



## Interaksjonen mellom glukokortikoidreseptoren og Pax6 under genregulering i sebrafiskembryo og mammalske celler i kultur

Lillann Wilsgård Skaue

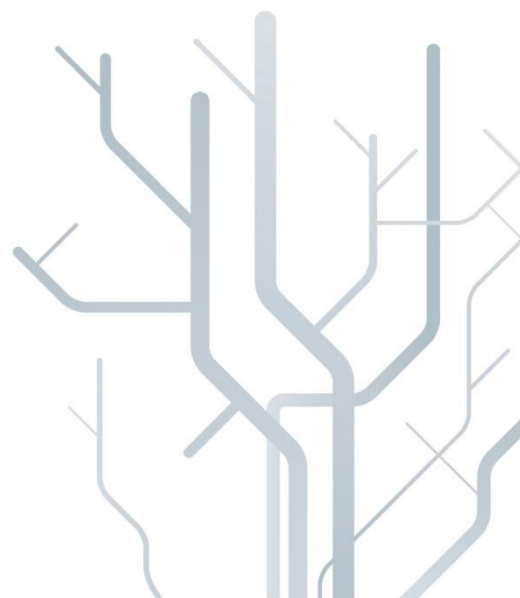
Masteroppgave i farmasi

2013

Veiledere

Ingvild Mikkola

Beate Hegge





## **Forord**

Masteroppgaven ble gjennomført ved Forskningsgruppen i farmakologi ved Institutt for farmasi, Universitet i Tromsø i perioden oktober 2012 til mai 2013. Hovedveileder var Ingvild Mikkola og Beate Hegge var biveileder.

Arbeidet med masteroppgaven har vært en lang og krevende prosess, men samtidig en lærerik og interessant periode av studiet.

Jeg vil først få takke min hovedveileder Ingvild Mikkola for all hjelp, både på lab og underveis i skriveprosessen.

Jeg vil også takke Beate Hegge og Rune Hogseth for veiledning på lab og ikke minst positivitet og inspirasjon i masterperioden.

En spesiell takk til alle i kull 08 som har gjort disse fem årene ved Institutt for farmasi fantastiske.

Takk kjære Ingrid, for støtte og oppmuntring gjennom hele masterperioden. Ditt gode selskap har gjort lange dager og sene kvelder med lab og skriving overkommelig.

Det gikk fint. Vi klarte det. Vi kom i mål. Hurra for oss!

Tilslutt vil jeg takke familie og venner som har hatt troen på meg og støttet meg hele veien.

Tromsø, Mai 2013

Lillann Wilsgård Skaue

## Sammendrag

Det er kjent at glukokortikoidreseptoren (GR) og Pax6 som begge er transkripsjonsfaktorer og blant annet er viktig for normal embryoutvikling, har noen felles målgener blant matriks metalloproteinase (MMP.) MMPer sørger for remodellering av ekstracellulær matriks (ECM) og er svært viktige under embryogenesen. Fra før av er det kjent at både GR og Pax6 regulerer uttrykket MMP2 og MMP9. I glioblastomaceller i hjernen nedreguleres MMP2 av Pax6 og i sebrafiskembryo oppreguleres det samme genet av GR. Begge transkripsjonsfaktorene kan oppregulere uttrykket av MMP9.

Det har ikke tidligere blitt undersøkt om GR og Pax6 kan påvirke hverandres genuttrykk, eller om de påvirker hverandres effekter på promoterer de begge regulerer. Det var derfor ønskelig å se på om Pax6 uttrykket i seg selv ble regulert under påvirkning av deksametason, samt hvordan reguleringen av både kjente og potensielle målgener til Pax6 påvirkes ved aktivering av GR med deksametason. Det ble først forsøkt å kartlegge uttrykksmønsteret til ulike gener innenfor Pax-, MMP- og TIMP-familiene i sebrafiskembryo inkubert i tre ulike konsentrasjoner av glukokortikoidet deksametason. RNA ble ekstrahert fra embryoene på tre ulike utviklingstrinn 24, 48 og 72 hpf. De to batchene med sebrafiskembryo som ble undersøkt, viste store variasjoner i genuttrykket til de testede genene. Det ble derfor gjort et forsøk på å gruppere genene etter lignende uttrykksmønster innad i hver batch. I den ene batchen viste Pax6.1 og MMP2 lignende uttrykksmønster, noe som kan tyde på at Pax6.1 kanskje kan regulere MMP2 også i sebrafiskembryo. Det var derfor av interesse å se nærmere på kombinasjonen av Pax6 og GR på MMP2 promoter. Det ble gjort transiente transfeksjoner med HeLa celler for å se på interaksjonen mellom GR og Pax6 på promoternivå. MMP2 promoterens aktivitet ble da observert i transfeksjoner med GR alene, Pax6 alene, og GR og Pax6 i kombinasjon, sammen med en MMP2 promoter reportervektor og passende kontroller. Resultatet viste at GR og Pax6 som transkripsjonsfaktorer har en synergisk effekt på MMP2 promoterens transkripsjonsaktivitet når cellene stimuleres med glukokortikoidet deksametason. Dette fenomenet ser ut til å være avhengig av en korrekt dose Pax6 i forhold til GR, siden synergismen kun ble observert for de to høyeste konsentrasjonene av Pax6 som ble testet. Den laveste konsentrasjonen av Pax6 kombinert med GR hadde bare en additiv effekt. Den observerte synergismen mellom GR og Pax6 på MMP2 promoter er en spennende oppdagelse og kan være et viktig funn for å forstå normal embryoutvikling hvis den også kan bekreftes *in vivo*.

## Forkortelser

Amp	Ampicillin
$\beta$ -gal	$\beta$ -galactosidase
Bp	basepar
cDNA	komplementær DNA
Ct	Threshold cycle
Dex-WS	Dexamethasone Water-Soluble
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksyribonukleinsyre trifosfat
EtOH	Etanol
g	Gram
GR	Glukokortikoidreseptor
GRE	Glukokortikoid responsive elementer
Hpf	Hours post fertilization
Luc	Luciferase
min	Minutt
ml	Milliliter
MEM	Minimum Essentiel Medium
MMP	Matrix metalloproteinase
NoRT	No Reverse Transcription
NTC	No template control
Pax	Paired box
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
q-PCR	Quantitative polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsyre
RT	Romtemperatur
Sek	Sekund
TAE	Tris-acetat-EDTA
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
V	Volt

## Innholdsfortegnelse

Forord.....	III
Sammendrag.....	IV
Forkortelser.....	V
Innholdsfortegnelse.....	VI
1. Introduksjon.....	1
1.1 Paired box gener.....	1
1.1.1 Strukturer og funksjoner.....	2
1.1.2 Pax i embryo- og organogenese.....	2
1.1.3 Pax6.....	3
1.1.4 Pax6 i embryogenesen.....	3
1.2 Glukokortikoidreseptoren.....	4
1.3 Matriks metalloproteinaser.....	6
1.3.1 MMPer og embryogenese.....	7
1.3.2 Tissue inhibitors of metalloproteinases.....	7
1.4 Sebrafisk.....	8
1.4.1 Fordeler ved sebrafisk som modellsystem.....	8
1.4.2 Sebrafisk som modellsystem.....	8
1.4.3 Pax6 og GR i sebrafisk.....	9
1.5 Formålet med oppgaven.....	12
2. Materialer.....	13
3. Metoder.....	19
3.1 SEBRAFISK.....	19
3.1.1 Sebrafiskhold.....	19
3.1.2 Avling av sebrafisk.....	19
3.1.3 Håndtering av sebrafiskembryo.....	19
3.1.4 Deksametason i arbeidet med sebrafiskembryo.....	20
3.1.5 Isolering av RNA fra sebrafiskembryo.....	21
3.1.6 Konsentrasjonsmåling av isolert RNA.....	21
3.1.7 Syntese av cDNA.....	22
3.1.8 Optimalisering av primere til RT-PCR.....	23

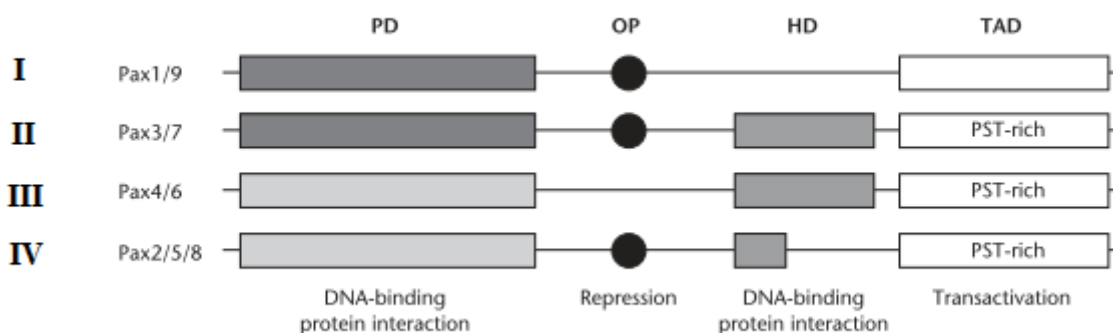
3.1.9	RT-PCR med primere for Pax6.1 og Pax6.2 .....	24
3.1.10	Støyping av agarosegel.....	25
3.1.11	Agarosegelelektroforese av PCR-produkt.....	25
3.1.12	Optimalisering av primere til q-PCR .....	26
3.1.13	q-PCR av cDNA fra sebrafiskembryo.....	27
3.2	EKSTRAKSJON AV PLASMIDER.....	28
3.3	TRANSFEKSJON AV HELA CELLER .....	29
3.3.1	Dyrking av HeLa celler .....	29
3.3.2	Transiente transfeksjoner .....	30
3.3.3	Inkubering av Hela celler i deksametason og RU486 .....	31
3.3.4	Høsting av celler og luciferase reporter-gen-assay.....	32
4.	Resultater .....	33
4.1	Inkubering av sebrafiskembryo med deksametason.....	33
4.2	Optimalisering av primere for RT-PCR .....	33
4.3	cDNA-syntese og korrigerings av input i RT-PCR.....	35
4.3.1	Genuttrykk av Pax6.1 og Pax6.2 i sebrafiskembryo inkubert i deksametason ..	36
4.4	Optimalisering av primere for q-PCR .....	39
4.5	Relativ kvantifisering av genuttrykk .....	41
4.6	MMP2 promoteranalyser med PAX6 og GR i Hela celler .....	50
4.6.1	Transfeksjon med GR.....	51
4.6.2	Transfeksjon med Pax6 .....	52
4.6.3	Transfeksjon med GR og Pax6 sammen .....	53
4.6.4	Transfeksjon med GR og Pax6 ved inhibering av GR med RU486.....	57
5.	Diskusjon .....	60
5.1	Relativ kvantifisering av genuttrykk i sebrafiskembryo.....	60
5.2	Kotransfeksjon med GR og Pax6 på MMP2-promoterens .....	65
5.3	Fremtidige aspekter .....	67
6.	Konklusjon.....	69
7.	Referanser .....	70
8.	Appendiks .....	75

# 1. Introduksjon

I dette prosjektet ble sebrafiskembryo brukt som modellsystem for å se nærmere på glukokortikoid medierte endringer i genuttrykket av Pax-, MMP- og Timp gener. I introduksjonsdelen omtales de utvalgte genene og deres rolle i embryogenesen. Det gis også en introduksjon til sebrafisk som modellsystem, hvor fordelene ved modellsystemet trekkes frem. Tilslutt omtales transkripsjonsfaktorene Pax6 og GR i sebrafisk.

## 1.1 Paired box gener

Paired box (Pax) gener ble for første gang identifisert i fruktfluen *Drosophila melanogaster*. Etter hvert har Pax genene blitt identifisert i mange dyrearter, blant annet menneske, mus, rotter, kylling, vaktel og sebrafisk. Per i dag er det identifisert ni mammalske Pax gener, som klassifiseres i fire subgrupper (I-IV) basert på proteinenes strukturelle domener som illustrert i figur 1.1. Alle Pax genene koder for Pax proteiner som fungerer som spesifikke transkripsjonsfaktorer. Pax familien har blant annet en viktig rolle under utviklingen av sentralnervesystemet (CNS) og hjerne, samt i organogenesen i embryo. Via transaktivering av målgener deltar Pax i regulering av celledifferensiering, proliferasjon, migrering og overlevelse i ulike typer celler (1-3).



**Figur 1.1 De ni Pax genene som er identifisert hos pattedyr er gruppert avhengig av hvilken kombinasjon av domener de har i proteinstrukturen.** Felles for alle Pax gener er paired domain (PD.) Noen av genene har også et oktapeptid (OP) og/eller et homeodomene (HD) i trunkert eller fullstendig utgave. I tillegg har alle Pax genen et transaktiverende domene (TAD.) Illustrasjonen er hentet fra Referanse nr. 1.



### **1.1.1 Strukturer og funksjoner**

Det karakteristiske paired domenet (PD) i den N-terminale enden av proteinet består av 128 aminosyrer og er felles for alle proteinene i Pax familien. Noen av Pax proteinene har ytterligere et DNA-bindende domene, homeodomenet (HD), et høyt konservert domene bestående av 60 aminosyrer. Genene i subgruppe II og III har et fullstendig homeodomenet (Pax 3, 4, 6, 7) mens Pax 2,5 og 8 i subgruppe IV har en trunkert variant. Subgruppe I (Pax 1 og 9) har ikke noe HD. Paired domenet kan binde til DNA alene, mens homeodomenet er avhengig av at PD binder til DNAet samtidig. Et konservert oktapeptid-motiv(OP) er plassert mellom paired domenet og homeodomenet, og gjør at Pax også kan fungere som en transkripsjonsrepressor. Alle Pax proteinene bortsett fra Pax 4 og 6 i subgruppe III har dette oktapeptidet. I den C-terminale enden av proteinet finnes en prolin-serin-threonin-rik region som fungerer som et transaktiverende domene (TAD) (1, 3).

### **1.1.2 Pax i embryo- og organogenese**

Pax genene er viktige for normal utvikling i embryogenesen og organogenesen. Genene koder for en gruppe transkripsjonsfaktorer som blant annet regulerer proliferering og fornyelse av celler, i tillegg til å regulere cellers evne til å unngå apoptose samt celledifferensiering tidlig i embryogenesen (4).

Under utviklingen av CNS er alle Pax genene (unntatt Pax1 og 9) uttrykt i fosterets nevrallrør (2). I organogenesen er Pax genene uttrykt i forskjellige deler av det utviklende fosteret. Pax mediert regulering av organogenesen skjer blant annet i thymus, B-celler i blodet, nyrer, thyroidea, pankreas og øye. Under utviklingen av thymus uttrykkes Pax1, som trolig har en viktig funksjon i utviklingen av epitel i organet. Pax4 og Pax6 er svært viktige for utviklingen av pankreas, Pax4 uttrykkes i insulin-produserende celler og Pax6 uttrykkes i glukagon-produserende celler. Pax6 uttrykkes i tillegg i de fleste delene av øyet (linsen, retina og hornhinnen). Pax2 uttrykkes også i retina. Pax8 er viktig for utvikling av follikulærceller som skiller ut thyroindhormoner fra thyroidea (5). Både Pax2 og Pax8 er uttrykt i nyrene og mutasjoner i genene som koder for de to proteinene kan føre til at det ikke dannes nyrer under organogenesen (6). Pax1 og Pax9 er involvert i utviklingen av skjelettet og er spesielt viktige når ryggsøylen skal dannes (4). Pax3 og Pax7 er viktige for muskelutviklingen (7), og Pax5 er spesielt viktig for utviklingen av B-celler (8).

Uttrykk av Pax genene ses primært under utvikling av embryoet, og så snart celledifferensieringen er fullstendig, reduseres genuttrykket av Pax eller det slås helt av (3). I

noen celler i CNS og endokrint vev f.eks. skjoldbruskkjertelen, thymus og pankreas opprettholdes uttrykket Pax også hos voksne individer. Trolig er uttrykket her knyttet til vevsspesifikke stamceller, og at uttrykk av Pax genene her hindrer terminal differensiering og apoptose av stamcellene (4).

Pax proteinene er svært viktige i proliferasjon og migrasjon av celler under embryogenesen og organdannelsen. Nøyte regulering av Paxene og deres aktivitet er nødvendig for normal fosterutvikling, og mutasjoner i gener som koder for Pax proteinene kan påvirke utviklingen og resultere i utviklingsdefekter på fosteret, i organene hvor det aktuelle Pax proteinet utøver sin aktivitet effekt (3, 4).

### **1.1.3 Pax6**

Pax6 proteinet tilhører subgruppe III og består blant annet av det karakteristiske paired domenet og et homeodomene, som begge to fungerer som DNA-bindene regioner. Det er identifisert en splice-variant kalt Pax6(5a), hvor 14 aminosyrer er satt inn i paired domenet og dermed gjør at domenet har andre egenskaper i forhold til binding til DNA enn paired domenet i Pax6. Pax6(5a) er unikt ved at den binder til DNA via C-terminal enden av det forlengede domenet, mens andre paired domener binder DNA via den N-terminale delen (9). En tredje variant av proteinet er Pax6( $\Delta$ PD), en trunkert variant hvor paired domenet er fraværende. mRNA for alle de tre variantene av Pax6 uttrykkes under utviklingen av hjernen. Uttrykket av Pax6 er sterkest, mens uttrykksnivået av Pax6( $\Delta$ PD) er så svakt at det er uvisst om dette proteinet faktisk har noen funksjon under hjerneutviklingen (10). Pax6 og Pax6(5a) er uttrykt i øyne, hjerne og ryggmarg under utviklingen av organene, Pax6(5a) ved et lavere nivå (11).

### **1.1.4 Pax6 i embryogenesen**

Pax6 genet koder for en høyt konserverte transkripsjonsfaktor Pax6 som i likhet med andre Pax proteiner spiller en sentral rolle under embryogenesen. Pax6 er både involvert i utviklingen av hjernen og CNS, øyne, ører, nese og bukspyttkjertel. Under utviklingen av CNS og hjernen uttrykkes Pax6 i områder av forhjernen og hjernestammen samt ryggmargen. Pax6 er også uttrykt i stor grad i nevrostamceller, hvor den regulerer prolifisering og differensiering av cellene (10).

Pax6 uttrykkes i den optiske koppen (fra nerverøret i forhjernen) og linseplakoden (fra ektoderm laget) i øyet hos vertebrater. Disse strukturene utvikles etter hvert til retina og linsen (1). Heterozygote mutasjoner i Pax6 genen forårsaker aniridia-syndromet hos mennesker, som er karakterisert ved helt eller delvis manglende iris (regnbuehinne). Mutasjoner i Pax6 er også assosiert med katarakt og glukose-intoleranse. Hos mus med homozygote mutasjoner i Pax6 genen blir ikke øyne og nasale strukturer utviklet, musene har alvorlige hjerneabnormaliteter og dør kort tid etter fødselen (3, 12).

I det utviklingen av pankreas starter, blir Pax6 uttrykt sammen med Pax4 i det som er den aller første delen av organet. Etterhvert som organet utvikles, reduseres uttrykket av begge Pax genene og videre uttrykk ses kun i endokrine celler som utvikles til de Langerhanske øyer (4).

Pax6 kan regulere transkripsjon av sine målgener alene eller i samarbeid med andre transkripsjonsfaktorer. De transaktiverende egenskapene dominerer, men Pax6 kan også fungere som en repressor av transkripsjonen, ved å påvirke DNA-binding eller transkripsjonsaktivitet, da i samarbeid med andre transkripsjonsfaktorer (10, 13). To matriks metalloproteinaser (MMP2 og MMP9) er kjente målgener for Pax6. Under sårtilhelning på hornhinnen i øyet fungerer Pax6 som en aktivator og slår på uttrykket av MMP9 (14). I glioblastomaceller i hjernen fungerer Pax6 som en repressor og reduserer uttrykket av MMP2 (15). Timp3 er også et målgen for Pax6, i en muse-fibroblast linje har Pax6 vist seg å nedregulere Timp3 (Mikkola, upubliserte data).

## **1.2 Glukokortikoidreseptoren**

Glukokortikoidreseptoren er en intracellulær kjernereseptor som aktiveres ved ligandbinding. I sin inaktive form inngår reseptoren i et kompleks med flere proteiner bl.a. hsp90 (heat shock protein 90) (16). Aktivert GR dimeriserer og binder til glukokortikoidresponsive elementer (GRE) i promoterregionen av målgenene og fungerer som en transkripsjonsfaktor som regulerer målgenes aktivitet. Dette er den primære glukokortikoid-responsen. I tillegg finnes det en sekundær respons, hvor ligand-aktivert GR kan intereagere med eller regulere andre transkripsjonsfaktorer og dermed indirekte regulere glukokortikoidresponsive gener. (17, 18). Binding av GR til GRE kan regulere transkripsjonen av målgenene på flere måter.

GR kan intereagere med koaktivatorer og rekruttere transkripsjonsmaskineriet slik at transkripsjonen av målgenet kan starte. Ved tett sammenpakking av DNA og histonproteiner til kromatin, er det vanskelig for transkripsjonsaktiverende faktorer å nå til DNAet. I slike tilfeller kan GR rekruttere et kompleks som remodelerer kromatin, slik at DNAet blir mer tilgjengelig for transkripsjonsfaktorene. GR kan også fungere som en repressor og hindre transkripsjon av sine målgener, enten ved direkte inhibering ved binding til negative GRE (nGRE,) ved interaksjoner med andre transkripsjonsfaktorer eller ved konkurranse om binding med andre transkripsjonsfaktorer (18).

Det er identifisert to isoformer av den humane glukokortikoidreseptoren, hGR $\alpha$  og en splice-variant hGR $\beta$ . Aminosyresekvensen i de to isoformene er identiske til og med aminosyre nr. 727.  $\alpha$ - isoformen har en lengre c-terminal ende enn  $\beta$ -isoformen (16, 19). GR proteinet består av et DNA-bindende domene, et ligandbindende domene og to transkripsjonsaktiverende domener. I det DNA-bindende domenet finnes en bestemt aminosyresekvens som gjør at GR kjenner igjen GRE hvor den skal binde. Domenet er også involvert i dimeriseringen som skjer når GR binder til GRE. Proteinstrukturen i det ligandbindende domenet danner en hydrofob lomme hvor glukokortikoider kan binde, og når liganden har bundet seg til reseptoren skjer det en konformasjonsendring hvor denne lommen lukkes. De to transaktiverende domene AF-1 og AF-2 er plassert i den N-terminale og den C-terminale enden av proteinet. Begge de to kan interagere med co-aktivatorer, men AF-2 mediert transaktivering krever at en ligand binder seg til domenet (18, 20).

Inaktiv GR er som regel lokalisert i cytoplasma (18).  $\beta$ -isoformen av GR er lokalisert i cellekjernen og har i motsetning til  $\alpha$ -isoformen, ikke transaktiverende egenskaper. Isteden har den en dominant negativ effekt som påvirker transkripsjonsaktiviteten til GR $\alpha$  (19).

GRs naturlige ligander er glukokortikoidene, en gruppe steroidhormoner som dannes og utskilles fra binyrene. Glukokortikoidene benyttes i stor grad som legemidler siden de har både anti-inflammatorisk og immunsuppressive egenskaper (17). De blir benyttet i behandlingen av mange ulike sykdommer, blant annet inflammasjoner, allergi, astma og en rekke autoimmune sykdommer (16).

### 1.3 Matriks metalloproteinaser

Matriks metalloproteinaser (MMPs) er en gruppe zink-avhengige endopeptidaser, som hydrolyserer og degraderer den ekstracellulære matriksen som befinner seg mellom cellene i vev. Noen av MMPene skilles ut fra cellen og forblir utenfor, mens andre forankres i cellemembranen. MMPenes aktivitet er essensiell i blant annet embryogenese, angiogenese, reparasjon og remodelering av vev etter skader og ved sårtilhelning. Den første MMPen ble oppdaget i rompetroll og det er hittil identifisert 24 ulike MMPer i vertebrater, 23 MMPer er identifisert hos mennesket (21).

MMPene klassifiseres i ulike kategorier basert på substratspesifisitet og organisering av de ulike domenene i proteinene. De ulike gruppene betegnes som kollagenaser, gelatinaser, stromelysiner, matrilysin og membrantype-MMPer samt en samlegruppe for de MMPene som ikke inkluderes i noen av de andre kategoriene.

MMPene består av et propeptid, et katalytisk domene og et hemopexin domene, og de tre domene inkluderer omtrentlig 80, 170 og 200 aminosyrer. I tillegg har MMPene en «hinge-» region mellom det katalytiske domenet og hemopexin domenet. Lengden på denne peptidkjeden varierer. I det katalytiske domenet finnes en zink-bindende region som sammen med cystein i propeptid-domenet sørger for at MMPenes forløpere proMMPene er inaktive. ProMMPene har en signalsekvens bundet til propeptidet. (21, 22).

Fra MMP-kodende gener blir det syntetisert pre-proMMPer. Under translasjonsprosessen fjernes signalsekvensen og proMMPen er klar for videre trinnvis aktivering utenfor cellen. En region av propeptidet er spesielt følsomt for proteinaser og nærvær av en proteinase vil føre til at hele eller deler av propeptidet fjernes. Hvis bare en del av propeptidet kløyves av, kreves nok et aktiveringstrinn, hvor enten en aktiv MMP kommer til for aktivering eller intermedietet som ble dannet sørger for aktivering av seg selv. Når en MMP har blitt aktivert, kan den delta i videre aktivering av andre MMPer (22).

Det er kjent at noen MMPer er målgener for både GR og Pax6. I glioblastomaceller i hjernen sørger Pax6 for nedregulering av MMP2. Det samme genet oppreguleres av GR i sebrafiskembryo. GR oppregulerer også uttrykket av MMP9 i sebrafiskembryo, mens Pax6 oppregulerer uttrykket av MMP9 ved sårheling på hornhinnen i øyet (14, 15, 23).

### 1.3.1 MMPer og embryogenese

MMPene spiller en viktig rolle i utviklingen av embryoet. De sørger for remodelering av ekstracellulær matrix (ECM), slik at celledigrering og organisering av voksende vev kan skje. MMPenes rolle i embryogenesen hos sebrafisk har blitt undersøkt i flere studier og det er nå kjent at MMP2, MMP13 og membran-type MMP $\alpha$  og  $\beta$  (MMP14a og b) er essensielle for normal fosterutvikling (24). MMP2 uttrykkes allerede på 1-cellestadiet i embryoutviklingen og knock-down av dette genet resulterer i embryo med trunkert kroppsakse (25). I morfoloforsøk med MMP13 er det vist flere ulike misdannelser. Embryoene utviklet ødemer i hjerte og plommesekk og kroppsaksen krummet seg. Man så også tilfeller av redusert blodstrøm, tap av struktur i halefinnen, atypisk craniofacial utvikling og hyperplasi i epitelvev (24). MMP14 uttrykkes under gastrulasjonen i embryoutviklingen. I denne perioden dannes de tre kimlagene (ektoderm, endoderm og mesoderm), og det skjer også morfologiske endringer (migrering av celler) som resulterer i dannelse av nevrallplater og bestemmer retningen av kroppsaksen (hode og hale) (26).

MMPene reguleres blant annet av  $\alpha_2$ -makroglobulin og TIMPer, begge er endogene inhibitorer.  $\alpha$ -makroglobulin inhiberer MMPer ved å fange dem inne i makroglobulinmolekylet, mens TIMPer inngår i et kompleks med MMPene de skal hemme (21).

### 1.3.2 Tissue inhibitors of metalloproteinases

Tissue inhibitors of metalloproteinaser (TIMPs) er som tidligere nevnt endogene inhibitorer av MMPene. TIMPene består av 184-194 aminosyrer som utgjør de to subdomenene av proteinet; C-terminalt og N-terminalt subdomene. Ved kompleksdannelse og inhibering av MMPenes aktivitet er det det N-terminale subdomenet som deltar (22). TIMP fungerer da som en slags kile i MMPens substratbindende sete (21).

I en studie hvor TIMP2 sin betydning for embryoutvikling hos sebrafisk ble undersøkt, fant man at både ved knock-down og overuttrykk av TIMP2 ble embryoenes kroppsakse trunkert. Dette viser at det er viktig med nøye regulering av gener involvert i embryoutviklingen (27). I sebrafiskgenomet er det identifisert 5 gener som koder for TIMPer (28).

