgende:  144 g Glycine 29 g Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS, Trometamol) 1 L Ethanol Ad 5 L dH <sub>2</sub> O
2x SDS PAGE-Buffer	Lysering av celler	100 mM Tris-HCl (pH 6.8) 4 % SDS (sodium dodecyl sulfate; electrophoresis grade) 0,2 % bromophenol blue 20 % glyserol 200 mM DTT (dithiothreitol) DTT tilsettes rett før bruk.
1 M DTT	Lysering av celler	10 ml består av følgende:  1,54 g DL-Dithiothreitol (DTT) 33,3 ul 3 M Natriumacetat (NaOAc) (pH 5,2) Ad 10 ml dH <sub>2</sub> O
50 x TAE	Agarose gelelektroforese	1 L består av følgende:  242 g Trisbase 57,1 ml Eddiksyre 100 ml 0,5 M EDTA Ad 1 L dH <sub>2</sub> O  Fortynning på 1 : 50 ble brukt til gelelektroforese.
Genomisk DNA buffer	Tillaging av genomisk DNA	50 ml består av følgende:  2,5 ml 50 mM TrisHCl (pH8) 10 ml 100 mM EDTA 2,5 ml 100 mM NaCl 2,5 ml 1 % SDS 32,5 ml dH <sub>2</sub> O
6xT Gel loading buffer	Gelelektroforese	0,25 % Xylen Cyanol FF 60 mM Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8,0) 0,6 % SDS 40 % (w/v) sukrose i vann

**Tabell 2.3 Diverse kjemikalier/løsninger brukt til DNA sekvensering**

Navn på kjemikalie/løsning brukt til DNA sekvensering	Bruksområde	Produsent	Produkt-nummer
Proteinkinase K Solution (20 mg/ml)	Genomisk DNA	Invitrogen	25530-049
2-propanol Isopropanol	Genomisk DNA	VWR Chemicals	67-63-0
Ethanol	Genomisk DNA	Sigma-Aldrich	32221
TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA)	Genomisk DNA	Invitrogen	12090015
5 x sekvenseringsbuffer	DNA sekvensering	Fra DNA Sekvenseringslab, Medisinsk Genetisk avdeling, UNN	
BigDye3.1	DNA sekvensering	Fra DNA Sekvenseringslab, Medisinsk Genetisk avdeling, UNN	
OneTaq 2X MM w/Standard Buffer	DNA sekvensering	BioLabs	M0482S
LE Agarose	Gel elektroforese	SeaKem	50004



**Figur 2.1 Laddere brukt til western blot og agarose gelelektroforese.** Chameleon Duo ladder som ble brukt som molekylvekt markør i WB fremstilles i figur A. Produsenten for Chameleon Duo ladder er LI-COR, og produktnummeret er 928-60000. TrackIt™ 1 Kb Plus DNA ladder, presentert i figur B, ble brukt som molekylvektmarkør i agarose gelelektroforese. Produsenten på TrackIt™ 1 Kb Plus DNA ladder er Invitrogen og produsentnummer 10488085.

**Tabell 2.4 Diverse kjemikalier/løsninger brukt til celledyrkning/celleprosesser**

<b>Kjemikalie/løsning brukt til celledyrkning/celleprosesser</b>	<b>Bruksområde</b>	<b>Produsent</b>	<b>Produkt-nummer</b>
MEM – Minimum Essential Medium Eagle	Celledyrkning	Sigma-Aldrich	M4655
Fetal Bovine Serum (FBS)	Celledyrkning	Biowest	S181B-500
MEM Non-essential Amino Acid Solution (100x)	Celledyrkning	Sigma-Aldrich	M7145
Sodium pyruvate solution	Celledyrkning	Sigma-Aldrich	S8636
Trypsin-EDTA solution (1x)	Cellesplitting	Sigma-Aldrich	T4049
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Vasking av celler	Sigma-Aldrich	D8537
Opti-MEM	Transfeksjon av celler	Gibco	11058021
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	Lysering av celler	Novex	NP008
Bolt™ Sample Reducing Agent (10X)	Lysering av celler	Novex	B0009
Hydrogenperoksid NAF 10 % oppløsning	Stimulering av celler	NAF – Norges apotekforening	231-765-0
Dexamethasone-Water Soluble	Stimulering av celler	Sigma-Aldrich	D2915
NewBlot Nitro Stripping Buffer, 5X	Stripping av membran fra WB	LI-COR	928-40030
Intercept™ Blocking Buffer TBS	Blokking av membraner fra WB	LI-COR	927-60001
Tween 20	Farging av membraner	Sigma-Aldrich	P1379
SuperSignal™ West Pico PLUS Stable Peroxide Solution	Western blot – fremkalle sekundære antistoffer	Thermo scientific	1863097
SuperSignal™ West Pico PLUS Luminol/Enhancer Solution	Western blot – fremkalle sekundære antistoffer	Thermo scientific	1863096
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	qPCR	Applied biosystems	A25741
RiboLock RNase Inhibitor	Syntetisering av cDNA	Thermoscientific	EO0382
Dual – Light™ Reagent Buffer A	Luciferase reporter-gen-assay	Applied biosystems	T2176
Dual – Light™ Reagent Buffer B	Luciferase reporter-gen-assay	Applied biosystems	T2238
Tropix® GALACTON - Plus	Luciferase reporter-gen-assay	Applied biosystems	T2190
Tropix® Accelerator II	Luciferase reporter-gen-assay	Applied biosystems	T2365

**Tabell 2.5 Primære og sekundære antistoff brukt for farging av membraner fra WB.**

<b>PRIMÆRE ANTISTOFF</b>			
	<b>Produktnummer</b>	<b>Produsent</b>	<b>Fortynning</b>
Anti- GR mouse	611227	BD transduction Laboratories	1 : 3000
Anti-Pax6 Bleed4 sheep	Custom	MRC PPU Protein Phosphorylation and Ubiquitylation Unit	1 : 500
Anti-GR DSBH mouse	AB_528427	Development Studies Hybridoma Bank, University of Iowa	1 : 500
Anti-Actin Antibody produced in rabbit	A5060	Sigma-Aldrich	1 : 1000
GILZ Monoclonal Antibody rat	14-4033-82	Invitrogen	1 : 250
Connexin 43 Monoclonal Antibody (CX-1B1) mouse	13-8300	Invitrogen	1 : 250
<b>SEKUNDÆRE ANTISTOFF</b>			
IRDye® 680LT Donkey anti-Mouse IgG Secondary Antibody	926-68022	LI-COR	1 : 10 000
IRDye® 800CW Donkey anti-Mouse IgG Secondary Antibody	926-32212	LI-COR	1 : 10 000
Anti-sau rød 680	A21102	Invitrogen	1 : 10 000
Anti-sau grønn 800	SA5-100060	Invitrogen	1 : 10 000
IRDye® 680LT Donkey anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	926-68023	LI-COR	1 : 10 000
Goat anti-rat IgG-HRP	J2109	Santa Cruz Biotechnology	1 : 250

**Tabell 2.6 Kommersielle Kits**

<b>Bruksområde</b>	<b>Kit</b>	<b>Innholdsstoffer</b>	<b>Produsent</b>	<b>Produkt-nummer</b>
Lage RNA av celler	Quick – RNA Miniprep	RNA Lysis Buffer	Zymo Research	R1055
		RNA Prep Buffer		
		RNA Wash Buffer		
		DNase/RNase-Free Water		
		DNaseI		
		DNA Digestion Buffer		
		Spin-Away Filter		
		Zymo-Spin IICG Columns		
		Collection Tubes		
Lage cDNA fra RNA	High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	10 x RT Buffer	Applied biosystems	4368814
		25 x dNTP mix		
		10x RT Random Primers		
		MultiScribe Reverse Transcriptase		
Rensing av plasmid til transfeksjon av celler	QIAGEN® Plasmid Plus Midi Kit (100)	LyseBlue - Fargeindikator	QIAGEN®	12945
		Buffer P1 - Resuspensjonsbuffer		
		Buffer P2 – Lysisbuffer		
		Buffer S3 – Nøytraliseringsbuffer		
		Buffer BB – Bindingsbuffer		
		Buffer ETR – Endotoksin vaskebuffer		
		Buffer PE – Vaskebuffer		
		Buffer EB - Elueringsbuffer		
Transfektore celler	Lipofectamine® 3000 Transfection kit	Lipofectamine 3000	Invitrogen	L3000-015
		P3000		
Fjerning av nukleotider og primere fra PCR-produkt før sekvensering	A'SAP PCR cleanup kit	Exonuclease 1	ArticZymes	70700-201
		Shrimp Alkaline Phosphatase		

**Tabell 2.7 Primere brukt til DNA sekvensering.**

Primer	Sekvens 5' - 3'	Produsent
hGR pcr 1 fw	GGTTCATTTAACAAGCTGCCTC	Forskningsgruppen i Farmakologi, IFA
hGR pcr 1 rev	GCTTGGAGTCTGATTGAGAAGC	

**Tabell 2.8 Primere brukt i qPCR.**

Human primer	Sekvens 5' - 3'	Produsent
FH2_GAPDH	CTTTTGCGTCGCCAG	Sigma-Aldrich
RH2_GAPDH	TTGATGGCAACAATATCCAC	Sigma-Aldrich
hGUSB.FW1	CCACCACACTGGGCTAATTT	Sigma-Aldrich
hGUSB.REV1	ACATTTTGTGGCCAGGTGT	Sigma-Aldrich
hGILZ.RT3	CAGGGTCTTCAACAGGGTG	Sigma-Aldrich
hGILZ.RT5	TGGTGGCCATAGACAACAA	Sigma-Aldrich
hGJA1.RT3	GGTACAAGAGTGTGGGTACAG	Operon
hGJA1.RT5	TGAGGAAAGTACCAAACAGCAG	Operon

**Tabell 2.9 Plasmider brukt for transfeksjoner.**

Plasmider
pGL3-basic
pGL3-GJA1 Large
pGL3-GILZ 1265
pGL3-GILZ 512
pGL3-GILZ 927
pCH110

pGL3-Basic plasmidet er fra produsenten Promega, og har produktnummeret E1751. De resterende plasmidene i *Tabell 2.9* er promotorer laget av Forskningsgruppen i Farmakologi ved IFA (Mikkola, upublisert).



## 3 Metode

### 3.1 Western blot

Western blot (WB) er en analytisk teknikk som ofte brukes for å detektere spesifikke proteiner i proteinekstrakter. Proteinene separeres ut ifra størrelse (MW) i en SDS-PAGE gel elektroforese, og overføres til en membran der de kan detekteres med spesifikke antistoffer.

#### 3.1.1 Høste celler til Western blot

Celler i en omtrentlig 80-90 % konfluent brønn i et 6- eller 12-brønners brett ble høstet. Dette ble gjort ved først å fjerne cellemediumet fra brønnene. Deretter ble cellene vasket med PBS-buffer, 1-2 ml per brønn. All PBS-bufferen ble fjernet, før lysisbuffer ble tilsatt.

Lysisbufferene som ble brukt for høsting til WB i denne oppgaven var enten LDL Sample buffer med Reducing Agent i forholdet 15 : 6 eller 2xSDS PAGE-Buffer som tilsettes 0,2 M DTT rett før bruk. Cellene i 12-brønners brettet ble høstet i 100 µl lyseringsbuffer, og celler i 6-brønners brett ble høstet i 140 µl. En celleskrape ble brukt for å løsne cellene. Lysisbufferen med cellene ble pipettert over i merkede eppendorfrør, og satt på varmeblokk (block heater SBH130DC fra Stuart) på 100 °C i 5-10 min. Videre ble eppendorfrørene satt på is. For lagring ble de oppbevart ved – 20 °C. Før kjøring på gel ble cellelysaten sonikert i iskaldt vannbad ved bruk av Bioruptor fra Diagenode. Cellelysaten ble sonikert på innstillingene High i 2,5 min, hvor det kjøres alternerende sykluser på 30 sek på/av. Formålet med sonikering er å gjøre prøvene mindre viskøs, før pipettering i brønnene i gelen. Rett før kjøring av WB ble cellelysaten sentrifugert i mikrosentrifuge (Biofuge pico fra Heraeus) på 12,000 x g i 2 min.

#### 3.1.2 Kjøring av SDS-PAGE gel

Invitrogen Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Plus geler med et passende antall brønner (10, 12 eller 15) ble plassert i et gelelektroforese kammer. Før gelen ble plassert i kammeret, ble kammen fra brønnene tatt av og brønnene ble skylt med Running buffer (Bolt™ MES SDS Running Buffer (20x) fra Invitrogen, Cat.no. B000202). Gelen ble festet i kammeret, og kammeret ble fylt med Running buffer. Running bufferen består av MES SDS Running Buffer (20X) fortynnet til 1X i vann. Chameleon Duo ladder (Fra LI-COR, Cat.no. 928-60000) ble brukt

som molekylvekt (MW) markør. 3 µl Chameleon Duo ladder og 15 µl med cellelysaten ble pipettert i brønnene. Gelen ble kjørt på innstillingene GEL på 200 V i 45 min på maskinen PowerEase 500 (Invitrogen life technologies). Proteinene vandrer fra katoden (-) mot anoden (+) i et elektrisk felt som dannes når spenning (200 V) påføres.

### 3.1.3 Blotting av membran

Etter gelelektroforesen ble det kjørt blotting, for å overføre prøvene fra gelen til en membran ved bruk av spenning. I blottingen ble gelen fra gelelektroforese lagt som en sandwich sammen med svamper, papir og membran (BioTrace™ Nitrocellulose Transfer Membranes fra PALL) i et kammer. Ved kjøring av en gel så sandwichen følgende ut: svamper – papir – gel – membran – papir – svamper til fullt kammer. For to geler som ble kjørt samtidig så sandwichen følgende ut: Svamper – papir – gel 1 – membran 1 – papir – 1 svamp – papir – gel 2 – membran 2 – papir – svamper til fullt kammer. Det ble kjørt strøm gjennom platene som klemmer sandwichen sammen, som gjør at proteinene vandrer fra gelen og over til membranen. Platen som er nærmest gelen er katoden (-) og platen som ligger nærmest membranen er anoden (+). Proteinene vandrer fra katoden over til anoden ved bruk av et elektrisk felt som oppstår når spenning tilføres. Kammeret med sandwichen ble satt i ytterkammeret, hvorav det innerste kammeret ble fylt opp med blotting buffer. Ytterkammeret ble fylt med destillert vann. Instrumentet (PowerEase 500 fra Invitrogen life technologies) ble innstilt på BLOT i 1 time og 45 min på 160 mA.

### 3.1.4 Farging av membran

Når blottingen var ferdig, ble membranen overført til et 50 ml sentrifugerør. Ca. 5 ml Intercept (TBS) Blocking Buffer ble tilsatt i sentrifugerøret med membranen, for å unngå uspesifikke bindinger. Membranen ble blokket med Intercept (TBS) Blocking Buffer i 1 time i romtemperatur (RT), før primærantistoffet ble tilsatt. Sammen med primærantistoffet ble 3000 µl Intercept (TBS) Blocking Buffer og 3 µl Tween 20 tilsatt. Fortynningen til de ulike primærantistoffene er oppgitt i *Tabell 2.5*. For alle primærantistoffene benyttet i denne masteroppgaven, med unntak av aktin, har primærantistoffet stått på rullemixer (Roller mixer str1 fra Stuart Scientific) over natt ved 4 °C. Aktin har stått på rullemixer i RT i minst 1 time. Membranen ble vasket 3-4 runder i sentrifugerøret, hvor ca. 20 ml TBS-T buffer ble tilsatt og vasket i 5-10 min per runde. Deretter ble membranen overført til en lystett boks som senere

brukes for sekundærantistoff. En større mengde TBS-T buffer, ca. 40-50 ml ble tilsatt og satt på vippeplate (Stuart scientific Gyro rocker STR9) i ca. 15-20 min. Dette ble utført to ganger. Etter vasking av membranen ble det tilsatt sekundærantistoff som var spesifikt til primærantistoffet. Sekundærantistoffet ble fortynnet i 15 ml TBS-T buffer i en lystett boks, og ble satt på vippeplate i 1 time. Videre ble overflødig sekundærantistoff vasket av membranen på samme måte som tidligere beskrevet for primærantistoffet. Membranen ble fremkalt ved bruk av maskinen Odyssey Fc fra LI-COR, og programmet Image Studio. Membranene ble scannet på Channel 700 og 800, med unntak av sekundærantistoffet Goat anti-rat IgG-HRP hvor membranen ble scannet på Chemi. For sekundær antistoffet Goat anti-rat IgG-HRP ble det tilsatt en 3 ml blanding av SuperSignal West Pico PLUS Stable peroxide Solution og SuperSignal West Pico PLUS Luminol/Enhancer Solution i forhold 1 : 1 på membranen rett før fremkalling av membranen. Denne blandingen virket på membranen i 3 min før fremkalling.

Membranene ble farget med flere primærantistoff. Etter fremkalling av membranen ble den overført til et 50 ml sentrifugerør. 5 ml Intercept (TBS) Blocking Buffer ble tilsatt, og membranen ble blokket i 1 time på rullemixer, før nytt primærantistoff ble tilsatt på samme måte som tidligere beskrevet. For membranene hvor det var mye bakgrunnsstøy, eller mange uspesifikke bånd ble membranene strippet før neste primærantistoff ble tilsatt. Dette ble gjort ved å blande 1 ml Stripping Buffer og 4 ml dH<sub>2</sub>O sammen. Blandingene ble tilsatt i et 50 ml sentrifugerør med membranen. Røret ble satt på rullemixer i 5 min i RT. Deretter ble membranen vasket med 1xPBS buffer i 30 min. Intercept (TBS) Blocking Buffer ble tilsatt membranen i 1 time. Til slutt ble primærantistoff tilsatt membranen.

## **3.2 Gelelektroforese**

### **3.2.1 Tillaging av 0,7 % Agarosegel**

Genomisk DNA og PCR produkt ble kjørt på 0,7 % Agarosegel for å verifisere innhold av DNA og størrelse på PCR produkt. 0,7 % Agarosegel ble fremstilt ved å veie inn 0,7 g agarosepulver per 100 ml 1xTAE. For å løse agarosen opp i 1xTAE ble løsningen varmet til kokepunkt i mikrobølgeovn, med flere omrøringer underveis. 0,7 % agaroseløsning ble oppbevart i varmeskap ved 65 °C.

### 3.2.2 Støping av 0,7 % Agarosegel

Passende størrelse på gelstøpingskar og en kam med ønsket antall «tenner» ble brukt for å støpe en 0,7 % agarosegel. I denne oppgaven ble det brukt et lite gelstøpingskar, med 8-10 brønner. Gelstøpingskaret ble festet på gelstøpingsrammen. 10 µl 1 mg/ml Etidiumbromid (EtBr) ble tilsatt i gelstøpingskaret. Deretter ble det tilsatt ca. 50 ml med 0,7 % agarosegelløsning. Karret ble vippet litt til siden, slik at EtBr ble blandet jevnt i gelen. EtBr gjør det mulig å detektere gelbåndene ved UV-lys. Kammen med ønsket antall «tenner» ble festet i gelstøpingskaret. Eventuelle luftbobler ble fjernet før gelen stivnet. Når gelen var stivnet, etter ca. 20 min, ble kammen fjernet og gelen ble overført til et gel elektroforesekar (Mini-Sub Cell GT, BIO-RAD). Gel elektroforesekaret ble fylt med 1xTAE Running buffer til hele gelen var dekket. TrackIt 1 Kb plus ladder (Invitrogen) ble brukt som MW-markør. Prøvene og TrackIt 1 Kb plus ladder ble pipettert i brønnene. Spenning (90V) ble tilført, og gelen ble kjørt i 30 min. Bilde av agarosegelen ble tatt ved bruk av instrumentet Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ fra BIO RAD, og programmet Image Lab<sup>TM</sup> Software.

## 3.3 DNA sekvensering

### 3.3.1 Genomisk DNA

500 µl genomisk DNA buffer (50 mM TrisHCl (pH8); 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1 % SDS) ble tilsatt et eppendorfrør med cellepellet høstet fra en 80-90% konfluent brønn i et 6-brønners brett. Deretter ble 12,5 µl av 20 mg/ml Proteinkinase K tilsatt, og prøvene ble mikset på vortex. Eppendorfrørene ble plassert i varmeblokk (block heater SBH130DC fra Stuart) på 55 °C over natten.

Neste morgen ble eppendorfrørene tatt av varmeblokken, og 180 µl konsentrert NaCl (approx 6 M NaCl = mettet) ble tilsatt, og invertert 5 ganger. Deretter ble eppendorfrørene mikset på vortex i 5 min, og videre sentrifugert i 7 min i en mikrosentrifuge (Heraeus Biofuge pico) på maksimal hastighet (13000 rpm). 600 µl supernatant uten toppfasen og pellet ble tatt ut av eppendorfrørene og overført til nye eppendorfrør. 400 µl 2-propanol ble tilsatt, og invertert 5 ganger. Denne blandingen sto 1 min i RT. Videre ble prøvene sentrifugert 2 min på maksimal hastighet i en mikrosentrifuge. Supernatanten ble fjernet. Den presipiterte DNA-pelleten ble vasket med 500 µl 70% EtOH. Dette ble gjort ved at EtOH ble tilsatt, og deretter ble prøvene sentrifugert i 2 min på maksimal hastighet i en mikrosentrifuge. Det meste av etanolen ble

pipettert ut, og DNA-pelleten med restene av EtOH ble lufttørket (prøvene sto 10 min i eksikator, deretter i RT til etanolen var fordampet). 100 µl TE, ble tilsatt og inkubert 30 min i RT og vortex noen ganger underveis. Det genomiske DNA 'et ble lagret ved - 20 °C. 2 µl ble kjørt på 0,7 % agarosegel, for å kontrollere om genomisk DNA er til stede i prøvene og dermed om prøvene kan brukes videre. 2 µl DNA, 2 µl 6xT buffer og 8 µl vann ble mikset sammen, og pipettert i brønner i en 0,7 % agarosegel. TrackIt 1 Kb plus ladder (Invitrogen) ble brukt som MW-markør.

### 3.3.2 PCR

Det ble kjørt PCR av genomisk DNA. Følgende ble tilsatt i PCR-rør:

Templat (genomisk DNA)	5 µl
Primer hGR pcr1 forward (10 µM)	2 µl
Primer hGR pcr1 revers (10 µM)	2 µl
dH <sub>2</sub> O	11 µl
OneTaq	20 µl

PCR-rørene ble videre kjørt på følgende program ved bruk av instrumentet T100™ Thermal Cycler fra BIO RAD:

Tabell 3.1 Program for PCR reaksjon av genomisk DNA

Trinn	Temperatur (°C)	Tid
Initial Denaturation	94	45 sek
30 Cycles	94	20 sek
	53	30 sek
	68	45 sek
Final Extension	68	5 min

PCR produktene ble kjørt på 0,7 % agarosegel. For hvert PCR-produkt ble det laget en blanding bestående av 5 µl PCR produkt, 5 µl dH<sub>2</sub>O og 2 µl 6xT buffer. 7 µl TrackIt 1kB plus ladder (Invitrogen) ble tilsatt i første brønn, deretter 12 µl av hver PCR-produktblanding med dH<sub>2</sub>O og 6xT buffer.

Ved bekreftelse av bånd med rett størrelse på gelen, ble PCR-produktene rensset med Clean-up kit fra Articzymes. Følgende ble tilsatt i eppendorfrør:

PCR produkt	5 µl
A'SAP PCR cleanup kit Shrimp Alkaline Phosphatase	1 µl
A'SAP PCR cleanup kit Exonuclease	1 µl

Eppendorfrørene med prøvene ble mikset på vortex, og spinnet ned. Prøvene ble satt på varmeblokk (block heater SBH130DC fra Stuart) på 37 °C i 15 min, deretter 80 °C i 15 min. Videre ble prøvene satt på is til videre bruk, deretter lagret ved – 20 °C.

### 3.3.3 Sekvensering

De rensede PCR produktene ble videre sekvensert. Følgende ble tilsatt i PCR-rør:

dH <sub>2</sub> O	13 µl
Templat	2 µl
5x Sekvenseringsbuffer	3 µl
Primer (hGR pcr1 fw eller hGR pcr1 rev)	1 µl
BigDye 3.1	1 µl

Hvert templat ble tilsatt i 2 stykk PCR-rør, som ble tilsatt ulike primere. Ett PCR-rør ble tilsatt hGR pcr1 forward og det andre røret ble tilsatt hGR pcr1 revers.

PCR-rørene med prøvene ble satt i PCR maskinen, MJ Research PTC-200 Thermo Cycler Gradient Peltier, og programmet SFSEQ ble kjørt. Programmet består av følgende:

Tabell 3.2 Program (SFSEQ) for sekvensering.

Trinn	Temperatur (°C)	Tid (min)
1	96	5:00
2	96	0:10
3	50	0:05
4	60	4:00
5, Gå til trinn 2, 24 ganger		
6	4	For ever

Etter kjørt program, ble prøvene levert inn til sekvensering hos DNA sekvenseringslab (Medisinsk Genetisk avdeling, Universitetssykehuset Nord-Norge HF, Fakultet for medisin og helsevitenskap (MH), UiT). DNA sekvenseringslab bruker Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzers. DNA sekvensene ble tolket ved bruk av programmet SnapGene.

### 3.4 Plasmidprep

Det ble laget over-natt-kulturer av plasmidene (pGL3-Basic, pGL3-GJA1 Large, pCH110) på følgende måte: 55 ml med LB buljong med 100 µg/ml Ampicillin ble tilsatt i en autoklavert erlenmeyerkolbe. Frysestockene med plasmidene oppbevart ved -70 °C, ble hentet opp fra fryseren og holdt kjølig i en fryseblokk. En autoklavert tannpirker ble brukt for å overføre litt av de frosne bakteriestockene til erlenmeyerkolben. Erlenmeyerkolben med mediumet og tannpirkeren ble inkubert i en riste-inkubator (Unitson HT INFORS) ved 37 °C og 225 rpm i 17 timer. Neste dag ble innholdet i erlenmeyerkolbene overført til hvert sitt 50 ml sentrifugerør, og sentrifugert ved 4 °C på 4000 rpm i Eppendorf Centrifuge 5810R i 30 min. Etter sentrifugeringen ble supernatanten fjernet. Pelleten ble vortexet i ca. 30 sek, for å løse pelleten opp. QIAGEN ® Plasmid Plus Midi Kit ble brukt. 2 ml med Buffer P1 (resuspensjonsbuffer) ble tilsatt, og vortexet til pelleten var helt resuspendert i bufferen. Videre ble 2 ml med lysisbufferen, Buffer P2, tilsatt. Buffer P2 var tilsatt LyseBlue reagens som er en fargeindikator. Løsningen ble blandet forsiktig ved å vende røret 4-6 ganger til lysatet så viskøst og helt blått ut. Løsningen ble inkubert i RT i 3 min. Deretter ble 2 ml Buffer S3 tilsatt for å nøytralisere lysatet. Løsningen ble blandet ved å vende rørene 4-6 ganger, til blandingen var helt fargeløs. Lysatet ble overført til QIAfilter Cartridge, og inkubert i RT i 10 min. Stempelet ble satt i QIAfilter Cartridge, og lysatene ble filtrert i 15 ml sentrifugerør. 2 ml Buffer BB (Bindingsbuffer) ble tilsatt til det filtrerte lysatet, og blandet ved å vende rørene 4-6 ganger. Lysatene ble overført til QIAGEN Plasmid Plus-spinnkolonnene i QIAvac 24 Plus, med en rørforlenger i hver kolonne. Det ble tilført rundt 300 mbar vakuüm på kolonnene, slik at væsken ble trukket gjennom kolonnene. DNAet på kolonnene ble vasket med 0,7 ml ETR Buffer (Endotoksin vaskebuffer). Vakuüm ble brukt for å trekke væsken gjennom kolonnene. Det ble videre tilsatt 0,7 ml med Buffer PE (Vaskebuffer) for å vaske DNAet ytterligere. Også her ble vakuüm brukt for å trekke væsken gjennom kolonnene. For å fjerne det gjenværende av vaskebufferen, ble kolonnene sentrifugert ved 10,000 x g i 1 min ved bruk av mikrosentrifugen Heraus Biofuge pico. Kolonnene ble overført til rene eppendorfrør. 200 µl Buffer EB (Elueringsbuffer) ble tilsatt

kolonnene, og sentrifugert ved 10,000 x g i 1 min i en mikrosentrifuge for å eluere DNAet fra kolonnen. Konsentrasjonen av DNAet og renheten ble målt ved bruk av Thermo Scientific™ Nanodrop™ One Spectrophometer.

### 3.5 Celledyrkning

Cellene som ble brukt i denne oppgaven var humane B3 linse-epitelcellelinjer (ATCC CRL-11421). De CRISPR-Cas9 modifiserte celleklonene ble behandlet på samme måte som B3 cellelinjen. Alt celledyrking ble utført i sterilt miljø i Laminar Air Flow (LAF) benk.

Cellene ble dyrket i cellemedium bestående av 78 % MEM-Minimum Essential Medium Eagle, 20 % Fetal Bovine Serum (FBS), 1 % MEM Non-essential Amino Acid Solution (100x) og 1 % Sodium pyruvate solution. Cellene ble splittet omtrent to ganger i uken, når cellene var 70-90 % konfluente i middels store dyrkningsflasker.

Cellemedium og trypsin ble varmet til 37 °C før bruk. Når cellene ble splittet ble det gamle cellemediumet sugd bort. Deretter ble cellene vasket med 5 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), for å fjerne serum og løse celler. PBS har tilnærmet lik pH som kroppen, er ikke-toksisk og isoton slik at den ikke skader cellene. All PBS-buffer ble deretter fjernet, og 1 ml Trypsin-EDTA solution ble tilsatt. Trypsin er et proteolytisk enzym som løser adherente celler fra celledyrkningsflasken. Celledyrkningsflasken med trypsin ble satt i inkubatorskap ved 37 °C i noen minutter, til cellene var løsnet. Deretter ble cellene resuspendert i nytt cellemedium (4 ml). Cellene ble normalt splittet i forhold 1 : 3 eller 1 : 4. De overflødig cellene ble kastet, eller brukt til forsøk. Den middels store flasken ble etter splitting tilsatt cellemedium til et totalvolum på 10 ml.

#### 3.5.1 Utsåing av celler

I flere forsøk ble det sådd ut celler i 6-, 12- eller 24-brønners brett. Et spesifikt antall celler ble sådd ut i hver brønn. Cellene ble telt ved bruk av et Bürkerkammer. Telleområdet på Bürkerkammeret er delt inn i 9 like kvadrater (1 mm<sup>2</sup>), og hver av disse er igjen delt inn i 16 kvadrater. Telleområdet på Bürkerkammeret dekkes av et dekkglass, slik at dybden er 0,1 mm. Dette gir et volum på 0,1 mm<sup>3</sup> for hver av de 9 kvadratene, som tilsvarer 1 x 10<sup>-4</sup> ml. Minst 3 av de 9 kvadratene ble telt, og et gjennomsnitt av disse ble benyttet. Ved stor variasjon mellom antall celler per kvadrat, ble flere kvadrater telt. Det gjennomsnittlige



antallet celler per kvadrat ble brukt for å begrenne antall celler per ml, ved å multiplisere gjennomsnittet med  $10^4$ . Det ble beregnet nødvendig antall ml for å så ut ønsket antall celler per brønn. Denne mengden ble blandet sammen med nytt cellemedium for å få ønsket totalvolum i brønnene.

## **3.6 Stimulering av celler**

Celler ble stimulert med ulike Dex og  $H_2O_2$  konsentrasjoner i dette studiet. Det ble laget Stock-løsninger av Dex og  $H_2O_2$  som beskrevet under.

### **3.6.1 Tillaging av Dex løsninger**

Dex konsentrasjonene cellene ble stimulert med ble laget ut fra en Dex Stock-løsning. I denne Dex Stock-løsningen ble Dexamethasone-Water Soluble fra Sigma (produktnummer D2915) løst i vann til en sluttkonsentrasjon på 1 mM. Stock-løsningen og fortynningene av denne var holdbar i 14 dager, og ble oppbevart mørk og kjølig (4 °C). Det ble laget en mellomfortynning på 100  $\mu$ M fra Stock-løsningen, som ble blandet direkte i cellemedium til ønsket Dex konsentrasjon til stimulering av cellene. Rett før cellene ble tilsatt Dex, ble det laget en Dex-cellemediumløsning for hver konsentrasjon, nok til alle brønnene som ble tilsatt de ulike Dex konsentrasjonene. 100  $\mu$ M Dex-løsning ble tilsatt i cellemedium til riktig sluttkonsentrasjon, denne blandingen ble vendt noen ganger, før Dex-cellemediumet ble tilsatt cellene.

### **3.6.2 Tillaging av $H_2O_2$ løsninger**

For å stimulere cellene med de ulike  $H_2O_2$  konsentrasjonene, ble det først laget en Stock-løsning på 5 mM  $H_2O_2$ . Hydrogenperoksid NAF 10 % oppløsning som tilsvarer 2,9399 M ble brukt for å lage stock-løsningen. 5,1  $\mu$ l av Hydrogenperoksid NAF 10 % oppløsning ble tilsatt i 3000  $\mu$ l cellemedium for å lage en Stock-løsning. Denne Stock-løsningen ble laget fersk hver dag. Stock-løsningen ble fortynnet direkte i cellemedium til en sluttkonsentrasjon på 0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM  $H_2O_2$ . I likhet med Dex-løsningene, ble det også for  $H_2O_2$  laget felles løsninger med de ulike  $H_2O_2$  konsentrasjonene nok til alle brønnene. Disse blandingene ble vendt noen ganger, før det ble tilsatt på cellene.

## 3.7 Proliferasjons-assay ved bruk av IncuCyte

Det ble utført proliferasjons-assay ved bruk av instrumentet IncuCyte. IncuCyte maskin er en CO<sub>2</sub> inkubator for celleflasker eller dyrkningsbrett, utstyrt med et kamera med mikroskop. Grunnet kamera brukes IncuCyte til «Live cells imaging». Ved bruk av IncuCyte kan blant annet proliferasjon og morfologi studeres.

### 3.7.1 Titrering av Dex

De seks cellelinjene B3 WT, B3 WT C9, B3 WT D10, B3 3.4, B3 3.4 C12 og B3 3.4 G9 ble sådd ut i fire brønner per cellelinje i 12-brønners brett. Det ble sådd ut 150 000 celler per brønn på dag 1. Brettene ble satt inn i inkubatorskap til neste dag. På dag 2 ble en brønn per cellelinje tilsatt 20 nM Dex, 100 nM Dex og 500 nM Dex, og én brønn forble ustimulert. Dette ble gjort ved at cellemediumet i brønnene ble fjernet, og erstattet med 2 ml nytt medium i brønnene hvor cellene ikke ble stimulert, og 2 ml cellemedium tilsatt Dex til ønsket konsentrasjon av Dex (20 nM, 100 nM eller 500 nM Dex) for cellene som skulle stimuleres. Som tidligere nevnt ble en Dex løsning med en konsentrasjon på 100 µM tilsatt i cellemediumet for å få korrekt sluttkonsentrasjon av Dex. For å få en sluttkonsentrasjon på 20 nM Dex ble løsningen med 100 µM fortynnet 5000 ganger, for å få 100 nM Dex ble den fortynnet 1000 ganger og for å få 500 nM Dex ble den fortynnet 200 ganger. 12-brønners brettene ble satt inn i en IncuCyte maskin. Hver brønn ble avbildet hver 3.time, og det ble tatt 9 bilder av hver brønn. Brettet sto i IncuCyte maskinen i tre døgn, før høsting av cellene til WB. Cellene ble høstet i 100 µl LDL Sample buffer tilsatt Sample Reducing Agent i forhold 15:6.

### 3.7.2 Dex stimulering

Det ble sådd ut 150 000 celler i hver brønn i et 12-brønners brett på dag 1. Hver av de seks cellelinje ble det sådd ut to brønner. På dag 2 ble halvparten av cellene stimulert med 100 nM Dex. Dette ble gjort ved at cellemediumet fra brønnene ble fjernet og halvparten av brønnene ble erstattet med 2 ml nytt oppvarmet cellemedium, og den andre halvparten ble tilsatt 2 ml 100 nM Dex cellemedium. En brønn per cellelinje ble ustimulert, og en brønn per cellelinje ble stimulert med 100 nM Dex. 12-brønners brettet ble satt inn i en IncuCyte maskin, hvor

hver brønn ble avbildet hver 3.time i tre døgn. Videre ble cellene høstet i 100 µl 2 xSDS PAGE-Buffer tilsatt 0,2 M DTT lysis buffer for WB. Forsøket ble repetert tre ganger.

### 3.7.3 Titrering av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Det ble utført proliferasjons-assay hvor hver cellelinje ble stimulert med tre ulike konsentrasjoner av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM). På dag 1 ble det i likhet med tidligere proliferasjons-assay sådd ut 150 000 celler per brønn. Fire brønner per cellelinje (alle seks cellelinjene ble inkludert), ble sådd ut i 12-brønners brett. På dag 2 ble en brønn av hver cellelinje stimulert med tre ulike konsentrasjoner med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, i tillegg til én ustimulert brønn med celler. Dette ble gjort ved at cellemediumet fra dag 1 ble fjernet, og 2 ml nytt cellemedium ble tilsatt brønnene til de ustimulerte cellene, og 2 ml cellemedium som inneholdt henholdsvis 0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ble tilsatt i de resterende brønnene. Som tidligere beskrevet ble en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stock-løsning på 5 mM brukt som utgangspunkt og fortynnet i cellemedium for å få de ønskede sluttkonsentrasjonene. I likhet med de tidligere IncuCyte forsøkene ble brønnene avbildet hver 3.time i tre døgn. Etter tre døgn i IncuCyte maskinen ble cellene høstet i 100 µl 2xSDS PAGE-Buffer tilsatt 0,2 M DTT til WB. Forsøket ble utført én gang for B3 WT cellelinjene og to ganger for B3 3.4 cellelinjene.

### 3.7.4 Stimulering med Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Det ble utført proliferasjons-assay hvor cellene ble stimulert med Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Konsentrasjonene av Dex og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ble valgt på grunnlag av resultatene fra proliferasjons-assayene med titrering av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og Dex.

Hver av de seks cellelinje ble sådd ut i fire brønner i 12-brønners brett. 150 000 celler ble sådd ut i hver brønn. På dag 2 ble det gamle cellemediumet fjernet, og én brønn av hver cellelinjene ble stimulert med 100 nM Dex, én med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, én med 100 nM Dex + 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og én brønn forble ustimulert. Dette ble gjort ved at de ustimulerte cellene ble tilsatt 2 ml nytt cellemedium i brønnene. Cellene stimulert med 100 nM Dex eller 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ble tilsatt 2 ml cellemedium som var tilsatt Dex eller H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> som tilsvarte en sluttkonsentrasjon på 100 nM Dex, eller 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i likhet med de tidligere forsøkene. For cellene som var i brønnene som ble stimulert med 100 nM Dex i kombinasjon med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ble først stimulert i 30 min med Dex for å aktivere GR, deretter ble cellene utsatt for oksidativt stress ved å tilsette H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dette ble gjort ved at det først ble tilsatt 1 ml med 100

nM Dex cellemedium, som virket i 30 min. Etter 30 min ble 1 ml med 100 nM Dex og 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tilsatt i de allerede 1 ml cellemedium som var til stede i brønnene. 12-brønners brettene ble satt inn i en IncuCyte maskin. Det ble fremkalt 9 bilder per brønn hver 3.time i tre døgn. Deretter ble cellene høstet i 100 µl 2xSDS PAGE-Buffer buffer tilsatt 0,2 M DTT for WB. Forsøket ble repetert tre ganger for alle seks cellelinjene.

