



Stresspecifika förstärkare i regleringen av transkriptionen under värmechock

Ingrid Karppi, 1800935

ikarppi@abo.fi

Pro gradu-avhandling i cellbiologi

CB00BR56, 30 sp

Handledare: professor Lea Sistonen

Praktiska handledare: FM Samu Himanen

FM Mikael Puustinen

Utbildningsprogrammet i cellbiologi

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Åbo Akademi

2020

ÅBO AKADEMI – FAKULTETEN FÖR NATURVETENSKAPER OCH TEKNIK
Abstrakt för avhandling pro gradu

Ämne: Cellbiologi	
Författare: Ingrid Karppi	
Titel: Stressspecifika förstärkare i regleringen av transkriptionen under värmechock	
Handledare: Samu Himanen	Handledare: Mikael Puustinen
<p>Abstrakt:</p> <p>Genuttrycket i eukaryota celler kontrolleras noga i respons till både yttre och inre signaler, genom reglerande icke-kodande sekvenser så som promotorer och förstärkare (eng. enhancer). Förstärkare inducerar transkription av en målgen genom att direkt växelverka med gensens promotor, genom att rekrytera kromatinremodellerande komplex eller genom att själv transkriberas till eRNA. Både eRNA-transkripten och eRNA-syntesen i sig har påvisats öka uttrycket av gener i förstärkarens genomiska region. Genuttrycket förändras kraftigt vid utsättning för värmestress, genom aktivering av värmechockresponsen. HSF1 och HSF2 förmedlar responsen genom att stimulera transkription av gener som kodar för HSP-chaperoner, vilka medverkar i skyddande mot den proteinaggregering som uppstår till följd av ökade temperaturer. Trots att värmechockresponsen är ett grundligt studerat cellulärt fenomen, är förändringar i aktiviteten hos förstärkare vid ökade temperaturer ännu inte kartlagda. Ännu opublicerade resultat från analyser med PRO-seq vid Sistonen-laboratoriet (Åbo Akademi) visar att mängden eRNA förändras för ca 4000 förstärkare vid värmechock i mus embryonala fibroblaster (MEF). Syftet med min avhandling pro gradu var att bestämma om det bland dessa sekvenser finns stressspecifika förstärkare vars aktivitet förändras vid värmestress.</p> <p>Aktiviteten hos varje utvald sekvens vid värmechock bestämdes med hjälp av luciferasanalys och qRT-PCR. Sekvenserna inkorporerades i LUC2-luciferasrapportörplasmider, i vilka uttrycket av LUC2-rapportörgenen är proportionell mot den reglerande aktiviteten i det inkorporerande fragmentet. Konstruktionerna transfekterades in i MEF-celler som utsattes för värmechock, varefter mängden LUC2-mRNA och LUC2-protein bestämdes med qRT-PCR respektive luciferasanalys. Trots att den tidigare utförda PRO-seq-undersökningen tydde på värmechockkänslig förstärkaraktivitet hos de utvalda sekvenserna, minskade förstärkaraktiviteten vid värmechock hos majoriteten av de studerade förstärkarkandidaterna enligt både luciferasanalys och qRT-PCR. Detta kan tyda på problem gällande metodiken, att eRNA-transkription förhindrar promotoraktivitet i förstärkarkonstruktioner eller att sekvenserna trots prognoser saknar värmechockkänslig förstärkaraktivitet. För att vidare bestämma om en förstärkares orientering inverkar på dess aktivitet, tillverkades för en förstärkare två olika konstruktioner där förstärkaren inkorporerades i dess båda möjliga riktningar i jämförelse med luciferaspromotorn i de två olika konstruktionstyperna. Riktningen av den ifrågavarande förstärkaren var inte av central betydelse för dess funktion. Endast preliminära resultat hann emellertid fås på grund av tidsbegränsningar orsakade av COVID-19-pandemin, och försöken borde i framtiden upprepas och optimeras.</p>	
Nyckeltermerna: HSF1, HSF2, förstärkare, eRNA, IFN-I	
Datum: 28.10.2020	Sidoantal: 79

ÅBO AKADEMI UNIVERSITY – FACULTY OF SCIENCE AND ENGINEERING
English abstract

Subject: Cell biology	
Author: Ingrid Karppi	
Title: The role of stress-specific enhancers in the regulation of transcription during heat shock	
Supervisor: Samu Himanen	Supervisor: Mikael Puustinen
<p>Abstract:</p> <p>Gene expression in eukaryotic cells is carefully controlled in response to both external and internal signals, through regulatory non-coding sequences such as promoters and enhancers. An enhancer can increase the expression of a target gene by directly interacting with the promoter, by recruiting chromatin remodeling complexes, or by being transcribed into eRNA. Both the eRNA transcripts and the eRNA synthesis per se have been shown to increase the expression of genes within the genomic region of an enhancer. Gene expression patterns change abruptly upon exposure to heat stress, through activation of the heat shock response (HSR). HSF1 and HSF2 mediate the response by stimulating transcription of genes encoding HSP chaperones that participate in the protection against heat induced protein aggregates. Although the HSR is a thoroughly investigated cellular phenomenon, changes in the activity of enhancers at increased temperatures are yet to be studied. Still unpublished results from a PRO-seq study conducted at the Sistonen laboratory (Åbo Akademi University) show that the eRNA levels change for approximately 4000 enhancers upon heat shock in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). The purpose of my thesis was to determine if among these sequences there are stress-specific enhancers whose activity is altered during stress.</p> <p>The activity of each selected sequence during heat stress was determined by luciferase assay and qRT-PCR. The sequences were incorporated into LUC2 luciferase reporter plasmids, in which the expression of the LUC2 reporter gene is proportional to the regulatory activity of the incorporated fragment. The constructs were then transfected into MEFs that were exposed to heat shock, whereafter LUC2-mRNA and protein levels were determined using qRT-PCR and luciferase assay, respectively. Although previously performed PRO-seq studies indicated heat-sensitive enhancer activity in the selected sequences, reduced enhancer activity upon heat shock was detected for the majority of the examined enhancer candidates according to both luciferase assay and qRT-PCR. This may indicate problems with methodology, that eRNA transcription prevents promoter activity in enhancer constructs or that the sequences, despite predictions, lack heat-sensitive enhancer activity. Additionally, in order to determine whether the orientation of an enhancer affects its activity, one enhancer was incorporated in its two possible directions relative to the luciferase promoter, into two separate construct types. The orientation of the enhancer in question was found not to be of central importance to its function. However, only preliminary results were obtained due to time constraints caused by the COVID-19 pandemic, and it is recommendable that in future research the experiments are repeated and further optimized.</p>	
Key terms: HSF1, HSF2, enhancer, eRNA, IFN-I	
Date: 28 October 2020	Number of pages: 79

Innehållsförteckning

Abstrakt för avhandling pro gradu

English abstract

Lista på använda förkortningar

1 Inledning	1
2 Litteraturoversikt.....	3
2.1 Gener och närliggande reglerande sekvenser.....	3
2.2 Transkription av proteinkodande gener	4
2.3 Förstärkare	6
2.3.1 Transkription av förstärkare – eRNA.....	9
2.3.2 Forskning i förstärkare	10
2.4 Värmechockresponsen	12
2.4.1 Värmechockfaktorer.....	12
2.4.2 Reglerande sekvenser vid värmechock	16
2.5 Respons mot oxidativ stress.....	17
2.6 Interferonsignalering.....	19
2.6.1 Interferonresponsen.....	19
2.6.2 Interferonsignaleringens växelverkan med värmechockproteiner.....	20
3 Målsättningar	21
4 Metoder	23
4.1 Cellinjer.....	23
4.2 Dataanalys av förstärkarsekvenser.....	23
4.3 In-fusionskloning	24
4.3.1 Linjärisering av luciferasrapportörplasmid	28
4.3.2 Amplifiering av förstärkar- och promotorfragment	28
4.4 Transformation.....	30
4.5 Transfektion	31
4.5.1 Elektroporering.....	31
4.5.2 Inhibering av interferonrespons orsakad av transfektion	32
4.6 Behandlingar som inducerar värmechock.....	32
4.7 Luciferasanalys	32
4.7.1 Luciferasanalys med LUC2-luciferas.....	33
4.7.2 β -galaktosidasanalys.....	35
4.8 Kvantitativ polymeraskedjereaktion med omvänd transkription	36
4.8.1 qRT-PCR-metoder	37
4.8.2 Mätning av LUC2-mRNA med hjälp av qRT-PCR	37