## **1.4 Sebrafisk**

Sebrafisk, *Danio rerio* er en liten, tropisk ferskvannsfisk som er et av de viktigste modellsystemene tilgjengelig for vertebrater. Sebrafisk-genomet er fullstendig sekvensert og ved sammenligning av motstykker i det humane genomet, er proteinene i underkant av 70 % identisk, mens funksjonelle domener er opp mot 100 % identiske (29). Genetisk og fysiologisk er sebrafisk og pattedyr nokså like (30), spesielt gjelder dette i de tidligste stadiene av embryogenesen. Både voksne sebrafisk og sebrafiskembryo har en rekke egenskaper som gjør denne arten til et godt modellsystem.

### **1.4.1 Fordeler ved sebrafisk som modellsystem**

Sebrafiskhold krever relativt liten plass. En fullvoksen sebrafisk er omtrent 3 cm lang, og flere fisk kan leve sammen i et kar, avhengig av karetts størrelse. Under embryogenesen er den blivende sebrafisken 1-2 mm og på dette stadiet kan flere embryo oppbevares sammen i små brønner (31). Ved avling av sebrafisk kan hver hunnfisk legge opptil 200 egg, dette er en stor fordel når det er ønskelig å gjøre forsøk i stor skala (32, 33). Generasjonstiden hos sebrafisk er kort og hele embryogenesen tar omtrent 72 timer fra fertiliserings tidspunktet. 24 hpf er de begynnende organene i embryoet allerede dannet (34). Og allerede ved 96 hpf er det kardiovaskulære systemet, tarm, lever og nyrer fullt utviklet (35). Embryoene utvikles utenfor mors liv, så det er lett å følge utviklingen av embryo ved hjelp av lupe. Selve embryoet og chorion (fosterhinnen) som de ligger i de første 2-3 dagene er transparent, så det er mulig å se strukturer og de indre organer allerede fra fertiliseringstidspunktet. Dette er svært nyttig i forsøk hvor man er interessert i å se om en kjemisk substans f.eks. et legemiddel påvirker organogenesen. Embryoene kan da inkuberes i embryomedium tilsatt det aktuelle legemidlet det er ønskelig å teste, og substansen absorberes av embryoet via hud og gjeller. Det finnes også teknikker for injisering av substanser som kan benyttes hvis substansens kjemiske egenskaper gjør at absorpsjonsmetoden ikke er optimal (29).

### **1.4.2 Sebrafisk som modellsystem**

Sebrafisk som modellorganisme ble lansert for første gang på begynnelsen av 80-tallet og var tiltenkt studier hvor gener hos vertebrater under embryoutvikling ble undersøkt.

Modellsystemet har utviklet seg gjennom tiden og benyttes nå i ulike typer forskningsprosjekter.

Det har blitt utviklet en rekke mutanter av sebrafisk som brukes som modell for ulike sykdommer (33). Når en modell for patofysiologien bak en sykdom er tilgjengelig, kan søket etter mutasjoner som påvirker sykdomsutviklingen starte. Disse mutasjonene vil være mulige targets for legemidler som kan behandle sykdomstilstanden. Mutasjoner i genet *tcf2* som fører til cyster i nyrene hos sebrafisk er identifisert og er analoge til humane mutasjoner som kan føre til polysystemisk nyresykdom. Det er også identifisert mutasjoner som kan føre til medfødt hjertefeil, arytmi og kardiomyopati, i både menneske og sebrafisk. Ved hjelp av transgene sebrafisk er det også mulig å indusere krefttyper som leukemi og melanoma (30).

Sebrafisk blir også brukt som modellsystem når kjemisk toksisitet skal undersøkes, både når det er ønskelig å se på toksisitetsprofilen til en enkelt substans og ved screening av et stort antall substanser samtidig. Ved utvikling av nye legemidler stilles det krav til toksisitetstesting av substansen og sebrafisk kan benyttes for å bestemme substansens toksikologiske endepunkt, dose-responskurve og mekanismen bak den observerte toksisiteten (36). Det finnes altså en rekke fordeler og ikke minst muligheter ved bruk av sebrafisk som modellsystem. Sebrafisk kan være kostnadseffektivt (30) sammenlignet med andre modellsystemer for pattedyr, og er i mange tilfeller et godt alternativ til tradisjonelle modellsystemer for vertebrater.

### **1.4.3 Pax6 og GR i sebrafisk**

I sebrafisk finnes det to gener som koder for transkripsjonsfaktoren Pax6; Pax6.1 og Pax6.2. På samme måte som i andre vertebrater består de to Pax6 variantene i sebrafisk av to DNA-bindende domener, et paired domene og et homeodomene. De to domenene er identiske i Pax6.1 og Pax6.2 (37). Under utviklingen av sebrafiskembryoet har det blitt observert uttrykk av Pax6.1 i forhjernen, øye, nese plakoden, hjernestammen samt i ryggmargen (38). Pax6.2 er også uttrykt i forbindelse med utvikling av øye og CNS(37). I noen områder uttrykkes begge genene, mens i andre områder uttrykkes bare et av de to. Mest iøynefallende er det at kun Pax6.2 uttrykkes i bukspyttkjertelen hos sebrafisk (39).

Gensekvensen som koder for de to proteinene er 82 % lik, på aminosyrenivå er likheten 98,8 %. I transfeksjoner av HeLa celler var Pax6.2 en mer effektiv transaktivator enn Pax6.1, og to mulige teorier for den observerte forskjellen ble lagt frem. Den ene teorien var at Pax6.2 muligens uttrykkes når effekten av Pax6.1 på målgene ville være for svak. Den andre



teorien var en kompensasjonsmekanisme for det lave uttrykket av Pax6.2 sammenlignet med til uttrykket Pax6.1. Mutasjoner i genene som koder for Pax6.1 og Pax6.2 hos sebrafisk kan påvirke utviklingen av f.eks. øyet (37). Morfolinoforsøk med Pax6.2 har vist at embryo utviklet fra behandlede egg hadde mindre øyne enn kontrollembryoene, noe som bekrefter at Pax6.2 har en viktig rolle i utviklingen av øye (40).

Sebrafiskgenomet inneholder i motsetning til i andre teleost fisker, bare ett GR-kodende gen, zGR. Det er identifisert to ulike isoformer av genet som er ekvivalenter til de to humane isoformene av glukokortikoidreseptoren hGR $\alpha$  og hGR $\beta$ , både når det gjelder struktur, funksjon og uttrykksnivå.  $\beta$ -isoformen av GR hos sebrafisk er nokså lik  $\alpha$ -isoformen, men har en annen aminosyresekvens i den C-terminale enden av proteinet og er litt kortere. zGR $\beta$  er i hovedsak lokalisert i cellekjernen, mens zGR $\alpha$  er lokalisert i både cellekjernen og i cytoplasma. Stimulering av reseptorene fører til translokasjon av  $\alpha$ -isoformen inn til cellekjernen, mens  $\beta$ - isoformen i liten grad påvirkes (19).

Utrykket av GR-kodende mRNA i ulike typer vev (milt, lever, tarm, hjerte, hjerne, gjeller og muskler) hos voksne sebrafisk har blitt undersøkt. Her så man at begge de to isoformene var uttrykt i det undersøkte vevet og at nivået av GR $\beta$ -kodende mRNA var lavere enn GR $\alpha$ -kodende mRNA. Ulike stadier av embryoutviklingen frem til 72 hpf viste et signifikant høyere uttrykksnivå av  $\alpha$ -isoformen enn  $\beta$ -isoformen.  $\beta$ -isoformen har dominant- negativ aktivitet, og i kotransfeksjoner med  $\alpha$  og  $\beta$ -isoformen er det vist en signifikant reduksjon av  $\alpha$ - isoformens transaktiverende egenskaper. *In situ* hybridisering av embryo høstet ved 24 hpf vise at de to isoformene uttrykkes i hele embryoet (19).

Fisk har en interrenal kjertel tilsvarende binyrene hos vertebrater, hvor endogene glukokortikoider som kortisol dannes. Kortisol er en GR-agonist og virker via binding og aktivering av GR. Glukokortikoidene skilles ut som respons på stress og for å oppretthold døgnrytmen. Utskillelsen er nøye regulert av den såkalte stressaksen HPA (hypotalamic-pituitary-adrenal axis) (41).

En studie har undersøkt om GR er kritisk for vekst og klekking av sebrafiskembryo. Uttrykk av GR mRNA ble observert i hele embryoet ved 24 hpf. Ved 48 hpf var uttrykket lokalisert i hode og overkropp, i tillegg til haleregionen, men noe redusert her. Knock-down av GR førte til defekter i utviklende hale og somitter (mesodermale celleansamlinger som dannes symmetrisk på hver side av fosterets ryggstreng) og forsinket somittogenese. Embryoene var også mindre enn normal og få embryo overlevde etter klekking. Den samme studien viste at

knock-down av GR resulterte i 70 % reduksjon av MMP13-kodende mRNA, som er et GR-responsivt gen (42).

## 1.5 Formålet med oppgaven

I dette prosjektet skal det undersøkes om det finnes interaksjoner mellom de to transkripsjonsfaktorene glukokortikoidreseptor (GR) og Pax6 når det gjelder regulering av en gruppe gener som er viktige for normal embryoutvikling: matriks metalloproteinaser (MMP) og deres regulatoriske proteiner, tissue inhibitors of MMP (Timp). To ulike modellsystemer skal benyttes, sebrafiskembryo og mammalske cellekulturer (HeLa celler).

I første del av oppgaven vil sebrafisk bli inkubert med forskjellige konsentrasjoner av et glukokortikoid (deksametason), og vi ønsker å se om dette påvirker genuttrykket til Pax6-, Pax2- samt et utvalg MMP- og Timp-gener. Noen av disse genene (MMP2 og MMP9) er fra før av kjent regulert av både Pax6 og glukokortikoider, resten er ukjent.

I andre del av oppgaven studeres reguleringen MMP2 promoteren nærmere, som et eksempel på et målgen som er kjent regulert av både GR og Pax6 hver for seg. Vi ønsker her å se på hvordan reguleringen av denne promoteren blir når både Pax6 og GR uttrykkes sammen under deksametason-stimulering av HeLa celler.

## 2. Materialer

**Tabell 2.1 Primere brukt til RT-PCR og q-PCR**

Primer	Sekvens 5' til 3'	Produsent
zActin.RT5	GAGAAGATCTGGCATCACACCTTC	Eurogentec S.A.
zActin.RT3	GGTCTCGTGGATACCGCAAGATTC	
zfPax2a.RT5	ACCAGGATATCCACCTCACG	Sigma
zfPax2a.RT3	TAGTGGCGGTCATAGGCAGT	
zfPax2b.RT5	AAACACAGGCCTGGATGAAG	Sigma
zfPax2b.RT3	CCAGTGTGGATGTGGCATAG	
zPax6.1.F	CAGCTCGGCGGTGTGTTTCGTC	Eurogentec S.A.
zPax6.1.R	CTGGGTATATTATCGTTTGTG	
zPax6.2F	CAGCTTGGCGGGGTGTTTGTG	Eurogentec S.A.
zPax6.2R	CTCGGTATGTTATCGTTGGTG	
zfMMP2.RT5	TCACCAGAATCATGGATGGA	Sigma
zfMMP2.RT3	CACCAAAGGAACCCATCATC	
zfMMP3.RT5	ATGCTGCCTACGAGAACACA	Sigma
zfMMP3.RT3	TGAAGGACAAGACAGCATCG	
zfMMP9.RT5	TCTGTGTTTCGTGACGTTTCC	Sigma
zfMMP9.RT3	AGCTCTGGCAAAGCATCAT	
zfMMP9.RT5new	TCGATTCAGTGCAGCTT	Sigma
zfMMP9.RT3new	ACTGCATTTTCAGGAGGTCGT	
zfMMP14a.RT5	CAGGGCTCTAAATGGGACAA	Sigma
zfMMP14a.RT3	GTTGTCCAAGGCTCTGCTTC	
zfMMP14b.RT5	TGCCATGCAGAGATTCTACG	Sigma
zfMMP14b.RT3	AAAGCCATCAGCGAAGAAGA	
zfTimp2.RT5	CGTTCTGCAATGCTGATGTT	Sigma
zfTimp2.RT3	GTTGCACAGCGTGTGATCTT	
zfTimp2a.RT5new	GAGTGCCACCCAGAAGAAGA	Sigma
zfTimp2a.RT3new	AGGCGTAGTGGTCAGACTGG	
zfTimp2b.RT5	GGCAATGACGCTTATGGCTA	Sigma
zfTimp2b.RT3	GGGACACTGGACAATCTTGC	
zfTimp3.RT5	CCTCTTTCGTCATCAGCACA	Sigma
zfTimp3.RT3	TGCACACACACTGGCAGTAA	

zfCav1.RT5	TCATCTGATCGCACTTCAGG	Sigma
zfCav1.RT3	TCTTTTCGTTGATGCTGTCG	
zfGusB.RT5	TTCGACCAGAAGAGGAAGGA	Sigma
zfGusB.RT3	ATCCTCCAGTAACGCTCACG	
zB2mg.RT5	AGGATTGTCTGCTTGGCTCTCT	Sigma
zB2mg.RT3	GGAGTGGAGACTTTCCCCTGTAC	

**Tabell 2.2 Plasmider brukt i transfeksjoner av HeLa celler**

<b>Plasmider</b>
pCI-neo
pCH110
GR
pKW10
pKW-pax6
pGL3-basic
pGL3-MMP2 promoter

### **pCI-neo**

Kommersielt plasmid fra Promega

### **GR-plasmid**

Gave fra Ragnhild Paulsen, Farmasøytisk Institutt, UiO (43).

### **pKW10**

Gave fra Meinrad Busslinger, Institutt for Molekylær Patologi i Wien

### **pKW-Pax6**

Gave fra Meinrad Busslinger, Institutt for Molekylær Patologi i Wien

### **pGL3-basic**

Kommersielt plasmid fra Promega

### **pGL3-MMP2 promoter**

Ca. 1700 bp av MMP2 promoteren var klonet inn i pGL3-basic vektoren av Ellen Tømte, Farmakologisk forskningsgruppe, IFA, UiT.

**Tabell 2.3 Kommersielle kits**

<b>Bruksområde</b>	<b>Navn</b>	<b>Produsent</b>
DNase-behandling av RNA	Heat&Run gDNA removal kit	ArticZymes
Rensing av plasmider til celletransfeksjon	Plasmid Plus Mindi Kit®	QIAGEN

**Tabell 2.4 Bufferløsninger i Plasmid Plus Mindi Kit®**

<b>Navn</b>	<b>Funksjon</b>
Buffer P1	Resuspensjonsbuffer
Buffer P2	Lysis buffer
Buffer S3	Nøytraliseringsbuffer
Buffer BB	Bindingsbuffer
Buffer ETR	Endotoksin vaskebuffer
Buffer PE	Vaskebuffer
Buffer EB	Elueringsbuffer
LyseBlue	Fargeindikator

**Tabell 2.5 Diverse kjemikalier og løsninger**

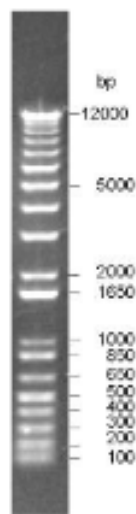
Navn	Bruksområde	Produsent
Trizol® Reagent	RNA-isolering	Ambion
80 % EtOH	RNA-isolering	
Chloroform	RNA-isolering	Fluka Chemica
Isopropanol Prima (2-propanol)	RNA-isolering	Arcus AS
PIS – Penicillin og Streptomycin	Celledyrking	
MEM Non-Essential Amino Acid solution 100x	Celledyrking	Sigma
FBS Superior	Celledyrking	Biochrom AG
Trypsin- EDTA solution (1x)	Cellesplitting	Sigma
DTT 0,1 M	Lysering av celler	
Dexamethasone Water Soluble	Inkubasjon av	Sigma
RU486 Mifepristone	sebrafiskembryo og HeLa celler	Sigma
Absolute ethanol		Sigma
Dual- light Reagent Buffer A	Luciferase assay	Applied biosystems
Dual- light Reagent Buffer B	Luciferase assay	Applied biosystems
Galacton-plus	Luciferase assay	Applied biosystems
Accelerator II	Luciferase assay	Applied biosystems

**Tabell 2.6 Diverse buffere**

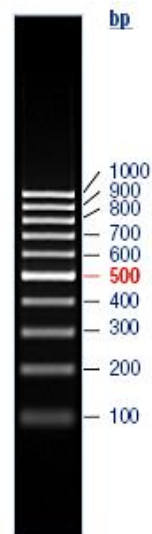
Navn	Bruksområde	Innholdsstoffer	Mengde
<b>50x TAE</b>	Agarose- gelelektroforese	Trisbase	242 g
		Eddiksyre	57,1 ml
		0,5 M EDTA	100 ml
		(pH 8.0)	
		dH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml
			Fortynning 1:50 ble brukt ved gelkjøring

<b>6xT Loading buffer</b>	Gelelektroforese	Xylen Cyanol FF /	0,25 %
		bromphenole blue	
		Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0)	60 mM
		SDS	0,6 %
		Sukrose i vann	40 % (w/v)
<b>PBS</b>	Vasking av celler	NaCl	8 g
		KCL	0,2 g
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24g
		dH <sub>2</sub> O	Ad 1 L.
			pH-justeres med HCl til pH 7.4
<b>2xHBS (Hepes buffered saline)</b>	Celletransfeksjon	NaCl	280 mM
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,5 mM
		Dextrose	12 mM
		Hepes syre	50 mM
			pH-justeres til 7.08 med NaOH eller HCl etter opptining
<b>60x E3 (embryomedium)</b>	Inkubering av sebrafiskembryo	NaCl	17,2 g
		KCl	0,76g
		CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	29 g
		MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	4,9 g
		dH <sub>2</sub> O	Ad 1 L





TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder,  
Invitrogen



GeneRuler 100 bp DNA Ladder,  
Thermo Scientific

**Figur 2.1 Laddere brukt til agarose gelelektroforese**

---

### **Mammalske cellekulturer**

I denne oppgaven ble det brukt Hela-celler, som var ved passasje 75 da dyrkingen ble startet. Cellene ble dyrket i MEM Minimum essential medium eagle with L-glutamin and NaHCO<sub>3</sub> fra Sigma.

### **Bakteriestammer**

Plasmid DNA som ble brukt i transfeksjon av Hela celler ble ekstrahert fra Echeriachia coli, av typen DH5 $\alpha$ . Bakteriene ble dyrket i LB-medium med ampicillin 100  $\mu$ g/ml.

### **3. Metoder**

#### **3.1 SEBRAFISK**

##### **3.1.1 Sebrafiskhold**

Sebrafiskene lever i plastkar, i en rack i et eget sebrafisklaboratorium. Vannet holder en temperatur på 26- 28 °C, pH 6,5-7,5 og en konduktivitet på 650- 750 µS. Lyset i rommet hvor fiskene lever er syklusregulert, slik at det er lyst 14 timer og mørkt 10 timer av døgnet. Lyset kommer gradvis på fra klokken 08.45 hver dag. Plastkarene har en eller to vannkraner i front, hvor det renner vann inn kontinuerlig, samtidig som det sluses ut vann i bakre del og filtreres. Fiskene fores 3 ganger daglig (9.00, 12.00 og 15.00) med pellets ZM-200/300/400 og/eller artemia, avhengig av fiskenes alder.

##### **3.1.2 Avling av sebrafisk**

Han- og hunfisk ble separert ettermiddagen før selve avlingen. Fiskene ble holdt adskilte ved hjelp av en skillevegg i karet eller de ble plassert i hvert sitt kar. Antall fisk av hvert kjønn som ble tatt ut til avl, var avhengig av avlskarets størrelse. Avlskarene som ikke hadde skillevegg, bestod av et ytre plastkar og et indre kar, hvor bunnen var en rist. Risten ble dekket med klinkekuler. Bunnen i karene med skillevegg ble også dekket med klinkekuler. Eggene vil dermed synke ned mellom klinkekulene og gjennom rista, og hindre at fiskene spiser sine egne egg (45).

Neste morgen ble han- og hunfisk satt sammen i avlskarene eller skilleveggen mellom dem ble fjernet, mens lyset i rommet gradvis ble slått på. 1-2 timer senere ble fiskene satt tilbake i karene hvor de hører til. Deretter ble klinkekulene tatt ut og vannet i karet filtrert for å samle opp egg som tilslutt ble overført til petriskåler.

##### **3.1.3 Håndtering av sebrafiskembryo**

Først ble eggene skylt med 1xE3(embryomedium) og renses for urenheter. Videre inkubasjon av eggene foregikk i E3 i et varmeskap ved 28 °C. Embryoutviklingen ble fulgt ved å kikke på embryoene i mikroskop (Nikon SMZ 645, med tilhørende lyskilde Fiberoptic heim,) og hvilket stadium av utviklingen embryoene var på ble bestemt ved hjelp av en artikkel om utvikling av sebrafiskembryo av Kimmel et al (46).

Embryo fra forskjellige avlskar ble blandet sammen, før de ble fordelt i 24-brønnsbrett. Hver brønn ble fylt med 400 µl E3 og 13-14 embryo. Alternativt ble det brukt 6-brønnsbrett. Hver brønn huset da ca. 40 embryo i 2 ml væske.

Embryoene ble inkubert i varmeskap ved 28 °C. Embryo ble høstet på 24, 48 og 72 hpf-stadiet fra de ulike konsentrasjonene. De resterende embryoene ble det byttet medie på, før de ble inkubert videre. Døde og soppinfiserte embryo ble fjernet før nytt medie ble tilsatt.

### 3.1.4 Deksametason i arbeidet med sebrafiskembryo

Deksametason regnes for å være uløselig i vann (47). I dette prosjektet ble en vannløselig variant av deksametason benyttet; Dexamethasone Water-Soluble fra Sigma-Aldrich. I følge produsentens datablad for det spesifikke lotnr: 031M1358V inneholder produktet 68 mg deksametason per g pulver (48). Løseligheten i vann er 25 mg/ml. Bærermolekylet som øker vannløseligheten er 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (49). Dexamethasone Water-Soluble ble oppløst i embryomediet E3. Det ble laget en stock-løsning av 1 mg/ml Dexamethasone Water-Soluble i E3, som tilsvarer 68 µg/ml deksametason. Videre ble det fortynnet to nye løsninger med konsentrasjonene 6,8 µg/ml og 0,68 µg/ml deksametason. Embryoene ble inkubert i disse tre konsentrasjonene fra de var omtrent 3,3 hpf. For hvert inkuberingsforsøk ble det også inkubert embryo i E3 til kontroll i videre forsøk.

**Tabell 3.1 De tre konsentrasjonene av Dexamethasone Water-Soluble som ble brukt i arbeidet med sebrafiskembryo, med tilhørende faktisk konsentrasjon av deksametason**

<b>Konsentrasjon av Dexamethasone Water- Soluble</b>	<b>Faktisk konsentrasjon av Deksametason</b>
0,01 mg/ml	0,68 µg/ml
0,1 mg/ml	6,80 µg/ml
1,0 mg/ml	68,0 µg/ml

### **3.1.5 Isolering av RNA fra sebrafiskembryo**

Nøyaktig 30 embryo fra kontrollgruppen (E3) og hver av konsentrasjonene med deksametason (0,68 µg/ml, 6,8 µg/ml og 68 µg/ml) ble høstet ved 24, 48 og 72 hpf og overført til egne mikrosentrifugerør (1,5 ml.) 300 µl Trizol (Ambion) ble overført til et nytt mikrosentrifugerør og omtrent 200 µl ble sugd opp i en 1 ml sprøyte med 25G kanyle. Deretter ble så mye som mulig av inkuberingsmediet fjernet fra embryoene ved hjelp av pipette, før embryoene ble dratt opp i sprøyten med Trizol. Embryoene ble homogenisert i Trizol ved å sprøyte opp og ned 3 ganger. Siste rest av Trizol ble sugd opp og overført til røret med de homogeniserte embryoene i. Rørene ble satt på is, og frosset ned ved -70°C umiddelbart for oppbevaring inntil videre.

Trizol-behandlede embryo ble tint på is. 700 µl Trizol ble tilsatt til hver prøve, deretter ble prøvene stående i romtemperatur i 5 min. Det ble tilsatt 200 µl kloroform og prøvene ble satt på is i 20 min. Rørene ble vendt et par ganger, hvert 2. minutt. Videre ble prøvene sentrifugert i en Eppendorf miniSpin, ved 9000 rpm i 30 min. Den organiske fasen, nederste i rørene, ble pipettert ut til omtrent 100 µl var igjen. Dette ble gjort for å minske arealet på kontaktflaten mellom den organiske fasen og vannfasen. Prøvene ble deretter sentrifugert ved 9000 rpm i 5 min til. Vannfasen øverst i røret ble overført til et nytt eppendorfrør og volumet av vannfasen ble anslått. Deretter ble en like stor mengde isopropanol tilsatt, før prøvene ble inkubert ved 4 °C i 1 time. Prøvene ble så sentrifugert på 12000 rpm ved 4°C i 30 min, og etter sentrifugering ble så mye som mulig av supernatanten over RNA-pelleten fjernet. 1 ml iskald 80 % EtOH ble tilsatt for vasking av pelleten, før ny sentrifugering ved 12000 rpm i 5 min. Supernatanten ble fjernet og prøvene fikk tørke i avtrekkskap i ca. 15 minutter til all etanol var fordampet. Pelleten ble resuspendert i 30 µl nukleasefritt vann.

### **3.1.6 Konsentrasjonsmåling av isolert RNA**

RNA-konsentrasjon og grad av forurensing ble målt med NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Saveen Werner. Isolert RNA ble fortynnet 1:10 med RNase fritt vann før måling.

### 3.1.7 Syntese av cDNA

Før cDNA-syntesen ble RNAet behandlet med Heat&Run gDNA removal kit, for å eliminere eventuelt genomisk DNA. 1 µl HL-dsDNase og 1 µl 10x Reaction Buffer per 10 µl RNA ble tilsatt til RNAet. RNAet ble så inkubert ved 37 ° i 10 min og deretter ved 55° i 5 min.

cDNA-syntesen ble gjort i en Peltier Thermal cyckler (PTC-200) DNA Engine fra MJ Research og 40 µl cDNA ble gjort i stand i 0,5 ml Thermo tubes fra AB gene.

RNA ble satt på is til tining. I oppsettet ble det brukt 6 µg RNA for å lage cDNA-prøver a' 40 µl. Volumet av resuspendert RNA som var nødvendig, ble beregnet utfra målt konsentrasjon.

Til hvert rør ble det tilsatt beregnet mengde RNA, 2 µl 0,25 µg/µl Random Hexamer Primer (pd(N)<sub>6</sub>), 2 µl 10 mM dNTP og RNase free wather, Qiagen ad 26 µl. Miksen ble satt i varmeblokk (Stuart block heater, SBH130DC) ved 65 °C i 5 min og deretter avkjølt på is i minimum 1 min. Prøvene ble sentrifugert for å samle prøven, etter behov. Videre ble det tilsatt 8 µl 5xFirst-Strand Buffer (Invitrogen,) 2 µl 0,1 M DTT (Invitrogen,) 2 µl RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen) og 2 µl SuperScriptIII RT (Invitrogen) til hvert rør. Prøvene ble så satt i PCR-maskinen hvor følgene oppsett ble gjennomført:

PCR-program for cDNA-syntese:

1. 25 °C i 5 min
2. 50 °C i 55 min
3. 70 °C i 15 min
4. 4 °C til programmet avsluttes manuelt

For å bekrefte at cDNA-syntesen var vellykket, ble det kjørt RT-PCR med primere for housekeeping-genet aktin for alle cDNA prøvene. Følgende PCR-reaksjon med aktinprimere ble satt opp (totalvolum 50 µl):

cDNA	2 µl
dH <sub>2</sub> O	39 µl
10x PCR buffer	5 µl
dNTP 10 mM	1 µl
zActin.RT5 (10 µM)	1 µl
zActin.RT3 (10 µM)	1 µl
DyNAzyme DNA polymerase II (FinnZyme)	1 µl

PCR-reaksjonene hadde følgende oppsett:

1. Denaturering ved 94 °C i 2 min
2. Denaturering ved 94 °C i 30 sek
3. Annealing ved 55 °C i 30 sek
4. Elongering ved 72 °C i 45 sek
5. Returnerer til 2. steg for 24 nye sykluser (totalt 25 sykluser)
6. Elongering ved 72 °C i 5 min
7. 4 °C, forever.

PCR-produktene ble kjørt på 1,5 % agarosegel og gelen ble avbildet. Prosedyre for gelstøping og gelelektroforese er beskrevet i eget avsnitt lengre ned.