### 3.8 Transfeksjon av reportergen-plasmider

Det ble sådd ut 85 000 celler i hver brønn i 24-brønners Brett på dag 1. 24-brønners brettet ble satt i inkubatorskapet til neste dag. På dag 2, når cellene var 70-90 % konfluente, ble cellene transfektert med plasmider (pGL3-Basic, pGL3-GJA1 Large og/eller pGL3-GILZ). Celletype, mengde plasmid og type plasmid for de ulike transfeksjonsforsøkene er nærmere beskrevet i resultatdelen.

I rør A ble det blandet x µl plasmid (0,2 µg, 0,4 µg og 0,8 µg), 0,01 µg pCH110, P3000 reagent (2 uL/µg DNA), og 25 µl Opti-MEM til hver brønn. I rør B ble det blandet 0,8 µl Lipofectamin 3000 og 25 µl Opti-MEM til hver brønn. Dersom flere brønner ble tilsatt samme plasmid ble det laget en felles mastermix av rør A og rør B til hver konsentrasjon av plasmidene. Disse mastermixene (Rør A og rør B) ble vortexet noen sekunder. Når rør B med Lipofectamin 3000 og Opti-MEM hadde stått i 5 min i RT, ble rør A tilsatt i rør B. Rør A og B ble blandet ved å pipettere opp og ned 4-5 ganger. Deretter sto blandingen 15 min i RT før den ble dryppet på cellene. Før Rør A+B ble dryppet på cellene, ble det skiftet cellemedium på cellene. Det gamle mediumet ble fjernet, og 500 µl nytt oppvarmet cellemedium ble tilsatt på cellene. Etter blandingen av rør A + B hadde stått 15 min, ble 50 µl (50 µl – 55 µl, avhengig av mengde plasmid som var tilsatt) dryppet på cellene. Cellene sto i inkubatorskapet ved 37 °C over natt. Neste dag ble det gamle cellemediumet fjernet, og 500-1000 µl nytt cellemedium med serum ble tilsatt. 1000 µl cellemedium ble tilsatt i brønnene hvor cellene ikke ble stimulert med Dex eller H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, og 500 µl cellemedium ble tilsatt i brønnene hvor cellene skulle stimuleres med Dex eller H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. For disse brønnene ble 500 µl cellemedium tilsatt ønsket mengde Dex eller H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tilsatt 24 timer før høsting av cellene, hvis ikke annet er spesifisert.

24-brønners brettene ble inkubert i inkubatorskapet ved 37 °C. Cellene ble høstet ca. 36 timer etter transfeksjonen. Cellemediumet fra brønnene ble fjernet, og cellene ble vasket to ganger

med ca. 2 ml PBS-buffer. All PBS-bufferen ble forsøkt og fjernet, før lysisbufferen ble tilsatt. 50  $\mu$ l Tropix  $\text{\textcircled{R}}$  Lysis solution med 0,5 mM DTT ble tilsatt i hver brønn. Det ble brukt en celleskraper for å skrape cellene løs. Lysisbufferen med cellene ble pipettert opp fra brønnene og overført til nye, merkede eppendorfrør. Eppendorfrørene ble sentrifugert i 3 min på 13000 rpm i en mikrosentrifuge (Heraeus Biofuge pico), for å fjerne eventuell celledbris. 20  $\mu$ l av hvert eppendorfrør ble overført til et 96-brønners brett. I tillegg til prøvene ble det tilsatt 20  $\mu$ l lysisbuffer til tre brønner som fungerer som blank (for å kontrollere og eventuelt justere for signal fra lysisbufferen). Videre ble luciferase (Luc) og  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) målt ved bruk av instrumentet CLARIOstar plus fra BMG LABTECH.

Luc ble målt først. 15  $\mu$ l med Buffer A og 60  $\mu$ l med Buffer B tilsatt Tropix  $\text{\textcircled{R}}$  Galacton-plus i forhold 1:100, ble av instrumentet tilsatt i hver brønn under måling av Luc. Etter måling av Luc sto 96-brønners brettet i 45 min før  $\beta$ -gal ble målt, for at signalene fra Luc skulle bli nedregulert. Ved måling av  $\beta$ -gal ble 60  $\mu$ l Tropix  $\text{\textcircled{R}}$  Accelerator II tilsatt hver brønn ved måling. Det ble beregnet Luc/  $\beta$ -gal verdi for alle brønnene, og et gjennomsnitt av brønnene med samme cellelinje og plasmid ble beregnet. Luc/  $\beta$ -gal verdiene for plasmidene ble i tillegg korrelert for kontrollvektoren, pGL3-Basic.

### **3.8.1 Stimulering med Dex**

For transfeksjonene hvor cellene ble stimulert med 100 nM Dex, ble cellene tilsatt Dex ca. 24 timer før høsting. 500  $\mu$ l cellemedium med sluttkonsentrasjonen 200 nM Dex, ble tilsatt i de allerede 500  $\mu$ l cellemediumet som var til stede i brønnene, slik at sluttkonsentrasjonen ble 100 nM Dex. Som beskrevet tidligere ble 1 mM Stock-løsning av Dex brukt til å lage en mellomkonsentrasjon på 100  $\mu$ M Dex. Det ble laget en felles 200 nM Dex cellemedium for alle brønnene som skulle tilsettes Dex, hvor 100  $\mu$ M Dex ble tilsatt til korrekt sluttkonsentrasjon. For å få en sluttkonsentrasjon på 200 nM Dex ble løsningen med 100  $\mu$ M fortynnet 500 ganger.

### **3.8.2 Stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Det ble utført luciferase reporter-gen-assay hvor cellene ble stimulert med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ulike tidsintervaller, og i ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasjoner. Cellene ble transfektert som tidligere beskrevet. Dagen etter cellene var transfektert, altså på morgenene dag 3, ble cellemediumet fra brønnene fjernet og erstattet med 500  $\mu$ l nytt oppvarmet cellemedium. For å lage en

tidskurve for  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ble cellene stimulert med  $\text{H}_2\text{O}_2$  i følgende tidsintervaller; 0 timer, 1 time, 2 timer, 4 timer, 8 timer og 24 timer. Dette ble gjort på følgende måte:

Kl. 16.00 på dag 3 ble cellene som skulle stimuleres i 24 timer tilsatt 0,4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dette ble gjort å tilsette 500  $\mu\text{l}$  0,8 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  i brønnene som allerede inneholdt 500  $\mu\text{l}$  cellemedium. Som tidligere beskrevet ble det laget en ny Stock-løsning på 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  hver dag. Denne stockløsningen ble fortynnet i cellemedium til ønsket konsentrasjon. I likhet med cellene stimulert med Dex ble det laget en felles  $\text{H}_2\text{O}_2$  løsning nok til alle brønnene som skulle stimuleres. I tillegg ble brønnene som ikke skulle stimuleres med  $\text{H}_2\text{O}_2$  (= 0 timer) tilsatt 500  $\mu\text{l}$  vanlig cellemedium, slik at totalvolumet i brønnene var 1 ml.

Kl. 08.00 på dag 4, ble brønnene som skulle stimuleres i 8 timer med  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tilsatt 500  $\mu\text{l}$  0,8 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  cellemedium. Kl. 12.00 ble cellene som skulle stimuleres i 4 timer tilsatt  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Kl. 14.00 ble cellene som skulle stimuleres i 2 timer tilsatt  $\text{H}_2\text{O}_2$ , og kl. 15.00 ble cellene som skulle stimuleres i 1 time tilsatt  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Kl. 16.00 samme dag ble alle brønnene høstet. Dette ble gjort på samme måte som tidligere beskrevet.

Det ble i tillegg utført luciferase reporter-gen-assay hvor cellene ble stimulert med ulike  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsentrasjoner i 24 timer (Dose-respons kurve).  $\text{H}_2\text{O}_2$ -konsentrasjonene som ble benyttet var 0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Som for de andre transfeksjonsforsøkene ble det gamle cellemediumet erstattet med 500  $\mu\text{l}$  nytt cellemedium på morgenen dag 3. Midt på dagen ble cellene tilsatt  $\text{H}_2\text{O}_2$ . For cellene stimulert med 0,2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ble 500  $\mu\text{l}$  0,4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  tilsatt cellene, for 0,4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ble 500  $\mu\text{l}$  0,8 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  tilsatt, og for cellene stimulert med 0,8 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ble 500  $\mu\text{l}$  1,6 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  tilsatt i de allerede 500  $\mu\text{l}$  cellemediumet brønnene inneholdt. For de ustimulerte cellene ble 500  $\mu\text{l}$  vanlig cellemedium tilsatt. Etter 24 timer med  $\text{H}_2\text{O}_2$ -stimulering ble cellene høstet.

## 3.9 Real-time qPCR

Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT qPCR) er en PCR-metode hvor man måler amplifisering av spesifikke gentranskripter i cDNAet i sanntid, og ikke i ettertid når reaksjonen er avsluttet som i standard PCR. Ved qPCR kan genuttrykket kvantiteres. For å kjøre qPCR må det først isoleres RNA fra cellelinjene, før det videre blir laget komplementært DNA (cDNA).

### 3.9.1 RNA høsting

600 000 celler av hver cellelinje ble sådd ut i to brønner i 6-brønners brett på dag 1. Cellelinjene som ble sådd ut var B3 WT, B3 WT C9, B3 WT D10, B3 3.4 og B3 3.4 G9. På dag 2 når cellene var 80-90 % konfluent, ble cellemediumet fra dag 1 fjernet, og erstattet med 2 ml nytt cellemedium. En brønn per cellelinje ble tilsatt 2 ml vanlig cellemedium, og en brønn av hver cellelinjene ble tilsatt 2 ml 100 nM Dex cellemedium. Cellene ble stimulert med Dex i 4 timer før høsting. Utsåing av celler til RNA høsting ble gjort tre ganger, ved tre ulike tidspunkter for cellelinjene.

For RNA høsting ble Quick-RNA Miniprep Kit (fra Zymo Research) benyttet. Cellemediumet fra brønnene ble fjernet. 300 µl RNA Lysis Buffer ble tilsatt i hver brønn. Pipettespissen ble brukt for å løsne cellene. RNA Lysis Bufferen med cellene ble pipettert over i et Zymo-Spin Filter (gul) (binder/fjerner genomisk DNA) som var plassert i et oppsamlingsrør. Deretter ble disse sentrifugert i 30 sek på 13,000 x g i en mikrosentrifuge (Heraeus Biofuge pico). Væsken som ble filtrert (passerte gjennom filteret) ble tatt vare på. Mengde væske som gikk gjennom kolonnen (filtrat) ble målt ved bruk av mikropipette (her ca 250 µl). Etanol 100% ble tilsatt i forholdet 1:1 med filtratet. 250 µl etanol 100 % ble tilsatt. Etanolen ble blandet med filtratet ved å pipettere opp og ned 4-5 ganger. Deretter ble denne blandingen overført til et Zymo-Spin IIICG Column (grønn), som binder DNA eller RNA. Zymo-Spin IIICG column var plassert i et oppsamlingsrør og ble sentrifugert på 13,000 x g i 30 sek. Filtratet ble kastet. Det ble videre utført DNase I behandling:

Kolonnen ble vasket med 400 µl RNA Wash Buffer, og sentrifugert i 30 sek på 13,000 x g. Filtratet ble kastet. I et nuklease-fritt rør ble det laget en mastermix til alle kolonnene bestående av DNase I og DNA Digestion Buffer. Denne mastermixen består av 5 µl DNase I (1 U/ µl) og 75 µl DNA Digestion Buffer per kolonne. Mastermixen ble mikset på vortex og satt på is før bruk. 80 µl av denne blandingen (=

5 µl DNase I (1 U/ µl) og 75 µl DNA Digestion Buffer) ble tilsatt på hver kolonne, og inkubert på kolonnen i RT i 15 min.

400 µl RNA Prep Buffer ble tilsatt på kolonnene og sentrifuger på 13,000 x g i 30 sek.

Filtratet ble kastet. Videre ble 700 µl RNA Wash Buffer tilsatt på kolonnene og sentrifugert i 30 sek. Filtratet ble kastet. 400 µl RNA Wash Buffer ble tilsatt på kolonnene, og sentrifuger i 2 min på 13,000 x g for å sikre fullstendig fjerning av vaskebuffer fra kolonnene. Kolonnene ble overført til nye nuklease frie rør. 50 µl DNase/RNase-Fritt vann ble tilsatt direkte på kolonnematriksen, og sentrifugert i 1 min på 13,000 x g. Kolonnene ble kastet, og eppendorfrørene med eluatene ble satt på is.

Etter høsting av RNA, ble RNA konsentrasjonen og grad av renheten målt ved bruk av Thermo Scientific™ Nanodrop™ One Spectrophometer.

### 3.9.2 cDNA

Det ble syntetisert cDNA fra RNA. RNA ble blandet sammen med en mastermix. Til mastermixen ble High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Appliedbiosystems) benyttet.

Mastermixen for hver prøve består av følgende:

10 x RT Buffer	2 µl
25 x dNTP mix	0,8 µl
10x RT Random Primers	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
RNase inhibitor	0,5 µl
Nuklease-fritt vann	3,7 µl

Det ble laget en felles mastermix for alle prøvene. I PCR-rør ble det tilsatt 10 µl av mastermixen, og ca. 400 ng RNA og vann som til sammen utgjør 10 µl. Totalvolumet i hvert PCR-rør var 20 µl. PCR-rørene med totalvolumet 20 µl, ble satt inn i instrumentet T100™ Thermal Cycler fra BIO RAD, hvor følgende program ble kjørt:



Tabell 3.3 PCR program cDNA.

Step	Tid (min)	Temperatur (°C)
1	10	25
2	120	37
3	5	85
4	∞	4

PCR-rørene med cDNA ble fryst ved – 20 °C. Det ble fremstilt cDNA for alle tre parallellene av RNA høsting.

### 3.9.3 qPCR

For hvert målgjen og housekeepinggen ble det laget en mastermix. Mastermixen for hver brønn (totalt 9 µl) består av følgende:

SYBR Green	5 µl
Primer Fw (100 µM)	0,075 µl
Primer Rev (100 µM)	0,075 µl
Ultrarent vann	3,85 µl

Det ble laget en felles mastermix for alle brønnene som inneholdt samme primer sett.

9 µl av mastermixen og 1 µl av cDNA eller vann (NTC) ble pipettert i hver brønn i et 96-brønners Brett. NTC ble brukt som en negativ kontroll for å avdekke eventuelle primer-dimers.

Det ble utført qPCR med GILZ eller GJA1 som målgjen. For qPCR med GILZ som målgjen, ble housekeeping-genene GAPDH og GusB brukt. Det ble kjørt to paralleller av hver cDNA prøve (fra alle fem cellelinjene), i tillegg til to paralleller med NTC (vann) for hver mastermix. Dette qPCR forsøket ble utført tre ganger, med tre ulike paralleller av cDNA.

Det ble også kjørt en qPCR reaksjon med GJA1 som målgjen, og GAPDH og GusB som housekeepinggen. For dette forsøket ble det benyttet cDNA fra parallell 1 fra RNA høstingen, hvor cDNA fra de fire cellelinjene B3 WT, B3 WT C9, B3 3.4 og B3 3.4 G9 ble brukt.

For 96-brønners brettet med prøvene ble det ved bruk av instrumentet LightCycler® 96 fra Roche kjørt qPCR. Følgende qPCR program ble benyttet:

Tabell 3.4 qPCR program.

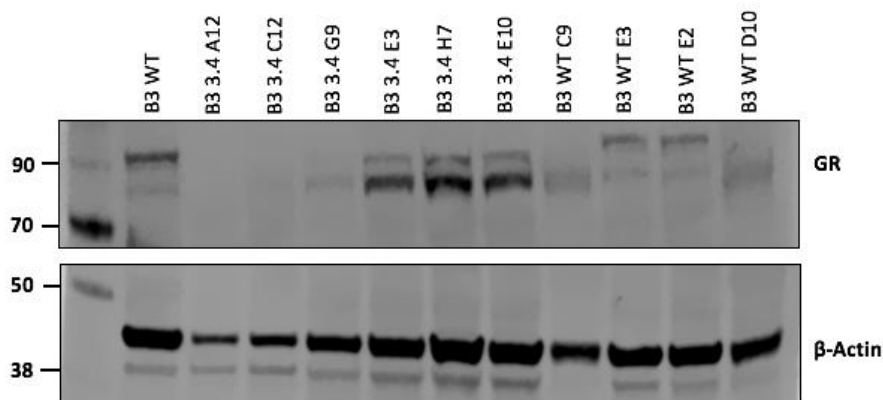
Step	Antall sykluser	Tid (sek)	Temperatur (°C)
Preincubation	1	120	50
		120	95
2 step	40	15	95
		60	60
Melting	1	15	95
		60	60
		1	95

For å beregne endringer i genuttrykket av målgenet ved bruk av referanseggen (housekeepinggen) i qPCR brukes likningen  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Threshold cycle ( $C_T$ ) er antall sykluser som kreves før en statistisk signifikant endring i fluorescens (overstiger bakgrunnsnivået) detekteres. Ved bruk av  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  ligningen normaliseres  $C_T$  verdiene av behandlet og ubehandlet prøve ved bruk av housekeepinggen, for å kontrollere at alle prøvene har lik mengde cDNA. Ligningen  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  brukes for å beregne dette, hvor  $\Delta\Delta C_T = (C_{T \text{ Målgen}} - C_{T \text{ Housekeepinggen}})$  behandlet prøve -  $(C_{T \text{ Målgen}} - C_{T \text{ Housekeepinggen}})$  ubehandlet prøve (44). Som nevnt brukes GJA1 (Gap Junction Alpha-1 Protein) og GILZ (Glucocorticoid-induced leucine-Zipper) som målgen for henholdsvis PAX6 og GR, og som Housekeepinggen brukes GAPDH (Glyceraldehyd 3-fosfat dehydrogenase) og GusB (Beta-Glucuronidase).

## 4 Resultater

### 4.1 Verifisering av GR knock out klonene

Forskningsgruppen i Farmakologi (IFA) har tidligere utført CRISPR-Cas9 på humane B3 linse-epitelceller, hvor målet var å fjerne uttrykket av PAX6- og GR-genene. Det er bekreftet at PAX6 er fjernet fra en B3 cellelinje (B3 3.4) (Hegge og Mikkola, upubliserte data), og denne cellelinjen ble derfor brukt sammen med B3 vill-type (B3 WT) cellelinjen for å prøve å slå ut GR. En rekke mulige kloner ble generert (Hogseth og Mikkola, upubliserte data) men ikke bekreftet. CRISPR-Cas9 modifikasjonen er utført like nedstrøms for startkodonet som brukes for å lage GR $\alpha$  og GR $\beta$ . Første del av denne oppgaven var derfor å undersøke om fjerning av GR med CRISPR-Cas9 teknologien for disse linsecellene hadde vært vellykket. Dette ble undersøkt ved bruk av western blot (WB) og DNA sekvensering som beskrevet under.



Figur 4.1 Screening av CRISPR-Cas9 modifiserte B3 WT og B3 3.4 cellelinjer for å se etter knock out av GR-genet. De modifiserte B3 WT og B3 3.4 cellelinjene viser en endring i GR uttrykket. B3 3.4 cellelinjen er tidligere CRISPR-Cas9 modifisert hvor PAX6 er bekreftet slått ut. Ved bruk av WB er det screenet seks kloner av B3 3.4 cellelinjen og fire kloner av B3 WT cellelinjen modifisert med CRISPR-Cas9 for å slå ut GR. WB er farget for GR som har en MW på 97 kDa, og Aktin som har en MW på 42 kDa.

Det er screenet seks kloner av B3 3.4 cellelinjen og fire kloner av B3 WT cellelinjen for å se etter KO av GR-genet, ved bruk av WB (Figur 4.1). Når GR omtales i denne oppgaven er det GR $\alpha$  med en molekylvekt (MW) på 97 kDa som omtales, dersom ikke annet er spesifisert. GR-båndet med en MW på 97 kDa (45) sees tydelig for B3 WT cellelinjen som bekrefter at denne cellelinjen inneholder GR. For B3 3.4 cellelinjene A12, C12 og G9 er det ingen synlige bånd på 97 kDa, men de resterende B3 3.4 cellelinjene E3, H7 og E10 har et synlig bånd på 97 kDa. I tillegg til GR-båndet på 97 kDa, er det også til stede et bånd med en litt lavere MW for de samme cellelinjene. For B3 WT cellelinjene viser E3 og E2 et svakt bånd på lik linje (97 kDa) med B3 WT kontrollcellelinjen som skal inneholde GR. For de to andre B3 WT

cellelinjene C9 og D10, er GR-båndet på 97 kDa ikke til stede. I likhet med B3 3.4 cellelinjene viser B3 WT cellelinjene et svakt bånd med litt lavere MW. Det kan tenkes at dette lavere båndet er en annen isoform av GR som fortsatt er tilstedeværende i flere av cellelinjene. Det er kjent at GR har flere isoformer. Flere av isoformene til GR har alternative startkodon, og kan mangle den delen av GR hvor mutasjonen er lagd ved bruk av CRISPR-Cas9 teknologien. Primærantistoffet for GR gjenkjenner flere bånd for WT cellene, men det største båndet med en MW på 97 kDa er borte for de fleste GR-klonene (*Figur 4.1*).

Hva det lavere båndet er, og hvilke funksjoner av GR det eventuelt utfører, dersom det er en GR-isoform, kan vi ikke si med sikkerhet, men vi vil funksjonelt teste disse klonene ved stimulering med Dexametason (Dex) videre i oppgaven. Dex er et syntetisk glukokortikoid som binder ligandbindingsdomenet til GR, som videre fører til at GR aktiveres.

Ligandbindingsdomene ligger i den C-terminale endel av GR, og er forventet å være til stede dersom det kun er N-terminalen som er trunkert.

Farging for aktin viser loadingen/mengde protein i de ulike proteinekstraktene. Det er betydelig forskjell i mengde protein på membranen mellom de ulike cellelinjene (*Figur 4.1*). En lavere intensitet av aktinbåndet kan være en årsak til et svakere eller ikke tilstedeværende bånd for GR. I dette WB (*Figur 4.1*) er det en betydelig lavere mengde protein satt på gelen for B3 3.4 cellelinjene A12, C12 og G9. Disse B3 3.4 cellelinjene viste ingen GR-bånd. Det er usikkert om dette er et resultat av at GR er fjernet fra cellene eller om årsaken er at en mindre mengde protein er til stede.

Tabell 4.1 Sekvenseringsresultater

Cellelinje	Funn
B3 WT C9	Delesjon av 14 bp + Dobbeltbånd
B3 WT E3	Ingen forandring
B3 WT E2	Ingen forandring
B3 WT D10	Delesjon av 54 bp + Dobbeltbånd
B3 3.4 A12	Dobbeltbånd
B3 3.4 C12	Delesjon av 1 bp + Dobbeltbånd
B3 3.4 G9	Delesjon av 11 bp + Dobbeltbånd
B3 3.4 E3	Dobbeltbånd
B3 3.4 H7	Dobbeltbånd
B3 3.4 E10	Dobbeltbånd

De seks GR muterte B3 3.4 cellene og de fire GR muterte B3 WT cellene ble sekvensert, for å undersøke om CRISPR-Cas9 modifikasjonene hadde forårsaket en mutasjon i GR-sekvensen. De fleste cellelinjene viste en endring i GR-sekvensen etter CRISPR-Cas9 modifikasjoner, enten i form av dobbeltbånd eller delesjon (*Tabell 4.1*). Når ett eller flere basepar (bp) blir deletert (fjernet) fra DNA-tråden, fører dette til leserammemutasjon. Ved en leserammemutasjon oppstår en forskyvning og translasjonsrammen endres, som fører til forskjeller fra villtype sekvensen. Hvis mutasjonen kun har skjedd i én av de to allelene (genkopiene) av genet i en celle, vil det sees som dobbeltbånd i sekvensen etter mutasjonen, når sekvensen leses av ved sekvensering. Med dobbeltbånd menes at både villtypesekvensen og den muterte (forskyvningen av) sekvensen leses av samtidig. Når det oppstår et dobbeltbånd etter et nukleotid er deletert eller insertert, indikerer dette at cellene er heterozygot.

Sekvensene av GR KO cellelinjene ble sammenlignet med en GR-sekvens (kontroll), for å undersøke om det var oppstått endringer i GR-sekvensen etter CRISPR-Cas9 modifikasjonen. For B3 WT cellelinjene viser B3 WT C9 og B3 WT D10 en endring i sekvensen i form av delesjon av henholdsvis 14 bp og 54 bp, i tillegg til et dobbeltbånd etter delesjonen (*Tabell 4.1*). De to resterende B3 WT GR KO cellelinjene E3 og E2 viser ingen forandring i GR-sekvensen. For B3 3.4 cellelinjene viser alle cellelinjene en forandring. For disse cellene er både PAX6 og GR forsøkt slått ut ved bruk av CRISPR-Cas9 modifikasjon, hvor PAX6 tidligere er bekreftet slått ut. Cellelinjene B3 3.4 C12 og B3 3.4 G9 viser en delesjon av bp, henholdsvis 1 bp og 11 bp. I tillegg viser disse B3 3.4 GR KO cellelinjene et dobbeltbånd etter delesjonen. For de resterende B3 3.4 KO cellene sees et dobbeltbånd.

Ved bruk av WB og DNA sekvensering, ble det valgt ut to cellelinjer med GR mutasjoner for både B3 WT og B3 3.4 cellelinjene. Valget av cellelinjer ble gjort på grunnlag av WB-resultatene etter farging for GR og aktin, i tillegg til at endringer i GR-sekvensen var observert. Cellene som ble valgt å gå videre med var:

Tabell 4.2 Cellelinjene som brukes videre i oppgaven. Tilstedeværelse av PAX6 og GR er markert med X.

Cellelinje	GR	PAX6
B3 WT	X	X
B3 WT C9		X
B3 WT D10		X
B3 3.4	X	
B3 3.4 C12		
B3 3.4 G9		

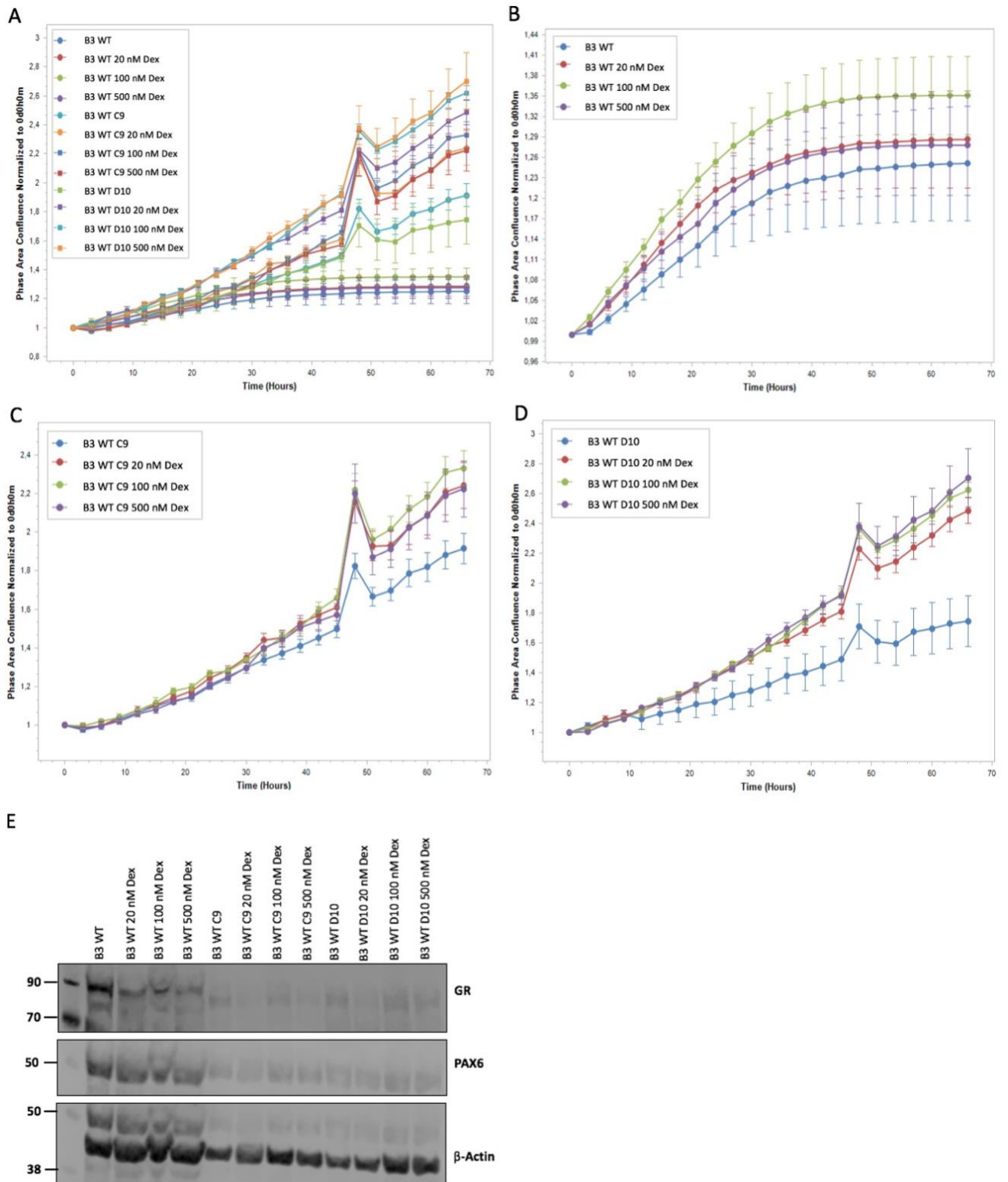
Det ble valgt to GR-mutanter av cellelinjene B3 WT og B3 3.4 for videre forsøk. Dette for å kunne si med en høyere sikkerhet at eventuelle funn i GR KO cellene av B3 WT eller B3 3.4, ikke er oppstått med en tilfeldighet. Videre i oppgaven brukes dermed GR-mutantene B3 WT C9 og B3 WT D10, og B3 3.4 G9 og B3 3.4 C12 hvor både GR og PAX6 skal være slått ut. I tillegg brukes B3 WT som inneholder både GR og PAX6, og B3 3.4 som inneholder GR (Tabell 4.2).

## 4.2 Proliferasjons-assay

Proliferasjonen til de utvalgte cellelinjene ble studert, ved bruk av en IncuCyte maskin. Det var ønskelig å studere proliferasjonen i fravær og nærvær av GR og/eller PAX6. Dette ble gjort ved å stimulere cellene med Dex for å aktivere GR. Videre var det ønskelig å studere proliferasjonen under oksidativt stress. Cellene ble stimulert med hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) som er en reaktiv oksygensubstans (ROS), og påfører cellene oksidativt stress.

### 4.2.1 Titrering med Dex

Alle de seks cellelinjene ble stimulert med tre ulike konsentrasjoner med Dex, for å finne egnet Dex-konsentrasjon for videre bruk i denne oppgaven. Cellene ble stimulert med 20 nM, 100 nM og 500 nM Dex, og proliferasjonen ble sammenlignet med ustimulerte celler, for å studere eventuelle forskjeller i veksten. Cellene ble stimulert i tre døgn, og proliferasjonen ble målt ved bruk av en IncuCyte maskin, som avbildet hver brønn hver 3.time.



Figur 4.2 Proliferasjon til B3 WT og de to GR KO klonene, B3 WT C9 og B3 WT D10, ble studert ved stimulering med ulike Dex-konsentrasjoner. Cellene ble stimulert med tre ulike konsentrasjoner av Dex, hvorav disse er 20 nM, 100 nM og 500 nM. Cellene ble tilsatt Dex ved tiden 0, og celletettheten er normalisert ved tiden 0 for alle cellelinjene. Proliferasjonen er målt i tre døgn, hvor hver brønn er avbildet hver 3. time ved bruk av en IncuCyte maskin. Proliferasjonskurvene for alle tre cellelinjene ved de fire ulike stimuleringene (ustimulert, 20 nM, 100 nM og 500 nM Dex) presenteres i figur A. Proliferasjonskurvene for B3 WT presenteres i Figur B, B3 WT GR KO klonen B3 WT C9 presenteres i figur C og B3 WT D10 i figur D. Ved forsøkets slutt (tre døgn etter tilsatt stimuli) ble det høstet proteinekstrakter. Proteinekstraktene ble kjørt på WB (Figur E), hvor det ble farget for GR, PAX6 og Aktin. GR har en MW på omtrent 97 kDa, PAX6 på 46 kDa og Aktin på 42 kDa.

Proliferasjonen av B3 WT, og GR KO cellelinjene B3 WT C9 og B3 WT D10 stimulert med tre ulike konsentrasjoner av Dex, ble undersøkt ved bruk av et IncuCyte instrument. Generelt viste både de stimulerede og de ustimulerede cellene av B3 WT D10 bedre vekst enn B3 WT C9 cellelinjen (*Figur 4.2 A*). Dårligst vekst viste B3 WT cellelinjen både ustimulert og stimulert med Dex.

For B3 WT cellelinjen viste stimulering med 100 nM Dex høyest proliferasjonshastighet, deretter stimulering med 20 nM og 500 nM Dex som viste relativt lik proliferasjonskurve (*Figur 4.2 B*). De ustimulerede B3 WT cellene viste lavest proliferasjonshastighet. B3 WT som inneholder både GR og PAX6, viser at stimulering med Dex, som fører til at GR aktiveres, resulterer i økt proliferasjon.

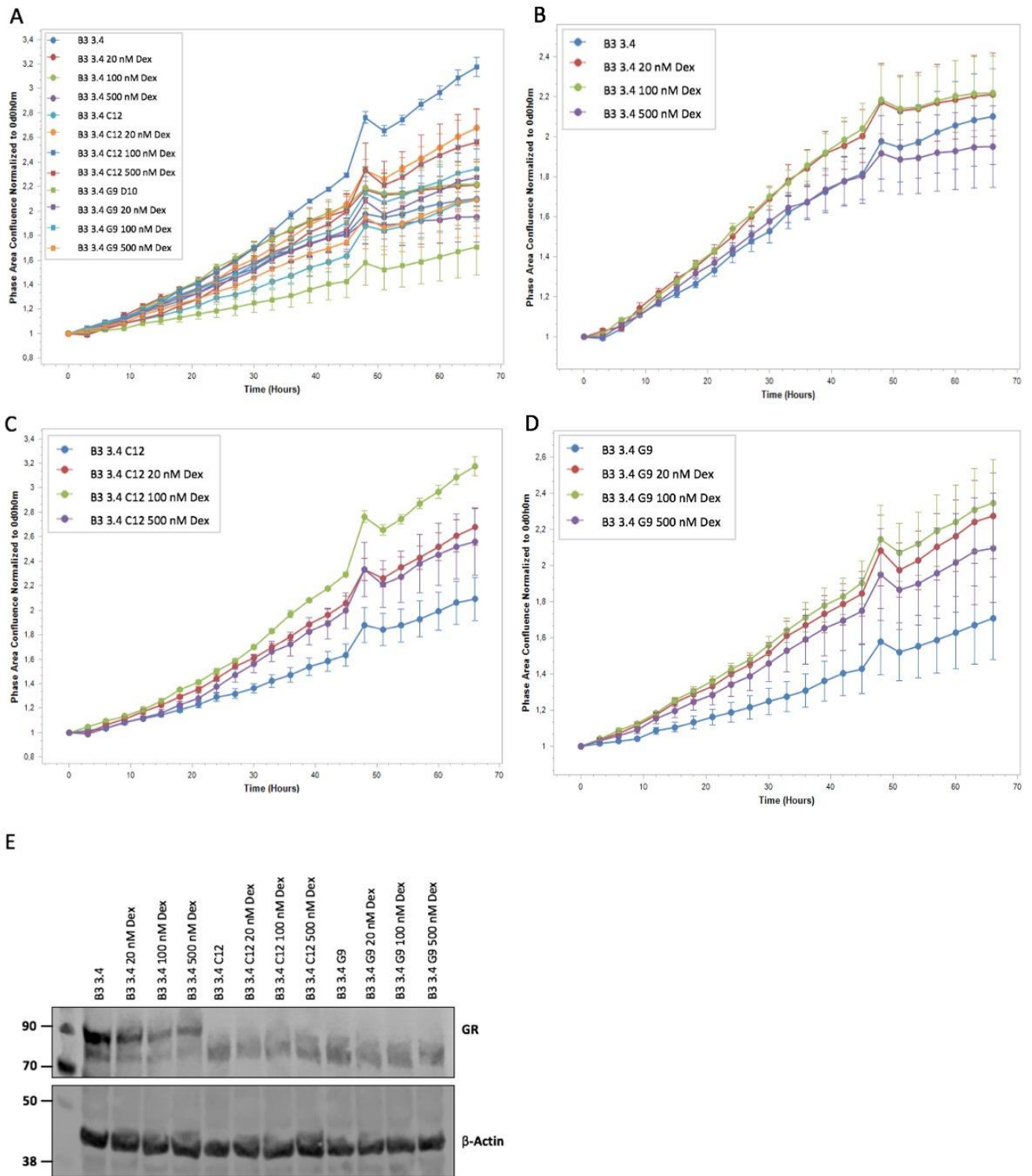
GR KO cellelinjene B3 WT C9 og B3 WT D10 viser i likhet med B3 WT høyest proliferasjonshastighet for cellene stimulert med Dex (*Figur 4.2 C og D*). Hvilken konsentrasjon av Dex som medfører høyest proliferasjonshastighet varierer mellom GR KO cellelinjene. For B3 WT C9 er det stimulering med 100 nM Dex som over tid viser høyest proliferasjonshastighet (*Figur 4.2 C*). For B3 WT D10 er det stimulering med 500 nM og 100 nM Dex som viser høyest proliferasjonshastighet (*Figur 4.2 D*). Felles for B3 WT GR KO cellelinjene er at alle Dex-konsentrasjonene viser betydelig bedre proliferasjonskurver, sammenlignet med de ustimulerede cellene. Begge GR KO cellelinjene hvor GR skulle vært slått ut, viste seg å være responsiv til Dex-stimulering, noe som ikke var forventet. Det tyder på at GR ikke er totalt utslått i disse cellelinjene. Dette styrker teorien om at CRISPR-Cas9 mutasjonene kun har ført til at full lengde varianten av GR er slått ut, men at det kan uttrykkes kortere isoformer av GR som fortsatt er Dex-responsive.

Ved forsøketts slutt (tre dager etter tilsatt stimuli) ble proteinekstraktene høstet, og kjørt på WB (*Figur 4.2 E*). Membranen ble farget med primærantistoffene  $\alpha$ -GR,  $\alpha$ -PAX6 og  $\alpha$ -Aktin. Ved farging for GR viser B3 WT cellene et tydelig GR-bånd på rundt 97 kDa. GR KO cellelinjene har derimot ikke dette GR-båndet (97 kDa). Dette viser at GR er til stede i B3 WT cellene, men tyder på at GR med en kDa verdi på 97 er fjernet.

