**1415 VOORBEELDUITWERKING M&M OV PB – VOOR DOCENTEN**

**Kloneren van humane glucocorticoide receptor in GFP-expressievector**

Het coderende deel van de humane glucocorticoïd receptor (hGR) in de pBluescript SK+ plasmide werd geamplificeerd door middel van een polymerase chain reaction (PCR), waarbij gebruik werd gemaakt van de forward primer (T7 primer) 5’- TAATACGACTCACTATAGGG-3’ en de reverse primer (T3 primer) 5’-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3’. Vervolgens werd het PCR product opgezuiverd en geligeerd in de *Bam*HI en *Xho*I restrictiesites van het expressieplasmide pEGFP-C1 en getransformeerd naar *E. coli*. Met behulp van kolonie PCR (primers hGR-F en hGR-R, type polymerase en programma) werd een kolonie geselecteerd welke een plasmide met insert van juiste grootte bevat. Evt. Met behulp van een mini-prep werd E. Coli met het plasmide vermeerderd. (zie opmerking dd6 van JS.

**Celkweek en calciumfosfaat transfectie**

 HEK293 cellen werden uitgezet in DMEM medium. Voor de transfectie werden 60-70% confluente HEK293 cellen getransfecteerd met hGR-pEGFP-C1 plasmide door middel van de calciumfosfaat/calciumcholoride transfectie methode. Het precipitaat van DNA en CaPO4/CaCl2 werd met de cellen geïncubeerd.

 **Translocatie assay**

Het medium van de HEK293 cellen werd voorafgaand aan de translocatieassay ververst. Voor de translocatie assay werden cortisol (100nM), corticosteron (100nM), mifepristone (1000nM) of 17AAG/geldanamycine (10000 nM) toegevoegd aan de celcultures en … min. (range: 30-60 min. 🡪 studenten vullen zelf in hoe lang) geïncubeerd bij 37°C. In het geval van de antagonisten werd na incubatie van 1 uur bij 37°C cortisol (100 nM) toegevoegd en vervolgens werd … min. geïncubeerd bij 37°C. Vervolgens werden de cellen gewassen met PBS, gefixeerd in 4% PFA, gewassen met PBS en ingebed met Fluorsave en Dapi. De cellen werden tot aan de analyse in het donker bewaard bij 4°C.

*Concentratie van de verschillende agonisten/antagonisten wordt misschien aangepast.*

Analyse resultaten

De resultaten van de translocatie assay werden geanalyseerd door de preparaten onder een fluorescentie microscoop te bekijken en hiervan foto’s te maken. Van elke conditie werden er in totaal zes foto’s gemaakt, drie met een DAPI-filter en drie met een GFP filter. De foto’s zijn geanalyseerd met behulp van het programma ImageJ waarbij de foto’s werden samengevoegd om te bepalen of er translocatie had plaatsgevonden. De cellen met translocatie én zonder translocatie werden geteld waarbij onderscheid werd gemaakt tussen drie typen; volledige translocatie naar de nucleus, partiële translocatie en geen translocatie. Vervolgens zijn in R een ANOVA/Kruskall-Wallis test met post hoc analyse uitgevoerd om te bepalen of er sprake is van significante verschillen tussen de experimentele condities, en de positieve en negatieve condities.

**TOELICHTING VOORBEELDUITWERKING DOCENTEN M&M OV PB**

**Validatie selectie: het is alleen van belang welk expressieplasmide werd gebruikt en in welke restrictiesites het stukje hGR werd gekloneerd. Alle informatie die tot doel had een goede kolonie te selecteren, het DNA eruit te isoleren en op te schalen is niet van belang voor het onderzoek en hoeft dus niet in de M&M komen.**

Voor de studenten kan het helpen om te benadrukken dat alleen die informatie hoeven op te schrijven die belangrijk is dat je de grafiek te kunnen begrijpen.

Dus wat moet je daarvoor weten?

Wat is je construct? = hGR

Wat is je vector? = EGFP

Hoe heb je het uitgelezen? = nucleaire translocatie a.d.h.v. GFP bekijken

Maakt het uit hoe je cellen zijn behandeld? = Ja, dus ook dat noemen.

**Resultaten (op basis van de fictieve dataset 1314)**

Uit de resultaten van de positieve (89,26 ± 6,62) en negatieve translocatie (8,57 ± 6,33) is gebleken dat de Z-factor van de translocatie assay 0,5183 bedraagt.

Verder zijn aan de hand van het GR-GFP fusie-eiwit drie experimenten uitgevoerd om het effect van liganden (corticosteron, mifeprestion en 17-AAG) op de translocatie te bepalen. Uit de ANOVA bleek dat de mate van translocatie significant verschilde tussen de drie condities.

Uit de resultaten (zie figuur 1) is op te maken dat door het toevoegen van corticosteron de translocatie significant lager is (27,9 ± 20,2, p<0,0001) in vergelijking met de positieve cortisol controle.

Verder is op te maken dat door het toevoegen van de antagonist mifepreston een geringe vermindering (70,3 ± 22,4) van de translocatie werd vastgesteld in vergelijking met de positieve controle conditie. Deze afname is echter niet significant (p=0,941).

Ook is op te maken dat het toevoegen van de antagonist 17-AAG een significant verschil (4,7 ± 6,2, p<0,0001) in translocatie wordt vastgesteld in vergelijking met de positieve controle (p=0.000).



n.s.

**Figuur 1. Het gemiddelde effect van de experimentele condities op de translocatie van de GR.** Weergegeven zijn de gemiddelde percentages van de translocatie van de positieve, negatieve en experimentele condities. \*\*\*\*P < 0.0001; n.s., niet significant.