Båndenes intensitet på gelen ble vurdert og ulik intensitet ble kompensert for ved å øke mengden cDNA i prøvene som gav svake bånd ved neste RT-PCR. Prøver som ikke behøvde kompensering, ble tilsatt autoklavert vann slik at det totale volumet av cDNA og vann ble likt i alle prøvene.

### 3.1.8 Optimalisering av primere til RT-PCR

Det ble gjort RT-PCR med sebrafiskprimere for de genene som det var ønskelig å se nærmere på i dette prosjektet. I første omgang måtte en passende annealingtemperatur bestemmes. Alle primerene ble derfor testet med annealingtemperatur på 59 °C. cDNA fra sebrafiskembryo høstet ved 72 hpf ble brukt som templat i optimaliseringstrinnet.

Oppsett for testing av primere ved RT-PCR:

cDNA	2 µl
dH <sub>2</sub> O	39 µl
10x PCR buffer	5 µl
dNTP 10 mM	1 µl
5' primer (10 µM)	1 µl
3' primer (10 µM)	1 µl
DyNAzyme DNA polymerase II	1 µl

Følgende PCR-program ble brukt ved optimalisering av primere:

1. Denaturering ved 94 °C i 2 min
2. Denaturering ved 94 °C i 25 sek
3. Annealing ved 59 °C i 50 sek
4. Elongering ved 72 °C i 45 sek
5. Elongering ved 72 °C i 3 min
6. Inkubering ved 4 °C til programmet avsluttes manuelt

Trinn 2-4 repeteres i totalt 30 sykluser.

PCR-produktene ble kjørt på 1,5 % agarosegel og primere som viste tydelige bånd på gelen ble brukt videre i forsøket. Primere som ikke gav bånd eller hvor båndene var svake ved annealingtemperatur 59 °C, ble testet videre med to nye annealingtemperaturer på 55,7°C og 57,4 °C. For primere som ikke fungerte ved noen av de tre temperaturene, ble det bestilt inn nye stockløsninger. Primere som ikke fungerte optimalt, ble ekskludert fra forsøket.

### **3.1.9 RT-PCR med primere for Pax6.1 og Pax6.2**

I PCR-oppsettet med Pax6.1 og Pax6.2 ble 2x DyNAzyme II mastermix (Finnzymes) benyttet. Bruk av mastermiks reduserer antall pipetteringer, det er tidsbesparende samtidig som risikoen for feil blir mindre. Følgende PCR-reaksjon ble benyttet for de to primerne (totalvolum 50 µl):

2xDyNAzyme mastermix	25 µl
5' primer (10 µM)	1 µl
3' primer (10 µM)	1 µl
dH <sub>2</sub> O	21 µl
cDNA	2 µl

Følgende PCR-program ble brukt til primerne Pax6.1 og Pax6.2:

7. Denaturering ved 94 °C i 2 min
8. Denaturering ved 94 °C i 25 sek
9. Annealing ved 59 °C i 50 sek
10. Elongering ved 72 °C i 45 sek
11. Elongering ved 72 °C i 3 min
12. Inkubering ved 4 °C til programmet avsluttes manuelt

Trinn 2-4 repeteres i totalt 30 sykluser.

### **3.1.10 Støyping av agarosegel**

Etter PCR-reaksjonen ble produktene kjørt på 1,5 % agarosegel. Agarose ble veid inn (1,5 g agarose per 100 ml 1xTAE) og blandet i 1xTAE. Blandingen ble kokt opp i mikrobølgeovn og ristet underveis, til alt var løst opp. Flytende 1,5 % agarose ble oppbevart ved 65°C i varmeskap. Gelform og brønnekam av passende størrelse ble montert i gelstøpningsapparatet. EtBr (1 mg/ml) ble tilsatt til agarosen til final konsentrasjon 0,5 µg/ml for å muliggjøre detektering av bånd på gelen ved hjelp av UV-lys etter gelkjøring. Agarose ble fylt i formen og gelen fikk stivne.

### **3.1.11 Agarosegelelektroforese av PCR-produkt**

Stivnet gel ble lagt i et gelkar (mini-sub eller wide mini-sub cell GT, BIORAD) fylt med 1xTAE. 25 µl PCR-produkt ble tilsatt 5 µl 6xT loading buffer, 25 µl av hver prøve ble så satt i hver sin brønn på gelen. TrackIt 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) ble påsatt i første brønn, deretter PCR-produktene etter oppsettet vist i tabell 3.1. Ved primeroptimalisering ble det brukt 3 µl av ladder og ved testing av cDNA ble det brukt 10 µl. PCR-produktene ble kjørt på gelen ved 60 V i 50 min. Tilslutt ble det tatt bilder av agarosegelen ved hjelp av Gel Doc 2000 fra BIO RAD og bildeprogrammet Quantity One 4.3.0.



**Tabell 3.2 Standardoppsett for pcr-produkter på agarosegel etter RT-pcr.**

Brønn nr. 1 er første brønn fra venstre.

Brønn		
1	Ladder	
2	E3	24 hpf
3	Deksametason 0,68 µg/ml	
4	Deksametason 6,8 µg/ml	
5	Deksametason 68 µg/ml	
6	E3	48 hpf
7	Deksametason 0,68 µg/ml	
8	Deksametason 6,8 µg/ml	
9	Deksametason 68 µg/ml	
10	E3	72 hpf
11	Deksametason 0,68 µg/ml	
12	Deksametason 6,8 µg/ml	
13	Deksametason 68 µg/ml	

### 3.1.12 Optimalisering av primere til q-PCR

Primere for alle genene som skulle undersøkes ble testet med cDNA fra sebrafisk og negative kontroller (NTC) med bare vann istedenfor cDNA, for å avdekke eventuelle primer-dimers i smeltekurvene.

Det ble laget en mastermiks for hvert primerpar med følgende innhold:

BrilliantII SyBR Green QPCR Mastermix	12,5 µl
dH <sub>2</sub> O	9,5 µl
5' primer (10 µM)	0,5 µl
3' primer (10 µM)	0,5 µl

23 µl mastermix overført til hver brønn på 96-brønnsbrett og 2 µl cDNA eller RNase-fritt vann ble tilsatt. q-PCR-programmet for SyBR Green ble kjørt.

Etter q-PCR ble smeltekurvene undersøkt. For primere med dobbeltopper eller skuldre i kurven, ble PCR-produktet kjørt på gel for å se om toppene eller skuldrene kunne påvises som produkter på gelen. Dobbeltopper kan tyde på dannelse av primer-dimers. Primere som gav to topper i smeltekurven og to bånd på gelen, ble ekskludert fra forsøket.

### **3.1.13 q-PCR av cDNA fra sebrafiskembryo**

Det ble syntetisert to batcher med cDNA for q-PCR som i utgangspunktet skulle bestå av prøver fra alle tidspunkter og konsentrasjoner. Den siste batchen mangler cDNA fra 72 timer gamle embryo inkubert i 0,68 µg/ml deksametason da et eller annet gikk galt under RNA-isoleringen eller DNase-behandlingen.

Syntetisert cDNA ble fortynnet 1:3 med RNase-fritt vann før bruk. Det ble laget en mastermix per primerpar med følgende innhold:

BrilliantII SyBR Green QPCR Mastermix	12,5 µl
dH <sub>2</sub> O	9,5 µl
5' primer (10 µM)	0,5 µl
3' primer (10 µM)	0,5 µl

23 µl mastermiks ble fordelt i hver brønn på et 96-brønnsbrett og 2 µl cDNA ble tilsatt i hver brønn. For hver prøve ble det gjort i stand to duplikater. Det ble pipettert opp og ned 10 ganger, og store luftbobler ble fjernet.

Brettet ble satt inn i q-PCR maskinen Stratagene Mx 3000P fra Agilent og q-PCRprogrammet ble startet.

q-PCR reaksjonene hadde følgende syklusoppsett:

1. Gradvis temperaturøkning fra 25 °C til 95 °C
2. Denaturering ved 95 °C i 10 min
3. Denaturering ved 95 °C i 30 sek
4. Annealing ved 58 °C i 1 min
5. Elongering ved 72 °C i 1 min
6. Returnerer til steg 3 for 39 nye sykluser (totalt 40 sykluser)
7. 95 °C i 1 min
8. 55 °C i 30 sek
9. 95 °C i 30 sek

Etter hver q-PCR ble smeltekurvene til primerne sjekket for eventuelle dobbelttopper. Ct-verdiene for prøvene ble også sjekket. Forskjellen mellom to duplikater bør ikke være mer enn 0,5 i ct-verdi. Det ble også kontrollert at ct-verdiene for de negative kontrollene NoRT (inneholder RNA som har gjennomgått cDNA-synteseprosessen uten DNA-polymerase) og NTC (inneholder mastermiks tilsatt vann i stedet for cDNA) ble No ct. PCR-produkt fra primere med dobbelttopper i smeltekurven ble kjørt på gel for å sjekke om to forskjellige produkter var dannet.

Ct-verdien (treshold cycle) forteller hvor mange amplifiseringssykluser som kreves for at prøven skal gi et fluorescenssignal som er over bakgrunnsnivået. Jo lavere Ct-verdien er, jo raskere ble det dannet et detekterbart produkt, noe som indikerer mengden av templat gjenkjent av primerne i prøvene (50). Videre ble de målte ct-verdiene benyttet for å gjøre en relativ kvantifisering av genuttrykk i deksametason-behandlede embryo i forhold til kontrollen som her var sebrafiskembryo som ikke ble inkubert i deksametason.

### **3.2 EKSTRAKSJON AV PLASMIDER**

Plasmidene ble rensert ved hjelp av QIAGEN Plasmid Plus Mindi Kit®

Autoklaverte erlenmeyerkolber (250 ml) ble fylt med 60 ml LB tilsatt ampicillin 100 µg/ml. Frysestock med plasmid ble hentet opp fra fryser (-70.) De ulike frysestockene ble berørt med en tannstikke hver, som etterpå ble puttet i hver sin erlenmeyerkolbe. Erlenmeyerkolbene ble plassert i en ristende inkubator (225 rpm) Unitson HT INFORS. Prøvene ble inkubert her over natt i omtrent 17 timer ved 37 °C.

Neste morgen ble omtrent 50 ml fra hver kultur overført til sentrifugerør og sentrifugert ved 2500 rpm, ved 4 °C i 30 min i en Eppendorf Centrifuge 5810R. Etter sentrifugering ble supernatanten helt ut av røret. 4 ml Buffer 1 ble tilsatt til hvert rør, og pelleten ble resuspendert ved pipettering. 4 ml Buffer 2 ble tilsatt for å lysere bakteriene, og innholdet i røret ble mikset sammen ved forsiktig vending, før løsningene ble inkubert ved romtemperatur i ca. 3 min. 4 ml Buffer S3 ble tilsatt for å nøytralisere lysatet og rørene ble vendt 4-6 ganger for å mikse innholdet. Lysatet ble overført til plastsprøyter med korker og deretter inkubert i romtemperatur i 10 minutter. Stemplene ble montert på sprøytene og korkene ble skrudd av. Lysatet ble filtrert igjennom et filter i sprøyten og over til et nytt eppendorfrør. QIAGEN Plasmid Plus Spin kolonner ble montert på QIAvac som var koblet til suget på vasken. Kolonneforlengere ble satt på kolonnene for å gjøre det lettere å helle i kolonnene. Det ble tilsatt 2 ml Buffer BB til lysatet og rørene ble vendt 4-6 ganger. Deretter ble lysatet overført til spin-kolonnene. Da all væske hadde passert kolonnene ble DNAet vasket med 0,7 ml ETR og deretter 0,7 ml Buffer PE. Kolonnene ble så overført til kolonnerør og sentrifugert ved 13000 rpm i 1 min, slik at gjenværende væske i kolonnen kom ut. Kolonnene ble så flyttet over i nye eppendorfrør og tilsatt 200 µl Buffer EB. Kolonnene ble stående i minst 1 min før DNAet ble eluert ved sentrifugering ved 13000 rpm i 1 minutt. Konsentrasjonsmåling ble gjort ved nano-drop, ved bruk av en ND-1000 V3.8.1. DNAet ble fortynnet med autoklavert vann, slik at brukskonsentrasjonen var omtrent 500 ng/µl. Ny måling ble gjort for å bestemme eksakt konsentrasjon.

### **3.3 TRANSFEKSJON AV HELA CELLER**

#### **3.3.1 Dyrking av HeLa celler**

HeLa celler i passasje 75 ble hentet opp fra en nitrogentank. Røret inneholdt ½ ml celler som ble tint ved å tilsette litt medium som var varmet til 37 °C på forhånd. Cellene ble overført til en 200 ml dyrkningsflaske med filterkork og tilsatt medie ad 10 ml. Mediet (MEM) som ble brukt bestod av Minimum essential medium Eagle with L-glutamin and NaHCO<sub>3</sub>, 10 % kalveserum (FCS), 1 % antibiotika – penicillin og streptomycin og 1 % essensielle aminosyrer. Cellene ble så satt i en CO<sub>2</sub> (5%)-inkubator ved 37 grader over natt. Cellenes utvikling ble observert over tid, og de ble splittet i forholdet 1:10 hver 3-4 dag. Ved splitting ble cellene vasket med 10 ml 1xPBS, før 1 ml Trypsin ble tilsatt for å løsne cellene fra flasken. Etter 3-4 minutter i varmeskap hadde cellene løsnet og 9 ml medie ble tilsatt for å

nøytraliserer. 1 ml av innholdet i flasken ble tatt med videre og tilsatt 9 ml medie, før videre inkubering. Etterhvert ble cellene flyttet over og dyrket videre i en 800 ml dyrkningsflaske med 25 ml medie.

### **3.3.2 Transiente transfeksjoner**

pGL3-MMP2-promoter og tomvektoren pGL3-basic som begge har et gen som koder for luciferase ble benyttet i transfeksjonsoppsettene. Plasmidet pCH110 som inneholder et gen som koder for beta-galactosidase, ble tilsatt i lik mengde i alle transfeksjonene for å justere for forskjell i transfeksjonseffektivitet.

Hver enkelt transfeksjon i et oppsett ble gjort med tre paralleller (1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c osv.) Dagen før transfeksjonen, ble det sådd ut 60.000 Hela celler per brønn på 6-brønnsbrett, med et medievolum på 2 ml. Cellene ble inkubert ved 37 °C over natt, og 1-2 timer før transfeksjonsmiksen ble tilsatt, ble det gamle mediet sugd av og 1 ml nytt medie tilsatt i hver brønn.

#### **3.3.2.1 Titrering av GR på MMP2-promoter**

Tomvektorene pGL3-basic og pCI-neo ble benyttet som kontroller. Hver brønn ble tilsatt 0,5 µg pGL3-basic eller pGL3-MMP2 promoter og 0,05 µg pCH110. Tre ulike konsentrasjoner (0,25 µg, 0,50 µg og 1,0 µg) av GR og kontrollvektoren pCI-neo ble testet ut i kombinasjon med MMP2 og pGL3-basic.

#### **3.3.2.2 Titrering av Pax6 på MMP2-promoter**

pKW-Pax6 ble transfektert med pGL3-MMP2 promoteren. Her ble tomvektoren pKW-10 brukt som kontroll. Hver brønn ble tilsatt 0,5 µg pGL3-basic eller pGL3-MMP2 promoter og 0,05 µg pCH110. Tre ulike konsentrasjoner (0,25 µg, 0,50 µg og 1,0 µg) av pKW-Pax6 uttrykksvektor og kontrollen pKW-10 ble testet ut i kombinasjon med MMP2 og pGL3-basic.

#### **3.3.2.3 Kotransfeksjon med Pax6 og GR på MMP2-promoter**

Hver brønn ble tilsatt 0,5 µg pGL3-basic eller pGL3-MMP2 promoter og 0,05 µg pCH110. Tre ulike konsentrasjoner (0,25 µg, 0,50 µg og 1,0 µg) av uttrykksvektoren for Pax6 ble transfektert med 0,50 µg uttrykksvektor for GR. Kontroller ble satt opp med GR og tre

konsentrasjoner av tomvektor pKW-10, tomvektor pCi-neo og tre konsentrasjoner av uttrykksvektor for Pax6, samt pCI-neo og pKW-10 sammen.

For detaljerte transfeksjonsoppsett, se appendiks 2-5.

Det ble laget en mastermiks for hver transfeksjon med tilstrekkelig volum til 4 brønner. Beregnet volum av de ulike plasmidene ble blandet med vann, til totalt volum 175,2  $\mu\text{l}$ . Videre ble 24,8  $\mu\text{l}$  2 M  $\text{CaCl}_2$  tilsatt dråpevis til hvert rør, og røret ble flikket på etter tilsetting. 200  $\mu\text{l}$  2xHBS (pH 7.08) ble pipettert i egne rør. DNA-mastermiksen ble tilsatt dråpevis til hvert sitt rør med 2xHBS og røret ble flikket på etterpå. 100  $\mu\text{l}$  av transfeksjonsmiksen ble dryppet utover i hver brønn og cellene ble inkubert ved 37 °C over natt i  $\text{CO}_2$ -inkubator. Neste morgen ble det byttet til 1 ml nytt medie. 4 timer senere ble det tilsatt deksametason til 100 nM finalt, til de transfeksjonene som skulle ha det. Cellene ble høstet omtrent 20 timer senere.

### **3.3.3 Inkubering av Hela celler i deksametason og RU486**

Det ble laget en stockløsning av Dexamethasone Water Soluble i 1xPBS med en konsentrasjon på 1 mM deksametason. 10  $\mu\text{l}$  av stocken ble overført til et eppendorfrør med 50 ml MEM, slik at sluttkonsentrasjonen av deksametason ble 200 nM. 1 ml av denne fortyningen ble tilsatt til celler i 1 ml medie, og sluttkonsentrasjonen i brønnene ble da 100 nM.

Det ble også gjort et forsøk med deksametason i kombinasjon med GR-antagonisten RU486 (mifepristone). Det ble laget en stockløsning ved å veie inn omtrent 8,6 mg RU486 og løse det i Absolut ethanol til en konsentrasjon på 20 mM. Stockløsningen ble videre fortynt 1:100 i MEM. Av denne fortyningen ble det tatt ut 10  $\mu\text{l}$  per brønn og blandet med medie (1ml per brønn.) Cellene ble tilsatt RU486 30 min før tilsetting av deksametason. Da det ble tilsatt 1 ml 200 nM deksametason, ble det tilsatt nye 10  $\mu\text{l}$  RU486, for å opprettholde en sluttkonsentrasjon av RU486 på 2  $\mu\text{M}$  i brønnene. Cellene ble inkubert ved 37 °C i  $\text{CO}_2$ -inkubator over natt.

### 3.3.4 Høsting av celler og luciferase reporter-gen-assay

Før høstingen startet ble det laget en lysisbuffer ved å blande Tropix lysis solution (beregnet 100 µl per brønn) med DTT til en final konsentrasjon på 0,5 mM. Mediet ble fjernet fra brønnene og cellene ble vasket to ganger med ca. 1 ml 1xPBS. Rester av PBS ble sugd bort og 100 µl lysisbuffer ble tilsatt til hver brønn. Brettene stod deretter på vippeplate Unimax 2012, Heidolph Instruments med speed 3 i 15 min. Videre ble cellelysatet overført fra brønnene til eppendorfrør og sentrifugert i 2 min ved 13.000 rpm for å bli kvitt eventuelt celledbris. 20 µl fra hver prøve ble overført til 96 brønnersbrett.

Verdier for luciferase-aktivitet (program 05) og β-galactosidase (program 06) ble målt ved hjelp av Luminoskan RT fra Labsystems, med 45 minutters mellomrom. Til disse målingene ble det per brønn beregnet 15 µl Buffer A og 60 µl Buffer B. Buffer B ble like før bruk tilsatt 1 % Galacton. Lysisbuffer ble brukt som blank i målingene. 45 minutter etter at luciferasemålingene var startet ble Accelerator II tilsatt (60 µl per brønn) for måling av β-gal aktivitet.

## **4. Resultater**

I dette prosjektet ble to ulike modellsystemer benyttet, av den grunn er resultatene delt inn i to hoveddeler, med flere underkapitler. Første del av oppgaven omhandler hvordan transkripsjonsfaktoren Pax6 og noen utvalgte Pax-, MMP- og Timp-gener påvirkes av deksametason-behandling i sebrafiskembryo.

I del 2 presenteres resultater fra transiente transfeksjoner utført i Hela celler, hvor MMP2-promoterens aktivitet i nærvær av de to transkripsjonsfaktorene GR og Pax6 ble undersøkt ved hjelp av luciferase reporter-genassay.

### **4.1 Inkubering av sebrafiskembryo med deksametason**

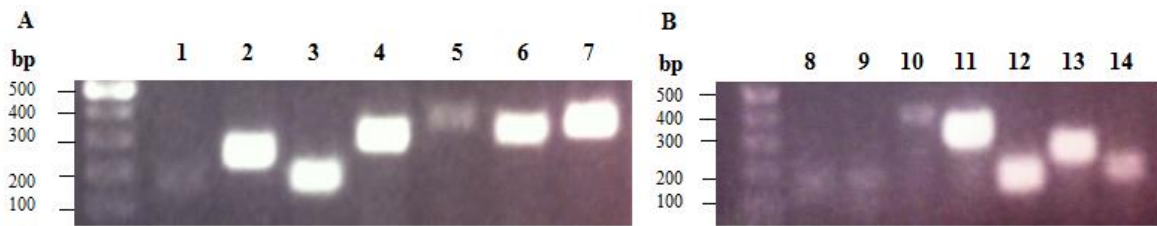
Det er kjent at GR og Pax6 har en del felles målgener, blant annet noen MMP'er (MMP2 og MMP9) (14, 15, 23). På bakgrunn av dette var det av interesse å finne ut av om deksametason behandling som kan aktivere GR, vil påvirke Pax6 uttrykket i seg selv. Det var også av interesse å se på om et utvalg av MMP'er og Timper blir påvirket av deksametason. Pax2 ble inkludert som et ekstra Pax gen.

Sebrafiskegg ble fordelt i brønner og inkubert i E3 og tre ulike konsentrasjoner av deksametason 0,68 µg/ml, 6,8 µg/ml og 68 µg/ml ved omtrent 3,3 hpf. Ved 24, 48 og 72 hpf ble det høstet embryo til RNA-isolering og analyser av genuttrykk.

### **4.2 Optimalisering av primere for RT-PCR**

Før cDNA fra de deksametason-inkuberte sebrafiskembryoene ble tatt i bruk, var det viktig å bekrefte at primersettene fungerte og ga produkt etter RT-PCR. PCR-produktene måtte ha ok intensitet på gel, slik at det var mulig å si noe om opp- og nedregulering i forhold til kontrollen i forsøkene som skulle gjøres. Primersett for genene som det var ønskelig å se på i dette forsøket, ble først testet ut i optimaliseringsprogrammet PRIMEOP med en annealingtemperatur på 59 °C. Figuren under (figur 4.1 A og B) viser båndene for PCR-produktene fra de ulike primersettene etter gelelektroforese.





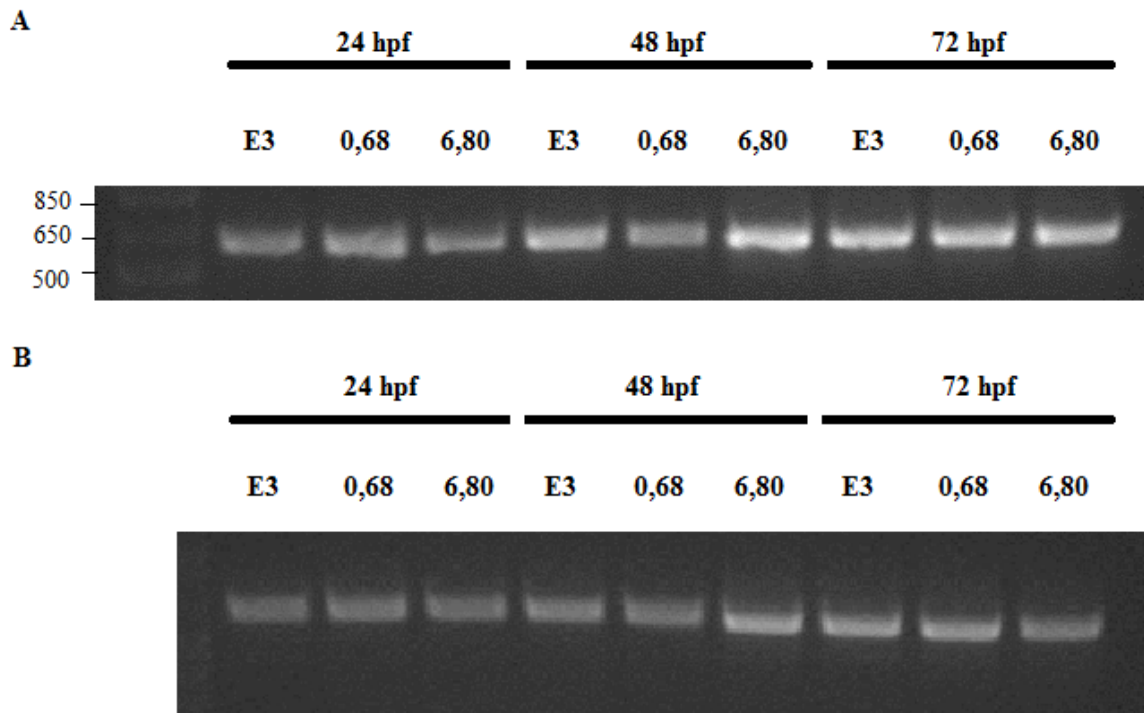
**Figur 4.1 Kjøring av PCR-produkt på 1,5 % agarosegel etter primeroptimalisering.**

Primere for 1: MMP3 (59 °), 2: Timp3 (59 °), 3: GusB (59 °), 4: MMP2 (59 °), 5: MMP9 (59 °), 6: MMP14a (59 °), 7: MMP14b (59 °), 8: MMP3 (55,7 °C), 9: MMP3 (57,4 °C), 10: Timp2a (59 °), 11: Timp2b (59 °), 12: Cav1 (59 °), (ble ikke brukt videre i oppgaven.) 13: Pax2a (59 °) og 14: Pax2b (59 °) ble testet ut med 30 amplifiseringssykluser og annealingtemperaturene angitt i parentes. cDNA fra sebrafiskembryo inkubert i E3, høstet ved 72 hpf ble brukt som templat. Halvparten av volumet etter PCR ble tilsatt 6xT Loading buffer og kjørt på en 1,5 % agarosegel for visualisering. På gelen i panel A ble GeneRuler 100bp DNA Ladder benyttet og i panel B ble The TrackIt 1 kb Plus DNA Ladder benyttet.

MMP3, primersett nr. 1 på gelen, hadde et veldig svakt produkt ved 165 bp og ble testet med to nye annealingtemperaturer, 55,7 og 57,4 °C. Brønn 8 og 9 viser resultatet etter temperaturendringene, altså ingen bedring. Primersett nr. 5, MMP9 og primersett nr. 10, Timp2a gav også svake bånd ved de tre temperaturene som ble testet. Det ble bestilt inn nye Timp2a- og MMP9-primere. Primersettet for Timp2a ble vurdert som ok og ble benyttet videre i q-PCR, mens primersettet for MMP9 gav uspesifikke produkter i q-PCR og ble dermed ekskludert fra forsøket. Sekvensen benyttet til design av primersettet til MMP3 ble hentet fra sebrafisk genomdatabasen i Ensembl i Oktober 2012. I januar 2013 var ikke MMP3-genet lengre søkbart i den samme databasen, noe som tyder på en feilannotering. Blast med MMP3 sekvensen fra oktobert ga et par månedre senere hit mot et område som ikke var annotert som MMP3. Det var altså ikke mulig å lage nytt primersett for MMP3, og MMP3 ble dermed ekskludert fra forsøksoppsettet. PCR-produktene fra primersettene for Timp3, GusB, MMP2, MMP14a, MMP14b, Timp2b, Pax2a og Pax2b ga tydelige bånd på gelen. I utgangspunktet skulle det gjøres RT-PCR med disse primersettene etter cDNA-syntese.

### 4.3 cDNA-syntese og korrigering av input i RT-PCR

Ved hjelp av revers transkriptase ble cDNA syntetisert fra RNA isolert fra sebrafiskembryo. I utgangspunktet ble lik mengde RNA brukt til cDNA-syntese for alle prøvene. For å kunne se om cDNA-syntesen hadde vært like effektiv for alle prøvene, ble cDNAet amplifisert med primersett for husholdningsgenet aktin og kjørt på 1,5 % agarosegel tilsatt etidiumbromid for visualisering.



