**Materiaal & methode**

Kloneren van humane glucocorticoïdreceptor (hGR) in GFP-expressievector

Allereerst werd het hGR-insert geknipt uit de ouderplasmide pBluescript SK+ met de volgende primers;

5’-AGATCCGCCACAACATCGAG-3’

5’- TGATGGTTCACGTAGTGGGC-3’

Vervolgens werd het uitgeknipte hGR-insert vermenigvuldigd door middel van een Polymerase Chain Reaction (PCR) van 35 cycli en werd het PCR-product opgezuiverd.

Er zijn compatibele ‘sticky ends’ gecreëerd voor zowel het hGR insert als het pEGFP-C1 expressieplasmide door een restrictiedigestie uit te voeren met de restrictie-enzymen BamHI en XhoI. Ter controle werd er op het expressieplasmide twee keer een enkele digestie uitgevoerd met een van de restrictie-enzymen om te kijken of deze beide goed knipten.

De DNA-monsters werden vervolgens met behulp van agarose gelelektroforese op grootte van elkaar gescheiden (45 minuten, 150 V). De fragmenten met een grootte van 4684 basenparen (GFP) en 2342 basenparen (hGR) zijn uit de gel gesneden en opgezuiverd. De concentratie DNA is bepaald door middel van een nano drop, hierbij werd gekeken naar de golflengtes 260 voor de DNA-concentratie en 280 voor de zuiverheid.

Door middel van ligatie is het fusie-gen hGR-GFP gecreëerd. Het insert werd gekloneerd in het opengeknipte pEGFP-C1 espressieplasmide met het enzym T4 DNA ligase. Voor de ligatie was de molaire verhouding van het plasmide en insert 1:2. De ligatie producten werden getransformeerd in E-coli bacteriën door middel van een heatshock (45 seconden, 42 ℃). Hierna werden de cellen in 2 concentraties, 10% en 90%, uitgeplaat op een LB agar plaat met kanamycine. Ter controle werd er gekeken of het plasmide überhaupt wel en niet enkel geknipt was door de restrictie-enzymen.

Ter controle is er op twee gegroeide kolonies een kolonie PCR van 25 cycli met de volgende primers:

5’-AGATCCGCCACAACATCGAG-3’

5’-TGATGGTTCACGTAGTGGGC-3’

Omdat er geen dubbel geknipte kolonies waren gevonden is er verder gewerkt met back-up kolonies. Het plasmide DNA werd vervolgens geïsoleerd uit de bacteriën en gezuiverd door middel van alkaline lysis, ofwel een mini-prep met een QIAprep® Spin Miniprep Kit.

Celkweek en calciumfosfaattransfectie

Ter voorbereiding van de transfectie werden de HEK293 cellen eerst getrypsiniseerd. De cellen zijn eerst twee keer gewassen in 5ml PBS. Vervolgens wordt 1,5ml 1x trypsine en daarna 5ml DMEM met FBS (met antibiotica penicilline/streptamicyne, glutamine en 10% foetaal kalf serum, HEPES buffered Saline) toegevoegd. De HEK293 cellen zijn hierna uitgezet in een 12-wells plaat met 1 mL medium + cellen per well. Het hGR-GFP construct werd door middel van een calciumfosfaat transfectie getransfecteerd in de uitgezette HEK293 cellen. Er werd 100µl transfectiemix (5% 2.5M CaCl2, 0.7% DNA, 44.3% H20, 50% 2X HBS) toegevoegd per well.

Translocatie-assay

De getransfecteerde cellen werden geïncubeerd (60 minuten, 37 ℃) met de antagonist Mifeprestone of 17AAG. Vervolgens werd er cortisol toegevoegd en apart corticosteron. Dit werd weer geïncubeerd (40 minuten, 37 ℃). De condities bestond uit 10µl corticosteron, 10µl 17AAG + 10µl cortisol en 10µl Mifeprestone + 10µl cortisol. De positieve controle bestond uit 10µl cortisol en aan de negatieve controle werd niks toegevoegd.

De cellen werden gefixeerd met Paraformaldehyde (4%, 10 minuten). Vervolgens werden de cellen gewassen met 2X 500µl PBS en ingebed met 15µl VectaSHIELD met DAPI op een voorwerpglas. Met behulp van de fluorescentie microscoop werd er gecontroleerd of het hGR-GFP fusie-eiwit wel tot expressie was gebracht in de HEK293 cellen. Van ieder preparaat zijn drie foto’s gemaakt met een fluorescentiemicroscoop met de twee verschillende filters, DAPI en GFP. Er was geen tot zeer weinig translocatie opgetreden bij de cellen, dus zijn er ook foto’s gemaakt van ‘back-up’ platen.

Statistische analyse

Met het programma ImageJ werden de foto’s met de filters DAPI en GFP van de preparaten samengevoegd. De foto’s van de twee filters pasten net niet goed over elkaar heen. Om deze reden werd er gebruik gemaakt van ‘back up’ foto’s. De cellen werden geteld. Hierbij werd gekeken naar 3 condities; Cellen met volledige translocatie, cellen met partiële translocatie en cellen zonder translocatie. Er werd met R-studio een statistische analyse gedaan. Er werd gekeken of er aan de assumpties werd voldaan met een Shapiro-Wilk en een Levene’s test. De significantie werd getoetst met een Kruskal-Wallis en post-hoc Turkey and Kramer (Nemenyi). De robuustheid van het onderzoek werd berekend via de Z-factor.