Stimulering med Dex er vist å redusere uttrykket av GR (46), og det vises også i dette WB. En konsentrasjon på 20 nM Dex viser allerede et redusert GR uttrykk sammenlignet med ustimulerede celler. I likhet med tidligere WB farget for GR, viser dette WB også et GR-bånd med en litt lavere molekylvekt enn 97 kDa for alle cellelinjene. Kvaliteten av WB gjør det



vanskelig å si med sikkerhet hvordan proteinuttrykket av dette båndet påvirkes av Dex-stimulering. Det kan likevel se ut til at intensiteten reduseres med Dex-stimulering i likhet med båndet på 97 kDa. Alle B3 WT cellelinjene inneholder PAX6, som bekreftes i WB med et bånd på rundt 48 kDa (*Figur 4.2 E*). Det er betydelig forskjell på intensiteten av båndene mellom B3 WT og GR KO cellelinjene. B3 WT cellelinjen viser høyest intensitet av PAX6-proteinet, men det ser ikke ut til at PAX6-proteinuttrykket påvirkes av Dex-stimulering, da det ikke er noen tydelig forskjell i intensiteten. Intensiteten av PAX6-proteinet i GR KO cellene er betydelig svakere sammenlignet med B3 WT cellene i dette WB. Dette kan skyldes ulik konsentrasjon av protein i proteinekstraktet, siden aktinfargingen viser det samme. Heller ikke her er det betydelig forskjell i intensiteten for PAX6-proteinet mellom de ustimulerte cellene og cellene stimulert med Dex.



Figur 4.3 Proliferasjonen til B3 3.4 og de to B3 3.4 GR KO cellelinjene, B3 3.4 G9 og B3 3.4 C12, er studert ved stimulering av ulike Dex-konsentrasjoner. Cellelinjene er stimulert i tre døgn, med tre ulike Dex-konsentrasjoner, hvorav disse er 20 nM, 100 nM og 500 nM Dex. Cellene er tilsatt Dex ved tiden 0, og celletettheten er normalisert ved tiden 0 for alle cellelinjene. Proliferasjonskurvene for alle de tre B3 3.4 cellelinjene presenteres i figur A. Figur B viser proliferasjonskurvene for de ulike stimuleringene for B3 3.4. Figur C og D viser mutantene, henholdsvis B3 3.4 C12 og B3 3.4 G9. Ved forsøkets slutt ble proteinekstraktene høstet, og kjørt på WB for å studere proteinuttrykket. WB (Figur E) ble farget for GR, som har en MW på rundt 97 kDa og Aktin som har en MW på rundt 42 kDa. Forsøket ble utført to ganger.

Proliferasjonen til B3 3.4 cellelinjene med eller uten Dex, ble studert gjennom proliferasjons-assay ved bruk av en IncuCyte maskin. GR KO cellelinjen B3 3.4 C12 ustimulert og stimulert med Dex viser generelt bedre proliferasjonshastighet sammenlignet med B3 3.4 (*Figur 4.3 A*). Den andre GR KO cellelinjen, B3 3.4 G9, viser derimot generelt dårligere proliferasjon enn B3 3.4.

Stimulering med 100 nM Dex og 20 nM Dex viser høyest proliferasjonshastighet for B3 3.4 cellelinjen (*Figur 4.3 B*). Stimulering med 500 nM Dex og de ustimulerte cellene viser relativt lik proliferasjonskurve frem til ca. 45 timer, deretter viser de ustimulerte cellene litt bedre proliferasjon. GR KO cellelinjen B3 3.4 C12 viser høyest proliferasjonshastighet etter stimulering med 100 nM Dex (*Figur 4.3 C*). Stimulering med de to resterende Dex konsentrasjonene, 20 nM og 500 nM, viser lavere og relativt like proliferasjonskurver, men betydelig høyere enn kurven for de ustimulerte cellene. I likhet med GR KO cellelinjen B3 3.4 C12 viser også den andre GR KO cellelinjen B3 3.4 G9 høyest proliferasjon for cellene stimulert med Dex (*Figur 4.3 D*). Stimulering med 100 nM Dex resulterer i høyest proliferasjonshastighet, og de ustimulerte cellene viser betydelig lavest proliferasjon.

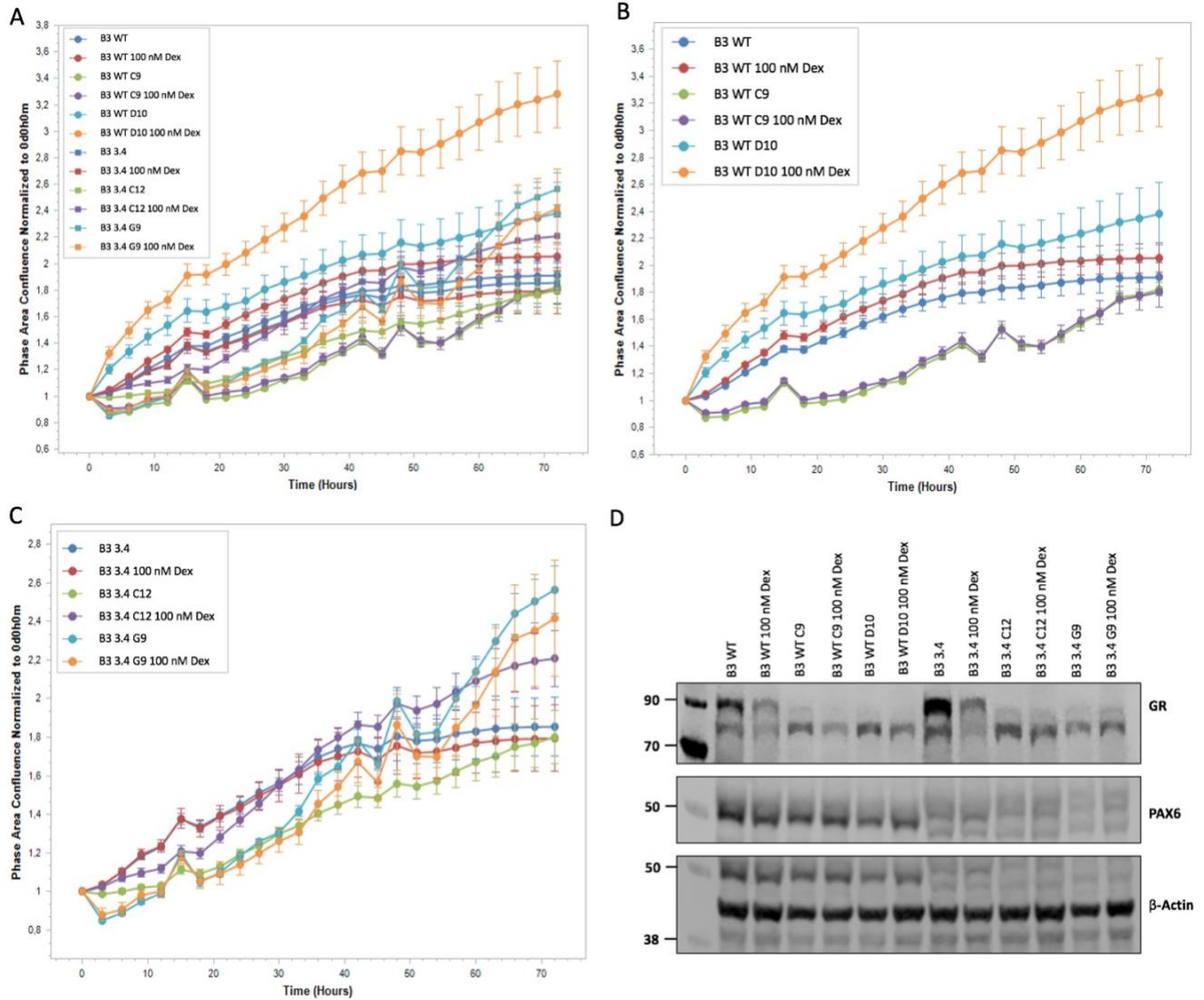
Sammenlignet med GR KO cellelinjene (*Figur 4.3 C og D*), viser B3 3.4 cellelinjen (*Figur 4.3 B*) faktisk mindre forskjell mellom de ustimulerte cellene og cellene stimulert med ulike Dex-konsentrasjoner. At Dex-stimulering hadde en effekt og at effekten på proliferasjon var bedre i B3 3.4 GR KO cellene enn i B3 3.4 cellene, var uventet. Dette kan muligens også forklares med at det kan være isoformer av GR til stede i GR KO cellene, som aktiveres av Dex og påvirker veksten.

Etter forsøket slutt, tre døgn etter tilsatt stimuli, ble proteinekstraktene høstet, og kjørt på WB. Det var ønskelig å studere proteinuttrykket av GR i cellelinjene etter de ulike stimuleringene. WB ble farget for GR og Aktin. B3 3.4 cellelinjen viser et tydelig bånd for GR på omtrent 97 kDa (*Figur 4.3 E*). Dette GR-båndet er ikke til stede i GR KO B3 3.4 cellelinjene. Det er som nevnt kjent at Dex reduserer GR-uttrykket, som også sees i dette WB. Båndet er sterkest for de ustimulerte cellene, og reduseres tydelig allerede etter stimulering med 20 nM Dex. I likhet med de tidligere WB, viser alle B3 3.4 cellelinjene et bånd med en litt lavere MW enn GR-båndet på 97 kDa. For B3 3.4 cellene er det tydelig at også dette båndets intensitet reduseres med økende Dex-konsentrasjon. For GR KO cellelinjene er det vanskeligere å bedømme på grunn av kvaliteten til WB.

Ut fra resultatene fra proliferasjons-assayene for B3 WT og B3 3.4 cellelinjene stimulert med tre ulike Dex-konsentrasjoner (20 nM, 100 nM og 500 nM) i tre døgn, ble en egnet konsentrasjon av Dex valgt ut til de videre forsøkene. For flertallet av cellelinjene viste stimulering med 100 nM Dex størst variasjon i proliferasjon sammenlignet med de ustimulerte cellene. Det ble derfor valgt å bruke 100 nM Dex som Dex-stimulering for alle cellelinjene i de videre forsøkene.

## 4.2.2 Proliferasjons-assay med og uten Dex

Det ble utført proliferasjonsstudier hvor cellene ble stimulert med og uten 100 nM Dex. Målet var å sammenligne proliferasjonen til celler med de 4 forskjellige genotypene i samme eksperiment.



Figur 4.4 Proliferasjonen til alle seks cellelinjene stimulert med 100 nM Dex er studert ved bruk av en IncuCyte maskin. Cellene er tilsatt Dex ved tiden 0, og celletettheten er normalisert ved tiden 0 for alle cellelinjene. Cellene er stimulert med 100 nM Dex i tre døgn, og sammenlignet med ustimulerte celler. Proliferasjonskurvene for de seks cellelinjene; B3 WT, B3 WT C9, B3 WT D10, B3 3.4, B3 3.4 C12 og B3 3.4 G9 stimulert i nærvær eller fravær av 100 nM Dex er presentert i figur A. Figur B viser proliferasjonskurvene for B3 WT og de to GR KO mutantene B3 WT C9 og B3 WT D10. Proliferasjonskurvene for B3 3.4, B3 3.4 C12 og B3 3.4 G9 fremstilles i figur C. Etter forsøket slutt, tre døgn etter tilsatt stimuli, ble proteinekstrakt høstet, og kjørt på WB som fremstilles i figur D. WB ble farget for GR (MW rundt 97 kDa), PAX6 (MW rundt 46 kDa) og Aktin (MW rundt 42 kDa). Forsøket ble repetert tre ganger.

For hver cellelinje er proliferasjonen studert for ustimulerte celler og celler stimulert med 100 nM Dex i tre døgn (*Figur 4.4 A*). For cellelinjene B3 WT og B3 3.4 som begge inneholder GR, er det forventet at Dex-stimulering aktiverer GR. Cellelinjene B3 WT og B3 3.4 viser relativt lik proliferasjonshastighet (*Figur 4.4 A*). Gjennomsnittlig viser B3 WT både ustimulert og stimulert med Dex litt høyere proliferasjonshastighet sammenlignet med B3 3.4 i alle tre repetisjonene av forsøket. Dette kan tyde på at når PAX6 er til stede i linse-epitelcellene øker proliferasjonen.

For B3 WT GR KO cellelinjene C9 og D10 sammenlignet med B3 WT cellelinjen viser den ene GR-modifiserte cellelinjen, B3 WT D10, bedre vekst enn B3 WT (*Figur 4.4 B*). Den andre GR-modifiserte cellelinjen B3 WT C9 viser dårligere vekst enn B3 WT. I motsetning til B3 WT og B3 WT D10, ser B3 WT C9 ikke ut til å bli stimulert av Dex. I alle tre repetisjonene av dette forsøket viste den GR-modifiserte cellelinjen B3 WT D10 og B3 WT en økt vekst etter stimulering med Dex, i motsetning til B3 WT C9 som viste liten eller ingen respons på Dex-stimulering.

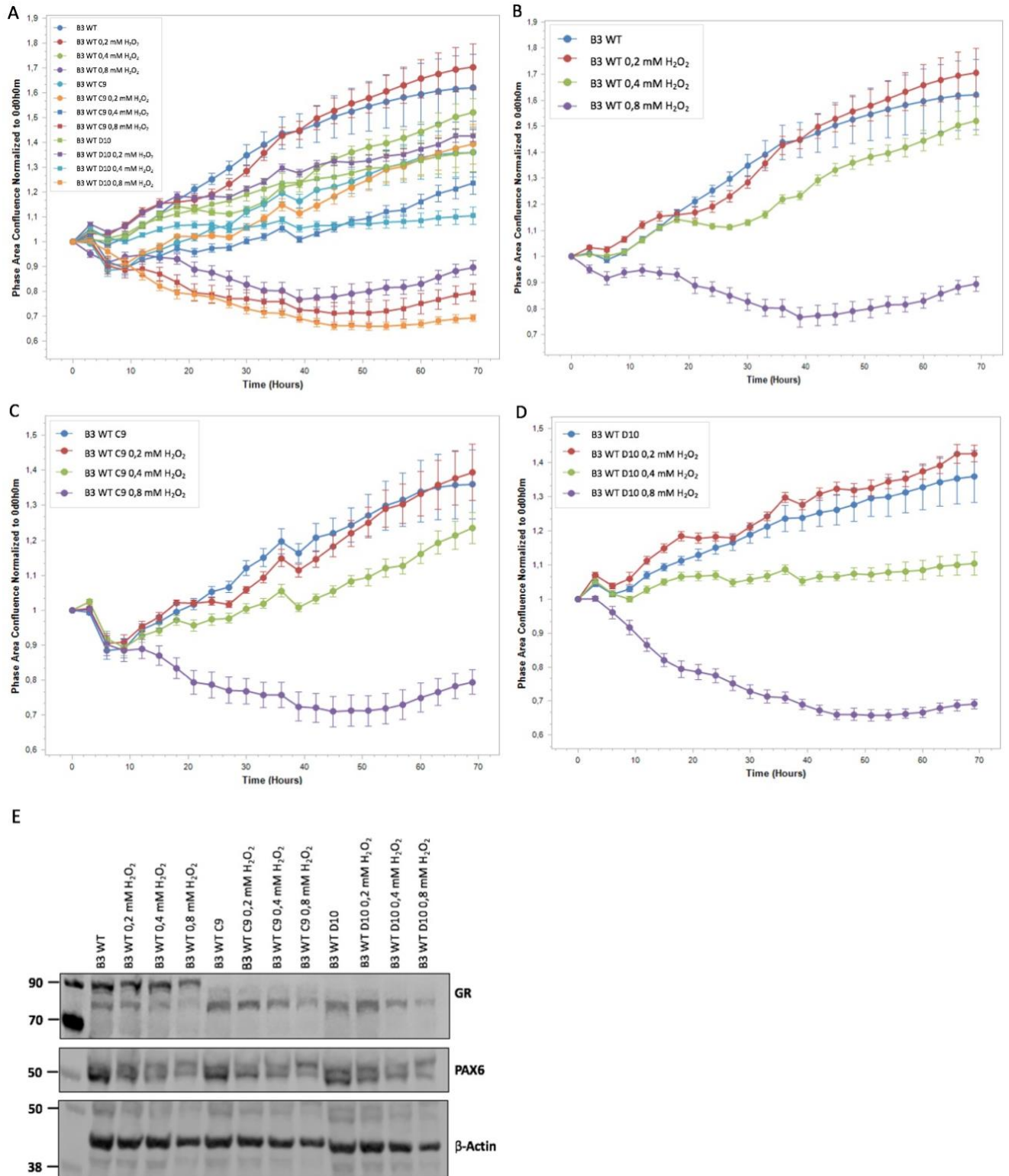
På grunnlag av disse forsøkene kan det se ut til at den ene GR-modifiserte cellelinjen, B3 WT C9, ikke inneholder en GR-isoform med ligandbindingsdomene, da stimuleringen med Dex ikke påvirker veksten. Som nevnt viser derimot den andre GR KO cellelinjene B3 WT D10, i likhet med B3 WT, en økt vekst når Dex tilsettes. Noe som tyder på at disse cellelinjene er responsive for Dex og inneholder GR med ligandbindingsdomene.

I motsetning til B3 WT, viser B3 3.4 cellelinjen overraskende en liten reduksjon i vekst ved Dex-stimulering (*Figur 4.4 A*). Denne reduserte veksten etter Dex-stimulering kan sees i alle de tre repetisjonene av dette forsøket. Dette kan indikere at PAX6 spiller en rolle i celleproliferasjonen ved Dex-stimulering. Den ene GR-modifiserte B3 3.4 cellelinjen, B3 3.4 C12, viser en betydelig økt proliferasjon etter Dex-stimulering (*Figur 4.4 C*). Derimot viste den andre GR-modifiserte cellelinjen, B3 3.4 G9, en liten reduksjon i vekst etter Dex-stimulering. I alle tre repetisjonene av forsøket er B3 3.4 C12 responsiv for Dex, og viser som nevnt økt vekst etter Dex-stimulering, derimot viser B3 3.4 G9 liten eller ingen respons på Dex-stimulering. Dette resultatet indikerer at GR KO cellelinjen B3 3.4 C12 inneholder et protein med ligandbindingsdomene for Dex, som påvirker proliferasjonen betydelig. B3 3.4 G9 viser liten eller ingen endring etter Dex-stimulering, som indikerer at denne cellelinjen ikke inneholder en GR-isoform med ligandbindingsdomene.

Etter forsøkets slutt ble proteinekstraktene høstet, og kjørt på WB (*Figur 4.4 D*). I likhet med tidligere WB bekrefter farging for GR, at cellelinjene B3 WT og B3 3.4 inneholder GR-båndet på 97 kDa. GR KO cellelinjene inneholder derimot et bånd med lavere MW, som også er vist i tidligere WB. For både B3 WT og B3 3.4 cellelinjen går intensiteten av 97 kDa-båndet ned når cellene stimuleres med 100 nM Dex, noe som er forventet. B3 3.4 cellelinjen ser ut til å uttrykke mye mer av GR (MW 97 kDa) enn hva B3 WT cellelinjen gjør. GR-båndet med en lavere MW ser også ut til å reduseres ved Dex-stimulering, spesielt i B3 3.4, B3 WT og GR KO cellelinjene C9 og D10. Merkelig nok ser ikke Dex ut til å ha den samme effekten i B3 3.4 GR KO cellelinjene C12 og G9. Det lavere MW-båndet for GR ser ut til være tilnærmet likt, uavhengig av Dex-stimuleringen. Farging for PAX6 bekrefter at B3 WT cellelinjene inneholder PAX6, og at PAX6 er fjernet fra er B3 3.4. Intensiteten av PAX6-båndene for B3 WT cellelinjene, ser ut til å være tilnærmet likt, uavhengig av Dex-stimulering.

#### **4.2.3 Titrering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Det ble utført proliferasjons-assay hvor målet var å undersøke hvordan cellenes vekst reagerer på oksidativt stress. For å utsette cellene for oksidativt stress, ble cellene stimulert med hydrogenperoksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) som er en reaktiv oksygensubstans (ROS). Cellene ble utsatt for tre ulike konsentrasjoner av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, og dermed ulik mengde oksidativt stress. Cellene ble stimulert med 0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, og deretter sammenlignet med ustimulerte celler. Ved bruk av tre ulike konsentrasjoner av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, var formålet å identifisere hvilken konsentrasjon av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> som er best egnet for at cellelinjene påvirkes av oksidativt stress, uten at det fører til celledød rett etter tilsetning. Denne konsentrasjonen av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ble brukt videre i forsøkene for å studere funksjonene til GR og PAX6 under oksidativt stress.



Figur 4.5 Proliferasjonen til B3 WT og de to B3 WT GR KO cellelinjene B3 WT C9 og B3 WT D10 er studert ved stimulering med ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjoner. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjonene som ble brukt var 0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cellene er tilsatt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ved tiden 0, og celledettheten er normalisert ved tiden 0 for alle cellelinjene. Proliferasjonskurvene til alle de tre cellelinjene er presentert i figur A. Figur B viser proliferasjonskurvene for B3 WT cellelinjen. Figur C og D viser GR KO mutantene, henholdsvis B3 WT C9 og B3 WT D10. Det ble kjørt WB av proteinekstraktene høstet etter forsøket slutt, tre døgn etter tilsatt stimuli. WB ble farget for GR (MW rundt 97 kDa), PAX6 (MW rundt 46 kDa) og Aktin (MW rundt 42 kDa) som presenteres i Figur E.



B3 WT ustimulert og stimulert med ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjoner viser generelt høyere proliferasjonshastighet, sammenlignet med de to GR KO cellelinjene (*Figur 4.5 A*). For alle cellelinjene viser stimulering med 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og de ustimulerte cellene generelt høyest proliferasjon sammenlignet med stimulering med 0,4 mM og 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> skiller seg fra de andre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjonene, da denne viser redusert vekst i alle cellelinjene. Dette tyder på at en konsentrasjon på 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> påfører cellene så mye oksidativt stress, at det resulterer i vekststans og celledød.

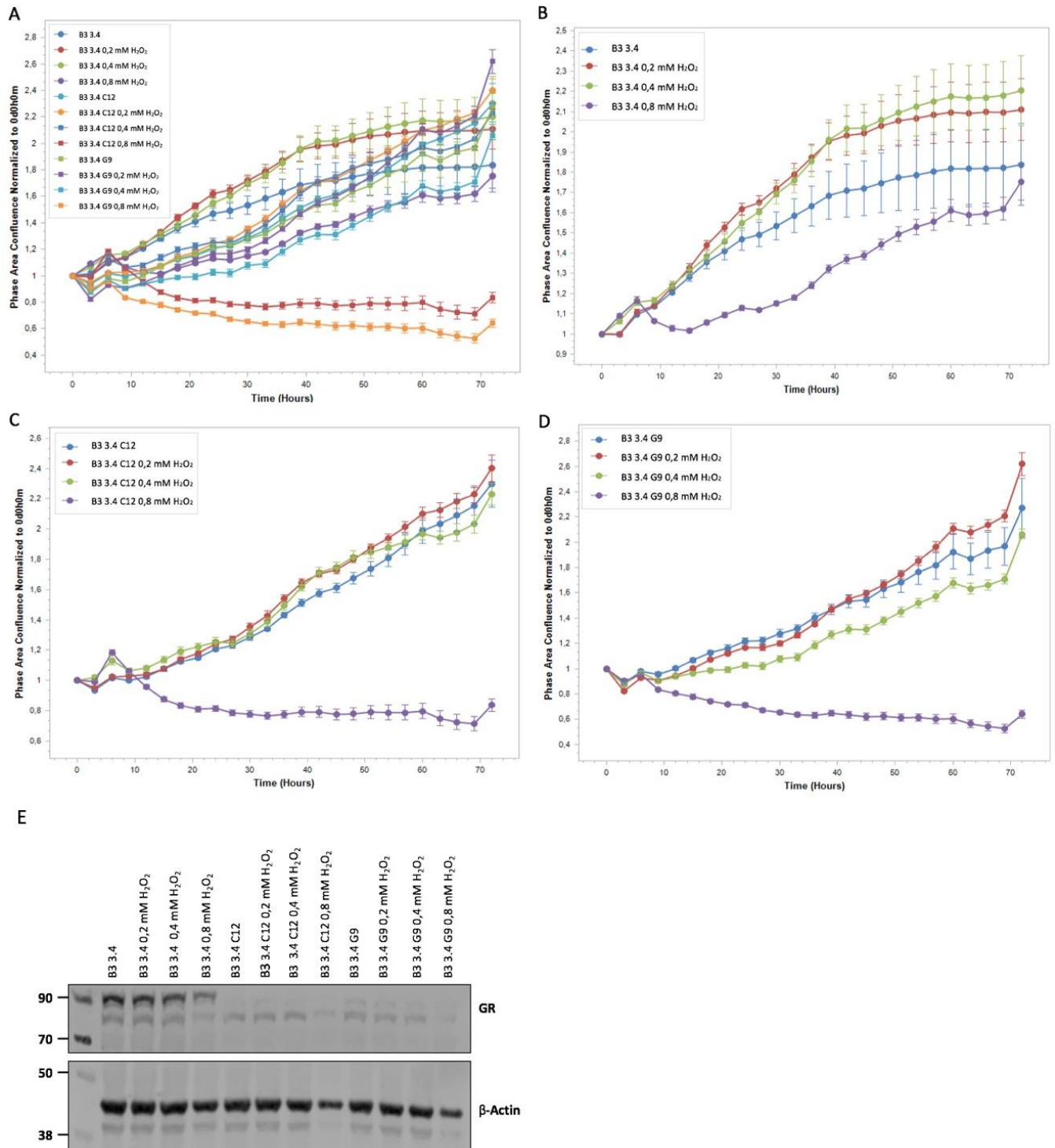
For B3 WT cellelinjen varierer det over de tre døgnene om det er de ustimulerte cellene eller cellene stimulert med 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> som viser høyest proliferasjonshastighet (*Figur 4.5 B*). Stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viser relativt lik kurve som de ustimulerte cellene frem til ca. 18 timer, deretter viser denne stimuleringen betydelig lavere proliferasjonshastighet. Stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viser en negativ proliferasjonskurve.

For den GR-modifiserte KO cellelinjen B3 WT C9 viser de ustimulerte cellene og cellene stimulert med 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> høyest proliferasjon (*Figur 4.5 C*). For den andre GR KO cellelinjen B3 WT D10 viser stimulering med 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> høyest proliferasjon, med en litt høyere vekst enn for de ustimulerte cellene (*Figur 4.5 D*). Felles for GR KO cellelinjene er at stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fører til lavere proliferasjon sammenlignet med de ustimulerte cellene, og 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viser en negativ proliferasjonskurve.

Felles for alle B3 WT cellelinjene er at de ustimulerte cellene eller stimulering med 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viser høyest proliferasjonshastighet. Dette indikerer at en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjon på 0,2 mM påfører cellene en mengde oksidativt stress som ikke påvirker celleveksten i stor grad, og som i noen celler faktisk virker positivt på veksten. Stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medfører en lavere proliferasjonshastighet for alle cellelinjene sammenlignet, med ustimulerte celler. Dette indikerer at denne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjonen påfører cellene en mengde oksidativt stress som påvirker cellenes proliferasjon i negativ retning. For alle cellene resulterer 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i en negativ proliferasjonskurve, som indikerer at cellene blir utsatt for en så stor mengde oksidativt stress at det fører til vekststans og celledød.

Etter proliferasjons-assayets slutt var det ønskelig å studere proteinuttrykket av GR og PAX6 i cellene etter de ulike stimuleringene med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Intensiteten av GR-båndet på 97 kDa påvirkes ikke betydelig ved stimulering med 0,2 mM eller 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Figur 4.5 E*). Derimot reduseres proteinuttrykket etter stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Intensiteten av det

lavere GR-båndet som er til stede i alle cellelinjene ser ut til å reduseres etter stimulering med 0,4 mM og 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. PAX6-båndene, og dermed proteinuttrykket av PAX6, ser ut til å påvirkes mer av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulering enn GR-båndene. Intensiteten ser ut til å reduseres allerede etter stimulering med 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, og reduseres videre parallelt med økende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjon. Ut fra aktinfargingen, kan det se ut til at mengde protein generelt reduseres litt med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulering. Spesielt for cellene stimulert med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ser det ut til at intensiteten av aktin reduseres sammenlignet med de ustimulerte cellene. Dette kan være et resultat av celledød, noe som også ble sett i proliferasjons-assayene i form av negativ proliferasjonskurve.



Figur 4.6 Proliferasjonen til cellelinjene B3 3.4 og de to GR-mutantene B3 3.4 C12 og B3 3.4 G9 ble studert ved stimulering med ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjoner (0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM) over tre døgn. Cellene er tilsatt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ved tiden 0, og celledettheten er normalisert ved tiden 0 for alle cellelinjene. Figur A fremstiller proliferasjonskurvene for alle stimuleringene for de tre B3 3.4 cellelinjene. I figur B, C og D fremstilles proliferasjonskurvene for henholdsvis B3 3.4, B3 3.4 C12 og B3 3.4 G9. Etter stimulering i tre døgn, ble proteinekstraktene høstet, og kjørt på WB. WB (figur E) ble farget for GR som har en MW på rundt 97 kDa, og Aktin som har en MW på 42 kDa.

B3 3.4 ustimulert og stimulert med tre ulike konsentrasjoner av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM) viser generelt bedre proliferasjon enn GR KO cellelinjene B3 3.4 C12 og B3 3.4 G9 (*Figur 4.6 A*).

Sammenlignet med de ustimulerte cellene vil både 0,2 mM og 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> føre til bedre proliferasjon i B3 3.4 cellene (*Figur 4.6 B*). 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vil derimot føre til redusert proliferasjon, sammenlignet med de ustimulerte cellene. 0,2 mM og 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viser relativt like proliferasjonskurver, men frem til ca. 40 timer viser 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generelt høyest proliferasjon, videre er det 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> som viser best proliferasjon. De ustimulerte B3 3.4 cellene viser relativt lik proliferasjonskurve som stimulering med 0,2 mM og 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frem til ca. 20 timer, deretter viser de ustimulerte cellene betydelig lavere proliferasjonshastighet. Stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viser lavest proliferasjonshastighet, men proliferasjonen er økende sammenlignet med de andre cellene.

GR KO cellelinjen B3 3.4 C12 viser ingen effekt på proliferasjonen ved stimulering med 0,2 mM og 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sammenlignet med de ustimulerte cellene (*Figur 4.6 C*). Stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulterer i en svakt negativ proliferasjonskurve. For den andre GR KO cellelinjen B3 3.4 G9 har stimulering med 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stort sett ikke noen effekt på proliferasjonen, sammenlignet med de ustimulerte cellene (*Figur 4.6 D*). Etter 50 timer kan en svak økning i proliferasjonen observeres for stimulering med 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sammenlignet med de ustimulerte cellene. Stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viser derimot en svakt hemmende effekt på proliferasjonen. I likhet med B3 3.4 C12 (*Figur 4.6 C*) viser stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en negativ proliferasjonskurve.

En interessant observasjon er at B3 3.4 stimulert med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viser relativt lik proliferasjonshastighet som B3 3.4 G9 stimulert med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, altså en stigende vekst, men lavere vekst enn ustimulerte celler. Stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for B3 3.4 KO cellelinjene viser derimot en negativ proliferasjonshastighet. Ved å sammenligne stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i B3 3.4 og B3 WT cellene, viser B3 3.4 en svak økende vekst i nærvær av 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Figur 4.6 B*), mens B3 WT (som inneholder PAX6) derimot viser en negativ proliferasjonskurve (*Figur 4.5 B*). Dette indikerer at B3 3.4 (som mangler PAX6) er mindre sensitiv for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, og dermed at PAX6 fører til økt sensitivitet for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Det sees også en tydelig forskjell i proliferasjonen mellom B3 3.4 og B3 3.4 GR KO cellelinjene, hvor ingen

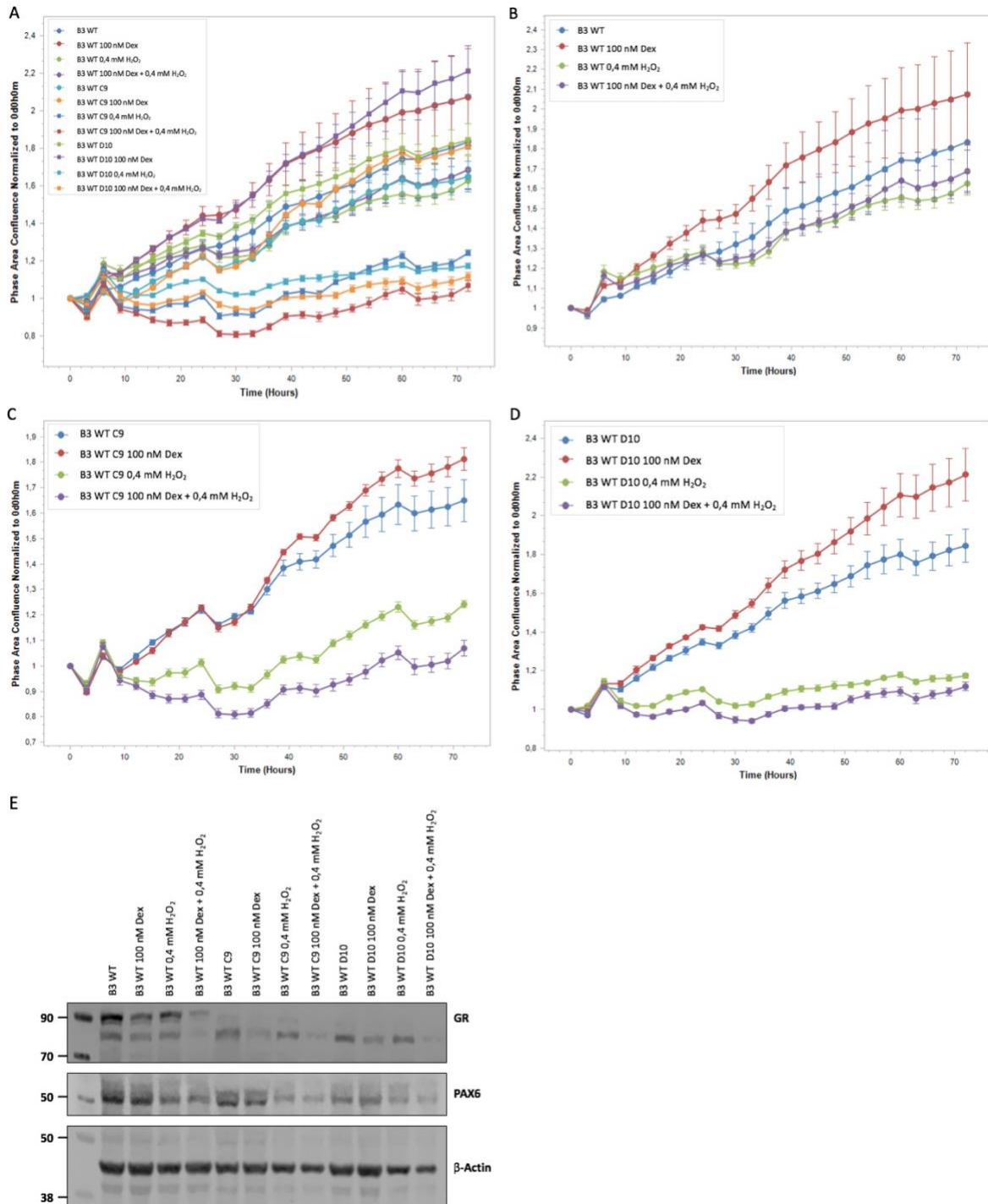
av cellelinjene inneholder PAX6. Dette indikerer at GR også kan spille en rolle i sensitiviteten for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ved at tilstedeværelse av GR fører til at cellene blir mindre sensitive for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Stimulering med 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viser en positiv effekt på prolifereringen i B3 3.4 cellelinjene. I disse cellene viser faktisk også stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en positiv effekt på proliferasjonen. Stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hemmer ikke veksten så sterkt i B3 3.4 GR KO cellelinjene (*Figur 4.6 C og D*), som i B3 WT cellelinjene (B3 WT og B3 WT GR KO) (*Figur 4.5 A*). B3 WT og B3 WT GR KO cellene (inneholder PAX6) viser en større forskjell i proliferasjonen enn det B3 3.4 GR KO viser, etter stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sammenlignet med de ustimulerte cellene. Dette bekrefter også at tilstedeværelse av PAX6 i cellene fører til at cellene blir mer sensitive for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Cellene ble høstet etter proliferasjons-assayets slutt, altså tre døgn etter tilsatt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Proteinekstraktene ble kjørt på WB, og farget med primærantistoffene  $\alpha$ -GR og  $\alpha$ -Aktin (*Figur 4.6 E*) for å studere proteinuttrykket av GR i cellelinjene etter stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Stimulering med 0,2 mM og 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ser ikke ut til å påvirke konsentrasjonen/stabiliteten til GR-proteinet. Derimot ser det ut til at intensiteten, og dermed proteinuttrykket, reduseres for cellene stimulert med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for begge GR-båndene. Disse resultatene viser det samme som proliferasjonskurvene, hvor de ustimulerte cellene, og stimulering med 0,2 mM og 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viser relativt lik proliferasjon, mens stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viser betydelig lavere proliferasjonskurve. Aktinfarging bekrefter relativt lik loading for de fleste prøvene. B3 3.4 GR KO cellelinjene behandlet med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ser ut til å ha mindre protein i prøvene, sammenlignet med de andre prøvene. Denne forskjellen er ikke så utpreget i B3 3.4 cellelinjen. I likhet med loadingen for B3 3.4 cellelinjen, viser proliferasjonskurven også at cellene ikke er like påvirket av 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjonen.

For alle cellelinjene (både B3 WT og B3 3.4 cellelinjene) førte stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> til negativ proliferasjonskurve, med unntak av B3 3.4. Ønskelig konsentrasjon til videre forsøk vurderes ut fra at cellene utsettes for en passende mengde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, slik at de påvirkes av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uten at celledød inntreffer rett etter tilsetning. For de fleste cellene viste stimulering med 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liten eller ingen effekt. Stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> førte for de fleste cellelinjene til synlige endringer (for det meste redusert proliferasjonshastigheten) sammenlignet med de ustimulerte cellene. Derfor ble denne konsentrasjonen valgt til videre forsøk.

## 4.2.4 Stimulering med Dex og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Det var ønskelig å studere effekten av GR og PAX6 når cellene utsettes for oksidativt stress ved å studere celleproliferasjon. For å aktivere GR stimuleres cellene med Dex, i tillegg tilsettes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for å utsette cellene for oksidativt stress.



Figur 4.7 Proliferasjonen til B3 WT cellelinjene, B3 WT, B3 WT C9 og B3 WT D10 er studert ved stimulering med Dex og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cellene er stimulert med 100 nM Dex, 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og 100 nM Dex i kombinasjon med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i tre døgn. Cellene er tilsatt stimuli ved tiden 0, og celledettheten er normalisert ved tiden 0 for alle cellelinjene. Figur A viser proliferasjonskurvene for alle cellelinjene, og figur B, C og D viser henholdsvis B3 WT, B3 WT C9 og B3 WT D10. Det ble utført WB av proteinekstrakter høstet etter proliferasjons-assayets slutt (tre døgn etter tilsatt stimuli), og figur E viser et representativt WB farget for GR (MW 97 kDa), PAX6 (46 kDa) og aktin (42 kDa). Forsøket er repetert tre ganger.

For B3 WT cellelinjene generelt ser det ut til at tilsetning av Dex fører til økt proliferasjon, sammenlignet med de ustimulerte cellene (*Figur 4.7 A*). Stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fører derimot til redusert proliferasjon i alle cellelinjene. Når Dex og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tilsettes samtidig på cellene, resulterer det i tilnærmet lik proliferasjonskurve som for tilsetning av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene, og faktisk en litt dårligere vekst i B3 WT GR KO cellelinjene. Dette viser at tilsetning av Dex ikke har noen effekt på den negative proliferasjonskurven forårsaket av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i B3 WT cellene.

