

**Kjernereseptorar og endokrinforstyrrende stoff:
Ligandaktiveringsstudiar av human Pregnan X Reseptor
(hPXR) og human Østrogen Reseptor alfa (hER α) med
luciferase transfeksjonsassay**

Gunn-Therese Lund Sørland

Oppgåve i molekylærbiologi til Mastergrad i farmasi



Molekylærbiologisk institutt

Senter for farmasi

Universitetet i Bergen

27.mai 2008

Føreord

Oppgåva inngår i prosjektet "Nuclear receptor targets for endocrine disrupting effects – mechanisms of action for emerging pollutants?" og er støtta av Noregs forskingsråd. Den har vorte gjennomført ved Molekylærbiologisk institutt med professor Anders Goksøyr som hovedrettleiar og professor Rune Male, Marte Rusten og professor Gunnar Mellgren som medrettleiarar. Desse vil eg takke for svært god rettleiing og oppmuntring gjennom prosessen. Oppgåva vart hovudsakleg gjennomført ved lab 2 og 3. Eg vil derfor takke alle studentar og tilsette ved lab 2 og 3 for eit godt arbeidsmiljø og god rettleiing i prosessen med gjennomføringa av oppgåva. Ein takk også til alle studentane på lesesalen som skapar eit hyggjeleg og godt miljø, og spesielt Marianne Brattås som har svart på mine spørsmål i tide og utide.

Eg vil også få takke for at eg fekk reise på vintermøtet til Norsk Selskap for Farmakologi og Toksikologi i januar 2008 og at eg der fekk presentere poster om prosjektet mitt.

Eg vil også nemne dei tilsette ved Senter for farmasi som har gjeve god oppfølging gjennom farmasistudiet. Som første kull på farmasistudiet i Bergen har det vore mange spennande utfordringar for både oss studentar og tilsette. Ein spesiell takk til alle farmasistudentane på kull 2003 som har medverka svært mykje til den fine tida som student ved Universitetet i Bergen.

Tilslutt vil eg takke familie og vener. Spesiell takk til mamma, pappa, Silje, Merete og Micah som alltid har gjeve meg oppmuntring og støtte. Alle mine gode vener som betyr enormt mykje for meg, Ann-Iren for at du dagleg gjev meg oppmuntring og sambuaren min Ørjan for støtte, tolmod, oppmuntring og godt samvær som du gjev meg kvar einaste dag. Utan den støtta frå dykk ville eg ikkje ha nådd denne milepælen i livet.

Bergen, mai 2008

Gunn-Therese Lund Sørland

Innhold

FØREORD	3
INNHALD	5
SAMANDRAG	7
FORKORTINGAR	9
1. INNLEIING	11
1.1 BAKGRUNN	11
1.2 ENDOKRINFORSTYRRANDE SAMBINDINGAR	12
1.3 FARMAKOKINETIKK OG FARMAKODYNAMIKK.....	13
1.3.1 <i>Metabolisme</i>	14
1.4 INTERAKSJONAR.....	16
1.5 CYTOKROM P450 SYSTEMET	17
1.5.1 <i>CYP enzymstruktur og substratspesifisitet</i>	18
1.5.2 <i>Katalytisk syklus for cytokrom P450</i>	19
1.6 KJERNERESEPTORAR	20
1.6.1 <i>Human pregnan X reseptor, hPXR</i>	22
1.6.2 <i>Human østrogenreseptor α, hERα</i>	22
1.6.3 <i>Kjernereseptorstruktur og aktivering av kjernereseptorar</i>	23
1.6.4 <i>Ligandbinding og ligandbingslomme</i>	25
1.6.5 <i>Hormon responselement, HRE, og kjernereseptorar</i>	26
1.6.6 <i>Artsforskjellar i kjernereseptoraktivering</i>	27
1.7 LUCIFERASE REPORTER ASSAYSYSTEM.	28
1.8 MÅLET MED STUDIEN	29
2. MATERIALE	31
2.1 LISTE OVER GENERELLE KJEMIKALIAR	31
2.2 MATERIALE TIL CELLEDYR KING	32
2.3 ENZYM	32
2.4 MOLEKYLVEKT STANDARD	33
2.5 OLIGONUKLEOTIDER OG PRIMERE	33
2.6 PLASMID BRUKT FOR DANNING AV REPORTERKONSTRUKT	33
2.7 EKSPRESJONSPLASMID	34
2.8 REPORTERPLASMID	34
2.9 LIGANDAR.....	34
2.10 BUFRAR OG LØYSINGAR BRUKT I AGAROSE GEL ELEKTROPHORESE.....	35
2.11 ULIKE BUFFERAR.....	35
2.12 BUFRAR OG LØYSINGAR TIL SDS-PAGE	36
2.13 BUFRAR OG LØYSINGAR TIL WESTERN BLOT.....	37
2.14 ANTISTOFF	37
2.15 ESCHERICHIA COLI STAMME.....	38
2.16 VEKST MEDIUM FOR BAKTERIAR	38
2.17 CELLELINJER	38
2.18 CELLE MEDIUM	39
2.19 BASELØYSING OG STOPPLØYSING TIL MÅLING AV β -GALAKTOSIDASEAKTIVITET.....	39
2.20 ULIKE KIT.....	39
2.21 INSTRUMENT	40
3. METODAR	41
3.1 EKSPERIMENTELL STRATEGI FOR OPPGÅVA	41
3.2 SUBKLONING AV REPORTERKONSTRUKT	41
3.2.1 <i>Danning av responselement CYP3A1, CYP3A3, DR1, DR3 og ERE</i>	42
3.2.2 <i>Ekstrahering av fragment frå agarosegel og reinsing av DNA</i>	43
3.2.3 <i>Bestemming av DNA konsentrasjon</i>	43
3.2.4 <i>Kutting av pG5Luc vektor med restriksjonsenzym</i>	44
3.2.5 <i>Kutting av pGL4.74 med restriksjonsenzym</i>	45

3.2.6 Defosforylering av vektor	46
3.2.8 Ligering av vektor og fragment	46
3.2.9 Transformering av DNA ved elektroporering.....	47
3.2.10 Kolonisjekk ved PCR og småskalareinsing (miniprepping) av DNA.....	47
3.2.11 Sekvensering av antatt korrekte klonar	48
3.2.12 Storskala reinsing av plasmid DNA, Maksiprep.....	48
3.3 LUCIFERASE REPORTER ASSAY	48
3.3.1 Utsåing av celler i 96-brønnsbrett.....	51
3.3.2 Transfeksjon av reporterplasmid og ekspresjonsplasmid.....	51
3.3.3 Eksponering av ligand.....	52
3.3.4 Lysering av cellene.....	52
3.3.5 Måling av eldfloge- og renilla-luciferase aktivitet	52
3.3.6 Måling av β -galaktosidase aktivitet.....	53
3.4 SDS POLYAKRYLAMID GELELEKTROFORESE (SDS-PAGE) OG WESTERN BLOT ANALYSE.....	53
3.5 STATISTISK ANALYSE	55
4. RESULTAT	57
4.1 SUBKLONING AV REPORTERKONSTRUKT	57
4.2 ETABLERING AV TRANSFEKSJONSASSAYET	58
4.2.1 Transfeksjon av hPXR* og hRXR med DR3-E-luc reporter.....	58
4.2.2 Transfeksjon av hPXR og hRXR med XREM-luc reporter.....	61
4.2.3 Transfeksjon av hER α og ERE-renilla-luciferase reporter	63
4.2.4 hER α aktivering med rifampicin og hPXR aktivering med etynylestradiol, EE ₂	65
4.2.5 hER α og hPXR aktivering med 4-nonylfenol.....	67
4.2.6 Kotransfeksjon av hER α og hPXR.....	69
4.3 WESTERNBLOTTANALYSE	73
5. DISKUSJON.....	75
5.1 EKSPERIMENTELL STRATEGI.....	75
5.2 SUBKLONING AV REPORTERKONSTRUKT	77
5.2.1 Sekvensanalyse og transfeksjon med DR3 reporter.....	78
5.2.2 Sekvensanalyse og transfeksjon med ERE-renilla-luciferase reporter	79
5.3 LIGANDAKTIVERING AV hPXR og hER α	79
5.4 LIGANDAKTIVERING AV KOTRANSFEKTERT hPXR og hER α	80
5.5 KRYSSKOMMUNIKASJON MELLOM hER α og hPXR.....	83
5.6 KONKLUSJON	85
5.7 FRAMTIDIGE PERSPEKTIV	86
6. REFERANSAR	87
APPENDIKS	94
1. SEKVENSANALYSE	95
1.1 Sekvensanalyse av subklona plasmid som ikke hadde korrekt innsatt fragment.....	95
1.2 Sekvensanalyse av subklona plasmid som hadde korrekt innsatt fragment.....	96

Samandrag

Pregnan X Reseptor (PXR) er ein kjernereseptor som ved aktivering kan indusere transkripsjon av CYP3A4 enzym. Desse enzyma er involvert i metabolisme av mange sambindingar som til dømes legemiddel. PXR vert aktivert ved å binde ligand. Det er identifisert svært mange ligandar for PXR. Aktivering av PXR kan altså seiast å vere ein sentral prosess i metabolisme utført av CYP3A4 enzymet. Det er derfor viktig med auka kunnskap om kva ligandar og ligandkonsentrasjonar som kan aktivere PXR. Også human østrogenreseptor α (hER α) er ein kjernereseptor som er involvert i mange fysiologiske prosessar i ein organisme. Det er vist at mange ligandar kan binde dei menneskeleg reseptorane hER α og hPXR. Målet med denne studien var dermed å undersøkje kva effektar ulike ligandar har på hPXR og hER α og om det eksisterar ein krysskommunikasjon mellom hER α og hPXR.

Etablering av luciferase assaysystemet var nødvendig for å studere hER α og hPXR. Reporterkonstrukt vart danna ved å subklone responselement for hPXR og hER α inn i høvesvis eldfloge-luciferase vektor og renilla-luciferase vektor. Ekspresjonsplasmid og reporterplasmid vart transfektert inn i COS-1 celler og luciferase aktivitet vart målt på eit luminometer. Resultat viste at ved separat transfeksjon av hPXR og hER α vert hPXR aktivert av rifampicin, etynylestradiol og 4-nonylfenol og at hER α kan aktiverast av etynylestradiol. Resultat frå kotransfeksjonsforsøk av hPXR og hER α viste at hER α aktivitet vart påverka av hPXR ved eksponering for etynylestradiol og 4-nonylfenol. Desse preliminare resultatata kan dermed tyde på at det eksisterar ein krysskommunikasjon mellom hPXR og hER α . Årsaka til denne effekten er usikker, men teoriar om at det eksisterar ein konkurranse om kofaktorar eller andre interaksjonar mellom hPXR og hER α dannar grunnlag for vidare studiar av hPXR og hER α i eit kotransfekttert system.

Forkortingar

Forkorting	Forklaring
AF-1	Transaktiveringsfunksjon 1
AF-2	Transaktiveringsfunksjon 2
AhR	Arylhydrokarbon reseptor
APS	Ammonium Persulfat
Bp	Basepar
BSA	Bovint serum albumin
CAR	Constitutive androstane reseptor (Constitutively active receptor)
CIAP	Calf intestine alkaline phosphatase
CYP2B	Cytochrom P4502B
CYP2E1	Cytochrom P4502E1
CYP3A1	Cytochrom P4503A1
CYP3A3	Cytochrome P4503A3
CYP3A4	Cytochrom P4503A4
DBD	DNA bindingsdomenet
DDD	Daglege døgndoser
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetyl sulfoksid
dNTP	Deoxyribonukleotid trifosfat
DR1	Direct repeat 1
DR3	Direct repeat 3
ECL	Enhanced chemiluminescent
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EE ₂	17- α -etynyl estradiol
ERE	Østrogen Responselement
ER-6	Everted repeat-6
FBS	Føtalt bovint serum
GST	Glutathione S-transferase
hER α	human Østrogenreseptor α
HRE	Hormon Responselement
hPXR	human Pregnane X reseptor
kDa	KiloDalton
keV	Kiloelectronvolt
KLS (NLS)	Kjernelokaliseringssignal (Nuclear localisation signal)
LB-medium	Luria-Bertani medium
LBD	Ligandbindingsdomenet
LBP	Ligand binding pocket (ligandbindingslomme)
MDR	multidrug resistance
NAPQI	N-acetyl-p-benzoquinone imine
NR	Nuclear Receptor (kjernereseptor)
PBDE	Polybromertdietyleter
PCN	Pregenolone 16 α carbonitrile
Rif	Rifampicin
RPM	Rotasjonar pr minutt
RXR	Retinoid X reseptor
SAP	Shrimp alkaline phosphatase
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electroforese
SXR	Steroid X reseptor
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksin
W/V	Vekt/volum
XREM	Xenobiotic-Responsive Enhancer Module
4-NP	4-nonylfenol

1. Innleiing

1.1 Bakgrunn

Det er kjent frå *in vitro* studiar at meir enn 40 - 50 % av marknadsførte legemiddel vert metabolisert via cytokrom P450 (CYP) 3A4 enzymesystemet (Li *et al.* 1995). Mekanismen for regulering av CYP3A4 var lenge ukjent, men i 1998 vart kjernereseptoren pregnane X reseptor, PXR (også kalla steroid og xenobiotisk reseptor, SXR) identifisert som ein sentral faktor i ulike signalvegar der steroidhormon er involvert (Bertilsson *et al.* 1998; Kliewer *et al.* 1998; Blumberg *et al.* 1998b). Seinare har fleire studiar vist at ulike ligandar, både legemiddel og miljøgifter, kan binde kjernereseptoren PXR. Til dømes er det vist at virkestoffet i Johannesurt, hyperforin, og antibiotikumet rifampicin induserar transkripsjon av CYP3A4 via den humane PXR (Lehmann *et al.* 1998; Moore *et al.* 2000). Johannesurt er eit naturlegemiddel som gjev antidepressiv effekt (Zhou *et al.* 2004) og kan kjøpast reseptfritt i Noreg.

Også østrogenreseptor alfa, ER α , er klassifisert som ein kjernereseptor som vert aktivert ved ligandbinding. Den er involvert i svært mange ulike fysiologiske prosessar i ein organisme og ved regulering, modifisering og degradering av reseptoren kan desse prosessane verte påverka (Reid *et al.* 2002). Mange ligandar kan binde hER α og det er nyleg vist at nokon ligandar for hER α også kan aktivere human PXR (Mnif *et al.* 2007).

Desse funna reiser spørsmål om ligandbinding til PXR og/eller til ER kan føre til ulike kryseffektar, og om desse kryseffektane kan vere av slik karakter at det påverkar fysiologiske funksjonar i ein organisme. Det er av den grunn viktig med auka kunnskap om korleis human pregnan X reseptor (hPXR) og human østrogenreseptor α (hER α) blir aktivert og påverkar kvarandre og andre kjernereseptorar. I denne masteroppgåva i farmasi ønskjer eg difor å undersøke korleis ulike ligandar og ligandkonsentrasjonar påverkar hPXR-avhengig transkripsjon og korleis hPXR påverkar hER α i eit slikt system.

Masteroppgåva inngår i prosjektet "Nuclear receptor targets for endocrine disrupting effects – mechanisms of action for emerging pollutants?" og her vil resultatane frå human PXR verte samanlikna med evna desse stoffa har til å aktivere PXR hjå andre artar, mellom anna fisk,

amfibia og sjøpattedyr. Prosjektet er støtta av Noregs forskingsråd (NFR) sitt program Miljøforskning mot 2015.

I innleiinga vert det fokusert på kva ein endokrin forstyrrande sambinding er og kva som skjer med slike sambindingar i ein organisme. Vidare vil eg gjere greie for kva kjernereseptorar og cytokrom P450 systemet er og tilslutt luciferase assaysystemet og målet med studien.

1.2 Endokrinforstyrrande sambindingar

Endokrinforstyrrande sambindingar er framande substansar som ein organisme vert eksponert for og som forstyrrar det endokrine systemet til organismen. WHO definerer endokrinforstyrrande sambindingar slik; ”Ein endokrinforstyrrande sambinding er ein substans eller blanding av substansar som endrar funksjonen av det endokrine systemet og som ein konsekvens av det fører til alvorlige helseeffektar hos ein organisme, avkommet eller populasjonar” (WHO 2002). Både naturlege og menneskeskapte sambindingar kan vere endokrinforstyrrande sambindingar. Syntetiske sambindingar kan vere til dømes plast, detergentar, bromerte flammehemmarar, legemiddel og kosmetikk. Desse sambindingane kjem ut i vårt miljø via industri og kloakktømming, vann og avløp samt ved aktiv bruk av desse produkta. Naturlege sambindingar kan til dømes vere hormon frå menneske og dyr som kjem ut i miljøet via avrenning frå kloakksystem.

Endokrinforstyrrande sambindingar kan virke via tre mekanismar (Rotchell *et al.* 2003; Goksøyr *et al.* 2007):

- (i) Agonistisk/antagonistisk effekt ved binding til hormonreseptorar eller påverke cellesignalisering. Hormonhermande effekt.
- (ii) Forstyrringar i produksjon, transport, metabolisme eller utskilling av naturlige hormon.
- (iii) Forstyrringar av produksjon og/eller funksjon av hormon reseptorar.

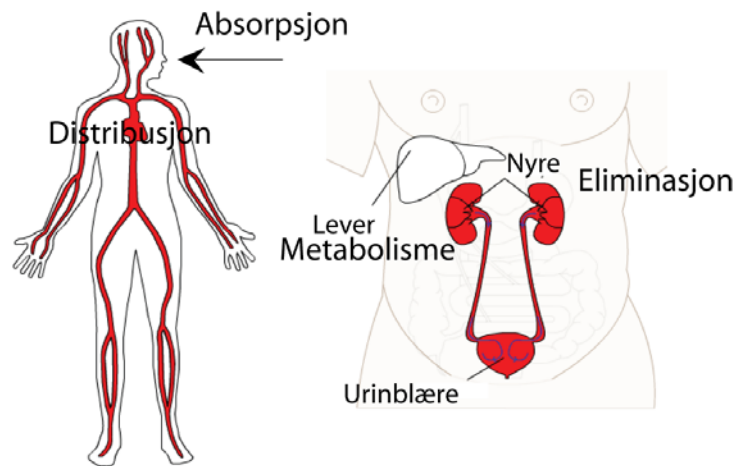
Studiar på atlantisk laks (*Salmo salar*) har vist at ulike konsentrasjonar av 4-nonylfenol kan virke som endokrinforstyrrande sambinding via alle desse tre mekanismane. Ved høge konsentrasjonar av 4-nonylfenol (10 mg/kg kroppsvekt) virka 4-nonylfenol som hormonhermar (i) ved å indusere transkripsjon av Vitellogenin, Vtg, og Zona radiata protein (Arukwe *et al.* 1997 a). Ved lave konsentrasjonar av 4-nonylfenol viste studien at 4-nonylfenol kunne endre hormonmetabolismen (ii) av hepatisk mikrosomal

progesteron 6 β -hydroksylase. Ved høgare konsentrasjonar av 4-nonylfenol (10mg/kg kroppsvekt) viste studien at 4-nonylfenol kunne hemme denne aktiviteten (Arukwe *et al.* 1997 b). Også forstyrringar av reseptorar (iii) er vist som ein effekt av 4-nonylfenol ved høgare konsentrasjonar (>10mg/kg kroppsvekt) (Yadatie *et al.* 1999). Resultata førte til formulering av hypotesen: ”Effektane av ein endokrinforstyrrende substans er bestemt av dose avhengig vegval og kryss-kommunikasjon mellom ulike klassar kjernereseptorar” (Goksøyr 2006).

1.3 Farmakokinetikk og farmakodynamikk

Når ein organisme vert eksponert for ein endokrinforstyrrende sambinding så vil sambindingen kunne utøve ein effekt på organismen, og organismen vil kunne omdanne den til ein sambinding som kan skiljast ut av organismen. Farmakokinetikk (toksikokinetikk) er altså kunnskap om kva organismen gjer med ein substans og farmakodynamikk (toksikodynamikk) er kunnskap om kva substansen gjer med organismen (Slørdal *et al.* 2005).

Farmakokinetikk omfattar absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon (fig. 1). Absorpsjon av ein substans kan skje via ulike ruter til dømes oralt. Substansen sine fysikalsk-kjemiske eigenskapar er avgjerande for absorpsjon. Vidare er også ventrikkeltømming, tarmmotilitet og første passasje metabolisme i lever avgjerande for absorpsjon av ein substans. Substansen sin evne til å fordele seg i organismen avheng av evna substansen har til proteinbinding og om substansen er feittløyseleg eller vassløyseleg. Eit omgrep som seier noko om distribusjonen av ein substans i organismen er distribusjonsvolumet. Eit høgt distribusjonsvolum betyr at det er låg konsentrasjon av substansen i plasma og høg konsentrasjon i vevet. Eliminasjon av ein substans skjer via urin og galle. Ein vassløyseleg substans kan verte skilt ut uforandra medan ein feittløyseleg substans vert omdanna til meir vassløyselege produkt og deretter skilt ut. Kunnskap om farmakokinetikk og farmakodynamikk er dermed viktig for å kunne seie noko om kva som skjer med substansen i organismen og kva effekt substansen har på organismen.



Figur 1. Figuren viser kva som skjer med ein substans som vert tatt opp av ein organisme. Først vert den absorbert av organismen. Oralt opptak krev at substansen er upolar og kan krysse lipidmembranar. Ein substans kan og bli tatt opp via andre ruter til dømes ved inhalasjon og dermalt (over hud). Dei fleste substansane som blir absorbert i tarm vil bli transportert gjennom lever ved hjelp av portåresystemet og vert her utsett for førstepassasjemetabolisme. Vidare vil substansen verte distribuert i organismen avhengig av dei fysikalsk-kjemiske eigenskapane til substansen og binding til andre transportprotein. Substansen vil til slutt verte eliminert frå organismen via urin og/eller galle.

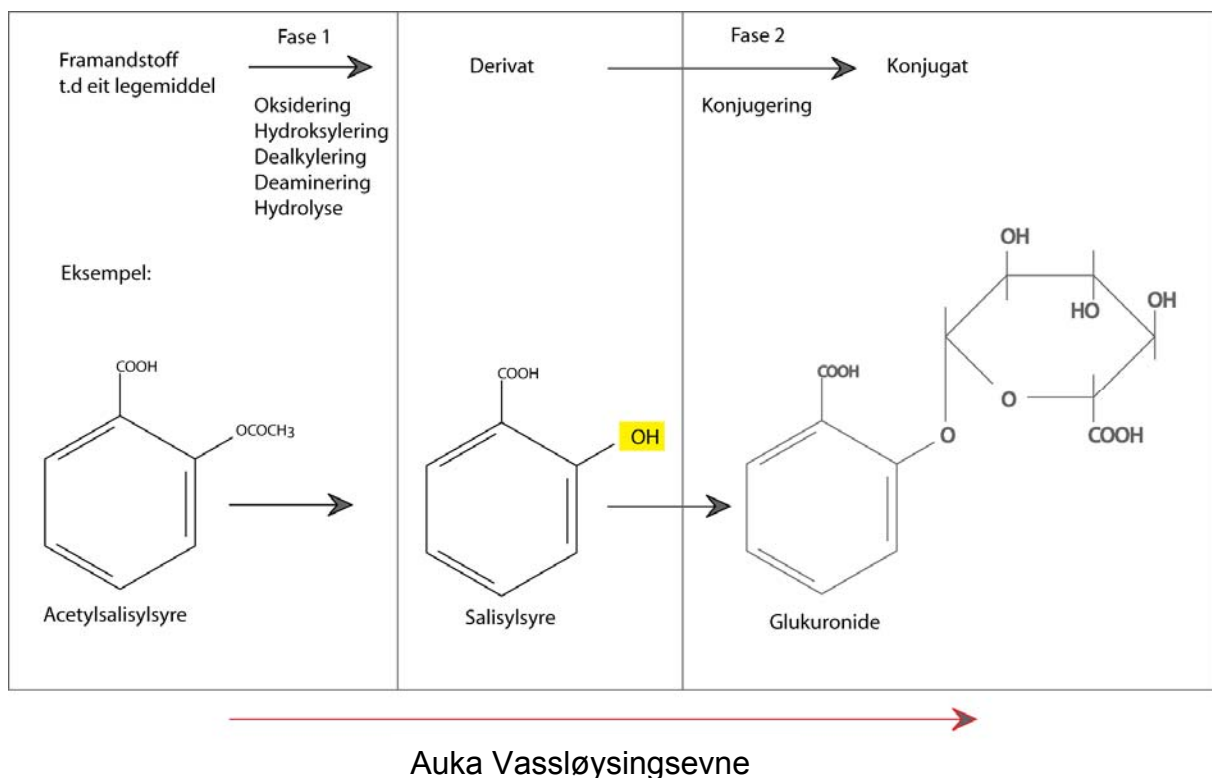
1.3.1 Metabolisme

Metabolisme er ein av dei farmakokinetiske prosessane som ein sambinding kan gjennomgå før den vert skilt ut av organismen. Metabolisme av legemiddel og miljøgifter er kroppen sin forsvarsmekanisme mot akkumulering av lipofile og potensielt toksiske substansar (Moreau *et al.* 2008). Metabolisme er prosessar der eit legemiddel eller ein annan substans vert biokjemisk modifisert for å deretter kunne skiljast ut frå kroppen. I samband med framandstoff vert desse prosessane kalla for biotransformasjon. For at framande substansar skal verte skilt ut av kroppen vert substansane omdanna til meir vassløselige produkt.

Biotransformasjon inneber fleire biokjemiske reaksjonar som ein kan dele inn i tre fasar. I fase I vert reaktive og polare grupper introdusert til substratet. Reaksjonar som er involvert kan vere oksidasjon, reduksjon eller hydrolyse. Eit eksempel på eit enzym som er involvert i ein fase I er cytokrom P450 enzym, forkorta CYP enzym. Desse reaksjonane fører til meir kjemisk reaktive, og ofte også til meir toksiske eller karsinogene produkt (Watkins *et al.* 1986; Rang 2003). I fase II vert substansen konjugert med lada molekyl og dette fører vanlegvis til større og meir polare produkt som lettare kan skiljast ut av organismen via galle

og urin. Enzym som er involvert i fase II kan til dømes vere glutation-S-transferase (GST) (Rushmore *et al.* 1993). Desse metabolske fase I og fase II reaksjonane skjer i endoplasmatisk retikulum og cytosol (fig. 2). Når substansen har gjennomgått fase I og fase II metabolisme vil dette produktet vere så vassløyselig at det ikkje kan transporterast over lipidmembranen og ut av cella. Fase III metabolisme involverar protein som fungerer som effluks system, altså protein som skal transportere vassløselige produkt ut av cella. Eksempel på fase III transportsystem er *multidrug resistance protein*, MDR.

Lever er hovudorganet for metabolisme, men det vert også utført metabolske prosessar i tarm, nyrer, lunger, hud og placenta (Walker *et al.* 2003). Avhengig av art, alder, kjønn, næringsstatus og eksponering for ulike kjemiske sambindingar kan biotransformasjon variere mellom individ (Watkins *et al.* 1986).



Figur 2. Figuren viser metabolismereaksjonar som inngår i fase I og fase II biotransformasjon. Intermediata som vert danna kan vere både toksisk og karsinogent. Produktet er som oftast mindre lipofilt for å auke utskilling av substansen. Eksemelet viser metabolisme av acetylsalisylsyre (Aspirin) der fase I metabolisme fører til at ei funksjonell gruppe vert introdusert til molekylet. I dette tilfellet ei OH-gruppe. Denne funksjonelle gruppa gjer at molekylet kan gjennomgå konjugeringsreaksjonar der molekylet blir tilført ei større gruppe slik at molekylet aukar hydrofilisiteten og storleiken. I dette tilfellet vert molekylet konjugert med ein glukuronid. Figuren er modifisert frå figur 8.1 i Pharmacology (Rang 2003).

1.4 Interaksjonar

Mange menneske tek eit eller fleire legemiddel dagleg. Tal henta frå reseptregisteret og presentert i Norsk Folkehelseinstitutt sin årlege rapport om legemiddelforbruket i Noreg viser mellom anna at minst 28 % av kvinnene mellom 15-49 år henta ut resept på prevensjonsmiddel minst ein gong i løpet av 2007. Data presentert i rapporten viser også at om lag 19 % av befolkninga i Noreg henta ut ein resept på legemiddel til behandling av hjerte og karsjukdomar i 2007 (Folkehelseinstituttet 2008).