5 Resultat	41
5.1 Sekvensering av luciferaskonstruktioner	41
5.2 Analys av förstärkarkandidater med hjälp av SCREEN-databasen	41
5.3 Luciferasanalys	42
5.3.1 Mätning av förstärkaraktivitet i celler som inte behandlats med inhibitorer av IFN-I-signalering.....	42
5.3.2 Mätning av förstärkaraktivitet i celler som behandlats med inhibitorer av IFN-I-signalering.....	43
5.3.3 Olika promotorers inflytande på luciferasuttrycket.....	44
5.3.4 Inverkan av inhibitorer av IFN-I-signalering på aktiviteten hos HSPA1A-promotorn.....	45
5.4 qRT-PCR.....	47
5.4.1 Mätning av LUC2-mRNA med SYBR Green-metoden.....	47
5.4.2 Mätning av LUC2-mRNA med TaqMan-analys.....	48
6 Diskussion.....	50
6.1 Förstärkaraktivitet kan avta vid stress om inhibitorer av IFN-I-signalering inte använts vid transfektion	51
6.2 Tilläggning av promotorer framför LUC2-genen i rapportörplasmider kan störa LUC2-uttrycket.....	53
6.3 eRNA-syntes kan störa transkriptionen av LUC2-rapportörgenen.....	55
6.4 Orienteringen av EH9-förstärkaren har inte en betydande inverkan på dess aktivitet.	57
6.5 Inhibitorer av IFN-I-signalering kan orsaka stimulering av HSPA1A-promotorn	58
6.6 Mätning av LUC2-mRNA med qRT-PCR kräver vidare optimering.....	59
7 Avslutning.....	61
Tillkännagivanden.....	63
Litteraturförteckning	64
Bilaga A: Receptbilaga	69
Bilaga B: Luciferasrapportörplasmid.....	70
Bilaga C: Förstärkar- och promotorsekvenser	71
Bilaga D: Polymeraskedjereaktion.....	75
Bilaga E: qRT-PCR.....	79

Lista på använda förkortningar

A	adenin
bp	baspar
cDNA	komplementärt DNA (eng. complementary DNA)
ChIP-seq	kromatin immunprecipitationssekvensering (eng. chromatin immunoprecipitation sequencing)
Cul3	eng. cullin 3
Ct	eng. cycle threshold
CTCF	eng. CCCTC binding factor
CTF8	eng. chromosome transmission fidelity protein 8
DBD	DNA-bindande domän
DNas	deoxiribonukleas
DNas I	deoxiribonukleas I
eRNA	enhancer-RNA
FLUC	eng. firefly luciferase
gDNA	genomiskt DNA
HR-A/B	eng. heptad repeat A/B
HR-C	eng. carboxy-terminal heptad repeat
HS	värmechock (eng. heat shock)
HSE	värmechockelement (eng. heat shock element)
HSF	värmechockfaktor (eng. heat shock factor)
HSF1	värmechockfaktor 1 (eng. heat shock factor 1)
HSF2	värmechockfaktor 2 (eng. heat shock factor 2)
HSP	värmechockprotein (eng. heat shock protein)
HSP40	värmechockprotein 40 (eng. heat shock protein 40)
HSP70	värmechockprotein 70 (eng. heat shock protein 70)
HSP90	värmechockprotein 90 (eng. heat shock protein 90)
HSR	värmechockrespons (eng. heat shock response)
IFN	interferon
IFN-I	interferon typ I
IKK ϵ	eng. inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon
IRF	eng. interferon regulatory factor
IRF3	eng. interferon regulatory factor 3

IRF7	eng. interferon regulatory factor 7
IRF9	eng. interferon regulatory factor 9
ISRE	eng. interferon stimulated response element
JAK1	januskinas 1
kb	kilobaspar
KEAP1	eng. kelch-like ECH-associated protein 1
LGALS3	galektin 3
LUC2	eng. luciferase 2
MEF	mus embryonala fibroblaster
mRNA	budbärar-RNA (eng. messenger RNA)
NAC	eng. no amplification control
ncRNA	icke-kodande RNA (eng. non-coding RNA)
NRF2	eng. nuclear factor erythroid 2-related factor 2
ONPG	orto-nitrofenyl- β -galaktosid (eng. ortho-nitrophenyl- β -galactoside)
ORI	replikationsstartställe (eng. origin of replication)
PCR	polymeraskedjereaktion (eng. polymerase chain reaction)
PITPNA	eng. phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform
PKR	proteinkinasa R
PRO-seq	eng. precision nuclear run-on sequencing
PTM	posttranslationell modifiering
qRT-PCR	kvantitativ polymeraskedjereaktion med omvänd transkription (eng. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)
RD	regulatorisk domän
RLU	eng. relative light unit
RNAPII	RNA-polymeras II
rRNA	ribosomalt RNA
ROS	reaktiva syreföreningar (eng. reactive oxygen species)
RSV	respiratoriskt syncytialvirus
SCP1	eng. super core promoter 1
siRNA	eng. small interfering RNA
STARR-seq	eng. self-transcribing active regulatory region sequencing
STAT1	eng. signal transducer and activator of transcription protein 1

STAT2	eng. signal transducer and activator of transcription protein 2
T	tymin
TAD	eng. topologically associating domain (i texten TAD-struktur)
TAD	eng. transactivation domain (i texten TAD-domän)
TBK1	eng. TANK-binding kinase 1 TANK, TRAF family member-associated nuclear factor kappa-B kinase activator TRAF, tumor necrosis factor receptor-associated factor
TLR2	eng. toll-like receptor 2
TLR4	eng. toll-like receptor 4
TSS	transkriptionsstartställe
TYK2	tyrosinkinase 2
UTR	eng. untranslated region

1 Inledning

Transkriptionen av en proteinkodande gen är en komplicerad process som noggrant regleras vid genens promotor (Proudfoot et al., 2002). Promotorer kan stimuleras av förstärkare (eng. enhancer), alltså reglerande sekvenser med kapacitet att inducera transkription av proteinkodande gener (Haberle & Stark, 2018). Förstärkare kan styra promotorer genom fysisk kontakt eller genom att själv transkriberas till enhancer-RNA (eRNA) (Haberle & Stark, 2018). Transkriptionen av eRNA har i allmänhet påvisats ha en positiv inverkan på transkriptionen av förstärkarens målgener (Chen et al., 2017; Mikhaylichenko et al., 2018).

Genuttrycket förändras kraftigt vid olika typer av stress, så som värmechock och oxidativ stress. Cellen kan skydda sig mot följderna av proteinskadande stress genom responser som förändrar cellens transkriptionella program. Värmechockresponser förmedlas av exempelvis värmechockfaktor 1&2 (eng. heat shock factor 1&2, HSF1&2), vilka inducerar transkription av chaperonproteiner som deltar i skydd mot proteinaggregat. Responser mot oxidativ stress förmedlas huvudsakligen av NRF2-transkriptionsfaktorn (eng. nuclear factor erythroid 2-related factor 2), som inducerar transkription av antioxidativa enzymer. (Himanen & Sistonen, 2019)

Även aktiviteten hos förstärkare förändras vid proteinskadande stress enligt resultat i PRO-seq-undersökningar (eng. precision nuclear run-on sequencing) vid Sistonenlaboratoriet (Åbo Akademi). Resultaten visar att mängden eRNA förändras för ca 4000 förstärkare vid värmechock och ca 3600 förstärkare vid oxidativ stress i mus embryonala fibroblaster (MEF). Eftersom förstärkare har en central roll i genuttrycket (Muerdter et al., 2015) och stressresponser kan utnyttjas av cancerceller (Joutsen & Sistonen, 2019), kan forskning av värmekänsliga förstärkare ha viktiga tillämpningar inom exempelvis cancerforskningen.

Sju sekvenser valdes ut från PRO-seq-datamaterialet för att studeras vidare inför denna pro gradu-avhandling. Aktiviteten hos varje utvald sekvens vid värmechock bestämdes med hjälp av luciferasanalys och kvantitativ polymeraskedjereaktion med omvänd transkription (eng. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR). De utvalda förstärkarsekvenserna amplifierades från musens DNA och inkorporerades med hjälp av in-fusionskloning i rapportörplasmider, i vilka den syntetiska LUC2-genen (eng. luciferase 2) fungerar som rapportör. I LUC2-rapportörplasmiden är transkriptionen av LUC2-genen proportionell mot den

reglerande aktiviteten i det inkorporerande fragmentet (Muerdter et al., 2015; Muerdter et al., 2018), och därför kunde förstärkarkandidaterna på ett ändamålsenligt sätt studeras med hjälp av plasmiden. Förstärkarkonstruktionerna transformerades till Stellar Competent HST08 Escherichia coli (E. coli) bakterier för tillverkning av tillräckliga mängder plasmidkonstruktioner inför transfektioner. Konstruktionerna transfekterades in i MEF-celler med hjälp av elektroporering och behandlades i samband med detta med inhibitorer av interferon typ I-signalering (IFN-I), eftersom IFN-I-signalering kan aktiveras av plasmidtransfektion (Huerfano et al., 2013). Efter återhämtning av transfektionen utsattes cellerna för värmechock (eng. heat shock, HS) vid 42 °C i 1 h, varefter mängden LUC2-mRNA och LUC2-protein bestämdes med qRT-PCR respektive luciferasanalys. Förstärkarkandidaterna analyserades också med hjälp av ENCODE SCREEN-databasen som innehåller 527 000 potentiella reglerande sekvenser hos musen.

