**Screenen van Gr-liganden door middel van translocatie is een robuuste methode**

**­­­­­­­­­­**

**Opdracht:** Onderzoeksverslag inleiding

**Versie:** feedbackversie ~~/ eindversie /herkansing~~

**Opdracht, versie:** onderzoeksverslag methode, [feedbackversie ~~/ eindversie / herkansing].~~

**Inleverdatum:** 13-03-2014 (digitaal 12-03-2014, voor 9.00 uur)

**Screenen van Gr-liganden door middel van translocatie is een robuuste methode

Inleiding**Stress is een veel voorkomende ziektebeeld bij de gemiddelde persoon in onze samenleving. De wetenchappelijke term hiervoor is een ‘stressor’, deze stressor bedreigt onze evenwichtstoestand of homeostase. Als gevolg op deze stressor treedt er een stressreactie op, dit is een reactie dat gedrags- en fysiologische aanpassingen vergt om de homeostase te herstellen in ons lichaam (de Kloet, 2009). Een belangrijk hormoon in de stressreactie is cortisol, deze wordt afgegeven door de bijnier dat onderdeel is van de hypothalamus-hypofyse-bijnieras (HHB-as). Cortisol wordt binnen enkele minuten na een stressreactie afgegeven, tegenover adrenaline dat binnen enkele seconden wordt afgegeven door de bijniermerg bij een stressreactie. Cortisol zorgt er onder andere voor dat de stressreactie niet te ver doorschiet of zelfs schadelijk wordt (de Kloet, 2009). Of een bepaald hormoon als cortisol of adrenaline werkt als antagonist of agonist hangt af van de mate van corepressors en coactivators die binden aan de glucocorticoïdereceptor (GR) en mineralcorticoïdereceptor (MR). Translocatie is een verschijnsel dat hierbij optreedt, dit wordt bekeken aan de hand van screening (Dull *et al.*, 2013).

In eerder onderzoek is aangetoond dat een falende stresshantering de sterkste stressreacties opwekt, deze zijn veelal van psychische aard. Het vermogen om homeostase te herstellen wordt ook wel allostase genoemd. Vatbaarheid voor ziekte wordt vergroot wanneer de allostatische last (hieronder verstaan we een buitensporige stressresponse, te buitensporige of ontoereikende stressresponse) te groot wordt (de Kloet, 2009).

Een belangrijke schakel in deze stressreactie is de GR, onderzoek hiernaar kan belangrijk zijn voor het onderzoeken van methoden om “hormone replacement therapy” (HRT) toe te passen (Dull *et al.*, 2013).

In dit onderzoek is gekeken of het kwantificeren van ligand-geïnduceerde nucleaire translocatie van de GR een robuuste methode is voor het screenen van GR-liganden. En zo ja, wat dan de effecten zijn van verschillende experimentele condities. Aan de hand van het onderzoek van Dull *et al.* (2013) is het waarschijnlijk dat dit een robuuste methode van screening is.

In dit onderzoek wordt gekeken naar de translocatie van het GR-cortisol complex naar de nucleus, dit wordt gedaan aan de hand van 4 verschillende experimenten. Bij de eerste wordt er gekeken of er verschil is translocatie tussen de hormonen cortisol en corticosteron(vergelijkbaar hormoon in ratten). In het tweede experiment wordt gekeken naar de translocatie bij minder cortisol. . In het derde experiment daarentegen wordt gekeken naar de translocatie met meer cortisol. het laatste experiment wordt gekeken naar de translocatie na toevoeging van twee antagonisten. Alle experimenten worden voltrokken in uitgezette HEK239 cellen, samen met de glucocorticoïdereceptor waaraan een expressieplasmide is geligeerd met een green-fluorescent protein (GFP) gen, hiermee kan de translocatie worden gescreend doordat het GFP gen groen oplicht bij translocatie.

 De verwachting is dat deze methode robuust genoeg is om de 4 experimenten uit te voeren. Bij de experimenten verwachten we dat corticosteron een mindere affiniteit heeft met de GR dan cortisol. Minder cortisol tot minder translocatie leidt. Meer cortisol daarentegen tot meer translocatie leidt en dat zonder antagonisten er meer traslocatie op zal treden dan met antagonisten.