**Figur 4.2 RT-PCR med primere for aktin ble brukt til å justere input av cDNA i RT-PCR reaksjonen.** A viser båndene før justering, B viser båndene etter justering. I A er input av cDNA 2  $\mu$ l i alle reaksjoner. I B er det brukt 4  $\mu$ l cDNA for alle prøvene fra embryo høstet ved 24 hpf, samt prøven fra embryo høstet ved 48 hpf, inkubert med 0,68  $\mu$ g/ml deksametason. For embryo inkubert i E3 høstet ved 48 hpf ble det brukt 3  $\mu$ l, og for de resterende prøvene ble det brukt 2  $\mu$ l cDNA som input.

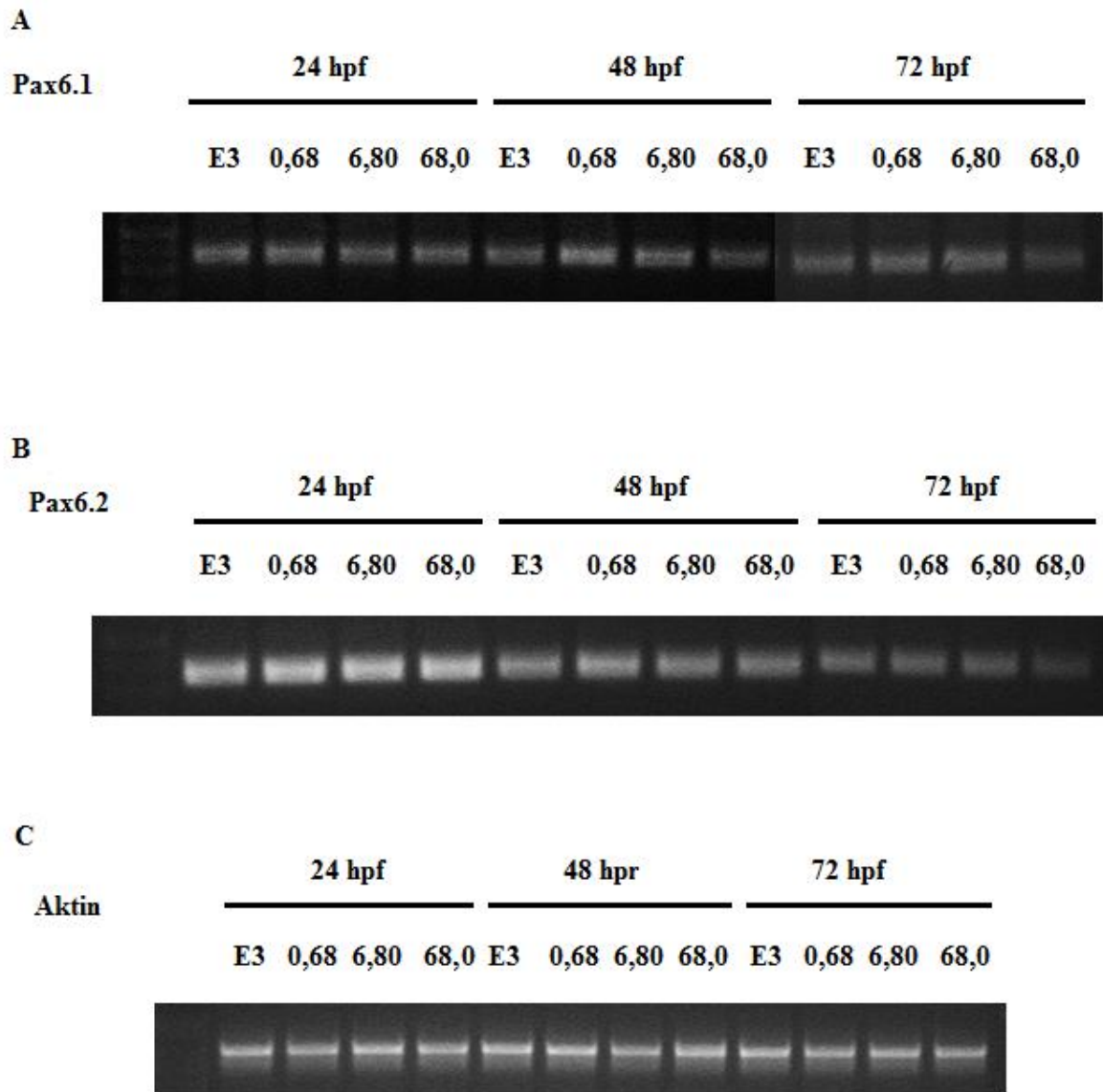
Produktet som ble dannet i PCR med aktinprimere (fig. 4.2) var synlig på gelen ved ca 650 bp. Videre skulle uttrykket av noen utvalgte gener i sebrafiskembryoene undersøkes. For å kunne sammenligne genuttrykk i prøver og kontroller fra de tre tidspunktene, er det viktig at input av cDNA er det samme for alle prøvene, slik at båndene for aktin i utgangspunktet har lik intensitet. Som vist på figur 4.2 A, var ikke dette tilfelle for den første batchen med cDNA som ble syntetisert. Båndene for embryo høstet ved 72 hpf var omtrent dobbelt så sterke i intensitet som båndene fra embryo høstet ved 24 hpf. Båndene for embryo høstet ved

48 hpf hadde tre ulike intensiteter. Kontrollens (E3) intensitet var en mellomting mellom embryo fra 24 og 72 hpf. Laveste konsentrasjon av deksametason gav intensitet på nivå med embryo høstet ved 24 hpf, mens høyeste konsentrasjon av deksametason gav intensitet på nivå med embryo høstet ved 72 hpf.

For å oppnå lik input av mengde cDNA fra de ulike prøvene, ble cDNA-volumet i PCR-reaksjonene justert i forhold til resultatet med aktinprimerne. Opprinnelig ble det tilsatt 2 µl cDNA som templat til hver PCR-reaksjon. Dette volumet ble beholdt for de prøvene som hadde sterkest aktinbånd. Mengden cDNA i prøvene som gav de svakeste båndene ble doblet til 4 µl. En av prøvene gav et bånd med intensitet omtrent midt i mellom de sterke og de svake. For denne prøven ble det forsøkt 3 µl cDNA. Alle prøvene ble fylt opp med vann i tillegg til PCR-buffer, dNTP, primersett og enzym, slik at sluttvolumet ble det samme i alle prøvene. Figur 4.2 B viser aktinbåndenes intensitet etter kompensering av mengde cDNA som input i PCR-reaksjonen. Båndenes intensitet ble vurdert til å være omtrent lik for alle prøvene.

#### **4.3.1 Genuttrykk av Pax6.1 og Pax6.2 i sebrafiskembryo inkubert i deksametason**

Underveis i prosjektet ble ytterligere en konsentrasjon av deksametason (68 µg/ml) inkludert, og mengde cDNA input ble justert som beskrevet over, før prøvene ble benyttet i RT-PCR med primere for Pax6.1 og Pax6.2. Prøvene deles i tre grupper etter tidspunkt for høsting av sebrafiskembryo. Hver gruppe har en kontroll (E3) og tre prøver av cDNA fra sebrafiskembryo inkubert i ulike konsentrasjoner av deksametason 0,68 µg/ml, 6,80 µg/ml og 68,0 µg/ml.



**Figur 4.3** Genuttrykk av Aktin (A), Pax6.1 (B) og Pax6.2 (C) i sebrafiskembryo inkubert i E3, 0,68  $\mu\text{g/ml}$ , 6,8  $\mu\text{g/ml}$  og 68  $\mu\text{g/ml}$  deksametason høstet ved 24, 48 og 72 hpf. Input av cDNA var 2  $\mu\text{l}$  for alle prøvene i de tre panelene A, B og C. De tre deksametason-konsentrasjonene (0,68, 6,80 og 68,0) som er oppgitt i figuren har benevningen  $\mu\text{g/ml}$ . **A:** I embryo høstet ved 24 hpf, inkubert med laveste konsentrasjon av deksametason, ser uttrykket av Pax6.1 ut til å være oppregulert, sammenlignet med kontroll og de to høyere konsentrasjonene. Embryo høstet ved 48 og 72 hpf følger samme trend med oppregulering av genuttrykk i embryo inkubert i 0,68  $\mu\text{g/ml}$ , 6,8  $\mu\text{g/ml}$  deksametason. Høyeste konsentrasjon i de to gruppene så ut til å være på nivå med kontrollen, mulig svak nedregulering i embryo høstet ved 72 hpf. **B:** Pax6.2 er oppregulert i de embryoene som ble høstet ved 24 hpf som hadde vært i inkubert med deksametason. I 48 timer gamle embryo er Pax6.2 oppregulert hos de embryoene som ble inkubert i 0,68  $\mu\text{g/ml}$  deksametason og nedregulert hos embryo inkubert i de to høyeste konsentrasjonene av deksametason. For embryo høstet ved 72 hpf så uttrykket av Pax6.2 ut til å være nedregulert for alle de tre konsentrasjonene, sammenlignet med kontrollen. **C:** PCR-reaksjonen med primersett for husholdningsgenet aktin viser tilnærmet lik input av cDNA for alle prøvene.

For å se om inkubering med deksametason påvirket uttrykket av de to Pax6-genene i sebrafiskembryo, ble det kjørt RT-PCR med primersett for Pax6.1 og Pax6.2. Templatet var cDNA fra sebrafiskembryo inkubert med tre ulike konsentrasjoner av deksametason samt en kontroll hvor embryoene var inkubert i E3. PCR-produktene ble kjørt på 1,5% agarosegel med etidiumbromid for visualisering.

Figur 4.3 A viser båndene som var synlige på agarosegel etter PCR med Pax6.1 primer. For embryo høstet ved 24 hpf så det ut til at de som ble inkubert med 0,68 µg/ml deksametason hadde noe høyere uttrykk av Pax6.1 enn embryo fra de to andre konsentrasjonene. Embryo inkubert med 6,80 µg/ml og 68,0 µg/ml deksametason så ut til å ha Pax6.1 uttrykk på nivå med kontrollgruppen som ble inkubert i E3. For embryo høstet ved 48 hpf så Pax6.1 ut til å være noe oppregulert i embryo inkubert med 0,68 µg/ml, 6,80 µg/ml deksametason, sammenlignet med kontroll og embryo inkubert i 68,0 µg/ml deksametason. Embryo fra høyeste konsentrasjon så ut til å ha omtrent samme uttrykk som kontrollen. Embryo høstet ved 72 hpf fulgte samme trend som embryo høstet ved 48 hpf, når det gjaldt uttrykk av Pax6.1. Mulig antydning til svak nedregulering av Pax6.1 i embryo fra høyeste konsentrasjon sammenlignet med kontrollen.

Figur 4.3 B viser bånd for Pax6.2 etter gelelektroforese av PCR-produktene. For embryo høstet ved 24 hpf så Pax6.2 ut til å være litt oppregulert i embryo inkubert med deksametason sammenlignet med kontrollen, dette gjelder alle de tre konsentrasjonene. For embryoene som ble høstet ved 48 hpf så Pax6.2 ut til å være noe oppregulert i embryo inkubert med laveste konsentrasjonen av deksametason. Embryo inkubert i 6,80 µg/ml og 68,0 µg/ml deksametason så ut til å være noe nedregulert i forhold til kontrollen. I embryo høstet ved 72 hpf så uttrykket av Pax6.2 ut til å være nedregulert ved alle konsentrasjonene av deksametason. Hos de som ble inkubert i den høyeste konsentrasjonen var uttrykket tydelig svakere enn ved de to andre konsentrasjonene.

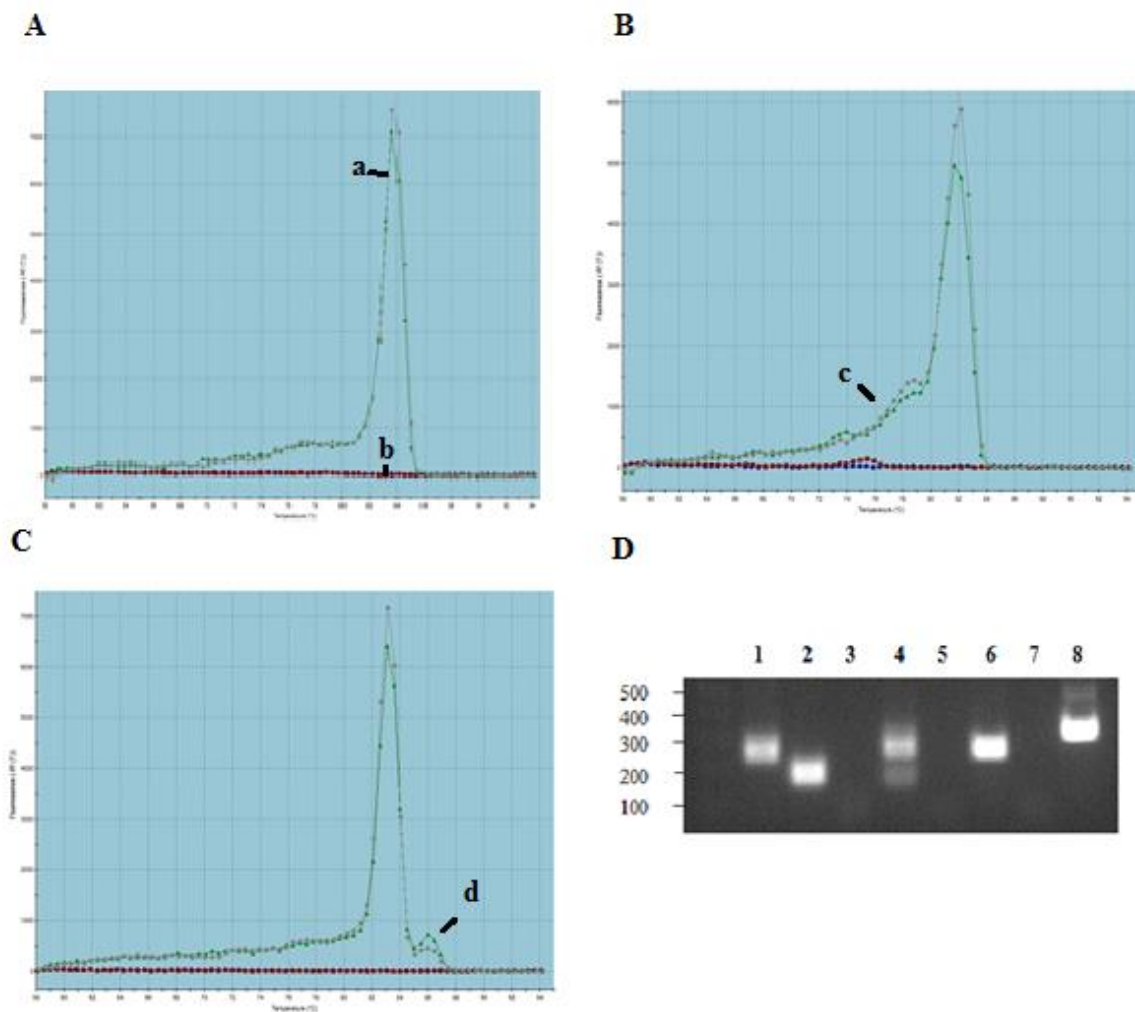
For PCR-reaksjonen med aktinprimer er det tilnærmet lik input av cDNA for den fullstendige rekken av prøver og kontroller (fig. 4.3 C).

#### 4.4 Optimalisering av primere for q-PCR

Det skulle vise seg å være tidkrevende å klare å kompensere input av cDNA, slik at alle båndene hadde lik intensitet. I tillegg krevde kompenseringsmetoden større mengder cDNA enn det som var tilgjengelig, siden totalt 15 gener skulle undersøkes. Det ble derfor bare gjort RT-PCR og gelelektroforese for visualisering med primere for genene Pax6.1 og Pax6.2. Uttrykket av de resterende genene ble undersøkt ved q-PCR.

På samme måte som ved RT-PCR, måtte primersettene testes ut før q-PCR med templat fra deksametason-inkuberte sebrafiskembryo. Ved optimalisering for q-PCR undersøker man om primersettet gir produkt og om primersettet plukker opp eventuelle uspesifikke produkter. For hvert primersett ble det kjørt q-PCR med en prøve tilsatt cDNA fra sebrafiskembryo og en kontroll som bare inneholdt mastermiks og vann (NTC – no template control). Figur 4.4 A viser smeltekurven for de to prøvene med primere for MMP14b. Kurvene (a) som gir en topp, viser smeltekurven for de to duplikatene med cDNA. Smeltekurven har en topp ved ca. 84 °C, dette er PCR-produktet av MMP14b. Denne smeltekurven ser optimal ut, da det bare er én synlig topp og ingen tegn til primer-dimerer. Fluorescensnivået i duplikatene av NTC-prøven (b) ligger stabilt på null, som ønskelig. Det tyder på at det ikke er uspesifikke produkter til stede, og at det ikke dannes primer-dimerer med dette primerparet.

Smeltekurven til alle primersettene ble sett på, og primere med skuldre eller dobbetopper i smeltekurvene som f.eks. MMP9 (fig. 4.4 B) og Timp2b (fig. 4.4 C,) ble kjørt på 1,5 % agarosegel for å se om skuldre og topper gav opphav til produkter som kunne detekteres på gel (fig.4.4 D). PCR-produkt fra NTC som gav CT-verdier i øvre del av skalaen (dvs. CT-verdier nært 40) ble også kjørt på gel, for å utelukke eventuelle uspesifikke produkter.



**Figur 4.4 Optimalisering av primere for q-PCR med BrilliantII SyBR Green QPCR Mastermix og cDNA fra sebrafiskembryo som templat. Smeltekurve for MMP14b-primere (A) har en topp (a) som bekrefter amplifisering av MMP14B. De to kurvene som ligger stabilt ved fluoresens på null (b,) viser fluorescensnivået i NTC med primersett for MMP14b. I smeltekurven for MMP9 (B) vises en tydelig skulder på venstre side av hovedtoppen (c). I smeltekurven for Timp2b (C) ses en liten, men tydelig topp til høyre for hovedtoppen (d). q-PCR-produkter etter gelelektroforese (D) fra venstre: 1. Pax2a, 2. Pax2b, 3. MMP2, 4. MMP9, 5. MMP14a, 6. Timp3, 7. Timp2a, 8. Timp2B.**

Ekstratopper i smeltekurven kan tyde på at primerne gjenkjenner noe annet enn det hovedproduktet som man er ute etter. MMP9 i brønn nr. 4 (fig. 4.4 D) hadde en skulder (c) i smeltekurven (fig. 4.4 B) og to bånd var synlige på gel, MMP9 ble dermed ekskludert fra forsøket. Timp2b i brønn nr. 8 (fig. 4.4 D) hadde en stor og en liten topp (d) i smeltekurven (fig. 4.4 C) og to synlige bånd på gelen. Denne primeren ble dermed også ekskludert fra forsøksoppsettet. Timp3 hadde to topper i sin smeltekurve, en liten og en stor topp, men vises

som et bånd på gel, så den ble brukt videre. De resterende primerne ble brukt videre i q-PCR med cDNA fra sebrafiskembryo. Etter optimaliseringen var følgende primere klare for q-PCR: Pax6.1, Pax6.2, Pax2a, Pax2b, Timp2a, Timp3, MMP2, MMP14a og MMP14b. Husholdningsgenene GusB og B2mg var også ok for videre arbeid.

#### **4.5 Relativ kvantifisering av genuttrykk**

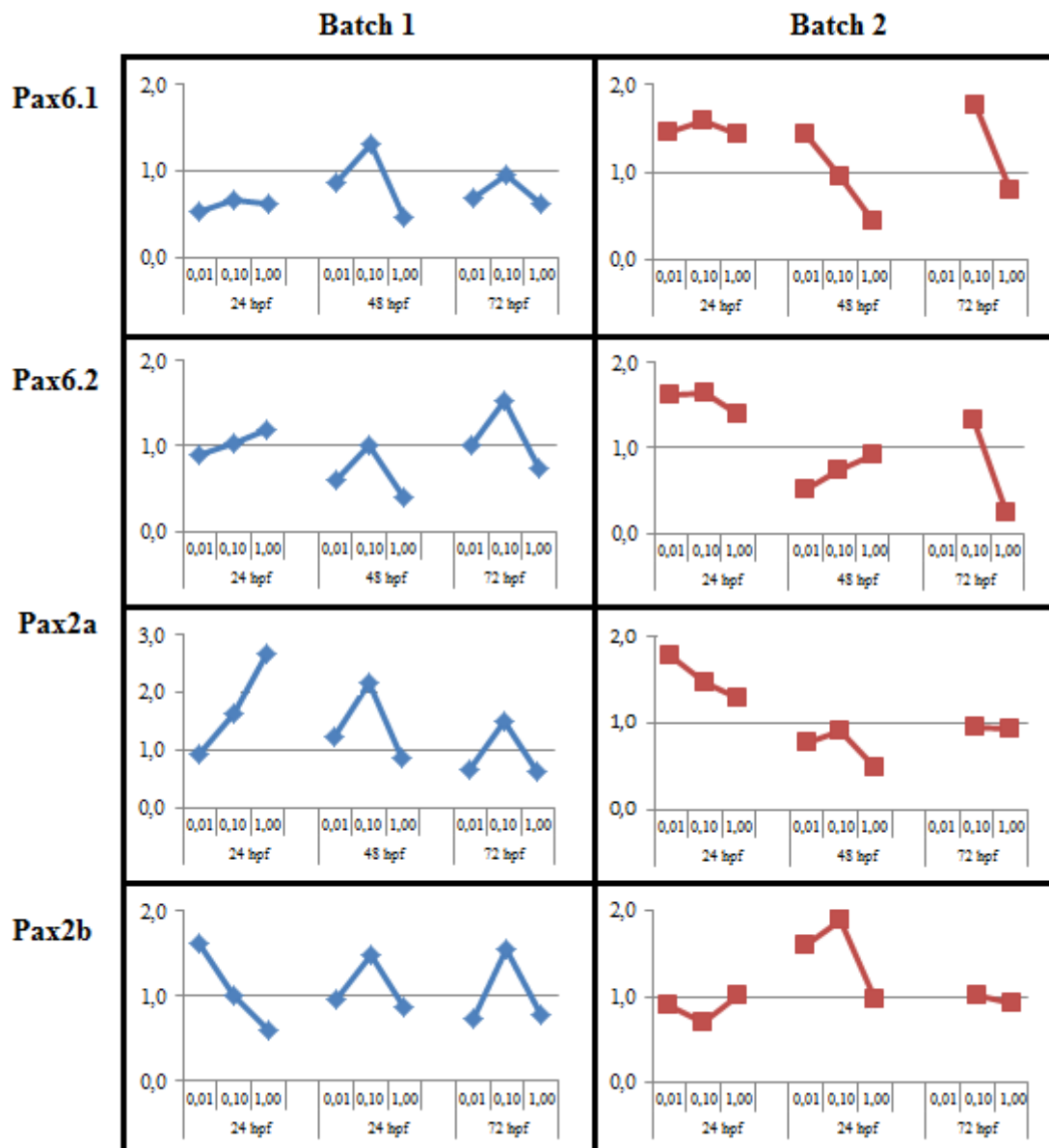
I neste trinn ble det gjort q-PCR med primerne og cDNA fra sebrafiskembryo inkubert i deksametason. cDNA fra sebrafiskembryo inkubert i E3 ble brukt som kontroll. Ct-verdier for hver enkelt prøve er vedlagt i appendiks 1. Ideelt sett skulle forskjellen mellom Ct-verdiene til to duplikater ikke være større enn 0,5. I noen tilfeller var den det, men pga. begrenset mengde cDNA per batch og begrenset med tid, ble dette notert ned, men forsøket ble ikke gjentatt.

Ved hjelp av  $\Delta\Delta C_t$ -metoden (komparativ kvantifiseringsalgoritme) (51) ble uttrykket av de aktuelle genene i prøver fra embryo inkubert med deksametason sammenlignet med uttrykket i kontrollembryo inkubert i E3. Verdien for genuttrykket i kontrollembryo ble satt til 1 og foldforskjellen mellom kontroll og prøver ble beregnet. Foldforskjell  $< 1$  betyr at det aktuelle genet er nedregulert i forhold til kontrollen, mens en foldforskjell  $> 1$  betyr at genet er oppregulert i forhold til kontrollen. Figur 4.5 viser en oversikt over genreguleringen i sebrafiskembryo inkubert i deksametason i de to batchene som ble undersøkt. Uttrykksnivået i kontrollen er lagt inn i figuren med en linje med verdien 1 på y-aksen. I dette forsøket ble «cut-off» -verdiene satt til 1,5 og 0,75. Foldverdier i dette forsøket som er over 1,5 defineres som oppregulering mens foldverdier under 0,75 defineres som nedregulering i forhold til kontrollen. Pga. stor variasjon i resultatene fra de to batchene er det likevel vanskelig å si noe bestemt om deksametason fører til opp eller nedregulering av genene som har blitt undersøkt. For å konkludere med klar opp- eller nedregulering av et gen i forhold til kontrollen, må foldverdien være over 1,5 eller under 0,75 i begge batchene. I dette forsøket har de fleste genene kun et tilfelle av klar opp- eller nedregulering i begge batchene. Videre kommenteres derfor trendene i reguleringen.

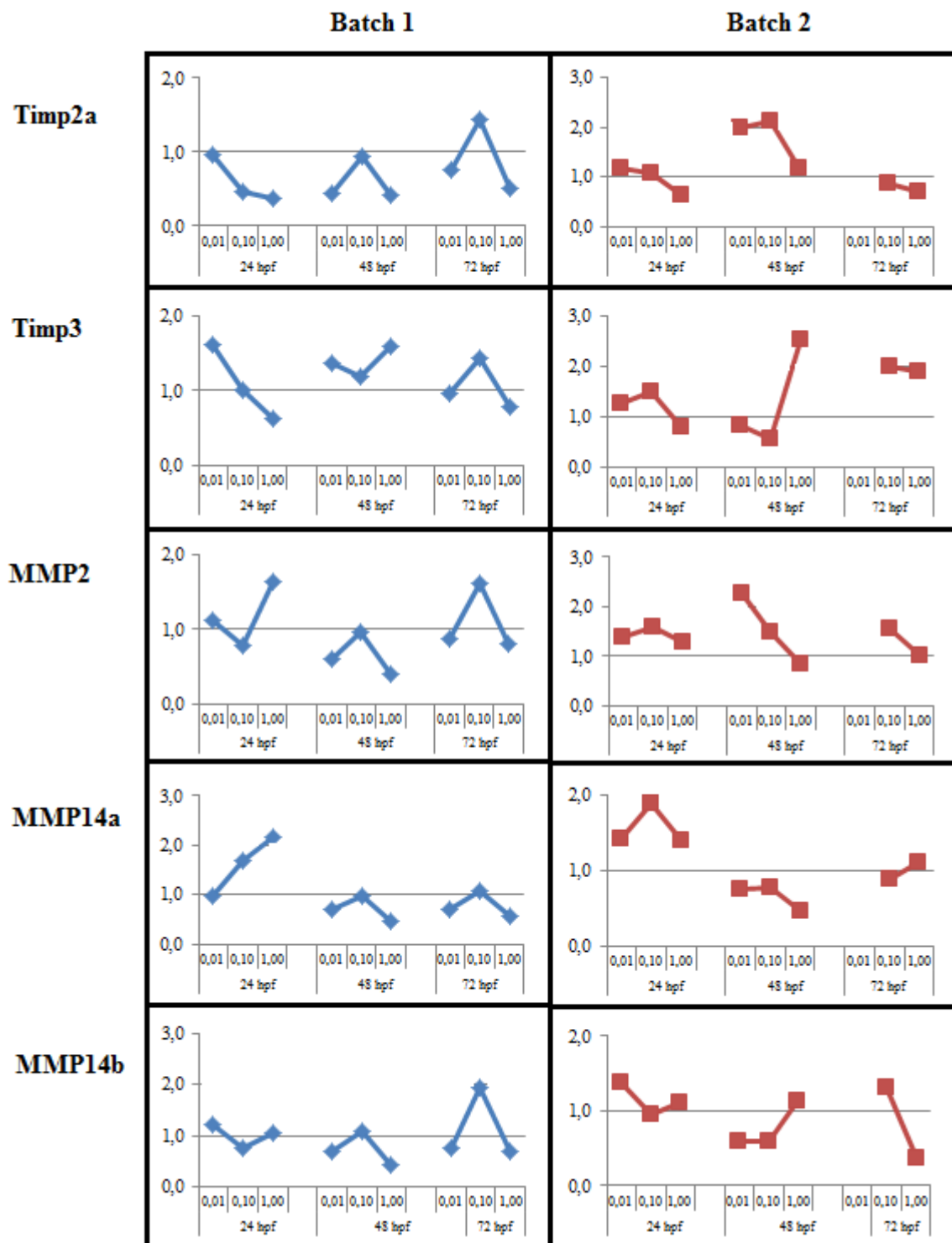
I siste batch (batch 2 på q-PCR) mangler prøven fra sebrafiskembryo inkubert i 0,68  $\mu\text{g/ml}$  deksametason høstet ved 72 hpf. En ny cDNA-syntese ble forsøkt, uten hell. Trolig gikk noe galt under DNasebehandling av RNAet. I resultatene fra q-PCR er det derfor bare en parallell for embryo fra denne konsentrasjonen høstet ved 72 hpf.