2 Litteraturöversikt

2.1 Gener och närliggande reglerande sekvenser

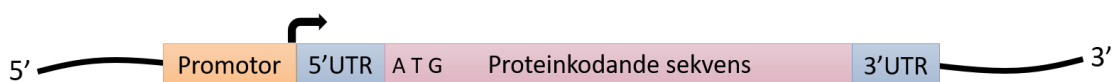
Cellens genetiska information består av DNA. DNA-molekylen byggs upp av två motsatt riktade kedjor av deoxiribonukleotider, som består av sockret deoxiribos och en av de fyra kvävebaserna adenin (A), cytosin (C), guanin (G) eller tymin (T). Deoxiribos har en hydroxylgrupp i dess 3'-kol och en fosfatgrupp i dess 5'-kol. Genom att 3'-hydroxylgruppen reagerar med 5'-fosfatgruppen hos följande nukleotid, byggs nukleotiderna ihop till en kedja. Eftersom den färdiga DNA-kedjan därmed erhåller så kallade 3'- och 5'-ändor, har kedjan en riktning. DNA-strängarna hålls ihop genom vätebindningar mellan de kväveinnehållande baserna, det vill säga basparning, vid vilken A är komplementär till T och C till G. (Watson & Crick, 1953)

DNA finns inte fritt i cellkärnan utan packas tillsammans med proteiner ihop till kromatin (Kouzarides, 2007). I den första nivån av DNA-packning vrids 147 baspar (bp) DNA runt oktamerer av histonproteinerna H3, H4, H2A och H2B, till så kallade nukleosomkärnpartiklar (Kouzarides, 2007). En nukleosom består av nukleosomkärnpartikeln samt av linker-DNA av varierande längd, vilket förbinder nukleosomkärnpartiklarna till varandra (Huang et al., 2018). Histonproteinerna har utåtvända svansar som kan bli posttranslationellt modifierade, främst genom acetylering, metylering, fosforylering, ubikvitinering och sumoylering (Kouzarides, 2007). En modifiering betecknas exempelvis H4K12ac: acetylerat lysin i position 12 av histon H4-proteinets aminosyrakedja. Modifieringarna fungerar som markörer för proteiner som växelverkar med kromatinet och appliceras enligt behov under rådande omständigheter (Kouzarides, 2007). Tillsättning och bortklyvning av histonmarkörer katalyseras av olika histonmodifierande enzymer, till exempel acetyltransferaser respektive deacetylaser (Kouzarides, 2007). Vissa markörer rekryterar kromatinremodellerande komplex som omarbetar kromatinet, alltså packar ihop eller löser upp det, genom att flytta på nukleosomkärnpartiklar (Kouzarides, 2007). Kromatinet delas upp i kromosomer, vars antal varierar mellan olika arter (Bonev & Cavalli, 2016). Exempelvis musen har 20 kromosomer (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2009).

I DNA innefattas proteinkodande gener, gener för icke-kodande RNA (eng. non-coding RNA, ncRNA) samt övrigt icke-kodande DNA, vilket hos eukaryoter till stor

del består av reglerande sekvenser (The ENCODE Project Consortium, 2012). Informationen i en proteinkodande gen överförs genom att genen transkriberas av RNA-polymeras II (RNAPII), som syntetiserar en till genen komplementär budbärar-RNA-molekyl (eng. messenger RNA, mRNA) (Young, 1991). De flesta eukaryota genssekvenser innehåller icke-kodande intronsekvenser, vilka klyvs bort i samband med transkriptionen (Proudfoot et al., 2002). Den färdiga mRNA-molekylen används som templat vid translationen, det vill säga proteinsyntesen (Wilson & Doudna Cate, 2012). Gener för ncRNA transkriberas till RNA av DNA-beroende RNA-polymeraser, men syntetiseras inte till protein (Hüttenhofer et al., 2005). De ncRNA-molekylerna utför därför sina funktioner på RNA-nivå (Hüttenhofer et al., 2005). Ribosomalt RNA (rRNA), siRNA (eng. small interfering RNA) och långt icke-kodande RNA (eng. long non-coding RNA, lncRNA) är exempel på ncRNA-molekyler (Hüttenhofer et al., 2005; Ma et al., 2013).

Kring en proteinkodande gen finns reglerande sekvenser som har inflytande på genens transkription (figur 1) (Haberle & Stark, 2018). Framför varje gen finns en promotor som innefattar genens transkriptionsstartställe (TSS) samt sekvenser där RNAPII binder (Haberle & Stark, 2018). Runt eukaryota genssekvenser finns UTR-sekvenser (eng. untranslated region) som inte tillhör den proteinkodande sekvensen men som också transkriberas (Barrett et al., 2012). Särskilt 3'UTR-sekvensen reglerar effektiviteten av proteinsyntesen samt stabiliteten och lokaliseringen av mRNA-molekylen (Mayya & Duchaine, 2019).



Figur 1. En typisk proteinkodande gen i det eukaryota genomet, tillsammans med närliggande reglerande sekvenser. Framför varje gen finns en promotor som styr transkriptionen av genen. Transkriptionsstartstället i promotorn är markerat med en pil. De flesta gener har en 5'UTR-sekvens (eng. untranslated region) direkt framför och ett 3'UTR direkt efter den proteinkodande sekvensen, vilka transkriberas till mRNA, men syntetiseras inte till aminosyrakedjan. Proteinsyntesen börjar vid ATG-startkodonet efter promotorn.

2.2 Transkription av proteinkodande gener

RNAPII-beroende transkription av en proteinkodande gen sker i tre huvudsakliga steg: initiering, elongering och avslutning (Proudfoot et al., 2002). Transkriptionens tidpunkt och kvantitet regleras noga och styrs av transkriptionsfaktorer som binder till

promotorer och andra reglerande sekvenser (Haberle & Stark, 2018). Sex generella transkriptionsfaktorer associeras med RNAPII: transkriptionsfaktor II A (TFIIA), TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF och TFIIH (Orphanides et al., 1996). Dessa binder promotorn i en bestämd ordningsföljd, exempelvis genom igenkänning av specifika motiv i promotorsekvensen (Haberle & Stark, 2018). De generella transkriptionsfaktorerna rekryterar samtidigt RNAPII till promotorn, varmed det så kallade initieringskomplexet bildas (Haberle & Stark, 2018). Initieringskomplexet kan bryta vätebindningarna mellan DNA-kedjorna vid promotorn, varefter transkriptionen initieras vid TSS (Haberle & Stark, 2018). Initieringen sker ofta avbrutet, genom cykler av initiering och kortvarig mRNA-syntes (Goldman et al., 2009). RNAPII transkriberar ett 2–15 nukleotider långt mRNA-transkript varmed det återvänder till TSS och transkriptet lösgörs (Goldman et al., 2009). Efter cykler av avbruten initiering släpper RNAPII slutligen promotorn och påbörjar aktiv elongering (Goldman et al., 2009).

Under elongeringen syntetiserar RNAPII mRNA utifrån kodonerna i gensekvensen (Young, 1991). RNAPII kontrollerar basparning av fria nukleotider till DNA och inkorporerar dem till det växande mRNA:t vid korrekt basparning (Liu et al., 2013). Aktiv elongering sker emellertid inte alltid direkt efter initiering, eftersom RNAPII kan bromsas ned och pauseras då en 30–50 nukleotider lång mRNA-sekvens syntetiserats (Haberle & Stark, 2018). På detta sätt hålls RNAPII i beredskap för snabb aktivering av mRNA-syntes, och då cellen är i behov av genprodukten frisläpps RNAPII för aktiv elongering (Haberle & Stark, 2018). Transkriptionen av en proteinkodande gen avslutas då mRNA och RNAPII disassocierar från DNA-templet (Kuehner et al., 2011).

Under transkriptionen bearbetas mRNA på flera sätt i eukaryota celler (Proudfoot et al., 2002). Vid transkriptionens början tilläggs på 5'-ändan av det nya mRNA en metylguanosenrest, vilken binder proteiner som skyddar mRNA:t för nedbrytning och reglerar dess transport till cytosolen (Ramanathan et al., 2016). Under elongering bearbetas mRNA genom splitsning, det vill säga bortklyvning av introner (Proudfoot et al., 2002). Genom alternativ splitsning kan även exoner klyvas bort så att olika isoformer av proteinet skapas (Matlin et al., 2005). Vid transkriptionens avslutning lösgörs mRNA från RNAPII genom att klyvas vid ett specifikt lokus i dess 3'UTR-sekvens. Klyvningen utförs av ett enzymkomplex som förutom endonukleaser

innefattar ett polymeras som syntetiserar en ca 200 nukleotider lång polyadenosinsvans vid klyvningsstället (Proudfoot et al., 2002). Endast polyadenylerade mRNA:n exporteras till cytosolen, där polyadenosinsvansens längd är avgörande för halveringstiden av mRNA-molekyler i den exonukleasrika miljön (Proudfoot et al., 2002; Wu & Brewer, 2012). 3'UTR-sekvensen styr mRNA-stabiliteten genom att reglera både hastigheten med vilken polyadenosinsvansen bryts ned och hållbarheten av 5'-metylguanosinändan (Mayya & Duchaine, 2019).