Ved kroniske og akutte tilstandar vil det vere livsviktig at legemiddelet har den effekten som det skal. Ein interaksjon vil kunne oppstå når ein effekt av eit legemiddel vert endra ved nærver av eit anna legemiddel, mat, drikke eller ein miljøgift (Baxter *et al.* 2006). Slike interaksjonar kan skje via to mekanismar. Den eine mekanismen inneber forstyrringar av metabolismereaksjonar ved hemming av metabolske enzym. Den andre mekanismen er induksjon av metabolske enzym. Hemming av metabolske enzym er klassifisert som reversibel og irreversibel hemming, og desse kan vidare klassifiserast som konkurrerende, ikkje-konkurrerende og u-konkurrerende hemming (Nelson *et al.* 2008). Ein konkurrerende hemmar vil binde til bindingssetet til enzymet og hindre enzymet frå å utføre metabolske reaksjonar. Ein ikkje-konkurrerende hemmar vil binde enzymet ein annan stad enn det metabolske setet og føre til konformasjonsendringar i enzymet som gjer at enzymet ikkje kan utføre metabolske reaksjonar. Ein u-konkurrerende reaksjon inneber at ein hemmar bind substrat-enzym komplekset og hindrar på denne måten at metabolske reaksjonar vert utført. Irreversibel hemming inneberer danning av kovalent bindingar. Enzymhemming er reaksjonar som skjer raskt. Induksjon av metabolske enzym skjer som følgje av auka transkripsjonell aktivitet av desse og det tek tid før effekt syner seg (Lin *et al.* 1998).

Det finst mange eksempel på interaksjonar. Eit eksempel på hemming av metabolske enzym er samtidig administrering av simvastatin, eit serumkolesterolsenkande legemiddel, og grapefrukt juice, som inneheld substansar som hemmar CYP3A4 enzymet (Fukuda *et al.* 1997; He *et al.* 1998). I dette tilfellet vil hemming av CYP3A4 føre til at simvastatin bli metabolisert av CYP3A4 i mindre grad enn normalt og dette vil føre til forlenga auka serumkonsentrasjon av simvastatin og økt biverknadsrisiko (Lilja *et al.* 2004). Tal frå legemiddelstatistikk for 2006 viste at simvastatin er det legemiddelet som ligg på toppen av

lista over selde daglege døgndosar (DDD) (Folkehelseinstituttet 2008). Det er derfor tenkjeleg at svært mange kan vere utsett for interaksjonar som dette.

Eit eksempel på induksjon av metabolske enzym er til dømes samtidig administrering av hormonelle prevensjonsmiddel som inneheld etynylestradiol og Johannesurt. Johannesurt inneheld den verksame substansen hyperforin som induserar transkripsjon av CYP3A4 enzym ved aktivering av PXR (Moore *et al.* 2000). Etynylestradiol vert metabolisert av CYP3A4 og som følge av induksjon av CYP3A4 enzym vert serumkonsentrasjonen av etynylestradiol redusert. Etynylestradiol hindrar egg-løysing i menstruasjonssyklusen og som følge av nedsett serumkonsentrasjon av etynylestradiol vert den preventive effekten nedsett (Henderson *et al.* 2002). I 1973 vart det også vist at samtidig administrering av antibiotikumet rifampicin, som induserar transkripsjon av CYP3A4, og orale hormonelle prevensjonsmiddel førte til fleire uventa graviditetar (Nockefin *et al.* 1973).

Eit anna eksempel på ein interaksjon der induksjon av metabolske enzym er involvert er samtidig administrering av alkohol og paracetamol. Paracetamol (acetaminofen) vert hovudsakleg metabolisert via fase 2 konjugering med sulfat og glukuronid. I mindre grad vert paracetamol metabolisert via fase 1 CYP2E1. Ved metabolisme via CYP2E1 vert paracetamol omdanna til ein toksisk metabolitt, N-acetyl-p-benzoquinone imine, NAPQI. Denne metabolitten vert vanlegvis detoksifisert ved reaksjon med glutation. Ved overdosering av paracetamol vert konjugeringsreaksjonane metta og meir metabolisme skjer via CYP2E1. Glutation vert brukt opp og den toksiske metabolitten vert ikkje detoksifisert. Denne metabolitten vil då binde til leverprotein og dette fører til direkte vevskade og hepatisk nekrose. Ved stort inntak av alkohol før eit stort inntak av paracetamol kan skaden bli verre som følge av induksjon av CYP2E1 og dermed auka metabolisme av paracetamol via CYP2E1 metabolisme (Prescott 2000).

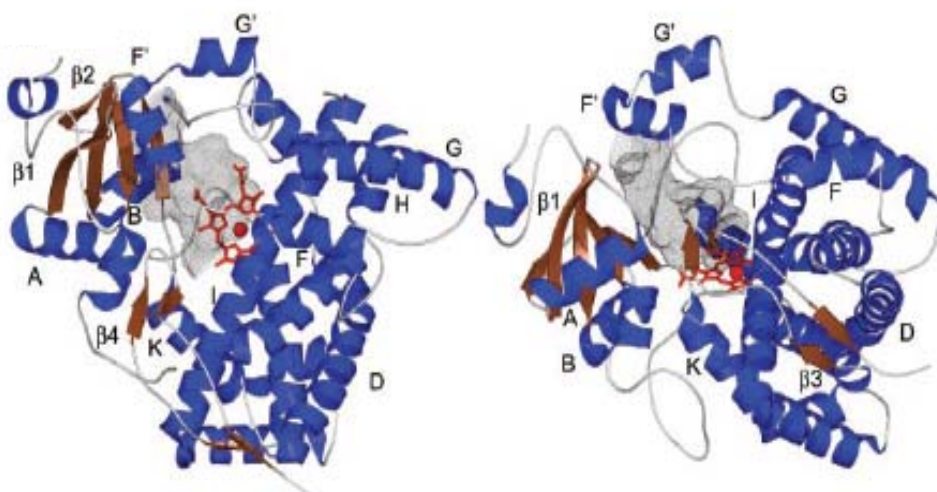
1.5 Cytokrom P450 systemet

Cytokrom P450 monooksygenaser er ei stor enzymesuperfamilie som deltar i fase I metabolisme. Hos menneska er det karakterisert 57 ulike CYP-enzym. For oversikt sjå heimesida til (Nelsons Cytochrome P450 heimeside) og oversiktsartikkel til (Guengerich 2006)). CYP monooksygenase enzymesystemet er membranbunde protein og er hovudsakeleg lokalisert i glatt endoplasmatisk retikulum i cella (Anzenbacher *et al.* 2001).

Det finst meir enn 3000 gen for ulike variantar av disse enzyma og meir enn 800 subfamiljar av enzyma (Nelsons Cytochrome P450 heimeside). Desse enzyma har ein storleik på omlag 45-60 kDa og har høg katalytisk diversitet og substratdiversitet. Det vil seie at dei kan metabolisere fleire ulike substansar. Nokon av enzyma i same subfamilie har overlappende substratspesifisitet, men ulik metaboliseringsrate. Substratspesifisitet kan verte endra av så lite som ein aminosyremutasjon. Dette kan føre til vesentlege endringar i substrataffinitet og reaksjonshastigheit (Danielson 2002). Substansane kan vere substrat, inhibitor eller induksjonsmiddel av enzym. Slik overlappende substratspesifisitet kan potensielt føre til interaksjonar mellom ulike substansar som vert metabolisert via same enzym i organismen.

1.5.1 CYP enzymstruktur og substratspesifisitet

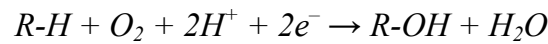
Alle enzyma har (FeIII) protoporfyrin IX som kofaktor som er bunde til eit apoprotein via ei cystinate-FeIII binding. Ved FeII kompleksbinding til CO vil enzymet gje eit absorpsjonssignal ved 450 nm (Mansuy 1998). CYP3A4 enzymet har ei relativt stort grop som samsvarar i storleik med dei substrata som vert oksidert av dette enzymet (Yano *et al.* 2004). Det er vist at CYP3A4 enzymet kan oksidere nokon av dei største substrata som er identifisert som CYP substrat. Eksempel på det er cyklosporin, bromokryptin og makrolid antibiotikum (Rendic *et al.* 1997). Det er også vist at to substrat kan okkupere denne gropa samtidig og verte oksidert utan å påverke kvarandre (Korzekwa *et al.* 1998).



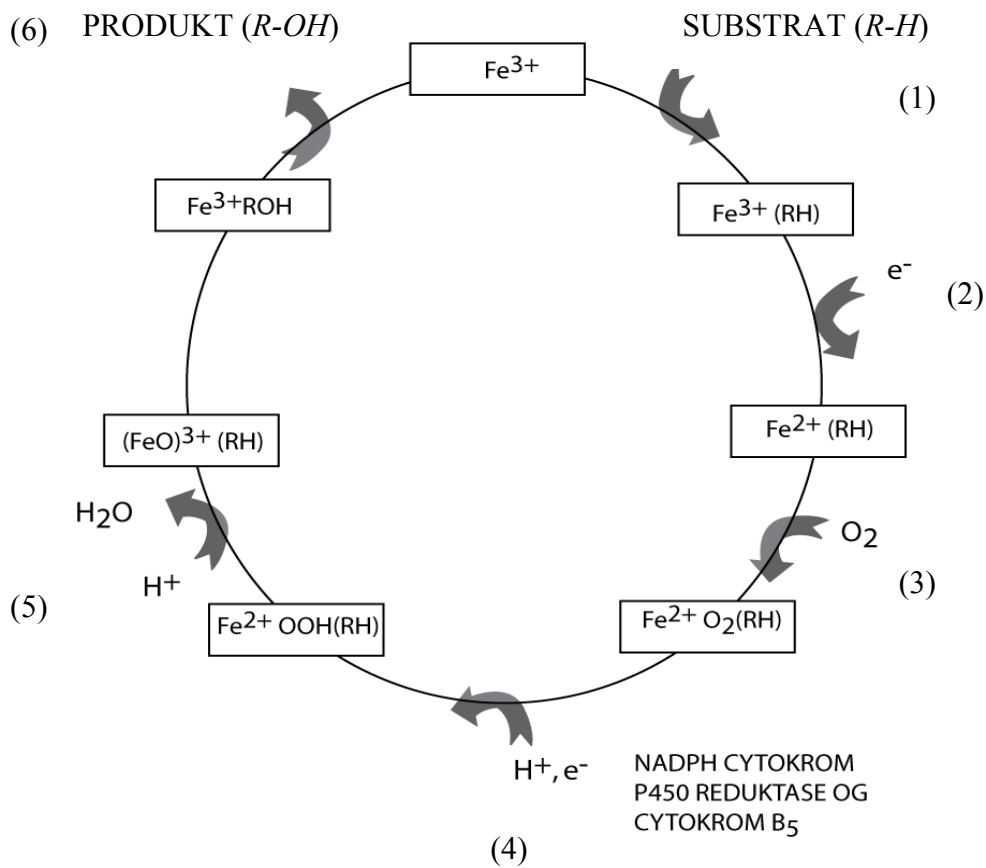
Figur 3. Bildet viser sekundær og tertiær struktur av CYP3A4 enzymet frå to ulike sider. α heliksene er blå, kveilane er grå og β -flak er brun-raud. Hem-gruppa er indikert som raude linjer sentralt i strukturen (Yano *et al.* 2004)

1.5.2 Katalytisk syklus for cytokrom P450

Cytokrom P450 enzym utfører biotransformasjon av eit substrat gjennom den katalytiske syklus. I denne syklusen vert eit substrat oksidert via fleire trinn. For at den katalytiske syklus skal kunne skje må cytokrom P450, NADPH-cytokrom P450 reduktase, NADPH og O₂ vere tilstades. Den generelle reaksjonslikninga for cytokrom P450 oksidering er:



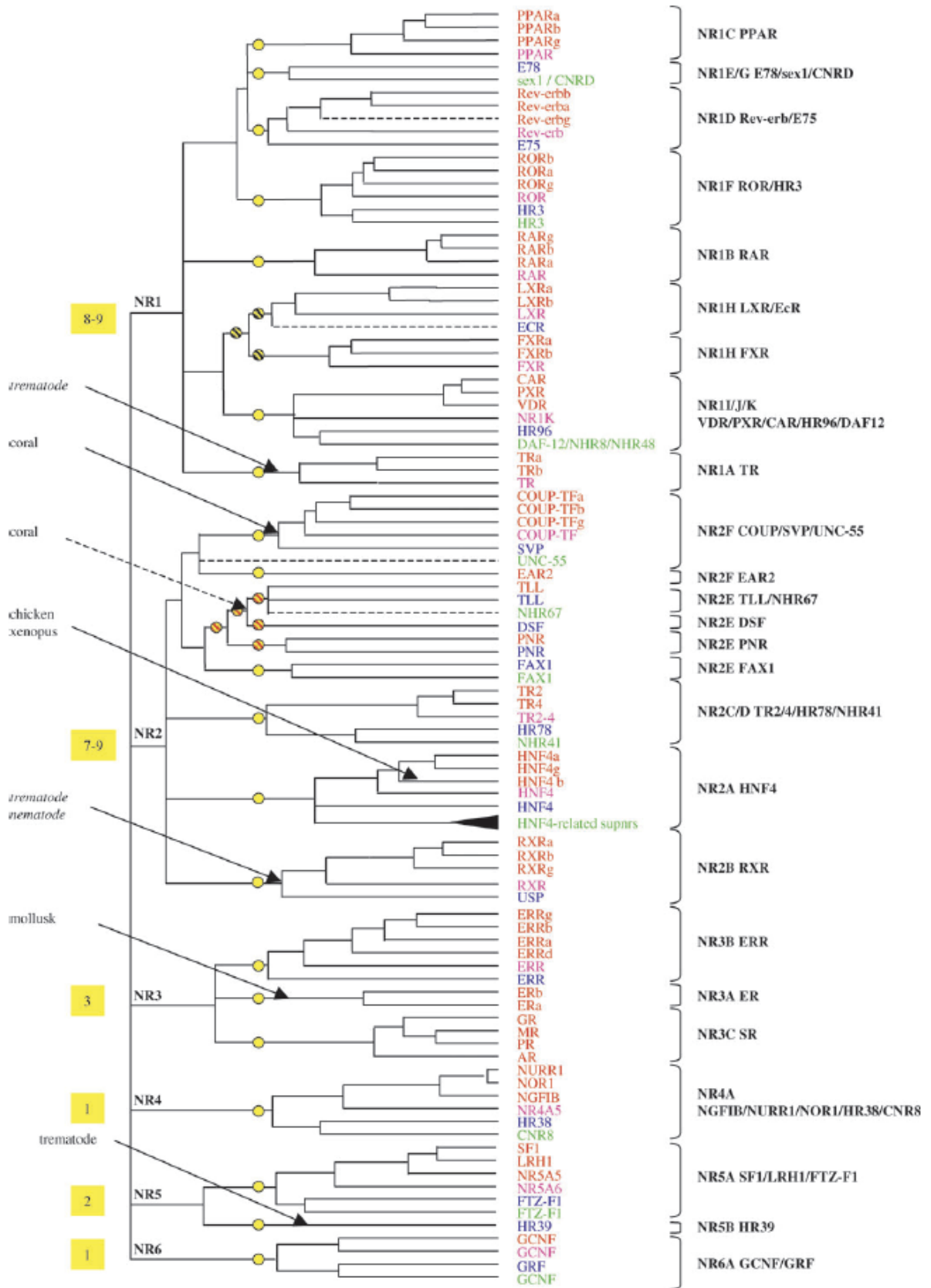
I den katalytiske syklus vert molekylært oksygen redusert samtidig som eit oksygenmolekyl vert inkorporert i substratet, RH, for å danne produktet R-OH (fig. 4).



Figur 4. Katalytisk syklus for Cytokrom P450. Figuren viser oksidering av eit substrat, RH. RH binder reversibelt til Fe³⁺ (1) og mottar eit elektron frå NADPH-reduktase som reduserer Fe³⁺ til Fe²⁺(2). Deretter bind eit oksygen molekyl til redusert jern (3) og eit proton og eit nytt elektron bind til substratet (enten frå NADPH-reduktase eller cytochrome b₅ (4)). Det har då blitt danna eit Fe²⁺OOH-RH kompleks. Dette komplekset bind eit nytt proton og danner H₂O og (FeO)³⁺-RH kompleks (5). I komplekset skjer det reaksjonar som gjer at (FeO)³⁺ får et hydrogenatom frå RH og det blir danna kortlevde frie radikalar og ROH som produkt (6) og CYP enzymet er resirkulert. (Figur er omteikna og forenkla frå fig.1 i Coon *et al.* 1992).

1.6 Kjernereseptorar

Regulering av transkripsjon av cytokrom 450 enzym skjer som nemnt i innleiinga via ligandbinding til kjernereseptorar. Sekvensering av det humane genomet førte til identifisering av 48 kjernereseptorar. 24 av desse er ligandavhengige transkripsjonsfaktorar (Germain *et al.* 2006). Ein ligandavhengig transkripsjonsfaktor er avhengig av ein ligand for å bli aktivert og vidare regulere transkripsjon av ulike enzym. Prosessar der kjernereseptorar spelar viktige roller er utvikling og homeostase, samt mange sjukdommar som fedme, diabetes og kreft (for oversiktsartikkel sjå Laudet *et al.* 2002; Gronemeyer *et al.* 2004). Fleire av kjernereseptorane bind som ein heterodimer med retinoid X reseptor, RXR (Mangelsdorf *et al.* 1995) og det er vist at RXR er ein viktig faktor i aktivering av kjernereseptorkompleks (Li *et al.* 2004). Sekvensanalyse og utvikling av fylogenetisk tre resulterte i klassifisering av kjernereseptorar i 6 grupper (fig. 5) (for oversikt over nomenklatur sjå Germain *et al.* 2006). Felles for kjernereseptorane i kvar gruppe er DNA-bindingsevne og dimeriseringsevne. Til dømes høyrer PXR og Constitutive androstane reseptor, CAR, til gruppe 1. Dei viser stor overlappende substratbindingsevne og begge induserar transkripsjon av CYP2B og CYP3A fase 1 enzym (Kretschmer *et al.* 2005). Østrogen reseptor, ER, er ein steroid reseptor og høyrer til gruppe 3. Desse er kjent for å danne homodimere kompleks. RXR høyrer til gruppe 2. Eit forslag til nomenklatur vart utarbeidd i samråd med *International Committee of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Classification* (NC-IUPHAR). Dette forslaget gav kjernereseptorane formell nomenklatur (NRNC 1999). Kjernereseptoren PXR fekk namnet NR1I2, ER α fekk namnet NR3A1 og RXR vert namnsett NR2B. I tillegg vert det gjeve ulike trivielle namn avhengig av art. Den humane PXR vert namnsett hPXR eller SXR. Vidare i oppgåva vert hPXR brukt der human PXR er omtalt.



Figur 5. Oppsumert fylogenetisk av kjernereseptorgen (Bertrand *et al.* 2004). Namnet på reseptoren er indikert i ulike fargar medan namnet på gruppa av kjernereseptorar er til høgre i svart.

1.6.1 Human pregnan X reseptor, hPXR

PXR vart identifisert i 1998 i fleire artar som eit medlem av kjernereseptorfamilien (Bertilsson *et al.* 1998; Kliewer *et al.* 1998; Blumberg *et al.* 1998b). Blumberg identifiserte den humane PXR (hPXR) som og vert kalla SXR. PXR bind til RXR som ein heterodimer slik som mange andre kjernereseptorar. Når ligand vert bunde til PXR vil PXR/RXR komplekset transaktivere eit DNA kjernereseptor-responselement også kalla hormonresponselement, HRE, og dermed indusere transkripsjon av CYP enzym (Kliewer *et al.* 2002) (fig. 6). PXR er særlig uttrykt i lever og noko i tarm (Bertilsson *et al.* 1998; Kliewer *et al.* 1998; Lehmann *et al.* 1998; Blumberg *et al.* 1998b).

Det kan seiast at kjernereseptoren PXR er ein svært sentral faktor i regulering av den oksidative metabolismen av framandstoff (fig. 5). Den har stor ligandbindingsevne og regulerar gen som er involvert i utvikling, homeostase, reproduksjon og metabolisme (Tabb *et al.* 2006; Matic *et al.* 2007). PXR induserar transkripsjon av *CYP3A* gen, men også andre metabolske enzym som CYP2B kan verte indusert (Lemaire *et al.* 2006). Regulering av transkripsjon av *CYP3A* gen skjer ved at PXR bind ulike ligandar. Ligandbinding til PXR er dermed ein sentral prosess for metabolisme av endogene og eksogene substrat som vert metabolisert via CYP3A4 enzym (Wyde *et al.* 2003). Rifampicin vart tidlig identifisert som ein kraftig induser av CYP3A4 enzym, men mekanismen for induksjon var lenge ukjent (Zilly *et al.* 1975). Rifampicin har derfor vore ein sentral ligand for identifisering av den humane varianten av kjernereseptoren PXR og studiar av CYP3A4 induksjon. Rifampicin er eit antibiotikum som vert brukt i kombinasjon med andre legemiddel mot tuberkulose (WHO 2003).

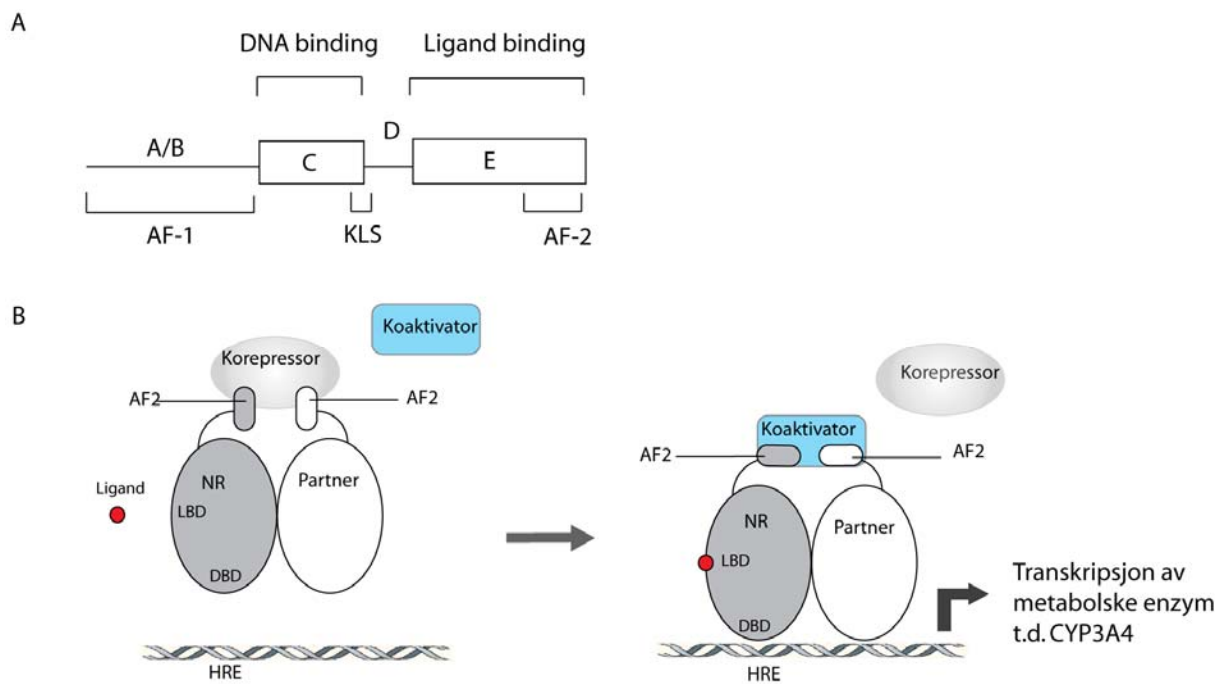
1.6.2 Human østrogenreseptor α , hER α

I motsetning til hPXR har human østrogen reseptor α , hER α , lenge vore kjent som ein kjernereseptor med ein naturleg ligand, estradiol. ER α vart identifisert i 1986 og var lenge kjent som den einaste østrogenreseptor varianten (Green *et al.* 1986; Greene *et al.* 1986). Seinare vart også ER β identifisert (Kuiper *et al.* 1996; Mosselman *et al.* 1996). Steroid hormonet østrogen bind ER α som er uttrykt i fleire ulike vev. Aktivert ER er kjent for å regulere uttrykking av målgen som kodar for til dømes progesteron reseptor. Det er difor svært mange fysiologiske effektar som følgje av østrogenbinding til ER. Østrogen regulerar

fysiologiske prosessar hos både menn og kvinner. Til dømes er det kjent at østrogen spelar ei viktig rolle i reproduksjon, bein- og lipidmetabolisme samt vedlikehald av det kardiovaskulære og nevrologiske system (For oversiktsartikklar sjå Ciocca *et al.* 1995; Reid *et al.* 2002). Lite er kjent om regulering av ER, men truleg vert hER α autoregulert (Reid *et al.* 2002).

1.6.3 Kjernereseptorstruktur og aktivering av kjernereseptorar

Alle kjernereseptorar har ein karakteristisk oppbygging av 5-6 domene, A til F. Figur 5 A viser skjematisk kjernereseptor struktur. A/B regionen er ein variabel region med aktiveringsfunksjon 1 (AF-1). AF-1 er liganduavhengig. Domenet C er DNA bindingsdomenet, DBD. Dette er den mest konserverte regionen og det er gjennom denne regionen kjernereseptorar bind til såkalla hormonresponselement, HRE. D regionen er mindre konservert enn C. Dette domenet fungerer som eit ledd mellom DBD og LBD og tillet at DBD kan rotere. Slik kan DBD og LBD ha ulike konformasjonar utan å skape sterisk hindring. Dette domenet har også eit kjernelokaliseringssignal, KLS. Domenet E er ligandbindingsdomenet (LBD) og er mindre konservert enn DBD. Dette domenet har fleire funksjonar som ligandbinding via ligandbindingslomme, dimerisering og ein ligandavhengig transaktiveringsfunksjon (AF-2). For at kjernereseptorar skal kunne transaktivere ulike gen må det i tillegg til ligandbinding til LBD også vere eit samspel med ulike kofaktorar. Via AF-2 vert korepressor- og koaktivatoraktivitet regulert. Når ligand bind til LBD vil ei rekkje av intramolekylære interaksjonar føre til konformasjonsendringar. Som følgje av det vert kjernereseptorinteraksjonar med koaktivator og korepressor endra slik at komplekset bind koaktivator og vidare transaktiverar ulike gen (Germain *et al.* 2006). Ei gruppe protein kalla for p160 koaktivatorar er viktig for aktivering av alle kjernereseptorar (Freedman 1999).

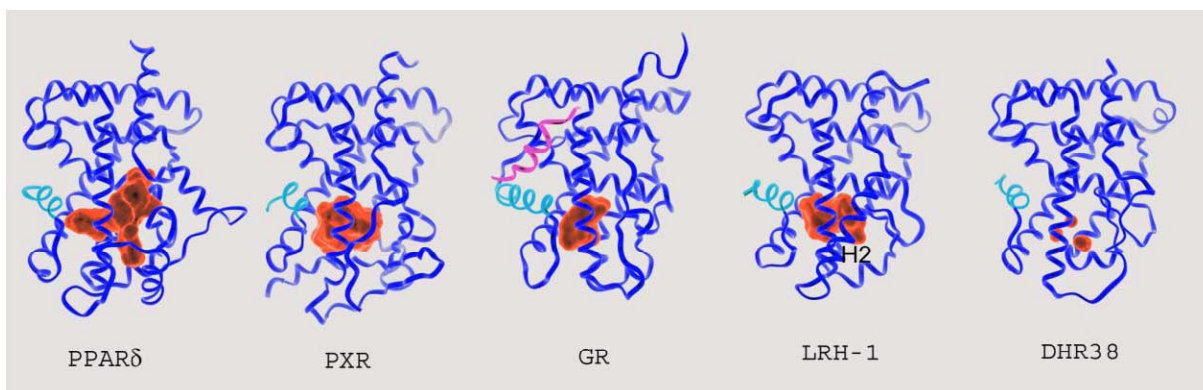


Figur 6. A viser forenkla ein generell struktur av ein kjernereseptor. Dei to konservative domena er C og E. C er DNA bindingsdomenet, DBD og E er ligandbindingsdomenet, LBD. Domenet A/B er ein variabel N-terminal region med lokalisering av AF-1 og tilsvarande ein variabel C-terminal der AF-2 er lokalisert (A er ein forenkla reproduksjon av fig.1 i Germain *et al.* 2006). B illustrerer korleis ein kjernereseptor (NR) vert aktivert av agonist. Når ligand bind til NR vil dette føre til konformasjonsendingar som fører til at korepressor vert erstatta av koaktivator. Dette fører til at heterodimeren NR/Partner vil binde hormonresponselementet, HRE, og metabolske enzym som til dømes CYP3A4 vert transkribert. Figuren er basert på figur 1 frå (Shulman & Mangelsdorf 2005).

1.6.4 Ligandbinding og ligandbingslomme

Ulike ligandar bind til kjernereseptorar. Eksempel på ligandgrupper er legemiddel, framandstoff og endogene sambindingar som pregnenolone og progesteron. Eksempel på ligandar som aktiverar hPXR er rifampicin, klotrimazol, hyperforin og ulike gallesyrer (Lehmann *et al.* 1998; Moore *et al.* 2000; Staudinger *et al.* 2001). Ein studie utført av Sinz *et al.* i 2006 viste at av 170 ulike legemiddel og kjemikaliar var det 54 % som viste noko aktivering av human PXR (Sinz *et al.* 2006). Også miljøgifter som alkylfenol (Mnif *et al.* 2007) og polybromerte dietylersambindingar, PBDE, (Pacyniak *et al.* 2007) kan binde hPXR og indusere transkripsjon av CYP3A4 enzym.