A



**B**



**Figur 4.5 Genuttrykk i batch 1 og 2 etter q-PCR med cDNA fra sebrafiskembryo inkubert i tre ulike konsentrasjoner av deksametason, høstet ved 24, 48 og 72 hpf.**

Konsentrasjonene oppgitt langs x-aksen i figuren (0,01 mg/ml, 0,10 mg/ml, 1,0 mg/ml) er Dexamethasone Water-Soluble, disse tilsvarer 0,68 µg/ml, 6,80 µg/ml og 68,0 µg/ml deksametason. Uttrykksnivået i kontrollene er satt til 1, og er tegnet inn i kurvene som en linje ved 1,0 på y-aksen. Cut-off er satt til 1,5 og 0,75. Punkter som ligger over 1,5 på y-aksen viser til oppregulering av det gitte genet i forhold til genuttrykket i kontrollen. Punkter under 0,75 på y-aksen viser til nedregulering av genet i forhold til genuttrykket i kontrollen.

---

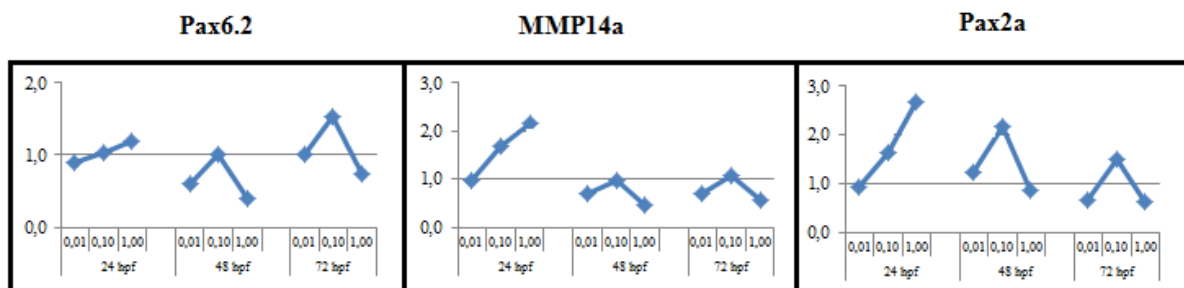
Som nevnt tidligere varierte genuttrykkene mer fra den ene til den andre batchen enn det som var forventet. Pax6.1 (fig.4.5 A) var nedregulert for alle deksametason-konsentrasjoner ved 24 hpf i batch 1, mens den var oppregulert for de samme konsentrasjonene i batch 2. Det viste seg at gener som i batch 1 så ut til å ha en lignende regulering ved økende mengde deksametason, ikke viste samme tendens i batch 2 (fig.4.5.) I enkelte tilfeller viste et gen samme ekspresjonsmønster for et av tidspunktene i begge batchene. MMP14b (fig.4.5 B) viser samme trend i begge batchene i embryo høstet ved 24 hpf. Genuttrykket av MMP14b er lavest i embryo inkubert med 6,80 µg/ml deksametason. Genuttrykket av Pax6.1 viser også samme trend i batch 1 og 2 ved 24 hpf. Utrykket av Pax6.1 så ut til å være høyest i embryo inkubert med 6,80 µg/ml deksametason. For Pax6.1 var trenden ved økende konsentrasjon av deksametason lik i de to batchene, men i batch 1 er genet nedregulert mens det er oppregulert i batch 2.

Ser man på foldverdiene i batch 1 og 2 uten å tenke på reguleringstrenden i forhold til økende konsentrasjon av deksametason, så har de fleste genene like verdier for en av konsentrasjonene, ved et av tidspunktene. Utrykket av Pax6.1 i embryo inkubert med den høyeste deksametason-konsentrasjonen, høstet ved 48 hpf er repressert i begge batchene. Pax6.2 er nedregulert i begge batchene i embryo inkubert i den laveste konsentrasjonen av deksametason ved 48 hpf. Utrykket av Pax2a i embryo høstet ved 24 hpf, inkubert i 6,8 µg/ml deksametason er oppregulert og ligger på samme nivå i begge batchene. Nivået av Pax2b er omtrent likt i embryo inkubert i høyeste konsentrasjon høstet ved 48 hpf, her er genuttrykket uendret sammenlignet med kontrollen. Utrykket av MMP2 var omtrent på samme nivå i 72 timer gamle embryo, for de to høyeste konsentrasjonene av deksametason. I embryo inkubert med 6,8 µg/ml deksametason var MMP2 oppregulert, mens genuttrykket ved

høyeste konsentrasjon av deksametason var uendret sammenlignet med kontrollen. MMP14a har lignende nivåer ved alle de tre tidspunktene. Ved 24 hpf er uttrykket av MMP14a i embryo inkubert med 6,8 µg/ml deksametason oppregulert og ganske likt i de to batchene. Ved 48 hpf er laveste deksametason-konsentrasjon i de to batchene på nivå med hverandre og høyeste deksametason-konsentrasjon på nivå med hverandre, i begge tilfellene ses nedregulering av MMP14a. MMP14b har lignende genuttrykk i embryo høstet ved 24 hpf, men sammenlignet med kontrollen er genuttrykket uendret ved alle konsentrasjonene i de to batchene.

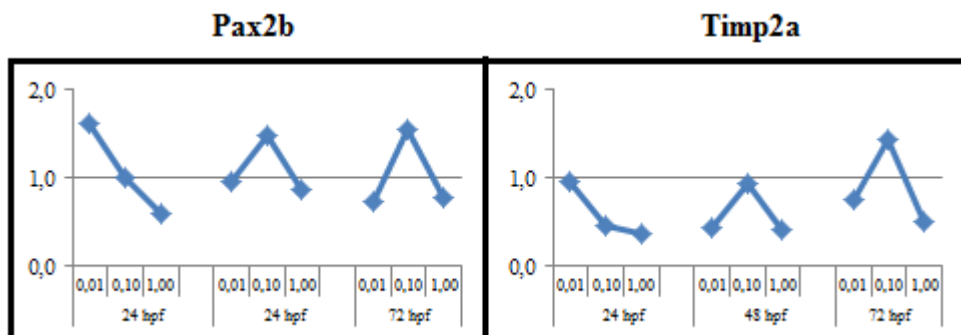
I utgangspunktet var det ønskelig å se om noen av genene som ble undersøkt hadde lik regulering, eller om reguleringsmønsteret kunne tyde på at noen av genene regulerte andre gener. Dersom to eller flere gener hadde vist samme reguleringsmønster i batch 1 og 2 kunne det vært tenkelig at disse to genene var underlagt samme reguleringsmekanismer f.eks. en felles transkripsjonsfaktor som GR. Da det var stor variasjon mellom de to batchene ble det gjort et forsøk på å gruppere gener med lignende genuttrykk innad i hver enkelt batch (fig. 4.6-4.9). Embryoene innad i en batch ble utsatt for den samme mengden deksametason over like lang tid og embryoene gjennomgikk eksakt samme prøveopparbeidelse for RNA-isolering og cDNA syntese. Genene hadde ikke nødvendigvis helt likt mønster når det gjaldt opp- og nedregulering i forhold til kontrollen, men de fulgte samme trend ved økende konsentrasjon av deksametason.

I batch 1 ble det identifisert to trender som flere enn et gen hadde felles. Pax6.2, MMP14a og Pax2a fulgte samme trend ved 24, 48 og 72 hpf. Figur 4.6 viser trenden de tre genene har felles. For embryo høstet ved 24 hpf, økte uttrykket av Pax6.2, MMP14a og Pax2a med økende konsentrasjon av deksametason. Økningen var brattere for MMP14a og Pax2a enn for Pax6.2. Ved 48 og 72 hpf var genuttrykket høyest i embryo inkubert med 6,80 µg/ml deksametason, sammenlignet med de andre to konsentrasjonene. Når det gjelder opp- og nedregulering av genene sammenlignet med kontrollembryo, variere det fra gen til gen og fra tidspunkt til tidspunkt. Disse trendene ses i batch 1.



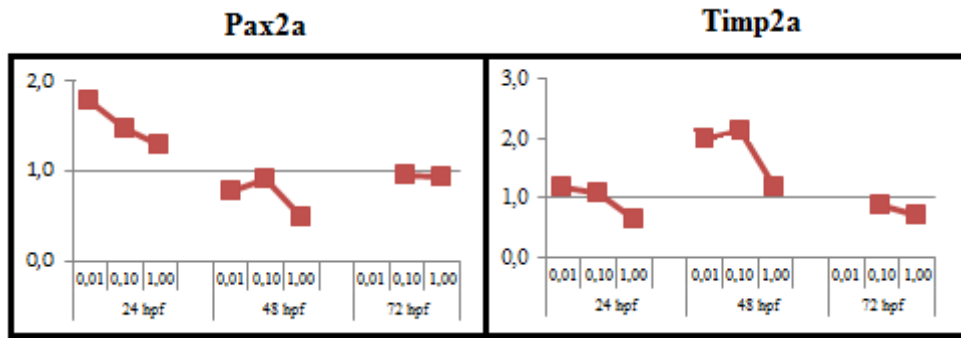
**Figur 4.6** Uttrykket av Pax6.2, MMP14a og Pax2a følger samme trend i batch 1 ved økende konsentrasjon av deksametason. Konsentrasjonene oppgitt langs x-aksen i figuren (0,01 mg/ml, 0,10 mg/ml, 1,0 mg/ml) er Dexamethasone Water-Soluble, disse tilsvarer 0,68 µg/ml, 6,80 µg/ml og 68,0 µg/ml deksametason. Uttrykket av de tre genene øker med økende konsentrasjon av deksametason i embryo høstet ved 24 hpf. Embryo høstet ved 48 og 72 hpf følger samme trend for alle de tre genene. Uttrykket av genene er høyest i embryo inkubert med 6,80 µg/ml deksametason. Uttrykksnivået til kontrollen er lagt inn i grafene som en horisontal linje fra y-aksen med verdien 1

Pax2b og Timp2a viste samme trend i batch 1 (fig.4.7.) I embryo høstet ved 24 hpf ble uttrykket av Pax2b og Timp2a redusert, når konsentrasjonen av deksametason økte. I likhet med genene i figur 4.6 har Pax2b og Timp2a samme trend i embryo høstet ved 48 og 72 hpf, med høyest genuttrykk i embryo inkubert i 6,80 µg/ml deksametason. Denne trenden med høyest genuttrykk i embryo inkubert i 6,80 µg/ml deksametason i både embryo høstet ved 48 og 72 hpf, var felles for for alle genene i batch 1, bortsett fra Timp3.



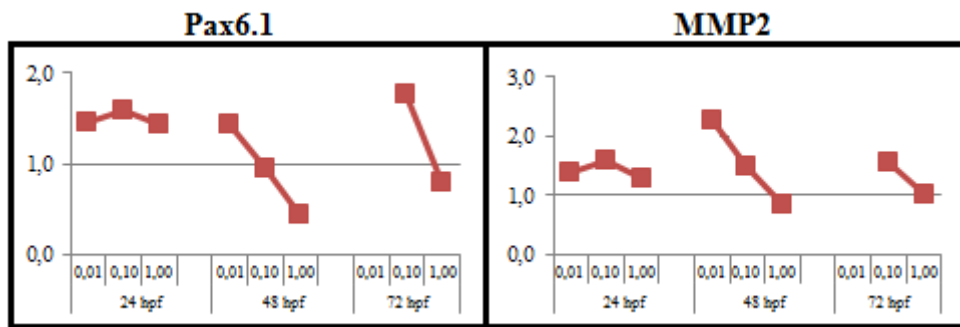
**Figur 4.7 Genene Pax2b og Timp2a følger samme trend i batch 1 ved økende konsentrasjon av deksametason.** Konsentrasjonene oppgitt langs x-aksen i figuren (0,01 mg/ml, 0,10 mg/ml, 1,0 mg/ml) er Dexamethasone Water-Soluble, disse tilsvarer 0,68 µg/ml, 6,80 µg/ml og 68,0 µg/ml deksametason. I embryo høstet ved 24 hpf ses en reduksjon i uttrykk av Pax2b og Timp2a ved økende konsentrasjon av deksametason. For embryo høstet ved 48 og 72 hpf ses en økning i genuttrykk fra embryo inkubert i 0,68 µg/ml deksametason til embryo inkubert 6,80 µg/ml. Ved ytterligere økning av deksametason-konsentrasjonen ses en reduksjon i genuttrykk. Genuttrykket er omtrent på samme nivå i embryo inkubert i laveste og høyeste konsentrasjon av deksametason. Dette gjelder kun embryo høstet ved 48 og 72 hpf.

I batch 2 ble det også identifisert to trender som to gener hadde til felles. Som vist i figur 4.8 ble uttrykket av Pax2a og Timp2a redusert ved økende konsentrasjon av deksametason i embryo høstet ved 24 hpf. For embryo høstet ved 48 hpf var genuttrykket høyest i embryo inkubert ved 6,80 µg/ml og lavest for embryo inkubert i 68,0 µg/ml deksametason. I embryo høstet ved 72 hpf ble det ikke observert noen stor forskjell når konsentrasjonen av deksametason økte.



**Figur 4.8 Pax2a og Timp2a viser samme trend i batch 2 ved økende konsentrasjon av deksametason.** Konsentrasjonene oppgitt langs x-aksen i figuren (0,01 mg/ml, 0,10 mg/ml, 1,0 mg/ml) er Dexamethasone Water-Soluble, disse tilsvarer 0,68 µg/ml, 6,80 µg/ml og 68,0 µg/ml deksametason. Gennivået gikk ned når konsentrasjonen av deksametason økte i embryo høstet ved 24 hpf. I embryo høstet ved 48 hpf var uttrykket av Pax2a og Timp2a høyest i embryo inkubert med 6,80 µg/ml deksametason og lavest i de som var inkubert i høyeste konsentrasjon av deksametason. I 72 timer gamle embryo kunne en svak nedgang i genuttrykk ses når konsentrasjonen av deksametason økte 6,80 µg/ml og 68,0 µg/ml deksametason.

I batch 2 hadde også Pax6.1 og MMP2 et felles mønster i genreguleringen (fig.4.9). Ved 24 hpf var uttrykket av de to gene høyst i embryo inkubert med 6,80 µg/ml deksametason. Nivået av Pax6.1 og MMP2 var omtrent likt for embryo inkubert i høyeste og laveste konsentrasjon av deksametason. I embryo høstet ved 48 og 72 hpf reduseres nivået av de to gene når konsentrasjonen av deksametason øker.



**Figur 4.9** Gennivået av Pax6.1 og MMP2 følger samme trend i batch 2 ved økende konsentrasjon av deksametason. Konsentrasjonene oppgitt langs x-aksen i figuren (0,01 mg/ml, 0,10 mg/ml, 1,0 mg/ml) er Dexamethasone Water-Soluble, disse tilsvarer 0,68 µg/ml, 6,80 µg/ml og 68,0 µg/ml deksametason. I embryo høstet ved 24 hpf var nivået av Pax6.1 og MMP2 høyest i embryo inkubert med , 6,80 µg/ml. Gennivået i embryo inkubert med høyeste og laveste konsentrasjon var omtrent likt. For embryo høstet ved 48 og 72 hpf gikk nivået av Pax6.1 og MMP2 ned ved økende konsentrasjon av deksametason

Når resultatene fra batch 1 og 2 sammenlignes for hvert enkelt gen, på hvert tidspunkt og for hver konsentrasjon har de fleste genene en konsentrasjon på et av de tre tidspunktene som gir klar opp- eller nedregulering i begge batchene. Foldverdiene er da over eller under cut-off-verdiene som ble satt for eksperimentet i både batch 1 og 2.

Samlet sett viser resultatene etter deksametason-inkubering av to batcher med sebrafiskegg en større variasjon fra batch til batch enn forventet. Det er relativt få tilfeller av sammenfallende verdier for genuttrykk i de to batchene. For å kunne si noe konkret om uttrykket av de undersøkte genene i nærvær av deksametason, er det nødvendig å repetere forsøket flere ganger. Inkludering av flere deksametason-konsentrasjoner kunne vært aktuelt.



**Tabell 4.1** Tabellen viser en oversikt over hvilke gener som til gitte tidspunkter og deksametason-konsentrasjoner er klart opp- eller nedregulert i begge batchene når cut-off verdien er satt til 1,5 for oppregulering og 0,75 for nedregulering i forhold til kontrollen. Foldverdi batch 1 og 2 er foldverdiene genet hadde i forhold til kontrollen E3 i batch 1 og 2. Kolonnen for uttrykk viser om genet er oppregulert (+) eller nedregulert (-).

Gen	Tidspunkt for høsting	Deksametason-konsentrasjon	Foldverdi batch 1	Foldverdi batch 2	Uttrykk
<b>Pax6.1</b>	48 hpf	68,0 µg/ml	0,5	0,4	-
<b>Pax6.2</b>	48 hpf	0,68 µg/ml	0,6	0,5	-
<b>Pax2a</b>	24 hpf	6,80 µg/ml	1,6	1,5	+
<b>Pax2b</b>	48 hpf	6,80 µg/ml	1,5	1,9	+
<b>Timp2a</b>	24 hpf	68,0 µg/ml	0,4	0,6	-
<b>Timp2a</b>	72 hpf	68,0 µg/ml	0,5	0,7	-
<b>Timp3</b>	48 hpf	68,0 µg/ml	1,6	2,5	+
<b>MMP2</b>	72 hpf	6,80 µg/ml	1,6	1,5	+
<b>MMP14a</b>	24 hpf	6,80 µg/ml	1,7	1,9	+
<b>MMP14a</b>	48 hpf	0,68 µg/ml	0,7	0,7	-
<b>MMP14a</b>	48 hpf	68,0 µg/ml	0,5	0,5	-
<b>MMP14b</b>	48 hpf	0,68 µg/ml	0,7	0,6	-
<b>MMP14b</b>	72 hpf	68,0 µg/ml	0,7	0,4	-

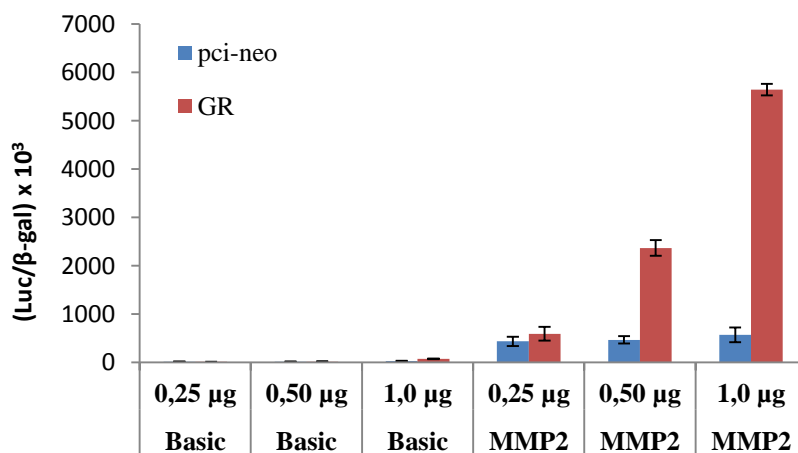
#### 4.6 MMP2 promoteranalyser med PAX6 og GR i Hela celler

Resultatene etter q-PCR med cDNA fra sebrafiskembryo viser endringer i genuttrykk etter deksametason-stimulering. Uttrykket av Pax6.1 og MMP2 i sebrafiskembryo viser et lignende reguleringsmønster i den ene batchen (fig. 4.9), noe som kan tyde på at de to genene kan ha felles regulering av f.eks transkripsjonsfaktoren GR eller at Pax6 kan påvirke uttrykket av MMP2. Det er kjent at MMP2 er et av målgenene til transkripsjonsfaktoren Pax6, og en studie har vist at promoteraktiviteten til MMP2 i glioblastomaceller i hjernen kan nedreguleres av Pax6 (15). En annen studie har vist at aktivert GR kan øke genuttrykket av MMP2 i sebrafiskembryo (23). I en studie hvor glukokortikoidbindende regioner ble undersøkt, så man indikasjoner på tilstedeværelse av Pax-bindingsmotiver i gener regulert av GR. Dette gjaldt både gener som ble aktivert og repressert av GR (52). Interaksjonen mellom de to transkripsjonsfaktorene Pax6 og GR har ikke blitt undersøkt tidligere, og det var derfor av interesse å se på uttrykket av MMP2-promoteren og hvordan dens aktivitet påvirkes av transkripsjonsfaktorene GR og Pax6 når deksametason er til stede.

#### 4.6.1 Transfeksjon med GR

Ca. 1700 bp av MMP2 promoteren var klonet inn i pGL3-basic vektoren. I innledende forsøk var det ønskelig å undersøke om GR og Pax6 kunne aktivere eller eventuelt represserer denne promoteren hver for seg. HeLa celler er mye brukt som modellsystem i molekylærbiologisk forskning. Cellene er lette og transfektere, så det ble bestemt at promoteranalysene skulle foregå i denne cellelinjen.

Første transfeksjonsoppsett gikk ut på å undersøke i hvilken grad aktivert GR påvirker aktiviteten til MMP2-promoteren. HeLa celler ble transfektert med pGL-basic eller pGL-MMP2 promoter og uttrykksvektoren for GR. Tomvektoren pCI-neo ble brukt som kontroll for GR. Økende konsentrasjoner av GR og tilhørende kontroll (0,25 µg, 0,50 µg og 1,0 µg) ble testet ut. Cellene ble inkubert med 100 nM deksametason 24 timer etter at plasmid-DNA ble tilsatt. Etter ytterligere 20 timer ble cellene høstet og luciferase reporter-gen-assay ble utført for å undersøke aktiviteten til MMP2 promoteren.

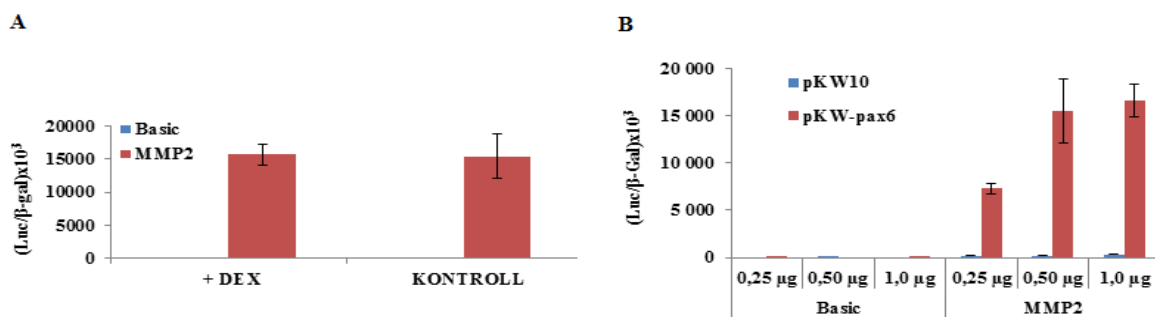


**Figur 4.10 Transfeksjon med GR og pGL3-MMP2 promoteren gi økt transkripsjonsaktivitet fra MMP2 promoteren i luciferase reporter-gen assay.** HeLa celler ble transfektert med kalsium-presipitert plasmid DNA for tom vektoren pGL3-basic eller vektor med MMP2-promoter (0,5 µg,) og GR eller pCI-neo i tre ulike konsentrasjoner (0,25 µg, 0,50 µg og 1,0 µg.) I tillegg ble 0,05 µg pCH110 tilsatt i hver brønn. Transfeksjonene ble utført i triplikatt. 24 timer etter tilsetning av plasmid DNA ble cellene stimulert med 100 nM deksametason. Etter ytterligere 20 timer ble cellene høstet og klargjort for luciferase reporter-gen assay. Transfeksjonsoppsettet med GR og MMP2-promoteren vist i denne figuren ble gjennomført en gang. Transkripsjonsaktiviteten til MMP2-promoteren øker med økende mengde av GR, sammenlignet med kontrollen.

Luciferaseaktiviteten i cellene transfektert med MMP2-promoter øker med økende konsentrasjon av GR, sammenlignet med kontrollen pCi-neo som holder seg relativt stabil ved økende konsentrasjon (fig.4.10). Stimulering av transkripsjonsfaktoren GR med glukokortikoidet deksametason, fører til at MMP2-promoterer i HeLa cellene aktiveres og dermed vil luciferasegenet uttrykkes.

#### 4.6.2 Transfeksjon med Pax6

Det ble så sett på Pax6 sin effekt på MMP2 promoteren. HeLa celler ble kotransfektet med pGL3-basic eller pGL3-MMP2 promoter og uttrykksvektor for Pax6 (0,5 µg.) For å avdekke hvilken effekt deksametason alene eventuelt hadde på Pax6, ble det gjort forsøk både med og uten deksametason. I forsøket med deksametason-stimulering ble cellene utsatt for en konsentrasjon på 100 nM deksametason.



**Figur 4.11 Pax6 har en doseavhengig transkripsjonsaktivering av MMP2-promoterer og aktiviteten påvirkes ikke av nærvær av deksametason.** Hela cellene i både A og B ble transfektet med kalsium-presipitert plasmid DNA for tom vektoren pGL3-basic eller vektor med MMP2-promoter (0,5 µg,) i tillegg til 0,05 µg pCH110 tilsatt i hver brønn. **A:** Luciferaseaktiviteten i HeLa celler kotransfektet med Pax6 og MMP2-promoter påvirkes i liten grad av om cellene er utsatt for deksametason eller ikke. pGL3-basic eller MMP2-promoterer ble kotransfektet med uttrykksvektor for Pax6 (0,5 µg.) Kontrollcellene ble dyrket i vanlig cellemedie (MEM,) mens cellene som her er markert med + DEX ble tilsatt 100 nM deksametason 24 timer etter tilsetning av plasmid DNA. 20 timer senere ble cellene høstet og klargjort for luciferase assay. Transfeksjonene ble utført i triplikate og transfeksjonsoppsettet i A ble utført en gang. **B:** Luciferase reporter gen assay viser at uttrykksvektor for Pax6 og MMP2-promoterer transfektet sammen gir økt luciferaseaktivitet. pGL3-basic eller MMP2-promoterer ble kotransfektet med uttrykksvektor for Pax6 eller tomvektor pKW10 i tre ulike konsentrasjoner (0,25 µg, 0,50 µg og 1,0 µg.) I dette transfeksjonsoppsettet er cellene dyrket i vanlig cellemedie. Transfeksjonene ble utført i triplikate og transfeksjonsoppsettet ble utført en gang. Cellene ble høstet og klargjort for luciferase reporter gen assay 44 timer etter plasmid DNA ble tilsatt.

Luciferaseaktiviteten i cellene transfektert med MMP2-promoter og Pax6-uttrykksvektor, er nokså like både for kontrollcellene og cellene som ble inkubert i deksametason (fig. 4.11 A.) Utfra dette forsøket ser det ut til at tilstedeværelse av deksametason ikke påvirker Pax6-uttrykksvektoren i stor grad.