2.3 Förstärkare

Förstärkare är en typ av reglerande sekvenser med kapacitet att stimulera transkription av proteinkodande gener (Haberle & Stark, 2018), ofta oberoende av orientering i relation till genen (Mikhaylichenko et al., 2018) (figur 2). Förstärkare kan vara positionerade både uppströms och nedströms av sina målgener, både i icke-kodande och kodande DNA, men också finnas inne i målgenen (Schoenfelder & Fraser, 2019). Inhibering av en förstärkare kan förhindra transkriptionen av dess målgener (Muerdter et al., 2015), vilket betyder att förstärkare utgör centrala genreglerande element (Schoenfelder & Fraser, 2019). Förstärkarna styr cellens totala genuttryck i enlighet med cellens karaktär och signaler från dess yttre (Schoenfelder & Fraser, 2019; Vihervaara et al., 2018; Muerdter et al., 2015). Detta möjliggörs av att celltypspecifika transkriptionsfaktorer binder förstärkare och bereder dem inför celltypspecifika responser på yttre signaler (Vihervaara et al., 2017). Ofta kan flera förstärkare reglera en gen på ett additivt sätt, men en förstärkare kan även reglera flera olika gener (Muerdter et al., 2015).

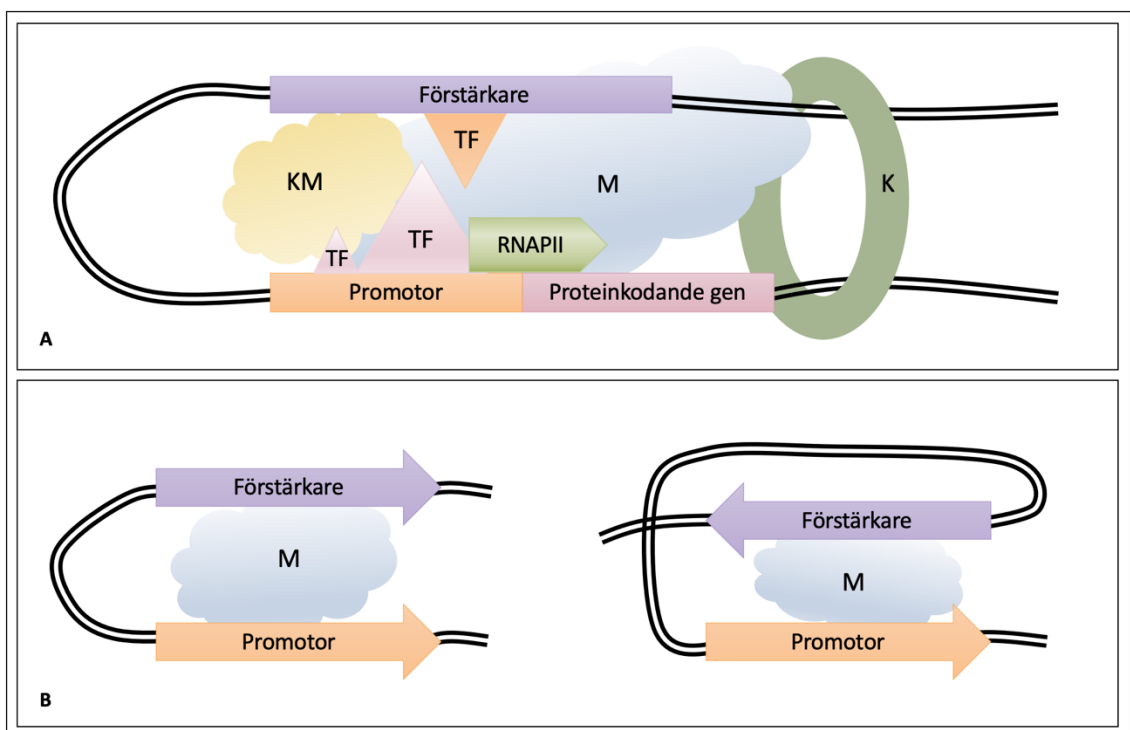
Förstärkare fungerar som bindningsställen för transkriptionsfaktorer, som genom att rekryteras till förstärkare kan växelverka med promotorbundna transkriptionsfaktorer (Haberle & Stark, 2018). Transkriptionsfaktorer på förstärkare kan rekrytera histonmodifierande enzym och kromatinremodellerande komplex, som kan omarbeta kromatinet vid promotorn (Hu & Tee, 2017). Förstärkaren kommer i närhet av promotorn genom att en öglestruktur formas mellan förstärkaren och dess målgen (Figur 2A) (Haberle & Stark, 2018). Transkriptionsfaktorerna på promotorn respektive förstärkaren kan därmed interagera genom olika samfaktorer, så som det så kallade mediorkomplexet (Haberle & Stark, 2018), som även direkt reglerar RNAPII-aktiviteten vid promotorn (Allen & Taatjes, 2015). Även transkriptionsfaktorer som

inverkar negativt på transkriptionen av en gen binder till både förstärkare och promotorer (Muerdter et al., 2015). De kombinerade signalerna från de olika transkriptionsfaktorerna bundna till förstärkar- och promotorsekvenser avgör med vilken effektivitet en gen transkriberas (Muerdter et al., 2015).

Öglor mellan förstärkare och promotorer bildas med hjälp av det ringformade kohesinproteinkomplexet (figur 2A) (Kagey et al., 2010). Öglorna är dynamiska strukturer som regleras av bland annat ncRNA (Schoenfelder & Fraser, 2019). Även mediator-komplexet har en central roll i formationen av kromatinöglan (Allen & Taatjes, 2015). Förstärkares positiva inverkan på promotorer genom öglestrukturer antydde först av Müller-Storm och medarbetare (1989) som genom att koppla en förstärkare till en promotor med hjälp av en proteinbrygga åstadkom inducering av promotorn. Studier där inducering av promotorer uppnåts av att de artificiellt placerats i öglor tillsammans med förstärkare, har senare bekräftat att öglor mellan förstärkare och promotorer kan leda till aktivering vid promotorn (Schoenfelder & Fraser, 2019).

Kromatinet fördelas även in i permanenta topologiska områden (eng. topologically associating domain, TAD), det vill säga hundratals nukleotider långa öglestrukturer som är sinsemellan isolerade men inom vilka förstärkare och promotorer kan växelverka med varandra (Szabo et al., 2019). I ändorna av TAD-strukturer finns sekvenser som det så kallade CTCF-proteinet (eng. CCCTC binding factor) binder till (Szabo et al., 2019). CTCF växelverkar med kohesin, som tillsammans med samfaktorer kopplar ihop de två avlägsna DNA-sekvenserna, så att en isolerad ögla formas mellan dem (Szabo et al., 2019). Då TAD-strukturer störts experimentellt har ändå få förändringar i gennuttrycket påvisats (Ghavi-Helm et al., 2019). Detta indikerar att TAD-strukturerna inte utgör huvudsakliga reglerare av växelverkan mellan förstärkare och promotorer (Ghavi-Helm et al., 2019). Vidare finns CTCF-bindningsställen i närheten av enbart minoriteten av aktiva gener och förstärkare, vilket ytterligare visar att promotorer och förstärkare kan växelverka oberoende av CTCF och TAD-strukturer (Schoenfelder & Fraser, 2019). Det finns alltså bevis för att förstärkar-promotor-kontakten uppnås av mediator-kohesin-förmedlade öglor, medan TAD-strukturernas betydelse för denna växelverkan fortfarande är oklar (Schoenfelder & Fraser, 2019).

Aktiviteten hos förstärkare är inducerbar, och förstärkare kan särskiljas på aktivitetsnivå efter kromatinsignatur (Schoenfelder & Fraser, 2019). Aktiva förstärkare är märkta med H3K27ac och förstärkare som är i beredskap för aktivering med H3K27me3 (Schoenfelder & Fraser, 2019). Vidare är förstärkare märkta med H3K4me1 oberoende av aktivitetsnivå (Schoenfelder & Fraser, 2019). Kromatinsignaturen hos förstärkare skiljer sig från promotorsignaturen genom att den innehåller enbart litet H3K4me3-märken (De Santa et al., 2010; Liang et al., 2004).



Figur 2. Formationen av en ögla mellan en förstärkare och en promotor. Förstärkare kan styra promotorer genom formationen av kromatinöglor. Ögla formas med hjälp av mediatorkomplexet (M) och kohesin (K), så att förstärkaren kommer i närheten av promotorn (A). Förstärkaren kan associera med kromatinremodellerande komplex (KM), som löser upp kromatinet vid promotorn och gör det lättillgängligt för RNA-polymeras II (RNAPII). Transkriptionsfaktorer (TF) bundna till promotorn respektive förstärkaren kan växelverka med varandra genom mediatorkomplexet, varmed RNAPII aktiveras och transkriptionen av genen påbörjas. Ögla mellan förstärkaren och promotorn kan skapas på flera olika sätt (B). Figur 2A är modifierad från Haberle & Stark (2018).