**Materiaal en methode**

*PCR glucocorticoide receptor*

 Voor de PCR van het glucocorticoide receptor is er gebruik gemaakt van 48µl PCR cocktail bestaande uit: 10x PCR Dream Taq buffer (eind conc 1x), 2mM dNTP’s (eind conc 0,04mM), 10µM forward primer (eind conc 0,2µM), 10µM reverse primer, H2O, 5U/µl Dream Taq DNA polymerase **tabel 1: PCR programma Glucocorticoide receptor**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| PCR programma |  | Temperatuur | Duur |
| Initiële denaturatie | 95°C | 2’ |
| 35 cycles | denaturatie | 95°C | 30’’ |
|  | Annealing | 52°C | 30’’ |
|  | extentie | 72°C | 3.30’’ |
| Eind extensie | 72°C | 10’ |
| bewaren | 8°C | ∞ |

 (eind conc 0,025U/µl). Dit is gepipetteerd in een epje samen met 2µl DNA oplossing bestaande uit het plasmide EGFP-C1 met een concentratie van 1µg/µl. vervolgens is het epje in een PCR apparaat gestopt dat de PCR cyclus doorliep volgens het schema van tabel 1.

*Opzuiveren PCR product*

Het PCR product van de PCR reactie is opgezuiverd met behulp van een High Pure PCR Product Purification Kit volgens de instructies van de producent; Roche Applied Biosciences.

*Restrictie digestie*

**Tabel 2: samenstelling mastermix restrictie enzym**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Per duo | Per tafel |
| Dubbel digestie | Enkele digestie | ongeknipt |
| hGR insert | pEGFP-C1 | pEGFP-C1 | pEGFP-C1 | hGR insert | pEGFP-C1 |
| 10x Restrictiebuffer G | 6µl | 4 µl | 4 µl | 4 µl | - | - |
| BamHI | 3 µl | 2 µl | 2 µl | - | - | - |
| XhoI | 3 µl | 2 µl | - | 2 µl | - | - |
| Insert hGR | 20 µl | - | - | - | 5 µl | - |
| ExpressieplasmidepEGFP-C1 (1µg/µl) | - | 2 µl | 2 µl | 2 µl | - | 1 µl |
| Water | 28 µl | 30 µl | 32 µl | 36 µl | 5 µl  | 9 µl |
| Totaal volume | 60 µl | 40 µl | 40 µl | 40 µl | 10 µl | 10 µl |

In bovenstaande tabel is te zien wat het pippeteerschema was tijdens dit experiment, per duo worden er 2 restrictie digestie reacties ingezet. Eentje waarbij de insert wordt geknipt aan beide kanten, zogenoemde dubbele digestie, met BamHI en XhoI. De tweede waarbij het expressieplasmide geknipt wordt aan beide kanten met dezelfde 2 enzymen. Verder worden en 4 controles meegenomen, namelijk (van links naar rechts) plasmide alleen geknipt met BamHI, plasmide alleen geknipt met XhoI, ongeknipte insert en de ongeknipte plasmide. De controles zijn uitgevoerd om te controleren of de enzymen op de juiste plek knipten en om te controleren of de plasmides of insert weer aanhechten.

*DNA extractie*

Om de ongewenste zouten en overtollige DNA te verwijderen uit de restrictie digestie producten, wordt gebruik gemaakt van (0,7%) agarose gelelektroforese. De gelelektroforese heeft gedurende 40 min gerund bij een voltage van 150V met. Vervolgens is de agarose gel op een Blue light transluminator gelegd, hiermee zijn de DNA stukjes te zien en kan je bepalen welk bandje eruitgesneden moest worden voor DNA extractie. Bij DNA extractie is gebruik gemaakt van de DNA extraction kit (Roche Applied Biosciences). Het eindproduct van de extractie is daarna gepipeteerd in een ander epje. Na DNA extractie is de concentratie DNA bepaald door gebruik te maken van een nanodrop, dit is in later stadium nog nodig.