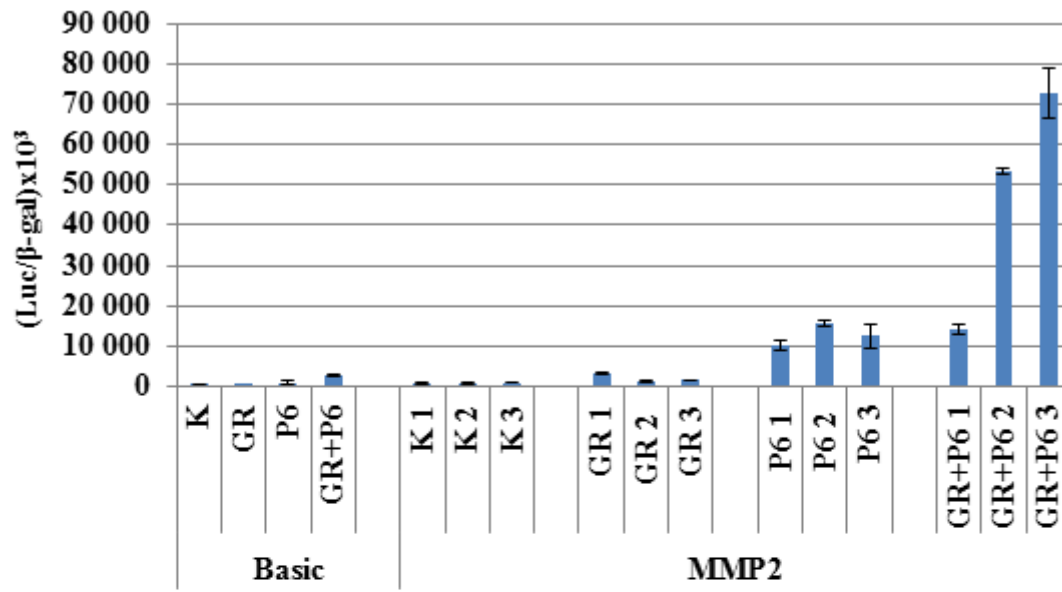
Det er tydelig at nærvær av transkripsjonsfaktoren Pax6 har positiv innvirkning på MMP2 i Hela celler og fører til aktivering av promoteren (fig.4.11 B.) Sammenlignet med kontrollen (blå søyler) hvor tomvektoren pKW10 ble transfektert sammen med MMP2-promoteren, er aktiviteten mye høyere når Pax6 er til stede. Ser en på foldverdiene mellom luciferaseaktiviteten i cellene transfektert med MMP2 og Pax6 sammenlignet med MMP2 og tomvektoren, viser cellene med Pax6 foldøkning i luciferaseaktivitet på henholdsvis 37,0, 95,7 og 49,1 for de tre konsentrasjonene. I tillegg ses en økning i luciferaseaktivitet når mengden Pax6 øker. Økningen er størst når konsentrasjonen av Pax6 økes fra 0,25 til 0,50 µg, da ses en omtrentlig dobling i luciferaseaktivitet. Ved ytterligere konsentrasjonsøkning ser det ut til at aktiviteten flater ut. I dette forsøket ble cellene inkubert i normalt cellemedie, så disse effektene ses når deksametason ikke er tilstede.

### **4.6.3 Transfeksjon med GR og Pax6 sammen**

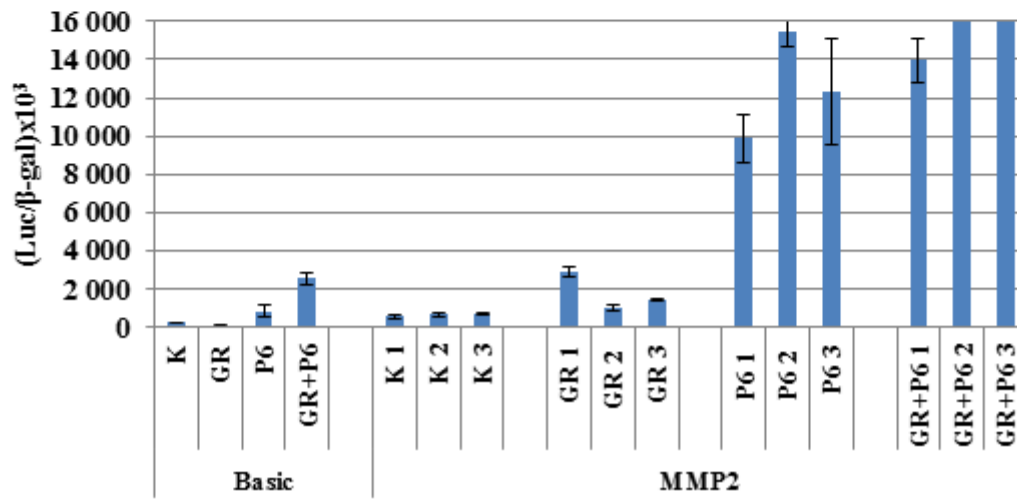
Innledende forsøk med GR og Pax6 viste at de to transkripsjonsfaktorene hver for seg aktiverer MMP2-promoteren. Aktiveringen økte med økende konsentrasjon av GR og Pax6. Siden transfeksjonsoppsettet med GR viste at 0,5 µg GR var innenfor det lineære området, ble denne konsentrasjonen brukt i alle transfeksjonene med Pax6. Den høyeste konsentrasjonen av Pax6 (1,0 µg) brukt til titrering ble kuttet ut, og en lavere konsentrasjon ble heller innført, med tanke på å holde seg innenfor et lineært område også her.

I dette transfeksjonsoppsettet ble MMP2-promoteren transfektert med uttrykksvektor for GR og økende konsentrasjon av uttrykksvektor for Pax6 (0,125 µg, 0,25 µg og 0,50 µg.) Alle transfeksjonene ble stimulert med 100 nM deksametason 24 timer etter selve transfeksjonen.

**A**



**B**



**Figur 4.12 Luciferaseaktivitet styrt av MMP2-promoteren øker når transkripsjonsfaktorene GR og Pax6 kotransfekteres, og luciferaseaktiviteten øker med økende konsentrasjon av Pax6. A:** Hela celler ble transfektert med kalsium-presipitert plasmid DNA. De fire første søylene til venstre illustrerer resultater fra transfeksjoner med 0,50 µg pGL3-basic, mens de resterende er med 0,50 µg MMP2-promoteren. I figuren er de ulike transfeksjonene nummerert med 1-3 i kontrolltransfeksjonen (K) med pCI-neo og pKW10, transfeksjonen med pKW10 og GR (GR) og transfeksjonen med pCI-neo og Pax6(P6,) og transfeksjonen med GR og Pax6 sammen (GR+P6.) Tallene betegner konsentrasjonen av pKW10 eller Pax6 i den gitte transfeksjonen. 1 tilsvarer 0,125 µg, 2 tilsvarer 0,25 µg og 3 tilsvarer 0,50 µg. I alle disse transfeksjonene ble cellene stimulert med 100 nM deksametason 24 timer etter tilsetning av plasmid DNA. Cellene ble høstet 20 timer senere og klargjort for luciferase reporter gen assay. Transfeksjonene ble utført i triplikat og transfeksjonsoppsettet ble repetert tre ganger. Figurene her viser resultatet fra et av de tre eksperimentene, eksperiment nr. 2. **B:** Viser et utsnitt av figur 4.12 A, som viser luciferaseaktiviteten i cellene etter transfeksjon med økende konsentrasjon av kontrollvektor, uttrykksvektor for GR og uttrykksvektor for Pax6.

---

Luciferaseaktiviteten i cellene med aktivert GR viser en liten økning i promoteraktivitet sammenlignet med kontrollen. I transfeksjonene med uttrykksvektor for Pax6 ses også en økning i luciferaseaktivitet sammenlignet med kontrollen. Luciferaseaktiviteten i cellene transfektert med Pax6 er høyere enn i de som er transfektert med GR. De tre søylene helt til høyre i figur 4.12 A viser at Pax6 i nærvær av aktivert GR har en enorm transaktivering på MMP2-promoteren, som ikke er der når Pax6 kun virker på promoter alene. Det samme gjelder for GR og her er økningen enda større. Den kraftige økningen i luciferaseaktivitet som observeres når Pax6 og aktivert GR kombineres, tyder på synergisme av de to transkripsjonsfaktorene.

I to av de tre eksperimentene var trenden som vist i figur 4.12. I det tredje eksperimentet var luciferaseaktiviteten i cellene transfektert med GR og 0,25 µg Pax6 uttrykksvektor litt lavere enn for cellene transfektert med GR og laveste konsentrasjon av Pax6. Figurer for de to andre parallellene er vedlagt i appendiks. Foldverdier for de tre parallellene er vist i tabell 4.2.

I alle de tre parallellene er det tydelig at summen av luciferaseaktivitet i celler transfektert med GR alene (GR 3) og Pax6 alene (P6 3,) er betydelig mindre enn luciferaseaktivitet oppnådd ved kombinasjonen av de to (GR+P6 3.) Dette gjelder for de to høyeste konsentrasjonene av Pax6. Det tyder på at GR og Pax6 kan fungere som aktivatorer av MMP2-promoteren og at de i kombinasjon kan ha synergistisk effekt. Den laveste

konsentrasjonen av Pax6 i kombinasjon med GR (GR+P6 1) viser en luciferaseverdier som er på nivå med summen av Pax6 (P6 1) og GR (GR 1) hver for seg, så her sees altså ikke den synergistiske effekten, men heller en additiv effekt.

Et utsnitt av transfeksjonene med lave verdiene i figur 4.12 A er illustrert i figur 4.12 B. Luciferaseverdiene for cellene transfektert med pGL3-basic er vist helt til venstre i figuren kan sammenlignes med K3, GR 3, P6 3 og GR+P6 3. Sammenlignet med verdiene for MMP2-promoteren er disse svært lave, spesielt for Pax6 og kombinasjonen av GR og Pax6.

**Tabell 4.2** Luciferase/ $\beta$ -gal-verdier for 3 transfeksjoner med GR og Pax6 på MMP2-promoteren i Hela celler, presentert som fold aktivering/-repressering sammenlignet med kontroll. Kontrollen her er transfeksjonen med pCI-neo og tilsvarende mengde pKW10, dens verdi er satt til 1. Mengden GR og pCI-neo er 0,50  $\mu$ g i alle transfeksjonene.

VEKTORER			FOLDVERDIER		
		Mengde ( $\mu$ g)	Eksperiment 1	Eksperiment 2	Eksperiment 3
pCI-neo	pKW10	0,125	1,0	1,0	1,0
pCI-neo	pKW10	0,25	1,0	1,0	1,0
pCI-neo	pKW10	0,50	1,0	1,0	1,0
GR	pKW10	0,125	0,3	5,3	0,5
GR	pKW10	0,25	1,8	1,6	1,0
GR	pKW10	0,50	0,9	2,1	0,6
pCI-neo	pKW-Pax6	0,125	13,8	18,2	3,1
pCI-neo	pKW-Pax6	0,25	13,5	23,7	15,8
pCI-neo	pKW-Pax6	0,50	51,8	18,0	8,4
GR	pKW-Pax6	0,125	17,8	25,7	12,5
GR	pKW-Pax6	0,25	123,1	81,9	7,9
GR	pKW-Pax6	0,50	167,7	106,1	50,0

I eksperiment 3 er foldaktiveringen i transfeksjonen med GR og 0,25  $\mu$ g pKW-Pax6 lav i forhold til de andre verdiene i samme eksperiment. Dette skyldes trolig en pipetteringsfeil, siden trenden i de andre to eksperimentene er at luciferaseaktiviteten øker med økende konsentrasjon av Pax6.

Luciferaseaktiviteten i HeLa cellene varierte veldig i de ulike transfeksjonsoppsettene som ble gjort, noe som kan reflekterer transfeksjonseffektivitetene. Det var derfor greit å ha med et plasmid som uttrykker  $\beta$ -gal, slik at dette ble korrigert for.

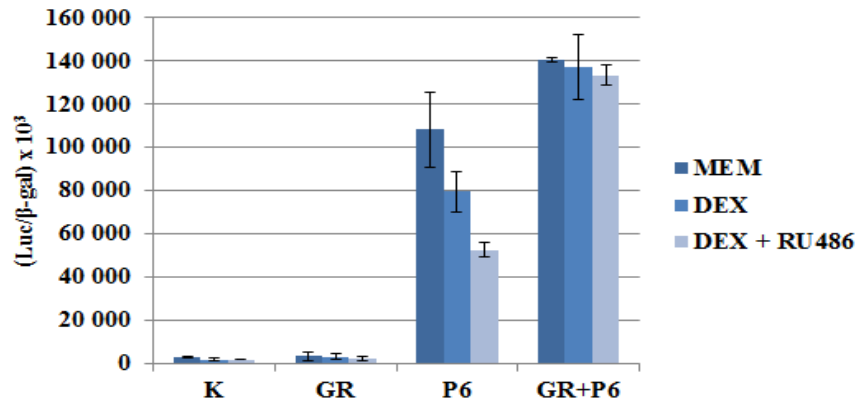
#### **4.6.4 Transfeksjon med GR og Pax6 ved inhibering av GR med RU486**

For å verifisere at den observerte synergismen mellom GR og Pax6 på MMP2-promoteren var avhengig av aktivering av GR, ble antagonist RU486 inkludert. RU486 er en GR-antagonist og virker ved å binde til glukokortikoidreseptoren. Det hindrer at deksametason som er en GR-agonist kan binde til reseptoren og GR blir dermed ikke aktivert. RU486 ble inkludert i transfeksjonen 30 min før cellene ble stimulert med deksametason. Det ble brukt 2  $\mu$ M RU486 og 100 nM deksametason. Forsøket ble utført tre ganger (fig.4.13.) og som vist i figuren var ikke resultatene i de tre eksperimentene entydige.

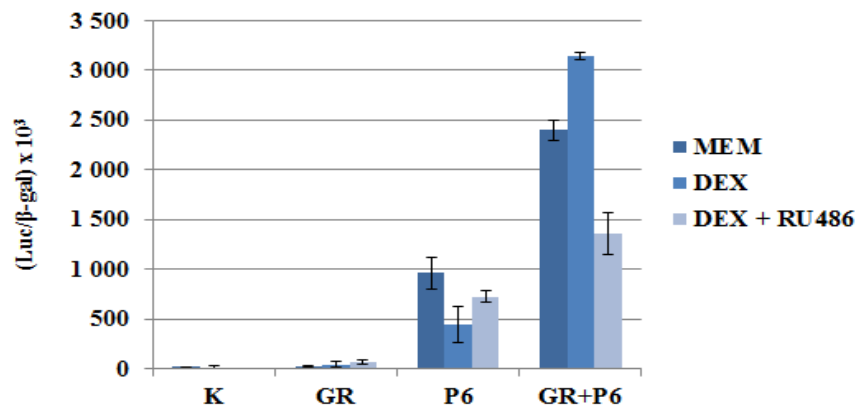
I det første eksperiment (A) ser det ikke ut til at verken deksametason eller RU486 hadde noen spesiell innvirkning på cellene kotransfektet med GR og Pax6, siden luciferaseaktiviteten er ganske lik i de tre transfeksjonene. Pax6 ga høy luciferaseverdi i forsøk A sammenlignet med resultatet i B og C, både i cellene som ble inkubert i vanlig cellemedium og de som ble stimulert med deksametason. Ser en på kombinasjonen av GR og Pax6 i celler stimulert med deksametason i A, er ikke synergismen like sterk som i tidligere forsøk hvor de to ble kombinert. I eksperiment A var  $\beta$ -gal-verdiene lave i forhold til tidligere forsøk. Cellene som ble brukt her var gamle, og det kan ha påvirket transfeksjonseffektiviteten. Flere faktorer tyder altså på at resultatene i A antageligvis er mindre pålitelige enn resultatene i B og C. Eksperiment B viser trenden som var forventet når RU486 ble inkludert. Her vises en tydelig synergistisk effekt av GR og Pax6 sammen, når cellene ble stimulert med deksametason. Luciferaseaktiviteten halveres når cellene utsettes for RU486 i tillegg. Luciferaseaktiviteten i cellene inkubert med RU486 kombinert med deksametason er også betydelig lavere enn luciferaseaktiviteten i cellene som ble inkubert i vanlig cellemedium. Eksperiment C viser også en tydelig synergisme mellom Pax6 og GR i nærvær av deksametason, men i dette tilfellet reduserer ikke luciferaseaktiviteten betydelig når cellene inkuberes med RU486. Luciferaseaktiviteten i cellene som bare ble inkubert i vanlig cellemedium er lavest i dette eksperimentet.



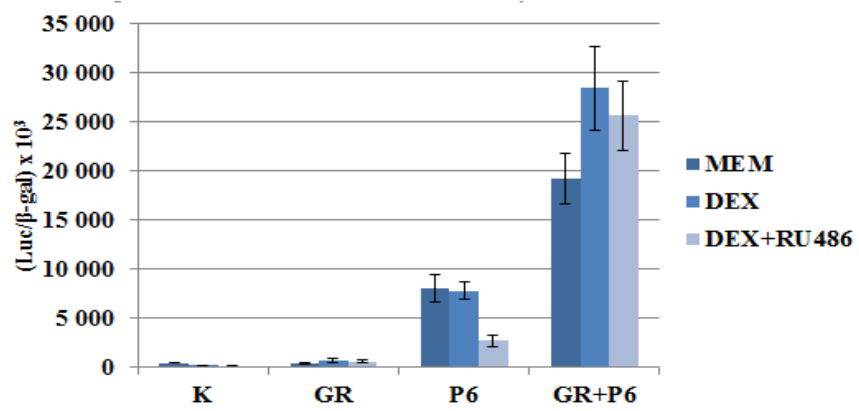
A



B



C



**Figur 4.13 Kotransfeksjon med uttrykksvektorer for GR og Pax6 på MMP2-promoteren i celler inkubert i vanlig cellemedie, 100 nM deksametason og en kombinasjon av 2  $\mu$ M RU486 og 100 nM deksametason.** HeLa celler ble transfektert med kalsium-presipitert plasmid DNA. Fire ulike transfeksjoner med Kontroll, GR, Pax6 og kombinasjonen av GR og Pax6 ble testet ut med 0,50  $\mu$ g MMP2-promoter. I kontrolltransfeksjonen (K) ble pCI-neo kotransfektet med pKW10. Uttrykksvektor for GR ble kotransfektet med pKW10 (GR.) Uttrykksvektor for Pax6 ble kotransfektet med pCI-neo (P6.) GR og Pax6 ble transfektet sammen (GR+P6.) I alle transfeksjonene ble det benyttet 0,50  $\mu$ g av aktuelle plasmider. Hver transfeksjon ble testet ut i celler inkubert i vanlig cellemedie (MEM,) MEM tilsatt 100 nM deksametason og MEM tilsatt 100 nM deksametason i tillegg til 2  $\mu$ M RU486. Cellene ble stimulert med deksametason 24 timer etter tilsetting av plasmid DNA. RU486 ble tilsatt 30 minutter før deksametason-stimulering. Cellene ble høstet 20 timer senere og klargjort for luciferase reporter gen assay. Transfeksjonene ble utført i triplikat og transfeksjonsoppsettet ble repetert tre ganger. Figurene A, B og C viser resultatet fra de tre eksperimentene.

---

## 5. Diskusjon

Deksametason-inkubering av to batcher med sebrafiskembryo ga varierende resultater når det gjaldt genuttrykket til de testede genene. Av den grunn ble genene forsøkt gruppert etter lignende uttrykksmønstre innad i hver batch. Pax6.1 og MMP2 viste lignende uttrykksmønstre i den ene batchen, og kombinasjonen av Pax6 og GR på MMP2 promoteren ble derfor undersøkt nærmere i transiente transfeksjoner. I denne delen av prosjektet ble en tydelig synergistisk effekt av kombinasjonen av Pax6 og GR på MMP2 promoteren observert, når cellene ble stimulert med deksametason.

### 5.1 Relativ kvantifisering av genuttrykk i sebrafiskembryo

Det er kjent at noen MMPer reguleres av transkripsjonsfaktoren Pax6. Pax6 nedregulerer uttrykket av MMP2 i glioblastomaceller i hjernen (15). Uttrykket av MMP9 kan også påvirkes av Pax6. En studie gjort av Sivak og kollegaer viste at Pax6 slår på uttrykket av MMP9 og sørger for migrering av epitelceller i hornhinnen på øyet, noe som er nødvendig for at sår skal gro under sårheling (14). En annen transkripsjonsfaktor som har vist seg å ha MMPer som målgener er GR. I sebrafisk har både MMP2, MMP9 og MMP13 vist seg å påvirkes av GR. I 72 hpf embryo fører GR til oppregulering av MMP2 og MMP9 noe som igjen påvirker craniofacial morfogenese. Uttrykket av MMP13 oppreguleres også av GR, og kan resultere i blant annet craniofaciale abnormaliteter og ødemer i hjertepose og plommesekk (23, 24).

Uttrykket av et utvalg Pax-, MMP- og Timp-gener ved tre utviklingstrinn i embryogenesen hos sebrafisk ble undersøkt. Embryoene ble inkubert i tre forskjellige konsentrasjoner av glukokortikoidet deksametason og høsting ble gjort på tre ulike utviklingstrinn. Den opprinnelige planen var å se om noen av de utvalgte genene klart ble opp- eller nedregulert av deksametason og om reguleringsmønstret endret seg med økende konsentrasjon av deksametason eller over tid underveis i embryoutviklingen. Det var også av interesse å se om noen av de utvalgte MMP- og Timp-genene hadde felles uttrykksmønstre som Pax-genene (Pax6.1, Pax6.2, Pax2a og Pax2b), for å avdekke mulig regulering.

Inkuberingsforsøket ble gjennomført to ganger og det var stor variasjon fra batch til batch, både med hensyn på opp- eller nedregulering av genene og uttrykksmønster (dvs. hvordan genuttrykket endret seg med økende konsentrasjon av deksametason). I noen tilfeller f. eks. for Pax6.1 så genet ut til og kanskje være oppregulert i forhold til kontrollen i den ene batchen, mens det så ut til og kanskje være nedregulert i den andre. Ideelt sett bør et forsøk repeteres flere ganger for å kunne bekrefte eventuelle trender som observeres, spesielt når resultatene variere så mye som i dette forsøket. For å kunne bekrefte at deksametason faktisk påvirker genuttrykket og at det er signifikante forskjeller i genuttrykk, bør det gjøres statistiske beregninger, men det krever flere enn to paralleller av et forsøk. Dessverre var det ikke mulig å repetere forsøket flere ganger, pga. begrenset med tid.

Det faktum at variasjonen i uttrykksmønster for genene var såpass stor fra batch 1 til batch 2, bidrar til å svekke teorien om mulig felles genregulering. Gener som viste samme uttrykksmønster i batch 1, hadde ulike uttrykksmønster i batch 2. Det var derfor bare mulig å gruppere gener med felles uttrykksmønster innad i en batch. Dette ble gjort på bakgrunn av at embryoene innad i en batch har vært utsatt for den samme deksametason-løsningen og de har gjennomgått samme prøveopparbeidelse. Felles uttrykksmønster mellom MMPer eller Timper og Paxene betyr ikke nødvendigvis at genene reguleres av Paxene. Dersom det er kjent at genene uttrykkes i samme områder i de samme cellene og til samme tid under f.eks. embryogenesen hos sebrafisk, kan teorien om mulig regulering forsterkes.

Det ble blant annet observert felles uttrykksmønster for Pax6.2, MMP14a og Pax2a i den ene batchen. Det har lenge vært kjent at Pax6 spiller en viktig rolle under utviklingen av øyet, blant annet i dannelsen av retina. Janssens og kollegaer har funnet ut at også MMP14a i sebrafisk har en viktig rolle under utviklingen av retina. MMP14a er nødvendig for korrekt utvikling av retinoblaster samt neurogenese, differensiering og laminering av retina (53). Siden begge disse to genene uttrykkes i retina, kan det være mulig at Pax6.2 genet er involvert i reguleringen av MMP14 noe som ikke er usannsynlig siden flere andre MMPer har vist seg å være målgener for Pax. Men for å bekrefte dette måtte man ha gjort nærmere studier av promoteren til MMP14a, og hvordan denne reguleres. Både Pax6.2 og Pax2a uttrykkes i hjernen, CNS og i retina i øyet, men i ulike områder eller i ulike celletyper. Pax2a har blant annet blitt detektert i forløperen til synsnerven, midthjernen og langs ryggmargen og i hjernestammen i sebrafiskembryo (54). De to Pax genene viser samme uttrykksmønster, noe som kan tyde på at de er underlagt en felles reguleringsmekanisme. Dersom de to genene

hadde vist et lignende uttrykksmønster også i batch 2, kunne det vært en indikasjon på at de to genene reguleres likt av GR.

I batch 2 viste Pax6.1 og MMP2 lignende reguleringsmønster. Begge genene uttrykkes i hjernen under embryoutviklingen hos sebrafisk, men i ulike områder til ulik tid. MMP2 har blitt identifisert i embryo 72 hpf i mellomhjernen av Hillegasse og kollegaer (23), mens Pax6.1 er identifisert på et tidligere stadie i utviklingen i hjernestammen og et område av hjernen som kalles diencephalon (38). Om de to uttrykkes på samme sted til samme tid under utviklingen av embryoet er uvisst. Som nevnt tidligere er MMP2 et kjent målgen for Pax6, men om dette forholdet også ses under hjerneutviklingen hos sebrafiskembryo er fortsatt uvisst. Informasjonen som er tilgjengelig om MMP, Timp og Pax genenes uttrykk til tid og sted i embryoutviklingen, kan gi indikasjoner på om disse er mulige målgener regulert av f.eks. Pax6, men det kan det ikke trekkes klare konklusjoner om.

Timp2a følger samme uttrykkssmønster som Pax2b i batch 1 og Pax2a i batch 2. Det gir en indikasjon på at Timp2a genet faktisk kan reguleres av Pax2 genet i sebrafiskembryo. I embryo 48 hpf uttrykkes Timp2a i hjernen og i muskler langs embryokroppen (55). Som tidligere nevnt uttrykkes også Pax2 i hjernen, men om de to genene er uttrykt i samme område og celler er ukjent.

Den observerte variasjonen i genuttrykk mellom de to batchene tyder på at det er flere faktorer enn bare deksametason-konsentrasjonen som embryoene inkuberes i og utviklingstrinnet embryoene var på ved høsting som påvirker genuttrykket.

I inkuberingsforsøket ble tre konsentrasjoner av deksametason 0,68 µg/ml, 6,80 µg/ml og 68,0 µg/ml benyttet. Sammenlignet med andre lignende studier er disse konsentrasjonene lave. Likevel ble de vurdert til å være biologisk relevante. Konsentrasjonene av deksametason som ble benyttet i dette forsøket og korresponderende humane doser er vist i tabell 5.1. Den korresponderende humane dosen er beregnet utfra et antatt kroppsvolum hos et voksent menneske på 60-70 L. Ved peroral eller intravenøs deksametason-behandling hos mennesker kan dosen variere fra 0,25-20 mg/døgn, avhengig av indikasjon (56). Den tilsvarende humane dosen til den konsentrasjonen som embryoene utsettes for, er altså mye høyere enn normale doser som gis til mennesker. Men det er viktig å merke seg at den beregnede korresponderende humane dosen er et røft estimat, hvor det f.eks. ikke tas hensyn til

legemidlets ADME-egenskaper (absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon) som er svært viktige faktorer. Her tas det faktisk ikke hensyn til annet enn ett antatt kroppsvolum.

**Tabell 5.1** Deksametason-konsentrasjonene som ble testet ut og deres korresponderende humane doser.

<b>Konsentrasjon deksametason (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Korresponderende human dose</b>
0,68	41- 48 mg
6,80	410- 480 mg
68,0	4100- 4800 mg

Hillegasse og kollegaer har undersøkt uttrykket av MMP-13 ved normal embryogenese hos sebrafisk og hos embryo utsatt for deksametason. Tre konsentrasjoner av deksametason (1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) ble benyttet i deres forsøk. Det ble verken observert genotypisk eller fenotypisk forskjell mellom kontrollembryo og de som ble inkubert i de to laveste deksametason-konsentrasjonen. Ved den høyeste konsentrasjonen var det signifikant økning av MMP13 mRNA (24). I videre forskning på andre MMPer benyttet samme forskningsgruppe kun den høyeste konsentrasjonen av deksametason (100  $\mu\text{g/ml}$ ), siden den dosen viste seg å være effektiv for å induserer uttrykket av MMP13 hos sebrafisk under utvikling (23).