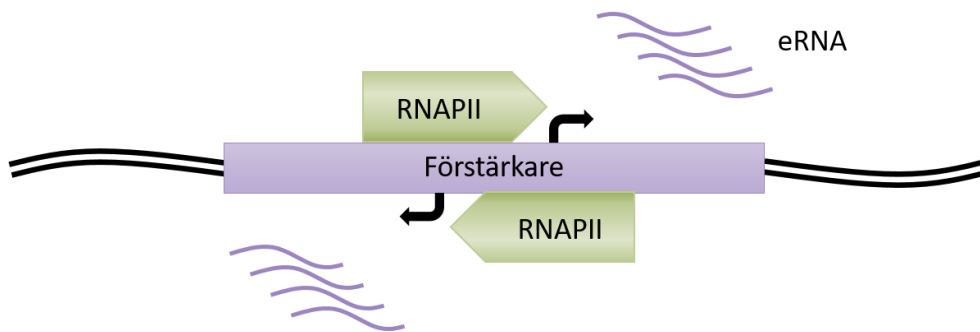
2.3.1 Transkription av förstärkare – eRNA

Förstärkare kan reglera promotorer genom att själv transkriberas till kortlivade och små (0,5–5 kb) ncRNA-molekyler kallade enhancer-RNA (eRNA) (Chen et al., 2017) (figur 3). Funktionen hos eRNA-molekylerna har sedan deras upptäckt debatterats intensivt (Kaikkonen & Adelman, 2018). Det sannolikt att eRNA-syntesen för vissa förstärkare endast är en sidoeffekt av transkriptionen som sker på förstärkarens målgen, eftersom kromatinet vid den aktiva förstärkaren är lättillgängligt för RNAPII (Kaikkonen & Adelman, 2018). Emellertid har allmänna samband mellan eRNA-uttryck, förstärkaraktivitet och genuttryck påvisats (Mikhaylichenko et al., 2018). Som exempel kan nämnas att Andersson och medarbetare (2014) visade att endast ett fåtal otraskriberade förstärkare innehar stimulerande aktivitet.

eRNA:n transkriberas i huvudsak av RNAPII (Chen et al., 2017) och genomgår i regel inte RNA-splitsning eller polyadenylering (Andersson et al., 2014). Transkriptionen av eRNA kan ske antingen i en enda riktning eller i två olika riktningar från två separata TSS i förstärkaren (Mikhaylichenko et al., 2018) (Figur 3). eRNA har påvisats endast i cellkärnan, där det ofta inverkar positivt på transkriptionen av gener i den ifrågasvarande förstärkarens genomiska region (De Santa et al., 2010; Andersson et al., 2014; Chen et al., 2017). Inhibering av eRNA, till exempel med siRNA, har i ett flertal studier påvisats minska på transkriptionen av den ifrågasvarande förstärkarens målgener (Chen et al., 2017). Vidare finns antydning att eRNA kunde ha viktiga funktioner i formationen av öglan mellan förstärkaren och promotorn, eftersom eRNA påvisats växelverka med både kohesin och mediatorkomplexet (Chen et al., 2017; Kaikkonen & Adelman, 2018).

I vissa fall kan själva eRNA-syntesen, snarare än eRNA-transkripten, inneha den stimulerande effekten på en närliggande promotor (Kaikkonen & Adelman, 2018). Det är möjligt att RNAPII i samband med eRNA-transkriptionen stöter av transkriptionsrepressorer eller öppnar upp kromatinstrukturen genom att flytta på nukleosomer (Kaikkonen & Adelman, 2018). Vidare kan RNAPII växelverka med aktiverande histonmodifierande enzymer (Kaikkonen & Adelman, 2018). Det är sannolikt att eRNA-transkriptionen av vissa förstärkare innehar sin viktigaste funktion i att den hindrar förstärkaren från att bli nedtystad i djupt packat kromatin (De Santa et al., 2010).

Transkriptionen av eRNA är inducerbar och varierar i enlighet med rådande cellulära omständigheter (De Santa et al., 2010; Kaikkonen & Adelman, 2018). eRNA-syntes av specifika förstärkare kan induceras av exempelvis inflammation (De Santa et al., 2010) eller värmestress (sektion 2.4.2) (Vihervaara et al., 2018). Det är tydligt att eRNA-transkriptionen reglerar mRNA-transkription, men regleringen av eRNA-syntesen är ännu i stort sätt oklar (Chen et al., 2017). Komplexa och dynamiska nätverk har påvisats mellan reglerande sekvenser, bland annat olika förstärkare emellan (Schoenfelder & Fraser, 2019), vilket kan inneha en förklaring till denna oklarhet.



Figur 3. Transkription av eRNA från en förstärkare. En förstärkare kan styra en promotor genom att själv transkriberas till enhancer-RNA (eRNA) av RNA-polymeras II (RNAPII). Transkriptionsstartställena för eRNA-syntes är markerade med pilar. eRNA-transkripten har i ett antal forskningar påvisats ha en positiv inverkan på transkriptionen av gener i förstärkarens genomiska region. Modifierad från Chen et al. (2017).

2.3.2 Forskning i förstärkare

Reglerande sekvenser över hela genomet kan upptäckas genom histonmarkörer, växelverkan med transkriptionsfaktorer och sensitivitet för enzymet deoxiribonukleas I (DNas I) (Andersson et al., 2014), som katalyserar nedbrytning av DNA (Rittié & Perbal, 2008). Kromatinet vid reglerande sekvenser är öppet och därmed lättillgängligt för DNaser, vilket gör att potentiella förstärkare kan detekteras genom mätning av DNas-sensitivitet (Boyle et al., 2008). Förstärkares histonmarkörer och växelverkan med transkriptionsfaktorer kan detekteras med hjälp av kromatin immunprecipitationssekvensering (eng. chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq) (Furey, 2012). ChIP-seq är en metod där DNA binds samman med associerande proteiner, varefter övrigt, obundet DNA avlägsnas (Furey, 2012). Det eftersökta proteinet precipiteras, varefter DNA lösgörs från proteinet och sekvenseras (Furey, 2012).

Förstärkare kan också spåras genom kartläggning av positioner med aktiv eRNA-syntes, vilket kan åstadkommas med exempelvis PRO-seq (Vihervaara et al., 2017). I PRO-seq detekteras aktiv transkription med hjälp av biotinmärkta nukleotider (Mahat et al., 2016a). Genom att de märkta nukleotiderna inkorporeras i växande RNA, möjliggörs specifik rening av endast det RNA som vid den ifrågasvarande tidpunkten syntetiserats (Mahat et al., 2016a). Renat RNA sekvenseras, varefter det jämförs mot DNA för kartläggning av positioner med aktiv transkription (Mahat et al., 2016a).

Emellertid genererar ChIP-seq för histonmarkörer, PRO-seq och mätning av DNAsensitivitet enbart prognoser på möjliga förstärkare, och därför måste vidare analyser göras för att klargöra förstärkarkandidaters verkliga funktion. Förstärkarkandidaterna kan inkorporeras i rapportörplasmider i vilka mängden rapportörtranskript är i proportion till aktiviteten hos förstärkarkandidaten. I allmänhet antar förstärkare sin ursprungliga funktion i analyser med rapportörplasmider och därför är undersökning av förstärkare i rapportssystem tillförlitligt för bestämning av förstärkaraktivitet. Ett dylikt system är luciferasanalys där luciferas, vars aktivitet kan mätas fotometriskt, fungerar som rapportör. Med luciferasanalys kan enbart förvalda förstärkarkandidater, detekterade med exempelvis PRO-seq, studeras och valideras. Stark-laboratoriet (Research Institute of Molecular Pathology (IMP), Vienna Biocenter) har därför utvecklat metoden STARR-seq (eng. self-transcribing active regulatory region sequencing), med vilken förstärkare över hela genomet kan spåras utgående från aktivitet. Genomet delas upp i slumpmässiga fragment, varefter fragmenten inkorporeras i rapportörplasmider i 3'-regionen av plasmidens rapportör. På så sätt blir det inkorporerade fragmentets sekvens en del av rapportörtranskriptet, varmed ett fragment som ger upphov till rapportörtranskript kan identifieras genom dess egna sekvens. Rapportörtranskript renas ur celler transfekterade med rapportörplasmiderna, varefter transkripten sekvenseras. Eftersom rapportörtranskript produceras enbart ifall det inkorporerade fragmentet innehar förstärkaraktivitet, är alla de identifierade sekvenserna förstärkare. (Muerdter et al., 2015)

2.4 Värmechockresponsen

Olika typer av proteinskadande stress så som märkbart ökade temperaturer, eller så kallad värmechock, orsakar felväckning och aggregering av proteiner (Himanen & Sistonen, 2019). Dessa tillstånd leder till aktivering av värmechockresponsen (eng. heat shock response, HSR), alltså en omställning i cellens transkriptionella program (Himanen & Sistonen, 2019). Responsen förmedlas av till exempel värmechockfaktorer, som snabbt åstadkommer ökning i transkriptionen av gener som kodar för värmechockproteiner (eng. heat shock protein, HSP) (Himanen & Sistonen, 2019). Proteiner som produceras till följd av HSR är involverade i upprätthållande av proteostas (Himanen & Sistonen, 2019). Responsen mot värmestress är en välkoordinerad process, vid vilken vissa gener aktiveras och andra nedregleras – en del för längre tider, andra enbart övergående (Mahat et al., 2016b). Omprogrammering av transkriptionen förändras under responsens gång och exempelvis är en del av de gener som induceras i senare skeden av HSR, målgener till transkriptionsfaktorer som aktiverats av responsen (Mahat et al., 2016b).