Ligandbinding til kjernereseptor skjer via ligandbindingslomma, LBP. LBP er ein viktig region av kjernereseptorstrukturen og består hovudsakleg av hydrofobe aminosyrer, men også av nokre få polare aminosyrer sentralt i LBP. Utforminga av LBP vil også vere avgjerande for spesifisiteten for ligandbinding. Storleiken til LBP varierar mellom ulike kjernereseptorar. Til dømes har PXR ein stor ligandbindingslomme og kan dermed binde svært mange ulike ligandar (Germain *et al.* 2006). Figur 7 viser ulike kjernereseptorar med ligandbindingslomme sentralt i strukturen.



Figur 7. Struktur av ulike kjernereseptorar med ligandbindingslomme markert rød. PPAR δ og PXR har store ligandbindingslommer og dette reflekterer også substratdiversiteten som desse kan binde (figur er modifisert frå Li *et al.* 2003).

1.6.5 Hormon responselement, HRE, og kjernereseptorar

Felles for alle kjernereseptorar er det konserverte DNA bindingsdomenet som er bygd opp av om lag 70 aminosyrer og to sinkfinger domene som kvar består av fire cystein einingar som chelaterar sinkfinger atoma (Gronemeyer *et al.* 1995). Alle kjernereseptorar kjenner igjen ulike variantar av ein DNA heksamere, PuGGTCA (Pu = A eller G). Mutasjonar, forlengingar, duplikasjonar og orienteringar av dette motivet gjer at ulike kjernereseptorar kjenner igjen og selektivt bind DNA ulikt (Laudet *et al.* 2002). Dette motivet vert kalla for hormonresponselement, HRE.

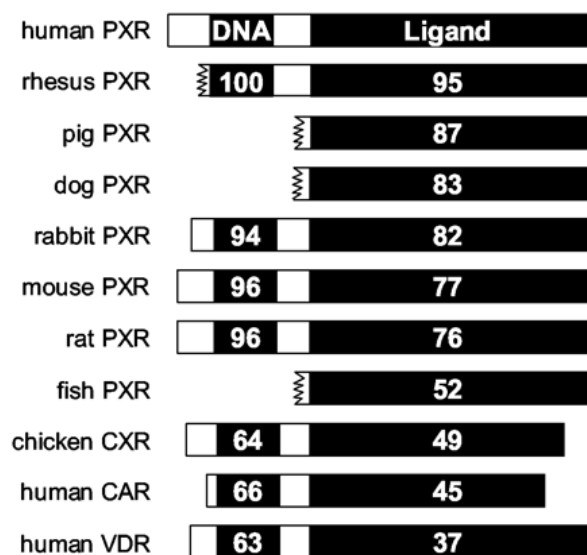
hPXR saman med RXR kan binde fleire ulike HRE. Til dømes er det vist at hPXR/RXR kan binde både DR3, DR4 og DR5 (direkte repetert sekvens med 3, 4 eller 5 nukleotider mellom repetisjonane av sekvensen AG(G/T)TCA) (Blumberg *et al.* 1998b). Desse promotorelementa regulerer transkripsjon av ulike CYP gen mellom anna *CYP2B* (Xie *et al.* 2000; Goodwin *et al.* 2001) samt *MDR1* (Geick *et al.* 2001).

Ein studie utført av Barwick *et al.* i 1996 viste at ein av tre konsensusregionar i det proksimale humane *CYP3A4* genet var nødvendig for ligandrespons. Denne sekvensen, AG(G/T)TCA, er hos *CYP3A4* genet identifisert som 2 kopiar av ein omvendt repetisjon av sekvensen, avskilt av 6 nukleotider og vert kalla ER-6. Det er også identifisert regulatoriske regionar i distale delar av *CYP3A4* genet som er involvert i transkripsjons-aktivering med rifampicin og andre xenobiotiske sambindingar. Denne regionen vert kalla for *Xenobiotic-responsive enhancer module*, XREM, og viste saman med responselement i proksimale promotorregionar transaktivering av *CYP3A4* genet (Goodwin *et al.* 1999).

Også hER α bind eit hormonresponselement, HRE, av PuGGTCA varianten. I motsetning til PXR bind hER α som ein homodimer til HRE og aktiverer deretter transkripsjon av ulike metabolske enzym (Kumar *et al.* 1988). Det er vist at eit 13 bp palindrom **GGTCA**CAG**TGACC** fungerer som eit østrogenreseptor responselement *in vitro* (Klein-Hitpass *et al.* 1988).

1.6.6 Artsforskjellar i kjernereseptoraktivering

Aktiveringsprofilen til PXR varierar mellom ulike artar. Samanstilling av kanin, rotte, mus og human PXR viser at desse deler om lag 70-80 % aminosyreidentitet i ligandbindingsdomenet, og det er grunnlag for å tru at nokon ligandar kan aktivere PXR hos fleire artar medan andre ligandar er artsspesifikk. Studiar har vist at hos ulike artar regulerar PXR uttrykking av *CYP3A* hos den respektive arten. Årsaka til artsvariasjon kjem truleg av at dei ulike artane har vore eksponert for ulike ligandar gjennom næring og omgjevningar i ulike habitat (Jones *et al.* 2000; Kliewer *et al.* 2002). Evolusjonstudiar av gallesalter samsvarar også med evolusjon av ligandspesifisiteten for steroider til PXR (Krasowski *et al.* 2005). Barwick *et al.* 1996 viste at ved å transfektere human *CYP3A4* promotorgen inn i rotte- og kaninhepatocytter så vil ligandane som aktiverer rotte/mus framleis gjere det sjølv om det er ein human *CYP3A4* promotor (Barwick *et al.* 1996). Årsaka til denne observerte ulikskapen vart seinare identifisert som ligandaktivering av PXR (Bertilsson *et al.* 1998; Kliewer *et al.* 1998; Blumberg *et al.* 1998b).



Figur 8. Figuren viser aminosyreidentitet i DNA bindingsdomenet og ligandbindingsdomenet mellom ulike artar (Kliewer *et al.* 2002)

1.7 Luciferase reporter assaysystem

DUAL-Luciferase reporter system har lenge eksistert som ein metode for å studere transkripsjonell aktivitet. I eit slikt system vert to reporterplasmid transfektert saman. Det første plasmidet er ein Eldfloge-luciferase reporter og vert aktivert av produkt frå ekspresjonsplasmidet som ein ønskjer å studere. Det andre plasmidet er eit kontrollplasmid med eit reporter gen som vert uttrykt konstant og fungerer som ein intern kontroll for å normalisere for transfeksjonsvariasjonar. Ulike luciferase reportersystem brukar ulike reporterplasmid som intern kontroll (kloramfenikolacetyltransferase, β -galaktosidase og β -glukuronidase). Promega utvikla i 1996 eit system der kontrollplasmidet kodar for renilla-luciferase. I dette systemet vert Eldfloge-luciferase aktivert av produkt frå ekspresjonsplasmidet som tidligare og det nye plasmidet, renilla-luciferase, er aktivert konstant. Desse to enzyma har ulik substratkrav og systemet gjer det enkelt å måle aktiviteten til desse to plasmida i same lysat (Sherf *et al.* 1996). Denne teknologien var det ønskeleg å ta i bruk i denne studien. For å kunne studere aktivering av hPXR og hER α og samtidig ha ein intern kontroll må det utviklast eit system som gjer at ein kan transfektere og studere aktiviteten til tre reporterplasmid samtidig. Dermed vert allereie etablert teknologi (β -galaktosidase reporter) kopla saman med ny teknologi (eldfloge-luciferase reporter og renilla-Luciferase reporter) for å studere hPXR og hER α aktivering.

1.8 Målet med studien

Utgangspunktet for oppgåva var kunnskap om at ulike ligandar kan binde kjernereseptoren hPXR og indusere transkripsjon av CYP3A4 enzym. Ligandbinding til hPXR og regulering av transkripsjon av CYP3A4 enzym er ein sentral prosess i metabolisme av framandstoff. Dette reiser derfor spørsmål om effektar av ligandbinding til hPXR og om ligandbinding til hER α vil påverke slike prosessar. Sidan nokon av desse ligandane også bind hER α kan ein reise spørsmål om det er ei form for kryssaktivitet mellom hER α og hPXR.

Målet med oppgåva var derfor å undersøke om ligandar kan ha både østrogen/antiøstrogen effekt og xenobiotisk effekt ved å studere ligandbinding til kjernereseptorane hPXR og hER α i eit Luciferase reportersystem. Det var ønskeleg å finne ut om hPXR og hER α kan binde same ligand og om ligandbinding til enten hPXR og/eller hER α kjernereseptor var doseavhengig. Ligandar som det var ønskeleg å bruke var p-pillehormonet etynylestradiol, miljøgifta 4-nonylfenol og legemiddelet rifampicin.

For å kunne studere hPXR og hER α i eit luciferase reportersystem måtte først transfeksjons-systemet etablerast. Dette innebar subkloning av reporterkonstrukt. Deretter skulle ulike transfeksjonsforsøk gjennomførast der målet var å undersøke om desse reporterkonstrakta fungerer som reporter, samt studere ligandbindingseffekt til hPXR og hER α kvar for seg. Til slutt var det ønskeleg å studere effekten av ligandbinding til hPXR og hER α når desse to ekspresjonsplasmida vart uttrykt samstundes i same celle.

2. Materiale

2.1 Liste over generelle kjemikalier

Namn	Kat.no	Leverandør
Agar	1.01614.1000	Merck
Agarose	15510-027	Invitrogen
Agarose (low melting)	50080	NuSieve GTG
Ampicillin	1034785A	Bristol-Myers Squibb AB
Bacto gjær ekstrakt	212750	BD
Bacto Tryptone	211705	BD
Borsyre	1.00165.1000	Merck
Bovine serum albumin, BSA 10mg/ml	R29610	Promega
Bromfenol blue		Merck
Dimetylsulfoksid, DMSO	2931	Merck
Dinatriumhydrogenfosfat, Na ₂ HPO ₄	30427	Riedel-de Haen Ag
Dinatriumkarbonat, Na ₂ CO ₃		Merck
dATP, 100 mM	B1053A	Takara
dCTP, 100 mM	B1050A	Takara
dGTP, 100 mM	B1058A	Takara
dTTP, 100 mM	B1052A	Takara
Etanol (EtOH) 100%		Arcus kjemi
EDTA	1.08418.1000	Merck
Ethidiumbromide (EtBr)	K 16549915	Merck
Glucose		Merck
Glycerol (87 %)	1.04094.1000	Merck
Glysin	1.04201.1000	Merck
Hydroclorsyre (HCl)	1.00317.1000	Merck
Isoamylalkohol	979.1000	merck
Isopropanol (100%)		Arcus produkter
Kaliumklorid, KCl	5114	Riedel-de Haen Ag
Magnesiumdiklorid, MgCl ₂		Merck
Magnesiumsulfat, MgSO ₄	5046B	Riedel-de Haen Ag
Metanol	20903.368	VWR
Natrium Acetat, NaAc	1.06268.1000	Merck
Natriumdihydrogenfosfat, NaH ₂ PO ₄	4033	Merck
Natriumklorid, NaCl	1.06404.1000	Merck
Tris-(hydroksymetyl)-aminometan (TRIS)	75825	USB
2-Nitrofenyl β-D-galaktopyranosid, ONPG	057 K0732	Sigma
β-mercaptoetanol	ZA 1440406	Merck

2.2 Materiale til celledyrking

Namn	Skildring	Kat.nr	Leverandør
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium, DMEM	Medium til COS 1 celler	D5921	Sigma
Føtalt bovin serum, FBS	Serum	DE14-801F	Biowhittaker
Trypsin EDTA	Løyer cellene	BE17-161E	Cambrex
L-Glutamin			Merck
Trypan blå løysing (0,4%)	Fargeløysing til celletejning	T8154	Sigma
Penicillin/Steptavidin(Pen./Strp.), 10 000 µg Streptomycin, 10 000 u/ml penicillin	Antibiotika	DE17-602E	Biowhittaker

2.3 Enzym

Namn	Konsentrasjon	Kat.no	Leverandør
Restriksjonsenzym			
EcoRI	12 u/µl	1040S	Takara
Acc651	10 u/µl	R692A	Promega
NheI	10 u/µl	R650A	Promega
HaeIII	10 u/µl	R617A	Promega
PvuII	15 u/µl	1076A	Takara
+ Multicore buffer ¹	x10	R999A	Promega
Fosfataser			
CIAP(calf intestinal Alkaline phosphatase)	14 u/µl	E1801BB	Takara
+CIAP buffer	x10	A2301	Takara
SAP (Shrimp alkaline Phosphatase)	1 u/µl	118243	USB
+SAP buffer	10 X	-	USB
Ligaser			
T4 DNA ligase	350 u/µl	2011A	Takara
+ T4 DNA ligase buffer	x10	A2801	Takara
Kinaser			
T4 DNA kinase	10 u/µl	2021A	Takara
+ T4 DNA kinase buffer	x10	A1701	Takara
Polymeraser			
Polymerase miks ²			
+ PCR buffer	x10	S0596	
Sekvensering			
Big Dye versjon 3.1 ³		4314421	Perkin Elmer

¹ Enzyma viste aktivitet i multicorebuffer og denne vart dermed brukt til kuttreaksjonane.

² Miksen er ein samansetning av 1,1 µg/µl KlenTaq-1 DNA polymerase og 1,1 µg/µl TaqStart antistoff.

³ Big Dye versjon 3.1 frå University of Bergen Sequencing Facility, Høgteknologissenteret,

Thormøhlensgate 55, 5008 Bergen, Noreg.

2.4 Molekylvekt standard

Namn	Kat. no	leverandør
DNA storleik markør		
2-log DNA ladder (50µg/µl)	15616 016	Invitrogen
ΦX174 DNA HaeIII Marker (50ng/µl)	345A	Takara
Protein storleik markør		
Precision Broad Range (10 kD - 250 kD)	161-0370	Bio-Rad Laboratories

2.5 Oligonukleotider og primere

Namn	Sekvens	Leverandør
Oligonukleotider for syntese av responselementer		
DR1f	CCA-GGT-CAC-AGG-TCA-GCA-G	Eurogentec S.A.
DR1r	CTG-CTG-ACC-TCT-GAC-CTG-G	Eurogentec S.A.
DR3f	CCA-GGT-CAG-ACA-GGT-CAG-CAG	Eurogentec S.A.
DR3r	CTG-CTG-ACC-TGT-CTG-ACC-TGG	Eurogentec S.A.
CYP3A1f	CCG-GGT-CAC-AGT-TCA-GCA-G	Eurogentec S.A.
CYP3A1r	CTG-CTG-ACC-TGT-GAC-CCG-G	Eurogentec S.A.
CYP3A3f	CCG-GGT-CAG-ACA-GTT-CAG-CAG	Eurogentec S.A.
CYP3A3r	CTG-CTG-AAC-TGT-CTG-ACC-CGG	Eurogentec S.A.
ERE3f	CCA-GGT-CAG-AGT-GAC-CTG-GCAG	Eurogentec S.A.
ERE3r	CTG-CCA-GGT-CAC-TCT-GAC-CTG-G	Eurogentec S.A.
Primere for sekvensering		
pGl4.10lucF	TAG-CAA-AAT-AGG-CTG-TCC-CC	Eurogentec S.A.
pGl4.10lucR1	CAT-CTT-CCA-TGG-TGG-CTT-TAC-C	Eurogentec S.A.

2.6 Plasmid brukt for danning av reporterkonstrukt

Namn	Storleik	Skildring	Produsent
pG5luc	4955 bp	eldfloge-luciferase vektor	Promega
pGL4.74	4205 bp	hRluc/TK vektor	Promega

2.7 Ekspresjonsplasmid

Namn	Skildring	Referanse/kjelde
hPXR(SXR)*	Står i vektor pCDG1	Gåve frå Professor Bruce Blumberg, Department of Developmental and Cell Biology, University of California, Irvine ¹
hPXR*	Står i vektor pCMV5	hPXR, hRXR og hER α vart gjeve som gåve frå Hormonlaboratoriet ved Haukeland Universitetssykehus
hRXR	Står i vektor pCMV5	Maksiprep av G-T Sørland
hER α	Står i vektor pSG5	

* I oppgåva vart det brukt to ulike hPXR plasmid. Det eine frå Professor Bruce Blumberg og det andre frå Hormonlaboratoriet ved Haukeland Universitetssykehus. Der det er brukt hPXR frå Hormonlaboratoriet står det hPXR* og hPXR når plasmidet frå Professor Bruce Blumberg vert brukt.

¹ (Blumberg *et al.* 1998a)

2.8 Reporterplasmid

Namn	Skildring	Referanse/kjelde
DR3-Eldfloge-Luc	Klona inn i pG5luc vektor ved å fjerne Gal4 bindingssetet	Subkloning og reinsing av Gunn-Therese L. Sørland ¹
ERE-Renilla-Luc	Klona inn i pGl4.74 vektor ved å fjerne HSV-TK promotor	Subkloning og reinsing av Gunn-Therese L. Sørland ²
XREM	TK-Luc vektor	Gåve frå Professor Bruce Blumberg, Department of Developmental and Cell Biology, University of California, Irvine ³
β -gal	pcDNA1.2/V5-GW/lacZ Kodar for β -galaktosidase	

¹ Sekvensanalyse i Appendiks 1, figur 29

² Sekvensanalyse i Appendiks 1, figur 30

³ (Goodwin *et al.* 1999)

2.9 Ligandar

Namn	Kat.no	Leverandør
Rifampicin	R7382	Sigma
Pregenolone 16 α carbonitrile	P0543	Sigma
4-nonylfenol	744330	Fluka
17- α - etynylestradiol, EE ₂	E4876	Sigma

Ligandane vart løyst opp i DMSO og fortynna i DMEM medium ved transfeksjon.

2.10 Bufrar og løysingar brukt i agarose gel elektroforese

Namn	Skildring
5x TBE, pH 8 0.5 M Tris 0.5 M Borsyre 10 mM EDTA, pH 8,0	
6x Loading buffer 0.25 % (w/v) xylene cyanol FF 30 % (w/v) Glycerol	
0,8% Agarose 0.5 x TBE 0.8 % (w/v) Agarose (Invitrogen) 0.1 % (w/v) Etidium Bromid	Etidium Bromid er tilsett rett før gelen skulle støypast
1 % Agarose 0.5 x TBE 1% (w/v) Agarose (Invitrogen) 0.1 % (w/v) Etidium Bromid	
2% Agarose 0.5 x TBE 1 % (w/v) Agarose (Invitrogen) 1 % (w/v) Agarose (NuSieve) 0.1 % (w/v) Etidium Bromid	For å få god separasjon av dei korte banda vart det brukt ein 2 % gel. Ved fragmentreinsing vart det brukt ein 50:50 miks av agarose med lavt smeltepunkt og vanleg agarose for å lettare kunne fjerne agarosen.

2.11 Ulike bufrar

Namn	Skildring
TE, pH 8 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0	Bufrane er sterilisert ved autoklaving
TE-tynn, pH 8.0 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 0.1 mM EDTA, pH 8.0	

2.12 Bufrar og løysingar til SDS-Page

Namn	kat.no.	Leverandør
30 % Acrylamid/Bis løysing 37,5:1 (2,6 %)	161-0158	Bio-Rad Laboratories
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	161-0798	Bio-Rad Laboratories
0,5 M Tris-HCl pH 6,8		Bio-Rad Laboratories
10 % Sodium dodecyl sulphate, SDS:		
20 % SDS	75832	USB Corporation
dH ₂ O		
Fortynn 20 % SDS med dH ₂ O (1:1)		
10 % Ammoniumpersulfat (APS):		
0,1 g APS	161-0700	Bio-Rad Laboratories
1 ml dH ₂ O		
(Lag like før bruk)		
N,N,N',N'-Tetrametyletylendiamin (TEMED)	161-0800	Bio-Rad Laboratories
2X Prøvebuffer:		
3,03 g Tris		
4,0 g SDS		
20 ml glycerol		
60 ml dH ₂ O		
Juster pH med 5 M HCl		
6 ml mercaptoetanol		
0,05 mg Bromfenol blue		
Juster volumet til 100 ml med dH ₂ O		
1X Kjøyrebuffer:		
100 ml 10x Tris/Glysin/SDS-buffer	161-0772	Bio-Rad Laboratories
900 ml dH ₂ O		
Separasjonsgel 9 %:		
4,35 ml dH ₂ O		
2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8		
100 µl 10 % SDS		
3 ml 30 % Acrylamid		
50 µl 10 % APS		
5 µl TEMED		
Konsentrerende gel 4 %:		
3,1 ml dH ₂ O		
1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH 8,8		
50 µl 10 % SDS		
650 µl 30 % Acrylamid		
25 µl 10 % APS		
5 µl TEMED		

2.13 Bufrar og løysingar til western blot

Namn	Skildring
10 X Blottebuffer	
144 g Glysin	
30,3 g Tris	
dH ₂ O opp til 1000 ml	
1 X Blottebuffer	
100 ml 10 X blottebuffer	
200 ml metanol	
dH ₂ O opp til 1000 ml	
5 X TBS	
24 g Tris	
292,5 g NaCl	
1,8 l d H ₂ O	
hH ₂ O til 2000 ml	Juster pH til 7,6 med 6 M HCl
1 X TBS	
Blandast frå 10 X TBS (1:10)	
0,05 % TTBS	
200 ml 5 X TBS	
800 ml dH ₂ O	
0,05 ml Tween-20	
5 % tørrmjølk	
6,25 g NAN1	
125 ml TTBS	Denne mengda er nok til 1 blott, 100 ml til blokking og 10 ml til kvart antistoff
10 X PBS	
11,5 g Na ₂ HPO ₄	
2,0 g KH ₂ PO ₄	
80 g NaCl	
2,0 g KCl	
dH ₂ O til 1000 ml	Juster pH til 7,3 med HCl
1 X PBS	
50 ml 10 X PBS	
450 ml dH ₂ O	

2.14 Antistoff

Namn	Produsent	Fortynning
Anti-NR1I2 (279-379) pAb	Abononova Corporation	1:2500
Estrogen receptor alpha antibody	Abcam	1:500
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immuno-Globulins/HRP (1g/L)	Dako	1:2000

2.15 *Escherichia coli* stamme

Namn	Genotype	Bruk	Kat.no.	Leverandør
XL1 Blue	<i>recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac [F⁺</i> <i>proAB laq^qZΔM15</i> <i>Tn 10 (Tet^r)]</i>	For plasmid formeiring	200228	Stratagene

2.16 Vekst medium for bakteriar

Namn	Skildring
LB-medium 1 % (w/v) Tryptone 0.5 % (w/v) Gjær ekstrakt 1 % / (w/v) NaCl	Sterilisert ved autoklaving
LB + Ampicillin LB medium 100 µg/ml Ampicillin	For tillaging av agarplater vart det tilsett 1.5 % (v/v) agar før autoklaving, og deretter tilsett ampicillin
SOB 2 % (w/v) Tryptone 0.5 % (w/v) Gjær ekstrakt 10 mM NaCl 2.5 mM KCl	Sterilisert ved autoklaving
SOC SOB medium 5 mM MgCl ₂ 5 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose	Vert laga til rett før bruk

2.17 Cellelinjer

Namn	Skildring	Referanse/kjelde
COS-1	Nyreceller frå Grøn afrikansk ape	(Gluzman 1981)

2.18 Celle medium

DMEM medium

10 % (w/v) Fetalt bovine serum, FBS
1 % (w/v) L-Glutamin
1 % (w/v) Pen./Strp.
88 % (w/v) DMEM

2.19 Baseløysing og stoppløysing til måling av β -galaktosidaseaktivitet

Løysing	Skildring
Baseløysing Na ₂ HPO ₄ (60 mM) KCL (10 mM) 0,5 M MgCl ₂ (1 mM) NaH ₂ PO ₄ (40 mM)	Brukt til måling av β -galaktosidaseaktivitet
Stoppløysing 1 M Na ₂ CO ₃	Brukt til å stoppe hydrolysen av ONPG av β -galaktosidase

2.20 Ulike kit

Namn	kat.no	Leverandør
QIAEXII Gel ekstraheringskit	20021	QIAGEN
Wisard Plus Minipreps DNA purification system	A1460	Promega
Qiagen Plasmid Maxi kit	12163	QIAGEN
FUGENE 6 Transfection Reagent	11815091001	Roche
DUAL -Luciferase™ Reporter 1000 Assay system	E1980	Promega
Amersham ECL (Enhanced Chemiluminescent Substrat) Plus Western blotting detection system	RPN2132	GE Healthcare

2.21 Instrument

Instrument	Skildring/Leverandør
Beckman Avanti J-25 sentrifuge	Rotor JA14 og JA25.50, Beckman Coulter
Eppendorf sentrifuge 5810	A-4-81 rotor, Eppendorf
Microfuge	Sigma 112 B, Brown Biotech International, 12026 rotor
Biofuge	Biofuge Fresco, nedkjølt microfuge, rotor F6094, Heraeus instruments
Biofuge 13	#3757, Heraeus instruments
DNA sekvenser	Seq ABI 377 ABI PRISM
PCR maskin	Gene Amp PCR systems 2700, Applied Biosystems
Nanodrop spektrofotometer	ND-1000 Saveen Werner
Elektroporator	Gene Pulser™, Bio Rad
Varme inkubator	Thermax
Plattform rister	Str 6, Bibby Stuart
Termomikser	Eppendorf
Vibrofix VF vortekser	IKA® Labortechnik
Magnet rører	IKA® Labortechnik
pH meter	Modell 420A+, Thermo Orion
Fluostar Optima	Luminescence 384 optic Optimized absorbance 384 optic, 240-740 nm Ser.No 413-0743, BMG Labtech GmbH

3. Metodar

3.1 Eksperimentell strategi for oppgåva

Oppgåva innebar subkloning av ulike reporterkonstrukt og deretter uttesting av ligandar i eit *in vitro* assaysystem. I eit luciferase reportersystem kunne ein teste fleire ligandar mot hPXR og systemet gjorde det mogeleg å variere ligandkonsentrasjonar. Ein intern standard som t.d. renilla-luciferase skulle vere med i systemet for å normalisere for variasjonar i forsøket som gjekk på transfeksjonseffektivitet, celletal etc. Dette kunne potensielt variere mykje.

3.2 Subkloning av reporterkonstrukt

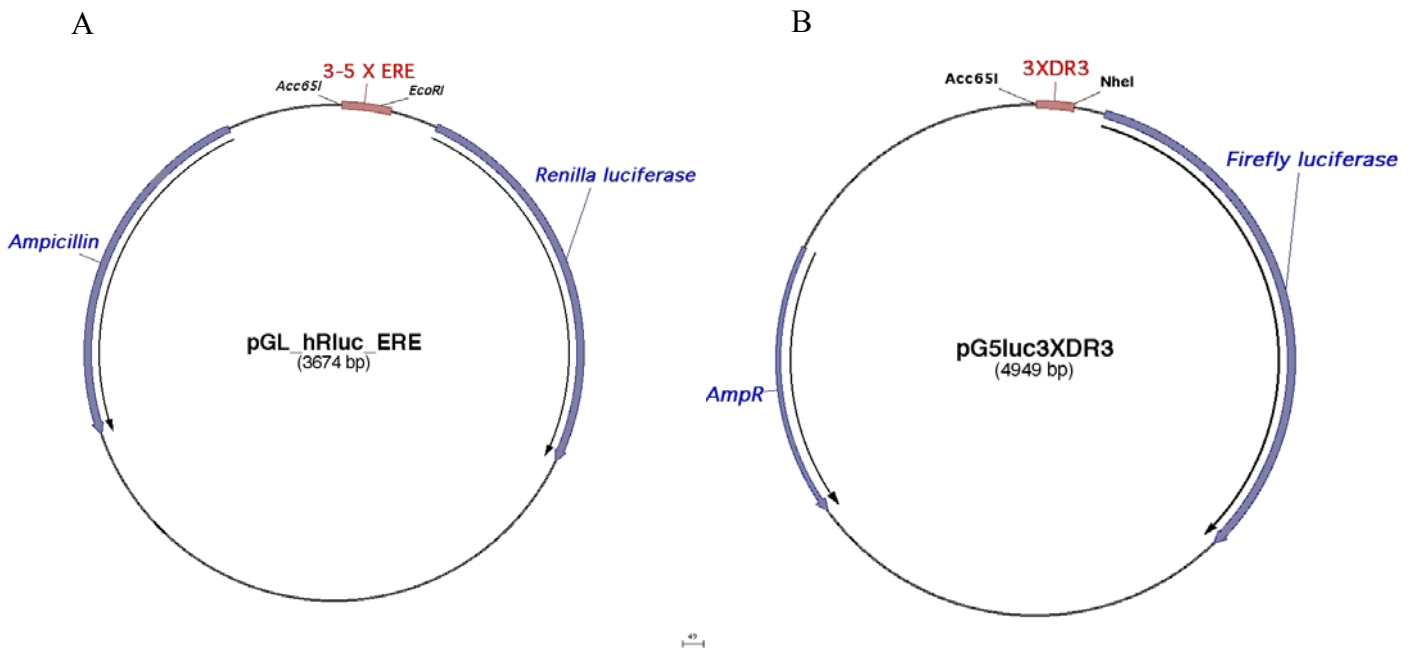
For å kunne teste ulike ligandar mot hPXR og hER α måtte luciferase reportersystemet subklonast. Eit reportersystem består av eit reporterogen til dømes luciferase, ein basal promotor og responselementet (HRE) som kan binde DNA bindingsdomenet uttrykt frå ekspresjonsplasmid (kjernereseptoren) som ein ønskjer å studere. HRE vil då stå framfor ein basal promotor og genet for luciferase enzymet. Ved kjernereseptorbinding til HRE vil luciferase enzym verte transkribert.