Uttrykket av MMP2 i sebrafisk inkubert i deksametason har blitt undersøkt tidligere. Hillegasse og kollegaer viste i sine forsøk vist at uttrykket av MMP2 øker signifikant i embryo 72 hpf, inkubert med 100  $\mu\text{g/ml}$  deksametason (23). Konsentrasjonen av deksametason som ble brukt i deres forsøk er høyere enn de som ble brukt i dette forsøket. Høyeste deksametason-konsentrasjon i dette forsøket var 68  $\mu\text{g/ml}$  og foldverdiene for MMP2 uttrykk i forhold til kontrollen i batch 1 og 2 var på 0,8 og 1,0. Sett i lys av cut-off verdiene som ble satt, var uttrykksnivået i deksametason-inkuberte embryo uendret i forhold til kontrollen. Det kunne vært interessant og inkludere ytterligere to konsentrasjoner f.eks. 10 og 100x høyere enn den høyeste konsentrasjonen som ble benyttet i dette prosjektet. Man kunne da sett på om disse to konsentrasjonene gav bedre samsvar mellom ulike batcher. Siden det bare ble gjort relativ kvantifisering av genuttrykk på to batcher, og de to viste varierende resultater kan det ikke konkluderes med om de forskjellene i genuttrykk som ble observert er

statistisk signifikante. For å kunne si noe om det, må det som tidligere nevnt gjøres gjentatte repetisjoner av forsøket.

Når det gjelder konsentrasjonen av deksametason embryoene ble inkubert i, har vi bare kontroll på konsentrasjonen i løsningen vi tilsetter i brønnene hvor embryoene oppbevares. Hvor mye deksametason som faktisk passerer chorion og når inn til embryoet, kan vi ikke si sikkert. Den faktiske konsentrasjonen som embryoet utsettes for innenfor chorion, vil f.eks. være avhengig av kvaliteten på chorion. I andre forsøk gjennomført på vår lab, har man observert at forholdene som sebrafiskene det avles egg fra, har stor betydning for kvaliteten på embryoene. I tillegg vil det trolig dannes avfallsstoffer i brønnene ettersom tiden går. Blant annet kan det tenkes at det vil være rester av avfallsstoffer fra embryo som dør underveis, selv om disse fjernes. Hvordan dette vil virke inn på miljøet som embryoene er i og i hvilken grad de påvirkes av det med tanke på genuttrykk er uvisst, men det kan tenkes at det er en faktor som kan påvirke embryoene og deres utvikling.

Holdbarheten på løsninger med deksametason i E3, ble i dette forsøket satt til 4 uker.

Løsningene ble oppbevart ved 4 °C i sentrifugerør, beskyttet mot lys. Det ble ikke foretatt konsentrasjonsmålinger på stock-løsningene og fortykningene som ble laget. Siden det ikke foreligger data som bekrefter at den holdbarheten som ble satt er ok, kan det ikke med sikkerhet sies at den deksametason-løsningen embryoene ble inkubert i var identisk for de to batchene som ble undersøkt.

Modellsystemet som benyttes her er et biologisk system og eksakt samme betingelser fra et forsøk til et annet er ikke sannsynlig å få til. I tillegg er det grunn til å tro at det vil være individforskjeller mellom sebrafisk, på samme måte som med andre dyrearter. Likevel var det forventet å se en større likhet mellom de to eksperimentene enn det som ble observert. Det faktum at forsøket bare ble gjort to ganger og at det var stor variasjon mellom de to batchene, gjør at det ikke er mulig å konkludere med i hvilken grad deksametason faktisk påvirker genuttrykket. Forsøket bør repeteres mange ganger, slik at det blir mulig å gjøre statistiske beregninger og først da kan man si noe om mulig deksametasonpåvirkning. Resultatene som ble lagt frem i dette prosjektet, blir bare spekulasjoner om trender. I andre studier som har undersøkt hvordan genuttrykket i sebrafisk moduleres av deksametason, har konsentrasjonen av legemidlet vært mye høyere enn her. Likevel er konsentrasjonene som ble testet ut her

biologisk relevante, fordi de humane dosene som tilsvarer den konsentrasjonen embryoene ble inkubert i er høyere enn det som ansett som normale doser til mennesker. Basert på resultater fra Hillegasse og kollegaer er det likevel grunn til å tro at de konsentrasjonene som ble testet ut i vårt forsøk var for lave til at det i det hele tatt har påvirket genuttrykket i embryoene, alternativt at påvirkningen fører til en så lav endring i genuttrykk at den er vanskelig å detektere når antall forsøk er så små. Kanskje er de resultatene vi har sett, bare et resultat av naturlig variasjon i genuttrykk hos embryo.

## **5.2 Kotransfeksjon med GR og Pax6 på MMP2-promoter**

I dette studiet fikk vi bekreftet at GR og Pax6 begge to kunne regulerer uttrykk fra MMP2 promoter hver for seg. I transfeksjoner med GR alene viste det seg at transkripsjonsfaktoren varierte mellom å aktivere og repressere MMP2 promoter (tabell 4.2). GR kan fungere både som aktivator og repressor, men her var det forventet at den ville ha aktiverende egenskaper, siden de innledende forsøkene viste økende promototeraktivitet med med økende mengde uttrykksvektor. I eksperiment 1 og 3 fungerte GR som repressor ved laveste og høyeste konsentrasjon av tomvektoren, dette var ikke som forventet. I eksperiment 2 aktiverer GR MMP2 ved alle konsentrasjonene av tomvektoren, størst foldøkning (5,3) er det for den laveste konsentrasjonen av tomvekoren. Foldøkningen i forhold til kontrollen som ses her er svært liten i forhold til den enorme foldøkningen som ses når GR og Pax6 kombineres. Det faktum at GR varierte mellom å være en repressor og en aktivator ble ansett for å være ubetydelig siden aktiviteten i celler kotransfektet med GR og Pax6 var så mye høyere.

Det er publisert at Pax6 represserer MMP2 promoter (15), men i transfektete HeLa celler observerte vi en ganske sterk aktivering av MMP2 promoter i nærvær av kotransfektet Pax6. I to av de tre forsøkene er det den midterste konsentrasjonen av Pax6 som gir sterkest aktivering (foldøkning på 23,7 og 15,8) sammenlignet med kontrollen. I likhet med foldverdiene for GR, er foldverdiene for Pax6 relativt lave sammenlignet med foldøkningen som GR og Pax6 gir sammen, dette gjelder for de to høyeste konsentrasjonene av Pax6 i kombinasjon med GR.

I dette forsøket fungerer Pax6 som en aktivator av MMP2 promoter, mens den i glioblastoma celler er kjent for og repressere det samme genet. Når en og samme transkripsjonsfaktor aktiverer et gen i en type celler og represserer det samme genet i en annen type celler, har det trolig med cellespesifikke forskjeller og gjøre. Hvilke



transkripsjonsfaktorer og ko-faktorer som finnes i cellen vil være av betydning.

Transkripsjonsregulering er en svært kompleks prosess og det finnes både ko-aktivatorer og ko-repressorer som kan påvirke transkripsjonsfaktorer. Disse kofaktorene kan utøve sin effekt på transkripsjonsprosessen alene eller som en del av et større kompleks (57). MMP2 kan altså påvirkes direkte av ulike kofaktorer eller kofaktorer kan påvirke Pax6 sin effekt på MMP2 promoteren.

Kotransfeksjonene med GR og Pax6 viste tydelig at disse to sammen har en synergistisk effekt på MMP2-promoterens aktivitet. Denne synergien var avhengig av en viss mengde Pax6 i forhold til GR for å inntreffe, siden den bare ble observert ved de to høyeste konsentrasjonene av Pax6 (GR konsentrasjonen ble holdt konstant). Det ble gjort forsøk på å verifisere om den observerte synergismen mellom Pax6 og GR var avhengig av deksametason-stimulering. I transfeksjonene hvor cellene ble inkubert med GR-antagonisten RU486 i tillegg til deksametason var det forventet at promoteraktiviteten skulle gå ned og det var tilfelle i to av de tre eksperimentene som ble gjort. Pga. store standardavvik i 3. eksperiment, både for cellene inkubert med deksametason og de som ble inkubert med både deksametason og RU486, kan det ikke sies med sikkerhet om nedgangen i luciferaseaktivitet som illustrert i figur 4.13 faktisk er troverdig.

I likhet med sebrafiskforsøket så bør det også gjøres flere eksperimenter av transfeksjonsforsøket. Det kreves større mengder data før man med sikkerhet kan si at den observerte synergismen er avhengig av deksametasonstimulering. I denne delen av forsøket kunne vi eventuelt forsøkt og titrere inn på en passende konsentrasjon av RU486. Det ble kun testet ut en konsentrasjon av antagonisten, 2  $\mu\text{M}$  i kombinasjon med 100 nM deksametason. Den samme konsentrasjonen av antagonisten og agonisten ble benyttet i en studie med en human leukemi cellelinje CEM-C7 (58). I andre studier har det blitt benyttet både høyer og lavere konsentrasjoner av antagonisten. I en studie med linseceller fra rotter ble det benyttet 5  $\mu\text{M}$  av både deksametason og RU486 (59). En annen studie med HeLa celler benyttet 100 nM deksametason som i dette forsøket, men en lavere RU486 enn her; 1  $\mu\text{M}$  (60). Det kan altså være aktuelt å prøve andre konsentrasjoner av RU486, for å se om det vil kunne gi mer entydige resultater enn det som er oppnådd hittil.

MMP2-promoterens som ble benyttet i dette prosjektet er human. Ved søk i databasen Consite (61), ble det funnet to mulige bindingssteder for Pax6 i denne sekvensen. Kuo og kollegaer har identifisert steder hvor GR binder seg i genomet til mus. De fant to ulike regioner i nærheten av MMP2 genot hvor GR kan binde (62). Dersom det viser seg at det er god homologi mellom mus og menneske i det aktuelle området, er det mulig at GR kan binde den humane MMP2-promoterens i det samme området. For å finne ut om det er disse Pax6 og GR setene som er viktige for den synergismen vi har observert må disse setene muteres før transfeksjonsforsøkene gjentas.

### **5.3 Fremtidige aspekter**

Når det gjelder forsøket hvor sebrafisk ble inkubert i deksametason, så er det klart at dette må repeteres flere ganger. Først når man har data nok til å kunne gjøre statistiske beregninger er det mulig å si noe sikkert om Pax6 uttrykket i seg selv reguleres under påvirkning av deksametason samt hvordan reguleringen av de andre inkluderte genene påvirkes ved aktivering av GR. I tillegg kan det være aktuelt å inkludere flere høyere konsentrasjoner av deksametason i forsøket, for å se om det kanskje fører til større og mer reproducerbare endringer i genuttrykket.

Det er også interessant å se på proteinnivået av de ulike genene i forhold til genuttrykket på mRNA nivå. Det kan f.eks. ekstraheres proteiner fra sebrafiskembryo inkubert i deksametason og se på proteinnivå ved å gjøre Westernblot for de genproduktene det finnes antistoffer mot.

Neste steg i forsøket med MMP2-promoterens kan være å trunkere MMP2 promoterens for å finne den eventuelle regionen av som er viktig for synergismen som observeres ved kombinasjon av aktivert GR og Pax6. Som nevnt tidligere er det identifisert to bindingssteder for Pax6 i den humane MMP2 sekvensen og to mulige regioner nær MMP2 genot i mus hvor GR kan binde. Ved å mutere disse aktuelle setene og gjenta transfeksjonsforsøkene, er det mulig å finne ut av om akkurat disse setene er viktige for den observerte synergismen. For å undersøke om det er direkte fysisk kontakt mellom GR og Pax6 når de påvirker aktiviteten til MMP2 promoterens kan det gjøres GST-pull down, hvor man ser etter protein-protein-interaksjoner.

Det er også aktuelt å gjøre transfeksjonsdelen av dette prosjektet med MMP9 promoteren. Som nevnt tidligere er også dette genet et kjent målgen for både GR og Pax6. Begge transkripsjonsfaktorene oppregulerer uttrykket av MMP9. Det kunne vært interessant å se hvordan aktiviteten til denne promoteren påvirkes ved deksametason-stimulering av GR.

Basert på resultatet fra inkubasjonsforsøket kunne det også vært aktuelt å se på hvordan uttrykket av Timp2a påvirkes av Pax2 og GR, siden Timp2a viste lignende uttrykksmønster med Pax2a og Pax2b i de to batchene. Det kunne også vært aktuelt å se på hvordan uttrykket av MMP14a påvirkes av Pax6 og GR, siden også disse to genene hadde lignende uttrykksmønster i inkubasjonsforsøket.

## 6. Konklusjon

De to transkripsjonsfaktorene GR og Pax6 er viktige i tidlig embryoutvikling, og regulerer begge uttrykket til noen felles målgener. Blant disse er matriks metalloproteinaserne MMP2 og MMP9.

I denne studien brukte vi sebrafisk som modellsystem for å se om genuttrykket til Pax6 og Pax2, samt et utvalg MMP- og Timp-gener ble påvirket av glukokortikoidet deksametason. Vi fant ut at det med de konsentrasjonene av deksametason som vi brukte ble for stor variasjon i de individuelle genuttrykkene fra batch til batch til å si noe sikkert. Det ble i midlertidig observert noen felles reguleringsmønstre innad i hver batch mellom både Pax6 og Pax2 genene og enkelte MMP-gener.

Pax6.1 og MMP2 hadde et felles reguleringsmønster i ett av deksametason-forsøkene i sebrafisk. Transiente transfeksjoner og reportergen assay i HeLa celler bekreftet at MMP2 promoteren er regulert av både Pax6 og GR. Men vi fant i tillegg ut av Pax6 og GR sammen har en voldsom synergistisk effekt på transkripsjonen av MMP2, noe som er en spennende oppdagelse og kan være et viktig funn hvis det også kan bekreftes *in vivo*.

## 7. Referanser

1. Bouchard M, Schleiffer A, Eisenhaber F, Busslinger M. Pax Genes: Evolution and Function. eLS: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
2. Mansouri A, Hallonet M, Gruss P. Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Current Opinion in Cell Biology*. 1996 12//;8(6):851-7.
3. 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 Dec;12(6A):2281-94.
4. Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA. PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochemical pharmacology*. 2007 Jan 1;73(1):1-14.
5. Mansouri A, Goudreau G, Gruss P. Pax genes and their role in organogenesis. *Cancer research*. 1999 Apr 1;59(7):1707s-9s.
6. Bouchard M, Souabni A, Mandler M, Neubuser A, Busslinger M. Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes & development*. 2002 Nov 15;16(22):2958-70.
7. Buckingham M, Relaix F. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Bi*. 2007;23:645-73.
8. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol*. 2007 May;8(5):463-70.
9. Haubst N, Berger J, Radjendirane V, Graw J, Favor J, Saunders GF, et al. Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development. *Development*. 2004 Dec;131(24):6131-40.
10. 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 Jul;26(7):1663-72.
11. Epstein JA, Glaser T, Cai J, Jepeal L, Walton DS, Maas RL. Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes & development*. 1994 Sep 1;8(17):2022-34.
12. Hill RE, Favor J, Hogan BLM, Ton CCT, Saunders GF, Hanson IM, et al. Mouse Small Eye Results from Mutations in a Paired-Like Homeobox-Containing Gene. *Nature*. 1991 Dec 19;354(6354):522-5.
13. Gauthier BR, Gosmain Y, Mamin A, Philippe J. The beta-cell specific transcription factor Nkx6.1 inhibits glucagon gene transcription by interfering with Pax6. *The Biochemical journal*. 2007 May 1;403(3):593-601.
14. Sivak JM, Mohan R, Rinehart WB, Xu PX, Maas RL, Fini ME. Pax-6 expression and activity are induced in the reepithelializing cornea and control activity of the transcriptional promoter for matrix metalloproteinase gelatinase B. *Dev Biol*. 2000 Jun 1;222(1):41-54.
15. Mayes DA, Hu Y, Teng Y, Siegel E, Wu X, Panda K, et al. PAX6 suppresses the invasiveness of glioblastoma cells and the expression of the matrix metalloproteinase-2 gene. *Cancer research*. 2006 Oct 15;66(20):9809-17.

16. Schaaf MJM, Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2002 12//;83(1–5):37-48.
17. Yudt MR, Cidlowski JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Molecular endocrinology*. 2002 Aug;16(8):1719-26.
18. Schoneveld OJ, Gaemers IC, Lamers WH. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochimica et biophysica acta*. 2004 Oct 21;1680(2):114-28.
19. Schaaf MJM, Champagne D, van Laanen IHC, van Wijk DCWA, Meijer AH, Meijer OC, et al. Discovery of a functional glucocorticoid receptor beta-isoform in zebrafish. *Endocrinology*. 2008 Apr;149(4):1591-9.
20. Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. 1999 May;64(5):310-9.
21. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*. 2003 May 2;92(8):827-39.
22. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*. 2006 Feb 15;69(3):562-73.
23. Hillegass JM, Villano CM, Cooper KR, White LA. Glucocorticoids alter craniofacial development and increase expression and activity of matrix metalloproteinases in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2008 Apr;102(2):413-24.
24. Hillegass JM, Villano CM, Cooper KR, White LA. Matrix metalloproteinase-13 is required for zebra fish (*Danio rerio*) development and is a target for glucocorticoids. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2007 Nov;100(1):168-79.
25. Zhang J, Bai S, Zhang X, Nagase H, Sarras MP, Jr. The expression of gelatinase A (MMP-2) is required for normal development of zebrafish embryos. *Dev Genes Evol*. 2003 Sep;213(9):456-63.
26. Coyle RC, Latimer A, Jessen JR. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates cell migration during zebrafish gastrulation: Evidence for an interaction with non-canonical Wnt signaling. *Exp Cell Res*. 2008 Jun 10;314(10):2150-62.
27. Zhang J, Bai S, Tanase C, Nagase H, Sarras MP, Jr. The expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) is required for normal development of zebrafish embryos. *Dev Genes Evol*. 2003 Aug;213(8):382-9.
28. Wyatt RA, Keow JY, Harris ND, Hache CA, Li DH, Crawford BD. The zebrafish embryo: a powerful model system for investigating matrix remodeling. *Zebrafish*. 2009 Dec;6(4):347-54.
29. Langheinrich U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2003 Sep;25(9):904-12.
30. Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature reviews Drug discovery*. 2005 Jan;4(1):35-44.

31. MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish-Based Small Molecule Discovery. *Chemistry & Biology*. 2003 10//;10(10):901-8.
32. Patton EE, Zon LI. The art and design of genetic screens: Zebrafish. *Nat Rev Genet*. 2001 Dec;2(12):956-66.
33. Renninger SL, Schonhaler HB, Neuhauss SC, Dahm R. Investigating the genetics of visual processing, function and behaviour in zebrafish. *Neurogenetics*. 2011 May;12(2):97-116.
34. Mullins MC, Hammerschmidt M, Haffter P, Nusslein-Volhard C. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Current biology : CB*. 1994 Mar 1;4(3):189-202. Epub 1994/03/01. eng.
35. Parnig C, Seng WL, Semino C, McGrath P. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay and drug development technologies*. 2002 Nov;1(1 Pt 1):41-8.
36. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2005 Jul;86(1):6-19.
37. Nornes S, Clarkson M, Mikkola I, Pedersen M, Bardsley A, Martinez JP, et al. Zebrafish contains two pax6 genes involved in eye development. *Mechanisms of development*. 1998 Oct;77(2):185-96.
38. Krauss S, Johansen T, Korzh V, Moens U, Ericson JU, Fjose A. Zebrafish pax[zf-a]: a paired box-containing gene expressed in the neural tube. *The EMBO journal*. 1991 Dec;10(12):3609-19.
39. Kleinjan DA, Bancewicz RM, Gautier P, Dahm R, Schonhaler HB, Damante G, et al. Subfunctionalization of duplicated zebrafish pax6 genes by cis-regulatory divergence. *PLoS genetics*. 2008 Feb;4(2):e29.
40. Ravi V, Bhatia S, Gautier P, Loosli F, Tay BH, Tay A, et al. Sequencing of Pax6 loci from the elephant shark reveals a family of Pax6 genes in vertebrate genomes, forged by ancient duplications and divergences. *PLoS genetics*. 2013 Jan;9(1):e1003177.
41. Schoonheim PJ, Chatzopoulou A, Schaaf MJM. The zebrafish as an in vivo model system for glucocorticoid resistance. *Steroids*. 2010 Dec;75(12):918-25.
42. Nesan D, Kamkar M, Burrows J, Scott IC, Marsden M, Vijayan MM. Glucocorticoid receptor signaling is essential for mesoderm formation and muscle development in zebrafish. *Endocrinology*. 2012 Mar;153(3):1288-300.
43. Paulsen RE, Granas K, Johnsen H, Rolseth V, Sterri S. Three related brain nuclear receptors, NGFI-B, Nurr1, and NOR-1, as transcriptional activators. *J Mol Neurosci*. 1995;6(4):249-55.
44. Strom BO, Aden P, Mathisen GH, Lomo J, Davanger S, Paulsen RE. Transfection of chicken cerebellar granule neurons used to study glucocorticoid receptor regulation by nuclear receptor 4A (NR4A). *J Neurosci Meth*. 2010 Oct 30;193(1):39-46.
45. Lawrence C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*. 2007 9/14//;269(1-4):1-20.
46. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1995 Jul;203(3):253-310.

47. MedicinesComplete. Solubility of dexamethason [updated 12.02.2013; cited 2012 23.12.2012]. Available from:  
[http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/ms-1084-t.htm?q=dexamethasone&t=search&ss=text&p=1#\\_hit](http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/ms-1084-t.htm?q=dexamethasone&t=search&ss=text&p=1#_hit).
48. Sigma-Aldrich. Certificate of Analysis Dexamethasone Water-Soluble: Sigma-Aldrich; [updated 01.04.2011; cited 2012 19.12.2012]. Available from:  
[http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/COFA/D2/D2915/D2915-BULK\\_031M1358V\\_.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/COFA/D2/D2915/D2915-BULK_031M1358V_.pdf).
49. Sigma-Aldrich. Dexamethasone Water-Soluble [cited 2012 19.12.2012]. Available from:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d2915?lang=en&region=NO>.
50. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1559-82.
51. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
52. Yu CY, Mayba O, Lee JV, Tran J, Harris C, Speed TP, et al. Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor binding regions in adipocytes reveal gene network involved in triglyceride homeostasis. *PloS one.* 2010;5(12):e15188.
53. Janssens E, Gaublomme D, De Groef L, Darras VM, Arckens L, Delorme N, et al. Matrix metalloproteinase 14 in the zebrafish: an eye on retinal and retinotectal development. *PloS one.* 2013;8(1):e52915.
54. Krauss S, Johansen T, Korzh V, Fjose A. Expression of the zebrafish paired box gene *pax[zf-b]* during early neurogenesis. *Development.* 1991 Dec;113(4):1193-206.
55. Zhang JS, Bai S, Tanase C, Nagase H, Sarras MP. The expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) is required for normal development of zebrafish embryos. *Dev Genes Evol.* 2003 Aug;213(8):382-9.
56. Glukokortikoider, Deksametason. *Norsk legemiddelhåndbok.* Epub 20.06.2010.
57. Lonard DM, O'Malley B W. Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Molecular cell.* 2007 Sep 7;27(5):691-700.
58. Garbrecht MR, Schmidt TJ. Expression and Regulation of 11- $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Enzyme Activity in the Glucocorticoid-Sensitive CEM-C7 Human Leukemic Cell Line. *ISRN Oncology.* 2013;2013:5.
59. Xie GL, Yan H, Lu ZF. Inhibition of glucocorticoid-induced alteration of vimentin by a glucocorticoid receptor antagonist RU486 in the organ-cultured rat lens. *Molecular vision.* 2011;17:32-40.
60. Lasa M, Brook M, Saklatvala J, Clark AR. Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb;21(3):771-80.
61. Sandelin A, Wasserman WW, Lenhard B. ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic acids research.* 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W249-52.



62. Kuo TY, Lew MJ, Mayba O, Harris CA, Speed TP, Wang JC. Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. *P Natl Acad Sci USA*. 2012 Jul 10;109(28):11160-5.

## 8. Appendiks

### Appendiks 1: Ct-verdier og relativ kvantifisering av genuttrykk etter q-PCR.

I første kolonne fra venstre oppgis tidspunkt for høsting av embryo i hpf og andre kolonne viser om prøven er en kontroll (E3) eller hvilken konsentrasjon av deksametason embryoene ble inkubert i

#### Pax6.1

		1. eksperiment			2. eksperiment		
		Ct	Ct-snitt	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	Ct	Ct-snitt	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
24	E3	17,86	17,46		19,89	19,66	
24	E3	17,06			19,43		
24	0,68	18,33	18,50	<b>0,53</b>	19,22	19,22	<b>1,45</b>
24	0,68	18,67			19,22		
24	6,80	16,96	17,21	<b>0,67</b>	18,81	18,89	<b>1,58</b>
24	6,80	17,46			18,97		
24	68,00	No Ct	17,48	<b>0,62</b>	19,21	19,15	<b>1,42</b>
24	68,00	17,48			19,15		
48	E3	17,61	17,76		18,24	18,23	
48	E3	17,91			18,21		
48	0,68	16,97	17,04	<b>0,86</b>	18,35	18,34	<b>1,44</b>
48	0,68	17,10			18,33		
48	6,80	17,91	17,91	<b>1,32</b>	19,39	18,99	<b>0,95</b>
48	6,80	17,91			18,58		
48	68,00	17,60	17,75	<b>0,46</b>	19,51	19,49	<b>0,44</b>
48	68,00	17,75			19,49		
72	E3	17,83	17,76		18,86	18,64	
72	E3	17,69			18,42		
72	0,68	17,92	17,61	<b>0,68</b>			
72	0,68	17,30					
72	6,80	18,13	18,17	<b>0,95</b>	18,60	18,73	<b>1,77</b>
72	6,80	18,21			18,85		
72	68,00	17,92	17,89	<b>0,61</b>	19,18	19,37	<b>0,79</b>
72	68,00	17,89			19,56		

**Pax6.2**

		1. eksperiment			2. eksperiment		
		Ct	Ct-snitt	2 <sup>^</sup> (-ΔΔ Ct)	Ct	Ct-snitt	2 <sup>^</sup> (-ΔΔ Ct)
24	<b>E3</b>	19,02	18,79		<b>20,99</b>	<b>20,92</b>	
24	<b>E3</b>	18,56			<b>20,85</b>		
24	<b>0,68</b>	18,97	19,08	<b>0,89</b>	<b>20,41</b>	<b>20,33</b>	<b>1,61</b>
24	<b>0,68</b>	19,19			<b>20,25</b>		
24	<b>6,80</b>	17,84	17,92	<b>1,02</b>	<b>20,06</b>	<b>20,11</b>	<b>1,63</b>
24	<b>6,80</b>	18,00			<b>20,15</b>		
24	<b>68,00</b>	17,79	17,86	<b>1,20</b>	<b>20,68</b>	<b>20,45</b>	<b>1,38</b>
24	<b>68,00</b>	17,86			<b>20,45</b>		
48	<b>E3</b>	18,28	18,25		<b>19,50</b>	<b>19,62</b>	
48	<b>E3</b>	18,22			<b>19,73</b>		
48	<b>0,68</b>	17,89	18,05	<b>0,60</b>	<b>21,08</b>	<b>21,20</b>	<b>0,52</b>
48	<b>0,68</b>	18,21			<b>21,32</b>		
48	<b>6,80</b>	19,00	18,78	<b>1,01</b>	<b>20,85</b>	<b>20,72</b>	<b>0,75</b>
48	<b>6,80</b>	18,56			<b>20,59</b>		
48	<b>68,00</b>	18,27	18,45	<b>0,40</b>	<b>19,55</b>	<b>19,85</b>	<b>0,91</b>
48	<b>68,00</b>	18,45			<b>20,14</b>		
72	<b>E3</b>	18,36	18,66		<b>20,13</b>	<b>20,06</b>	
72	<b>E3</b>	18,95			<b>19,99</b>		
72	<b>0,68</b>	18,26	17,95	<b>1,01</b>			
72	<b>0,68</b>	17,63					
72	<b>6,80</b>	18,51	18,38	<b>1,52</b>	<b>20,48</b>	<b>20,55</b>	<b>1,33</b>
72	<b>6,80</b>	18,25			<b>20,62</b>		
72	<b>68,00</b>	18,29	18,50	<b>0,74</b>	<b>22,32</b>	<b>22,51</b>	<b>0,24</b>
72	<b>68,00</b>	18,50			<b>22,70</b>		