2.4.1 Värmechockfaktorer

I människans genom finns sex värmechockfaktorer: HSF1, HSF2, HSF4, HSF5, HSFX och HSFY (Gomez-Pastor et al., 2018), av vilka HSF1 anses vara nyckelregleraren i HSR (Joutsen & Sistonen, 2019). HSF2 deltar i responsen exempelvis genom att forma heterotrimerer med HSF1 (Joutsen & Sistonen, 2019). Vid värmestress ökar transkriptionen av hundratals gener, av vilka en andel ökar HSF1- och HSF2-oberoende (Mahat et al., 2016b). HSF1 reglerar ändå majoriteten av de gener vars transkription induceras kraftigast av värmechock (Vihervaara et al., 2017). Utöver HSF1:s och HSF2:s roller inom HSR, har HSF:er flera viktiga funktioner inom exempelvis cellcykeln och utvecklingen (Joutsen & Sistonen, 2019). Specifikt är HSF1 och HSF2 viktiga reglerare av energimetabolismen respektive celladhesionen, vilket är en av anledningarna till att felreglering av HSF1 och HSF2 ofta är kopplat till cancer (Joutsen & Sistonen, 2019; Joutsen et al., 2020). Genom inducering av uttrycket eller stabiliteten av HSF1 kan cancerceller dessutom utnyttja HSR för produktion av HSP:er, varmed rubbad proteostas hos cancercellen motarbetas (Joutsen & Sistonen, 2019). Neurodegenerativa sjukdomar som beror på proteinfelveckning kan däremot orsakas av nedreglering av HSF1 (Gomez-Pastor et al., 2018).

Alla HSF:er innehar olika funktionella domän, av vilka den DNA-bindande domänen (DBD) finns hos samtliga HSF:er (Vuister et al., 1994; Joutsen & Sistonen 2019). HSF1 oligomeriserar genom en hydrofob HR-A/B-domän (eng. leucine zipper-like heptad repeat A/B) (Sorger & Nelson, 1989), som vid fysiologisk temperatur inhiberas av HR-C-domänen (eng. carboxy-terminal heptad repeat) (Hentze et al., 2016). Vid värmechock sker en förändring i HR-C-strukturen så att HR-A/B-domänen frigörs (Hentze et al., 2016). HSF1 har även en TAD-domän (eng. transactivation domain), som binder HSF1-samfaktorer (Sullivan et al., 2001; Boellmann et al., 2004). TAD-domänen regleras på motsvarande sätt som HR-A/B, genom en värmekänslig regulatorisk domän (RD) (Shi et al., 1995; Zuo et al., 1995).

HSF1 är konstant uttryckt i cellen, men dess funktion regleras av både interaktion med andra proteiner och av posttranslationella modifieringar (PTM) (Joutsen & Sistonen, 2019). HSF1 modifieras posttranslationellt genom både inhiberande och aktiverande fosforylering, ubikvitinering, acetylering och symoylering (Joutsen & Sistonen, 2019). Funktionen hos HSF1 inhiberas vid fysiologiska temperaturer genom att HSF1 hålls instängd i ett chaperonkomplex bestående av HSP40-, HSP70- och HSP90-chaperoner (figur 4) (Gomez-Pastor et al., 2018). HSF1:s växelverkan med chaperonerna är ännu inte helt förstådd och även antydning på positiv reglering finns (Hentze et al., 2016; Gomez-Pastor et al., 2018). Enligt den traditionella modellen för livscykeln av HSF1 frigörs HSF1 från chaperonkomplexet vid proteinskadande stress, varmed HSF1 kan forma oligomerer genom HR-A/B-domänen (Sorger & Nelson, 1989; Gomez-Pastor et al., 2018). HSF1 formar i motsats till majoriteten av transkriptionsfaktorer trimerer vid aktivering (Joutsen & Sistonen, 2019) (figur 4). HSF1 kan aktiveras även vid fysiologiska temperaturer, vid vilka PTM:ar tros ha den centrala rollen i regleringen av HSF1 (Gomez-Pastor et al., 2018). Hyperfosforylering av RD-domänen sker emellertid även i värmestressade celler (Joutsen & Sistonen, 2019), men experimentell inhibering av dessa fosforyleringar förhindrar inte HSF1-funktionen vid värmechock (Budzyński et al., 2015).

Den aktiva HSF1-trimeren förflyttas till cellkärnan där den inducerar transkription av sina målgener (figur 4), genom att binda till så kallade värmechockelement (eng. heat shock element, HSE) i dessa geners promotorer. HSE-sekvenserna består av inverterade upprepningar av motivet 5'-nGAAn-3', där n är en godtycklig nukleotid. HSE-konsensussekvensen är 5'-nGAAnnTTCnnGAA-3', och varje monomer i en

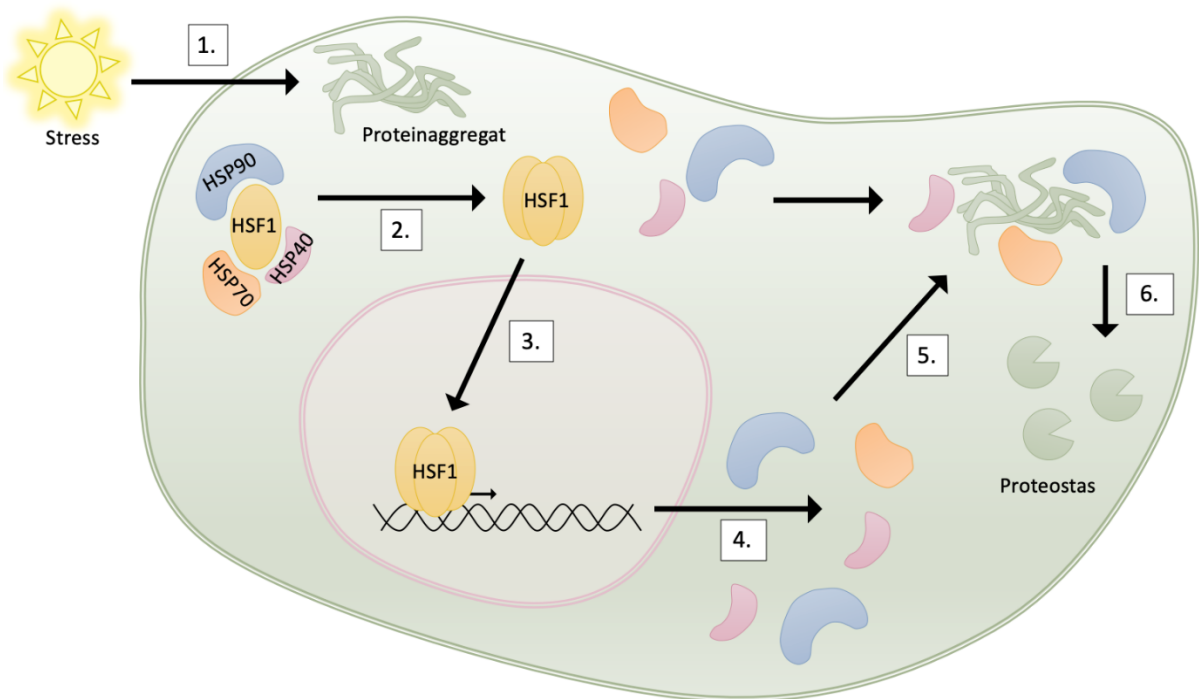
HSF-trimer binder till en 5'-nGAAn-3'-sekvens. Resultat från studier med HSF1-ChIP-Seq visar emellertid att HSE-sekvenserna kan uppvisa stora variationer i antal 5'-nGAAn-3'-upprepningar, upprepningarnas orientering samt avstånd mellan dem. Resultaten antyder vidare att HSF1 kan ha varierande preferenser till olika typer av HSE-sekvenser under olika cellulära omständigheter. (Jaeger et al., 2014)

Pausering av RNAPII under fysiologiska omständigheter är vanligt på gener som induceras av värmestress, vilket medför att transkription av generna snabbt kan aktiveras av HSR (Himanen & Sistonen, 2019). Vid värmechock kan HSF1 rekrytera P-TEFb-kinas (eng. positive transcription elongation factor b) till värmekänsliga promotorer, varmed P-TEFb frigör RNAPII från pausläge till aktiv elongering (Lis et al., 2000; Himanen & Sistonen, 2019). Många målgener för HSF1 är gener som kodar för HSP-chaperoner (till exempel HSP40, HSP70 och HSP90). Dessa hjälper cellen att återfå och upprätthålla proteostas samt förhindra genomgång av apoptos (Joutsen & Sistonen, 2019; Gomez-Pastor et al., 2018). Eftersom just HSP:er kan fungera som inhibitorer av HSF1, involverar HSR en räkka av negativ återkoppling (Shi et al., 1998; Zou et al., 1998; Gomez-Pastor et al., 2018). Vid återhämtning av HSR nedregleras HSF1 även genom ubikvitinering och efterföljande proteasomal degradering (Joutsen & Sistonen, 2019). Trots att ett universellt mönster för HSF1:s aktivitet är kartlagt, är HSF1-förmedlad genreglering vid stress starkt beroende på både celltyp och cellcykelfas (Vihervaara et al., 2017).