For B3 WT cellelinjen viser stimulering med Dex tydelig bedre proliferasjon, sammenlignet med de ustimulerte cellene (*Figur 4.7 B*). Denne cellelinjen inneholder GR, og i likhet med de tidligere proliferasjons-assayene er det forventet at proliferasjonen øker når Dex tilsettes. Når cellene tilsettes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indusert oksidativt stress, eller i kombinasjon med Dex (GR aktiveres) medfører det en redusert proliferasjon. Dette tyder på at aktivering av GR (ved tilsetning av Dex) når cellene utsettes for oksidativt stress ikke vil ha noen effekt på proliferasjonen. Det samme sees i de to andre repetisjonene av dette forsøket.

For begge GR KO cellelinjene C9 og D10 viser stimulering med 100 nM Dex generelt bedre vekst enn de ustimulerte cellene (*Figur 4.7 C og D*). I likhet med B3 WT cellelinjen viser tilsetning av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene eller i kombinasjon med Dex, dårligere vekst enn de ustimulerte cellene. For B3 WT C9 viser de ustimulerte cellene og tilsetning av Dex relativt like proliferasjonskurver frem til ca. 39 timer, deretter viser Dex-stimulering bedre vekst (*Figur 4.7 C*). Sammenlignet med de to andre repetisjonene av dette forsøket viser B3 WT C9 stimulert med 100 nM Dex bedre vekst enn de ustimulerte cellene, i to av tre repetisjoner. Tilsetning av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene, eller i kombinasjon med Dex, viser i alle forsøkene en lavere vekst enn de ustimulerte cellene. I forsøket fremstilt i *Figur 4.7 C* viser cellene stimulert med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene, høyere proliferasjonshastighet, sammenlignet med cellene stimulert med Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. I de andre to repetisjonene er det mindre forskjell i veksten mellom disse to stimuleringene.

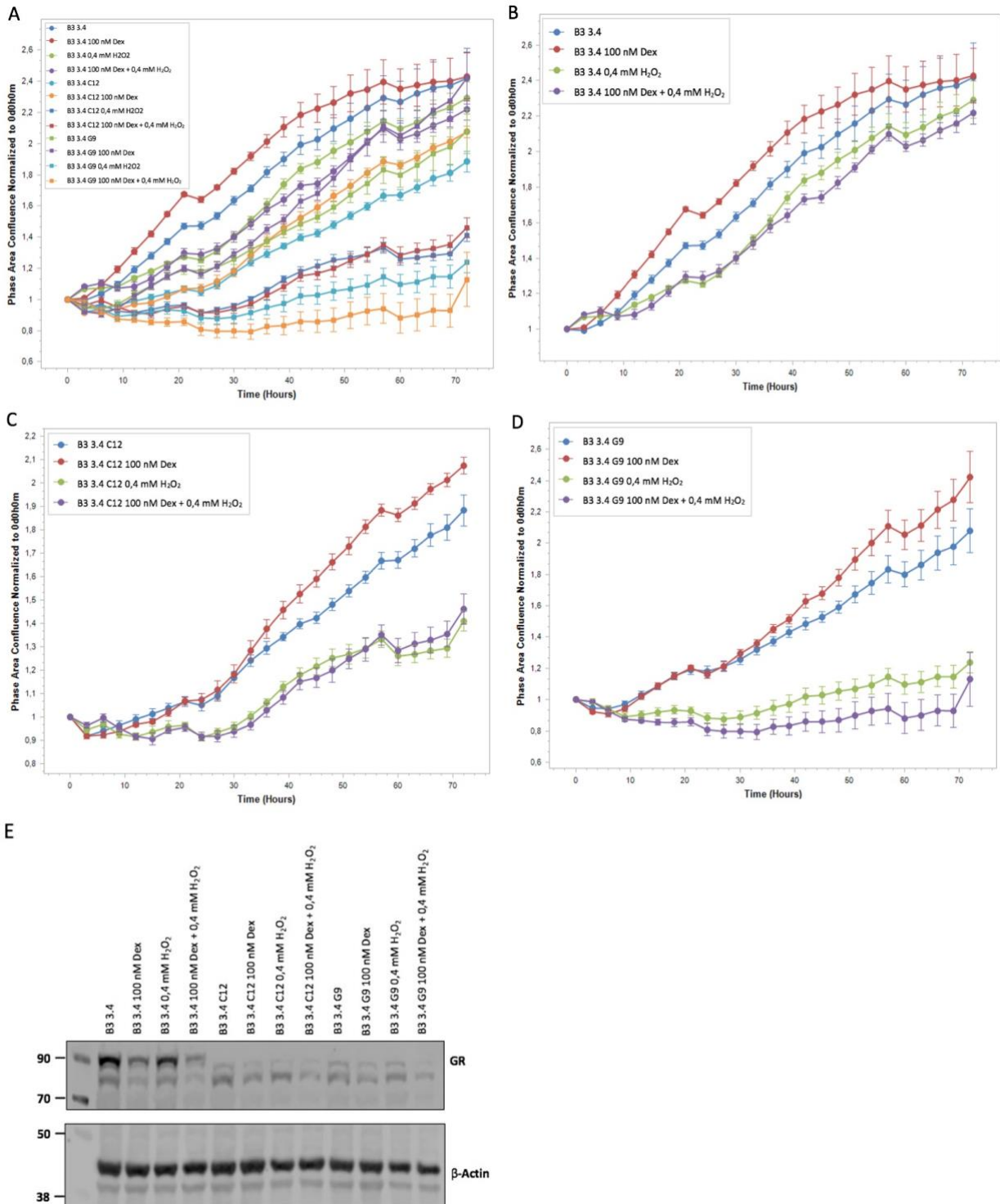
For B3 WT D10 (*Figur 4.7 D*) viser alle tre repetisjonene av forsøket at tilsetning av Dex fører til bedre proliferasjon enn de ustimulerte cellene. Derimot viser stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene eller i kombinasjon med Dex redusert proliferasjon. Når cellene utsettes for oksidativt stress, ser det i likhet med de andre B3 WT cellelinjene ut til at Dex ikke påvirker veksten i stor grad. I to av tre repetisjoner av dette forsøket viser stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> litt høyere

proliferasjonshastighet, sammenlignet med cellene stimulert med Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

For å oppsummere ble det vist at aktivering av GR (ved stimulering med Dex) for B3 WT cellelinjen ikke hadde noen påvirkning på proliferasjonen til cellene, når de ble utsatt for oksidativt stress. I motsetning, så det ut til at tilsetning av Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> førte til en ytterligere reduksjon av proliferasjonen i B3 WT GR KO cellelinjene. Dette kan indikere at 97 kDa-isoformen av GR har en viss beskyttende effekt for oksidativt stress, eventuelt at de mindre GR-isoformene i GR KO cellene (som ser ut til være responsiv for Dex), gjør cellene mere sensitiv for oksidativt stress da proliferasjonen reduseres ytterligere.

Etter proliferasjons-assayets slutt, tre døgn etter tilsatt stimuli, ble cellene høstet og proteinekstraktene ble kjørt på WB. WB er farget for GR, PAX6 og Aktin (*Figur 4.7 E*). Uttrykket av begge GR-variantene med ulik MW ser ut til å endres som respons på de ulike stimuleringene. Alle cellelinjene viser en reduksjon i GR-uttrykket som respons på Dex-stimuli, som også er vist i tidligere WB. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene endrer ikke GR-proteinuttrykket, men H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i kombinasjon med Dex gir et lavere nivå av GR-proteinet enn det Dex alene gjorde. PAX6-proteinuttrykket ser ikke ut til å påvirkes av Dex-stimulering i noen av cellelinjene. Derimot reduseres proteinuttrykket når Dex tilsettes i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, eller ved H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene. Dette indikerer at stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fører til en økt nedbrytning av PAX6-proteinet. Aktinbåndene viser relativt lik loading for alle cellelinjene. GR KO cellelinjene stimulert med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene eller i kombinasjon med Dex ser ut til å ha litt mindre proteiner i prøvene, sammenlignet med de andre prøvene.





Figur 4.8 Proliferasjonen for B3 3.4 cellelinjene er studert med tilsetning av Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, for å studere veksten under oksidativt stress samtidig som GR er aktivert. Cellene er stimulert med 100 nM Dex, 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og 100 nM Dex i kombinasjon med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i tre døgner. Cellene er tilsatt stimuli ved tiden 0, og celledettheten er normalisert ved tiden 0 for alle cellelinjene. Proliferasjonskurvene for alle tre B3 3.4 cellelinjene presenteres i Figur A. Figur B viser B3 3.4 med de ulike stimuleringene, og figur C og D viser de to B3 3.4 GR KO cellene, henholdsvis B3 3.4 C12 og B3 3.4 G9. Etter forsøket slutt, tre døgner etter tilsatt stimuli, ble proteinekstrakt høstet, og kjørt på WB (Figur E). WB er farget for GR (MW 97 kDa) og Aktin (MW 42 kDa). Forsøket er utført tre ganger.

For alle B3 3.4 cellelinjene viser tilsetning av Dex økt proliferasjon sammenlignet med de ustimulerte cellene (*Figur 4.8 A*). Når cellene ble utsatt for oksidativt stress ved tilsetning av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, eller i kombinasjon med Dex, ble veksten redusert.

Cellelinjen B3 3.4 stimulert med 100 nM Dex viser bedre vekst enn de ustimulerte cellene i alle tre repetisjonene av dette forsøket. Dette indikerer at aktivering av GR resulterer i økt proliferasjon. Stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene eller i kombinasjon med Dex viser i *Figur 4.8 B* lavere proliferasjonshastighet sammenlignet med de ustimulerte cellene. Stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene og i kombinasjon med Dex viser relativt like proliferasjonskurver. Dette ble sett i to av tre repetisjoner.

I likhet med B3 3.4, viser stimulering med 100 nM Dex generelt bedre proliferasjon sammenlignet med de ustimulerte cellene i B3 3.4 GR KO cellelinjene (*Figur 4.8 C og D*). Stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene eller i kombinasjon med Dex viser dårligere vekst sammenlignet med de ustimulerte cellene. For GR KO cellelinjen B3 3.4 C12 viser stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene eller i kombinasjon med Dex relativt like proliferasjonskurver, og tydelig lavere vekst sammenlignet med de ustimulerte cellene (*Figur 4.8 C*). Det samme sees i to av tre repetisjoner av forsøket. I én av repetisjonene viser derimot stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bedre proliferasjon sammenlignet med de ustimulerte cellene, og Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viser lik vekst som de ustimulerte cellene (*Appendiks 4*). For B3 3.4 G9 cellelinjen fører stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> til dårligere vekst sammenlignet med de ustimulerte cellene, og når man i tillegg tilsetter Dex fører det til en enda dårligere vekst (*Figur 4.8 D*). Dette sees i to av de tre repetisjonene av forsøket.

Disse resultatene indikerer at aktivering av GR i B3 3.4 cellelinjen ikke har noen påvirkning på proliferasjonen under oksidativt stress. Når cellene mangler 97 kDa-isoformen av GR (B3 3.4 GR KO cellene) vil tilsetning av Dex i noen av repetisjonene vise en ytterligere reduksjon i proliferasjon under oksidativt stress. Dette kan i likhet med B3 WT GR KO cellelinjene indikere at 97 kDa-isoformen av GR har en viss beskyttende effekt, eventuelt at de mindre isoformene av GR fører til at cellene blir mer sensitive for oksidativt stress.

Etter cellene var stimulert med Dex og/eller H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i tre døgn, var det ønskelig å studere proteinuttrykket i de ulike cellene. WB ble farget for GR og Aktin for å studere GR-uttrykket etter de ulike stimuleringene (*Figur 4.8 E*). Uttrykket av begge GR-variantene ser ut til å

endres som respons på noen av de ulike stimuliene. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene ser ikke ut til å endre GR-proteinuttrykket i noen av cellelinjene. Alle cellelinjene viser en reduksjon i GR-uttrykket som en respons på Dex-stimulering, og Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ser ut til å redusere GR-uttrykket mer enn det Dex gjorde alene.

### 4.3 Real time PCR (qPCR)

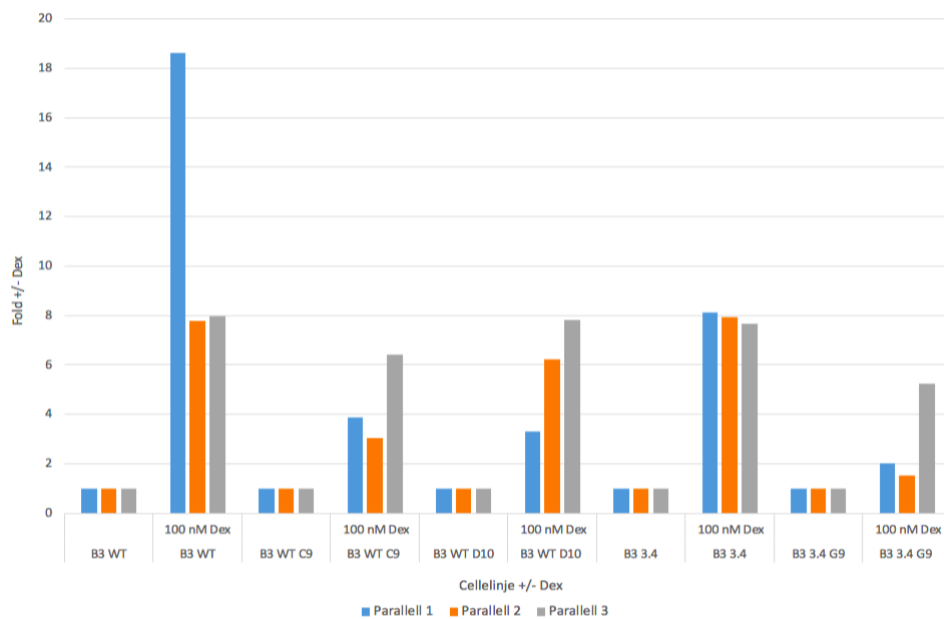
Siden GILZ er et målgen for GR (47) og GJA1 et målgen for PAX6 (Mikkola, upublisert), var det av interesse å se om uttrykket av disse genene endret seg når uttrykket av GR og PAX6 var manipulert. GILZ og GJA1 kan også være et mål for om funksjonen til PAX6 og GR endres under oksidativt stress. GJA1 kan benevnes på ulike måter, og vil i dette studiet omtales som GJA1.

#### 4.3.1 GILZ som målgen

Det ble utført qPCR-forsøk med cellelinjene B3 WT (GR og PAX6), B3 WT C9 (PAX6), B3 3.4 (GR) og B3 3.4 G9 hvor målet var å undersøke effekten på GILZ. GILZ ble brukt som målgen, og housekeeping-genene som ble brukt var GusB og GAPDH. GILZ-uttrykket ble studert i nærvær og fravær av 100 nM Dex for alle cellelinjene. Det ble kjørt tre paralleller av qPCR-forsøkene, hvor RNA var høstet ved tre forskjellige tidspunkter og dermed ble det brukt tre ulike cDNAer.

Tabell 4.3 Endringer i genekspressjonen til GILZ i fem cellelinjer stimulert med Dex. Cellene er stimulert med 100 nM Dex (+) i 24 timer, eller ustimulert (-). Fold verdien i de ustimulerte cellene er satt til 1, og verdiene fra tre parallelle qPCR eksperimenter er vist, der GusB og GAPDH ble brukt for normalisering ved  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metoden (44).

Cellelinje	Dex (100 nM)	Fold +/- Dex		
		Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3
B3 WT	-	1,00	1,00	1,00
	+	18,6	7,78	7,97
B3 WT C9	-	1,00	1,00	1,00
	+	3,88	3,03	6,43
B3 WT D10	-	1,00	1,00	1,00
	+	3,31	6,23	7,81
B3 3.4	-	1,00	1,00	1,00
	+	8,13	7,92	7,65
B3 3.4 G9	-	1,00	1,00	1,00
	+	2,02	1,53	5,24



Figur 4.9 Grafisk fremstilling av foldverdiene presentert i tabell 4.2 i nærvær og fravær av 100 nM Dex for de fem cellelinjene. Det er kjørt tre paralleller, hvor blå fremstiller parallel 1, oransje parallel 2 og grå parallel 3. Foldverdien til de ustimulerte cellene er satt til 1,00, og fold verdien til cellene stimulert med 100 nM Dex er beregnet i forhold til dette.

For alle tre parallellene er foldinduksjonen av GILZ redusert i alle GR-mutantene, sammenlignet med B3 WT og B3 3.4 (Tabell 4.3 og Figur 4.9). Forskjellen i induksjonen av GILZ mellom B3 WT og B3 WT GR KO cellene er størst for parallel 1, og er nesten ikke til stede i parallel 3. Av B3 WT cellelinjene, ser det ut til at B3 WT C9 responderer minst på Dex. B3 WT D10 ser ut til å respondere nesten like godt på Dex som B3 WT i parallel 2 og 3. Dette ble også sett i proliferasjons-asseyet, hvor det så ut til at B3 WT D10 var mest responsiv for Dex og B3 WT C9 så ikke ut til å være responsiv for Dex.

Proliferasjonsresultatene og qPCR-resultatene indikerer at det finnes en Dex-responsiv isoform av GR i GR KO cellene som kan påvirke uttrykket av GR målgener.

Foldverdiene og differansen mellom foldverdiene til B3 WT og GR KO cellene varierer mellom de ulike parallellene, men alle parallellene viser likevel en reduksjon i foldverdiene sammenlignet med B3 WT som inneholder GR. Dette indikerer at når GR er til stede, øker GILZ-uttrykket med Dex-stimulering. Likevel sees en endring i foldverdien for GR KO cellelinjene etter Dex-stimulering. Dette tyder på at GR-uttrykket er redusert, men er likevel ikke helt borte.

I to av parallellene responderer B3 3.4 tilnærmet likt som B3 WT cellelinjen. Dette bekrefter at GILZ er et målgen for GR, og ikke nevneverdig påvirket av at PAX6 er fjernet. I likhet

med B3 WT cellelinjene, viser også B3 3.4 en økt GILZ-ekspresjon etter Dex-stimulering, sammenlignet med GR (og PAX6) KO cellelinjene. B3 3.4 G9 viser en betydelig mindre GILZ-ekspresjon i alle parallellene, sammenlignet med B3 3.4. Den reduserte induksjonen i GILZ-ekspresjonen i GR KO cellelinjene indikerer at den ligandavhengige aktiviteten til GR er redusert i disse cellene. Likevel sees en induksjon i disse cellene når Dex tilsettes, som tyder på at GR ikke er helt borte.

*Tabell 4.4 Endringer i genekspressjonen til GILZ i fem cellelinjer stimulert med Dex. Cellene er stimulert med 100 nM Dex (+) i 24 timer, eller ustimulert (-). Foldverdien til de ulike cellelinjene er sammenlignet med foldverdien til B3 WT. Uttrykket i B3 WT cellene er satt til 1,00, hvor de andre cellelinjene sammenlignes med denne både med og uten Dex. Verdien for tre parallelle qPCR-forsøk er vist, der GusB og GAPDH ble brukt for normalisering ved  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoden (44).*

Cellelinje	Dex (100 nM)	Fold +/- Dex sammenlignet med B3 WT		
		Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3
B3 WT	-	1,00	1,00	1,00
	+	18,60	7,78	7,97
B3 WT C9	-	5,14	1,37	0,94 (-1,06)
	+	19,97	4,16	6,06
B3 WT D10	-	3,49	0,62 (-1,61)	0,58 (-1,71)
	+	11,55	3,84	4,54
B3 3.4	-	4,45	1,19	1,19
	+	36,13	9,43	9,13
B3 3.4 G9	-	5,00	1,70	0,84 (-1,20)
	+	10,11	2,61	4,38

qPCR-resultatene kan også brukes til å se på grunnnivået av GILZ i cellelinjene sammenlignet med B3 WT. Det var ønskelig å studere grunnnivået av GILZ i de ulike cellelinjene, for å se om fjerning av GR og/eller PAX6 påvirker GILZ-nivået. Uttrykket av GILZ i B3 WT cellelinjen, settes til 1. Uttrykket i de andre cellelinjene med og uten Dex-stimulering, sammenlignes med GILZ-uttrykket i B3 WT.

Parallell 1 viser generelt et mye høyere GILZ-nivå for alle cellelinjene, sammenlignet med parallell 2 og 3 (Tabell 4.4). Parallell 2 og 3 viser relativt like verdier, hvor GILZ-nivået er litt redusert i noen av GR KO cellene. De fleste cellelinjene viser et økt GILZ-uttrykk sammenlignet med B3 WT. For B3 WT GR KO cellelinjene B3 WT C9 og B3 WT D10 viser noen av parallellene en liten nedgang i GILZ-uttrykk uten Dex-stimulering, sammenlignet med B3 WT. Ved stimulering med Dex viser B3 WT GR KO cellelinjene derimot et økt GILZ-uttrykk sammenlignet med B3 WT. Det samme sees også for B3 3.4 GR KO

cellelinjene, hvor én parallell viser et redusert GILZ-uttrykk uten Dex-stimulering, men derimot et økt uttrykk med Dex-stimulering.

### 4.3.2 GJA1 som målgen

GJA1 ble brukt som målgen for å studere om effekten av GJA1-uttrykket ble endret når PAX6 og GR var manipulert. Det ble utført qPCR-forsøk for de fire cellelinjene B3 WT (GR og PAX6), B3 WT C9 (PAX6), B3 3.4 (GR) og B3 3.4 G9, hvor målet var å undersøke effekten på GJA1. Målgenet som ble brukt var derfor GJA1, og housekeeping-genene som ble brukt var GusB og GAPDH. Ekspresjonen av GJA1-uttrykket ble studert i nærvær og fravær av 100 nM Dex.

*Tabell 4.5 Endringer i genekspressjonen til GJA1 i fire cellelinjer stimulert med Dex. Cellene er stimulert med 100 nM Dex (+) i 24 timer, eller ustimulert (-). Første del av tabellen presenterer foldverdien til de ulike cellelinjene med og uten Dex, sammenlignet med foldverdien til B3 WT. Uttrykket i B3 WT er satt til 1, og uttrykket til de andre cellelinjene sammenlignes med denne. I andre del av tabellen presenteres foldverdiene til cellelinjene stimulert med Dex sammenlignet med ustimulerte celler, der verdien er satt til 1. Foldverdien er beregnet der GusB og GAPDH ble brukt for normalisering ved  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoden (44).*

Cellelinje	Dex (100 nM)	Fold sammenlignet med WT		Fold +/- Dex	
B3 WT	-	1,00		1,00	
	+	0,88	-1,1	0,88	-1,1
B3 WT C9	-	1,29	1,3	1,00	
	+	0,86	-1,2	0,66	-1,5
B3 3.4	-	0,58	-1,7	1,00	
	+	0,33	-3,0	0,57	-1,8
B3 3.4 G9	-	0,40	-2,5	1,00	
	+	0,41	-2,4	1,03	1,0

GJA1-uttrykket reduseres i B3 3.4 cellelinjene hvor PAX6 er fjernet, sammenlignet med B3 WT (Tabell 4.5). Dette tyder på at PAX6 virker positivt på uttrykket av GJA1, noe som er forventet da GJA1 er et målgen for PAX6. Når B3 3.4 cellelinjen stimuleres med Dex, reduseres GJA1 uttrykket mer, noe som er uventet og indikerer at aktivert GR påvirker GJA1-uttrykket negativt. For B3 3.4 cellelinjen hvor GR er fjernet (B3 3.4 G9), endres ikke GJA1-uttrykket under stimulering med Dex.

Foldverdien for cellelinjene stimulert med Dex sammenlignet med de ustimulerte, bekrefter at GJA1 ikke er et GR målgen i seg selv, da uttrykket av GJA1 i B3 WT cellene blir minimalt påvirket under Dex-stimulering. I motsetning viser B3 WT C9 hvor GR skal være fjernet, en endring i GJA1-uttrykket når Dex tilsettes.

Dex ser ut til å ha en represserende effekt på GJA1-uttrykket i cellelinjen som mangler PAX6, men har GR (B3 3.4). For B3 3.4 G9 endres ikke GJA1-uttrykket under stimulering med Dex, noe som indikerer at GR er slått ut fra denne cellelinjen.

## **4.4 Luciferase reporter-gen-assay**

Det ble utført luciferase reporter-gen-assay hvor aktiviteten til GJA1- og GILZ-promotoren ble brukt som et mål på funksjonen til GR og PAX6 i cellelinjene. Aktiviteten av GJA1- og GILZ-promotorene ble studert i nærvær og fravær av Dex, og oksidativt stress hvor cellene ble stimulert med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

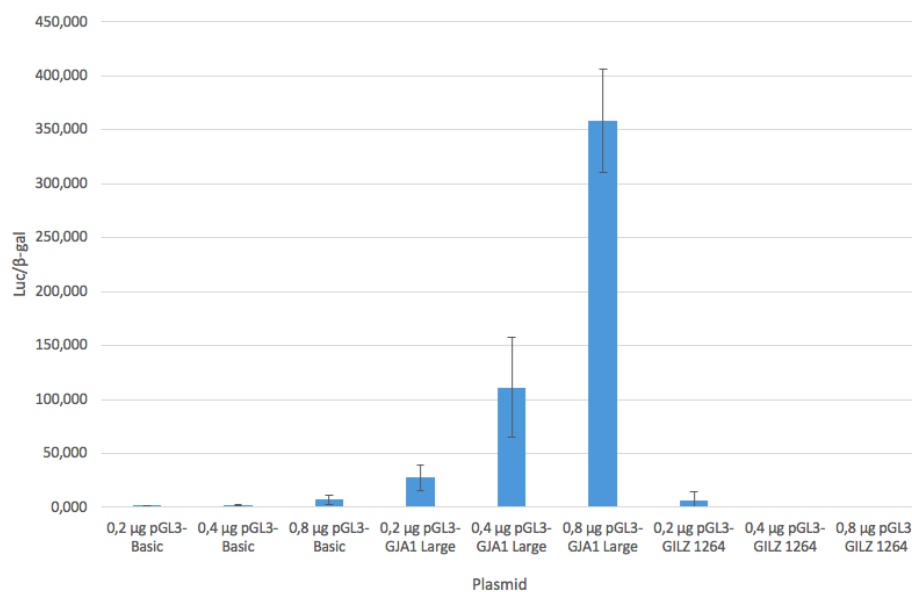
Plasmidet pCH110 ble brukt i alle transfeksjonene for å justere for eventuelle forskjeller i transfeksjonseffektivitet. pCH110 inneholder et gen som koder for  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal). GJA1-promotoren ble identifisert i et kromatin immunopresipiterings- (ChIP) assay gjort med PAX6 antistoff for denne B3 cellelinjen (Mikkola, upublisert).

Promotorfragmenter som inkluderer transkripsjons startstedene for henholdsvis GJA1-genet og GILZ-genet, klonet i en reporter-genvektor (pGL3-Basic) ble brukt.

### **4.4.1 Titrering av reporter-genplasmidene**

Det ble utført en transfeksjon for å finne optimal konsentrasjon av de ulike reporter-genplasmidene til videre bruk i forsøkene. Dette ble gjort i B3 WT cellene, og plasmidene som ble titrert var pGL3-GJA1 Large, pGL3-GILZ 1264 og pGL3-Basic.



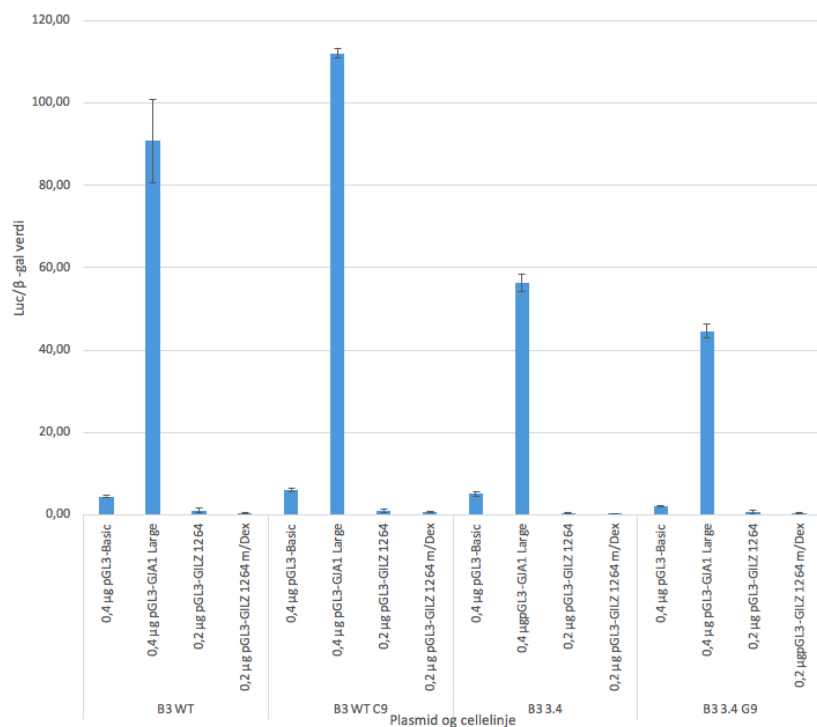


Figur 4.10 Grafisk fremstilling av Luc /  $\beta$ -gal verdiene for plasmidene pGL3-GJA1 Large, pGL3-GILZ 1264 og pGL3-Basic i tre ulike konsentrasjoner (0,2  $\mu$ g, 0,4  $\mu$ g og 0,8  $\mu$ g). Luc /  $\beta$ -gal verdiene viser aktiviteten til plasmidene i cellelinjen B3 WT som inneholder både PAX6 og GR.

Transfeksjon med plasmidet pGL3-GJA1 Large viste en økende aktivitet i B3 WT cellelinjene med økende konsentrasjon av plasmidet (Figur 4.10). På grunnlag av gode Luc/ $\beta$ -gal verdier for alle konsentrasjonene av pGL3-GJA1 Large plasmidet, ble en konsentrasjon på 0,4  $\mu$ g valgt å bruke i de videre forsøkene. pGL3-GILZ 1264 plasmidet viste derimot lav aktivitet i B3 WT cellelinjen. Ut fra figuren ser det ut til at en økt konsentrasjon av plasmidet fører til en lavere transkripsjon. Transfeksjon med 0,2  $\mu$ g pGL3-GILZ 1264 viste høyest Luc/ $\beta$ -gal verdi, og ble derfor forsøkt benyttet videre i neste transfeksjonsforsøk. Selv om det ble vist lav aktivitet i dette forsøket, var det ønskelig å se om plasmidet viser en forskjell ved transfeksjon i de ulike cellelinjene, og i nærvær av Dex.

#### 4.4.2 Transfeksjon med plasmidene GJA1 Large og GILZ 1264

Basert på resultatet av titreringen ble det utført en transfeksjon med de utvalgte konsentrasjonene av plasmidene. Det var ønskelig å studere aktiviteten av GJA1 Large og GILZ 1264 i nærvær og fravær av GR og/eller PAX6. Cellelinjene som ble transfektert var B3 WT, B3 WT C9, B3 3.4 og B3 3.4 G9. Cellene ble transfektert med plasmidene pGL3-GJA1 Large og pGL3-GILZ 1264, der tomt plasmid (pGL3-Basic) ble inkludert for sammenligning. For pGL3-GILZ 1264 promotorplasmidet ble aktiviteten i tillegg studert i nærvær og fravær av Dex.



Figur 4.11 Grafisk fremstilling av Luc/β-gal verdien til de fire cellelinjene B3 WT, B3 WT C9, B3 3.4 og B3 3.4 G9 transfektert med plasmidene pGL3-Basic, pGL3-GJA1 Large og pGL3-GILZ 1264. Luc/β-gal verdiene viser aktiviteten til den klonede GJA1-promotoren og GILZ 1264 promotoren i ulike cellelinjer hvor GR (er fjernet eller modifisert) og/eller PAX6 er fjernet, sammenlignet med villtype cellelinjen der både PAX6 og GR er til stede. Tom vektor (pGL3-Basic) er brukt som kontroll. Det ble kjørt tre paralleller med hvert plasmid for hver cellelinje. For plasmidet pGL3-GILZ 1264 ble det brukt seks brønner for hver cellelinje, hvor tre brønner ble stimulert med 100 nM Dex i 24 timer.

Tabell 4.6 Foldverdier for aktiviteten til pGL3-GJA1 Large plasmidet sammenlignet med kontrollvektoren pGL3-Basic i de fire cellelinjene.

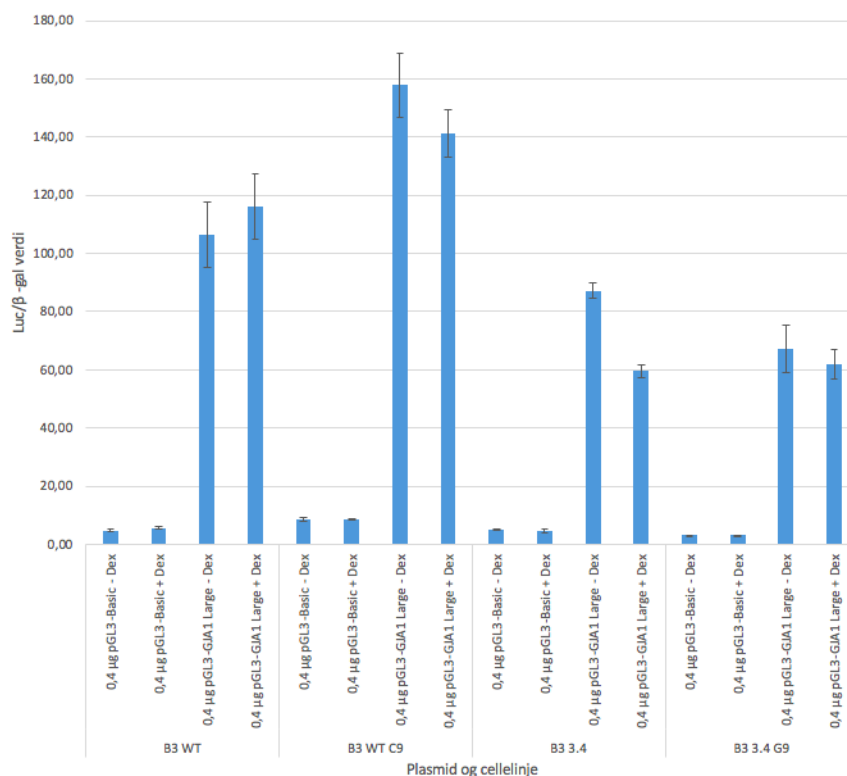
Cellelinje	Luc/β-gal pGL3-GJA1 Large	Luc/β-gal pGL3-Basic	Fold
B3 WT	90,84	4,37	20,8
B3 WT C9	112,12	5,93	18,9
B3 3.4	56,29	5,07	11,1
B3 3.4 G9	44,56	2,07	21,5

Grafen (Figur 4.11) over aktiviteten til GJA1 promotorplasmidet i de fire ulike cellelinjene, viser at det er størst aktivitet i B3 WT cellelinjene (både med og uten GR), og minst aktivitet i B3 3.4 cellelinjene som mangler PAX6. Dette er forventet siden GJA1-promotoren ble isolert ved at den bandt PAX6-proteinet. Resultatene endres litt når man tar hensyn til Luc/β-gal verdiene til det tomme plasmidet (pGL3-Basic). Foldverdier for promotorplasmidet i forhold til tom vektor er beregnet for alle cellene i Tabell 4.6. B3 3.4 viser fortsatt lavest uttrykk, men den største forskjellen er for B3 3.4 G9 cellelinjen. B3 3.4 G9 viser et like høyt uttrykk som B3 WT cellelinjen.

GILZ (1264 bp) promotoren viste lav aktivitet i alle cellelinjene, både i fravær og nærvær av Dex (Figur 4.11). Dette tyder på at denne delen av promotoren ikke var i stand til å forårsake genuttrykk i B3 cellene, og dermed ble ikke dette brukt videre. Det ble senere forsøkt to andre deler av GILZ-promotoren, for å se om de er mer responsive i disse cellene.

#### 4.4.3 Transfeksjon med GJA1 plasmidet i nærvær og fravær av Dex

Det var ønskelig å studere GJA1-uttrykket i nærvær og fravær av Dex for de ulike cellelinjene, for å se om aktivering av GR påvirker GJA1-uttrykket. Dette fordi tidligere studier i forskningsgruppen har vist at GR og PAX6 kan virke synergistisk sammen i regulering av genuttrykk (Hegge og Mikkola, upubliserte data). Cellelinjene B3 WT, B3 WT C9, B3 3.4 og B3 3.4 G9 ble transfektert med plasmidene pGL3-GJA1 Large og pGL3-Basic i nærvær og fravær av Dex.



Figur 4.12 Grafisk fremstilling av Luc/β-gal verdiene for plasmidene pGL3-Basic og pGL3-GJA1 Large i de fire ulike cellelinjene i nærvær og fravær av Dex. Luc/β-gal verdiene viser aktiviteten til det klonede pGL3-GJA1 Large plasmidet i ulike cellelinjer hvor GR (er fjernet eller modifisert) og/eller PAX6 er fjernet, sammenlignet med villtype cellelinjen der både PAX6 og GR er til stede. Tom vektor (pGL3-Basic) er brukt som kontroll.

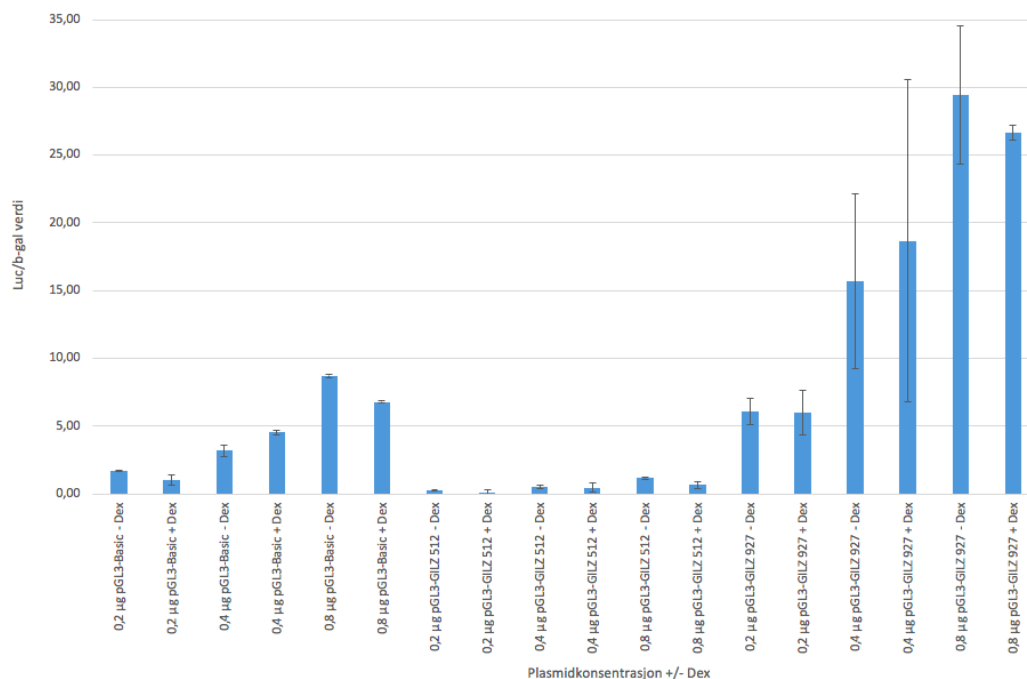
Tabell 4.7 Foldverdier for aktiviteten til pGL3-GJA1 Large plasmidet sammenlignet med kontrollvektoren pGL3-Basic i de fire cellelinjene. Cellene er stimulert med 100 nM Dex (+) i 24 timer og ustimulert (-).