Subkloning innebar derfor syntese av ønskjelege responselement og deretter ligering av desse inn i ein eldfloge-luciferase vektor pG5luc og renilla-luciferase vektor pGL4.74. Ved å klonare responselementa inn i desse to ulike reportervektorane kunne det gjennomførast forsøk med hPXR og hER α i same reportersystem. Forskjellen på Eldfloge-luciferase og renilla-luciferase enzym er struktur og substrat krav (fig. 12). Ved å tilsette ulike substrat på ulikt tidspunkt kan ein selektivt skilje mellom eldfloge-luciferase aktivitet og renilla-luciferase aktivitet (Sherf *et al.* 1996).

Subkloning av ulike eldfloge-luciferase reporterplasmid med ulike responselement vart forsøkt. Dei ulike responselementa var CYP3A1, CYP3A3, DR1 og DR3 (sjå material kapittel 2.5 for sekvensar). Desse har ulike variantar av sekvensen AG(G/T)TCA og det kunne tenkast at desse ville verte aktivert av PXR.

3.2.1 Danning av responselement CYP3A1, CYP3A3, DR1, DR3 og ERE

Metoden som vart brukt er skildra i studien til Klinge *et al.* (Klinge *et al.* 1992). Først vart oligonukleotidene fosforylert ved å ta 5 μ l (200 μ M) oligonukleotid og tilsette 1 μ l (10 einingar) T4 DNA kinase. Deretter vart oligonukleotidane samanstilt ved å blande saman framover og revers primer i eppendorfrør og deretter plassert i 100 °C vassbad. Temperaturen vart redusert til 40 °C i løpet av om lag 60 minutt og deretter vart eppendorføret med samanstilt oligonukleotider plassert på is. 5 μ l av samanstilt oligonukleotid vart tilsatt 1 μ l (fortynna 1:10 i multicore buffer), T4 DNA ligase og ligert ved rom temperatur over natt for å danne x gongar repeterte sekvensar av primersekvensen. Det ønskelige var å få 3-6 x repetert sekvensen. For å sikre at CYP3A1, CYP3A3, DR1 og DR3 kom rett veg etter kvarandre (direkte repetert) vart 1 μ l av kvart restriksjonsenzym HaeIII og PvuII (høvesvis 10u og 15u) tilsett i ligeringsreaksjonen.



Figur 9: A viser ERE-responselementet subklona inn i renilla-luciferase vektor, pGL4.74. Reportergen er renilla luciferase. B viser DR3 responselementet subklona inn i Eldfloge-luciferase vektor, pG5Luc. Reportergen er Eldfloge (firefly) Luciferase. Begge plasmida kodar for ampicillin resistens.

3.2.2 Ekstrahering av fragment frå agarosegel og reinsing av DNA

For å kunne skilje dei ulike fragmentstorleikane frå kvarandre vart ein 2 % (50:50) (sjå material kapittel 2.10) preparativ agarose-gelelektroforese utført. Dei ønska bandstorleikane (60, 80 og 100 bp) vart kutta ut frå gel. Det vart brukt eit gelekstraksjonskit frå QIAGEN der ein fjernar agarose gel frå DNA og DNA ville då binde til silica gel resin. Deretter vart DNA eluert ved å tilsette 10 mM TRIS HCl pH 8,0.

3.2.3 Bestemming av DNA konsentrasjon

Etter gel ekstrahering vart 1 µl DNA satt på ein agarose gel for konsentrasjonsbestemming. Som standard vart det brukt ΦX 174 HaeIII markør (50 ng/µl). Ved å samanlikne intensiteten i dei ulike banda med banda i standarden vart konsentrasjonen estimert ved å bruke formel 1.

Formel 1:

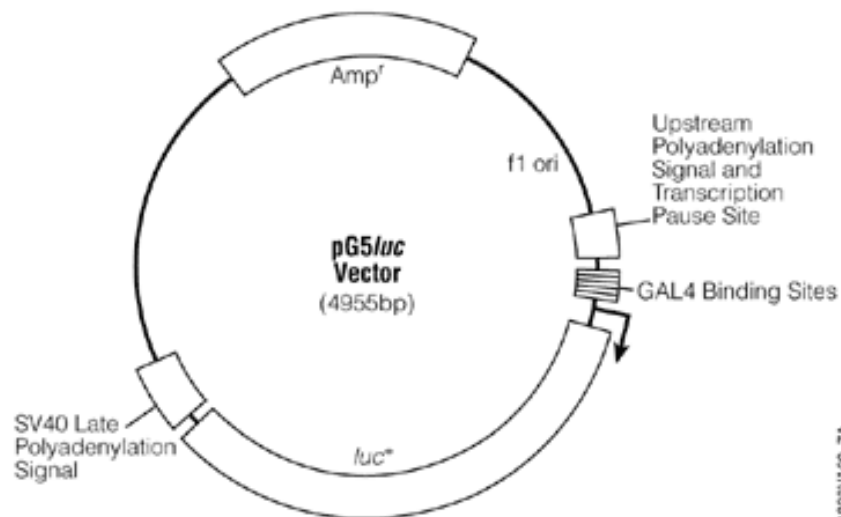
$$\frac{\text{estimert ant. bp i band} * (\text{ant. } \mu\text{l } \phi\text{x}174.\text{HaeIII} * \text{kons. } \phi\text{x}174.\text{HaeIII}(50\text{ng} / \mu\text{l}))}{\text{Tot. ant.bp i } \phi\text{x}174.\text{HaeIII}} = \text{ng DNA}$$

3.2.4 Kutting av pG5Luc vektor med restriksjonsenzym

pG5luc vektor består av 5 Gal4 bindingssteder oppstrøms av ein minimal TATA boks, som igjen er oppstrøms av eit Eldflogeluciferase gen, *luc+*. Dette Gal4 bindingssettet vart kutta ut. For å danne linjert pG5Luc DNA og deretter kutte ut Gal4 bindingssettet vart 10 µg vektor DNA tilsett 1 µl (10 einingar) av kvart restriksjonsenzym NheI og Acc651, 2,0 µl 1xMulticore buffer, 2,0 µl 1:10 fortyning av BSA (10mg/ml) til eit totalt volum på 20 µl. Kutting skjedde ved 37 °C over natt.

Ein kontroll på om kuttreaksjonen var fullstendig vart utført ved å påføre 1 µl av ufortynna kutteløysing og 1:10 fortyning av kutteløysing ved sidan av 1:50 fortyning av ukutta pG5luc vektor til ein 1 % agarosegel. Elektroforese vart kjørt med 50-80 volt i 45-60 minutt.

For å fjerne fragmentet som var kutta ut vart det utført reinsing av vektor (fig.10) slik som i kapittel 3.2.2. Kutting av vektor danna 3' og 5' overheng, og for å få butt ende vart 1 eining pr µg DNA Large Klenow fragment tilsett kutteløysinga. Etterfølgd av inkubering i 37 °C i 5 minutt og deretter vart 100 µM dNTP tilsatt. Tilslutt vart løysinga inkubert i 15 minutt ved 37 °C og enzymet inaktivert i 10 minutt ved 70 °C.



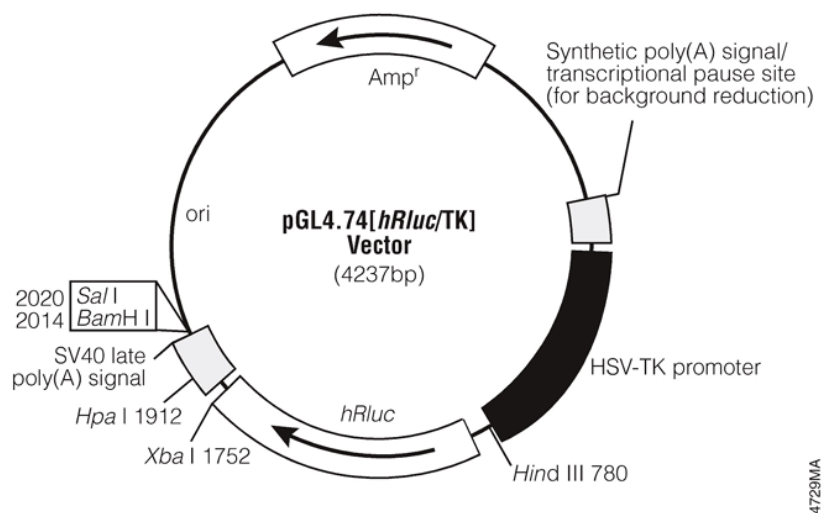
Figur 10. pG5Luc vektor som CYP3A1, CYP3A3, DR1 og DR3 responselementa vart forsøkt ligert saman med.

3.2.5 Kutting av pGL4.74 med restriksjonsenzym

pGL4.74 har ein HSV-TK promotor som delvis vart erstatta med ERE-responselementet. Den basale promotoren vart ikkje kutta ut av vektor. Dette vart gjort ved å kutte 35 µg vektor med 5 µl (60 einingar) EcoR1 og 5 µl (50 einingar) Acc651, 10 µl 1xMulticore buffer i totalt 100 µl kutteløysing. Kutting skjedde ved 37 °C over natt. Deretter vart enzymba varmeinaktivert ved 65 °C i 20 minutt.

Ein kontroll på om kuttereaksjonen var utført som ved kutting av pG5Luc (kapittel 3.2.4).

For å fjerne fragmentet som var kutta ut vart det utført reinsing av vektor (fig.11) slik som i kapittel 3.2.2. Kutting av vektor danna 3' og 5' overheng, og for å danne butt ende vart det tilsett 1 eining Large Klenow fragment pr µg DNA og 100 µM dNTP som i kapittel 3.2.4



Figur 11. Figuren viser ekspresjonsvektor pGL 4.74 som vart brukt til å klonare østrogen responselementet, ERE-Ren-Luc

3.2.6 Defosforylering av vektor

For å hindre at vektor religerer og for å auke talet på positive klonar måtte 5`enden på vektor defosforylerast. Det vart forsøkt defosforylering med alkalisk rekefosfatase, SAP og alkalisk kalvetarm fosfatase, CIAP. Ved defosforylering med SAP (1 u/μl) vart det tilsett 1 μl av SAP til 20 μl kuttemiks og inkubert ved 37°C i 30 minutt. Deretter vart SAP inaktivert ved 65 °C i 15 minutt. Ved defosforylering med CIAP vart det tilsett 0,01 u/pmol DNA endar. Formel 2 vart brukt for utrekning av mengd CIAP til DNA mengd. Reaksjonen vart inkubert i 15 min ved 37 °C og deretter vart CIAP inaktivert i 15 minutt ved 50 °C.

$$\text{Formel 2: } \frac{2 \times 10^6 \text{ pg} * \mu\text{g dsDNA} * \text{pmol}}{N \text{ bp} * 660 \text{ pg} * 1 \mu\text{g}} = \text{pmol ender}$$

3.2.7 DNA ekstrahering med fenol/kloroform og etanol felling.

For å fjerne fosfatase vart det utført fenol/kloroform ekstrahering ved å tilsette 1:1 av fenol:kloroform:isoamylalkohol (forhold 25:25:21) til prøven. Dette vart blanda saman ved å pipettere prøven. Deretter vart prøven sentrifugert ved 4°C i 10 minutt. Vassfasen vart overført til eit nytt eppendorfrør. Den resterande organiske fasen vart tilsatt 100 μl ddH₂O, blanda saman og sentrifugert på nytt i 10 minutt ved 4°C. Vassfasen i dette røret vart overført til den førre vassfasen. Protein vil då vere i den organiske fasen medan DNA vil vere i vassfasen. Deretter vart det utført etanolfelling for å konsentrere DNA ved å tilsette 0,1 x prøvevolumet av 3 M NaAc pH 5,2 og 2x prøvevolumet av 96 % EtOH. DNA vart felt ut ved -20 °C for 30-60 minutt. DNA prøven vart sentrifugert ved 13000 rpm ved romtemperatur i 15 minutt. Pellet vart vaska med 500 μl iskald 75 % EtOH og deretter sentrifugert ved 13000 rpm ved romtemperatur i 10 minutt. Pellet vart tørka i avtrekk og deretter løyst i 30 μl TE-tynn buffer og konsentrasjonen vart bestemt ved gelelektroforese (metode 3.2.3).

3.2.8 Ligering av vektor og fragment

Ved ligering av butt ende er det vanlig å bruke 1:3-5 forhold av vektor:fragment. Det vart brukt mellom 200-500 ng vektor. Ved utrekning av mengd innsett fragment vart formel 3 brukt. Formelen viser utrekning av mengd ng fragment som vert brukt i ligerings-reaksjonen.

Det vart tilsatt 1 µl (350 u) T4 DNA ligase til 20 µl ligeringsmiks. Ligeringsvart utført ved romtemperatur i 16-18 timar.

$$\text{Formel 3: } \frac{\text{ant. ng vektor} * \text{ant. bp innsett fragment} * 3}{\text{ant. bp vektor}} = \text{ant. ng fragment}$$

3.2.9 Transformering av DNA ved elektroporering

For å undersøke om ligering av fragment og vektor var vellukka vart plasmidet transfektert inn i XL1 Blue E-coli celler. Dette vart gjort ved elektroporering. Først vart 40 µl elektrokompetente XL1Blue celler tint på is. 1 µl av ligeringsløyning vart tilsatt cellene, blanda saman og inkubert på is i 1 minutt. Løysinga vart overført til passende kyvette (2 mm elektrodegap) for elektroporering. Det vart brukt 200 Ohm motstand, 25 mF kapasitet og 2,5 kV puls. Straks etter elektropuls-eksponering av vart cellene tilsatt 1 ml SOC medium og deretter overført til eit eppendorfrør. Miksen vart riste inkubert ved 250 rpm ved 37°C i 1 time. Deretter vart 100 µl cellekultur sådd ut på agar skåler tilsatt 100 µg ampicillin. Resten av cellekulturen vart sentrifugert i 1 minutt og pellet resuspendert i 100 µl cellekulturmedium og sådd ut på agar skål som tidligare. Skålene vart inkubert ved 37 °C i 16-18 timar.

3.2.10 Kolonisjekk ved PCR og småskalareinsing (miniprepping) av DNA

Transformantar vart undersøkt for korrekt innsett fragment ved PCR. 5µl 5xGoTag buffer vart tilsatt ein løysing av 1,5 µl MgCl₂, 1 µl 2,5 mM dNTP, 1 µl av framover og revers primer, 1 µl Taq.polymerase og 15,4 µl ddH₂O. Deretter vart koloniar som var ønskelig å sjekke for korrekt innsett fragment overført frå agarskål til PCR-rør ved å bruke ein pipettespiss. PCR syklusen var 94°C/5minutt – 25 x(94°C/30 sekund - 55°C/30 sekund – 72°C/30 sekund) – 72°C/5 minutt – 4°C/∞. Deretter vart 2 µl PCR produkt overført til ein 1% agarosegel. Plasmid som gav antatt korrekte PCR produkt vart småskalareinsa (miniprepp). Dette vart utført ved å overføre den ønska kolonien til eit 30 ml rør med 5 ml Luria Bertani(LB) – medium med 50 µg/ml Ampicillin og risteinkubere ved 250 rpm ved 37°C i 8-15 timar. 2x 750 µl cellekultur vart reinsa ved å bruke Wisard Plus Minipreps DNA purification system frå Promega. Etter reinsing vart blandinga kutta med restriksjonsenzym for å kunne bekrefte eller avkrefte om vektor hadde innsett fragment og deretter analysert på agarosegel slik som skildra i kapittel 3.2.4 og 3.2.5.

3.2.11 Sekvensering av antatt korrekte klonar

Sekvensering av plasmid frå antatt korrekte klonar vart utført ved PCR. Sekvenseringsløyning vart laga ved å tilsette 3,2 µl 1,0 µM framover og 1,0 µM revers primer til 2 µl DNA løysing, 1 µl sekvenseringsbuffer og 1,0 µl Big Dye, totalt volum 10 µl. PCR syklus var 96°C/5 minutt – 25 x (96°C/10 sekund - 50°C/5 sekund – 60°C/4 minutt) – 4°C/∞. Reaksjonsløyning vart lagra ved -20°C og sekvensering utført ved Universitetet i Bergen, Sequencing Facility, Høgteknologissenteret, på Seq ABI 377 ABI PRISM DNA sekvensmaskin. Sekvensresultatet vart analysert i forhold til oligonukleotidsekvens og vektor.

3.2.12 Storskala reinsing av plasmid DNA (maksiprep)

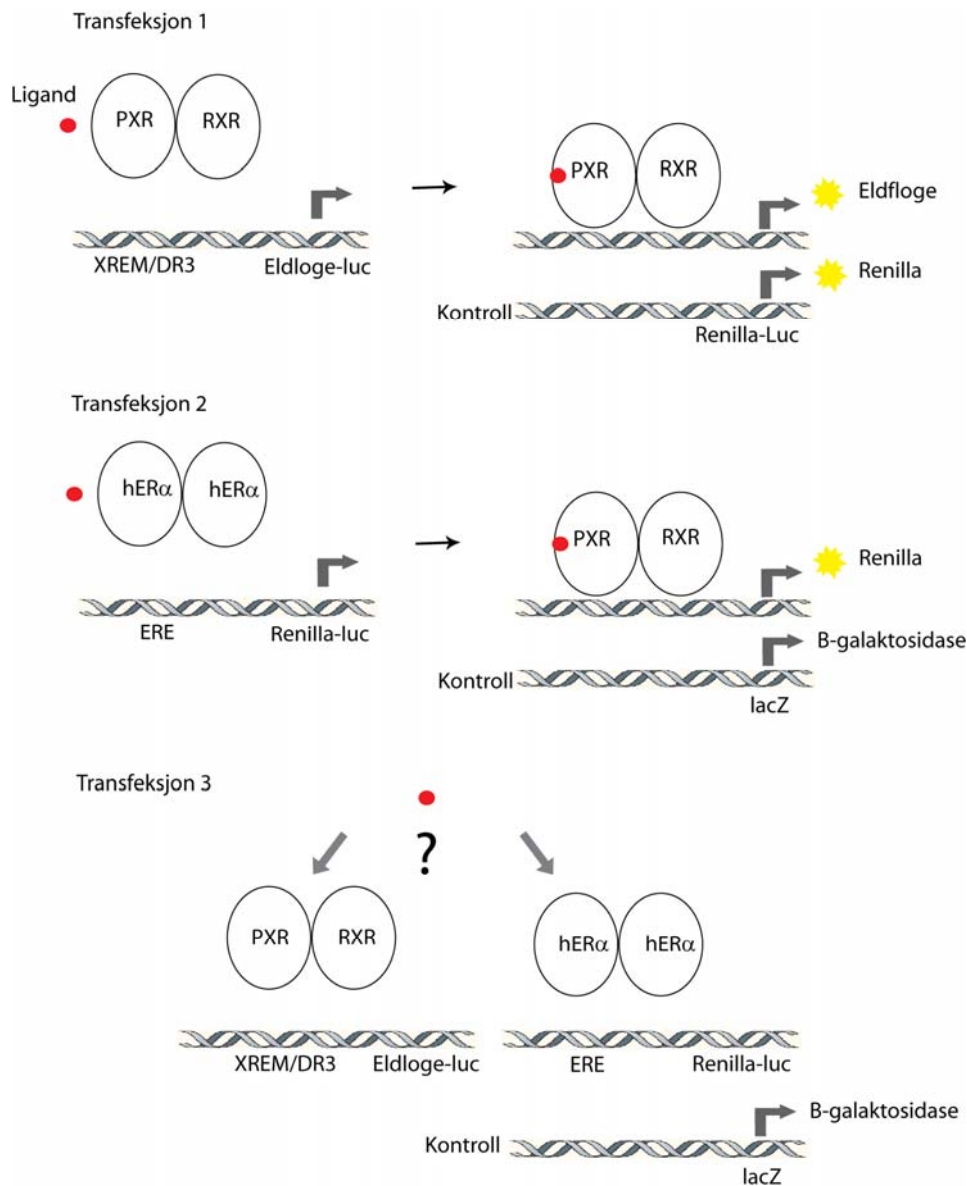
Plasmid med korrekt innsett fragment vart reinsa i storskala for å kunne oppnå brukbar konsentrasjon til transfeksjonsforsøk. Dette vart utført ved å plukke bakteriekolonien med korrekt fragment og dyrke bakteriekultur i 50 ml LB – medium som skildra i kapittel 3.2.10. Deretter vart 200 µl av denne bakteriekulturen dyrka i 200 ml LB – medium med 200 µl 100 mg/ml Ampicillin i 1 liters kolbe i 12-18 timar. Deretter vart det utført reinsing av DNA ved å bruke protokoll for Qiagen Plasmid Maxi kit.

3.3 Luciferase reporter assay

Vidare skulle reporter-konstrukt testast for ligandaktivering saman med høvesvis hPXR og hERα. I forsøket vart det brukt COS-1 celler som vart transient transfektert med FUGENE® 6 transfeksjonsreagens. hPXR og hERα ekspresjonsplasmid vart først transfektert kvar for seg og deretter i same transfeksjonssystem. Det vart brukt 24- og 96-brønns Brett til transfeksjonane. Aktivering kunne studerast på eit luminometer ved å måle Eldfloge-luciferase aktivitet. Denne aktiviteten vart deretter normalisert i høve til renilla-luciferase aktivitet eller β-galaktosidase aktivitet.

DUAL-Luciferase reporter systemet var egna til å studere eit ekspresjonsplasmid og aktivering av eit reporterplasmid. I oppgåva var det ønskjeleg å studere to ekspresjonsplasmid og aktivering av to ulike reporterplasmid i same transfeksjon. Teknologien i DUAL-luciferase reportersystemet kunne modifiserast for å få til dette. Prinsippet bak denne teknologien er at ein vektor med det eksperimentelle reporterogenet vert kotransfekttert med ein Eldfloge-luciferase reporter samt ein renilla-luciferase reporter som fungerer som transfeksjonskontroll.

Renilla-luciferase reporter har ein sterk basal promotor (CMV) som vert konstitutivt aktivert uavhengig av varierende forsøksforhold som variasjonar i celledetal, celledivitalitet, samt transfeksjonseffektivitet og lysing. Eldflogeluciferase aktivitet vert difor normalisert ut frå aktiviteten til renilla-luciferase (Sherf *et al.* 1996). Det var ønskeleg å utnytte denne teknologien til å kunne studere to ulike reseptorar (hER α og hPXR) ved å subklone responselementa for dei to ekspresjonsplasmida som det var ønskeleg å studere inn i høvesvis renilla-luciferase vektor og Eldflogeluciferase vektor. Ein tredje reportervektor vart då brukt som transfeksjonskontroll (β -galaktosidase). Figur 12 viser assaysystemet med tre ulike eksempel på transfeksjonsforsøk.



Figur 12. Luciferase systemet. I transfeksjon 1 vert PXR og RXR transfektert og eksponert for ligand. Heterodimeren vil binde til responseelementet (DR3 eller XREM). Dette vil føre til transkripsjon av Eldfloge-luciferase enzym som emitterar eit lyssignal som kan detekterast på eit luminometer. Renilla-luciferase vil bli transfektert med i systemet. Denne har ein sterk CMV promotor som er konstitutivt uttrykt og vert brukt til å normalisere for transfeksjonsvariasjonar. I transfeksjon 2 vil hER α bli transfektert og eksponert for ligand. hER α er ein kjernereseptor som bind som ein homodimer. Dette komplekset vil binde til responseelementet ERE og renilla-luciferase vert transkribert. renilla-luciferase enzymet emitterar også eit lyssignal som kan detekterast på eit luminometer. I dette tilfellet vil plasmidet som kodar for β -galaktosidase verte transfektert med hER α for å kunne måle transfeksjonsvariasjonar. I transfeksjon 3 vert PXR og hER α kotransfekttert og liganden kan potensielt binde både PXR og hER α . Det kan stadfestast kva for ein av reseptorane ligande har bunde til ved å lese av renilla og eldfloge-luciferase aktivitet på eit luminometer. B-galaktosidase vert brukt som transfeksjonskontroll.

3.3.1 Utsåing av celler i 96-brønnsbrett

200-500 μ l (5000- 20 000) COS-1 celler vart dagen før transfeksjon sådd ut i sterile NUNC cellebrett. Det vart brukt fenolrødtfritt DMEM medium for å unngå hormonhermande effekt av denne komponenten.

3.3.2 Transfeksjon av reporterplasmid og ekspresjonsplasmid

Transfeksjon av ekspresjonsplasmid og reporterplasmid vart utført 24 timar etter utsåing av celler. Dette vart gjort ved å bruke FUGENE[®] transfeksjonsreagens. Prinsippet er at FUGENE transfeksjonsreagens dannar eit kompleks med DNA som deretter vert tatt opp av cellene (Jacobsen *et al.* 2004).

Avhengig av storleiken og talet brønner som skulle tilsettast same transfeksjonsløyning vart det laga ei masterløyning med ønska plasmid i ønska konsentrasjon. Først vart x ant. μ l serumfritt og penicillin/streptomycinfritt DMEM medium overført til eit sterilt eppendorfrør. Mediet vart inkubert i 5 minutt med x ant. μ l FUGENE. Deretter vart dei ulike plasmida tilsett røret. Forholdet mellom reporterplasmid, ekspresjonsplasmid og kontrollreporterplasmid bør vere om lag 10:1:1 og det bør vere om lag like mykje DNA i kvar transfeksjonsløyning. Det vart derfor tilsett pCMV5- vektor som er eit tomt plasmid slik at det vart like mykje DNA i kvar transfeksjonsløyning. pCMV5- vart også brukt som ein kontroll for ligandaktivering utan ekspresjonsplasmid. Masterløyninga vart forsiktig blanda og deretter inkubert i 15 min før x ant. μ l av transfeksjonsløyninga vart tilsatt kvar brønn. Deretter vart cellene inkubert ved 37°C i 4 timar.

Tabell 20. Tabellen viser transfeksjonsforhold som vart brukt i forsøka.

	24-brønssbrett	96-brønnsbrett
Ant celler pr brønn	15 000-20 000	5 000-10 000
Volum medium i kvar brønn	500 μ l	200 μ l
Volum medium i transfeksjonsløyning (pr brønn)	~ 20 μ l	~ 5 μ l
Mengd reporterplasmid (kvar plasmid)	~ 200 ng	~ 100 ng
Mengd ekspresjonsplasmid (kvar plasmid)	~ 20 ng	~ 10 ng
Mengd kontroll plasmid	~20 ng	~ 10 ng
Totalt mengd DNA	0,2- 0,4 μ g	0,03 - 0,06 μ g
Volum FUGENE [®] 6 (pr brønn)	1,0 μ l	0,6 μ l

3.3.3 Eksponering av ligand

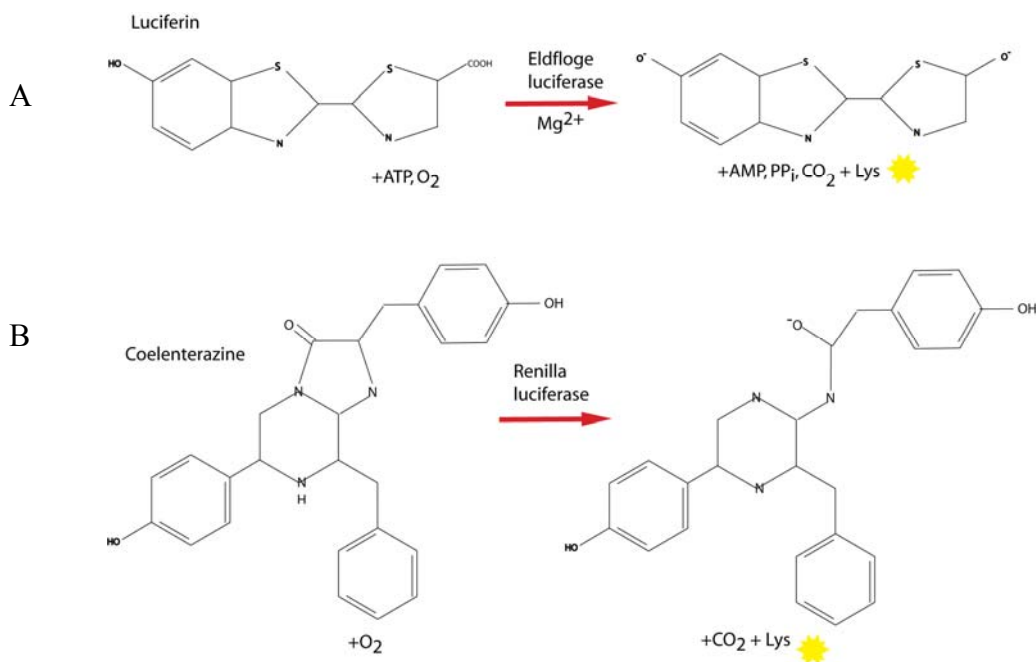
Eksponering av ligand vart utført 4 timar etter at cellene var transfektert. Cellene vart tilsett ulike fortynningsrekker av ligand. Ligandfortynningar vart laga til i fenolrødtfritt medium og 50-100 μl vart tilsatt kvar brønn. Det vart ikkje skifta medium før eksponering av ligand. Cellene vart vidare inkubert i 24 timar ved 37°C .