Fastän HSF1 anses vara nyckelregleraren av HSR visar nya resultat att en stor andel av HSR styrs HSF1-oberoende. I en omfattande forskning om HSF1:s roll i HSR, i vilken RNA-sammansättning vid värmechock jämfördes med hjälp av PRO-seq mellan HSF1-knockout (HSF1^{-/-}) och vildtyps MEF-celler, visade Mahat och medarbetare (2016b) att HSR i stor utsträckning styrs HSF1-oberoende. I studien jämfördes PRO-seq-resultat även mot HSF1-ChIP-seq-resultat för att klargöra betydelsen av HSF1:s bindning till värmekänsliga geners promotorer. Enligt jämförelserna finns promotorer som vid värmestress binder HSF1, men vars aktivitet under dessa förhållanden hålls oförändrad eller till och med minskar. Vidare förekommer gener som binder HSF1 men vars uttryck vid värmestress ökar HSF1-oberoende. Enligt analysen finns också värmekänsliga promotorer som inte på något sätt växelverkar med eller styrs av HSF1. (Mahat et al., 2016b)

Även kännedomen om HSF2:s roll inom HSR har uppdaterats. HSF1 och HSF2 har mycket liknande DBD och binder således till identiska HSE (Mahat et al., 2016b). Trots detta bekräftade Mahat och medarbetare (2016b), genom påvisande av liknande genuttryck vid värmechock i HSF1^{-/-} och HSF1&2^{-/-}-MEF-celler, att HSF2 inte kompenserar HSF1:s funktion i värmestressade celler. Det har tidigare hållits sannolikt att HSF2 kunde hindra HSF1-förmedlad inducering av HSF1-målgener genom att tävla med HSF1 om bindningsställen i HSE-sekvenser (Joutsen & Sistonen, 2019). Vihervaara och medarbetare (2017) påvisade i stället att HSF1 växelverkar med HSF2 vid de gener som induceras kraftigast av värmechock. Däremot upptäcktes ett samband mellan förekomst av Sp2-transkriptionsfaktorn (eng. specificity protein 2) vid HSF1-målgeners promotorer och transkriptionell nedreglering vid värmestress (Vihervaara et al., 2017).

HSR leder till nedreglering av tusentals gener, vilket till stor del sker HSF1-oberoende (Mahat et al., 2016b). Generna nedregleras genom att pauserat RNAPII stöts bort från promotorerna. De nedreglerade generna kodar för proteiner som är involverade i reglering av cellcykel, metabolism och mRNA-processering (Mahat et al., 2016b). Även den transkriptionella nedregleringen i värmestressade celler är en välkoordinerad process. Till exempel de gener som kodar för proteiner involverade i mRNA-processering nedregleras först vid längre utsättning för värmestress (Mahat et al., 2016b). Den stora mängden RNAPII som frigörs till följd av den transkriptionella nedregleringen bidrar till att cellen vid värmechock snabbt kan producera HSP:er och andra viktiga komponenter av HSR (Mahat et al., 2016b). Genom inducering av vissa gener och nedreglering av andra åstadkoms genom HSR en genomgripande transkriptionell omprogrammering som möjliggör upprätthållande av proteostas även under icke-fysiologiska förhållanden (Vihervaara et al., 2017).



Figur 4. Värmechockresponsen. Vid värmestress kan proteinaggregat bildas (1). Till följd av stress och rubbad proteostas aktiveras värmechockfaktor 1 (eng. heat shock factor 1, HSF1), genom att släppas fri från ett inhiberande komplex, trimerisera (2) och förflyttas till cellkärnan (3). HSF1 förmedlar tillsammans med andra transkriptionsfaktorer värmechockresponsen genom att aktivera transkriptionen av värmechockproteiner (eng. heat shock protein, HSP) (4). Dessa skyddar cellen från proteinaggregat (5) och återskapar proteostas (6). Eftersom HSP:er kan fungera som inhibitorer av HSF1, involverar värmechockresponsen en ränka av negativ återkoppling. Modifierad från Gomez-Pastor et al. (2018).

2.4.2 Reglerande sekvenser vid värmechock

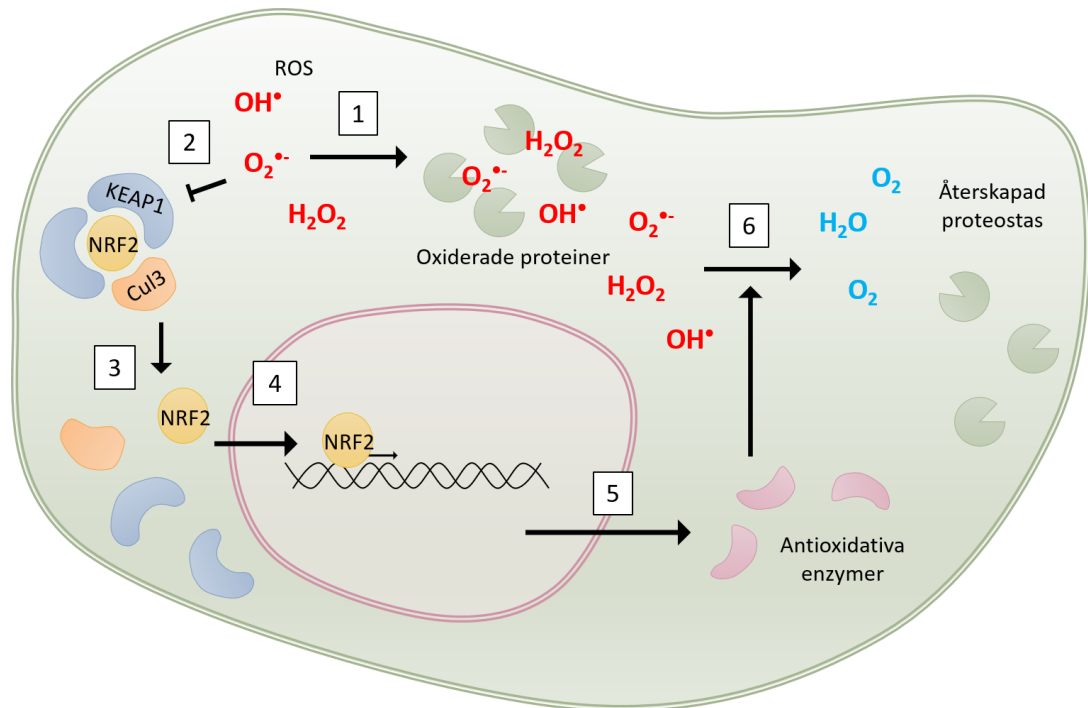
Aktivitetsnivån hos reglerande sekvenser har i ett antal studier påvisats förändras vid proteinskadande stress (Himanen & Sistonen, 2019). Till exempel kan sekvensernas kromatinstruktur genomgå aktiverande modifieringar, så som aktiverande histonacetylering och histonsumoylering (Himanen & Sistonen, 2019). Det är sannolikt att HSF1 reglerar en andel av sina målgener via förstärkare, eftersom HSF1 påvisats binda till promotorn av endast 35 % av de gener vars transkription induceras HSF1-beroende i värmestressade celler (Mahat et al., 2016b). I enlighet med detta, visade Vihervaara och medarbetare (2017) att HSF1 binder till ca 500 reglerande sekvenser vid värmechock i K562-erytroleukemi-cellinjen från människan. Vidare har HSF1 påvisats öka transkriptionen av exempelvis FOXO3-genen vid värmechock och oxidativ stress (eng. forkhead box O3), genom en förstärkare som reglerar genens promotor (Grossi et al., 2018). HSF1 kan även binda CTCF-bundna insulatorelement

(Vihervaara et al., 2017), och det är därför möjligt att HSF1 även har uppgifter inom reglering av kromatinorganisationen i stressade celler.