Cellelinje	Dex (100 nM)	Luc/ $\beta$ -gal pGL3-GJA1 Large	Luc/ $\beta$ -gal pGL3-Basic	Fold
B3 WT	-	106,46	4,84	22,0
	+	116,04	5,68	20,4
B3 WT C9	-	157,94	8,56	18,5
	+	141,44	8,63	16,4
B3 3.4	-	87,25	5,23	16,7
	+	59,56	4,80	12,4
B3 3.4 G9	-	67,30	3,14	21,4
	+	61,91	3,09	20,0

GJA1-promotoren ser ut til å være mest aktiv i B3 WT cellelinjene sammenlignet med B3 3.4 cellelinjene som har mistet sitt uttrykk av PAX6 (Figur 4.12). Dette stemmer med at PAX6 er vist å binde GJA1-promotoren. Når det gjelder mutasjonen av GR, kan det se ut som den fører til en liten økning i GJA1-uttrykket i B3 WT cellelinjen (B3 WT C9), derimot ser den ikke ut til å ha noen effekt i B3 3.4 cellelinjen (B3 3.4 G9). Tilsetning av Dex ser generelt ikke ut til å ha noen stor effekt på GJA1-uttrykket, bortsett fra i B3 3.4 cellelinjen der tilsetning av Dex reduserer uttrykket av GJA1. Dette bekreftes av Tabell 4.7 hvor foldverdien reduseres når cellene tilsettes Dex. Til sammen indikerer disse resultatene at PAX6 påvirker GJA1-promotoren positivt, mens GR muligens kan ha en negativ effekt. Det observeres altså ingen synergisme mellom PAX6 og GR på denne promotoren.

#### 4.4.4 Titrering av GILZ promotorplasmider

Det ble utført transfeksjon ved bruk av to andre GILZ promotorplasmider, da GILZ plasmidet (pGL3-GILZ 1264) som ble benyttet i det tidligere transfeksjonsforsøket ikke så ut til å bli aktivert i B3 cellene. De to nye GILZ promoterplasmidene er trunkerte varianter (inneholdende henholdsvis 512 bp og 927 bp) av den første promotoren som ble prøvd. Titrering av to de andre GILZ-promotorene ble utført for å se om noen av disse ga respons, og eventuelt hvilken konsentrasjon. Cellelinjen som ble benyttet var B3 WT, og cellene ble transfektert i fravær eller nærvær av Dex.



Figur 4.13 Grafisk fremstilling av Luc/β-gal verdiene for de ulike konsentrasjonene (0,2 µg, 0,4 µg og 0,8 µg) av plasmidene pGL3-GILZ 512, pGL3-GILZ 927 og pGL3-Basic transfekter i B3 WT cellelinjene i nærvær og fravær av Dex. Luc/β-gal verdiene viser aktiviteten til GILZ 512 bp og GILZ 927 bp i B3 WT cellelinjen som inneholder GR og PAX6. Tom vektor (pGL3-Basic) er brukt som kontroll.

Tabell 4.8 Foldverdier for aktiviteten til pGL3-GILZ 927 plasmidet sammenlignet med kontrollvektoren pGL3-Basic i de fire cellelinjene. Cellene er ustimulert (-) eller stimulert med 100 nM Dex (+) i 24 timer.

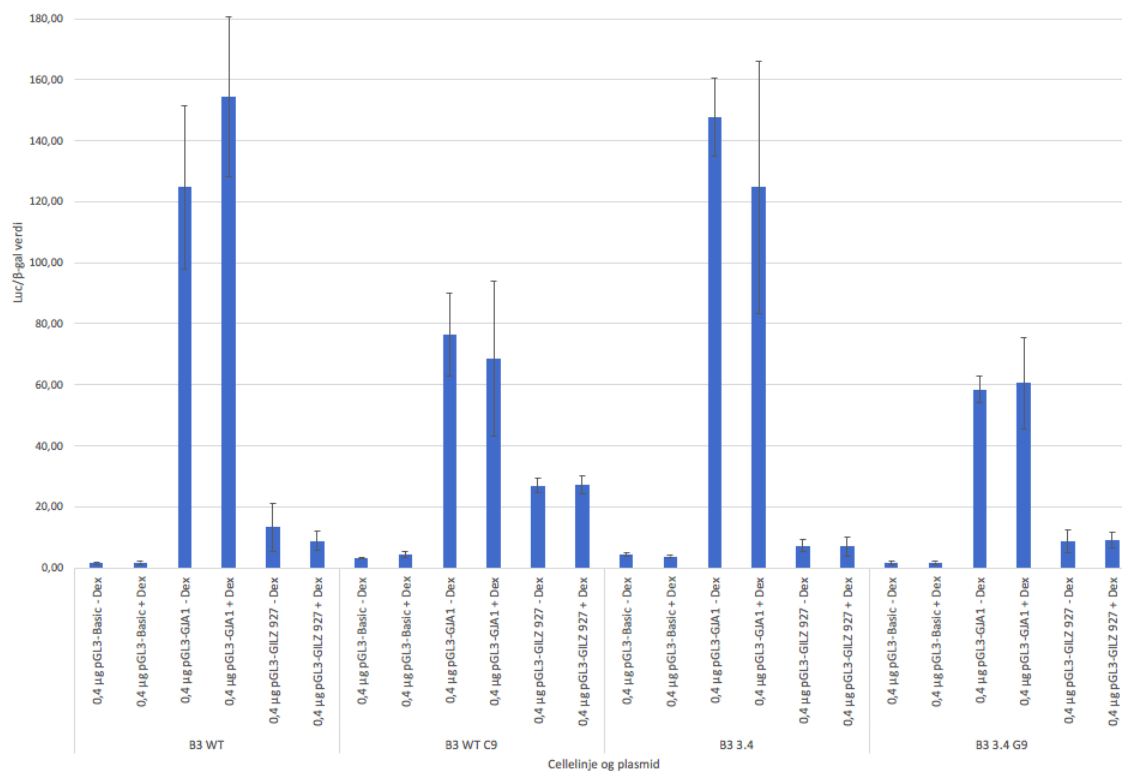
Plasmid	Dex (100 nM)	Luc/β-gal pGL3 - GILZ 927	Luc/β-gal pGL3 - Basic	Fold
0,2 µg pGL3-GILZ 927	-	6,11	1,68	3,6
	+	5,99	0,99	6,0
0,4 µg pGL3-GILZ 927	-	15,68	3,18	4,9
	+	18,67	4,54	4,1
0,8 µg pGL3-GILZ 927	-	29,48	8,73	3,4
	+	26,66	6,80	3,9

Promotoren GILZ 927 ser ut til å være virksom i B3 WT cellene, da økt konsentrasjon av plasmidet gir en økning i Luc/β-gal-verdiene som er høyere enn verdiene for pGL3-Basic (Figur 4.13). Foldverdier der økningen i verdiene for GILZ-promotoren er justert for økningen av verdiene for den tomme vektoren, pGL3-Basic, er vist i Tabell 4.8. Det ser ikke ut til at promotoren er responsiv til Dex, da foldverdien ikke økes betydelig i B3 WT cellelinjen etter stimulering med Dex. Dette indikerer at GILZ 927 promotoren mest sannsynlig ikke inneholder et GR-bindingssete. Det var likevel ønskelig å se hvordan

promotoren oppfører seg i B3 3.4 cellelinjen hvor PAX6 er fjernet. I neste transfeksjonsforsøk ble denne promotoren inkludert. Siden den andre GILZ-promotoren (512 bp) ikke så ut til å være virksom i B3 WT cellelinjen (*Figur 4.13*), ble den ikke benyttet videre i denne oppgaven.

#### 4.4.5 Transfeksjon med plasmidene GJA1 og GILZ 927 i nærvær og fravær av Dex

Siden GILZ (927 bp) promotoren så ut til å være virksom i B3 WT cellelinjen ble den inkludert i transfeksjonen der GJA1-eksperimentet med og uten Dex ble repetert i de fire cellelinjene (B3 WT, B3 WT C9, B3 3.4 og B3 3.4 G9).



*Figur 4.14 Grafisk fremstilling av Luc/β-gal verdi for de fire cellelinjene (B3 WT, B3 WT C9, B3 3.4 og B3 3.4 G9) transfektert med plasmidene pGL3-Basic, pGL3-GJA1 Large og pGL3-GILZ 927. For hvert plasmid er cellene stimulert med eller uten 100 nM Dex. Luc/β-gal verdiene viser aktiviteten til GJA1 Large og GILZ 927 i ulike cellelinjer hvor GR (er fjernet eller modifisert) og/eller PAX6 er fjernet, sammenlignet med villtype cellelinjen der både PAX6 og GR er til stede. Tom vektor (pGL3-Basic) er brukt som kontroll.*

GJA1-promotoren ser ut til å bli uttrykt betydelig høyere enn GILZ 927-promotoren i alle cellelinjene både i nærvær og fravær av Dex (*Figur 4.14*). I likhet med det tidligere forsøket (*Figur 4.12* og *Tabell 4.7*) viste også dette at GJA1-promotoren er mest aktiv i B3 WT. I motsetning til det tidligere forsøket viste B3 3.4 cellelinjen tilnærmet lik luc/β-gal verdi som

B3 WT cellelinjen i dette forsøket. Dette er uventet da PAX6 er fjernet fra B3 3.4 cellelinjen, og PAX6 er vist å binde GJA1. Derimot ser det ut som det er høyere «bakgrunnsstøy» fra pGL3-Basic vektoren i B3 3.4 cellelinjen, enn i B3 WT. Resultatene kan dermed se annerledes ut når foldverdier beregnes, hvor aktiviteten til GJA1-promotoren justeres for kontrollvektoren pGL3-Basic. Når GR fjernes fra B3 WT og B3 3.4 cellelinjene ser det ut til at GJA1-uttrykket reduseres.

GILZ 927-promotoren ser ut til å være mest aktiv i B3 WT C9. For å kunne se effekten i promotoruttrykk må promotorene korreleres for kontrollvektoren (tom vektor), som i dette tilfellet er pGL3-Basic.

Tabell 4.9 Foldverdier for aktiviteten til pGL3-GJA1 Large plasmidet sammenlignet med kontrollvektoren pGL3-Basic i de fire cellelinjene. Cellene er ustimulert (-) eller stimulert med 100 nM Dex (+) i 24 timer.

Cellelinje	Dex (100 nM)	Luc/ $\beta$ -gal pGL3-GJA1 Large	Luc/ $\beta$ -gal pGL3-Basic	Fold	Fold +/- Dex
B3 WT	-	124,75	1,49	83,9	1,1
	+	154,31	1,65	93,5	
B3 WT C9	-	76,52	3,30	23,2	-1,4
	+	68,56	4,27	16,1	
B3 3.4	-	147,59	4,35	34,0	1,0
	+	124,79	3,66	34,1	
B3 3.4 G9	-	58,53	1,47	40,0	-1,1
	+	60,52	1,64	37,0	

Når GJA1-promotoruttrykket korreleres med kontrollvektoren (pGL3-Basic) er GJA1-promotoren mest aktiv i B3 WT sammenlignet med B3 3.4 (Tabell 4.9), som samsvarer med det tidligere forsøket. I likhet med det tidligere forsøket reduseres GJA1-uttrykket når GR fjernes fra B3 WT (B3 WT C9). At GJA1-uttrykket reduseres betydelig når GR fjernes fra B3 WT cellelinjen tyder på at tilstedeværelsen av GR øker GJA1-uttrykket. I motsetning har ikke tilsetningen av Dex (aktivering av GR) noen særlig påvirkning av uttrykket fra GJA1-promotoren i noen av cellelinjene i dette forsøket. Derimot viste B3 3.4 cellelinjen et redusert GJA1-uttrykk etter tilsetning av Dex i det første forsøket.

I likhet med det tidligere forsøket reduseres foldverdien betydelig når PAX6 fjernes fra B3 WT, som bekrefter at PAX6 virker positivt på GJA1-promotoren. I søylediagrammet (Figur

4.14) så det ut til at GJA1-uttrykket i B3 3.4 cellelinjen var tilnærmet likt som for B3 WT cellelinjen, men derimot når uttrykket korreleres for kontrollvektoren viser B3 3.4 en betydelig reduksjon i GJA1-uttrykket.

Tabell 4.10 Foldverdier for aktiviteten til pGL3-GILZ (927 bp) plasmidet sammenlignet med kontrollvektoren pGL3-Basic i de fire cellelinjene. Cellene er ustimulert (-) eller stimulert med 100 nM Dex (+) i 24 timer.

Cellelinje	Dex (100 nM)	Luc/ $\beta$ -gal pGL3-GILZ 927	Luc/ $\beta$ -gal pGL3-Basic	Fold	Fold +/- Dex
B3 WT	-	13,39	1,49	9,0	-1,7
	+	8,88	1,65	5,4	
B3 WT C9	-	26,87	3,30	8,1	-1,3
	+	27,11	4,27	6,4	
B3 3.4	-	7,32	4,35	1,7	1,1
	+	7,00	3,66	1,9	
B3 3.4 G9	-	8,59	1,47	5,9	1,1
	+	9,14	1,64	5,6	

For GILZ-promotoren viser B3 WT cellelinjen høyest uttrykk, nemlig 9 ganger høyere aktivitet enn kontrollplasmidet (pGL3-Basic) i de ustimulerte cellene (Tabell 4.10). Når cellelinjen stimuleres med Dex reduseres uttrykket av GILZ (927 bp) promotoren fra 9 til 5,4 fold. Dette indikerer at aktivering av GR påvirker GILZ-promotoren negativt, noe som er uventet da GILZ-uttrykket ble betydelig økt ved aktivering av GR i qPCR-forsøkene. Også for GR KO cellene (B3 WT C9) reduseres uttrykket fra GILZ-promotoren når cellene stimuleres med Dex.

Når PAX6 fjernes fra B3 WT cellelinjen (B3 3.4) reduseres aktiviteten av GILZ-promotoren fra 9 til omtrent 2 fold (Tabell 4.10). B3 3.4 viser tydelig den laveste aktiviteten av GILZ-promotoren. Dette tyder på at PAX6 er nødvendig for aktivering av denne GILZ-promotoren, noe som er uventet. GILZ er i utgangspunktet kjent som et gen regulert av GR. Det er ukjent at PAX6 skal kunne regulere aktiviteten til denne promotoren. Når GR fjernes fra B3 3.4 cellelinjen (B3 3.4 G9) øker aktiviteten av GILZ-promotoren. Dette er overraskende da denne cellelinjen ikke inneholder PAX6, som ifølge B3 3.4 så ut til å være nødvendig for å aktivere promotoren. Ingen av de to B3 3.4 cellelinjene påvirkes betydelig av Dex.

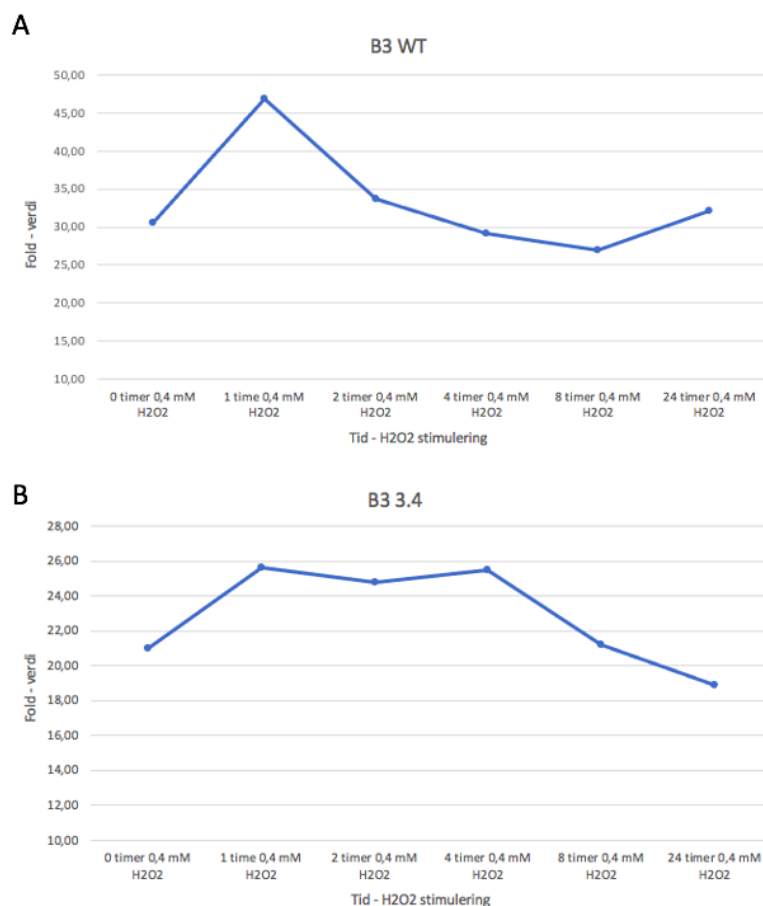


#### 4.4.6 Stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

GJA1-promotoren kan fungere som en reporter for funksjonen til PAX6 (og GR) under oksidativt stress. Det ble derfor utført transfeksjoner hvor cellene ble stimulert med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ulike tidsintervaller og konsentrasjoner. Transfeksjonene ble utført for å se om aktiveringen av GJA1-promotoren blir påvirket av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, og om responsen vil være forskjellig i B3 WT og B3 3.4 cellene. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> er vist å aktivere reporter-genet på en dose- og tidsavhengig måte (48). Det ble derfor utført luciferase reporter-gen-assay hvor cellene ble stimulert i ulike tidsintervaller, og med ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjoner.

##### 4.4.6.1 Tidskurve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Det ble utført luciferase reporter-gen-assay for cellelinjene B3 3.4 og B3 WT transfektert med GJA1-promotoren og kontrollvektoren pGL3-Basic. De transfekterte cellene ble stimulert med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ulike tidsintervaller (0, 1, 2, 4, 8 og 24 timer). Cellene ble stimulert i ulike tidsintervaller med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for å studere reporter-genet og dermed funksjonen til PAX6 (og GR) under ulik lengde (tid) utsatt for oksidativt stress.



Figur 4.15 Foldverdier for aktiviteten til pGL3-GJA1 Large plasmidet sammenlignet med kontrollvektoren pGL3-Basic i de to cellelinjene. Cellene er stimulert med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ulike tidsintervaller (24 timer, 8 timer, 4 timer, 2 timer, 1 time og 0 timer). Figur A viser tidskurve for B3 WT cellelinjen og Figur B for B3 3.4 cellelinjen.

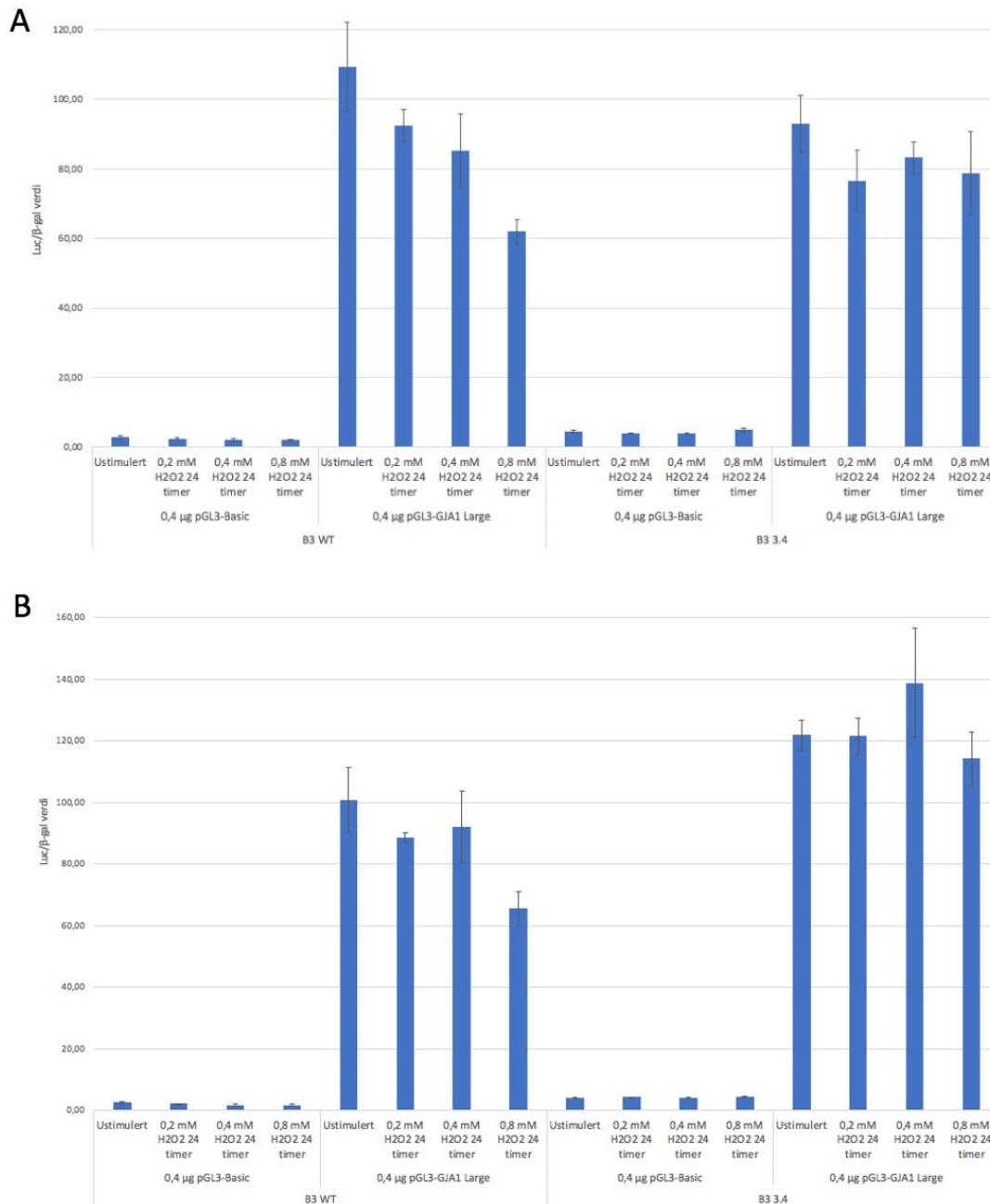
B3 WT ser generelt ut til å ha høyest aktivering av GJA1-promotoren (*Figur 4.15*), noe som er forventet på bakgrunn av de tidligere forsøkene. PAX6 er vist seg å binde denne promotoren, som bekreftes i forsøkene. Aktiviteten for GJA1-promotoren ser ut til å øke etter 1 time med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulering for begge cellelinjene, noe som indikerer at H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> har en positiv effekt på aktiveringen av GJA1-promotoren etter dette tidspunktet for begge cellelinjene. For B3 3.4 cellelinjene holder aktiviteten seg høy også ved 2 og 4 timer. Derimot går aktiviteten ned ved 2, 4 og 8 timer for B3 WT cellelinjen. De 4 første timene ser B3 3.4 cellene ut til være mindre påvirket av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enn B3 WT.

Ut fra tidskurvene ser det i likhet med tidligere observasjoner ut til at B3 3.4 er mindre sensitiv for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enn B3 WT. I cellene der PAX6 er til stede og påvirker uttrykket fra GJA1-promotoren, blir uttrykket raskt redusert under oksidativt stress. I B3 3.4 cellene der GJA1-uttrykket er uavhengig av PAX6, ble ikke uttrykket redusert like fort under oksidativt stress. Dette kan indikere at funksjonen til PAX6 som transkripsjonsfaktor på GJA1-promotoren svekkes under oksidativt stress.

#### 4.4.6.2 Dose-responskurve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

##### B3 3.4 og B3 WT

Det var ønskelig å studere aktivering av reporter-genet og dermed funksjonen til PAX6 (og GR) på en doseavhengig måte. Det ble utført luciferase reporter-gen-assay for cellelinjene B3 3.4 og B3 WT transfektert med pGL3-GJA1 Large plasmidet og kontrollvektoren pGL3-Basic stimulert med ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjoner (0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM) i 24 timer.



Figur 4.16 Grafisk fremstilling av Luc/β-gal verdiene for B3 WT og B3 3.4 transfektert med plasmidene pGL3-Basic og pGL3-GJA1 Large. Luc/β-gal verdiene viser aktiviteten til GJA1 i B3 3.4 cellelinjen hvor PAX6 er fjernet (men GR er til stede), sammenlignet med villtype cellelinjen der både PAX6 og GR er til stede. Tom vektor (pGL3-Basic) er brukt som kontroll. Cellene er stimulert med ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjoner (ustimulert, 0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Det ble utført to paralleller av transfeksjonsforsøket, hvor figur A viser parallell 1 og figur B parallell 2.

Tabell 4.11 Foldverdier for aktiviteten til pGL3-GJA1 Large plasmidet sammenlignet med kontrollvektoren pGL3-Basic i de to cellelinjene. Det er utført to paralleller av forsøket, markert parallell 1 og parallell 2.

	Cellelinje	Konsentrasjon av H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	Luc/β-gal pGL3-GJA1 Large	Luc/β-gal pGL3-Basic	Fold
Parallell 1	B3 WT	0	109,36	2,93	37,4
		0,2	92,47	2,51	36,8
		0,4	85,28	2,20	38,8
		0,8	61,94	2,07	29,9
	B3 3.4	0	93,04	4,48	20,8
		0,2	76,53	4,04	18,9
		0,4	83,18	4,12	20,2
		0,8	78,79	4,95	15,9
Parallell 2	B3 WT	0	100,88	2,50	40,4
		0,2	88,58	2,19	40,4
		0,4	92,01	1,77	51,9
		0,8	65,52	1,71	38,3
	B3 3.4	0	121,84	4,04	30,2
		0,2	121,46	4,28	28,4
		0,4	138,76	4,14	33,5
		0,8	114,20	4,36	26,2

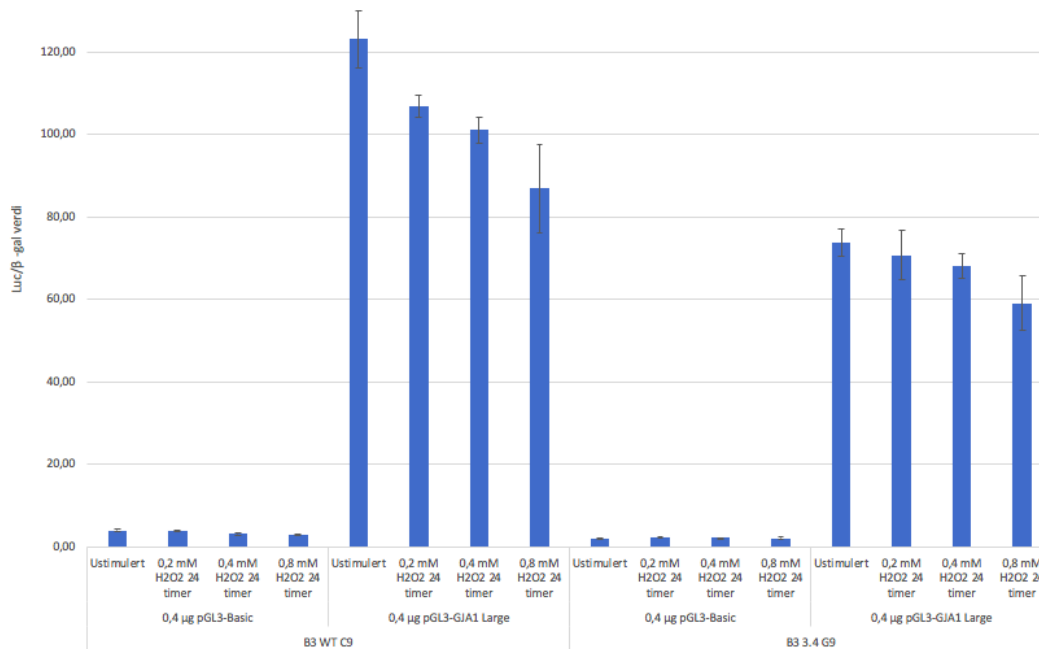
Ut ifra Luciferaseverdiene (Luc/β-gal) for GJA1-promotoren ser det ut til at B3 WT er mer sensitiv for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enn B3 3.4 cellelinjen (*Figur 4.16*). For B3 WT cellelinjen reduseres luciferaseverdien med økende konsentrasjon av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i parallell 1 (*Figur 4.16 A*). Det samme sees i parallell 2 (*Figur 4.16 B*), men i denne parallellen viser stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en økt luciferaseverdi for B3 WT sammenlignet med 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Luciferaseverdien for stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viser derimot et stort standardavvik, som kan være en årsak til den økte luciferaseverdien etter stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i parallell 2 sammenlignet med parallell 1. I begge parallellene er det en betydelig reduksjon i luciferaseverdien etter stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sammenlignet med de ustimulerte cellene. Dette indikerer at økende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjon reduserer GJA1-uttrykket i B3 WT cellelinjen. For B3 3.4 cellelinjen ser det ut til at stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> påvirker GJA1-uttrykket i mindre grad sammenlignet med B3 WT (*Figur 4.16*). Dette tyder på at cellene som ikke inneholder PAX6 er mindre sensitiv for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Når luciferaseverdiene til GJA1-promotoren korreleres for kontrollvektoren pGL3-Basic, viser B3 WT cellelinjen generelt høyere GJA1-aktivitet enn B3 3.4 cellelinje (*Tabell 4.11*). For B3 WT cellelinjene viser begge parallellene høyest foldverdi ved stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, og tydelig lavest etter stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Som tidligere nevnt

reduseres foldverdien for aktiviteten til GJA1-promotoren sammenlignet med kontrollvektoren (pGL3-Basic) når PAX6 fjernes fra B3 WT. At B3 WT cellelinjen generelt har høyere GJA1-aktivitet enn B3 WT bekrefter tidligere resultater som viser at PAX6 virker positivt på GJA1-uttrykket. For B3 3.4 cellelinjene viser de ustimulerte cellene og stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> høyest foldverdi. I begge parallellene viser stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lavest foldverdi.

### B3 WT C9 og B3 3.4 G9

Det var ønskelig å se hvordan aktiviteten til GJA1-promotoren ble påvirket av stimulering med ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjoner, også for GR KO cellelinjene B3 WT C9 og B3 3.4 G9 hvor GR skal være slått ut.



Figur 4.17 Grafisk fremstilling av Luc/β-gal verdiene til plasmidene pGL3-Basic og pGL3-GJA1 Large transfektert i cellelinjene B3 WT C9 og B3 3.4 G9. Luc/β-gal verdiene viser aktiviteten til pGL3-GJA1 Large plasmidet i GR KO cellelinjene, hvor en tom vektor (pGL3-Basic) er brukt som kontroll. Cellene er stimulert med ulike konsentrasjoner av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ustimulert, 0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM) i 24 timer.

Tabell 4.12 Foldverdier for aktiviteten til pGL3-GJA1 Large plasmidet sammenlignet med kontrollvektoren pGL3-Basic i de to cellelinjene (B3 WT C9 og B3 3.4 G9). Cellelinjene er stimulert med tre ulike konsentrasjoner av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 mM, 0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM) i 24 timer.

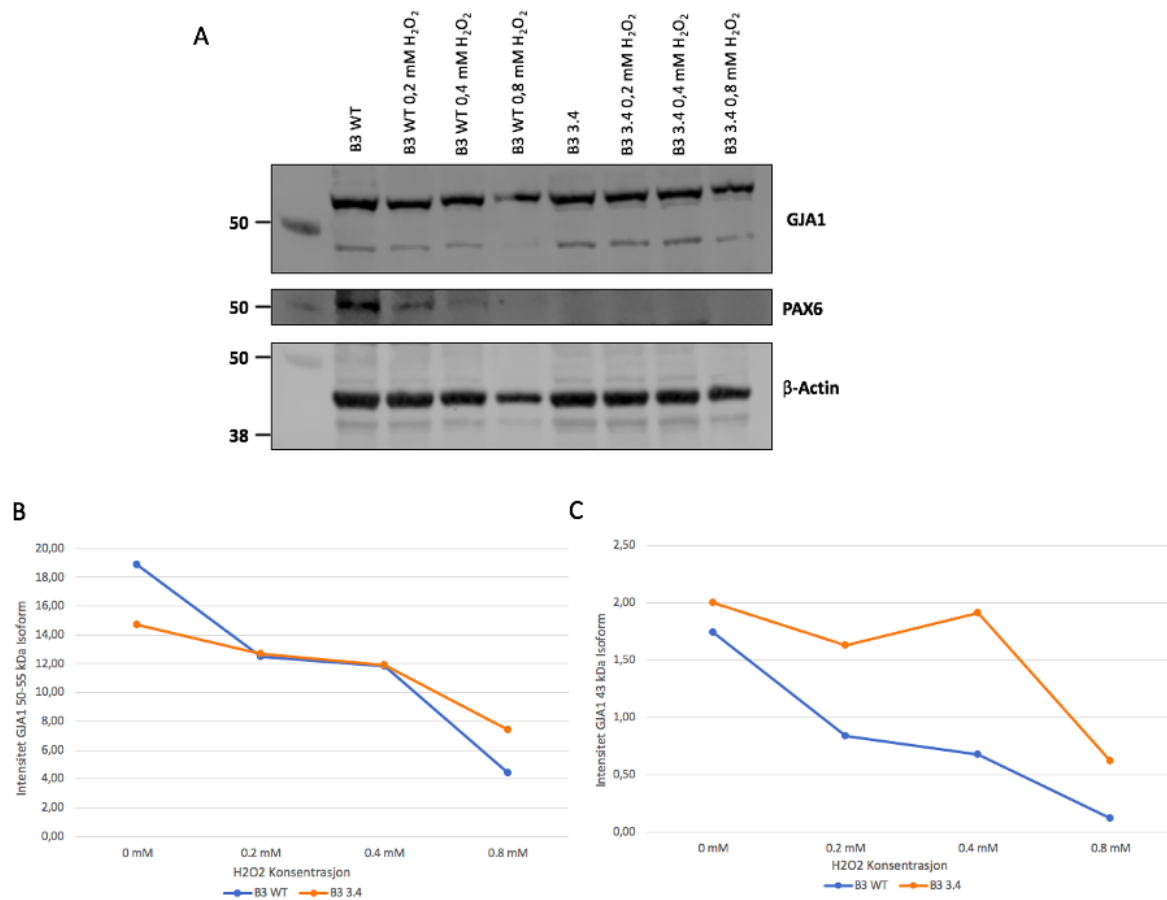
Cellelinje	Konsentrasjon av H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	Luc/β-gal pGL3-GJA1 Large	Luc/β-gal pGL3-Basic	Fold
B3 WT C9	0	123,14	3,98	31,0
	0,2	106,89	3,93	27,2
	0,4	101,11	3,21	31,5
	0,8	86,93	3,12	27,8
B3 3.4 G9	0	73,95	2,17	34,1
	0,2	70,83	2,24	31,7
	0,4	68,15	2,23	30,6
	0,8	59,09	2,14	27,7

B3 WT C9 viser generelt høyere aktivitet av GJA1-promotoren, sammenlignet med B3 3.4 G9 (Figur 4.17 og Tabell 4.12). Dette er forventet da GJA1 er et målgen for PAX6, og B3 WT C9 inneholder PAX6, noe B3 3.4 G9 ikke gjør. I likhet med det samsvarende transfeksjonsforsøket med B3 WT og B3 3.4, ser det også her ut til at PAX6 fører til at cellene blir mer sensitive for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. B3 3.4 G9 som hverken inneholder PAX6 eller GR ser også ut til å redusere GJA1-uttrykket med økende mengde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, men ikke i like stor grad som B3 WT C9. Sammenlignet med B3 3.4 som kun mangler PAX6 (Figur 4.16), ser B3 3.4 G9 cellene ut til å være mer følsom for økende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjoner (Figur 4.17). Når Luc/β-gal verdien korreleres for kontrollvektoren pGL-3 Basic viser B3 WT og B3 3.4 relativt like foldverdier (Tabell 4.12). Forskjellen i foldverdien mellom de ustimulerte cellene og stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> er størst for B3 3.4 G9 cellelinjen, men forskjellen i Luc/β-gal verdiene er størst i B3 WT C9 cellelinjene. Dette og tidligere forsøk i denne oppgaven indikerer at celler uten PAX6 er mindre følsomme for oksidativt stress, i motsetning til cellene hvor PAX6 er til stede. Men denne forskjellen i promotoraktiviteten til GJA1 ser ut til å forsvinne når GR fjernes, og cellene ser ut til å bli mer følsomme for oksidativt stress. Dette ble sett for B3 3.4 G9 cellelinjen som hverken inneholder GR eller PAX6, som viser økt sensitivitet for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sammenlignet med B3 3.4 som fortsatt inneholder GR.

## 4.5 WB GJA1

Det ble observert endringer i uttrykket av GJA1 i cellelinjene B3 WT og B3 3.4 i qPCR-forsøkene. I tillegg ble det sett endringer i aktiviteten til et promotorfragment av GJA1 under oksidativt stress. Derfor var det ønskelig å studere proteinuttrykket av GJA1.

Proteinuttrykket av GJA1 i B3 WT og B3 3.4 cellelinjene etter stimulering med ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjoner ble studert. Dette ble gjort for å se om proteinuttrykket endres i ulik grad for de to ulike cellelinjene når cellene utsettes for oksidativt stress.



Figur 4.18 Proteinuttrykket til GJA1, PAX6 og aktin i cellelinjene B3 3.4 og B3 WT, stimulert med tre ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasjoner. Figur A viser WB av cellelinjene B3 WT og B3 3.4 ustimulert eller stimulert med 0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i tre døgn. Proteinekstraktene er høstet tre døgn etter stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Membranen er farget for GJA1 som har en MW på 43 kDa, PAX6 som har en MW på 46 kDa, og Aktin med en MW på 42 kDa. Intensiteten av GJA1-båndet på rundt 55 kDa og 43 kDa for de ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimuleringene, justert for aktin presenteres henholdsvis i Figur B og Figur C. Forsøket ble utført to ganger.

For både B3 WT og B3 3.4 cellelinjene gir farging med primærantistoffet for GJA1 to ulike bånd. Ett intenst bånd mellom 50-55 kDa, og et svakere bånd på rundt 43 kDa (Figur 4.18 A). Båndet på 50-55 kDa er sannsynligvis en modifisert variant av GJA1, hvor det kan ha skjedd en glykosylering eller lignende. Det litt svakere båndene på rundt 43 kDa er den umodifiserte formen av GJA1. Ut fra WB ser det ut til at intensiteten av båndene på 50-55 kDa er omtrent

lik i B3 WT og B3 3.4 cellene. Derimot ser det ut til at B3 3.4 har et høyere proteinuttrykk av GJA1 med en kDa verdi på 43, sammenlignet med B3 WT. Dette indikerer at B3 WT cellelinjene har et lavere proteinuttrykk under oksidativt stress enn B3 3.4, som i likhet med tidligere resultater tyder på at B3 WT (inneholder PAX6) er mer sensitivt for oksidativt stress. B3 WT inneholder PAX6. I likhet med GJA1, påvirkes proteinuttrykket av PAX6 også av oksidativt stress. Proteinuttrykket av PAX6 reduseres med økende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjon.

Proteinuttrykket til GJA1 med en kDa verdi på 50-55 justert etter aktin (*Figur 4.18 B*) viser at uttrykket er relativt likt i B3 WT og B3 3.4 cellelinjene ved tilsetning av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Begge cellelinjene viser høyest proteinuttrykk for de ustimulerte cellene, deretter reduseres proteinuttrykket med økende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjon. Størst reduksjon i proteinuttrykket i begge cellelinjene sees etter stimulering med 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. B3 WT viser høyest proteinuttrykk for de ustimulerte cellene (0 mM), og lavest proteinuttrykk ved stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sammenlignet med B3 3.4 cellelinjen. Dette viser at proteinuttrykket for GJA1 med en isoform på 50-55 kDa reduseres med økende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjon, og denne reduksjonen er størst for B3 WT cellelinjen som inneholder PAX6.