3.3.4 Lysering av cellene

24 timar etter at cellene var eksponert for ligand vart cellene lysert. Dette vart gjort ved å først vaske cellene med 100 μl 1x PBS og deretter tilsatt mellom 30-150 μl 1x passiv lysisbuffer frå DUAL - Luciferase™ Reporter Assay system kit (volumet lysis buffer tilsatt avheng om det vart brukt 24-brønnsbrett eller 96-brønnsbrett). Etter lysering vart cellene inkubert på vippe ved romtemperatur i 15 minutt. Dersom plasmidet som kodar for β -galaktosidase vart transfektert med måtte måling av luciferase aktivitet og β -galaktosidase aktivitet gjerast i separate alikvoter høvesvis 30-70 μl og 75 μl .

3.3.5 Måling av eldfloge- og renilla-luciferase aktivitet

For å måle aktiviteten til kvart plasmid måtte ein kunne skilje mellom aktiviteten dei hadde etter eksponering for ligand. DUAL – Luciferase™ reporter assayet gjorde dette mogeleg.



Figur 13. A viser eldfloge-luciferase enzymet som er avhengig av ATP, Mg^{2+} og O_2 for å kunne oksidere substratet eldfloge luciferin og deretter danne eit lyssignal. B viser renilla-luciferase enzymet som krev coelenterazine som substrat ved danning av lyssignal (figur er omteikna frå fig.1 i Sherf *et al.* 1996) .

Etter at cellene var lysert vart 30-50 μl lysat overført til tette 96-brønnsbrett for avlesing av luciferase aktivitet på eit Luminometer. Luciferase assay-løysing og Stop and Glo-løysing vart laga til rett før bruk ved å tilsette luciferasebuffer til luciferase substrat og Stop and Glo substrat til Stop and Glo buffer. Luciferase assay inneheld ulike komponentar, blant anna ATP, Mg^{2+} og luciferin. Luciferin er substrat for Eldfloge-luciferase for å danne eit lyssignal. Stop and Glo inneheld coelenterazine som er substrat for renilla- luciferase enzym og nødvendig for danning av lyssignal. Til kvar brønn vart det tilsatt 100 μl Luciferase Assay og på eit luminometer vart eldfloge-luciferase aktivitet lest av. Deretter vart 100 μl Stop and Glo tilsatt kvar brønn for å stoppe eldfloge-luciferase aktivitet, og renilla-luciferase aktivitet vart målt.

3.3.6 Måling av β -galaktosidase aktivitet

75 μl lysat vart overført til klare 96-brønnsbrett og tilsatt 150 μl baseløysing (sjå materialkapittel tabell 2.16). Baseløysinga var tilsatt 3,5 μl β -merkapttoetanol pr ml baseløysing og 0,00025 g ONPG pr ml baseløysing. Deretter vart brettet inkubert ved 37 °C i 15-45 minutt. Det var viktig å følgje med brettet undervegs. Reaksjonen var ferdig når løysinga i brønnane var begynt å bli gule. Reaksjonen vart stoppa ved å tilsette 50 μl 1 M Na_2CO_3 . Enzymet B-galaktosidase katalyserer hydrolysen av ONPG og frigjer o-nitrofenol som absorberer lys ved 420 nm. Aktiviteten til β -galaktosidase vart målt på eit spektrofotometer ved å måle absorbansen til o-nitrofenol.

3.4 SDS polyakrylamid gelelektroforese (SDS-Page) og Western blot analyse

Det var viktig å stadfeste at det faktisk var spesifikke protein (hPXR og hER α) i kvar prøve. Dette vart gjort ved å skilje proteina gelelektroforetisk på ein SDS-polyakrylamid gel som skildra av Laemmli (Laemmli 1970). Denne metoden kan skilje protein basert på storleik. SDS vil bryte ned sekundær- og tertiær struktur i protein og gjer at proteina vert negativt lada. Disulfidbruer vert ikkje øydelagde av SDS, men ved å koke prøven i nærver av β -mercaptoetanol så vil desse bindingane også verte øydelagde. Etter dette vil protein som er satt på polyakrylamidgel vandre gjennom gelen som følgje av elektrisk spenning. Protein-storleiken vart bestemt ved å samanlikne med molekylvektstandard.

Utstyret vart montert etter Bio-Rad sin prosedyre. Først vart ein 9 % separasjonsgel laga. Denne skulle stå i 1 time for polymerisering. Deretter vart ein 4 % konsentrerende gel laga og tilsatt over separasjonsgelen. Tilslutt vart kammane satt i og dette systemet skulle stå i 45-60

minutt for polymerisering. 15 µl prøve (5-10 µg) vart tilsatt dH₂O for å få rett konsentrasjon på prøvevolumet og deretter vart prøvevolumet fortynna 1:1 med 2 X prøvebuffer. Mengd prøve som skulle tilsettast vart rekna ut etter formel 4. Prøven vart kokt ved 95 °C i 3-4 minutt for denaturering av proteina. Prøven vart spunne ned forsiktig. Gelen vart påført kjøyrebuffer og 15 µl prøve vart satt på gel. Straumforsyninga vart satt til 100 V per gel og tida var ca 45 minutt.

Formel 4:
$$\frac{10\mu\text{g} * 100\mu\text{l}}{Y * 15\mu\text{l}} = x \qquad Y = \text{mg protein/ml}$$

Westernblotting gjer det mogleg å sjå spesifikke protein i bandet som ein observerar på akrylamidgelen. Proteina vert detektert ved å bruke antistoff som bind aminosyresekvensar i det spesifikke proteinet ein er ute etter. Proteina vert overført til ein membran av til dømes nitrocellulose ved å påføre gelen elektrisk spenning.

Først vart gelen vaska i blottebuffer i om lag 10 minutt. Akrylamidgel (nedst) og nitrocellulosemembran (øvt) vart lagt i midten av ein sandwich i ein blottekassett saman med filterpapir, blottesvamp (over og under akrylamidgel og nitrocellulosemembran) Anode og katode var høvesvis øvt og nedst. Det vart påført 1 X blottebuffer og satt på 100 V i 45 minutt. Nitrocellulosemembranen vart overført til eit passende kar og vaska med TTBS i 5 minutt og deretter blokkert med 5 % tørrmjølk i 45 minutt og tilslutt vaska 2 X med TTBS i 5 minutt. TTBS vart fjerna før primærantistoff (fortynna i 3 % tørrmjølk) vart tilsatt membranen. Det vart brukt 3 ml løysing med primærantistoff og membranen vart inkubert i ein 3x7 cm zip-lock pose på vippe i 16-18 timar. Deretter vart membranblottet vaska 2 X med TTBS i 5 minutt, og deretter vart denne fjerna. Geit-antimus IgG sekundærantistoff (fortynna i 3 % tørrmjølk) vart tilsatt blottet og inkubert i minst 3 timar ved romtemperatur. Deretter vart membranblottet vaska 2 X med TTBS i 5 minutt og deretter ein gong med dH₂O.

Framkalling av membranblottet kan utførast på to måtar. ECL er den mest sensitive framkallingsmetoden, men ein risikerar bakgrunnsstøy. Ved å nytte Opti-4CN framkalling vert bakgrunnstøy redusert, men denne metoden er mindre sensitiv enn ECL. Etter framkalling med ECL kan blottet framleis brukast til Opti-4CN framkalling etter at membranblottet er vaska.

Ved ECL vart membranen inkubert i 5 minutt i romtemperert ECL-løysingar (sjå protokoll frå leverandør GE Healthcare UK Limited), og deretter vart membranblottet framkalla på Hyperfilm ECL på Optimax framkallingsmaskin frå Protec processor technology.

3.5 Statistisk analyse

Resultata vart behandla i excel. Ein t-test vart gjort for å bestemme om det er ein signifikant forskjell mellom gjennomsnitt av aktivering av kontroll og gjennomsnitt av aktivering av ekspresjonsplasmid. Det vart satt opp ein nullhypotese H_0 , som seier at gjennomsnittet til dei to datasetta er like (altså ingen forskjell mellom gjennomsnittet til aktivering av kontroll (μ_1) og aktivering av ekspresjonsplasmid (μ_2)):

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

Denne nullhypotesen vart testa i ein t-test. T-testen gjev ein p-verdi. Denne p-verdien er sannsynet for at forskjellen mellom dei to datasetta skuldast tilfeldigheter dersom nullhypotesen er sann. Når ein skal ta stilling til om ein hypotese kan forkastast eller ikkje må ein velje eit nivå for kor stor forkastingsfeil ein kan godta. I denne oppgåva vart 5 % signifikansnivå valt ($\alpha=0,05$), altså dersom H_0 er riktig godtar vi at det er 5 % sjanse for at vi gjer ein forkastingsfeil. Dersom $p < \alpha$ vert H_0 forkasta og det er sannsynleg at det er ein forskjell mellom datasetta til dei to gruppene som vi ønskjer å studere, og at denne forskjellen ikkje er tilfeldig. Ein seier at resultatet er statistisk signifikant.

4. Resultat

4.1 Subkloning av reporterkonstrukt

Eit av måla med oppgåva var å klone ulike PXR responselement og ER α responselementet, ERE, inn i to ulike Luciferase reporter vektorar, høvesvis pG5luc (eldfloge-luciferase) og pGL4.74 (renilla-luciferase). Sjå kapittel 3.2 for detaljert skildring av metoden. Dette var ønskjeleg for å kunne studere ligandaktivering av kjernereseptor hER α og hPXR i transfeksjonsforsøk kvar for seg, samt i eit kotransfeksjonssystem.

Dei var ønskjeleg å subklone ulike hPXR responselement over i eldfloge-luciferase vektor. Responselementa var CYP3A1, CYP3A3, DR1 og DR3. Når hPXR bind til eit responselement vert DNA polymerase rekruttert og gen for eldfloge-luciferase enzym vert transkribert. For ER α var det ønskjeleg å subklone ER responselementet, ERE, over i Renilla-luciferase vektor. Ved hER α binding til ERE vil gen for renilla-luciferase enzym verte transkribert. Ved å få ei celle til å uttrykke desse to kjernereseptorane kunne ein studere ligandaktivering av hER α og hPXR ved ulike ligandkonsentrasjonar og ulike konsentrasjonar av ekspresjonsplasmid.

Av dei ulike responselementa som det var ønskjeleg å danne lukkast det tilslutt å få klona DR3 (direkte repetert sekvens) inn i pG5Luc vektor. Sekvensanalyse viste at det innsette fragmentet i vektoren hadde 3 x sekvensen CCAGGTCAGACAGGTCAGCAG (rødt viser sekvensen som PXR kan binde til avskilt av tre nukleotider, DR3. Appendiks 1 figur 28 viser sekvensanalysen). For å kunne gjere ligandaktiveringsstudiar med hPXR vart det gjort transfeksjonsforsøk med DR3 - reporter for å stadfeste om den kunne aktiverast av hPXR. Det lukkast ikkje å subklone andre responselement inn i pG5Luc vektoren (CYP3A1, CYP3A3 eller DR1) trass gjentatte forsøk.

ERE-Luc reporter eksisterte allereie og viste gode resultat i transfeksjonsforsøk. Men denne stod i eldfloge-luciferase vektor, pG5Luc. For å kunne ha reporter for hPXR og hER α i to ulike vektorar vart det derfor forsøkt å subklone ERE inn i renilla-luciferase vektor, pGL4.74. Sekvensanalyse viste at ERE-responselementet var klona inn i Renilla-luciferase vektor med 2 x sekvensen CCAGGTCAGAGTGACCTGGCA (rødt viser ERE responselementet,

appendiks 1 figur 28 viser sekvensen). For å stadfeste om ERE-renilla-luciferase reporter kunne aktiverast av hER α vart det gjort transfeksjonsforsøk med denne reporteren.

4.2 Etablering av transfeksjonsassayet

For å kunne gjere eksponeringsforsøk med ulike ligandar måtte transfeksjonsassay- metoden etablerast og dei ulike reporterplasmida måtte vise signifikant aktivitet i transfeksjonsforsøk. Det vart utført transfeksjonar i 24-brønnsbrett og 96-brønnsbrett med ulike konsentrasjonar av ligand.

Transfeksjon vart gjennomført ved å første dag så ut COS-1 celler i eit bestemt volum DMEM i kvar brønn. Dag 2 vart cellene transfektert med ekspresjonsplasmid og reporterplasmid ved å bruke Fugene[®] 6 transfeksjonsreagens. Etter 4 timar vart cellene eksponert for ligand og vidare inkubert i 24 timar. Deretter vart cellene lysert og luciferase aktivitet målt.

Det vart gjennomført fleire transfeksjonsforsøk der målet var å finne optimale transfeksjonsparametere. Til dømes var det viktig å finne ut kor mykje ekspresjonsplasmid og reporterplasmid som gav best transfeksjonsresultat, samt bestemme om det var nødvendig å transfektere RXR. Forsøk for å stadfeste om RXR var nødvendig for å vise luciferase aktivitet i transfeksjonsforsøk vart gjennomført, men resultatane gav ikkje noko tydeleg svar på dette (data er ikkje vist). Truleg var dette på grunn av at 96-brønnsbrett som var tilgjengeleg for transfeksjon på dette tidspunktet ikkje var av nyare dato. Det vart i forsøk valt å transfektere RXR saman med hPXR, bortsett frå i transfeksjonsforsøk der hPXR og hER α vart kotransfekttert.

4.2.1 Transfeksjon av hPXR* og hRXR med DR3-E-luc reporter

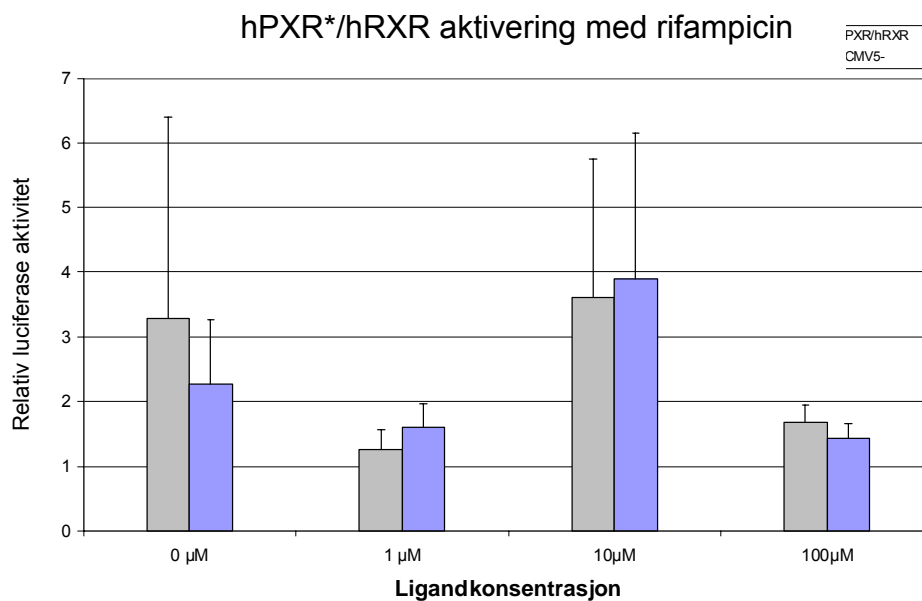
Den klona DR3 eldfloge-luciferase (DR3-E-luc) reporteren vart testa ut i transfeksjonsforsøk for å stadfeste om den kunne binde hPXR* og vidare aktivere transkripsjon av eldfloge-luciferase. Transfeksjonsforsøk vart gjennomført i COS-1 celler i 96-brønnsbrett og eksponert for kjente ligandar for hPXR* (sjå kapittel 3.3 for detaljert metode skildring).

hPXR* og hRXR var ei gåve frå Hormonlaboratoriet ved Haukeland Universitetssykehus. Fordi PXR virkar som ein heterodimer med RXR vart hRXR transfekttert saman med hPXR*. Rifampicin og pregnenolon 16 α -carbonitrile, PCN, vart brukt som ligand. Rifampicin er kjent

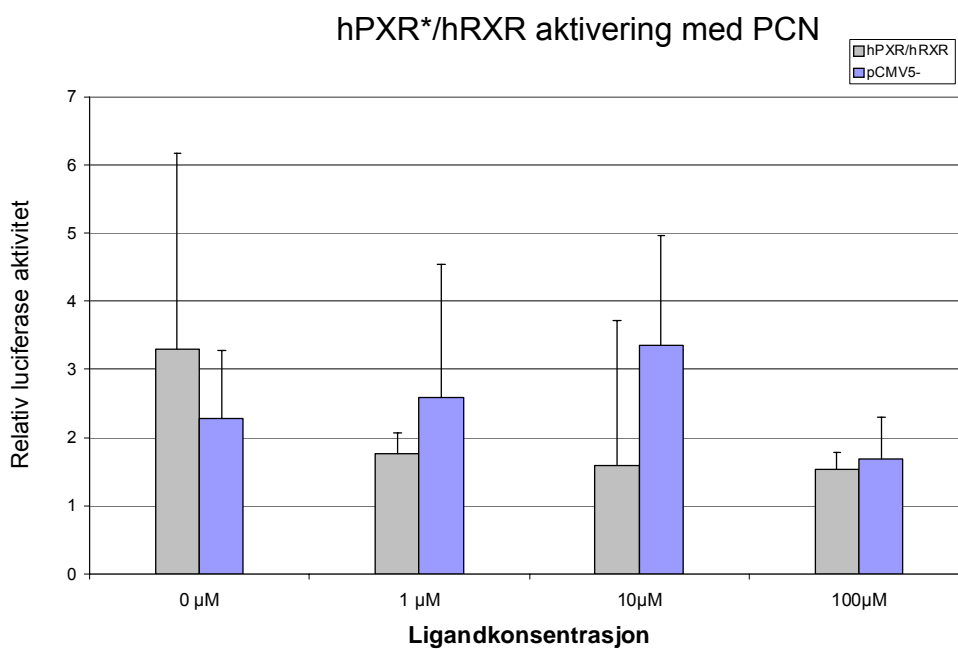
som ligand for hPXR og skulle dermed binde den og vidare indusere transkripsjon av eldfloge-luciferase (Blumberg *et al.* 1998b). PCN er kjent som ligand for muse PXR og er ein dårlig ligand for hPXR (Lehmann *et al.* 1998; Blumberg *et al.* 1998b; Jones *et al.* 2000).

I forsøket vart COS-1 celler transfektert med hPXR* og DR3-R-Luc reporter i 96-brønnsbrett. Renilla-Luc (pGL4.74) vart transfektert for å normalisere for transfeksjonsvariasjonar. Etter 4 timar vart cellene eksponert for ulike ligandkonsentrasjonar av rifampicin og PCN, og deretter inkubert i 24 timar før avlesing av luciferase aktivitet (sjå kapittel 3.3 for detaljert skildring av metoden). I transfeksjonsforsøk viste resultatet ingen signifikant aktivering av hPXR* med DR3-E-luc som reporter. Dersom DR3-E-luc reporter hadde fungert, skulle rifampicin eksponering gjeve auka luciferase aktivitet i forhold til kontroll. I dette forsøket viser kontroll signalet 0 μ M ligand (DMSO) om lag like verdiar som for dei ulike ligandkonsentrasjonane. Også standardavvik på triplikatane er store (fig. 14A). Ved PCN eksponering ser ein ikkje endra aktivering av hPXR* i forhold til eksponering for rifampicin (fig. 14B). Forsøket vart gjentatt ein gong med same resultat. Dette kan tyde på at DR3-E-Luc reporter ikkje verkar i transfeksjon med hPXR*.

A



B



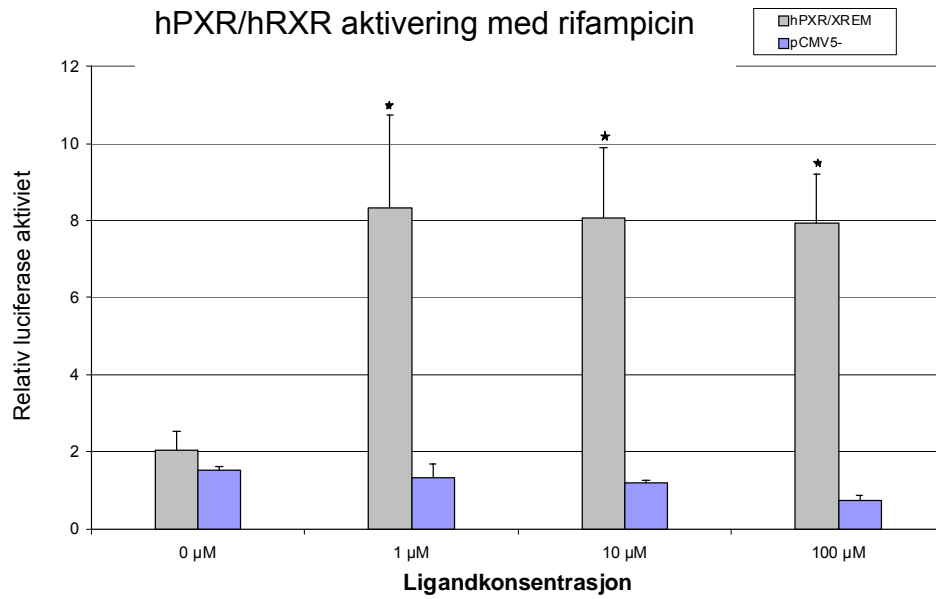
Figur 14. Transfeksjon av hPXR* og DR3-E-luc reporter og eksponering for rifampicin og PCN (0 μ M er tilsatt DMSO). COS-1 celler er transfektert med 20 ng hPXR-plasmid og 20 ng hRXR-plasmid i 96-brønnsbrett. Resultata er presentert som snitt av tre replikat (n=3) \pm SD. Blå søyler viser pCMV5-aktivering (kontroll) og grå søyle viser hPXR aktivering. A viser relativ luciferase aktivitet ved eksponering med ulike ligandkonsentrasjonar av rifampicin. Resultatet viser at rifampicin ikkje aktiverar hPXR* med DR3-E-Luc som reporter. B viser relativ luciferase aktivitet med eksponering med PCN. Resultatet viser at det ikkje er nokon signifikant dose-respons effekt av PCN med DR3-Eldfloge-Luciferase som reporter. Forsøket vart gjentatt ein gong med same resultat.

4.2.2 Transfeksjon av hPXR og hRXR med XREM-luc reporter

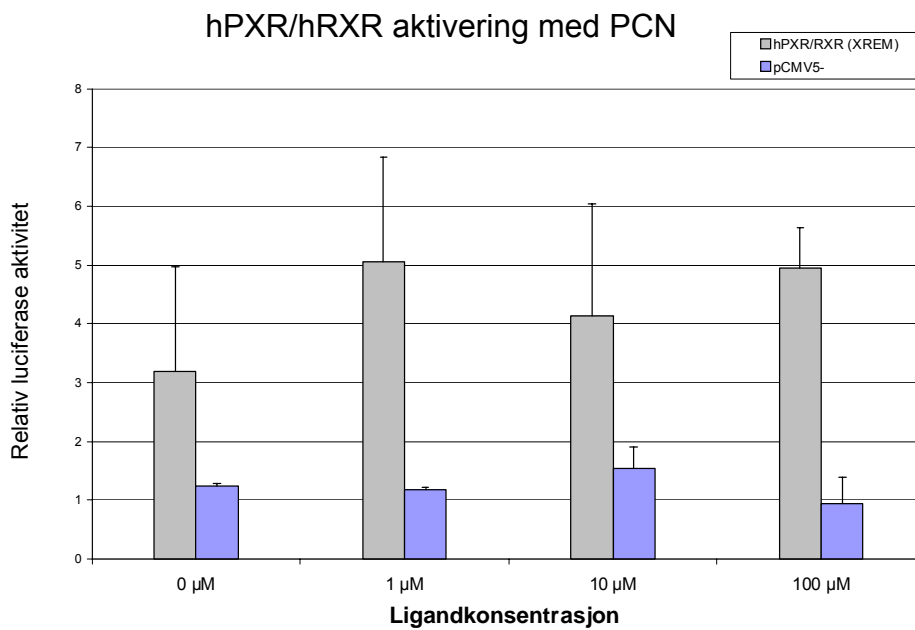
For å kunne gå vidare med ligandaktiveringsstudiar var det avgjerande for oppgåva å ha ein luciferase reporter som viste aktivitet i transfeksjonsforsøk. Ekspresjonsplasmidet hPXR og reporterplasmidet XREM-Luc var ei gåve frå professor Bruce Blumberg si gruppe ved Department of Developmental and Cell Biology, University of California, Irvine, USA. XREM vart i 1999 identifisert som ein regulator region av *CYP3A4* og vert aktivert av rifampicin og andre xenobiotiske sambindingar som bind human PXR (Goodwin *et al.* 1999).

I forsøket vart COS-1 celler transfektert med hPXR, RXR og XREM-Luc i 96-brønnsbrett. Renilla-Luc (pGL4.74) vart transfektert med for å normalisere for transfeksjonsvariasjonar. Etter 4 timar vart cellene eksponert for ligandane rifampicin og PCN, og deretter inkubert i 24 timar før avlesing av luciferase aktivitet (sjå kapittel 3.3 for detaljert skildring av metoden). Resultata frå transfeksjonsforsøket viser at rifampicin aktiverar hPXR og fører til transkripsjon av eldfloge-luciferase med XREM-Luc reporter. Resultatet viser at ligandkonsentrasjonane 1 μ M og 100 μ M gjev om lag lik aktivitet (fig. 15). Dette kan tyde på at systemet har nådd eit mettingspunkt. Resultatet i figur 15 B viser at PCN aktiverar hPXR i mindre grad. Dette forsøket vart gjentatt ein gong med same resultat. Resultatet er signifikant og viser som venta at rifampicin bind hPXR og aktiverar transkripsjon av eldfloge-luciferase og at PCN bind hPXR i mindre grad.

A



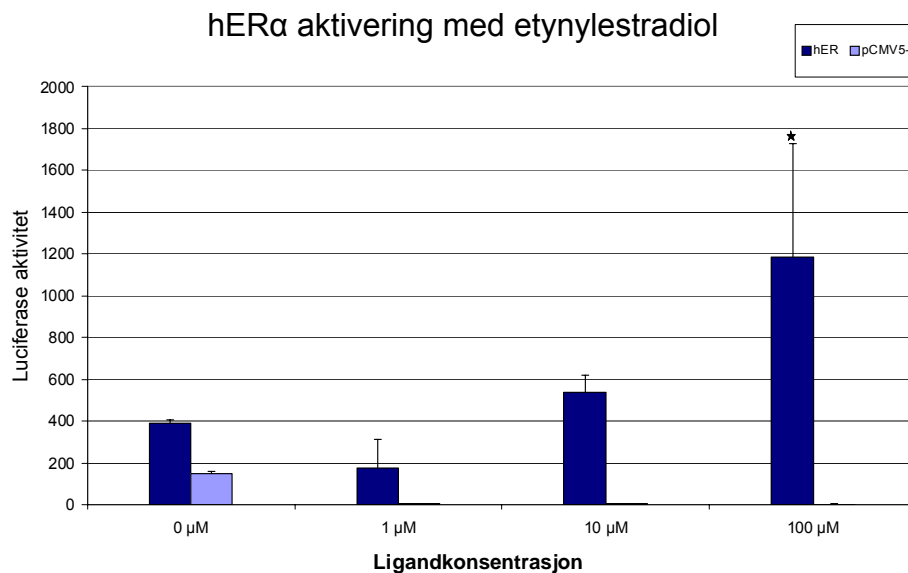
B



Figur 15. Transfeksjon av hPXR og XREM luc reporterer og eksponering for ulike ligandkonsentrasjonar av rifampicin og PCN (0 μM er tilsatt DMSO). COS-1 celler er transfektert med 10 ng hPXR-plasmid og 10 ng hRXR-plasmid i 96-brønnsbrett. Resultata er presentert som snitt av tre replikat ($n=3$) \pm SD. Blå søyle viser pCMV5-aktivering (kontroll) og grå søyle viser hPXR aktivering. A viser relativ luciferase aktivitet etter at hPXR er eksponert for rifampicin. Resultata viser at Rifampicin kan aktivere hPXR med XREM-Luc som reporter og at det er signifikant forskjell mellom ligandkonsentrasjonane. Dette tyder på at rifampicin kan aktivere hPXR og at systemet fungerer. B viser relativ luciferase aktivitet etter at hPXR er eksponert for PCN. Resultatet viser som venta at PCN ikkje aktiverar hPXR i nokon grad. Forsøket vart gjentatt ein gong med same resultat.