*Ligatie*

**Tabel 3: pipeteerschema voor de ligatie van het hGR gen in pEGFP-C1**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1:2 | Controle 1 | Controle 2 | Controle 3 |
| pEGFP-C1 XhoI-BamHI | 1,4 µl | µl | - | - |
| pEGFP-C1 XhoI | - | - | µl | - |
| pEGP-C1 BamHI | - | - | - | 2,9 µl |
| Insert hGR XhoI-BamHI | 3,9 µl | - | - | - |
| 5x rapid ligatie buffer | 4 µl | 4 µl | 10 µl | 10 µl |
| Quick T4 ligase | 1 µl | 1 µl | 1 µl | - µl |
| Water | 9,7 µl | µl | µl | 37,1 µl |
| Totaal volume | 20 µl | 20 µl | 50 µl | 50 µl |

Volgens bovenstaand tabel wordt er gepipetteerd, belangrijk is de volgorde waarin dit wordt gedaan; water eerst, vervolgens, de insert en plasmide, als derde de 5x rapid ligatie buffer en als laatste het quick T4 ligase. Laat het vervolgens 5 minuten op kamertemperatuur incuberen, waarna het ijs gezet moet worden.

*Tranformatie*

Per conditie (experiment zelf en controles) is er gebruik gemaakt van 50 µl ontdooide competente cellen. Tegelijkertijd is LB verwarmd in een waterbad van 37°C. Van ieder van de 4 ligatie reacties is vervolgens 5 µl in een 1.5ml epje gepipetteerd samen met de 50 µl competente cellen waarna het 30 min is geïncubeerd op ijs. Na het incuberen zijn de cellen 90 seconden geheatshocked in een waterbad van 42°C, waarna het direct weer op ijs gezet voor 2minuten. Vervolgens 950 µl LB medium toevoegen aan de celsuspensie waarna het 45 min werd geïncubeerd in een schudstoof. Na deze stap werd 100 µl uitgeplaat op een LB agar plaat met kanamycine, hierna is de celsuspensie 3 min gecentrifugeerd bij 4000rpm. 800 µl van het supernatant is hiervan verwijderd en kort geresuspendeerd, waarna er weer 100 µl is uitgeplaat op een LB agar plaat met kanamycine, beide platen zijn overnacht geïncubeerd bij 37°C met de agarkant naar boven.

*Colony PCR*

Hier is gebruik gemaakt van de agar platen met de kolonies van de vorige stap, hiervan is 1 kolonie gebruikt en in een epje met 20 µl water gestopt, waarna het gemengd is door voorzichtig op en neer te pipetteren. Van suspensie is 2 µl gebruikt voor de PCR reactie samen met 48 µl PCR cocktailmix, dit is dezelfde PCR cocktailmix zoals vermeld staat als bij PCR glucocorticoïde receptor. Vervolgens is er gebruik gemaakt van (0,7%) agarose gelelektroforese die 30 minuten heeft gerund bij 150V. Dit is gedaan om te controleren of de reactie goed verlopen is. Na deze stap zijn de transformanten gebruiksklaar gemaakt voor DNA isolatie door gebruik te maken van de methode aanenten. Dit is gedaan door 4ml LB medium toe te voegen aan de originele 18 µl bacteriesuspensie, hierbij is een negatieve controle en een controle met een lege plasmide meegenomen in de procedure.

*Mini-prep DNA isolatie*

Bij de mini-prep is gebruik gemaakt van de QIAprep Spin Miniprep Kit volgens de instructies van de producent; QIAgen. Hiervoor is 1 kolonie aangestipt en in een epje met water (µl) gestopt.