B3 3.4 viser generelt høyest proteinuttrykk for GJA1 43 kDa isoformen ved alle stimuleringene sammenlignet med B3 WT (*Figur 4.18 C*). For B3 3.4 cellelinjen er proteinuttrykket relativt likt for de ustimulerte cellene og stimulering med 0,2 mM og 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, derimot reduseres uttrykket kraftig etter stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. GJA1-proteinuttrykket i B3 WT reduseres derimot betydelig ved økende konsentrasjon av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Intensiteten av GJA1 med isoform 50-55 kDa (*Figur 4.18 B*) og 43 kDa (*Figur 4.18 C*) ser dermed ut til å reduseres mest for B3 WT cellelinjene, sammenlignet med B3 3.4 ved de ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjonene. Dette kan i likhet med proliferasjons-assayene og luciferase reporter-gen-assayene tyde på at B3 WT cellelinjen som inneholder PAX6 er mere sensitiv for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enn B3 3.4 cellelinjen hvor PAX6 er fjernet. Dette indikerer at PAX6 virker negativt på proteinuttrykket i cellene når de utsettes for oksidativt stress.



## 5 Diskusjon

### 5.1 Verifisering av GR Knock out

Denne oppgaven startet med å undersøke om GR var fjernet fra GR KO mutantene ved bruk av CRISPR-Cas9 teknologien. GR KO cellelinjene som ble brukt i denne oppgaven ble gjennom WB vist å mangle  $\alpha$ -GR isoformen med en MW på 97 kDa. Alle GR KO cellelinjene så likevel ut til å ha et GR-bånd med en lavere MW. Det er usikkert hva dette lavere båndet var, og eventuelt hva det utfører av GRs funksjoner dersom det er en isoform av GR. I tillegg viste de utvalgte cellelinjene en mutasjon i GR sekvensen. Gjennom forsøkene ble GR KO klonene funksjonelt testet ved stimulering med Dex. For å vurdere om det var vellykkede GR KO cellelinjer, vil jeg nå kort ta for meg forsøkene hvor det er studert om GR KO cellelinjene inneholder en GR isoform som er ligandresponsiv. Forsøkene med Dex stimulering vil bli omtalt mer detaljert senere i diskusjonen.

Gjennom forsøkene i denne oppgaven ser det ut til at to av GR KO klonene (B3 WT C9 og B3 3.4 G9) er mer lovende enn de andre GR KO klonene (B3 WT D10 og B3 3.4 C12), da de viser seg å være mindre responsiv for Dex både i proliferasjon og induksjon av GILZ-ekspressjon. Likevel var resultatene for proliferasjon og induksjon av GILZ ikke helt konsistente, da disse GR KO klonene også så ut til å være responsiv for Dex i enkelte forsøk.

B3 WT C9 er den ene GR KO cellelinjen som så ut til å være mindre responsiv for Dex. Proliferasjonsstudiene for denne cellelinjen viste stor variasjon i respons på Dex. I fire av proliferasjons-assayene responderte cellelinjen ikke på Dex, mens i tre forsøk viste cellelinjen å være responsiv for Dex etter ett viss tidspunkt (mellom 20-35 timer). Når det gjaldt induksjonen av GILZ-ekspressjon ble denne økt i liten grad ved Dex stimulering for denne cellelinjen. Økningen i GILZ-uttrykket var mindre sammenlignet med B3 WT. Dette indikerer at GR uttrykket er redusert i cellelinjen, men at GR ikke er helt borte. I likhet ble det også vist en økning i GJA1-uttrykket når Dex ble tilsatt i denne cellelinjen, som kan indikere at GR ikke er helt fjernet fra denne cellelinjen. Dette indikerer at denne GR KO cellelinjen fortsatt inneholder en isoform av GR, som i en viss grad er responsiv for Dex.

Den andre GR KO cellelinjen av B3 WT, B3 WT D10, responderte derimot positivt på stimuli med Dex i alle forsøkene. I flere av forsøkene viste faktisk denne cellelinjen bedre respons enn B3 WT cellene. For denne cellelinjen økte også GILZ-uttrykket med Dex stimulering, og

det så faktisk ut til at cellelinjen responderte nesten like godt på Dex som B3 WT i to av parallellene. Ut ifra forsøkene ser det dermed ut som at denne GR KO klonen inneholder en GR-isoform som er responsiv for Dex.

B3 3.4 G9 er den andre GR KO cellelinjen som så ut til å være mindre responsiv for Dex. I likhet med B3 WT C9 viste også proliferasjonsstudiene for denne cellelinjen store variasjoner i respons på Dex. Cellelinjen responderte ikke på Dex-stimulering i tre av forsøkene, men det gjorde den derimot i de fire andre forsøkene. I tre av forsøkene hvor cellelinjen responderte på Dex, viste cellelinjen en økt vekst etter 18 til 30 timer. Dette kan i likhet med B3 WT C9 antyde at cellenes respons på Dex ikke inntre før det har gått en viss tid. Når det gjaldt induksjonen av GILZ-ekspresjon ble denne økt i liten grad ved Dex-stimulering. Induksjonen i GILZ-ekspresjonen var betydelig mindre sammenlignet med B3 3.4 cellelinjen. Dette indikerer at GR-uttrykket er redusert i cellelinjen, men at GR ikke er helt borte. I qPCR-forsøket med GJA1 som målgen, ble det derimot ikke vist noen endringer i GJA1-uttrykket når Dex ble tilsatt. Dette kan indikerer at GR er slått ut fra denne cellelinjen. Disse resultatene tyder på at denne GR KO cellelinjene i likhet med B3 WT C9 inneholder en GR-isoform som til en viss grad er responsiv for Dex.

B3 3.4 C12 GR KO cellelinjen responderte derimot positivt på Dex-stimulering i alle forsøkene. I flere av forsøkene viste denne cellelinjen faktisk bedre respons på Dex enn B3 3.4. Denne cellelinjen ble ikke inkludert i qPCR-forsøkene, dermed kan det ikke bekreftes noe angående induksjon i GILZ-ekspresjonen. I proliferasjons-assayene oppførte denne cellelinjen seg relativt likt som B3 WT D10 i den grad at alle forsøkene viste at cellelinjen responderte positivt på Dex-stimulering. Dermed kan det antas at GILZ-ekspresjon for denne cellelinjen også øker ved Dex-stimulering.

I denne oppgaven er to GR KO kloner av B3 WT og to av B3 3.4 studert. Det ser generelt ut til at en GR KO klone av begge cellelinjene er responsive for Dex, og i noen tilfeller faktisk mere responsive enn B3 WT og B3 3.4. Derimot viste de andre GR KO klonene seg å respondere mindre på Dex. Dette indikerer at GR KO cellelinjene B3 3.4 C12 og B3 WT D10 er ligandresponsive, mens GR KO cellelinjene B3 3.4 G9 og B3 WT C9 ikke i betydelig grad responderer på Dex.

Det er blitt vist at den kortere GR $\alpha$ B isoformen er mer responsiv for glukokortikoider og mer sensitiv for degradering av proteosomer enn den lengre GR $\alpha$ A-isoformen (16). Dette kan forklare hvorfor noen av GR KO cellelinjene responderer mer på Dex enn B3 WT og B3 3.4 som inneholder GR. Dette kan tyde på at GR KO cellene eller i hvert fall noen av cellene (B3 WT D10 og B3 3.4 C12) fortsatt inneholder den kortere GR $\alpha$ B-isoformen.

## 5.2 Proliferasjon ved tilsetning av Dex

B3 WT og B3 3.4, i tillegg til noen av GR KO cellelinjene som viste seg å være responsive for Dex, responderte alle ved å øke proliferasjonen. Dette samsvarer med hva Petersen og kollegaer har funnet. De studert effekten av Dex på dyrkede linseepitelceller fra mennesker med tanke på blant annet proliferasjon, apoptose, og oksidativt stress (29). Linseepitelcellene ble stimulert med Dex i 24 timer. Kvantitativ bestemmelse av celleproliferasjon viste en økning i antall Ki-67 positive celler i linseepitelceller fra menneske ved eksponering av 0,1  $\mu$ M (= 100 nM) Dex i 24 timer. Ki-67 er et gen som er forbundet med celleproliferasjon. I studiet ble det også forsøkt høyere Dex konsentrasjoner (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M og 100  $\mu$ M), men disse viste ikke en signifikant effekt på celleproliferasjonen (29).

Det er forventet at både B3 3.4 og B3 WT som inneholder GR er responsive for Dex, som resulterer i endret proliferasjon etter tilsetning av Dex. Men overraskende viste B3 3.4 som ble stimulert med 100 nM Dex en liten reduksjon i vekst (*Figur 4.4*). Dette ble bekreftet av to repetisjoner av dette forsøket (ingen induksjon eller svak reduksjon ved tilsetning av Dex). Det ble observert en redusert proliferasjon for B3 3.4, som kan indikere at PAX6 i kombinasjon med aktivert GR, er vesentlig for en økt proliferasjon. Likevel viste den ene B3 3.4 GR KO cellelinjen (B3 3.4 C12) en økt proliferasjon ved Dex-stimulering. Dette tyder på at PAX6 ikke er nødvendig for økt proliferasjon i kombinasjon med den GR-isoformen som er til stede i GR KO cellelinjene, som viser seg å være responsiv for Dex.

Tilstedeværelse av PAX6 i linse epitelcellene viste jevnt over en litt bedre vekst enn for cellene hvor PAX6 er slått ut. Proliferasjonen til B3 WT som inneholder PAX6 og GR viser generelt høyere proliferasjonshastighet, sammenlignet med B3 3.4 hvor PAX6 er slått ut. Dette var tilfellet både i nærvær og fravær av Dex (*Figur 4.4 A*). Dette kan tyde på at tilstedeværelse av PAX6 øker proliferasjonen til cellene. Til sammenligning viste den ene GR KO cellelinjen B3 WT D10 (med PAX6) generelt bedre vekst enn GR KO cellelinjene for B3

3.4 (uten PAX6). Dette samsvarer med en studie utført av Madhavan og kollegaer (39). De har studert Pax6 sin rolle i linseregenerering hos salamandere, hvor de viste at nedregulering av Pax6 hemmet proliferasjonen. Et annet studie av glioblastoma cellelinjer utført av Hegge og kollegaer viste derimot at PAX6 KO celler prolifererer i høyere hastighet sammenlignet med B3 WT hvor PAX6 er til stede (49). Dette indikerer at effekten PAX6 har på celleproliferasjonen er vevs-spesifikk, og vil kunne variere mellom ulike celletyper og vev.

### 5.3 Protein stabilitet

Proteinuttrykket for GR ble studert i cellelinjene som var stimulering med Dex i tre døgn. Ved bruk av WB ble det vist et redusert proteinuttrykk av GR etter Dex-stimuleringen. Det ble sett en reduksjon i GR-ekspressjonen allerede etter stimulering med 20 nM Dex. Dette samsvarer blant annet med noen lignende studier gjort av andre. Et tidligere studie utført av Celojevic og kollegaer med humane linse epitelcellelinjer, viste at eksponering med 100  $\mu$ M Dex i 24 timer medførte en signifikant reduksjon i GR-ekspressjonen (50). Et annet studie utført av He og kollegaer, viste at stimulering med 100 nM Dex i 24 timer reduserte signifikant innholdet av GR-protein i BeWO-celler (humane choriokarsinomer fra morkake) (46). Ved bruk av WB ble det vist en redusert GR-ekspressjon sammenlignet med ustimulerte celler (46).

B3 cellelinjene i denne oppgaven viste en doseavhengig nedregulering av GR etter Dex-stimulering. Dette samsvarer med et studie gjort av Pujols og kollegaer som har studert to humane isoformer av GR, GR $\alpha$  og GR $\beta$  i respiratoriske epitelceller (51). De viste en nedregulering av begge isoformene ved Dex-stimulering, på en doseavhengig måte. En nedregulering av GR etter Dex-stimulering er et tegn på at GR er aktivert. Når Dex bindes til GR, blir Dex-GR komplekset translokert fra cytoplasma til kjernen hvor den utfører sin funksjon som transkripsjonsfaktor (50;51). En nedregulering av GR-proteinuttrykket i WB etter Dex-stimulering viser at det er en aktiv GR-isoform til stede i cellene som aktiveres, noe som er et tegn på at stimuleringen har virket. Stimulering med Dex viste seg derimot ikke å ha noen effekt på protein stabiliteten for PAX6.

Protein stabiliteten til GR og PAX6 i cellelinjene ble også studert etter stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Protein stabiliteten for GR etter stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, viste seg å være doseavhengig. En konsentrasjon på 0,2 mM og 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viste seg å ikke påvirke proteinuttrykket av GR i

betydelig grad. I motsetning ble proteinuttrykket redusert ved stimulering av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i en konsentrasjon på 0,8 mM. Protein stabiliteten til PAX6 så ut til å bli mer påvirket av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sammenlignet med GR. Proteinuttrykket av PAX6 så ut til å bli redusert allerede etter stimulering med 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, og ble videre redusert parallelt med økende konsentrasjon av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dette samsvarer med studier hvor oksidativt stress har vist å føre til undertrykkelse av PAX6 (41;43).

## 5.4 Påvirkning ved oksidativt stress

Øynene utsettes for oksidativt stress. Det er rapportert at oksidativt stress kan påvirke PAX6 og GR i andre vev (49;52). I denne oppgaven ble det studert hvordan oksidativt stress påvirker normale funksjoner som vekst og overlevelse til linse-epitelcellene, og om tilstedeværelse eller fravær av PAX6 og/eller GR har betydning.

Proliferasjonen til cellelinjer med tilstedeværelse eller fravær av PAX6 og eller/GR ble studert under oksidativt stress, i form av tilsetning av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. I proliferasjons-assay utført i denne oppgaven med titrering av ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjoner, viste den laveste H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjonen (0,2 mM), en økt proliferasjonshastighet i noen av cellelinjene sammenlignet med ustimulerte celler. Derimot viste den høyeste H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjonen (0,8 mM) en negativ proliferasjon i de fleste cellelinjene, som tyder på vekststans og celledød.

Nivået av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avgjør hvilke cellulære responser som oppstår, om det vil oppstå et såkalt oksidativt eustress hvor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kan spille en positiv rolle i redoks signalering eller oksidativt destress hvor redoks signaleringen forstyrres (53). Oksidativt eustress er H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasjoner i fysiologiske områder som fremmer normale prosesser til adaptive stressresponser, som signalsubstans, proliferasjon, og migrering. Oksidativt destress er derimot høyere konsentrasjoner som fremkaller inflammatoriske responser, og til slutt vekststand og celledød (53). Dette kan forklare hvorfor tilsetning av 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> førte til økt proliferasjon av cellene i denne oppgaven, mens en konsentrasjon på 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> førte til vekststans og død for de fleste cellene.

Ohguro og kollegaer studerte effekten av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-eksponering på proliferasjon og overlevelse for linse epitelcellelinjer fra kanin (27). Det ble vist at en høy konsentrasjon (1 mM) førte til celledød, mens lavere nivåer av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 nM til 1 µM) stimulerte proliferasjonen og førte dermed til økt proliferasjon. Konsentrasjonene 1 nM til 1 µM med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viste en

doseavhengig økning i celledødel (27). I likhet med deres studie viste også forsøkene i denne oppgaven at en lav H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjon fører til økt vekst, mens en høy konsentrasjon medfører celledød.

PAX6 ble vist å spille en rolle i hvordan cellene reagerer på de ulike mengdene av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indusert oksidativt stress. For B3 3.4 cellelinjene hvor PAX6 er fjernet, viste cellene en økt proliferasjon ved høyere konsentrasjon av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sammenlignet med B3 WT cellelinjene hvor PAX6 er til stede. Konsentrasjonene 0,2 mM og 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viste for B3 3.4 cellelinjene en økt proliferasjon (*Figur 4.6*). Derimot ble det for B3 WT cellelinjene vist at en konsentrasjon på 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduserte vekst sammenlignet med ustimulerte celler (*Figur 4.5*). Dette tyder på at mangelen på PAX6 fører til at cellene blir mer motstandsdyktige for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, altså oksidativt stress. Dette samsvarer med det Hegge og kollegaer tidligere har vist. De har vist at PAX6 KO glioblastomcellelinjer er mer motstandsdyktig for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indusert oksidativt stress enn villtypecellene hvor PAX6 var til stede (49).

Som tidligere nevnt viste proliferasjons-assayene med titrering av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at B3 3.4 stimulert med de ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjonene generelt viste bedre vekst sammenlignet med B3 WT cellelinjen. Den største forskjellen ble sett ved stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hvor denne stimuleringen førte til redusert vekst for B3 WT (*Figur 4.5*), i motsetning til B3 3.4 hvor denne konsentrasjonen førte til økt vekst sammenlignet med ustimulerte celler (*Figur 4.6*). Imidlertid var denne forskjellen ikke like tydelig i proliferasjons-assayene hvor cellene ble stimulert med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i kombinasjon med Dex, i tillegg til 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene. Ved stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viste begge cellelinjene en hemmet proliferasjon sammenlignet med de ustimulerte cellene (*Figur 4.7 og 4.8*). Dette fører til at det er usikkert om B3 3.4 cellelinjen faktisk tåler oksidativt stress bedre, og dermed om mangelen på PAX6 fører til at cellene blir mer motstandsdyktig for oksidativt stress. De initiale forsøkene med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> titrering, og forsøkene med kombinasjonen av Dex og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ble imidlertid utført med 2-3 måneders mellomrom med to ulike batcher av cellelinjer. Dette kan ha en innvirkning, noe jeg vil komme mere inn på senere i diskusjonen.

### 5.4.1 Celleproliferasjon under oksidativt stress og aktivering av GR

For de fleste cellelinjene medførte tilsetning av 100 nM Dex til økt proliferasjon sammenlignet med de ustimulerte cellene. Derimot viste tilsetning av 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en redusert vekst. Ved å tilsette både Dex og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> var det ønskelig å se om Dex (dvs aktivering av GR) kan nøytralisere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sin negative effekt på veksten, eller om H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kan nøytralisere Dex sin positive effekt på veksten. For B3 WT ble det vist at Dex ikke vil ha noen effekt på den negative proliferasjonen forårsaket av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Figur 4.7 B*). Det ble derimot vist en ytterligere reduksjon i proliferasjonen for B3 WT GR KO cellelinjen (*Figur 4.7 C og D*). B3 WT GR KO cellelinjene er vist å mangle 97 kDa isoformen av GR, men som tidligere nevnt har denne sannsynligvis en kortere isoform av GR. Dette tyder på at 97 kDa isoformen har en viss beskyttende effekt for oksidativt stress, eventuelt at en mindre isoform av GR som er til stede i GR KO (som er Dex responsiv) gjør cellene mer responsive for oksidativt stress.

For B3 3.4 cellelinjene viste verken B3 3.4 eller B3 3.4 C12 en endring i proliferasjonen når Dex ble tilsatt sammen med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Figur 4.8 B og C*). For B3 3.4 G9 ble det vist en ytterligere reduksjon i proliferasjonen når Dex ble tilsatt (*Figur 4.8 D*). I likhet med B3 WT GR KO cellelinjene, kan dette indikere at GR-isoformen til stede i B3 3.4 G9 gjør cellene mer følsom for oksidativt stress, eventuelt at GR med en kDa verdi på 97 kDa har en liten beskyttende effekt. Likevel sees ikke dette for B3 3.4 C12 som responderer relativt likt som B3 3.4 på stimulering med Dex i kombinasjon med oksidativt stress. Denne GR KO cellelinjen har i likhet med de andre GR KO cellelinjene vist å ikke inneholde GR-isoform på 97 kDa. Disse resultatene indikerer at effekten av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ser ut til å være dominerende i cellelinjene, da proliferasjonskurvene for stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i kombinasjon med Dex er tilnærmet lik kurven for stimulering med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alene. Aktivering av GR kan dermed ikke oppveie for effekten av oksidativt stress. Det ser heller ikke ut som om fravær av PAX6 i disse forsøkene har noen betydning, siden resultatet er tilnærmet likt for B3 WT og B3 3.4 cellene.

## 5.5 Funksjonen til PAX6 og GR ved bruk av qPCR og reporter-gen-assay

Funksjonen til PAX6 og GR ble studert ved bruk av målgenene GJA1 og GILZ i Real time qPCR og luciferase reporter-gen-assay. Cellene ble stimulert med 100 nM Dex i 4 timer før RNA høsting til qPCR. Gupta og kollegaer har utført RT-PCR med B-3 celler hvor GILZ ekspresjonen ble studert etter Dex-stimulering over en periode på 32 timer (34). GILZ uttrykket var høyest etter stimulering med Dex i 4 timer, og ble redusert etter 16 timer. I denne oppgaven ble derfor cellene stimulert med Dex i 4 timer før RNA høsting.

Gjennom qPCR-forsøkene hvor GILZ ble brukt som målgen, ble det bekreftet at GILZ er et målgen for GR. B3 WT og B3 3.4 cellelinjene som begge inneholder GR, viste den høyeste induksjonen av GILZ. Gupta og kollegaene viste en økt GILZ-ekspresjon på 4 til 10-fold i humane linseepitel B-3 celler stimulert med Dex i 2 til 32 timer, sammenlignet med ustimulerte celler. Høyest GILZ-uttrykk, med en foldverdi på rundt 10, ble vist etter 4 timer (34). I denne oppgaven viste B3 WT og B3 3.4 som begge inneholder GR en foldverdi på rundt 8, i to av tre paralleller (*Tabell 4.3*). Unntaket var parallell 1 for B3 WT som viste en foldverdi på 18 etter Dex-stimulering. Den økte verdien i parallell 1 kan ha ulike årsaker, blant annet var passasjennummeret for parallell 1 lavere enn de to andre parallellene. Alle parallellene var fra samme celletining, men parallell 1 ble utført ett par uker før parallell 2 og 3. En annen årsak kan være ulike Dex Stock-løsninger, eller at Dex stock-løsningen som ble tilsatt cellene var oppbevart i ulik tidsperiode. De to siste parallellene ble utført i et nærmere tidsrom, innenfor 1-2 uker. Dermed ble samme Dex Stock-løsning brukt for disse to parallellene.

GR KO cellelinjene hvor GR er forsøkt fjernet ved bruk av CRISPR-Cas9 teknologien viste en induksjon i GILZ-ekspresjonene etter tilsetning av Dex. GILZ-uttrykket var betydelig lavere i GR KO cellelinjene enn i B3 WT og B3 3.4 cellelinjene. Dette indikerer at den ligandavhengige aktiviteten til GR er redusert i GR KO cellene, men induksjonen av GILZ når Dex ble tilsatt, tyder på at GR ikke er helt borte. I likhet med proliferasjons-assayene hvor flere av GR KO cellelinjene endret vekst under Dex-stimulering, viser også qPCR-resultatene at cellene er responsive for Dex, men ikke i like stor grad som B3 WT og B3 3.4. Det var ønskelig å studere proteinnivået av GILZ i cellelinjene, for å kunne bekrefte resultatene i qPCR. Det ble forsøkt utført WB av GILZ, men fargingen ble mislykket. Dersom mer tid



hadde vært tilgjengelig og eventuelt flere GILZ-antistoffer tilgjengelig, ville det vært interessent å ha undersøkt proteinuttrykket i disse cellene.

qPCR-resultatene hvor GJA1-ekspressjonen ble detektert viste at B3 WT cellene (som inneholder PAX6) hadde høyere nivå av GJA1-transkripter enn B3 3.4 cellelinjen der PAX6 er slått ut. WB av B3 WT og B3 3.4 cellelinjene bekreftet at proteinuttrykket av GJA1 generelt var høyest uttrykt i B3 WT cellelinjen. Dette bekrefter at GJA1 er et målgen for PAX6. Overraskende viste B3 3.4 cellelinjen stimulert med Dex en større reduksjon i GJA1-uttrykket, sammenlignet med de ustimulerte cellene i qPCR-forsøket. For B3 3.4 cellelinjen hvor GR er fjernet, ble det ikke sett en endring i GJA1-uttrykket under Dex-stimulering. B3 WT cellelinjene som har både PAX6 og GR, viser kun en minimal påvirkning under Dex-stimulering. Dette tyder på at GJA1 ikke er et målgen for GR i seg selv, men at GR muligens kan ha en represserende effekt på GJA1-uttrykket i celler som mangler PAX6 (B3 3.4). Disse resultatene bekrefter at PAX6 regulerer uttrykket av GJA1, og litt overraskende ser det ut til at GR også påvirker uttrykket. Men det ser ikke ut til å være en synergisme mellom GR og PAX6, siden PAX6 ser ut til å påvirke uttrykket positivt, mens GR muligens påvirker uttrykket negativt (spesielt når PAX6 ikke er tilstedeværende).

### **5.5.1 Transfeksjon PAX6 og GR med og uten Dex**

GJA1 er som tidligere nevnt et av målgenene til transkripsjonsfaktoren PAX6. Gjennom transfeksjons-assay ble aktiviteten av GJA1 studert under påvirkning av transkripsjonsfaktorene PAX6 og GR, både med og uten tilsetning av Dex. Det ble gjennom forsøkene i denne oppgaven vist at PAX6 øker aktiviteten til GJA1-promotoren, og fungerer dermed som en aktivator for promotoren. Dette stemmer med tidligere forsøk hvor det er blitt vist at PAX6 binder GJA1-promotoren (Mikkola, upublisert). GJA1-promotoren ble vist å være mest aktiv i B3 WT cellelinjen som inneholder både GR og PAX6. B3 3.4 cellelinjen hvor PAX6 er fjernet, viser GJA1-promotoren seg å være mindre aktiv sammenlignet med B3 WT. Likevel ble det vist aktivitet fra GJA1-promotoren i cellene hvor PAX6 er fjernet, noe som indikerer at andre transkripsjonsfaktorer også påvirker transkripsjon fra denne promotoren. Når GR fjernes fra B3 WT cellelinjen (B3 WT C9) ble det i de fleste forsøkene vist et redusert GJA1-uttrykk sammenlignet med B3 WT. Dette kan tyde på at tilstedeværelse av GR øker aktiviteten av GJA1-promotoren. Likevel så ikke tilsetning av Dex ut til å noen

stor effekt på aktiviteten av GJA1-promotoren ved tilsetning av Dex. Dette kunne man forventet i cellene som inneholdt GR, hvis GR skulle øke GJA1-promotoraktiviteten.

GILZ er et målgen for GR, og ble dermed brukt som målgen for å studere funksjonen til GR og PAX6 i cellelinjene. De tre GILZ-promotorene brukt i denne oppgaven ga svært lave luciferaseverdier sammenlignet med GJA1-promotoren. De så heller ikke ut til å være responsive for Dex, da foldverdiene ikke økte betydelig i cellene som inneholder GR etter tilsetning av Dex. Dette tyder på at de benyttede promotorene ikke inneholdt GR-bindingsseter eller bindingsseter for andre transkripsjonsfaktorer som vil gi høy aktivitet i B3 cellelinjen. GILZ- (927 bp) promotoren var den av de tre promotorene som viste litt aktivitet. B3 WT cellelinjen viste høyest aktivitet for GILZ (927 bp) i de ustimulerte cellene. Ved tilsetning av Dex ble uttrykket redusert fra 9 til 5,4 Fold, som indikerer at aktivering av GR påvirker GILZ-promotoren negativ (*Tabell 4.10*). Dette er overraskende da GILZ er forventet å være et målgen for GR som får økt uttrykk ved GR-aktivering. Dette resultatet stemmer heller ikke med qPCR-resultatene, som viste en induksjon av GILZ-uttrykk ved Dex-stimulering (*Tabell 4.3*).

qPCR gir et bilde av de faktiske transkriptene av GILZ i cellene, altså mengde mRNA. Resultatene fra qPCR viser at stimulering med Dex gir økt mengde transkripsjon av GILZ-genet. Normalt styres transkripsjonen av et gen av en promotor, og en eller flere enhancere som samarbeider med promotoren. Både promotorer og enhancere kan binde transkripsjonsfaktorer og kofaktorer, og disse vil sammen føre til en nøyaktig regulering av genuttrykket til bestemt tid og sted. I luciferase reporter-gen-assayet i denne oppgaven er det kun brukt en liten del av GILZ-promotoren, noen hundre basepar (512 bp, 927 bp eller 1264 bp) rundt transkripsjonsstartstedet. Dermed kan viktige deler av promotoren mangle i plasmidene brukt i denne oppgaven. I tillegg mangler det input fra alle enhancerene som normalt sett skal regulere denne promotoren. I et reporter-gen-assay kobles en promotorbit foran et reporter-gen (luciferase), dermed vil uttrykket av luciferase kun reflektere reguleringen som skjer via bindingssetene som befinner seg på den klonede promotorbiten. Promotorsekvensen til det humane GILZ-genet har tidligere vært studert, og det har blitt identifisert flere funksjonelle GRE i promotoren (54). GILZ-promotorbitene brukt i luciferase reporter-gen-assayene i denne oppgaven, kan se ut til å ikke inneholde bindingsseter, GRE, for transkripsjonsfaktorer som fører til høy transkripsjon i B3 cellene. Dersom GILZ-

promotorbiten inneholder GR bindingssete, kan det se ut til at det er et negativt GRE som fører til at GR hemmer transkripsjonen fra dette elementet.

Resultatene fra luciferase reporter-gen-assayet viste at når PAX6 fjernes fra B3 WT cellelinjen (B3 3.4) ble aktiviteten av GILZ (927 bp) redusert fra 9 til 2 fold, og det er denne cellelinjen som viste lavest aktivitet av GILZ (*Tabell 4.10*). Dette indikerer overraskende at PAX6 er nødvendig for aktivisering av denne GILZ-promotoren. GILZ er kjent som et gen regulert av GR, dermed er det uventet at PAX6 skal kunne regulere aktiviteten av GILZ-promotoren. Resultatene fra transfeksjonen og luciferase reporter-gen-assayene i denne oppgaven var vanskelig å tolke for hver cellelinje, grunnet varierende resultater. For å kunne si noe med sikkerhet, må forsøkene gjentas flere ganger.

I denne oppgaven ble cellene stimulert med Dex i 24 timer. Gupta og kollegaer har observert en signifikant økning i luciferaseaktiviteten til reporter-gener etter stimulering med 0,1  $\mu$ M Dex allerede etter 2 timer, som ble opprettholdt over en 24 timers periode i humane linseepitelcellelinjer (35). De transfekterte linse epitelcellelinjer (B3) med plasmidet pGRE, og målte dermed direkte GR sin evne til å binde sine bindingsseter (GRE) i DNA etter stimulering med Dex i 0,25 til 24 timer. Deres resultat indikerer at glukokortikoidresponsen opptrer tidlig i cellene, og en endring i genuttrykk kan allerede forekomme etter 2 timer med Dex-stimulering. Det ble ikke sett så store endringer i genuttrykket etter 2 timer, kun litt over 1 fold. Stimulering i 4-24 timer ga derimot 3-6 folds økning sammenlignet med tom vektor, hvor 24 timer ga høyest genuttrykk. Endringen i foldverdiene ble derimot ikke betraktelig endret mellom 8 timer og 24 timer med Dex stimulering (35). Det kan ikke utelukkes at en økt aktivitet av GILZ-reporteren kunne vært sett dersom cellene hadde vært stimulert i for eksempel 8 timer med Dex. Det kan ikke avkreftes at aktiviteten av GILZ kan ha avtatt på tidspunktet 24 timer, som var lengden cellene ble stimulert med Dex i reporter-gen-assayene i denne oppgaven. For å si noe med sikkerhet må det utføres studier hvor aktiviteten av GILZ-reporteren studeres etter stimulering med Dex i flere tidsintervaller.

## 5.6 Funksjonen til transkripsjonsfaktorene PAX6 og GR under oksidativt stress

Funksjonen til PAX6 og GR som transkripsjonsfaktorer under oksidativt stress ble studert i denne oppgaven gjennom luciferase reporter-gen-assay. I et studie utført av Kim og kollegaer er H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vist å aktivere reporter-genen på en dose- og tidsavhengig måte i rotte 2-fibroblastceller (48). De brukte reporter-plasmidet pSRE-Luc. Deres studie viste høyest økning i luciferaseaktiviteten etter 2 timer (3,5 gangers økning), og en redusert luciferaseverdi etter 8 timer. Tilsetning av en høyere dose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hvor det ble forsøkt med doser opptil 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ga en høyere luciferaseverdi (48). I denne oppgaven ble derfor funksjonen til transkripsjonsfaktorene PAX6 og GR studert ved ulike konsentrasjoner og ulike tidsperioder med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Reporter-genet som ble brukt var GJA1. For både B3 WT og B3 3.4 økte aktiviteten av GJA1-promotoren etter 1 time (*Figur 4.15*). Dette indikerer at H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> virker positivt på aktivering av GJA1-promotoren ved dette tidspunktet. B3 WT viste generelt høyest aktivering av GJA1-promotoren, noe som også er observert i tidligere forsøk i denne oppgaven. Dette bekrefter at PAX6 binder denne promotoren. Mer interessant er det at B3 3.4 cellelinjen viste tilnærmet like høy aktivitet ved 2 og 4 timer som etter 1 time, mens for B3 WT cellelinjen ble aktiviteten redusert ved 2, 4 og 8 timer. Dette indikerte at aktiviteten på GJA1-promotoren så ut til å være mindre påvirket av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i B3 3.4 cellene enn den var i B3 WT cellene, i alle fall de første 4 timene. Det kan derfor se ut som det er PAX6-aktiviteten på GJA1-promotoren som blir påvirket negativt av oksidativt stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), siden promotoraktiviteten holdes konstant over lengre tid i B3 3.4 cellene (som mangler PAX6). Dette indikerer at funksjonen til PAX6 som transkripsjonsfaktor på GJA1-promotoren (og antagelig andre promotorer også) svekkes under oksidativt stress. Gjennom WB ble det også vist at proteinkonsentrasjonen av PAX6 ser ut til å reduseres allerede med den laveste H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjonen (0,2 mM) (*Figur 4.5 E*).

I denne oppgaven ble også funksjonen til PAX6 (og GR) studert under økende mengde oksidativt stress, med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjoner på 0,2 mM, 0,4 mM og 0,8 mM. Promotoraktiviteten av GJA1 i B3 WT cellelinjen ble redusert med økende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjon, som tyder på at funksjonen til PAX6 (og GR) reduseres under økende dose oksidativt stress (*Figur 4.16*). For B3 3.4 cellelinjen hvor PAX6 er fjernet, så det ut til at promotoraktiviteten til GJA1 ble påvirket mindre under økende mengde oksidativt stress. Dette bekrefter observasjonen gjort i tidskurveforsøket, som viste at cellene som ikke

inneholder PAX6 er mindre sensitiv for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Figur 4.15*). B3 3.4 cellene viser som nevnt høyere toleranse for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, men cellene viser kun en høyere toleransen til de blir utsatt for en viss mengde oksidativ stress. Dersom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjonen blir for høy, vil det også føre til negative konsekvenser for B3 3.4 cellene. Stimulering med 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> har i denne oppgaven ført til negative konsekvenser for cellene både i form av lav transkripsjonsaktivitet og degradering av proteiner/celledød (*Figur 4.6 E*).

For å se om GR kan påvirke PAX6-proteinets regulering av GJA1-promotoren, eventuelt regulere denne promotoren alene under oksidativt stress, ble også reporter-gen-assay utført for GR KO cellelinjene B3 WT C9 og B3 3.4 G9. I likhet med transfeksjons-assayet for B3 WT og B3 3.4 viste også B3 WT C9 generelt høyere aktivitet av GJA1, som er forventet da B3 WT C9 inneholder PAX6. Begge GR KO cellelinjene viste derimot relativt like foldverdier (*Tabell 4.12*). I likhet med B3 WT viste også GR KO cellelinjene av B3 WT (C9) redusert GJA1-uttrykk ved en høyere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjon. Dette indikerer at aktiviteten til transkripsjonsfaktoren PAX6 reduseres under økt oksidativt stress, og at nærvær eller fravær av GR ikke har noe å si for aktiviteten på GJA1-promotoren under disse betingelsene. GR KO cellelinjen B3 3.4 G9 så ut til å være mer følsom for økende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjoner (*Figur 4.17*), sammenlignet med B3 3.4 cellelinjen (*Figur 4.16*). Dette og tidligere forsøk i denne oppgaven indikerer at celler uten PAX6 er mindre følsomme for oksidativt stress, enn cellene hvor PAX6 er til stede. Men for aktiviteten på GJA1-promotoren ser denne forskjellen ut til å forsvinne når GR fjernes, og cellene ser ut til å bli mer følsomme for oksidativt stress. Dette ble sett for B3 3.4 G9 cellelinjen som verken inneholder GR eller PAX6, som viser økt sensitivitet for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sammenlignet med B3 3.4 som fortsatt inneholder GR. Dette forsøket ble kun utført én gang i denne oppgaven, og må gjentas før dette kan bekreftes.

## 5.7 Mulige feilkilder

Det er flere faktorer som kan ha bidratt til ulike resultater i de ulike repetisjonene av hvert forsøk, og at noen av de ulike forsøkene kunne tolkes ulikt. Noen av disse faktorene er ulikt passasjenummer for cellelinjene, ulik batch/tining av cellelinjer, hvor lenge Dex Stock-løsningen var oppbevart før bruk, fortykning av Dex/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> løsninger, naturlige variasjoner, eller ulik celletetthet i hver brønn ved start.

I de ulike forsøkene og de gjentakende repetisjonene, hadde cellene ulikt antall passasjer (alder) mellom hver repetisjon. Det er mulig at dette kan ha påvirket resultatene. Et høyt antall passasjer kan blant annet påvirke veksthastighet, respons på stimuli og proteinuttrykk (55;56).

Bruk av ulike cellebatcher/ulike tinte celler kan også være en årsak til ulik proliferasjon med samme stimuli mellom de ulike forsøkene. Proliferasjons-assayene foregikk over flere måneder, og det ble derfor benyttet mellom to og tre ulike batcher/tinte celler for hver cellelinjene. Proliferasjons-assayene hvor cellene ble stimulert med 100 nM Dex, ble utført med en annen batch tinte celler enn proliferasjons-assayene hvor cellene ble stimulert med Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. B3 3.4 cellelinjen responderte tydelig ulikt på Dex-stimulering mellom disse to forsøkene. I proliferasjons-assayet med Dex-stimulering viste ikke B3 3.4 cellelinjen økt proliferasjon ved Dex-stimulering. Derimot viste det senere proliferasjons-assayet med Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en betydelig økt proliferasjon ved Dex-stimulering. Det samme ble sett for stimulering med 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hvor denne stimuleringen viste betydelig bedre vekst i B3 3.4 cellelinjene i proliferasjons-assayet med titrering av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sammenlignet med proliferasjons-assayene når cellene ble stimulert med Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dette kan indikere at de ulike tinte cellebatchene har respondert ulikt på stimuleringene, og dermed har ført til ulike resultater.

Cellene ble stimulert med Dex og/eller H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, som det ble laget Stock-løsninger av. Det ble laget ny Stock-løsning av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hver gang cellene ble stimulert med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Eventuelle feil i fortykning kan også bidra til å forklare ulike resultater mellom de ulike forsøkene. Derimot ble det for de fleste forsøkene utført flere paralleller av samme forsøk, og dermed bør en eventuelt stor feil i fortykning blitt oppdaget ved sammenligning av de andre parallellene. Dex stock-løsningene hadde en holdbarhet på 14 dager, oppbevart mørkt og kjølig (4 °C). I de ulike repetisjonene kan denne løsningen ha vært oppbevart i ulikt antall dager før bruk. Dette er årsaker som både kan ha påvirket variasjon i vekst for de ulike proliferasjons-assayene, og

ulike resultater mellom de ulike forsøkene i denne oppgaven. På grunn av begrenset holdbarhet, og at de fleste repetisjonene av forsøkene foregikk over en lengre tid, ble det derfor brukt ulike Dex stock-løsninger. I noen av forsøkene ble samme stock-løsning brukt i to paralleller, men det var ingen forsøk hvor samme stock-løsning ble brukt for alle tre parallellene.