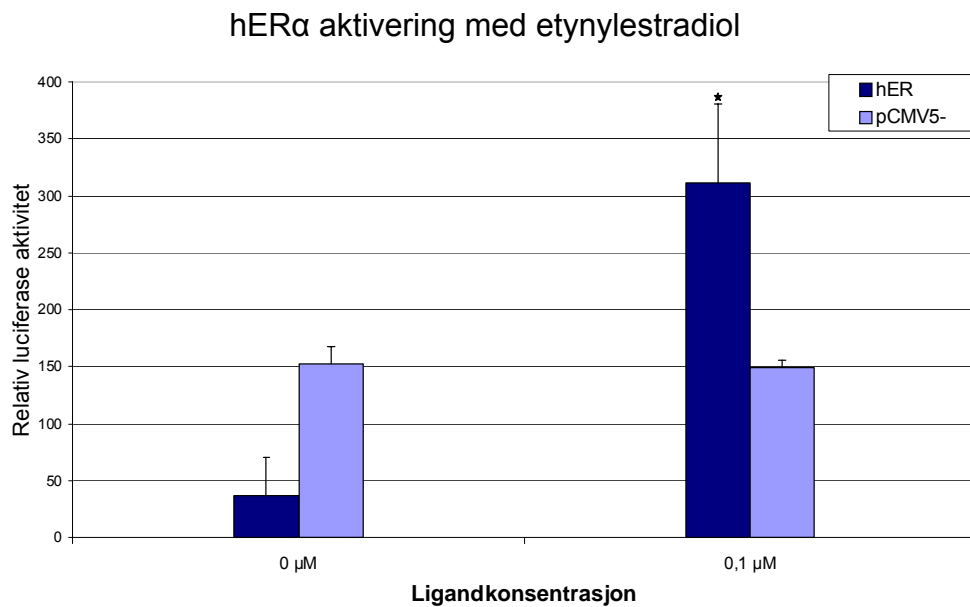
4.2.3 Transfeksjon av hER α og ERE-renilla-luciferase reporter

For å kunne undersøke ligandbinding til hER α og hPXR i same transfeksjonssystem måtte først aktiviteten til ERE-renilla-luciferase (ERE-R-Luc) som reporter stadfestast. I forsøket vart hER α og ERE-R-luc transfektert inn i COS-1 celler i 96-brønnsbrett og etter 4 timar vart cellene eksponert for tre fortyningar av etynylestradiol (EE₂), og deretter inkubert i 24 timar før avlesing av luciferase aktivitet. I første forsøk med hER α og ERE-R-Luc reporter (fig. 16) viser resultatet at hER α kan aktiverast av ulike ligandkonsentrasjonar av EE₂ (1 μ M, 10 μ M og 100 μ M) og indusere transkripsjon av renilla-luciferase. I dette forsøket er resultatata ikkje normalisert.



Figur 16. Transfeksjon av hER α og ERE-R-luc og eksponering for etynylestradiol, EE₂ (0 μ M er tilsatt DMSO). COS-1 celler er transfektert med 10 ng hER α -plasmid i 96-brønnsbrett. Resultata er presentert som snitt av tre replikat (n=3) \pm SD. Blå søyler viser pCMV5-aktivering (kontroll) og mørk blå søyle viser hER α aktivering. Resultatet viser luciferase aktivitet etter eksponering for ulike ligandkonsentrasjonar av EE₂ og viser at EE₂ kan binde hER α og vidare aktivere ERE-R-Luc reporter. Men det kan ikkje konkluderast at hER α vert aktivert av EE₂ på grunn av manglande transfeksjonskontroll.

I neste forsøk vart hER α og ERE-R-Luc transfektert inn i COS-1 celler i 24 brønnsbrett og etter 4 timar eksponert for 0,1 μ M EE₂. Deretter vart cellene inkubert i 24 timar før avlesing av luciferase aktivitet. I dette forsøket vart det og transfektert eit plasmid som kodar for β -galaktosidase saman med hER α og ERE-Renilla-Luc for å normalisere for transfeksjonsvariasjonar. Resultatet viser at hER α vert aktivert av 0,1 μ M EE₂ (fig. 17). Luciferase aktivitet er ikkje normalisert for transfeksjonsvariasjonar.

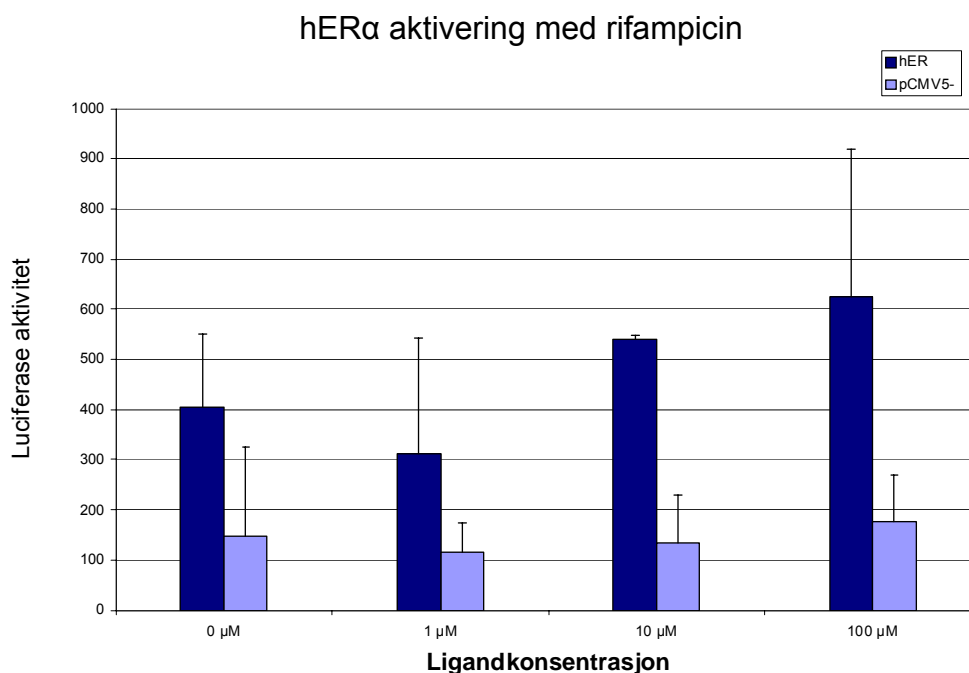


Figur 17. Transfeksjon av hER α og ERE-R-luc og eksponering for etynylestradiol, EE₂ (0 μ M er tilsatt DMSO). COS-1 celler er transfektert med 50 ng hER α -plasmid i 24-brønnsbrett. Resultata er presentert som snitt av tre replikat (n=3) \pm SD. Blå søyler viser pCMV5-aktivering (kontroll) og mørk blå søyle viser hER α aktivering. Figuren viser relativ luciferase aktivitet etter eksponering for EE₂. Resultatet viser at hER α vert aktivert av 0,1 μ M EE₂. Resultatet er signifikant og tyder på at ERE-renilla luciferase virkar som reporter. Relativ luciferase aktivitet er i dette forsøket normalisert ut frå β -galaktosidase aktivitet.

4.2.4. hER α aktivering med rifampicin og hPXR aktivering med etynylestradiol, EE₂

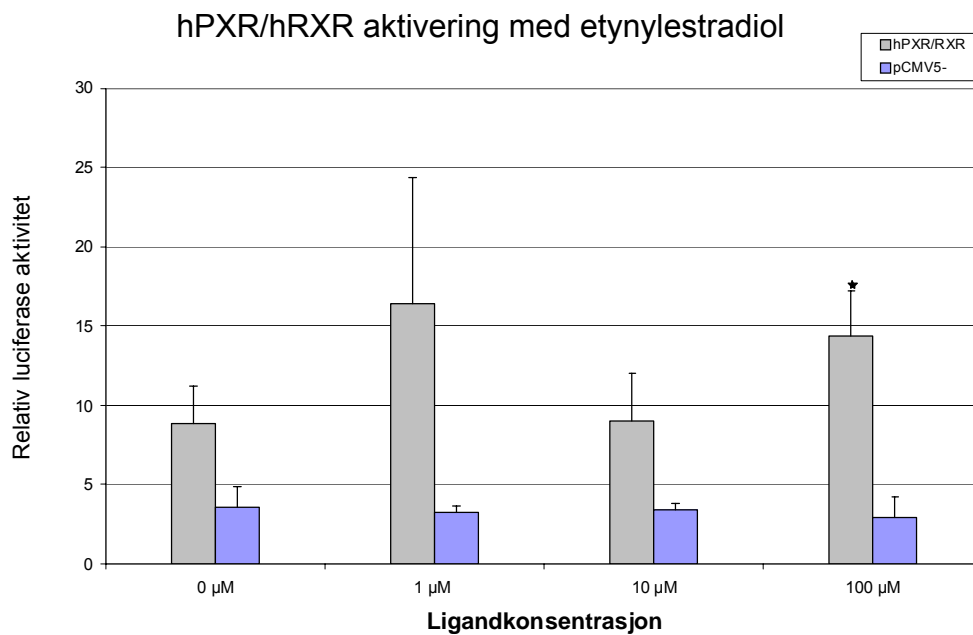
For å kunne undersøke ligandaktivering av hER α og hPXR i same system var det ønskeleg å undersøke kva effekt rifampicin har på hER α og kva effekt EE₂ har på hPXR. Medan effekten av rifampicin på hER α er noko uklar er det kjent frå studiar at EE₂ kan aktivere hPXR (Mnif *et al.* 2007).

I forsøket vart COS-1 celler transfektert med hER α og ERE-R-Luc og etter 4 timar eksponert for tre ligandkonsentrasjonar av rifampicin (1 μ M, 10 μ M og 100 μ M). Deretter vart cellene inkubert i 24 timar før avlesing av luciferase aktivitet. Resultata viser at rifampicin ikkje signifikant aktiverar hER α i nokon grad (fig. 18). Luciferase aktivitet er ikkje normalisert for transfeksjonsvariasjonar.



Figur 18. Transfeksjon av hER α og ERE-R-luc og eksponering for rifampicin (0 μ M er tilsatt DMSO). COS-1 celler er transfektert med 10 ng hER α -plasmid i 96-brønnsbrett. Resultata er presentert som snitt av tre replikat (n=3) \pm SD. Blå søyler viser pCMV5-aktivering (kontroll) og mørk blå søyle viser hER α aktivering. Figuren viser luciferase aktivitet etter eksponering for ulike ligandkonsentrasjonar av rifampicin. Resultatet viser at hER α ikkje vert aktivert av rifampicin.

I neste forsøk vart det undersøkt om etynylestradiol, EE₂, kunne aktivere hPXR. COS-1 celler vart transfektert med hPXR, hRXR og XREM-Luc. Renilla-Luc (pGL4.74) vart transfektert med for å normalisere for transfeksjonsvariasjonar. Etter 4 timar vart cellene eksponert for tre fortynningsrekker av EE₂ 1 µM, 10 µM og 100 µM, og deretter inkubert i 24 timar før avlesing av luciferase aktivitet. Resultatet viste ingen tydelig dose-respons effekt av EE₂, men ved 100 µM fortytning var resultatet signifikant forskjellig frå kontroll 0 µM (DMSO) (fig. 19). Dette resultatet tyder på at 100 µM etynylestradiol kan aktivere hPXR.

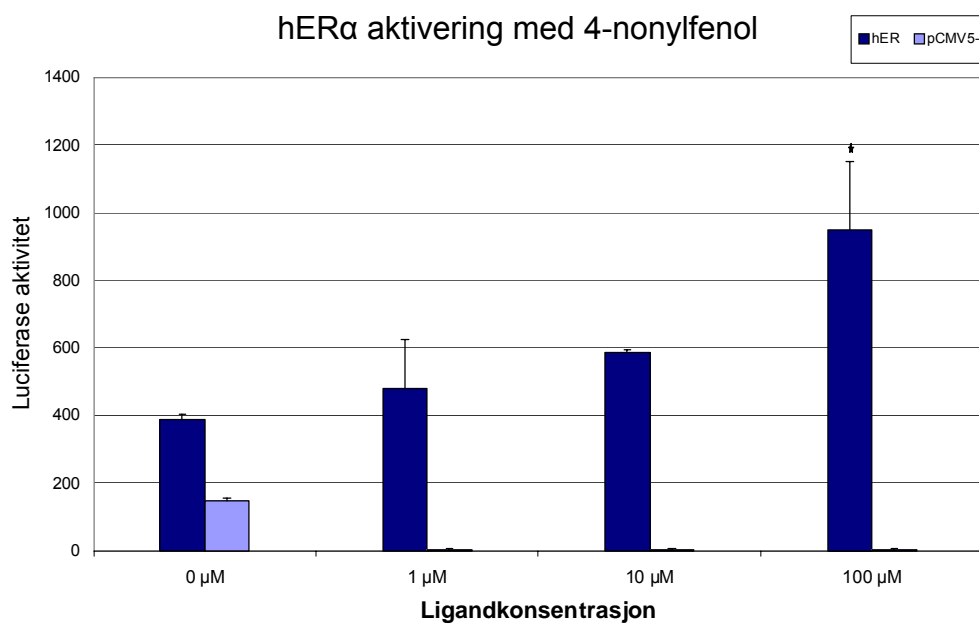


Figur 19. Transfeksjon av hPXR og XREM luc reporterer og eksponering for etynylestradiol, EE₂ (0µM er tilsatt DMSO). COS-1 celler er transfektert med 5 ng hPXR-plasmid og 5 ng hRXR-plasmid i 96-brønnsbrett. Resultata er presentert som snitt av tre replikat (n=3) ± SD. Figuren viser relativ luciferase aktivitet etter eksponering for ulike ligandkonsentrasjonar av EE₂. Resultata viser at det ikkje er nokon tydelig dose-respons effekt av EE₂ ved binding til hPXR. Men for ligandkonsentrasjonen 100 µM er resultatet signifikant forskjellig frå kontrollen, 0 µM.

4.2.5 hER α og hPXR aktivering med 4-nonylfenol

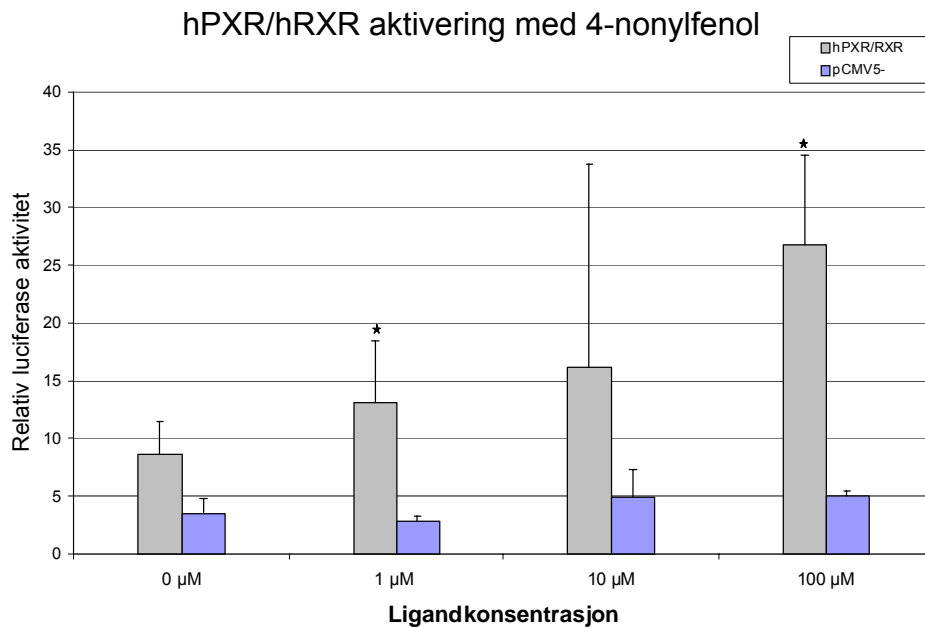
For å kunne undersøke om ulike ligandar kunne binde hER α og/eller hPXR når desse var i same system måtte det først undersøkast om liganden kunne aktivere hER α og hPXR når desse vart transfektert kvar for seg. Det vart valt å bruke 4-nonylfenol. Denne liganden skal kunne aktivere både hER α og hPXR (Mnif *et al.* 2007).

COS-1 celler vart transfektert med hER α og ERE-Renilla luc i 96 brønnsbrett. Etter 4 timar vart cellene eksponert for 4-nonylfenol og deretter inkubert i 24 timar før avlesing av luciferase aktivitet. Resultatet viser ein trend til aktivering av hER α med aukande mengd 4-NP (fig. 20). Luciferase aktivitet er ikkje normalisert for transfeksjonsvariasjonar.



Figur 20. Transfeksjon av hER α og ERE-R-luc og eksponering 4-nonylfenol, 4-NP (0 μ M er tilsatt DMSO). COS-1 celler er transfektert med 10 ng hER α i 96-brønnsbrett. Resultata er presentert som snitt av tre replikat (n=3) \pm SD. Figuren viser luciferase aktivitet etter eksponering for 4-NP. Resultatet viser at 4-NP kan aktivere hER α med ERE-R-Luc som reporter og det kan observerast ein trend til dose-respons aktivering. Verdiane for ligandkonsentrasjonen 100 μ M er signifikant forskjellig frå 0 μ M. Luciferase aktivitet er ikkje normalisert for transfeksjonsvariasjonar.

Deretter vart COS-1 celler transfektert med hPXR og XREM-Luc reporter i 96-brønnsbrett. Renilla-Luc (pGL4.74) vart transfektert med for å normalisere for transfeksjonsvariasjonar. Etter 4 timar vart cellene eksponert for 4-NP, og deretter inkubert i 24 timar før avlesing av luciferase aktivitet. Resultatet viser at 4-NP kan aktivere hPXR ved desse ligandkonsentrasjonane (1 μ M, 10 μ M og 100 μ M), men berre resultatet for 1 μ M og 100 μ M er signifikant (fig. 21)



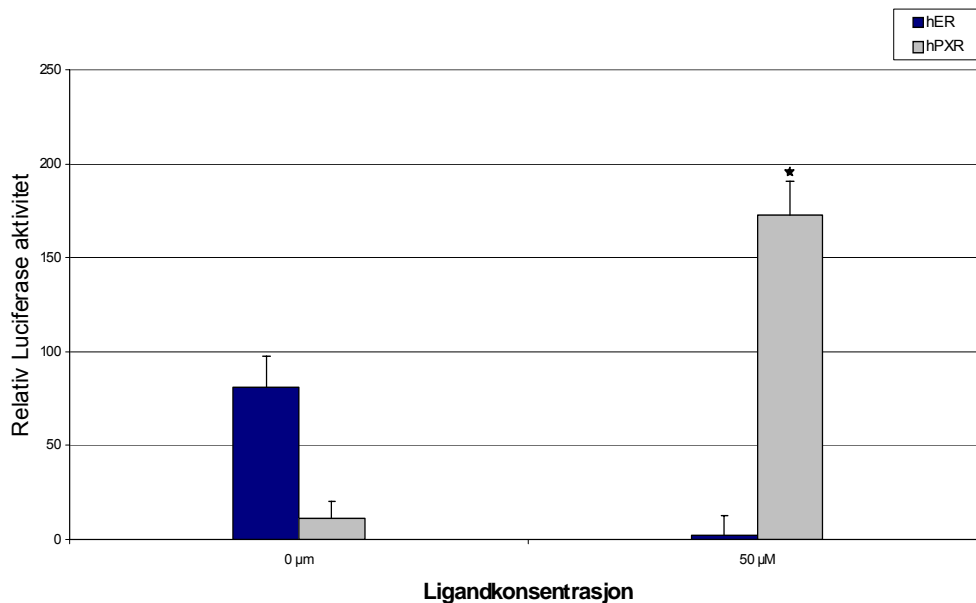
Figur 21. Transfeksjon av hPXR og XREM luc reporter og eksponering for 4-nonylfenol, 4-NP (0 μ M er tilsatt DMSO). COS-1 celler er transfektert med 5 ng hPXR-plasmid og 5 ng hRXR-plasmid i 96-brønnsbrett. Resultata er presentert som snitt av tre replikat (n=3) \pm SD. Blå søyler viser pCMV5-aktivering (kontroll) og grå søyle viser hPXR α aktivering. Figuren viser relativ luciferase aktivitet etter eksponering for ulike ligandkonsentrasjonar av 4-NP. Resultatet viser at hPXR kan aktiverast av 4-NP. Resultatet viser ein trend til dose-respons aktivering og det er skilnad frå kontroll for 1 μ M og 100 μ M.

4.2.6 Kotransfeksjon av hER α og hPXR

Dei førre forsøka viste at hER α kan aktiverast av EE₂ (fig.17) og at hPXR kan aktiverast av rifampicin og EE₂ (fig. 15A og 19), og at begge desse kjernereseptorane truleg kan aktiverast av 4-nonylfenol (fig. 20 og 21). Når luciferaseassaysystemet no var etablert var det ønskeleg å kotransfekte hER α og hPXR og dei respektive reporterplasmida, høvesvis ERE-renilla-luciferase og XREM-Luciferase, saman i COS-1 celler. Transfeksjonen vart utført i 24-brønnsbrett og 4 timar etter transfeksjon vart cellene eksponert for ligand og deretter vart cellene inkubert i 24 timar før avlesing av luciferase aktivitet og β -galaktosidaseaktivitet. I dette systemet vart plasmidet som kodar for β -galaktosidase brukt som transfeksjonskontroll for å kunne normalisere for transfeksjonsvariasjonar. Ligandane som vart valt var ligandane som i førre forsøk viste aktivering av hER α og hPXR (EE₂, rifampicin og 4-NP). Forsøket er gjennomført ein gong. Resultata er presentert som relativ hER α og hPXR aktivitet ved å trekkje frå pCMV5- aktivitet. Dette er ein noko forenkla måte å presentere resultatet på, men viser korleis aktiviteten til hER α og hPXR vert endra med aukande ligandkonsentrasjon. På grunn av tidsnaud er forsøket berre gjennomført ein gong.

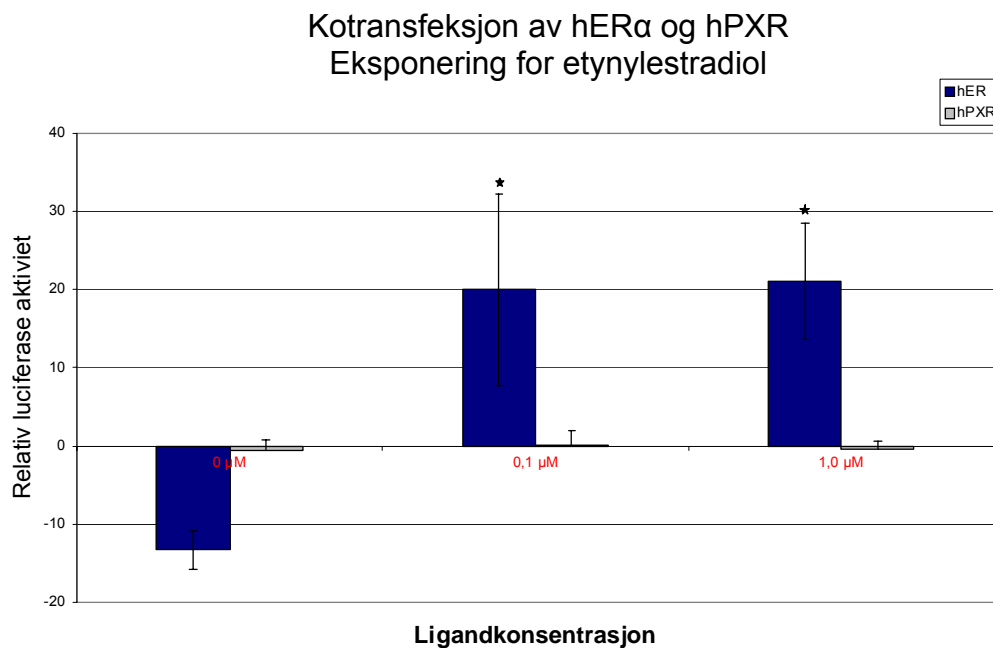
I eit forsøk vart kotransfekterte COS-1 celler eksponert for 50 μM rifampicin. Resultata i viser at ved 50 μM rifampicin vil liganden truleg binde hPXR og ikkje hER α i særlig grad (fig. 22). Resultatet er signifikant. På grunn av at det vart valgt å bruke 24-brønnsbrettet vart cellene eksponert for berre ein ligandkonsentrasjon av rifampicin (50 μM).

Kotransfeksjon av hPXR og hER α Eksponering for rifampicin



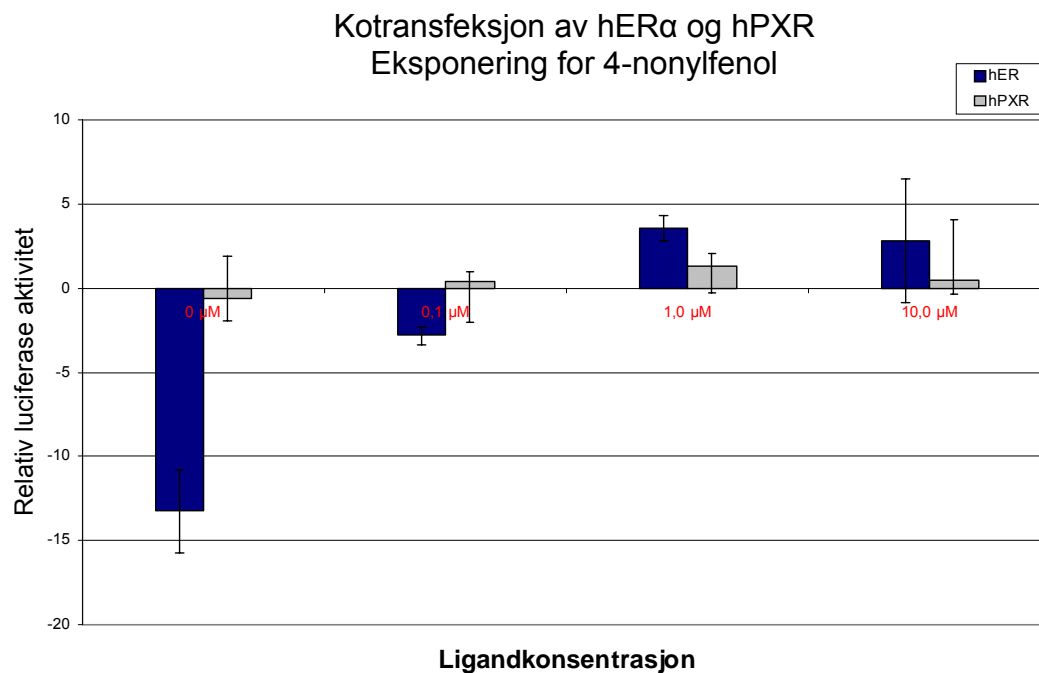
Figur 22. Transfeksjon av hPXR, hER α og høvesvis XREM luc og ERE-R-luc reporterer og eksponering for rifampicin (0 μM er tilsatt DMSO). COS-1 celler er transfektet med 50 ng hPXR-plasmid og 50 ng hER α -plasmid i 24-brønnsbrett. Resultata er presentert som snitt av tre replikat ($n=3$) \pm SD. Mørk blå søyle viser hER α aktivering og grå søyle viser hPXR aktivering. Figuren viser relativ luciferase aktivitet etter eksponering for 50 μM rifampicin. Resultatet er signifikant og viser at i eit kotransfektet system vil 50 μM rifampicin aktivere hPXR og ikkje hER α i særlig grad.

Kotransfekterte celler som vart eksponert for ulike ligandkonsentrasjonar av EE₂ at ved eksponering av ulike ligandkonsentrasjonar med EE₂ kan ein observere eit forhold mellom dose og respons (fig. 23). Resultatet er signifikant og dette tyder på at EE₂ vil aktivere hER α ved desse ligandkonsentrasjonane sjølv om EE₂ også kan aktivere hPXR. Ved 0 μ M kan ein observere negativ hER α aktivitet. Dette kan tyde på aktiviteten til hER α vert påverka av hPXR i eit kotransfeksjonssystem.



Figur 23. Transfeksjon av hPXR, hER α og høvesvis XREM luc og ERE-R-luc reporter og eksponering for etynylestradiol (0 μ M er tilsatt DMSO). COS-1 celler er transfektert med 20 ng hPXR-plasmid og 20 ng hER α -plasmid i 24-brønnsbrett. Resultata er presentert som snitt av tre replikat ($n=3$) \pm SD. Mørk blå søyle viser hER α aktivering og grå søyle viser hPXR aktivering. Figuren viser relativ luciferase aktivitet etter eksponering for ulike ligandkonsentrasjonar av EE₂. Resultatet viser signifikant aktivering av hER α ved konsentrasjonane 0,1 og 1,0 μ M EE₂. Figuren viser også at hPXR ikkje vert aktivert i nokon grad. pCMV5-aktivitet er i denne framstillinga substrahert frå aktiviteten til hER α og hPXR pCMV5- har ein høgare verdi enn hER α ved 0 μ M og dermed vert denne verdien negativ.

Kotransfekterte COS-1 celler som var eksponert for 4-NP viste også ein trend til dose-respons forhold. Resultata indikerar at i eit kotransfektert system er det forskjell mellom hER α aktivering og hPXR aktivering ved eksponering for 4-NP (fig. 24). Resultata tyder på at hER α vert påverka av 4-NP og at hPXR ikkje vert det i nokon særlig grad ved desse ligandkonsentrasjonane.