*Calciumfosfaat transfecties*

**Tabel 4: transfectie schema voor een 12-wells plaat voor 4-duo’s**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  | 1 well (µl) | 4-welletjes (µl) |
| Deel 1 | Water | 11.25 | 45 |
|  | 0,1x TE | 17,3 | 69,2 |
|  | DNA 1µg/µl | 2,55 | 10,2 |
|  | 2,5M CaCl2 | 3,5 | 14 |
| Deel 2 | 2x HBS pH 7,05 | 34,6 | 138,4 |
|  | totaal | 69,2 | 276,8 |

Na het uitzetten van de cellen en het verversen van het medium

Is er een transfectie mix gemaakt volgens tabel 4. Deel 1 is eerst in een epje gepipetteerd, waarna de 2x HBS met een pH van 7,05 toegevoegd is terwijl het epje gevortexed werd. Na deze stap is de totale mix in de 3 welletjes verdeeld (er is gemaakt voor 4 welletjes indien er een fout werd gemaakt).

*Translocatie assay*

In deze stap zijn de 4 condities gepipetteerd in de welletjes. Bij de antagonisten is het van belang dit toe te voegen een uur voordat de cortisol wordt toegevoegd en na het toevoegen te incuberen voor een uur. Er is gebruik gemaakt van 104 en 103 stock voor cortisol en corticosteron voor de antagonisten (Mifepreston en Geldanamycine; 17-AAG) is gebruik gemaakt van 106 en 105 stock. Na 30 minuten van incuberen bij 37 °C zijn de cellen gewassen met 1000 µl PBS, waarna de cellen 15min zijn gefixeerd met behulp van 300 µl 4% PFA, bij het fixeren moeten de cellen beschermd zijn tegen het licht. Vervolgens zijn de cellen weer twee keer gewassen iedere keer met 500 µl PBS. Na deze stap zijn de cellen op de dekglaasjes omgekeerd op een voorwerpglas gelegd met 20 µl vectaSHIELD.

*Analyse resultaten*

In deze stap zijn alle resultaten geanalyseerd, dit is gebeurd op verschillende manieren. Ten eerste zijn van de gefixeerde cellen foto’s gemaakt met behulp van een fluorescentiemiscroscoop, deze zijn met behulp van het programma ImageJ geanalyseerd door middel van het tellen van de cellen die getransloceerd zijn, partieel getrasnloceerd zijn en geheel niet getransloceerd zijn. Ten tweede zijn deze resultaten in een excel sheet ingevoerd om vervolgens de Z-waarde te berekenen

(1 – (3 x $\frac{SDpos+SDneg}{abs(GEMpos-GEMneg)} $)). Verder is er een MANOVA uitgevoerd tussen de verschillende condities.

**Resultaten**

**Figuur 5. Gemiddelde percentage translocaties per conditie**

Weergegeven is het gemiddelde percentage translocaties per onderzochte conditie ± SD.

\*, p<0.05, \*\*, p>0.05.

In bovenstaande grafiek is te zien wat de gemiddelde translocatie is per conditie, hierin zien we dat de positieve controle de meeste translocatie heeft en de negatieve controle het minste. Verder komen de condities van corticosterone erg veek overeen. De antagonist 17-AAG toont ook weinig verschil in translocatie vergeleken met de negatieve controle. **Tabel 6. Gemiddelde, standaard deviatie en Z-waarde.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | gemiddelde | Standaard deviatie |
| Positief | 0.892617 | 0.066216 |
| Negatief | 0.085733 | 0.06332 |
| Z-waarde | 0.518387 |  |

In tabel 6 hiernaast weergegeven is

te zien met welke gegeven s de Z-waarde is uitgerekend.

**Tabel 7. Uitslag MANOVA voor onderzochte condities**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Conditie | Diff | Lwr | Upr | P adjust |
| Positief/17-AAG | 69.01848329 | 57.955767 | 80.081199 | 0.0000000 |
| Positief/cortocosterone | 45.85290942 | 35.578432 | 56.127386 | 0.0000000 |
| Positief/dosis | 45.88489958 | 35.610423 | 56.159377 | 0.0000000 |
| Positief/mifepreston | 3.38090514 | -7.259104 | 14.020914 | 0.9410997 |

In bovenstaand tabel 7 is te zien wat de p-waarde is per conditie vergelijking, hierin is te zien dat positief tegenover mifepreston niet significant verschilt.