**Pax2b**

		1. eksperiment			2. eksperiment		
		Ct	Ct-snitt	2 <sup>^</sup> (-ΔΔ Ct)	Ct	Ct-snitt	2 <sup>^</sup> (-ΔΔ Ct)
24	E3	22,80	22,68		23,65	23,28	
24	E3	22,56			22,91		
24	0,68	22,25	22,10	1,63	23,62	23,55	0,89
24	0,68	21,94			23,47		
24	6,80	21,90	21,84	1,00	23,68	23,68	0,71
24	6,80	21,78			23,67		
24	68,00	22,60	22,75	0,60	22,98	23,24	1,03
24	68,00	22,75			23,50		
48	E3	20,69	20,91		21,62	21,72	
48	E3	21,12			21,81		
48	0,68	19,85	20,03	0,96	21,75	21,67	1,61
48	0,68	20,21			21,59		
48	6,80	20,86	20,88	1,49	21,73	21,49	1,89
48	6,80	20,90			21,24		
48	68,00	20,18	19,99	0,87	21,92	21,84	0,98
48	68,00	19,80			21,75		
72	E3	21,61	21,62		22,33	22,36	
72	E3	21,63			22,38		
72	0,68	21,19	21,35	0,75			
72	0,68	21,50					
72	6,80	21,16	21,33	1,54	23,01	23,23	1,02
72	6,80	21,50			23,44		
72	68,00	21,11	21,39	0,78	23,03	22,86	0,93
72	68,00	21,67			22,68		

**Timp2a**

		1. eksperiment			2. eksperiment		
		Ct	Ct-snitt	2 <sup>^</sup> (-ΔΔ Ct)	Ct	Ct-snitt	2 <sup>^</sup> (-ΔΔ Ct)
24	E3	20,41	20,64		22,31	22,26	
24	E3	20,86			22,21		
24	<b>0,68</b>	20,86	20,80	<b>0,97</b>	22,44	22,14	<b>1,17</b>
24	<b>0,68</b>	20,73			21,83		
24	<b>6,80</b>	20,83	20,93	<b>0,46</b>	22,21	22,05	<b>1,07</b>
24	<b>6,80</b>	21,03			21,89		
24	<b>68,00</b>	21,57	21,41	<b>0,37</b>	22,46	22,92	<b>0,63</b>
24	<b>68,00</b>	21,25			23,37		
48	E3	18,88	18,94		20,49	20,59	
48	E3	18,99			20,69		
48	<b>0,68</b>	19,30	19,17	<b>0,44</b>	20,06	20,23	<b>2,01</b>
48	<b>0,68</b>	19,04			20,39		
48	<b>6,80</b>	19,54	19,58	<b>0,94</b>	20,01	20,19	<b>2,12</b>
48	<b>6,80</b>	19,61			20,37		
48	<b>68,00</b>	19,32	19,10	<b>0,41</b>	20,53	20,43	<b>1,19</b>
48	<b>68,00</b>	18,88			20,33		
72	E3	18,32	18,47		18,76	18,70	
72	E3	18,61			18,64		
72	<b>0,68</b>	18,23	18,18	<b>0,75</b>			
72	<b>0,68</b>	18,12					
72	<b>6,80</b>	18,49	18,29	<b>1,43</b>	19,57	19,78	<b>0,89</b>
72	<b>6,80</b>	18,08			19,99		
72	<b>68,00</b>	18,95	18,89	<b>0,50</b>	19,68	19,60	<b>0,70</b>
72	<b>68,00</b>	18,83			19,52		

**Timp3**

		1. eksperiment			2. eksperiment		
		Ct	Ct-snitt	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	Ct	Ct-snitt	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
24	E3	22,80	22,68		24,39	24,33	
24	E3	22,56			24,26		
24	0,68	22,25	22,10	1,63	24,21	24,08	1,27
24	0,68	21,94			23,95		
24	6,80	21,90	21,84	1,00	23,45	23,64	1,49
24	6,80	21,78			23,83		
24	68,00	22,60	22,68	0,63	24,65	24,65	0,80
24	68,00	22,75			No Ct		
48	E3	22,03	21,71		22,25	22,03	
48	E3	21,38			21,80		
48	0,68	20,39	20,31	1,37	22,85	22,95	0,82
48	0,68	20,23			23,05		
48	6,80	22,39	22,01	1,19	23,43	23,57	0,55
48	6,80	21,62			23,70		
48	68,00	19,95	19,91	1,59	20,70	20,78	2,52
48	68,00	19,87			20,86		
72	E3	19,98	19,89		21,25	21,32	
72	E3	19,79			21,38		
72	0,68	19,15	19,23	0,97			
72	0,68	19,30					
72	6,80	19,74	19,70	1,43	21,24	21,22	2,00
72	6,80	19,66			21,20		
72	68,00	19,82	19,65	0,79	20,77	20,79	1,89
72	68,00	19,47			20,81		

MMP2

		1. eksperiment			2. eksperiment		
		Ct	Ct-snitt	2 <sup>^</sup> (-ΔΔ Ct)	Ct	Ct-snitt	2 <sup>^</sup> (-ΔΔ Ct)
24	E3	21,27	21,15		21,61	21,76	
24	E3	21,02			21,90		
24	0,68	20,88	21,11	1,12	21,22	21,41	1,37
24	0,68	21,33			21,59		
24	6,80	20,67	20,68	0,77	21,00	20,98	1,59
24	6,80	20,69			20,95		
24	68,00	19,78	19,77	1,64	21,39	21,39	1,29
24	68,00	19,75			21,98		
48	E3	19,76	19,83		20,32	20,33	
48	E3	19,90			20,34		
48	0,68	19,89	19,64	0,60	19,57	19,81	2,24
48	0,68	19,38			20,04		
48	6,80	20,34	20,42	0,97	20,33	20,44	1,49
48	6,80	20,50			20,55		
48	68,00	19,90	20,07	0,39	20,49	20,69	0,83
48	68,00	20,24			20,89		
72	E3	18,98	19,20		19,19	19,11	
72	E3	19,41			19,02		
72	0,68	18,97	18,70	0,87			
72	0,68	18,43					
72	6,80	18,96	18,83	1,63	19,24	19,40	1,53
72	6,80	18,69			19,55		
72	68,00	18,94	18,93	0,80	19,36	19,48	1,01
72	68,00	18,92			19,60		

**MMP14a**

		1. eksperiment			2. eksperiment		
		Ct	Ct-snitt	2 <sup>^</sup> (-ΔΔ Ct)	Ct	Ct-snitt	2 <sup>^</sup> (-ΔΔ Ct)
24	E3	21,47	21,37		22,05	22,02	
24	E3	21,26			21,98		
24	0,68	21,56	21,52	<b>0,97</b>	21,64	21,60	<b>1,43</b>
24	0,68	21,48			21,56		
24	6,80	19,46	19,77	<b>1,70</b>	20,81	20,99	<b>1,89</b>
24	6,80	20,07			21,17		
24	68,00	19,00	19,59	<b>2,15</b>	21,37	21,52	<b>1,41</b>
24	68,00	20,18			21,66		
48	E3	19,51	19,45		19,89	19,87	
48	E3	19,38			19,84		
48	0,68	18,74	19,05	<b>0,69</b>	20,80	20,93	<b>0,74</b>
48	0,68	19,36			21,06		
48	6,80	19,92	20,03	<b>0,98</b>	21,44	20,93	<b>0,77</b>
48	6,80	20,13			20,42		
48	68,00	19,06	19,40	<b>0,48</b>	20,94	21,04	<b>0,47</b>
48	68,00	19,73			21,14		
72	E3	18,88	18,51		19,75	19,50	
72	E3	18,13			19,24		
72	0,68	17,94	18,30	<b>0,71</b>			
72	0,68	18,66					
72	6,80	18,78	18,74	<b>1,07</b>	20,50	20,56	<b>0,90</b>
72	6,80	18,70			20,62		
72	68,00	18,63	18,72	<b>0,58</b>	19,99	19,75	<b>1,10</b>
72	68,00	18,81			19,50		



**MMP14b**

		1. eksperiment			2. eksperiment		
		Ct	Ct-snitt	2 <sup>^</sup> (-ΔΔ Ct)	Ct	Ct-snitt	2 <sup>^</sup> (-ΔΔ Ct)
24	E3	19,60	19,29		21,04	20,94	
24	E3	18,97			20,84		
24	0,68	19,06	19,11	1,22	20,68	20,57	1,39
24	0,68	19,16			20,46		
24	6,80	18,87	18,85	0,76	20,14	20,92	0,94
24	6,80	18,83			21,70		
24	68,00	18,37	18,52	1,07	20,63	20,79	1,11
24	68,00	18,66			20,95		
48	E3	18,25	18,55		19,61	19,48	
48	E3	18,85			19,34		
48	0,68	17,83	18,12	0,70	20,91	20,88	0,59
48	0,68	18,41			20,85		
48	6,80	18,82	18,96	1,10	20,72	20,93	0,59
48	6,80	19,10			21,13		
48	68,00	18,66	18,61	0,44	19,24	19,39	1,13
48	68,00	18,56			19,54		
72	E3	18,54	18,23		18,94	19,03	
72	E3	17,91			19,12		
72	0,68	18,36	17,90	0,77			
72	0,68	17,44					
72	6,80	17,52	17,60	1,94	19,53	19,55	1,31
72	6,80	17,68			19,57		
72	68,00	18,00	18,20	0,68	20,64	20,83	0,38
72	68,00	18,40			21,01		

**Appendiks 2: Oppsett til transfeksjon med GR (4x mastermix)**

<b>Transfeksjon nr.</b>	<b>Basic</b>	<b>MMP2</b>	<b>pCI-neo</b>	<b>GR</b>	<b>pCH110</b>	<b>Dex</b>
	(µg)	(µg)	(µg)	(µg)	(µg)	X
<b>1</b>	2,0		1,0		0,2	X
<b>2</b>	2,0		2,0		0,2	X
<b>3</b>	2,0		4,0		0,2	X
<b>4</b>	2,0			1,0	0,2	X
<b>5</b>	2,0			2,0	0,2	X
<b>6</b>	2,0			4,0	0,2	X
<b>7</b>		2,0	1,0		0,2	X
<b>8</b>		2,0	2,0		0,2	X
<b>9</b>		2,0	4,0		0,2	X
<b>10</b>		2,0		1,0	0,2	X
<b>11</b>		2,0		2,0	0,2	X
<b>12</b>		2,0		4,0	0,2	X

### Appendiks 3: Oppsett for transfeksjon med Pax6 (4x mastermix)

Transfeksjon nr.	Basic	MMP2	pKW10	pKW-pax6	pCH110	Dex
	(µg)	(µg)	(µg)	(µg)	(µg)	
1	2,0		1,0		0,2	
2	2,0		2,0		0,2	
3	2,0		4,0		0,2	
4	2,0			1,0	0,2	
5	2,0			2,0	0,2	
6	2,0			4,0	0,2	
7		2,0	1,0		0,2	
8		2,0	2,0		0,2	
9		2,0	4,0		0,2	
10		2,0		1,0	0,2	
11		2,0		2,0	0,2	
12		2,0		4,0	0,2	
13	2,00			2,0	0,2	X
14		2,0		2,0	0,2	X

#### Appendiks 4: Oppsett for transfeksjon med GR og Pax6 (4x mastermix)

Transfeksjon nr.	Basic	MMP2	pCI-neo	GR	pKW10	pKW-pax6	pCH110	Dex
	(µg)	(µg)	(µg)	(µg)	(µg)	(µg)	(µg)	X
<b>1 *</b>	2,0		2,0		2,0		0,2	X
<b>2 *</b>	2,0			2,0	2,0		0,2	X
<b>3 *</b>	2,0		2,0			2,0	0,2	X
<b>4 *</b>	2,0			2,0		2,0	0,2	X
<b>5</b>		2,0	2,0		0,5		0,2	X
<b>6</b>		2,0	2,0		1,0		0,2	X
<b>7</b>		2,0	2,0		2,0		0,2	X
<b>8</b>		2,0	2,0			0,5	0,2	X
<b>9</b>		2,0	2,0			1,0	0,2	X
<b>10</b>		2,0	2,0			2,0	0,2	X
<b>11</b>		2,0		2,0	0,5		0,2	X
<b>12</b>		2,0		2,0	1,0		0,2	X
<b>13</b>		2,0		2,0	2,0		0,2	X
<b>14</b>		2,0		2,0		0,5	0,2	X
<b>15</b>		2,0		2,0		1,0	0,2	X
<b>16</b>		2,0		2,0		2,0	0,2	X

\*I eksperiment nr. 3 ble Basic byttet ut med MMP2 i transfeksjon nr. 1-4.

**Appendiks 5: Oppsett for transfeksjon med GR og Pax6 hvor cellene ble stimulert med både deksametason og RU486 (4x mastermix)**

<b>Transfeksjon nr.</b>	<b>MMP2</b>	<b>pCI-neo</b>	<b>GR</b>	<b>pKW10</b>	<b>pKW-pax6</b>	<b>pCH110</b>	<b>Dex</b>	<b>RU486</b>
	( $\mu\text{g}$ )	( $\mu\text{g}$ )	( $\mu\text{g}$ )	( $\mu\text{g}$ )	( $\mu\text{g}$ )	( $\mu\text{g}$ )		
<b>1</b>	2,0	2,0		2,0		0,2		
<b>2</b>	2,0		2,0	2,0		0,2		
<b>3</b>	2,0	2,0			2,0	0,2		
<b>4</b>	2,0		2,0		2,0	0,2		
<b>5</b>	2,0	2,0		2,0		0,2	X	
<b>6</b>	2,0		2,0	2,0		0,2	X	
<b>7</b>	2,0	2,0			2,0	0,2	X	
<b>8</b>	2,0		2,0		2,0	0,2	X	
<b>9</b>	2,0	2,0		2,0		0,2	X	X
<b>10</b>	2,0		2,0	2,0		0,2	X	X
<b>11</b>	2,0	2,0			2,0	0,2	X	X
<b>12</b>	2,0		2,0		2,0	0,2	X	X

## Appendiks 6: Rådata for transfeksjonen med GR og Pax6 sammen. Eksperiment 1-3.

Verdier markert med rødt er ikke tatt med i beregningen av gjennomsnittsverdi, pga. at verdiene skiller seg veldig ut fra de andre to parallellene

1.

Tr.nr	Luc			β-gal			(Luc/β-gal) x 1000			Snitt	Std.a
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.		
1	0,000	0,000	0,000	5,600	5,426	6,156	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,098	0,045	0,000	2,468	3,994	3,814	39,7	11,3	0,0	17,0	20,5
3	0,274	0,330	0,391	2,253	4,027	5,441	121,6	81,9	71,9	91,8	26,3
4	2,980	3,474	2,917	5,731	6,281	5,494	520,0	553,1	530,9	534,7	16,9
5	2,443	1,475	1,920	6,905	6,252	6,371	353,8	235,9	301,4	297,0	59,1
6	0,908	0,927	0,506	2,726	4,271	5,082	333,1	217,0	99,6	216,6	116,8
7	2,078	1,750	1,732	6,625	6,723	6,316	313,7	260,3	274,2	282,7	27,7
8	0,556	0,457	0,773	6,541	6,576	6,782	85,0	69,5	114,0	89,5	22,6
9	2,831	3,670	2,723	5,398	9,453	9,523	524,5	388,2	285,9	399,5	119,7
10	1,731	2,375	1,756	7,477	8,000	8,668	231,5	296,9	202,6	243,7	48,3
11	18,980	21,280	24,600	5,301	5,428	5,167	3580,5	3920,4	4761,0	4087,3	607,7
12	12,470	8,224	9,515	2,563	4,167	4,886	4865,4	1973,6	1947,4	1960,5	18,5
13	105,300	79,360	69,650	5,916	6,095	5,294	17799,2	13020,5	13156,4	14658,7	2720,6
14	39,590	29,300	26,220	6,638	5,978	5,239	5964,1	4901,3	5004,8	5290,1	586,1
15	149,200	154,400	180,800	4,314	6,489	8,372	34585,1	23794,1	21595,8	22695,0	1554,4
16	510,900	605,400	626,100	10,740	12,820	13,200	47569,8	47223,1	47431,8	47408,2	174,6

2.

Tr.nr	Luc			β-gal			(Luc/β-gal ) x 1000			Snitt	Std.a
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.		
1	0,832	0,975	1,111	3,769	4,256	3,948	220,7	229,1	281,4	243,7	32,9
2	0,471	0,422	0,424	5,629	6,658	5,834	83,7	63,4	72,7	73,2	10,2
3	2,794	5,069	3,016	4,817	4,268	4,379	580,0	1187,7	688,7	818,8	324,0
4	17,250	18,700	17,450	5,989	7,500	7,644	2880,3	2493,3	2282,8	2552,2	303,0
5	1,780	2,151	1,437	3,050	3,631	3,162	583,6	592,4	454,5	543,5	77,2
6	2,058	1,696	2,409	3,211	3,005	3,196	640,9	564,4	753,8	653,0	95,3
7	1,920	1,909	2,001	2,987	2,736	2,795	642,8	697,7	715,9	685,5	38,1
8	22,060	18,400	20,620	8,203	5,779	7,374	2689,3	3183,9	2796,3	2889,8	260,3
9	4,234	3,722	3,527	3,520	3,912	3,994	1202,8	951,4	883,1	1012,4	168,4
10	6,981	8,099	7,531	5,072	5,538	5,329	1376,4	1462,4	1413,2	1417,3	43,2
11	30,360	29,560	31,720	2,692	3,295	3,381	11277,9	8971,2	9381,8	9877,0	1230,5
12	53,410	55,590	53,110	3,397	3,465	3,635	15722,7	16043,3	14610,7	15458,9	751,8
13	32,990	32,330	45,520	2,854	3,213	2,946	11559,2	10062,2	15451,5	12357,6	2781,9
14	59,360	53,280	57,320	3,941	4,161	4,097	15062,2	12804,6	13990,7	13952,5	1129,3
15	345,200	359,100	394,100	6,359	6,691	7,495	54285,3	53669,1	52581,7	53512,0	862,6
16	684,000	821,700	634,300	8,545	11,910	9,169	80046,8	68992,4	69178,8	72739,3	6329,1

3.

Tr.nr	Luc			β-gal			(Luc/β-gal ) x 1000			Snitt	Std.a
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.		
1	1,182	1,521	1,211	3,904	3,557	5,016	302,8	427,6	241,4	323,9	94,9
2	1,362	1,570	1,539	5,291	5,789	6,406	257,4	271,2	240,2	256,3	15,5
3	24,160	24,030	29,310	4,114	4,122	4,282	5872,6	5829,7	6844,9	6182,4	574,2
4	20,050	15,330	18,530	4,060	3,928	3,706	4938,4	3902,7	5000,0	4613,7	616,5
5	0,401	0,540	0,382	2,349	3,371	4,054	170,7	160,2	94,2	141,7	41,5
6	0,620	0,548	0,746	3,831	4,124	3,982	161,8	132,9	187,3	160,7	27,2
7	0,807	0,607	0,745	3,645	3,690	3,573	221,4	164,5	208,5	198,1	29,8
8	0,264	0,349	0,284	3,803	3,970	3,952	69,4	87,9	71,9	76,4	10,0
9	0,496	0,720	0,608	3,706	3,440	3,789	133,8	209,3	160,5	167,9	38,3
10	0,410	0,478	0,297	2,774	3,919	4,051	147,8	122,0	73,3	114,4	37,8
11	1,158	1,384	1,926	3,907	3,411	3,191	296,4	405,7	603,6	435,2	155,7
12	8,467	6,482	6,260	2,219	3,248	3,505	3815,7	1995,7	1786,0	1890,9	148,3
13	6,747	6,254	5,546	3,730	3,646	3,710	1808,8	1715,3	1494,9	1673,0	161,2
14	7,709	7,648	6,858	3,944	4,213	4,434	1954,6	1815,3	1546,7	1772,2	207,4
15	4,264	4,070	7,279	4,038	3,991	4,182	1056,0	1019,8	1740,6	1272,1	406,1
16	36,130	44,690	47,730	4,581	4,449	4,059	7886,9	10045,0	11759,1	9897,0	1940,3



**Appendiks 7: Rådata for transfeksjonen med GR og Pax6 sammen, hvor cellene ble stimulert med både deksametason og RU486. Eksperiment 1-3.**

1.

Tr.nr	Luc			β-gal			(Luc/β-gal) x 1000			Snitt	Std.a
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.		
1	0,974	0,983	1,043	0,321	0,363	0,395	3034,3	2708,0	2640,5	2794,3	210,6
2	0,892	1,391	1,048	0,461	0,514	0,190	1934,9	2706,2	5515,8	3385,6	1884,6
3	48,780	44,680	39,960	0,381	0,463	0,401	128031,5	96501,1	99650,9	108061,1	17366,4
4	90,320	104,100	131,900	0,639	0,742	0,948	141345,9	140296,5	139135,0	140259,1	1105,9
5	0,614	0,467	0,423	0,274	0,268	0,295	2240,9	1742,5	1433,9	1805,8	407,2
6	0,660	0,996	0,931	0,326	0,220	0,349	2024,5	4527,3	2667,6	3073,1	1299,7
7	30,950	29,320	41,150	0,360	0,402	0,217	85972,2	72935,3	189631,3	79453,8	9218,5
8	66,410	73,400	60,770	0,307	0,497	0,481	216319,2	147686,1	126341,0	137013,5	15093,3
9	0,474	0,454	0,542	0,259	0,284	0,292	1830,1	1598,6	1856,2	1761,6	141,8
10	0,536	0,710	0,831	0,321	0,344	0,244	1669,8	2064,0	3405,7	2379,8	910,1
11	17,290	17,640	19,740	0,354	0,318	0,370	48841,8	55471,7	53351,4	52555,0	3385,9
12	63,660	69,440	84,860	0,481	0,539	0,614	132349,3	128831,2	138208,5	133129,6	4737,1

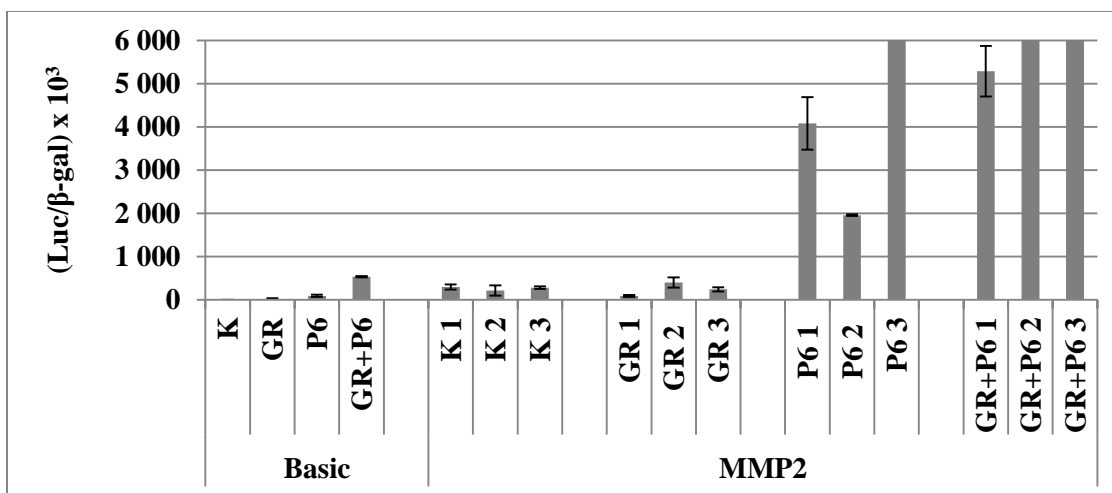
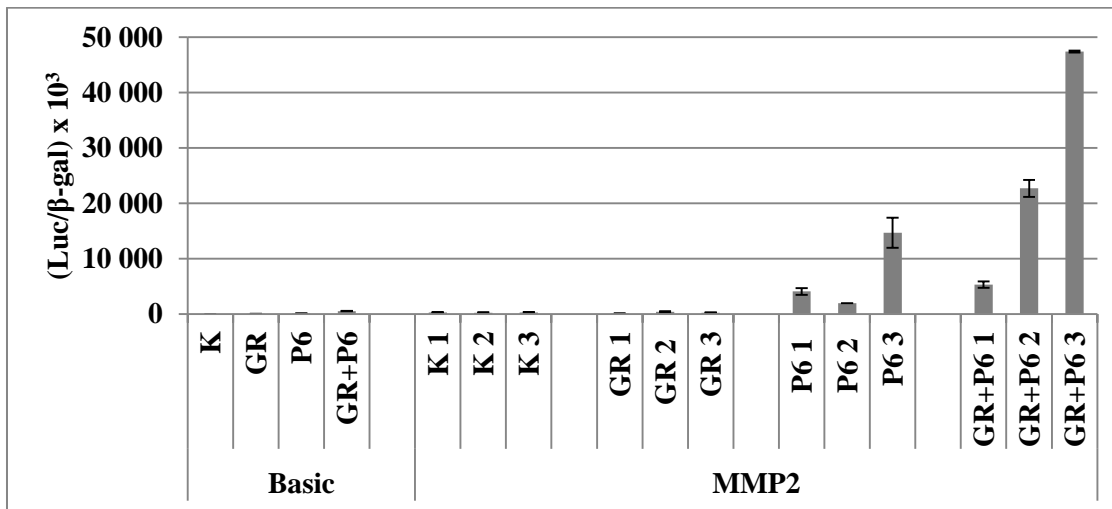
2.

	Luciferase			$\beta$ -gal			(Luc/B-gal) x 1000			Snitt	Std.a
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.		
1	0,117	0,12	0,138	5,189	5,768	5,477	22,5	20,8	25,2	22,8	2,2
2	0,076	0,119	0,076	4,985	5,28	2,645	15,2	22,5	28,7	22,2	6,8
3	3,914	5,993	5,09	4,805	5,263	5,465	814,6	1138,7	931,0	961,4	164,2
4	13,12	15,2	13,42	5,724	6,128	5,524	2292,1	2480,4	2429,4	2400,6	97,4
5	0,15	0,094	0,05	5,742	6,167	6,274	26,1	15,2	8,3	16,6	9,0
6	0,218	0,29	0,128	6,087	3,652	5,834	35,8	79,4	21,9	45,7	30,0
7	3,086	1,804	3,393	5,364	5,715	2,772	575,3	315,7	1224,0	445,5	183,6
8	20,6	18,83	18,81	3,908	5,945	6,025	5271,2	3167,4	3122,0	3144,7	32,1
9	0,056	0,044	0,051	5,666	5,851	5,685	9,9	7,5	9,0	8,8	1,2
10	0,366	0,318	0,388	5,744	5,958	4,368	63,7	53,4	88,8	68,6	18,2
11	3,712	4,031	3,686	4,878	5,271	5,604	761,0	764,8	657,7	727,8	60,7
12	6,205	6,412	7,37	4,694	5,501	4,654	1321,9	1165,6	1583,6	1357,0	211,2

**3.**

	Luciferase			β-gal			(Luc/B-gal ) x 1000			Snitt	Std.a
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.		
1	5,045	4,23	4,89	10,48	10,69	10,53	481,4	395,7	464,4	447,2	45,4
2	4,281	4,808	4,574	13,43	13,72	11,6	318,8	350,4	394,3	354,5	37,9
3	52,7	56,79	61,96	7,971	6,083	7,585	6611,5	9335,9	8168,8	8038,7	1366,8
4	169,2	198	256,3	9,494	11,3	11,6	17821,8	17522,1	22094,8	19146,2	2557,9
5	1,87	1,885	1,662	8,975	9,358	8,723	208,4	201,4	190,5	200,1	9,0
7	10,34	9,911	12,01	17,68	17,34	13,83	584,8	571,6	868,4	674,9	167,7
6	48,92	62,22	53,92	6,432	7,124	7,746	7605,7	8733,9	6961,0	7766,9	897,3
8	244,9	230,8	343,8	9,582	8,746	10,34	25558,3	26389,2	33249,5	28399,0	4221,1
9	1,611	1,035	1,251	9,352	5,8	9,222	172,3	178,4	135,7	162,1	23,1
10	5,974	4,96	5,828	8,485	9,582	10,9	704,1	517,6	534,7	585,5	103,1
11	24,95	20,04	16,12	7,525	7,619	7,815	3315,6	2630,3	2062,7	2669,5	627,4
12	246,7	164	219,8	9,056	7,609	7,851	27241,6	21553,4	27996,4	25597,2	3522,3

**Appendiks 8: Figurer som illustrer resultatet etter transfeksjonen med GR og Pax6 sammen, eksperiment nr. 1. Den nederste figuren er et utsnitt av den øverste.**



**Appendiks 9: Figurer som illustrer resultatet etter transfeksjonen med GR og Pax6 sammen, eksperiment nr. 3. Den nederste figuren er et utsnitt av den øverste.**