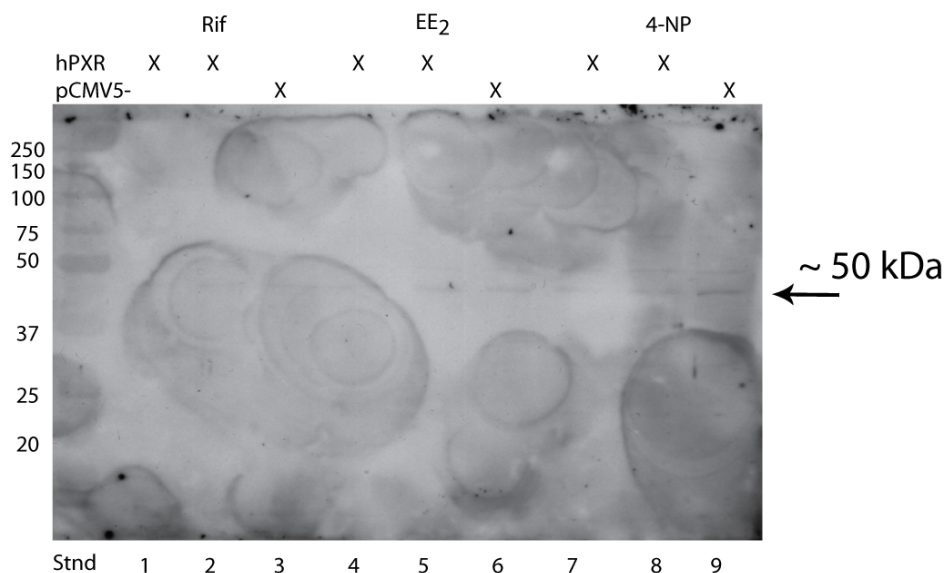


Figur 24. Transfeksjon av hPXR, hER α og høvesvis XREM luc og ERE-R-luc reporterer og eksponering for 4-nonylfenol (0 μM er tilsatt DMSO). COS-1 celler er transfektet med 20 ng hPXR-plasmid og 20 ng hER α -plasmid i 24-brønnsbrett. Resultata er presentert som snitt av tre replikat ($n=3$) \pm SD. Mørk blå søyle viser hER α aktivering og grå søyle viser hPXR aktivering. Figuren viser relativ luciferase aktivitet etter eksponering for ulike ligandkonsentrasjonar av 4-nonylfenol. Resultatet i figuren er noko uklart og viser at i eit kotransfektert system vil 4-nonylfenol kunne interagere med hER α framfor hPXR. I denne framstillinga er bakgrunnen (pCMV5-) substrahert frå aktiviteten til hER α og hPXR, og dette er grunnen til negativ verdi for hER α kontroll (0 μM).

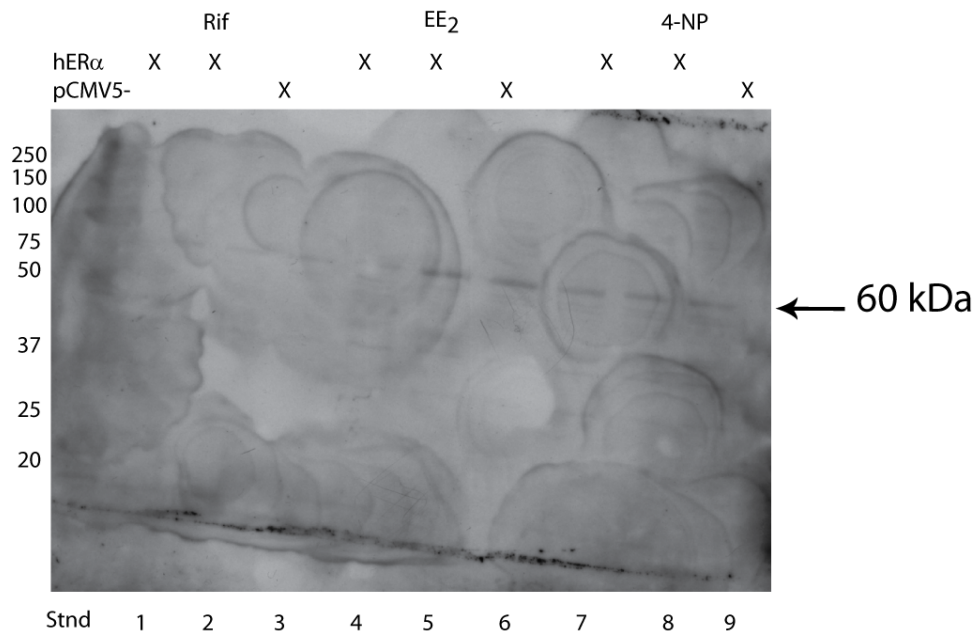
4.3 Westernblottanalyse

Det var ønskeleg å bruke westernblot analyse til å påvise hPXR og hER α i cellelysate for å stadfeste at ekspresjonsplasmida var transfektert inn i COS-1 celler, og stabilt uttrykt i desse ligandkonsentrasjonane. Dersom desse ekspresjonsplasmida vart påvist i cellelysate kan ein truleg relatere luciferase aktivitet til desse. Prøver frå cellelysate vart laga til ved å først måle proteinkonsentrasjonen i prøvene. Deretter vart det laga til to prøver frå kvart cellelysate der den eine prøven skulle merkast med hPXR antistoff og den andre med ER α antistoff ved westernblotting. Resultata frå westernblotanalysen gav ikkje noko klart resultat. Det var ikkje mogeleg å identifisere spesifikke hPXR og hER α band i den storleiken som hPXR og hER α har (høvesvis om lag 50 kDa og 65-70 kDa). Figur 25 viser westernblottanalyse av hPXR og det kan observerast band som er om lag 50 kDa. Men også prøver som inneheld cellelysate der kun pCMV5- vart transfektert (tomt plasmid) viser slike band. Desse banda viser truleg altså ikkje spesifikke hPXR. Dette er også tilfellet for analyse av hER α . Figur 26 viser westernblottanalyse av hER α og det kan observerast band som er om lag 65 kDa. Men også i dette tilfellet viser prøver som inneheld pCMV5- band i denne storleiken.

Det var brukt nye antistoff som ikkje tidlegare var testa ut i westernblottanalyse. Vidare optimalisering er derfor nødvendig for å kunne bruke desse antistoffa til å identifisere hPXR og hER α i cellelysate frå transfeksjonsforsøk.



Figur 25: Westernblott analyse av kotransfektet hPXR og hER α . Bildet viser fleire uspesifikke band. Ein kan sjå band ved om lag 50 kDa som er storleiken til PXR, men også kontroll (3,6 og 9) viser band ved om lag 50 kDa.



Figur 26: Westernblott analyse av kotransfektet hPXR og hER α . Bildet viser fleire uspesifikke band. Det kan også observerast band i området 65-70 kDa som er storleiken til hER, men også kontroll (3,6 og 9) har tydelege band.

5. Diskusjon

I denne oppgåva var målet å etablere luciferase transfeksjonsassay for *in vitro* ligandaktiveringsstudiar av kjernereseptorane hER α og hPXR. For å få til dette vart ulike reporterplasmid subklona og aktiviteten i transfeksjonsforsøk vart undersøkt. Vidare vart hER α og hPXR eksponert for ulike ligandar for å stadfeste om desse kunne aktivere transkripsjon. Tilslutt vart det gjennomført transfeksjonsforsøk der hER α og hPXR vart kotransfektet med dei respektive luciferase reporterplasmida, ERE-Ren og XREM.

5.1 Eksperimentell strategi

Den eksperimentelle strategien var subkloning av reporterkonstrukt og etablering av luciferase transfeksjonsassayet. Det var avgjerande for oppgåva å få subklona reporterplasmid som viste signifikant aktivitet i luciferase transfeksjonsassayet. Gjentatte negative subkloningsresultat er bakgrunnen for at nokon av transfeksjonsforsøka er utført berre ein gong då det innanfor tidsbegrensinga som oppgåva er underlagt ikkje var meir tid til dette.

Transfeksjonssystemet var basert på DUAL-LuciferaseTM Reporter Assay systemet som er ein patentert teknologi og svært kostbar. For å redusere kostnadane ved denne metoden vart det forsøkt å bruke mindre volum av løysingane til måling av luciferase aktivitet (luciferase assay reagent II løysing og Stop & GloTM løysing). Samanlikning av eldfloge-luciferase aktivitet og renilla-luciferase aktivitet ved 50 μ l istadenfor 100 μ l av kvar reagens viste at aktiviteten truleg ikkje vart redusert av dette (data er ikkje tatt med). Fleire forsøk må likevel gjennomførast for å kome fram til eit passende volum. Eit anna alternativ som kan redusere kostnadane kan vere å måle eldfloge-luciferase og renilla-luciferase aktivitet i to ulike delar av lysatet. I dette tilfellet vil det ikkje vere nødvendig å tilsette Stop & GloTM reagensen til lysatet for å stoppe eldfloge-luciferase aktiviteten. Dette fordi det kun er renilla-luciferase aktivitet som vert målt i denne delen av lysatet, medan eldfloge-luciferase aktivitet vert målt i den andre delen av lysatet. Dette alternativet vart ikkje forsøkt i denne oppgåva. Andre alternative reporterassaysystem kan også vurderast. Til dømes kan ønska responselement subklonast inn i kloramfenikol acetyltransferase (KAT) reporterplasmid. I dette tilfellet vert KAT inkubert med radioaktivtmerka kloramfenikol og det acetylte produktet vert skildt frå det som ikkje er acetylt ved kromatografi og deretter kvanifisert ved scintillasjonsspektroskopi. Derimot er dette ein svært tungvindt metode og lite brukt i

transfeksjonsstudiar. Sjølve transfeksjonsforsøka vart gjennomført med standard transfeksjonsmetode ved å bruke Fugene® transfeksjonsreagens. Enkelte transfeksjonsoppsett var svært omfattande og krevde gode pipetteringsteknikkar og pippeteringsutstyr.

For å kunne bruke denne kotransfeksjons-metoden til å studere to ekspresjonsplasmid som kan aktivere kvar sin reporter vil det vere nødvendig å innføre fleire transfeksjonskontrollar for å kunne gje tydelege svar på kva som gjev signal i transfeksjonen og korleis ekspresjonsplasmida oppfører seg.

- Transfeksjon av hPXR og ERE-Renilla reporter
- Transfeksjon av hER α og XREM-Luc reporter
- Transfeksjon av hER α og hPXR med ERE-Renilla reporter
- Transfeksjon av hER α og hPXR med XREM-Luc reporter

Desse kontrollane vil kunne seie noko om hPXR kan påverke ERE-Renilla reporter, om hER α kan påverke XREM-Luc reporter, om hER α og hPXR vil konkurrere om ERE-Renilla reporter eller om dei vil konkurrere om XREM-luc reporter.

I transfeksjonen vil det også vere fornuftig å ha med eit kontrollplasmid som kodar for eldfloge-luciferase. Dette for å sjå kva aktivitet luciferase har i seg sjølv i transfeksjons-systemet.

5.2 Subkloning av reporterkonstrukt

Utgangspunktet for å klonе ulike reporterplasmid var å få ein PXR eldfloge-luciferase reporter og ein ERE renilla reporter som kunne binde høvesvis kjernereseptoren hPXR og hERα *in vitro*.

Fragmenta som skulle klonast inn i vektorplasmida var små, mellom 19-21 bp x 3-4, og butt ende ligering av fragment og vektorar viste seg å vere problematisk. Sekvensanalyse av antatt positive plasmid viste at vektor ikkje var kutta og/eller at noko var kutta av restriksjonsenzym, men at fragmentet var satt inn i vektor igjen og vektor religert (sjå appendiks 1 fig.27 og fig.28). I ligering av vektor og fragment var det ulike kontrollar for å avdekke om transformantane var vektor med korrekt innsatt fragment. Kontroll 1 var kutta vektor utan ligase og fragment. Denne skulle vise antall koloniar som innehaldt ukutta vektor (falsk positiv kontroll). Kontroll 2 var kutta vektor med ligase som skulle vise om vektor religerte som følgje av ufullstendig defosforylering, og kontroll 3 var ukutta vektor som kontroll på at transformasjonen var vellukka. Desse kontrollane gav varierende resultat ved transformering inn i E.coli celler. Optimalt sett skulle kontroll 1 gje få koloniar, kontroll 2 skulle gje få koloniar og kontroll 3 skulle gje fleire koloniar. Resultata viste gjentatte gonger at kontroll 2 gav mange koloniar. Dersom kontroll 1 i tillegg viste få koloniar (få ukutta vektorar) ville dette indikere at vektor hadde religert sjølv om den i utgangspunktet ikkje skulle gjere det som følgje av at den var defosforylert. Dersom kontroll 1 i staden viste mange koloniar var det vanskelig å konkludere om vektor hadde religert eller om det var kuttinga som var problemet. Truleg var det defosforyleringstrinnet som var kritisk då gelelektroforese etter kutting viste at vektor var kutta. Defosforylering av vektor vart forsøkt med alkalisk fosfatase frå reke og kalvetarm (SAP og CIAP) frå ulike produsentar. Ved butt ende ligering anbefaler Takara å bruke bakteriell alkalisk fosfatase. Dette enzymet er svært stabilt og dermed vanskelig å inaktivere/fjerne etter tilsetjing. Det var difor ønskjeleg å unngå denne. Det lukkast til slutt å sekvensere eit korrekt plasmid med DR3 responselementet i eldfloge-luciferasevektor, pG5Luc, og ERE responselementet inn i renilla luciferasevektor, pGL4.74. Desse konstrukta vart så brukt vidare i transfeksjonsforsøk.

5.2.1 Sekvensanalyse og transfeksjon med DR3 reporter

Sekvensanalyse viser at fragmentet som er ligert inn i eldfloge-luciferase vektor har 3 x sekvensen CC**AGGTCA**GAC**AGGTCA**GCAG. Dette er konsensus sekvensen, AGGTCA, som alle kjernereseptorar bind ulike variantar av.

I transfeksjonsforsøk med DR3–eldflogeluciferase viste resultat at denne reporteren ikkje bind ligandaktivert hPXR* og vidare induserar transkripsjon av eldflogeluciferase i særlig grad (fig. 14). Årsaka til dette kan kome av artsforskjellar i PXR aktivering. Ved identifisering av kjernereseptoren PXR i 1998 vart det identifisert artsforskjellar i indusering av CYP3A enzym. Mellom anna har ulike studiar vist forskjellar mellom menneske og mus. Det er vist at muse PXR kan aktiverast av PCN og vidare indusere transkripsjon av CYP3A1 enzym via mPXR binding til DR3. Human PXR vert aktivert av rifampicin og induserer transkripsjon av CYP3A4 via hPXR binding til ER-6 (Bertilsson *et al.* 1998; Kliewer *et al.* 1998; Lehmann *et al.* 1998; Blumberg *et al.* 1998b). Resultat som desse gruppene har kome fram til tyder på at hPXR også kan aktivere DR3 og andre HRE, men at hPXR har større affinitet for ER-6. Truleg kan dette forklare den låge aktiveringa som resultat i figur 14 syner som følgje av både PCN eksponering og rifampicin eksponering. PCN aktiverar dårlig fordi PCN viser større affinitet for muse PXR og rifampicin aktiverer dårlig fordi HRE er DR3 og ikkje ER-6. Eit forsøk som kunne vore gjort for å bekrefte om dette DR3 HRE virkar ville vore å gjere transfeksjonsforsøk med muse PXR.

5.2.2 Sekvensanalyse og transfeksjon med ERE-renilla-luciferase reporter

Østrogen responselementet, ERE, er klona inn i renilla vektor pGL4.74. Sekvensanalyse viser at innsett fragment er 2x sekvensen CCAGGTCA_{GAG}TGACCTGGCA. Dette fragmentet er palindrom sekvensen som hER α bind til (Klein-Hitpass *et al.* 1986).

Denne sekvensen avviker i ein av dei tre basane som er markert med mindre skrift. I følge studien til Klein-Hitpass *et al.* kan einkvar av nukleotidane stå i desse posisjonane utan at det betyr noko for funksjonen. Same studie viste også at mutasjonar av ERE sekvensen i posisjon 1 og 11 var essensielle for funksjonen (Klein-Hitpass *et al.* 1988). Ein annan studie viste også at både 1x ERE sekvensen og 2x ERE sekvensen kan binde østrogen reseptor og deretter indusere transkripsjon av luciferase (Gehm *et al.* 1997).

Desse resultatene er dermed støtta av tidlige studiar av Klein-Hitpass *et al.* og Gehm *et al.* og transfeksjonsforsøk med dette ERE renilla luciferase reporter viste signifikant aktivering av hER α (fig. 17).

5.3 Ligandaktivering av hPXR og hER α

Resultata viser at hPXR vert aktivert av rifampicin og ikkje av PCN og dette samsvarar med fleire studiar av human PXR (Bertilsson *et al.* 1998; Blumberg *et al.* 1998b; Goodwin *et al.* 1999). Resultatet frå transfeksjonsforsøk med 4-nonylfenol og etynylestradiol viser at desse ligandane kan aktivere hPXR og desse funna er støtta av andre studiar der det også er vist at 4-nonylfenol og EE₂ kan aktivere human PXR ved konsentrasjonar mellom 1-10 μ M (Mnif *et al.* 2007). Det er dermed vist at ulike ligandar som legemiddel (rifampicin og 17- β -etynylestradiol) og miljøgifter (4-nonylfenol) kan aktivere kjernereseptoren hPXR *in vitro*.

I oppgåva var det ønskeleg å teste fleire ligandar mot hPXR. På grunn av varierende høge standardavvik ved bruk av 96-brønnsbrett vart det valgt å bruke 24-brønnsbrett i nokon av forsøka. Dette gjorde at transfeksjonskapasiteten gjekk ned. I tillegg var kostnadane med Dual-LuciferaseTM reporterassayet svært høge og det var ikkje fornuftig å bruke denne metoden til å teste mange ligandar og ligandkonsentrasjonar. Det vart difor valgt ut tre ligandar som representerte dei to gruppene legemiddel og miljøgift. Ligandkonsentrasjonane vart valgt på bakgrunn av tidlige studiar (Mnif *et al.* 2007).

Transfeksjon av hER α med ERE renilla luciferase reporter og eksponering for etynylestradiol stadfestar at hER α kan aktiverast av denne liganden (fig. 17). Resultata frå transfeksjon av hER α og eksponering av rifampicin viser at truleg kan ikkje rifampicin aktivere hER α (fig. 18). Dette resultatet stemmer med Blumberg *et al.* sin studie der hPXR vart identifisert. I den studien viser resultat at 50 μ M rifampicin ikkje aktiverar hER α i nokon særlig grad (Blumberg *et al.* 1998b). 4-nonylfenol viser noko aktivering av hER α (fig. 20). Ein studie av Kuiper *et al.* frå 1998 viste at ulike østrogene kjemikaliar kan aktivere hER α i konsentrasjonar mellom 100-1000 nM. Mellom anna vart nonylfenol undersøkt for ligandaktivering. Resultatet i den studien viste at kjemiske sambindingar som nonylfenol kan binde hER α , men at affiniteten til reseptoren kan vere så mykje som 1 000 til 10 000 fold lågare enn affiniteten reseptoren har for 17- β -estradiol (Kuiper *et al.* 1998). Det er også kjent at 4-nonylfenol har ein østrogeneffekt *in vivo* (Arukwe *et al.* 1997 a).

5.4 Ligandaktivering av kotransfektet hPXR og hER α

Kotransfeksjonsforsøk vart gjennomført for å studere ligandaktivering av hPXR og hER α når desse to var transfektet saman. Det var ønskjeleg å få resultat som kunne gje indikasjonar på om liganden ville aktivere reseptorane ulikt ved ulike ligandkonsentrasjonar, samt ved ulike konsentrasjonar av kjernereseptor. Dersom forsøket viste at det var forskjellar i aktivering av hPXR og hER α kan det då tenkjast at det eksisterar krysskommunikasjon mellom desse to reseptorane *in vivo*?

Det vart i kotransfeksjonsforsøket valgt å ikkje transfektere hRXR saman med hPXR og hER α for å redusere talet på ulike plasmid i transfeksjonen. COS-1 og COS-7 cellelinje er avleia frå CV1 cellelinje. Ein studie av proteininteraksjonar i COS-1 celler viser at desse cellene har svært lave nivå, eller ikkje noko endogent RXR (Chen *et al.* 2003). Sidan hPXR dannar ein heterodimer saman med RXR og deretter bind til responselementet i DNA vil transfeksjon utan RXR vere noko som kan gje lågare eller ingen aktivering av hPXR. Studiar har likevel vist at PXR transfeksjon i COS-7 celler kan gje signifikant PXR aktivitet utan at RXR vert transfektet med (Blumberg *et al.* 1998b).

I kotransfeksjonsforsøk av hPXR og hER α og eksponering for rifampicin viser resultatata at ved 50 μ M rifampicin vil hPXR bli aktivert framfor hER α . Dette stemmer med konklusjonen

basert på resultatene i figur 18 og Blumberg *et al.* 1998b sine resultat som viser at hER α ikkje vert aktivert av rifampicin i særleg grad.

I kotransfeksjonsforsøk av hPXR og hER α og eksponering for etynylestradiol viser resultatene i figur 23 ein dose-respons aktivering av hER α ved konsentrasjonar mellom 0,1-1,0 μ M. Figuren viser også at hPXR ikkje vert aktivert av etynylestradiol når hER α er kotransfektet. Det kan tenkast at ved høgare ligandkonsentrasjonar av etynylestradiol vil ein også observere binding til hPXR. Ved separat transfeksjon av hPXR og eksponering med etynylestradiol viser resultatene signifikant aktivering av hPXR for 100 μ M etynylestradiol (fig. 19). Truleg har hER α større affinitet enn hPXR for etynylestradiol ved låge ligandkonsentrasjonar (0,1-10 μ M). Ved høgare konsentrasjonar av etynylestradiol (>100 μ M) vil ein truleg også observere ligandbinding til hPXR.

Ved eksponering for 4-nonylfenol viser resultatene at ved konsentrasjonar mellom 0,1-10 μ M vil liganden ha ulik effekt på hER α og hPXR (fig. 24). Her kan det observerast ein auka relativ luciferase aktivitet med aukande ligandkonsentrasjon for hER α , medan hPXR ikkje vert aktivert av 4-nonylfenol i nokon særleg grad. Resultatene kan tyde på at i eit kotransfektet system vil hER α verte hemma ved 0 og 0,1 μ M ligandkonsentrasjon. Det vart gjort eit forsøk på undersøkje nivå av hER α og hPXR i dei transfektete cellene ved hjelp av westernblott, men dette vart ikkje vellukka. Det vil i seinare forsøk vere nødvendig å samanlikne resultat frå transfeksjonsforsøk med westernblottanalyse for å bestemme nivå av hER α og hPXR.

I kotransfeksjonsforsøka der systemet er eksponert for etynylestradiol og 4-nonylfenol ser ein altså at ved låge ligandkonsentrasjonar vert verdiane for hPXR og hER α lågare enn 0 (fig. 23 og 24). I figurane kan det observerast at hER α aktivitet truleg vert redusert i nærver av ein annan kjernereseptor og i dette tilfellet hPXR. Dette var ikkje observert i transfeksjon der hPXR og hER α vart transfektet separat og eksponert for 4-nonylfenol. Dette var heller ikkje observert i kotransfeksjonsforsøket der reseptorane vart eksponert for ein ligand som kun aktiverer hPXR (rifampicin). Dette kan tyde på at sjølve kotransfeksjonen av hPXR og hER α ikkje skal ha effekt på reseptor aktivering, men at det er ligander som kan aktivere begge reseptorane som fører til ein slik effekt på reseptoraktivitet. Ulike teoriar kan forklare dette. Til dømes kan det tenkast at det vil vere konkurranse om cellulære kofaktorar. Ein studie av Min *et al.* 2002 viser at østrogen reseptor aktivitet kan verte påverka av andre kjernereseptorar. Studien undersøker om kjernereseptorane CAR og hPXR har potensial til å

regulere ER-mediert transaktivering. Resultata viste at hPXR svært moderat kunne undertrykke østrogenreseptor aktivitet og at CAR til samanlikning reduserte østrogenreseptor transaktivering i vesentleg grad. Vidare undersøkte denne gruppa kva som var årsaka til at CAR reduserte ER-mediert transaktivering. Det vart framsett tre ulike hypotesar. Den første var danning av eit inaktivt kompleks med ER som fører til at ER aktivering vart redusert. Den andre teorien var konkurranse om binding til ERE og den siste teorien var ein effekt på kofaktorar og kofaktornivå. Ulike forsøk viste at det truleg var effekt på kofaktorar og kofaktornivå som var årsaka til redusert ER-aktivitet. Studien viser at det eksisterar konkurranse om kofaktorar mellom ulike kjernereseptorar. Ved å overrutmeye CAR vart det observert ein dose avhengig reduksjon i ER aktivitet. Denne effekten vart redusert ved å auke mengden av koaktivatoren GRIP-1 (Min *et al.* 2002). Cellulære kofaktorar som til dømes SRC-1, TIF-2/GRIP1, ACTR/AIB-1/PCAF er kjent for å aktivere kjernereseptorar. For at ein kjernereseptor skal kunne indusere transkripsjon av metabolske enzym må først ligand kunne binde ligand-bindingssetet til kjernereseptor. Ligandbinding fører til ein kaskade av ulike prosessar som involverar kofaktorar (Freedman 1999). Det er også vist at sjølve liganden kan endre nivået av ulike kofaktorar i ei celle. Auka transkripsjonell aktivitering av ER α er observert ved auka nivå av koaktivatorar som følgje av ligandeksponering, noko som kan tyde på at sjølve liganden kan endre nivået av kofaktorar og dermed auke reseptoraktivitet (Lonard *et al.* 2004).

Det vil vere nødvendig å gjennomføre fleire og meir omfattande studiar for å konkludere om dette assaysystemet faktisk viser at det er kryssregulering/krysskommunikasjon mellom hPXR og hER α . Det ville i første omgang vore fornuftig å gjennomføre transfeksjonar der cellene vart eksponert for fleire og tettare ligandkonsentrasjonar i området 0,1 μ M til 100 μ M for å sjå om ligandane har større affinitet for hER α eller hPXR ved ulike konsentrasjonar. Det ville også vore ønskjeleg å undersøke om ligandane har ulik affinitet for kjernereseptoren ved ulike konsentrasjonar av hER α og hPXR. Det kan tenkjast at dersom hER α vert autoregulert vil ligandbinding skifte frå hPXR til hER α . Dersom tilfellet er at det er konkurranse om ulike kofaktorar vil eit forsøk der kofaktorar vert overrutmeyt vere fornuftig for å sjå om aktiviteten til hER α eller hPXR vert endra som følgje av det. Også konkurranse transfeksjonsforsøk der ein undersøker hER α aktivitet ved å først kotransfektore ein kofaktor som til dømes GRIP-1 og deretter kotransfektore hPXR for å sjå om aktiviteten til hER α vert endra som følgje av det. Også ved å variere ligandar frå rifampicin, som er ein sterk aktivator av PXR, til PCN som aktiverar hPXR i mindre grad, kan ein få svar på om konkurranse om kofaktorar også er

ligandavhengig. Meir omfattande forsøk kan vere å utføre kromatin immunopresipitering (ChiP) av ligand-kjernereseptor-kofaktor-kromatin kompleks. Ved å bruke antistoff mot ulike kofaktorar og kjernereseptorar kan ein undersøkje kva for faktorar som er involvert i aktivering av ulike kjernereseptorar. Slike bindingsassaystudiar vil vere viktig for å undersøkje endringar i ligand- reseptor binding ved å endre ligandkonsentrasjon eller forholdet mellom hPXR og hER α , samt ved endra nivå av koaktivatorar.

5.5 Krysskommunikasjon mellom hER α og hPXR

Det er kjent at det eksisterar krysskommunikasjon mellom ulike kjernereseptorar. Til dømes er slik krysskommunikasjon kjent mellom hPXR og CAR (constitutive androstane reseptor). CAR bind eit DR4 element i phenobarbital responseelementet og regulerer uttrykking av CYP2B gen. Ulike studiar har vist at hPXR kan binde DR4 elementet og regulere CYP2B gen *in vitro* og at CAR bind DR3 og ER6 element og regulerer CYP3A gen (Xie *et al.* 2000; Goodwin *et al.* 2001; Smirlis *et al.* 2001). Slik overlappende regulering av ulike PXR og CAR målgen kan potensielt føre til interaksjonar mellom legemiddel og ligandar som bind både PXR og CAR.

Eit anna døme på krysskommunikasjon eksisterar mellom arylhydrokarbon reseptor, AhR, og hER α . AhR høyrer til PAS (Per-Arnt-Sim) familien av transkripsjonsregulatorar (Gu *et al.* 2000) og kan binde ligandar som til dømes miljøgifta TCDD (dioksin) (Denison *et al.* 2003). Mekanismen bak denne krysskommunikasjonen er noko usikker. Mekanismen bak denne krysskommunikasjonen er komplisert og mangfaldig. Ulike teoriar vart framsatt; AhR/ARNT heterodimeren kan binde hemmande responselement i østrogenreseptor målgenet, samspel med koaktivatorar, syntese av ukjente hemmande protein, auka proteasomal nedbryting av ER eller endra syntese/metabolisme av østrogen via auka uttrykking av aromatase og CYP enzym (Matthews *et al.* 2006). Nyare studiar har vist at AhR endrar proteasomal nedbryting av hER α ved å auka ubiquitinering (Ohtake *et al.* 2007) og at AhR direkte assosierar til ER α og regulerar transkripsjon sjølv om ER α ikkje var aktivert av ligand (Ohtake *et al.* 2008).