**Discussie**

In dit onderzoek werd gekeken of het kwantificeren van ligand-geïnduceerde nucleaire translocatie van de GR een robuuste methode is voor het screenen van GR-liganden en zo ja, of er een verschil is in translocatie tussen cortisol, een vergelijkbaar hormoon in ratten (corticosterone), een kleine of grote dosis cortisol en bij toevoeging van 2 verschillende antagonisten. Uit het onderzoek is gebleken dat de methode robuust is voor het screenen van GR-liganden, dit kunnen we afleiden uit de

Z-waarde deze heeft een waarde van afgerond 0.51 bij een significantie van 0.5. Daarbij is gebleken dat corticosterone een lagere affiniteit met de GR heeft dan cortisol, dat er bij een lagere concentratie cortisol minder translocatie plaatsvindt en dat bij toevoeging van 17-AAG geen translocatie optreedt. Deze resultaten bevestigen de hypotheses dat corticosterone een lagere affiniteit heeft met het GR dan cortisol, dat een lagere concentratie cortisol leidt tot minder translocatie en dat bij toevoeging van 17-AAG er geen translocatie op zal treden. Toevoeging van de antagonist mifepreston heeft echter wel geleid tot translocatie, dit in tegenstelling tot de hypothese dat er geen translocatie zou optreden.

Uit dit onderzoek is te concluderen dat de gebruikte methode weldegelijk robuust is voor het screenen van GR-liganden. Bovendien zijn er inderdaad verschillende effecten op de translocatie gezien bij de 4 condities. Dat er wel translocatie plaatsvindt met corticosterone ondanks de lagere affiniteit impliceert dat de GR van de rat en van de mens overeenkomen. Dit valt te verklaren door de evolutionaire overeenkomsten in DNA en dus ook in de eiwitten en receptoren. Het feit dat er minder translocatie plaatsvindt bij een lagere concentratie valt te verklaren door dat er bij een lagere concentatie er minder deeltjes van cortisol zijn die een interactie zouden kunnen aangaan met de receptor. Bij toevoeging van de antagonist 17-AAG vindt er geen translocatie plaats dit is te verklaren door het feit dat bij translocatie er ATP wordt gehydrolyseerd om energie vrij te maken die nodig is om de kern in te transloceren, de binding van 17-AAG aan de GR verhindert deze hydrolyse waardoor er geen translocatie mogelijk is door gebrek aan energie. In tegenstelling tot de hypothese en de verwachting heeft er bij toevoeging van de antagonist mifepreston wel translocatie plaatsgevonden. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de translocatie niet wordt beïnvloed maar dat de translatie wel beïnvloed wordt. Ofwel het GR kan na binding van mifepreston niet binden aan het DNA om de translatie te initiëren.

 Na analyse van de resultaten die dit onderzoek hebben opgeleverd is er geconcludeerd dat de resultaten van dusdanige kwaliteit waren dat er uiteindelijk gebruik gemaakt is van een fictieve dataset. De resultaten kunnen zijn beïnvloed door een aantal factoren. Ten eerste kunnen is het tellen verdeeld onder ±80 studenten, dit zou ervoor hebben kunnen zorgen dat de telling van de foto’s met de fluorescentiemicroscoop zodanig mis gegaan is door andere telling per student dat het de resultaten negatief beïnvloed heeft. Ten tweede is het maken van de foto’s ook snel en waarschijnlijk onnauwkeurig gebeurt, dit bemoeilijkte het tellen ook.

 Uit eerder onderzoek is al gebleken dat het screenen van ER-liganden door middel van ligand-geinduceerde nucleaire translocatie een robuuste methode is, in dit onderzoek is echter niet onderzocht of hetzelfde geldt voor de GR (Dull *et al*., 2013). Dit onderzoek sluit daar bij aan.

Het is bekend dat cortisol binnen enkele minuten wordt afgegeven na een stressreactie, dit onderzoek heeft onderzoek gedaan naar de translocatie van verschillende concentraties cortisol, de translocatie na toevoeging van antagonisten en bovendien of dit een robuuste methode is van screenen. Het is van groot belang dit te onderzoeken, hiermee is het namelijk mogelijk om met de gebruikte methode mogelijke medicijnen te ontwikkelen die de stressreactie (translocatie en translatie van GR-cortisol-complex) kunnen verminderen. Dit kan van grote invloed zijn op de gezondheid van een groot deel van de maatschappij.