En annen mulig feilkilde som kan ha ført til variasjon i resultatene er forskjellig celletetthet (konfluent) i starten av forsøkene. I proliferasjons-assayene avbildet IncuCyte-maskinen bilder av brønnene, hvor det ble kontrollert om det var omtrent lik celletetthet mellom de ulike brønnene og de ulike parallellene av samme forsøk. Store forskjeller i celletettheten ved start ville dermed sannsynligvis blitt oppdaget i proliferasjons-assayene. I reporter-gen-assayene ble celletettheten etter utsåing kontrollert ved bruk av mikroskop. Det er dermed mer utfordrene å oppdage eventuelle forskjeller i tettheten av cellene mellom de ulike repetisjonene av luciferase reporter-gen-assayene. I qPCR-forsøkene hvor genuttrykkene ble studert, er også celletetthet en faktor som kan ha påvirket resultatene mellom de ulike parallellene. Dersom celletettheten blir for høy, kan det påvirke celledelingen og transkripsjonene til enkelte gener, som kan påvirke genuttrykket. I alle qPCR-forsøkene i denne oppgaven ble det derimot sådd ut et likt antall celler, og cellene var tilnærmet like lenge i inkubatorskap før de ble høstet. Før Dex-stimulering og høsting ble celletettheten kontrollert gjennom mikroskop.

Andre faktorer som kan påvirke blant annet celletettheten og cellenes evne til å dele seg er temperatur og CO<sub>2</sub> nivå. For de fleste forsøkene ble det utført tre paralleller, for å forhindre at faktorer som temperatur og CO<sub>2</sub>-nivå skulle påvirke resultatene.

En annen mulig feilkilde som kan forårsake uventede resultater, er dersom cellelinjene blir byttet om i eksperimentene. Dette kan for eksempel skje ved utsåing til 12-brønners brett til proliferasjons-assayene. For å trekke frem et eksempel i denne oppgaven hvor dette kunne vært et tilfelle, er for proliferasjons-assayene hvor B3 WT eller B3 3.4 i noen av repetisjonene responderte dårligere på Dex enn GR KO cellelinjene. Jeg anser dette likevel som lite sannsynlig i proliferasjons-assayene, da det ble gjort WB på samtlige av disse i ettertid og de stemte overens med tidligere WB på de samme cellelinjene.

## 5.8 Fremtidige aspekter

I denne oppgaven ble det benyttet CRISPR-Cas9 kloner hvor GR var forsøkt slått ut, og PAX6 var allerede bekreftet slått ut. WB viste at det fortsatt var noe igjen av GR i cellene, sannsynligvis en kortere isoform av GR, som til en viss grad så ut til å være responsiv for Dex. Det kunne vært interessant å undersøke hva som var til stede i disse cellene, og eventuelt undersøke hvilke av GR sine funksjoner den eventuelle isoformen har. En måte dette kan gjøres på er å bruke et mer spesifikt GR primærantistoff. For eksempel et primærantistoff spesifikt for GR $\beta$ , for eventuelt å kunne utelukke om denne er til stede. Det ville vært interessant å undersøke tilstedeværelse av GR $\alpha$ A og GR $\alpha$ B i GR KO klonene, for eksempel dersom det finnes et primærantistoff for å skille disse to isoformene.

Nye cellekloner hvor GR var fullstendig slått ut, hadde vært interessant å studere for å kunne bekrefte GR sin funksjon i disse forsøkene. Ved bruk av CRISPR-Cas9 teknologien kunne det vært forsøkt laget nye GR KO kloner hvor en større bit av GR ble deletert, for eksempel hele ekson 2 hvor startkodonet er.

Flere repetisjoner ville styrket validiteten til resultatene fra forsøkene som ble gjort. I tillegg ville det vært en fordel å få nok data til å kunne utføre statistiske beregninger for å kunne se om det faktisk er forskjeller.



## 6 Konklusjon

Det ble brukt seks cellelinjer i forsøkene. En cellelinje inneholdt både PAX6 og GR (B3 WT), en inneholder GR men mangler PAX6 (B3 3.4), to inneholder PAX6 men mangler GR (B3 WT C9 og B3 WT D10) og to inneholder hverken PAX6 eller GR (B3 3.4 C12 og B3 3.4 G9). Gjennom WB er GR $\alpha$  bekreftet slått ut i GR KO cellelinjene, men cellene så fortsatt ut til å inneholde en GR-isoform som i en viss grad ble vist å være responsiv for Dex.

Det ble gjort flere proliferasjons-assay for å undersøke om GR KO cellelinjene var responsive for Dex. Det var noen variasjoner i resultatene, men det så ut til at to av GR KO klonene (B3 WT D10 og B3 3.4 C12) fortsatt var responsive for Dex, noe som indikerer tilstedeværelse av en ligandresponsiv GR-isoform. Derimot viste de to andre GR KO klonene (B3 WT C9 og B3 3.4 G9) seg å være lite responsiv for Dex. Dette ble også delvis bekreftet gjennom qPCR. GR KO cellelinjene stimulert med Dex, viste alle en liten økning i GILZ-uttrykket. Dette viser at GR-uttrykket er redusert i cellene men ikke slått helt ut.

Tilstedeværelse av GR og PAX6 i cellelinjene ble vist å spille en rolle i veksten. Aktivert GR (ved stimulering med Dex), og tilstedeværelse av PAX6 i linsecellene førte til økt proliferasjon. Linse epitelcellelinjene ble påvirket av oksidativt stress. Når cellene ble utsatt for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indusert oksidativt stress, viste responsen i vekst seg å være doseavhengig. En mindre mengde oksidativt stress (0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) medførte ingen endringer eller en liten økning i proliferasjonen, mens en høyere mengde oksidativt stress (0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) medførte vekststans og celledød. Cellelinjene hvor PAX6 var fjernet var mer motstandsdyktige for oksidativt stress, sammenlignet med celler hvor PAX6 var til stede. Dette viste seg å gjelde både i en lengre tidsperiode og ved en høyere dose, før negative konsekvenser i form av lav transkripsjonsaktivitet og degradering av proteiner/celledød ble sett. Aktivering av GR viste seg og ikke ha betydelig påvirkning på celleproliferasjon under oksidativt stress.

## 7 Referansliste

1. Bouchard M, Schleiffer A, Eisenhaber F, Busslinger M. Pax genes: Evolution and function. *e LS* 2001.
2. Mansouri A, Hallonet M, Gruss P. Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Current Opinion in Cell Biology* 1996;8(6):851-7.
3. Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA. PAX genes: Roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochemical Pharmacology* 2007;73(1):1-14.
4. Muratovska A, Zhou C, He S, Goodyer P, Eccles MR. Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene* 2003;22(39):7989-97.
5. Wang Q, Fang WH, Krupinski J, Kumar S, Slevin M, Kumar P. Pax genes in embryogenesis and oncogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine* 2008;12(6a):2281-94.
6. Ramos KS, Nanez A. 2.05 - Introduction and Overview of Receptor Systems. I: McQueen CA, red. *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. Oxford: Elsevier; 2010. s. 71-80. Tilgjengelig fra:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846002050>
7. Shaham O, Menuchin Y, Farhy C, Ashery-Padan R. Pax6: a multi-level regulator of ocular development. *Prog Retin Eye Res* 2012;31(5):351-76.
8. Hall HN, Williamson KA, FitzPatrick DR. The genetic architecture of aniridia and Gillespie syndrome. *Human Genetics* 2019;138(8):881-98.
9. Cvekl A, Callaerts P. PAX6: 25th anniversary and more to learn. *Exp Eye Res* 2017;156:10-21.
10. Gehring WJ, Ikeo K. *Pax 6*: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends in Genetics* 1999;15(9):371-7.
11. Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K, Maekawa M. Concise Review: Pax6 Transcription Factor Contributes to both Embryonic and Adult Neurogenesis as a Multifunctional Regulator. *STEM CELLS* 2008;26(7):1663-72.
12. Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132(5):1033-44.
13. Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2006;102(1):11-21.
14. Schoneveld OJLM, Gaemers IC, Lamers WH. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 2004;1680(2):114-28.
15. Vitellius G, Trabado S, Bouligand J, Delemer B, Lombès M. Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling. *Annales d'Endocrinologie* 2018;79(3):98-106.
16. Gupta V, Wagner BJ. Search for a functional glucocorticoid receptor in the mammalian lens. *Experimental Eye Research* 2009;88(2):248-56.
17. Sulaiman RS, Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in the eye. *Steroids* 2018;133:60-6.
18. Yudit MR, Cidlowski JA. The Glucocorticoid Receptor: Coding a Diversity of Proteins and Responses through a Single Gene. *Molecular Endocrinology* 2002;16(8):1719-26.
19. Mitre-Aguilar IB, Cabrera-Quintero AJ, Zentella-Dehesa A. Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(1):1-10.

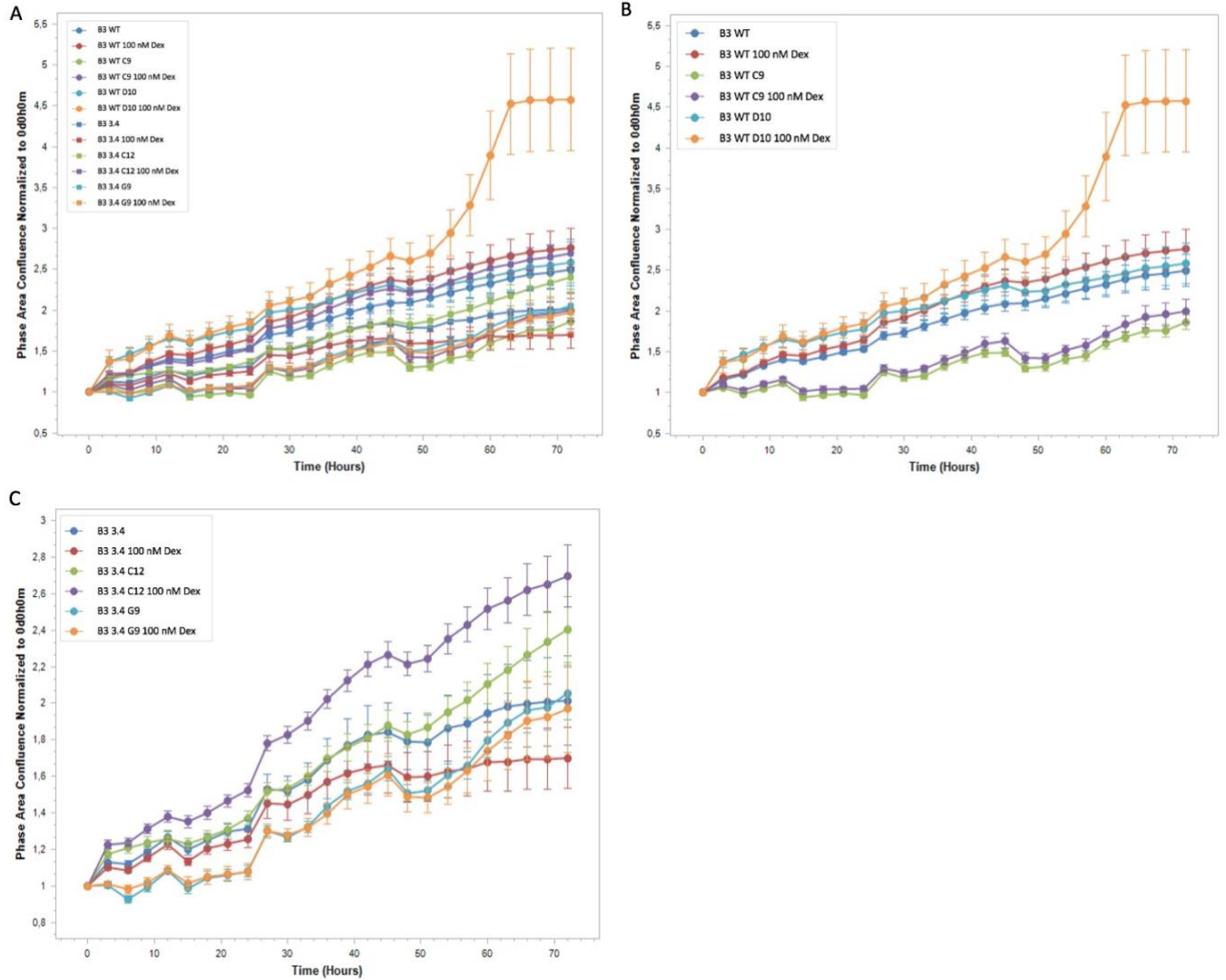
20. Panettieri RA, Schaafsma D, Amrani Y, Koziol-White C, Ostrom R, Tliba O. Non-genomic Effects of Glucocorticoids: An Updated View. *Trends Pharmacol Sci* 2019;40(1):38-49.
21. Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, et al. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2013;380(1):41-54.
22. Schaaf MJM, Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2002;83(1):37-48.
23. Graw J. The genetic and molecular basis of congenital eye defects. *Nature Reviews Genetics* 2003;4(11):876-88.
24. Vinson JA. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* 2006;13(3):151-62.
25. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2020;2020:9829176-.
26. LjoNes K, Berg K. Oksygen–venn eller fiende? *Bioingeniøren* 2010;4:6-13.
27. Ohguro N, Fukuda M, Sasabe T, Tano Y. Concentration dependent effects of hydrogen peroxide on lens epithelial cells. *British journal of ophthalmology* 1999;83(9):1064-8.
28. Berthoud VM, Beyer EC. Oxidative stress, lens gap junctions, and cataracts. *Antioxidants & redox signaling* 2009;11(2):339-53.
29. Petersen A, Carlsson T, Karlsson JO, Jonhede S, Zetterberg M. Effects of dexamethasone on human lens epithelial cells in culture. *Mol Vis* 2008;14:1344-52.
30. Hingorani M, Hanson I, van Heyningen V. Aniridia. *European Journal of Human Genetics* 2012;20(10):1011-7.
31. Ghosh KS, Chauhan P. Crystallins and Their Complexes. *Subcell Biochem* 2019;93:439-60.
32. Liu F, Wang L, Fu JL, Xiao Y, Gong X, Liu Y, et al. Analysis of Non-Sumoylated and Sumoylated Isoforms of Pax-6, the Master Regulator for Eye and Brain Development in Ocular Cell Lines. *Curr Mol Med* 2018;18(8):566-73.
33. Yudt MR, Cidlowski JA. Molecular Identification and Characterization of A and B Forms of the Glucocorticoid Receptor. *Molecular Endocrinology* 2001;15(7):1093-103.
34. Gupta V, Awasthi N, Wagner BJ. Specific activation of the glucocorticoid receptor and modulation of signal transduction pathways in human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(4):1724-34.
35. Gupta V, Galante A, Soteropoulos P, Guo S, Wagner BJ. Global gene profiling reveals novel glucocorticoid induced changes in gene expression of human lens epithelial cells. *Mol Vis* 2005;11:1018-40.
36. Ramaesh T, Ramaesh K, Leask R, Springbett A, Riley SC, Dhillon B, et al. Increased Apoptosis and Abnormal Wound-Healing Responses in the Heterozygous Pax6 +/- Mouse Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(5):1911-7.
37. Duncan MK, Kozmik Z, Cveklova K, Piatigorsky J, Cvekl A. Overexpression of PAX6(5a) in lens fiber cells results in cataract and upregulation of (alpha)5(beta)1 integrin expression. *J Cell Sci* 2000;113 ( Pt 18):3173-85.
38. Lin Y, Gao H, Zhu Y, Chen C, Li T, Liu B, et al. Two Paired Box 6 mutations identified in Chinese patients with classic congenital aniridia and cataract. *Mol Med Rep* 2018;18(5):4439-45.
39. Madhavan M, Haynes TL, Frisch NC, Call MK, Minich CM, Tsonis PA, et al. The role of Pax-6 in lens regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(40):14848-53.

40. Shaham O, Smith AN, Robinson ML, Taketo MM, Lang RA, Ashery-Padan R. Pax6 is essential for lens fiber cell differentiation. *Development* 2009;136(15):2567.
41. Shukla S, Mishra R. Level of hydrogen peroxide affects expression and sub-cellular localization of Pax6. *Molecular biology reports* 2018;45(4):533-40.
42. Lou MF. Redox regulation in the lens. *Progress in retinal and eye research* 2003;22(5):657-82.
43. Chamberlain CG, Mansfield KJ, Cerra A. Glutathione and catalase suppress TGFbeta-induced cataract-related changes in cultured rat lenses and lens epithelial explants. *Mol Vis* 2009;15:895-905.
44. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
45. Charmandari E, Kino T, Chrousos GP. Glucocorticoid Receptor. I: Martini L, red. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. New York: Elsevier; 2004. s. 229-34.  
Tilgjengelig fra:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0124755704005357>
46. He B, Zhang N, Zhao R. Dexamethasone Downregulates SLC7A5 Expression and Promotes Cell Cycle Arrest, Autophagy and Apoptosis in BeWo Cells. *Journal of Cellular Physiology* 2016;231(1):233-42.
47. Ayroldi E, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *The FASEB Journal* 2009;23(11):3649-58.
48. Kim JH, Kwack HJ, Choi SE, Kim BC, Kim YS, Kang IJ, et al. Essential role of Rac GTPase in hydrogen peroxide-induced activation of c-fos serum response element. *FEBS Lett* 1997;406(1-2):93-6.
49. Hegge B, Sjøttem E, Mikkola I. Generation of a PAX6 knockout glioblastoma cell line with changes in cell cycle distribution and sensitivity to oxidative stress. *BMC Cancer* 2018;18(1):496-.
50. Celojevic D, Carlsson T, Johansson B, Nannmark U, Petersen A. Cell adhesion molecule expression in human lens epithelial cells after corticosteroid exposure. *Open Ophthalmol J* 2012;6:42-8.
51. Pujols L, Mullol J, Pérez M, Roca-Ferrer J, Juan M, Xaubet A, et al. Expression of the human glucocorticoid receptor  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms in human respiratory epithelial cells and their regulation by dexamethasone. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2001;24(1):49-57.
52. Tome ME, Jaramillo MC, Briehl MM. Hydrogen peroxide signaling is required for glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoma cells. *Free Radical Biology and Medicine* 2011;51(11):2048-59.
53. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* 2017;11:613-9.
54. Van Der Laan S, Sarabdjitsingh RA, Van Batenburg MF, Lachize SB, Li H, Dijkmans TF, et al. Chromatin immunoprecipitation scanning identifies glucocorticoid receptor binding regions in the proximal promoter of a ubiquitously expressed glucocorticoid target gene in brain. *Journal of neurochemistry* 2008;106(6):2515-23.
55. Kwist K, Bridges W, Burg K. The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells. *Cytotechnology* 2016;68(4):1661-7.
56. Jin W, Penington CJ, McCue SW, Simpson MJ. A computational modelling framework to quantify the effects of passaging cell lines. *PloS one* 2017;12(7):e0181941.

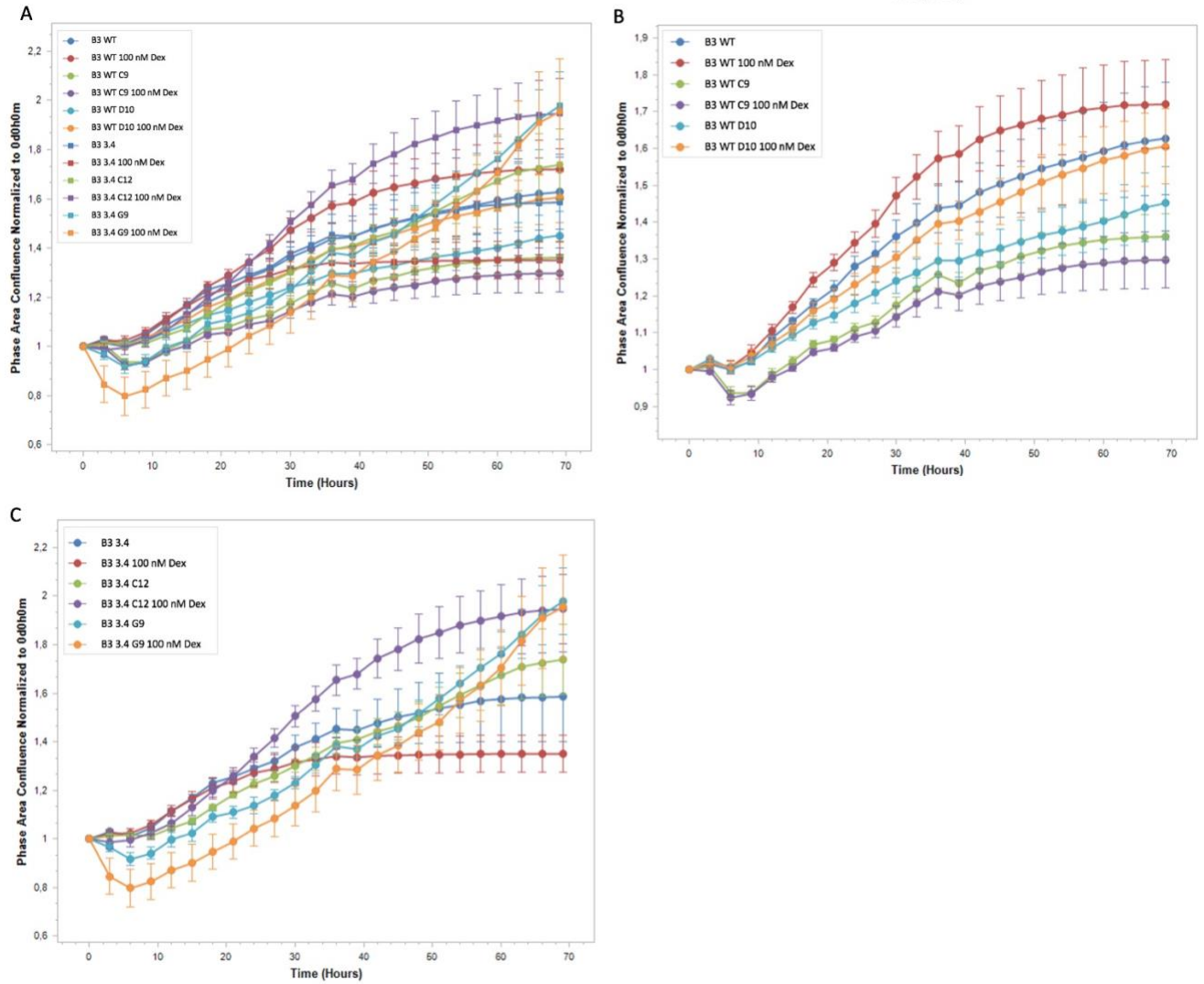
# 8 Appendiks

## Appediks 1: Proliferasjonskurver og WB fra proliferasjons-assay med og uten Dex

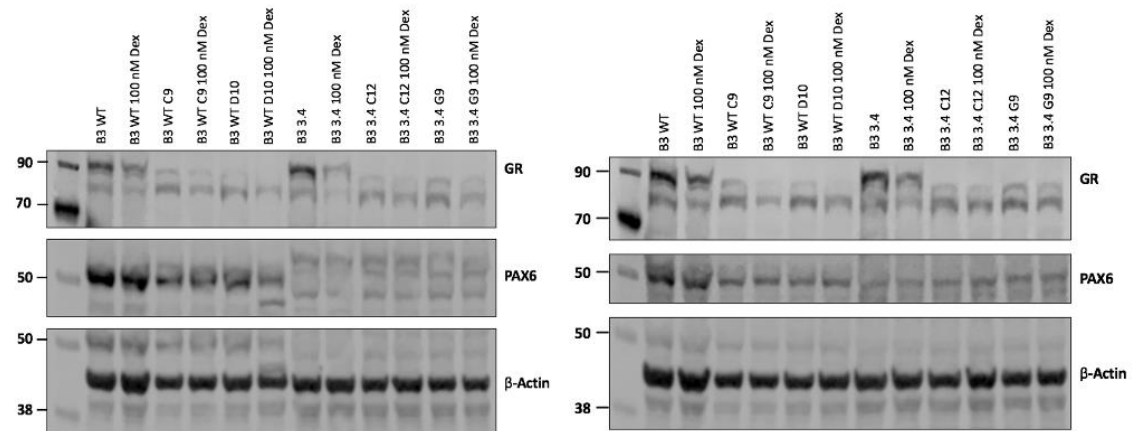
### Repetisjon 1:



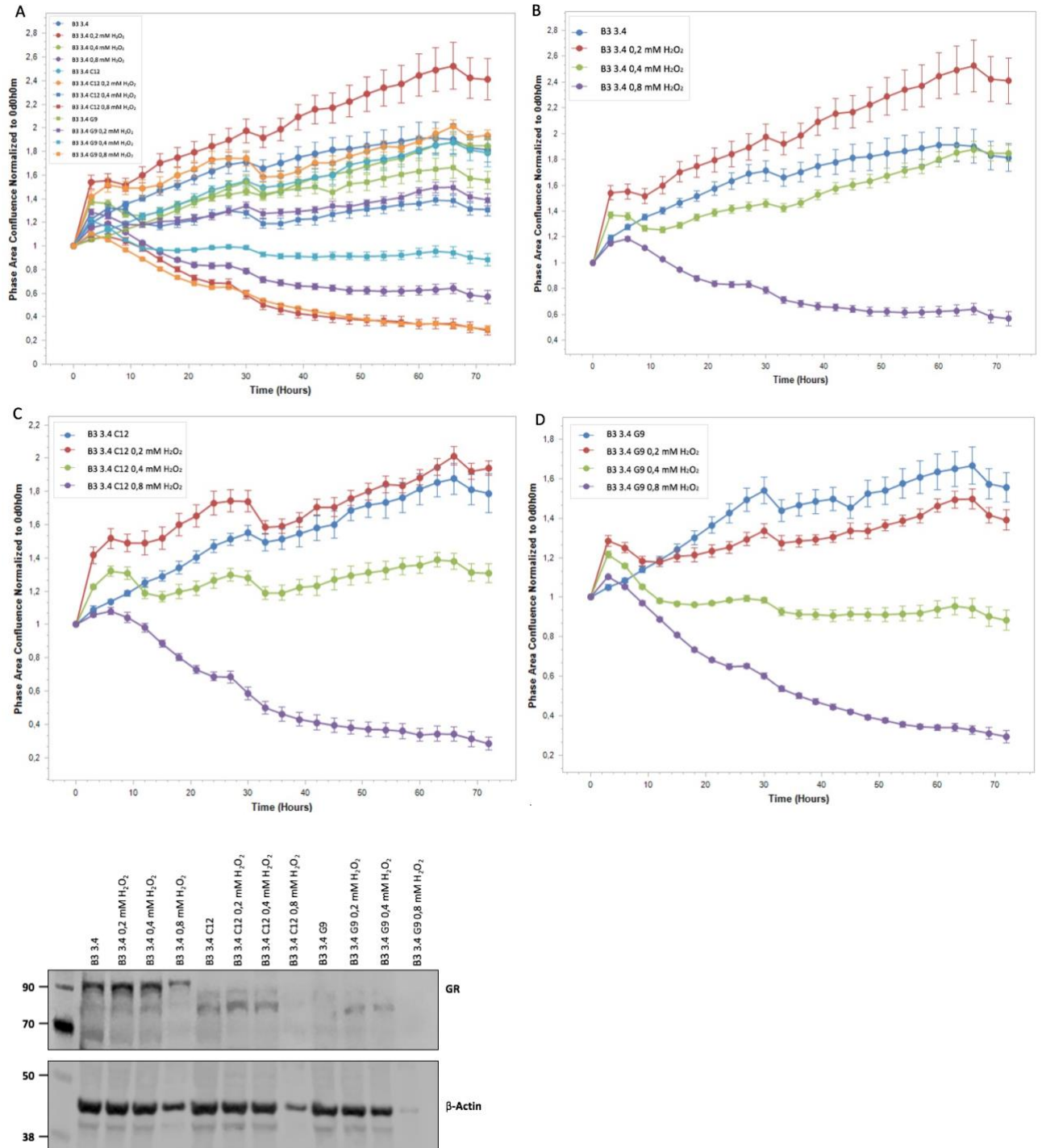
Repetisjon 2:



WB fra repetisjon 1 og 2:

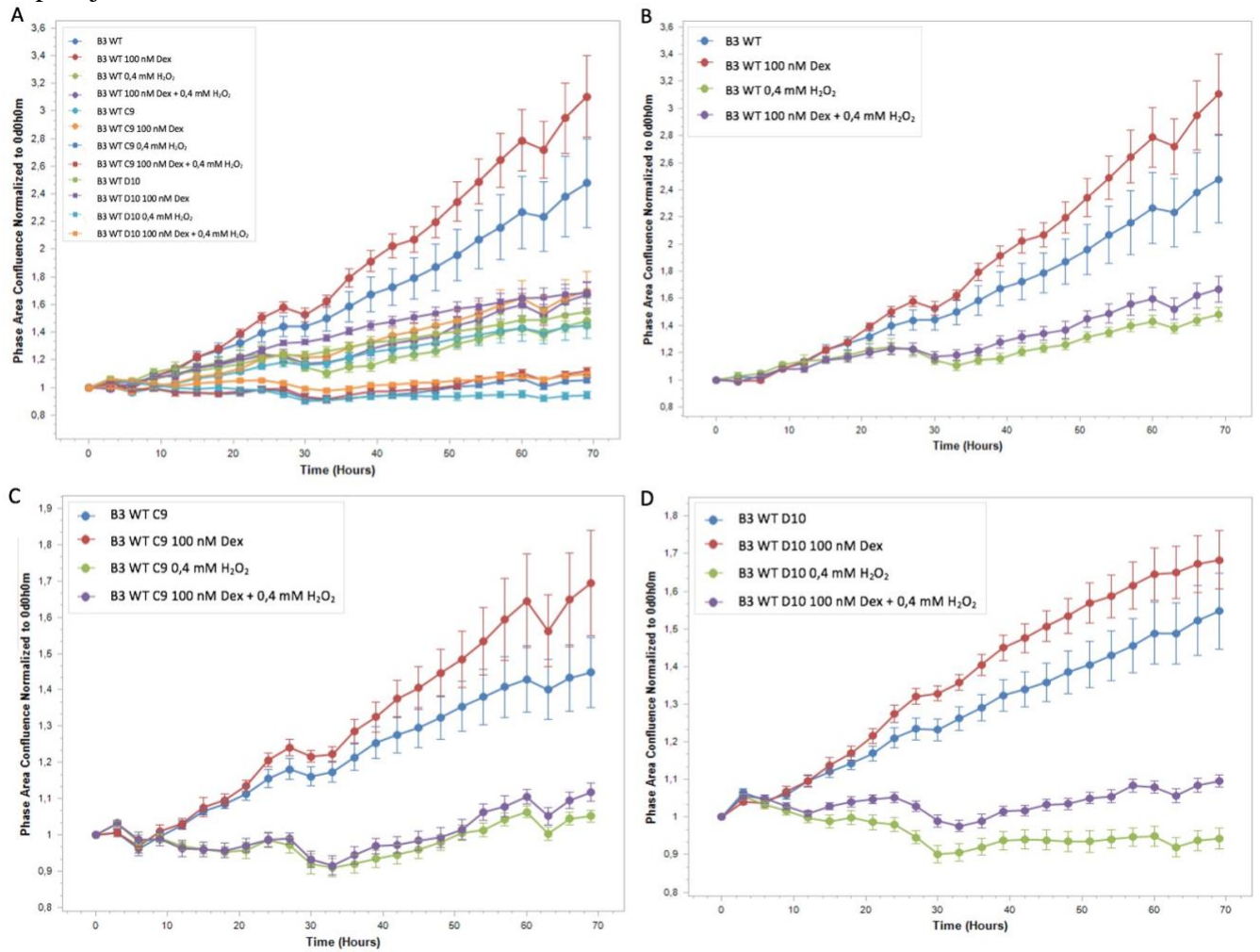


## Appediks 2: Proliferasjonskurver og WB fra proliferasjons-assay for titrering med $H_2O_2$ for B3 3.4 cellelinjene



### Appediks 3: Proliferasjonskurver og WB fra proliferasjons-assay for B3 WT cellelinjene stimulert med Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

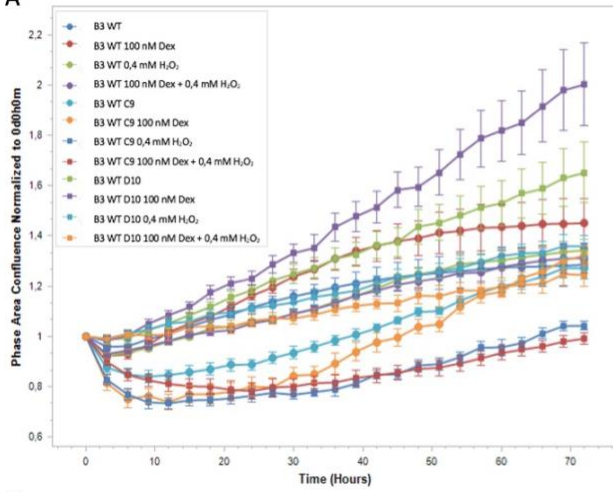
#### Repetisjon 1:



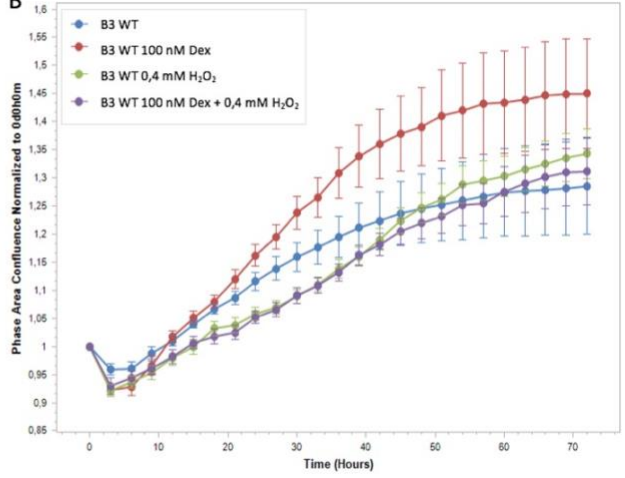


Repetisjon 2:

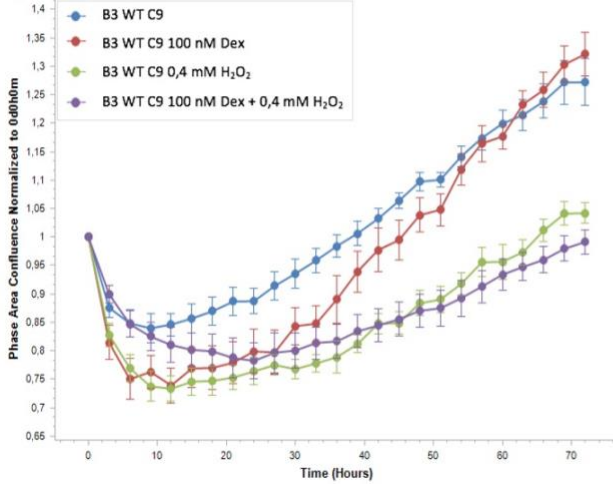
A



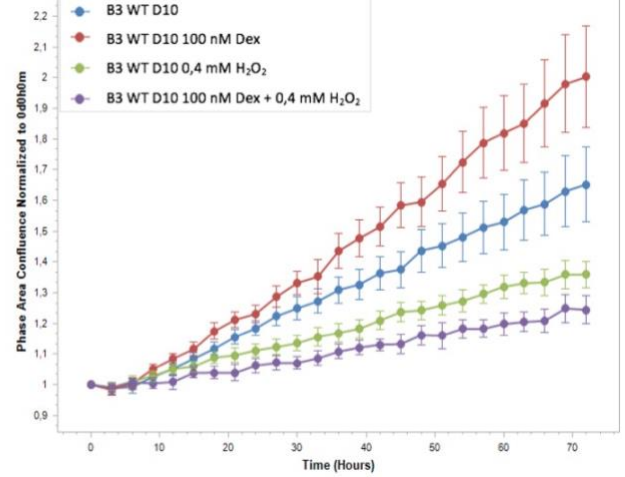
B



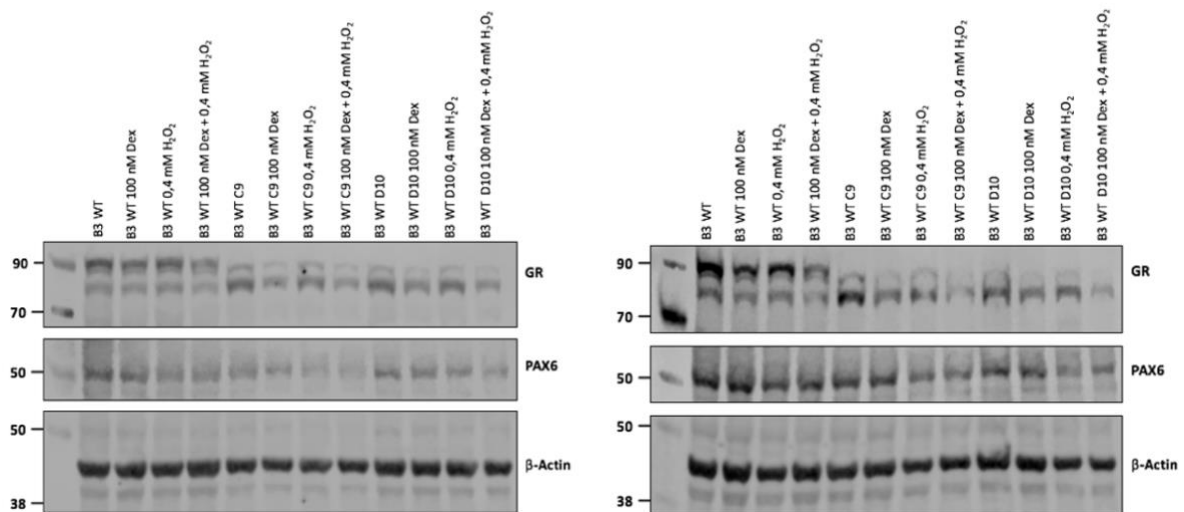
C



D

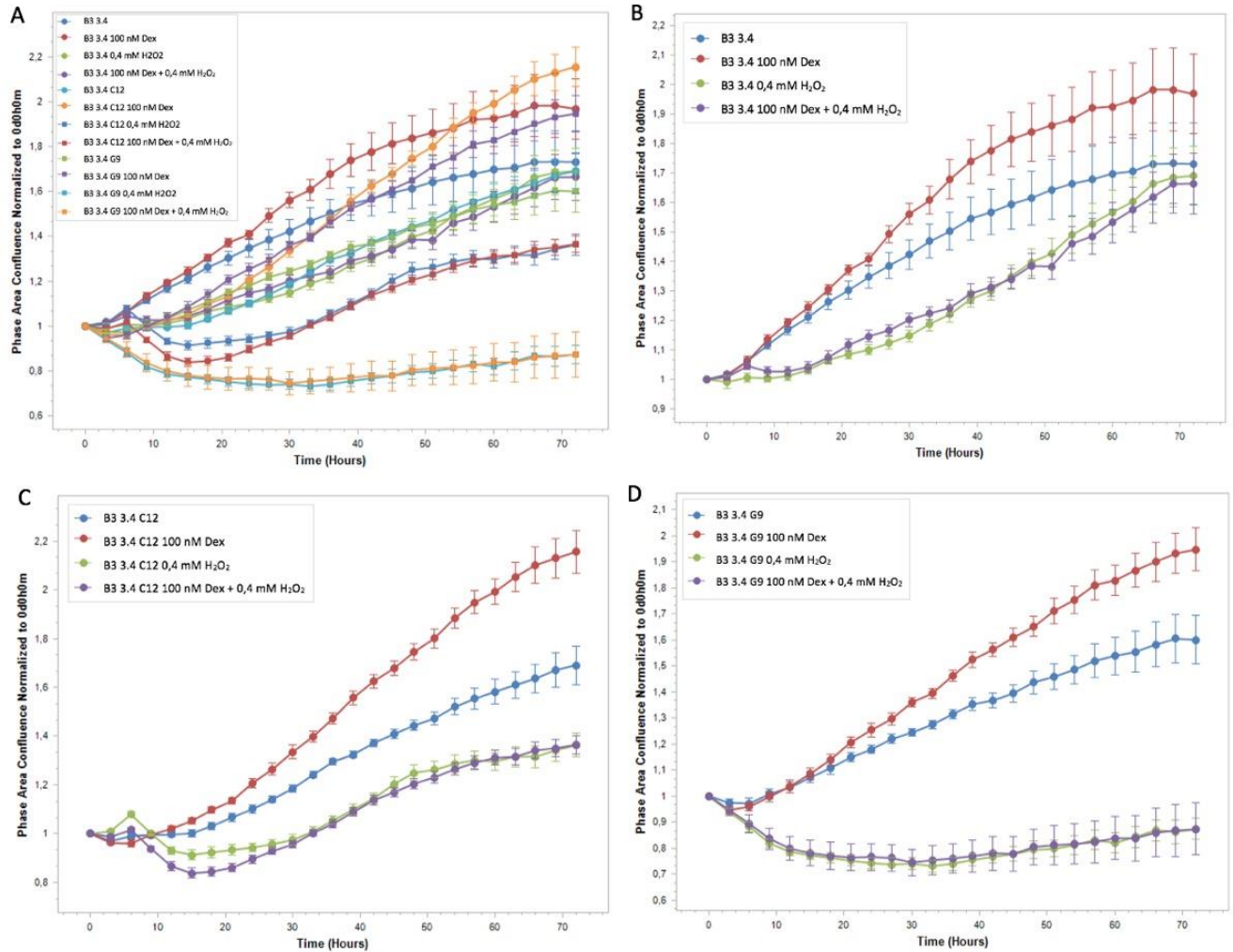


WB for repetisjon 1 og 2:

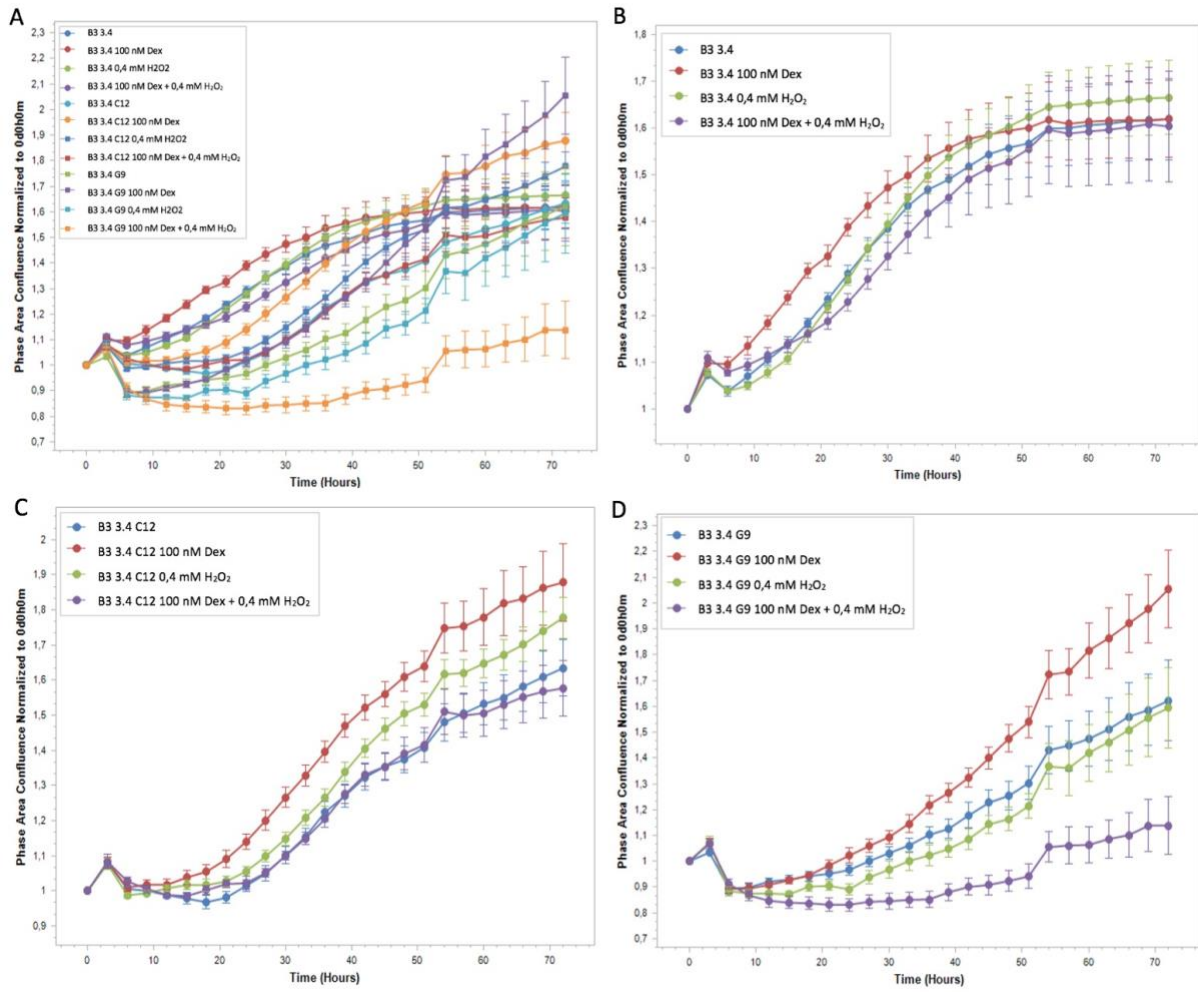


## Appediks 4: Proliferasjonskurver og WB fra proliferasjons-assay for B3 3.4 celloinjene stimulert med Dex i kombinasjon med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

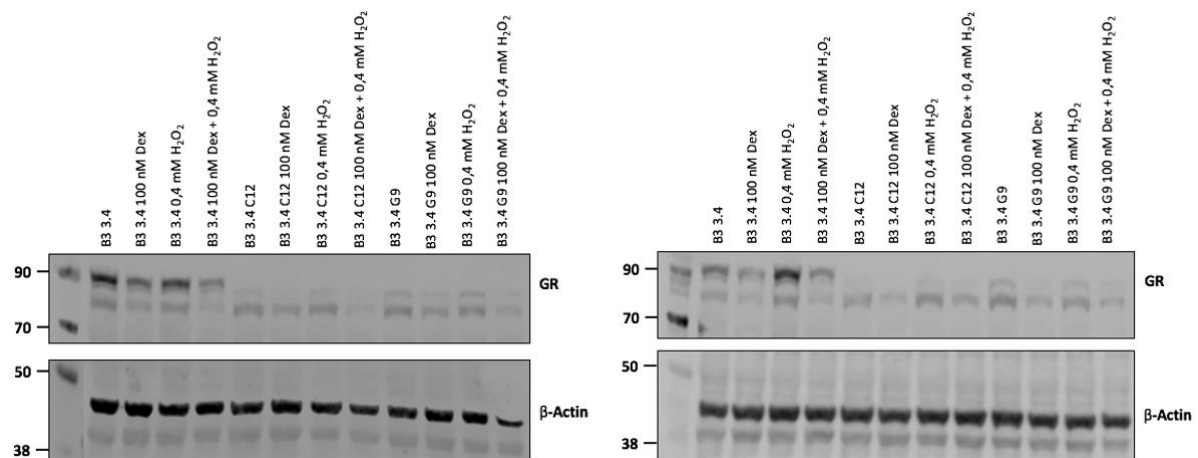
### Repetisjon 1:



## Repetisjon 2:



## WB for repetisjon 1 og 2:



## Appendiks 5: Ct verdier, relativ kvantifisering av genuttrykk og foldverdier fra qPCR

Fra venstre i tabellene presenteres cellelinje, med eller uten Dex stimulering, deretter Ct-verdier og Ct-snitt av målgen og housekeepinggenene. Videre presenteres Ref Index som er gjennomsnittet av de to housekeepinggenene (GAPDH og GusB), deretter HKG normalisert ved bruk av  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Foldverdier for cellelinjene er beregnet med og uten Dex stimulering, og sammenlignet med WT cellelinjen.

Parallell 1 av qPCR resultatene med GILZ som målgen:

Cellelinje	Ct GILZ	Ct-snitt GILZ	Ct GAPDH	Ct-snitt GAPDH	Ct Gus B	Ct-snitt GusB	Ref Index	HKG Norm	Fold +/- Dex	Fold comp to WT
B3 WT	24,08	23,94	14,00	14,00	26,14	26,16	20,08	0,07	1,00	1,00
	23,79				26,18					
B3 WT 100 nM Dex	21,18	21,16	13,96	13,91	29,11	29,13	21,52	1,29	18,60	18,60
	21,13		13,86		29,14					
B3 WT C9	23,19	23,22	14,63	14,67	28,89	28,79	21,73	0,36	1,00	5,14
	23,25		14,70		28,69					
B3 WT C9 100 nM Dex	21,48	21,43	14,69	14,67	29,45	29,11	21,89	1,38	3,88	19,97
	21,37		14,65		28,77					
B3 WT D10	24,33	24,41	14,66	14,60	29,67	30,11	22,36	0,24	1,00	3,49
	24,48		14,54		30,55					
B3 WT D10 100 nM Dex	22,07	22,08	14,86	14,71	28,92	28,81	21,76	0,80	3,31	11,55
	22,09		14,55		28,69					
B3 3.4	22,87	22,86	13,57	13,84	28,52	28,47	21,15	0,31	1,00	4,45
	22,84		14,11		28,41					
B3 3.4 100 nM Dex	20,56	20,49	14,65	14,70	28,85	28,91	21,81	2,50	8,13	36,13
	20,41		14,75		28,97					
B3 3.4 G9	22,96	22,95	14,95	14,59	28,10	28,24	21,41	0,35	1,00	5,00
	22,93		14,22		28,38					
B3 3.4 G9 100 nM Dex	21,84	21,96	14,31	14,23	28,80	28,65	21,44	0,70	2,02	10,11
	22,07		14,15		28,49					

Parallell 2 med GILZ som målgjen:

Cellelinje	Ct GILZ	Ct-snitt GILZ	Ct GAPDH	Ct-snitt GAPDH	Ct GusB	Ct-snitt GusB	Ref Index	HKG Norm	Fold +/- Dex	Fold comp to WT
B3 WT	24,66	24,73	14,26	14,30	29,00	29,01	21,65	0,12	1,00	1,00
	24,79		14,33		29,02					
B3 WT 100 nM Dex	21,95	21,96	14,16	14,40	29,40	29,29	21,84	0,92	7,78	7,78
	21,96		14,65		29,17					
B3 WT C9	24,27	24,31	14,45	14,60	28,79	28,79	21,69	0,16	1,00	1,37
	24,34		14,74		28,78					
B3 WT C9 100 nM Dex	22,89	22,95	14,96	15,03	29,02	28,84	21,94	0,49	3,03	4,16
	23,01		15,10		28,66					
B3 WT D10	26,64	26,47	15,50	15,52	29,55	29,89	22,70	0,07	1,00	0,62
	26,30		15,53		30,22					
B3 WT D10 100 nM Dex	23,38	23,36	15,33	15,31	29,21	29,14	22,23	0,46	6,23	3,84
	23,33		15,29		29,07					
B3 3.4	24,68	24,63	14,65	14,75	28,84	28,86	21,81	0,14	1,00	1,19
	24,57		14,85		28,88					
B3 3.4 100 nM Dex	22,05	21,93	14,99	14,91	29,29	29,29	22,10	1,12	7,92	9,43
	21,81		14,82		29,28					
B3 3.4 G9	24,67	24,75	15,03	15,12	30,12	29,76	22,44	0,20	1,00	1,70
	24,82		15,21		29,39					
B3 3.4 G9 100 nM Dex	22,65	23,36	14,50	14,40	28,90	28,94	21,67	0,31	1,53	2,61
	24,07		14,30		28,98					

Parallell 3 med GILZ som målgjen:

Cellelinje	Ct GILZ	Ct-snitt GILZ	Ct GAPDH	Ct-snitt GAPDH	Ct Gus B	Ct-snitt GUsB	Ref Index	HKG Norm	Fold +/- Dex	Fold comp to WT
B3 WT	23,91	23,78	14,65	14,65	28,45	28,45	21,55	0,21	1,00	1,00
	23,64		28,45							
B3 WT 100 nM Dex	21,17	21,19	14,45	14,46	29,42	29,46	21,96	1,71	7,97	7,97
	21,21		14,47		29,50					
B3 WT C9	24,45	24,40	15,21	15,21	28,95	28,96	22,09	0,20	1,00	0,94
	24,34		15,21		28,97					
B3 WT C9 100 nM Dex	21,46	21,46	14,89	14,74	29,02	28,93	21,83	1,30	6,43	6,06
	21,45		14,58		28,83					
B3 WT D10	24,38	24,52	14,20	14,28	28,60	28,75	21,51	0,12	1,00	0,58
	24,66		14,35		28,90					
B3 WT D10 100 nM Dex	21,59	21,66	14,52	14,75	28,79	28,48	21,61	0,97	7,81	4,54
	21,72		14,98		28,16					
B3 3.4	23,22	23,32	14,01	13,97	28,65	28,72	21,35	0,26	1,00	1,19
	23,41		13,93		28,79					
B3 3.4 100 nM Dex	20,50	20,54	14,14	14,16	28,83	28,86	21,51	1,95	7,65	9,13
	20,58		14,17		28,88					
B3 3.4 G9	23,68	23,75	14,03	14,15	28,24	28,39	21,27	0,18	1,00	0,84
	23,82		14,26		28,53					
B3 3.4 G9 100 nM Dex	21,58	21,58	13,74	13,96	29,03	29,02	21,49	0,94	5,24	4,38
	21,51		14,17		29,00					

qPCR resultat med GJA1 som målgjen:

Cellelinje	Ct GJA1	Ct-snitt GJA1	Ct GAPDH	Ct-snitt GAPDH	Ct Gus B	Ct-snitt GusB	Ref Index	HKG Norm	Fold +/- Dex	Fold comp to WT
B3 WT	21,26	21,27	14,44	14,41	29,31	29,64	22,02	1,69	1,00	1,00
	21,27		14,37		29,96					
B3 WT 100 nM Dex	21,99	21,95	14,94	14,90	30,47	30,16	22,53	1,49	0,88	0,88
	21,91		14,85		29,85					
B3 WT C9	21,44	21,20	15,27	15,32	29,23	29,33	22,32	2,18	1,00	1,29
	20,95		15,36		29,43					
B3 WT C9 100 nM Dex	21,76	21,72	15,45	15,33	29,23	29,18	22,25	1,45	0,66	0,86
	21,67		15,21		29,12					
B3 3.4	22,12	22,12	14,85	14,75	29,37	29,44	22,10	0,98	1,00	0,58
	22,12		14,65		29,51					
B3 3.4 100 nM Dex	23,38	23,25	15,23	15,23	29,70	29,85	22,40	0,56	0,57	0,33
	23,12		15,23		29,45					
B3 3.4 G9	23,26	23,25	15,56	15,47	29,80	29,88	22,68	0,67	1,00	0,40
	23,23		15,38		29,96					
B3 3.4 G9 100 nM Dex	22,70	22,72	14,92	14,96	29,36	29,41	22,18	0,69	1,02	0,41
	22,73		14,99		29,45					

**Appendiks 6: Oppsett og rådata fra reportergen-assay med titrering av plasmidene pGL3-GJA1 Large, pGL3- GILZ (1264 bp) og pGL3-Basic.**

Oppsett:

Transfeksjons nr.	Cellelinje	Konsentrasjon pGL3-Basic (µg)	Konsentrasjon pGL3-GJA1 Large (µg)	Konsentrasjon pGL3-GILZ 1264 (µg)	Konsentrasjon pCH110 (µg)
1	B3 WT	0,2			0,01
2		0,4			0,01
3		0,8			0,01
4			0,2		0,01
5			0,4		0,01
6			0,8		0,01
7				0,2	0,01
8				0,4	0,01
9				0,8	0,01

Rådata:

Transfeksjons nr.	Luc		β - gal		Luc / β - gal			
	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 1	Brønn 2	Gjennomsnitt	Stdav
1	200	295	122	173	1,64	1,71	1,67	0,05
2	4339	4065	1844	1651	2,35	2,46	2,41	0,08
3	8203	4655	790	1118	10,38	4,16	7,72	4,40
4	4511	11129	234	313	19,28	35,56	27,42	11,51
5	225467	199272	2872	1385	78,51	143,88	111,19	46,23
6	20400	25010	52	77	392,31	324,81	358,56	47,73
7	359	32	29	81	12,38	0,40	6,39	8,47
8	96	98	226	260	0,42	0,38	0,40	0,03
9	4	67	293	125	0,02	0,54	0,28	0,37

**Appediks 7: Oppsett og rådata for reporter-gen-assay med plasmidene pGL3-GJA1 Large, pGL3-GILZ 1264 (med og uten Dex stimulering) og pGL3-Basic i de fire cellelinjene (B3 WT, B3 WT C9, B3 3.4 og B3 3.4 G9).**

Oppsett:

Transfeksjons nr.	Cellelinje	Konsentrasjon pGL3-Basic (µg)	Konsentrasjon pGL3-GJA1 Large (µg)	Konsentrasjon pGL3-GILZ 1264 (µg)	Konsentrasjon pCH110 (µg)	Dex
1	B3 WT	0,4			0,01	
2			0,4		0,01	
3				0,2	0,01	
4				0,2	0,01	100 nM
5	B3 WT C9	0,4			0,01	
6			0,4		0,01	
7				0,2	0,01	
8				0,2	0,01	100 nM
9	B3 3.4	0,4			0,01	
10			0,4		0,01	
11				0,2	0,01	
12				0,2	0,01	100 nM
13	B3 3.4 G9	0,4			0,01	
14			0,4		0,01	
15				0,2	0,01	
16				0,2	0,01	100 nM

Rådata:

Transfeksjons nr.	Luc			β - gal			Luc/ β - gal				
	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Gjennomsnitt	Stdav
1	30 659	31 931	32 413	7984	6824	7888	4,33	4,68	4,11	4,37	0,29
2	324 061	354 145	343 687	4002	3923	3394	80,97	90,27	101,26	90,84	10,16
3	1263	400	334	707	527	560	1,79	0,76	0,60	1,05	0,65
4	158	182	189	369	399	543	0,43	0,46	0,35	0,41	0,06
5	24 702	31 510	26 834	3957	5166	4937	6,24	6,10	5,44	5,93	0,43
6	337 366	355 577	314 434	2973	3182	2829	113,48	111,75	111,15	112,12	1,21
7	2114	734	667	1466	1082	1307	1,44	0,68	0,51	0,88	0,50
8	627	440	523	883	1025	1022	0,71	0,43	0,51	0,55	0,14
9	103 937	99 733	89 676	22 698	19 766	16 064	4,58	5,05	5,58	5,07	0,50
10	959 244	906 052	1 007 000	17 798	15 677	17 607	53,90	57,79	57,19	56,29	2,10
11	3653	1621	1618	5756	5365	5377	0,63	0,30	0,30	0,41	0,19
12	1136	823	1014	3848	4948	5645	0,30	0,17	0,18	0,21	0,07
13	30 173	30 202	30 646	15 118	14 552	14 236	2,00	2,08	2,15	2,07	0,08
14	457 589	491 775	459 976	10 573	11 199	9896	43,28	43,91	46,48	44,56	1,70
15	3731	1194	1127	2977	3199	3534	1,25	0,37	0,32	0,65	0,52
16	754	1029	887	2132	2859	2864	0,35	0,36	0,31	0,34	0,03



**Appendiks 8: Oppsett og rådata fra reporter-gen-assay med plasmidene pGL3-GJA1 Large og pGL3-Basic i de fire cellelinjene (B3 WT, B3 WT C9, B3 3.4 og B3 3.4 G9) i nærvær og fravær av Dex.**

Oppsett:

Transfeksjons nr.	Cellelinje	Konsentrasjon pGL3-Basic (µg)	Konsentrasjon pGL3-GJA1 Large (µg)	Konsentrasjon pCH110 (µg)	Dex
1	B3 WT	0,4		0,01	
2		0,4		0,01	100 nM
3			0,4	0,01	
4			0,4	0,01	100 nM
5	B3 WT C9	0,4		0,01	
6		0,4		0,01	100 nM
7			0,4	0,01	
8			0,4	0,01	100 nM
9	B3 3.4	0,4		0,01	
10		0,4		0,01	100 nM
11			0,4	0,01	
12			0,4	0,01	100 nM
13	B3 3.4 G9	0,4		0,01	
14		0,4		0,01	100 nM
15			0,4	0,01	
16			0,4	0,01	100 nM

Rådata:

Transfeksjons nr	Luc			β - gal			Luc/ β - gal				
	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Gjennomsnitt	Stdav
1	23180	27209	22241	4567	5555	4897	5,08	4,90	4,54	4,84	0,27
2	27111	21528	24274	4340	3883	4619	6,25	5,54	5,26	5,68	0,51
3	429253	470746	368071	3920	4067	3910	109,50	115,75	94,14	106,46	11,12
4	300929	360056	398035	2910	3003	3189	103,41	119,90	124,81	116,04	11,21
5	24756	24270	27615	3191	3209	2965	7,76	8,61	9,31	8,56	0,78
6	21494	24542	22262	2495	2825	2589	8,61	8,69	8,60	8,63	0,05
7	381794	370674	384161	2257	2517	2441	169,16	147,27	157,38	157,94	10,96
8	282714	364647	285892	2025	2425	2128	139,61	150,37	134,35	141,44	8,17
9	88752	91070	90850	17147	16807	17816	5,18	5,42	5,10	5,23	0,17
10	80962	82958	98593	18524	18523	17794	4,37	4,48	5,54	4,80	0,65
11	1272000	1169000	1137000	14957	12988	13116	85,04	90,01	86,69	87,25	2,53
12	725982	843952	948516	11790	14813	15775	61,58	56,97	60,13	59,56	2,35
13	35871	38684	37609	11834	12081	11772	3,03	3,20	3,19	3,14	0,10
14	33485	31296	34942	11220	10004	11053	2,98	3,13	3,16	3,09	0,09
15	642674	705824	720652	11006	9545	10361	58,39	73,95	69,55	67,30	8,02
16	511989	537945	559630	7554	9121	9489	67,78	58,98	58,98	61,91	5,08

**Appendiks 9: Oppsett og rådata fra reporter-gen-assay med titrering av plasmidene pGL3-GILZ (512 bp) og pGL3 GILZ (927 bp) i nærvær og fravær av Dex.**

Oppsett:

Transfeksjons nr.	Cellelinje	Konsentrasjon pGL3-Basic (µg)	Konsentrasjon pGL3-GILZ 512 (µg)	Konsentrasjon pGL3-GILZ 927 (µg)	Konsentrasjon pCH110 (µg)	Dex	
1	B3 WT	0,2			0,01		
2		0,2			0,01	100 nM	
3		0,4			0,01		
4		0,4			0,01	100 nM	
5		0,8			0,01		
6		0,8			0,01	100 nM	
7				0,2		0,01	
8				0,2		0,01	100 nM
9				0,4		0,01	
10				0,4		0,01	100 nM
11				0,8		0,01	
12				0,8		0,01	100 nM
13					0,2	0,01	
14					0,2	0,01	100 nM
15					0,4	0,01	
16					0,4	0,01	100 nM
17					0,8	0,01	
18					0,8	0,01	100 nM

Rådata:

Transfeksjons nr.	Luc		β - gal		Luc/ β - gal			
	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 1	Brønn2	Gjennom-snitt	Stdav
1	93	105	54	64	1,72	1,64	1,68	0,06
2	59	84	81	67	0,73	1,25	0,99	0,37
3	2310	2084	807	596	2,86	3,50	3,18	0,45
4	1772	2055	402	440	4,41	4,67	4,54	0,19
5	6209	6677	719	757	8,64	8,82	8,73	0,13
6	4852	4782	722	696	6,72	6,87	6,80	0,11
7	20	20	88	72	0,23	0,28	0,25	0,04
8	16	-10	70	69	0,23	-0,14	0,04	0,26
9	76	111	194	182	0,39	0,61	0,50	0,15
10	118	26	173	122	0,68	0,21	0,45	0,33
11	134	191	112	174	1,20	1,10	1,15	0,07
12	83	103	172	122	0,48	0,84	0,66	0,26
13	884	972	163	143	5,42	6,80	6,11	0,97
14	628	743	130	104	4,83	7,14	5,99	1,64
15	1001	1133	90	56	11,12	20,23	15,68	6,44
16	1273	738	47	72	27,09	10,25	18,67	11,9
17	4997	3881	151	150	33,09	25,87	29,48	5,10
18	5015	4548	191	168	26,26	27,07	26,66	0,58

**Appendiks 10: Oppsett og rådata fra reportergen-assay med plasmidene pGL3-GJA1 Large, pGL3-GILZ (927 bp) og pGL3-Basic i de fire cellelinjene (B3 WT, B3 WT C9, B3 3.4 og B3 3.4 G9) i nærvær og fravær av Dex.**

Oppsett:

Transfeksjons nr.	Cellelinje	Konsentrasjon pGL3-Basic (µg)	Konsentrasjon pGL3-GJA1 Large (µg)	Konsentrasjon pGL3-GILZ 927 (µg)	Konsentrasjon pCH110 (µg)	Dex
1	B3 WT	0,4			0,01	
2		0,4			0,01	100 nM
3			0,4		0,01	
4			0,4		0,01	100 nM
5				0,4	0,01	
6				0,4	0,01	100 nM
7	B3 WT C9	0,4			0,01	
8		0,4			0,01	100 nM
9			0,4		0,01	
10			0,4		0,01	100 nM
11				0,4	0,01	
12				0,4	0,01	100 nM
13	B3 3.4	0,4			0,01	
14		0,4			0,01	100 nM
15			0,4		0,01	
16			0,4		0,01	100 nM
17				0,4	0,01	
18				0,4	0,01	100 nM
19	B3 3.4 G9	0,4			0,01	
20		0,4			0,01	100 nM
21			0,4		0,01	
22			0,4		0,01	100 nM
23				0,4	0,01	
24				0,4	0,01	100 nM

Rådata:

Transfek- sjons nr.	Luc			β - gal			Luc / β - gal				
	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Gjennom- snitt	Stdav
1	90	112	141	68	60	111	1,32	1,87	1,27	1,49	0,33
2	118	89	82	79	85	34	1,49	1,05	2,41	1,65	0,70
3	14183	14707	15677	115	149	103	123,33	98,70	152,20	124,75	26,78
4	10381	11572	11419	60	93	69	173,02	124,43	165,49	154,31	26,15
5	1119	673	426	50	66	56	22,38	10,20	7,61	13,39	7,89
6	307	670	414	54	56	46	5,69	11,96	9,00	8,88	3,14
7	372	502	402	112	142	132	3,32	3,54	3,05	3,30	0,25
8	345	370	356	103	69	87	3,35	5,36	4,09	4,27	1,02
9	3930	4202	3321	61	46	45	64,43	91,35	73,80	76,52	13,67
10	4016	4731	3009	45	62	75	89,24	76,31	40,12	68,56	25,46
11	2618	2721	3690	103	92	144	25,42	29,58	25,63	26,87	2,34
12	2221	2345	3987	93	84	135	23,88	27,92	29,53	27,11	2,91
13	1145	1138	1406	287	274	287	3,99	4,15	4,90	4,35	0,48
14	978	982	923	238	280	275	4,11	3,51	3,36	3,66	0,40
15	21443	19380	16713	135	129	125	158,84	150,23	133,70	147,59	12,77
16	12188	11140	13747	71	119	126	171,66	93,61	109,10	124,79	41,32
17	502	446	363	57	57	68	8,81	7,82	5,34	7,32	1,79
18	296	379	562	65	65	53	4,55	5,83	10,70	7,00	3,19
19	47	141	176	62	79	95	0,76	1,78	1,85	1,47	0,61
20	63	129	94	43	57	79	1,47	2,26	1,19	1,64	0,56
21	6157	6432	6574	115	107	106	53,54	60,03	62,02	58,53	4,43
22	4769	5072	5048	108	69	79	44,16	73,51	63,90	60,52	14,96
23	874	1758	699	102	142	145	8,57	12,38	4,82	8,59	3,78
24	631	870	896	98	93	77	6,44	9,35	11,64	9,14	2,61

**Appendiks 11: Oppsett og rådata fra reportergen-assay med plasmidene pGL3-GJA1 Large og pGL3-Basic i cellelinjene B3 WT og B3 3.4 stimulert med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ulike tidsintervaller.**

Oppsett:

Transfeksjons Nr.	Cellelinje	Konsentrasjon pGL3-Basic (µg)	Konsentrasjon pGL3-GJA1 Large (µg)	Konsentrasjon pCH110 (µg)	Tid stimulert med H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (timer)	
1	B3 WT	0,4		0,01	0	
2		0,4		0,01	1	
3		0,4		0,01	2	
4		0,4		0,01	4	
5		0,4		0,01	8	
6		0,4		0,01	24	
7				0,4	0,01	0
8				0,4	0,01	1
9				0,4	0,01	2
10				0,4	0,01	4
11				0,4	0,01	8
12				0,4	0,01	24
13	B3 3.4	0,4		0,01	0	
14		0,4		0,01	1	
15		0,4		0,01	2	
16		0,4		0,01	4	
17		0,4		0,01	8	
18		0,4		0,01	24	
19				0,4	0,01	0
20				0,4	0,01	1
21				0,4	0,01	2
22				0,4	0,01	4
23				0,4	0,01	8
24				0,4	0,01	24

Rådata:

Transfeksjons nr.	Luc		β - gal		Luc / β - gal			
	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 1	Brønn 2	Gjennom- snitt	Stdav
1	8274	7203	1826	1712	4,53	4,21	4,37	0,23
2	5523	5597	1867	1763	2,96	3,17	3,07	0,15
3	6453	7383	1873	1647	3,45	4,48	3,96	0,73
4	8864	8871	1675	1406	5,29	6,31	5,80	0,72
5	8128	7066	1333	802	6,10	8,81	7,45	1,92
6	5955	6348	1654	1615	3,60	3,93	3,77	0,23
7	276002	203298	1911	1667	144,43	121,95	133,19	15,89
8	263606	279081	1902	1871	138,59	149,16	143,88	7,47
9	250689	292459	2091	1984	119,89	147,41	133,65	19,46
10	310346	313179	1873	1812	165,69	172,84	169,27	5,05
11	244383	213164	1482	904	164,90	235,80	200,35	50,13
12	193531	256296	1571	2149	123,19	119,26	121,23	2,78
13	58567	56870	7813	7794	7,50	7,30	7,40	0,14
14	55010	56336	8421	8163	6,53	6,90	6,72	0,26
15	57035	63986	8470	9262	6,73	6,91	6,82	0,12
16	48535	50398	7341	6878	6,61	7,33	6,97	0,51
17	53571	43155	6014	4354	8,91	9,91	9,41	0,71
18	44760	45356	5143	5291	8,70	8,57	8,64	0,09
19	867407	1104000	6156	6493	140,90	170,03	155,47	20,59
20	1088000	1068000	6486	6056	167,75	176,35	172,05	6,09
21	956136	967216	5281	6172	181,05	156,71	168,88	17,21
22	742158	784563	4293	4298	172,88	182,54	177,71	6,83
23	689387	626772	4195	2675	164,34	234,31	199,32	49,48
24	475600	589956	2965	3558	160,40	165,81	163,11	3,82

**Appendiks 12: Oppsett og rådata fra to paralleller av reporter-gen-assay med plasmidene pGL3-GJA1 Large og pGL3-Basic i cellelinjene B3 WT og B3 3.4 stimulert med ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasjoner.**

Oppsett:

Transfeksjons Nr.	Cellelinje	Konsentrasjon pGL3-Basic (µg)	Konsentrasjon pGL3-GJA1 Large (µg)	Konsentrasjon pCH110 (µg)	Konsentrasjon H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)
1	B3 WT	0,4		0,01	0
2		0,4		0,01	0,2
3		0,4		0,01	0,4
4		0,4		0,01	0,8
5			0,4	0,01	0
6			0,4	0,01	0,2
7			0,4	0,01	0,4
8			0,4	0,01	0,8
9	B3 3.4	0,4		0,01	0
10		0,4		0,01	0,2
11		0,4		0,01	0,4
12		0,4		0,01	0,8
13			0,4	0,01	0
14			0,4	0,01	0,2
15			0,4	0,01	0,4
16			0,4	0,01	0,8

Rådata parallell 1:

Transfeksjons nr	Luc			β - gal			Luc/ β - gal				Stdav
	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Gjennomsnitt	
1	12851	12236	12935	4848	4217	4012	2,65	2,90	3,22	2,93	0,29
2	11061	9285	10460	4051	4388	3882	2,73	2,12	2,65	2,51	0,34
3	9684	8933	7646	3850	3851	4354	2,52	2,32	1,76	2,20	0,39
4	5794	5640	5412	2689	2836	2601	2,15	1,99	2,08	2,07	0,08
5	436331	550479	547910	3540	5601	5143	123,26	98,28	106,54	109,36	12,72
6	515662	518290	531985	5544	5350	6078	93,01	96,88	87,53	92,47	4,70
7	461766	414010	418365	4789	4918	5561	96,42	84,18	75,23	85,28	10,64
8	204550	248202	239714	3503	3798	3862	58,39	65,35	62,07	61,94	3,48
9	36383	46555	48244	8150	11343	9916	4,46	4,10	4,87	4,48	0,38
10	42046	41187	48641	10017	10888	11738	4,20	3,78	4,14	4,04	0,23
11	38849	40041	39270	9533	9471	9706	4,08	4,23	4,05	4,12	0,10
12	24241	25454	24921	4424	5261	5510	5,48	4,84	4,52	4,95	0,49
13	890238	952371	962163	8879	11333	10148	100,26	84,04	94,81	93,04	8,26
14	781134	766913	827677	10134	11372	9730	77,08	67,44	85,06	76,53	8,83
15	738947	751089	760599	8809	8603	9707	83,89	87,31	78,36	83,18	4,52
16	384537	224582	398959	4209	3320	5156	91,36	67,65	77,38	78,79	11,92

Rådata parallell 2:

Transfeksjons nr	Luc			β - gal			Luc / β - gal				
	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Gjennomsnitt	Stdav
1	7196	5886	5439	2691	2703	2056	2,67	2,18	2,65	2,50	0,28
2	4228	4713	4683	1941	2175	2098	2,18	2,17	2,23	2,19	0,03
3	4321	4616	4575	2560	2315	2800	1,69	1,99	1,63	1,77	0,19
4	2238	2224	3535	1473	1377	1768	1,52	1,62	2,00	1,71	0,25
5	203429	208022	225964	1848	2023	2518	110,08	102,83	89,74	100,88	10,31
6	222798	241750	209036	2545	2754	2312	87,54	87,78	90,41	88,58	1,59
7	193891	179195	215200	1870	2236	2334	103,69	80,14	92,20	92,01	11,77
8	90218	110707	124178	1500	1553	1907	60,15	71,29	65,12	65,52	5,58
9	46396	50479	45569	11299	12426	11533	4,11	4,06	3,95	4,04	0,08
10	50500	45717	53371	12160	10532	12297	4,15	4,34	4,34	4,28	0,11
11	38320	43511	45004	9712	10043	10853	3,95	4,33	4,15	4,14	0,19
12	27478	26168	28448	5849	6158	6882	4,70	4,25	4,13	4,36	0,30
13	727663	764262	787297	5716	6374	6654	127,30	119,90	118,32	121,84	4,80
14	778292	712849	774138	6074	6101	6484	128,14	116,84	119,39	121,46	5,92
15	646475	664056	675154	4072	5010	5403	158,76	132,55	124,96	138,76	17,74
16	346062	360526	377328	2836	3112	3603	122,02	115,85	104,73	114,20	8,77



**Appendiks 13: Oppsett og rådata av reporter-gen-assay med plasmidene pGL3-GJA1 Large og pGL3-Basic i cellelinjene B3 WT C9 og B3 3.4 G9 stimulert med ulike H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasjoner.**

Oppsett:

Transfeksjons nr.	Cellelinje	Konsentrasjon pGL3-Basic (µg)	Konsentrasjon pGL3-GJA1 Large (µg)	Konsentrasjon pCH110 (µg)	Konsentrasjon H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)
1	B3 WT C9	0,4		0,01	0
2		0,4		0,01	0,2
3		0,4		0,01	0,4
4		0,4		0,01	0,8
5			0,4	0,01	0
6			0,4	0,01	0,2
7			0,4	0,01	0,4
8			0,4	0,01	0,8
9	B3 3.4 G9	0,4		0,01	0
10		0,4		0,01	0,2
11		0,4		0,01	0,4
12		0,4		0,01	0,8
13			0,4	0,01	0
14			0,4	0,01	0,2
15			0,4	0,01	0,4
16			0,4	0,01	0,8

Rådata:

Transfeksjons nr.	Luc			β - gal			Luc / β - gal				
	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Gjennomsnitt	Stdav
1	14157	11401	12053	3564	2694	3230	3,97	4,23	3,73	3,98	0,25
2	8999	10373	10329	2364	2699	2501	3,81	3,84	4,13	3,93	0,18
3	9876	8184	8051	2752	2658	2721	3,59	3,08	2,96	3,21	0,33
4	4678	4681	4411	1447	1552	1413	3,23	3,02	3,12	3,12	0,11
5	402456	343825	344063	3149	2717	2990	127,80	126,55	115,07	123,14	7,02
6	301957	271184	246422	2803	2484	2375	107,73	109,17	103,76	106,89	2,80
7	218290	212545	220226	2101	2175	2165	103,90	97,72	101,72	101,11	3,13
8	85928	93640	106444	909	1024	1423	94,53	91,45	74,80	86,93	10,61
9	25460	20946	21996	11460	9995	10013	2,22	2,10	2,20	2,17	0,07
10	17646	18363	19934	8014	7609	9538	2,20	2,41	2,09	2,24	0,16
11	14644	16369	16179	6399	7385	7411	2,29	2,22	2,18	2,23	0,05
12	9744	9529	10180	4057	4741	5090	2,40	2,01	2,00	2,14	0,23
13	851376	716283	750515	10955	10010	10340	77,72	71,56	72,58	73,95	3,30
14	672598	615217	587968	8871	8479	9173	75,82	72,56	64,10	70,83	6,05
15	440670	459779	471080	6160	6874	7136	71,54	66,89	66,01	68,15	2,97
16	263347	168989	291624	3961	3151	5103	66,48	53,63	57,15	59,09	6,64

## Appendiks 14: WB GJA1

WB av proteinekstrakter fra B3 WT og B3 3.4 cellelinjene stimulert med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i tre døgn. WB er farget for GJA1, PAX6 og Aktin. Grafisk fremstilling av intensiteten av 50-55 kDa isoformen og 43 kDa isoformen av GJA1 justert for aktin.