I denne studien var det ønskjeleg å finne ut om kryssregulering også eksisterar mellom hPXR og hER α , og om dette potensielt kan vere av klinisk relevans.

Assaysystemet vart nytta som ein metode for å studere ligandaktivering av kotransfektet hER α og hPXR. Studien til Mnif *et al.* 2007 undersøker om ulike ligandar for

østrogenreseptor, ER, også kan aktivere hPXR. Resultat som denne studien har kome fram til viser at av 48 utvalte ligandar med østrogen aktivitet viste 54 % av desse også hPXR aktivitet. Blant ligandane som studien undersøkte var etynylestradiol og ein miks av nonylfenolsambindingar. Studien viste at etynylestradiol kunne aktivere hPXR så vel som hER α , men at hPXR viste lågare affinitet for liganden enn hER α . På bakgrunn av desse resultata kom Mnif *et al.* 2007 med ein hypotese. Denne hypotesen foreslo at dersom ein sambinding kan vere ligand for både hER α og hPXR og då aktivere hER α ved låge konsentrasjonar og hPXR ved høge konsentrasjonar, og som følgje av enzym induksjon vert metabolisert til ein uskadeleg metabolitt via CYP3A4 enzym så kan den endokrinforstyrrende substansen raskt verte eliminert frå organismen. Dersom CYP3A4 metabolisme fører til at sambindingen vert metabolisert til ein meir aktiv sambinding kan dette føre til auka endokrine forstyrningar som følgje av at den då aktiverar hER α i større grad. Resultat som studien til Mnif *et al.* 2007 viser, samt preliminære resultat som denne oppgåva har kome fram til, kan tyde på at slik kryssregulering av kjernereseptorar er ein viktig faktor i regulering av transkripsjonsaktivitet.

Kryssregulering av hER α og hPXR kan altså oppstå som følgje av ulik affinitet for ulike ligandar og ligandkonsentrasjonar, konkurranse om kofaktorar eller andre årsaker som gjer at hER α og hPXR aktivitet vert endra. Svært mange ligandar kan binde både hER α og hPXR. Ein veit at det også eksisterar artsforskjellar i aktiveringsprofilen til PXR, så resultat frå studiar av kryssregulering mellom human PXR og ER α kan ikkje direkte gjelde for andre artar.

Dersom det er slik at det eksisterar kryssregulering av hER α og hPXR aktivitet kan dette gje uheldige effektar dersom ein vert eksponert for sambindingar som fører til dette.

5.6 Konklusjon

Ved å oppsummere resultatene som denne studien har kommet fram til kan det trekkes noen konklusjoner.

- Reporterplasmidene ERE-renilla luciferase viser signifikant aktivitet i transfeksjonsforsøk. Plasmidene kan dermed nyttes i kotransfeksjon med andre eldflye-luciferase reporter plasmid der ein ønskjer å studere ulike kjernereseptorar saman med hER α .
- EE₂ viser signifikant aktivering av hER α og rifampicin, EE₂ og 4-nonylfenol viser signifikant aktivering av hPXR i dette systemet.
- Etablering av kotransfeksjonsassayet der hER α og hPXR vert transfektert med sine respektive reporterplasmid høvesvis ERE-renilla luciferase og XREM-E luciferase har lukkast.
- Kotransfeksjonsforsøk viser at i eit kotransfekttert system vil truleg hPXR kunne kryssregulere hER α aktivitet.

Resultatene gjev ikkje noko eintydig svar på hypotesen *"Effektane av ein endokrinforstyrrende substans er bestemt av doseavhengig vegval og kryss-kommunikasjon mellom ulike klassar kjernereseptorar"* (Goksøyr 2006). Truleg er effektane av ein endokrin forstyrrende substans bestemt av doseavhengig vegval då nokon av resultatene viser at auka dose gjev ein signifikant endring i aktiviteten (respons). Truleg er det også krysskommunikasjon mellom ulike kjernereseptorar. Figur 23 viser at EE₂ aktiverer hER α framfor hPXR ved konsentrasjonar mellom 0,1-1,0 μ M ligandkonsentrasjonar. Når resultatene i figur 19 viser at EE₂ også vil aktivere hPXR ved høgare konsentrasjonar kan ein dermed stille spørsmål om EE₂ ved høgare konsentrasjonar også vil ha affinitet for hPXR når desse to kjernereseptorane er kotransfekttert. Forsøka viste at 4-nonylfenol kan aktivere både hER α og hPXR når desse er transfekttert separat, men kotransfeksjonsresultat gjev ikkje noko klart svar på om 4-nonylfenol vil ha ulik affinitet for hER α eller hPXR ved ulik ligandkonsentrasjon. Men desse resultatene indikerer at 4-nonylfenol kan endre hER α og hPXR aktivitet ved endra ligandkonsentrasjon når hER α og hPXR er kotransfekttert. Årsaka til dette er noko usikker, men kofaktorar spelar truleg ei viktig rolle i regulering av kjernereseptorane og truleg er det og eit samspel med desse som gjer at ein observerer ulik aktivitet for hER α og hPXR. Forsøk som kunne kartlagt dette vart det ikkje tid til innanfor rammene av denne oppgåva.

5.7 Framtidige perspektiv

Aktivering av kjernereseptorane hPXR og hER α fører til transkripsjon av ulike gen. Ved aktivering av hPXR vert CYP3A4 enzym transkribert og aktivering av hER α fører til transkripsjon av fleire ulike gen som er involvert i mange viktige prosessar i kroppen. Induksjon av transkripsjon av CYP3A4 enzym fører til endra metabolisme av ulike legemiddel samt endra metabolisme av andre sambindingar som til dømes endogene steroid. hER α reseptor er involvert i prosessar som reproduksjon, kreftutvikling, beinmetabolisme. Kunnskap om desse reseptorane og korleis dei vert regulert og påverkar kvarandre er derfor viktig for å kunne få auka kunnskap om legemiddelmetabolisme og regulering av viktige fysiologiske prosessar hos menneska.

Etablering av luciferase transfeksjonsassayet samt preliminare resultat som denne oppgåva har kome fram til dannar grunnlag for vidare studiar av aktivering av kjernereseptorane hPXR og hER α .

6. Referansar

- Anzenbacher, P. and E. Anzenbacherova (2001). "Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics." *Cell Mol Life Sci* 58: 737-47.
- Arukwe, A., L. Forlin and A. Goksoyr (1997 b). "Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol." *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 2576-2583.
- Arukwe, A., F. R. Knudsen and A. Goksoyr (1997 a). "Fish zona radiata (eggshell) protein: A sensitive biomarker for environmental estrogens." *Environmental Health Perspectives* 105: 418-422.
- Barwick, J. L., L. C. Quattrochi, A. S. Mills, C. Potenza, R. H. Tukey and P. S. Guzelian (1996). "Trans-species gene transfer for analysis of glucocorticoid-inducible transcriptional activation of transiently expressed human CYP3A4 and rabbit CYP3A6 in primary cultures of adult rat and rabbit hepatocytes." *Molecular Pharmacology* 50: 10-16.
- Baxter, K. and I. H. S. s. d. i. Stockley (2006). *Stockley's drug interactions : a source book of interactions, their mechanisms, clinical importance and management*. London, Pharmaceutical Press.
- Bertilsson, G., J. Heidrich, K. Svensson, M. Asman, L. Jendeberg, M. Sydow-Backman, R. Ohlsson, H. Postlind, P. Blomquist and A. Berkenstam (1998). "Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 12208-12213.
- Bertrand, S., F. G. Brunet, H. Escriva, G. Parmentier, V. Laudet and M. Robinson-Rechavi (2004). "Evolutionary genomics of nuclear receptors: from twenty-five ancestral genes to derived endocrine systems." *Mol Biol Evol* 21: 1923-37.
- Blumberg, B., H. Kang, J. Bolado, Jr., H. Chen, A. G. Craig, T. A. Moreno, K. Umesono, T. Perlmann, E. M. De Robertis and R. M. Evans (1998a). "BXR, an embryonic orphan nuclear receptor activated by a novel class of endogenous benzoate metabolites." *Genes Dev* 12: 1269-77.
- Blumberg, B., W. Sabbagh, H. Juguilon, J. Bolado, C. M. van Meter, E. S. Ono and R. M. Evans (1998b). "SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor." *Genes & Development* 12: 3195-3205.
- Chen, Y., L. N. Wei and J. D. Muller (2003). "Probing protein oligomerization in living cells with fluorescence fluctuation spectroscopy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15492-15497.
- Ciocca, D. R. and L. M. Roig (1995). "Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications." *Endocr Rev* 16: 35-62.
- Coon, M. J., X. X. Ding, S. J. Pernecky and A. D. N. Vaz (1992). "Cytochrome-P450 - Progress and Predictions." *Faseb Journal* 6: 669-673.
- Danielson, P. B. (2002). "The cytochrome P450 superfamily: Biochemistry, evolution and drug metabolism in humans." *Current Drug Metabolism* 3: 561-597.

- Denison, M. S. and S. R. Nagy (2003). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 309-34.
- Folkehelseinstituttet (2008). *Legemiddelforbruket i Norge 2003-2007*. A. f. legemiddelepidemiologi, Avdeling for legemidler, Divisjon for epidemiologi, Nasjonalt folkehelseinstitutt.
- Freedman, L. P. (1999). "Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling." *Cell* 97: 5-8.
- Fukuda, K., T. Ohta, Y. Oshima, N. Ohashi, M. Yoshikawa and Y. Yamazoe (1997). "Specific CYP3A4 inhibitors in grapefruit juice: furocoumarin dimers as components of drug interaction." *Pharmacogenetics* 7: 391-6.
- Gehm, B. D., J. M. McAndrews, P. Y. Chien and J. L. Jameson (1997). "Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14138-43.
- Geick, A., M. Eichelbaum and O. Burk (2001). "Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin." *J Biol Chem* 276: 14581-7.
- Germain, P., B. Staels, C. Dacquet, M. Spedding and V. Laudet (2006). "Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors." *Pharmacol Rev* 58: 685-704.
- Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." *Cell* 23: 175-182.
- Goksøyr, A. (2006). "Endocrine disruptors in the marine environment: mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish." *J Toxicol Environ Health A* 69: 175-84.
- Goksøyr, A., A. Arukwe, J. L. M., P. Cajaraville, L. Hauser, B. M. N. D. Lowe and P. Matthiessen (2007). *Molecular/Cellular Processes and the Impact on Reproduction. Effects of Pollution on Fish*. K. H. Andrew Lawrence: 179-220.
- Goodwin, B., E. Hodgson and C. Liddle (1999). "The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module." *Molecular Pharmacology* 56: 1329-1339.
- Goodwin, B., L. B. Moore, C. M. Stoltz, D. D. McKee and S. A. Kliewer (2001). "Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor." *Mol Pharmacol* 60: 427-31.
- Green, S., P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J. M. Bornert, P. Argos and P. Chambon (1986). "Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A." *Nature* 320: 134-9.
- Greene, G. L., P. Gilna, M. Waterfield, A. Baker, Y. Hort and J. Shine (1986). "Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA." *Science* 231: 1150-4.
- Gronemeyer, H., J. A. Gustafsson and V. Laudet (2004). "Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily." *Nat Rev Drug Discov* 3: 950-64.
- Gronemeyer, H. and V. Laudet (1995). "Transcription factors .3. Nuclear receptors." *Protein Profile* 2: 1173-1308.
- Gu, Y. Z., J. B. Hogenesch and C. A. Bradfield (2000). "The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 519-61.

- Guengerich, F. P. (2006). "Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity." *Aaps Journal* 8: E101-E111.
- He, K., K. R. Iyer, R. N. Hayes, M. W. Sinz, T. F. Woolf and P. F. Hollenberg (1998). "Inactivation of Cytochrome P450 3A4 by Bergamottin, a Component of Grapefruit Juice." *Chem. Res. Toxicol.* 11: 252-259.
- Henderson, L., Q. Y. Yue, C. Bergquist, B. Gerden and P. Arlett (2002). "St John's wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes." *Br J Clin Pharmacol* 54: 349-56.
- Jacobsen, L. B., S. A. Calvin, K. E. Colvin and M. Wright (2004). "FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power." *Methods* 33: 104-112.
- Jones, S. A., L. B. Moore, J. L. Shenk, G. B. Wisely, G. A. Hamilton, D. D. McKee, N. C. Tomkinson, E. L. LeCluyse, M. H. Lambert, T. M. Willson, S. A. Kliewer and J. T. Moore (2000). "The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution." *Mol Endocrinol* 14: 27-39.
- Klein-Hitpass, L., G. U. Ryffel, E. Heitlinger and A. C. B. Cato (1988). "A 13-Bp Palindrome Is a Functional Estrogen Responsive Element and Interacts Specifically with Estrogen-Receptor." *Nucleic Acids Research* 16: 647-663.
- Klein-Hitpass, L., M. Schorpp, U. Wagner and G. U. Ryffel (1986). "An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells." *Cell* 46: 1053-61.
- Kliewer, S. A., B. Goodwin and T. M. Willson (2002). "The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism." *Endocr Rev* 23: 687-702.
- Kliewer, S. A., J. T. Moore, L. Wade, J. L. Staudinger, M. A. Watson, S. A. Jones, D. D. McKee, B. B. Oliver, T. M. Willson, R. H. Zetterstrom, T. Perlmann and J. M. Lehmann (1998). "An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway." *Cell* 92: 73-82.
- Klinge, C. M., F. V. Peale, Jr., R. Hilf, R. A. Bambara and S. Zain (1992). "Cooperative estrogen receptor interaction with consensus or variant estrogen responsive elements in vitro." *Cancer Res* 52: 1073-81.
- Korzekwa, K. R., N. Krishnamachary, M. Shou, A. Ogai, R. A. Parise, A. E. Rettie, F. J. Gonzalez and T. S. Tracy (1998). "Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites." *Biochemistry* 37: 4137-47.
- Krasowski, M., K. Yasuda, L. Hagey and E. Schuetz (2005). Evolutionary selection across the nuclear hormone receptor superfamily with a focus on the NR1I subfamily (vitamin D, pregnane X, and constitutive androstane receptors). 3: 2.
- Kretschmer, X. C. and W. S. Baldwin (2005). "CAR and PXR: Xenosensors of endocrine disrupters?" *Chemico-Biological Interactions* 155: 111-128.
- Kuiper, G. G., E. Enmark, M. Pelto-Huikko, S. Nilsson and J. A. Gustafsson (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5925-30.
- Kuiper, G. G. J. M., J. G. Lemmen, B. Carlsson, J. C. Corton, S. H. Safe, P. T. van der Saag, B. van der Burg and J.-A. Gustafsson (1998). "Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor {beta}." *Endocrinology* 139: 4252-4263.

- Kumar, V. and P. Chambon (1988). "The Estrogen-Receptor Binds Tightly to Its Responsive Element as a Ligand-Induced Homodimer." *Cell* 55: 145-156.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-5.
- Laudet, V. and H. Gronmeyer (2002). *The Nuclear Receptor FactsBook*, Academic Press.
- Lehmann, J. M., D. D. McKee, M. A. Watson, T. M. Willson, J. T. Moore and S. A. Kliewer (1998). "The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions." *J Clin Invest* 102: 1016-23.
- Lemaire, G., W. Mnif, J. M. Pascussi, A. Pillon, F. Rabenoelina, H. Fenet, E. Gomez, C. Casellas, J. C. Nicolas, V. Cavailles, M. J. Duchesne and P. Balaguer (2006). "Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system." *Toxicological Sciences* 91: 501-509.
- Li, A. P., D. L. Kaminski and A. Rasmussen (1995). "Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4." *Toxicology* 104: 1-8.
- Li, D., T. Yamada, F. Wang, A. I. Vulin and H. H. Samuels (2004). "Novel Roles of Retinoid X Receptor (RXR) and RXR Ligand in Dynamically Modulating the Activity of the Thyroid Hormone Receptor/RXR Heterodimer." *J. Biol. Chem.* 279: 7427-7437.
- Li, Y., M. H. Lambert and H. E. Xu (2003). "Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics." *Structure* 11: 741-6.
- Lilja, J. J., M. Neuvonen and P. J. Neuvonen (2004). "Effects of regular consumption of grapefruit juice on the pharmacokinetics of simvastatin." *British Journal of Clinical Pharmacology* 58: 56-60.
- Lin, J. H. and A. Y. Lu (1998). "Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications." *Clin Pharmacokinet* 35: 361-90.
- Lonard, D. M., S. Y. Tsai and B. W. O'Malley (2004). "Selective estrogen receptor modulators 4-hydroxytamoxifen and raloxifene impact the stability and function of SRC-1 and SRC-3 coactivator proteins." *Mol Cell Biol* 24: 14-24.
- Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995). "The Rxx Heterodimers and Orphan Receptors." *Cell* 83: 841-850.
- Mansuy, D. (1998). "The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 121: 5-14.
- Matic, M., A. Mahns, M. Tsoli, A. Corradin, P. Polly and G. R. Robertson (2007). "Pregnane X receptor: promiscuous regulator of detoxification pathways." *Int J Biochem Cell Biol* 39: 478-83.
- Matthews, J. and J. A. Gustafsson (2006). "Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways." *Nucl Recept Signal* 4: e016.
- Min, G., H. Kim, Y. Bae, L. Petz and J. K. Kemper (2002). "Inhibitory cross-talk between estrogen receptor (ER) and constitutively activated androstane receptor (CAR). CAR inhibits ER-mediated signaling pathway by squelching p160 coactivators." *J Biol Chem* 277: 34626-33.

- Mnif, W., J.-M. Pascussi, A. Pillon, A. Escande, A. Bartegi, J.-C. Nicolas, V. Cavailles, M.-J. Duchesne and P. Balaguer (2007). "Estrogens and antiestrogens activate hPXR." *Toxicology Letters* 170: 19-29.
- Moore, L. B., B. Goodwin, S. A. Jones, G. B. Wisely, C. J. Serabjit-Singh, T. M. Willson, J. L. Collins and S. A. Kliewer (2000). "St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7500-2.
- Moreau, A., M. J. Vilarem, P. Maurel and J. M. Pascussi (2008). "Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response." *Molecular Pharmaceutics* 5: 35-41.
- Mosselman, S., J. Polman and R. Dijkema (1996). "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor." *FEBS Lett* 392: 49-53.
- Nelson, D. L., A. L. Lehninger and M. M. Cox (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. New York, Freeman.
- Nelsons Cytochrome P450 homepage, D. "Cytochrome P450 Homepage." from <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>.
- Nockefin, L., H. Breuter and D. Reimers (1973). "Effects of Rifampicin on Menstrual-Cycle and on Estrogen Excretion in Patients Taking Oral-Contraceptives." *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 98: 1521-1523.
- NRNC (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily Nuclear Receptors Nomenclature Committee *Cell* 97 2
- Ohtake, F., A. Baba, Y. Fujii-Kuriyama and S. Kato (2008). "Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings." *Biochem Biophys Res Commun* 370: 541-6.
- Ohtake, F., A. Baba, I. Takada, M. Okada, K. Iwasaki, H. Miki, S. Takahashi, A. Kouzmenko, K. Nohara, T. Chiba, Y. Fujii-Kuriyama and S. Kato (2007). "Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase." *Nature* 446: 562-6.
- Pacyniak, E. K., X. Cheng, M. L. Cunningham, K. Crofton, C. D. Klaassen and G. L. Guo (2007). "The Flame Retardants, Polybrominated Diphenyl Ethers, Are Pregnane X Receptor Activators." *Toxicol. Sci.* 97: 94-102.
- Prescott, L. F. (2000). "Paracetamol, alcohol and the liver." *British Journal of Clinical Pharmacology* 49: 291-301.
- Rang, H. P. (2003). *Pharmacology*. Edinburgh, Churchill Livingstone, (p.106-119).
- Reid, G., S. Denger, M. Kos and F. Gannon (2002). "Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation." *Cell Mol Life Sci* 59: 821-31.
- Rendic, S. and F. J. Di Carlo (1997). "Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors." *Drug Metab Rev* 29: 413-580.
- Rotchell, J. M. and G. K. Ostrander (2003). "Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms." *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* 6: 453-495.
- Rushmore, T. H. and C. B. Pickett (1993). "Glutathione S-Transferases, Structure, Regulation, and Therapeutic Implications." *Journal of Biological Chemistry* 268: 11475-11478.

- Sherf, B. A. and S. L. Navarro (1996). "Dual-Luciferase™ Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays." *Promega Notes Magazine* 57.
- Sherf, B. A., S. L. Navarro, R. R. Hannah and K. V. Wood (1996). "Novel reporter gene technology integrating firefly and Renilla luciferase assays for internal control." *Molecular Biology of the Cell* 7: 925-925.
- Shulman, A. I., Mangelsdorf, D. J. 2005 Mechanisms of disease: Retinoid X receptor heterodimers in the metabolic syndrome *New England Journal of Medicine* 353 6 604-615 Aug 11
- Sinz, M., S. Kim, Z. Zhu, T. Chen, M. Anthony, K. Dickinson and A. D. Rodrigues (2006). "Evaluation of 170 xenobiotics as transactivators of human pregnane X receptor (hPXR) and correlation to known CYP3A4 drug interactions." *Curr Drug Metab* 7: 375-88.
- Slørdal, L. and O. Spigset (2005). "Grunnleggende farmakokinetikk - Absorpsjon." *Tidsskrift for Den norske legeforening* 886-887.
- Smirlis, D., R. Muangmoonchai, M. Edwards, I. R. Phillips and E. A. Shephard (2001). "Orphan receptor promiscuity in the induction of cytochromes P450 by xenobiotics." *Journal of Biological Chemistry* 276: 12822-12826.
- Staudinger, J. L., B. Goodwin, S. A. Jones, D. Hawkins-Brown, K. I. MacKenzie, A. LaTour, Y. Liu, C. D. Klaassen, K. K. Brown, J. Reinhard, T. M. Willson, B. H. Koller and S. A. Kliewer (2001). "The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3369-74.
- Tabb, M. M. and B. Blumberg (2006). "New modes of action for endocrine-disrupting chemicals." *Molecular Endocrinology* 20: 475-482.
- Walker, R. and C. Edwards (2003). *Clinical pharmacy and therapeutics*. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Watkins, J. B. and C. D. Klaassen (1986). "Xenobiotic Biotransformation in Livestock - Comparison to Other Species Commonly Used in Toxicity Testing." *Journal of Animal Science* 63: 933-942.
- WHO (2002) *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*, in WHO/PCS/EDC WHO
- WHO. (2003). "TREATMENT OF TUBERCULOSIS: GUIDELINES FOR NATIONAL PROGRAMMES." 3. from http://www.who.int/tb/publications/cds_tb_2003_313/en/.
- Wyde, M. E., E. Bartolucci, A. Ueda, H. Zhang, B. F. Yan, M. Negishi and L. You (2003). "The environmental pollutant 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethylene induces rat hepatic cytochrome P4502B and 3A expression through the constitutive androstane receptor and pregnane X receptor." *Molecular Pharmacology* 64: 474-481.
- Xie, W., J. L. Barwick, C. M. Simon, A. M. Pierce, S. Safe, B. Blumberg, P. S. Guzelian and R. M. Evans (2000). "Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR." *Genes Dev* 14: 3014-23.
- Yadete, F., A. Arukwe, A. Goksoyr and R. Male (1999). "Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon in vivo by the environmental estrogen, 4-nonylphenol." *Science of the Total Environment* 233: 201-210.

- Yano, J. K., M. R. Wester, G. A. Schoch, K. J. Griffin, C. D. Stout and E. F. Johnson (2004). "The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-angstrom resolution." *Journal of Biological Chemistry* 279: 38091-38094.
- Zhou, S., E. Chan, S.-Q. Pan, M. Huang and E. J. D. Lee (2004). "Pharmacokinetic Interactions of Drugs with St John's Wort." *J Psychopharmacol* 18: 262-276.
- Zilly, W., D. D. Breimer and E. Richter (1975). "Induction of drug metabolism in man after rifampicin treatment measured by increased hexobarbital and tolbutamide clearance." *European Journal of Clinical Pharmacology* 9: 219-227.

Appendiks

1. Sekvensanalyse

1.1 Sekvensanalyse av subklona plasmid som ikkje hadde korrekt innsatt fragment

```
5´ GACTTTCTCTATCGATAGGTACCGAGTTTCTAGACGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGACT  
CGAGCGGAGTACTGTCCTCCGATCGGAGTACTGTCCTCCGCGAATTCCGGAGTACTGTCCTCCGAAGACGCTAGC  
GGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCTCACTCTAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGT  
ACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGAT  
GGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAAGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGAT  
GCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGA  
TATGGGCTGAATACAAAT 3´
```

Figur 27: Sekvensanalyse av pG5Luc med CYP3A3 responselement (sekvensid GS 73). Sekvensen viser at vektor ikkje er kutta. GAL4 bindingssetet er framleis i vektor (utheva i grønt). Rødt viser kutteteser for restriksjonsenzym Acc651 og NheI.

```
5´ GACTTTCTCTATCGATAGGTACCGAGTTTCTAGACGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGACT  
CGAGCGGAGTACTGTCCTCCGATCGGAGTACTGTCCTCCGCGAATTCCGGAGTACTGTCCTCCGAAGACGCTAGC  
GGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGCGTTCGTCTCACTCTAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGT  
ACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGAT  
GGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAAGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGAT  
GCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGA  
TATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGC  
GCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGC  
ATTTGCGAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTC 3´
```

Figur 28: Sekvensanalyse av pG5Luc med DR1 responselement (sekvensid GS 89). Sekvensen viser at vektor ikkje er kutta. GAL4 bindingssetet er framleis i vektor (utheva i grønt). Rødt viser kutteteser for restriksjonsenzym Acc651 og NheI.

1.2 Sekvensanalyse av subklona plasmid som hadde korrekt innsatt fragment.

```
5´ TTTCTCTATCGATCGGTACCCAGGTCAAGACAGGTCAAGCAGCCAGGTCAAGACAGGTCAAGCAGCCAGGTCAAGACA  
GGTCAAGCAGGGGGGGCTATAAAAGGGGGTGGGGGGCGTTTCGTCCTCACTCTAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGG  
CATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCG  
CTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCTTGGAAACAATTGCT  
TTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCT  
ATGAAACGATATGGGCTGAATACAAA 3´
```

Figur 29: Sekvensanalyse av pG5Luc med korrekt DR3 responselement (sekvensid GS 143). Sekvensen viser at vektor er kutta og at 3x DR3 sekvensen er satt inn i vektor. Rødt viser kuttsetter for restriksjonsenzym Acc651 og NheI.

```
5´ TTCTCTGGCCTAACTGGCCGGTACCCAGGTCAAGAGTGACCGAGTGGCAGCCAGGTCAGAGTGACCTGGCAGAATTCG  
AACACGCAGATGCAGTCGGGGCGGGCGGGTCCCAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAAC  
ACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAAAAGCTTGGCAATCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGCTTCCAA  
GGTGTACGACCCCGAGCAACGCAAACGCATGATCACTGGGCCTCAGTGGTGGGCTCGCTGCAAGCAAATGAACGT  
GCTGGACTCCTTCATCAACTACTATGATTCCGAGAAGCACGCCGAGAACGCCGTGATTTTTCTGCATGGTAACGC  
TGCCTCCAGCTACCTGTGGAGGCACGTCGTGCCTCACATCGAGCCCGTGGCTAGATGCATCATCCCTGATCTGAT  
CGGAATGGGTAAGTCCGGCAAGAGCGGGAATGGCTCATATCGCCTCCTGGATCACTACAAGTACCTCACCGCTTG  
GTTTCGAGCTGCTGAACCTTCCAAAGAAAATCATCTTTGTGGGCCACGACTGGGGGGCTTGTCTGGCCTTTACTA  
CTCCTACGAGCACCAAGACAAGATCAAGGCCATCGTCCATGCTGAGAGTGTCTGGACGTGATCGAGTCTTGGGA  
CGAGTGGCCTGACATCGAGGAGGATATCGCCCTGATCAAGAGCGAAGAGGGCGAGAAAATGGTGTCTGAGAAATA  
CTTCTTCGTCGAGACCATGCTCCCAAGCAAGATCATGCGGAAACTGGAGCCTGAGGAGTTCGCTGCCTACCTGGA  
GCCATTCAAGGAGAAGGGCGAGGTTAGACGGCCTACCCTCTCCTGGCCTCGCGAGATCCCTCTCGTTAAGGGAGG  
CAAGCCCGACGTCGTCCAGATTGTCCGCAACTACNNGCCTACCTTCGGGCCAGCGACGATCTGCCTAANANGTTC  
ATCGAGTCCGACCCTGGGTTCTTTTCCAACNN 3´
```

Figur 30: Sekvensanalyse av pGL4.74 med ERE responselement (sekvensid GS 172). Sekvensen viser at vektor er kutta. Rødt viser kuttsetter for restriksjonsenzym Acc651 og EcoRI. Responselementet 2x ERE er satt inn i vektor (blå nukleotider).