In het huidig onderzoek is gebleken dat na toevoeging van de antagonist mifepreston er wel translocatie heeft plaatsgevonden, dit in tegenstelling tot de verwachting. In een vervolgonderzoek zou gekeken kunnen worden wat de werking is van mifepreston. Verder zou er dan meer uitleg nodig zijn, dit omdat de resultaten die zijn verkregen uit de originele dataset van dusdanige kwaliteit waren dat er gebruikt moest worden gemaakt van een fictieve dataset.

Wat uit dit onderzoek geconcludeerd kan worden is dat er een robuuste methode is voor het screenen van GR-liganden, hiermee is het mogelijk een medicijn te kunnen vinden tegen overmatige stress, waar veel mensen in de huidige maatschappij gebaat bij zouden zijn.

*Literatuurlijst*

* de Kloet, E.R. (2009). Stress: neurobiologisch perspectief. *Tijdschrift voor psychiatrie,* 8, 541-550.
* Dull, A.B., George, A.A., Goncharova, E.I., Evans, J.R., Wamiru, A., Cartner, L.K., *et al.* (2013). Identification of Compounds by High-Content Screening That Induce Cytoplasmic to Nuclear Localization of a Fluorescent Estrogen Receptor …. Chimera and Exhibit Agonist or Antagonist Activity in Vitro.  *Journal of Biomolecular Screening,* DOI: 10.1177/1087057113504136.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Vaardigheden (de vaardigheden in een grijs vak zijn eerder behandeld)** | **Gewicht** | **Score** |
| **Inhoud** | **Inhoudelijke samenhang** | Alle onderdelen van de empirische cyclus sluiten inhoudelijk logisch op elkaar aan. | **2** | **6** |
| **Inleiding** | Alle onderdelen van de inleiding worden inhoudelijk correct en met voldoende diepgang weergegeven en waar nodig onderbouwd door middel van literatuur. | **3** | **8** |
| **Materiaal en Methode** | De materiaal en methode is correct en repliceerbaar geschreven. | **3** | **6.5** |
| **Resultaten** | De resultaten worden op correcte wijze weergegeven.  | **3** | **5** |
| **Discussie** | Alle onderdelen van de discussie worden inhoudelijk correct en met voldoende diepgang weergegeven en waar nodig onderbouwd door middel van literatuur. | **3** | **6** |
| **Structuur****Struct****Strcut** | **Inleiding** | Alle onderdelen van de inleiding zijn aanwezig en zijn in de juiste volgorde en in trechtervorm verwerkt.  | **3** | **8** |
| **Materiaal en Methode** | Alle relevante onderdelen van de materiaal en methode zijn aanwezig en zijn in de juiste volgorde beschreven.  | **2** | **8** |
| **Resultaten** | Alle onderdelen van de resultaten zijn aanwezig en in de juiste volgorde beschreven. | **2** | **7** |
| **Discussie** | Alle onderdelen van de discussie zijn aanwezig en zijn in de juiste volgorde en in omgekeerde trechtervorm verwerkt. | **3** | **7** |
| **Vorm** | **Wetenschappelijk taalgebruik** | Het onderzoeksverslag is in correct Nederlands geschreven en er is wetenschappelijk taalgebruik gehanteerd. | **3** | **4** |
| **Tekstuele samenhang** | Het onderzoeksverslag is tekstueel samenhangend. | **1** | **5** |
| **Formeel** | **Refereren** | Er wordt op de juiste plaats in de tekst naar de literatuur gerefereerd.De referenties in de tekst en de literatuurlijst zijn volgens de handleiding opgemaakt. | **1****1** | **8****9** |
| **Figuren/tabellen** | De figuren en tabellen, inclusief onder- of bovenschrift en statistische significantie, zijn volgens de handleiding opgemaakt en er wordt in de tekst naar figuren/tabellen verwezen. | **2** | **8** |

 **Zelfbeoordelingsformulier onderzoeksverslag**