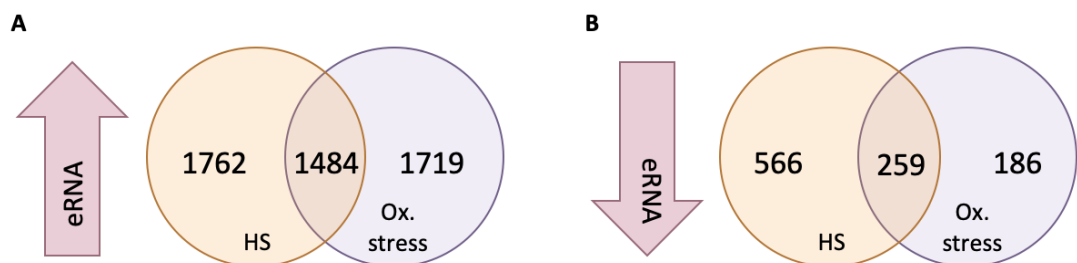
Vidare sker märkbara omställningar i eRNA-syntesen vid värmestress. I K562-celler förhöjdes transkriptionen av ca 5000 och minskade för ca 1600 reglerande sekvenser vid utsättning för värmechock (Vihervaara et al., 2017). Vihervaara och medarbetare (2017) visade också att transkriptionen ökar för majoriteten av de ca 500 reglerande sekvenser som HSF1 binder i värmestressade celler. Motsvarande visar opublicerad data från analyser gjorda med PRO-seq vid Sistonen-laboratoriet att värmechock orsakar förhöjd transkription av 3246 och minskad transkription av 825 potentiella förstärkare i MEF-celler (figur 6).

2.5 Respons mot oxidativ stress

Oxidativ stress orsakas av reaktiva syreföreningar (eng. reactive oxygen species, ROS), som produceras bland annat vid den mitokondriella elektrontransportkedjan (Sies et al., 2017). ROS kan oxidera cellens makromolekyler och således behövs en snabb respons mot oxidativ stress för upprätthållande av homeostas (Sies et al., 2017). Responsen mot oxidativ stress förmedlas huvudsakligen av NRF2-transkriptionsfaktorn (eng. nuclear factor erythroid 2-related factor 2) (Itoh et al., 1997; Taguchi et al., 2011) (figur 5), som under kontrollförhållanden kontinuerligt bryts ner (McMahon et al., 2003). E3-ubikvitin-ligaset Cul3 (eng. cullin 3) växelverkar med NRF2 via KEAP1-proteinet (eng. kelch-like ECH-associated protein 1), vilket medför att NRF2 konstant ubikvitineras och riktas för proteasomal degradering (Kobayashi et al., 2004). Vid oxidativ stress oxideras KEAP1, vilket stör dess interaktion med Cul3 (Kobayashi et al., 2004). NRF2 undgår därmed ubikvitinering och kan lokalisera till cellkärnan och aktivera transkription av dess målgener, som kodar för exempelvis antioxidativa enzymer (figur 5) (Kobayashi et al., 2004; Taguchi et al., 2011). Av dessa enzymer deltar en del aktivt i eliminering av ROS, medan andra är involverade i syntesen av glutation (Taguchi et al., 2011), en tripeptid som reducerar ROS genom att själv oxideras (Meister & Andersson, 1983). I likhet med värmestress sker förändringar även i eRNA-syntesen vid oxidativ stress. Ännu opublicerad data från PRO-seq vid Sistonen-laboratoriet påvisar förhöjd transkription av 3203 och minskad transkription av 445 potentiella förstärkare i MEF-celler vid oxidativ stress (figur 6).



Figur 5. Respons mot oxidativ stress. Vid oxidativ stress, det vill säga vid ackumulering av reaktiva syreföreningar (eng. reactive oxygen species, ROS) (1), oxideras KEAP1 (eng. kelch-like ECH-associated protein 1) (2), ett protein som under normala omständigheter kopplar transkriptionsfaktorn NRF2 (eng. nuclear factor erythroid 2-related factor 2) till E3-ubikvitin-ligaset Cul3 (eng. cullin 3). Oxiderat KEAP1 förlorar sin funktion och NRF2 befrias från ubikvitinering och efterföljande proteasomal degradering (3). NRF2 kan under dessa förhållanden förflyttas till cellkärnan (4) och aktivera transkription av antioxidativa enzymer (5). Dessa bidrar till återskapande av homeostas, till exempel genom att modifiera ROS till för cellen oskadliga molekyler (6).



Figur 6. Förändringar i eRNA-uttryck vid värmechock och oxidativ stress i mus embryonala fibroblaster. Vid värmechock (eng. heat shock, HS) och oxidativ stress (Ox. stress) ökar transkriptionen av enhancer-RNA (eRNA) för 3246 respektive 3203 förstärkare (A), medan transkriptionen av 825 och 445 förstärkare minskar vid respektive typer av proteinskadande stress (B), enligt resultat i PRO-seq (eng. precision nuclear run-on sequencing) utförd i Sistonen-laboratoriet. En del av de förstärkare för vilka variationer i eRNA-mängder förekommer är överlappande mellan de två typerna av stress.

2.6 Interferonsignalering

2.6.1 Interferonresponsen

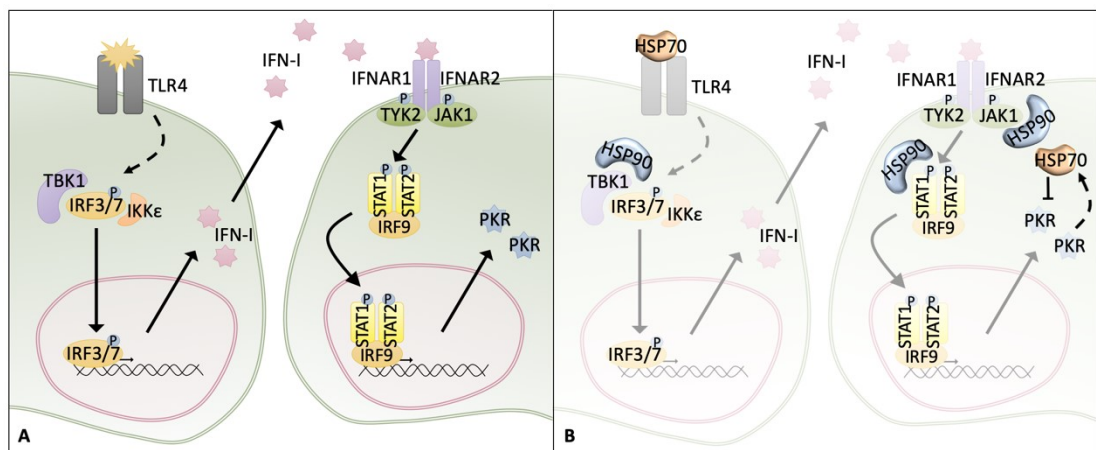
Interferoner (IFN) delas in i tre huvudgrupper (IFN-I, IFN-II och IFN-III) och är signalmolekyler som triggar försvarsmekanismer mot infektioner. IFN-uttrycket regleras huvudsakligen av IRF-transkriptionsfaktorer (eng. interferon regulatory factor), av vilka nio varianter (IRF1–9) finns hos däggdjur. Vid virusinfektioner inducerar IRF:er IFN-uttrycket, varpå IFN:er utsöndras från den virusinfekterade cellen. Extracellulärt IFN binder interferonreceptorer på närliggande cellers yta, så att dessa aktiverar sitt antivirala försvar. (Negishi et al., 2018)

Utryck av IFN-I regleras huvudsakligen av IRF3 och IRF7 (figur 7A), vilka binder så kallade ISRE-motiv (eng. interferon stimulated response element) i IFN-I-geners promotorer (Negishi et al., 2018). ISRE-motivet utgörs av 5'-A/GnGAAAnnGAAACT-3', där n är en godtycklig nukleotid (Tanaka et al., 1993). IRF3 och IRF7 aktiveras genom fosforylering som katalyseras av ett proteinkomplex innehållande TBK1-kinas (eng. TANK-binding kinase 1) och IKK ϵ -kinas (eng. inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon) (Negishi et al., 2018). Till exempel signalering vid TLR4-receptorn (eng. toll-like receptor 4) stimulerar IRF3 och IRF7, genom signalkaskader som aktiverar TBK1 och IKK ϵ (Negishi et al., 2018) (figur 7A).

Extracellulärt IFN-I binder till den heterodimeriska IFNAR-receptorn (eng. interferon- α/β receptor) som består av IFNAR1- och IFNAR2-underenheter (Negishi et al., 2018) (figur 7A). Receptoraktivering stimulerar januskinas 1 (JAK1) och tyrosinkinase 2 (TYK2) (Negishi et al., 2018), som vid aktivering fosforylerar STAT1- (eng. signal transducer and activator of transcription protein 1) och STAT2-proteiner. Detta leder till att ett komplex innehållande STAT1, STAT2 och IRF9 kan bildas (Negishi et al., 2018). Proteinkomplexet förflyttas till cellkärnan och initierar transkription av en uppsättning målgener (Negishi et al., 2018). Aktivering av IFN-I-signalkaskaden resulterar i ökat uttryck av proteinkinase R (PKR), som katalyserar fosforylering av eIF2 α (eng. eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1) (Srivastava et al., 1998). eIF2 α inaktiveras till följd av fosforyleringen, vilket resulterar i allmänt minskad proteinsyntes i cellen och slutligen genomgång av apoptos (Srivastava et al., 1998). Även IFN-II- och IFN-III-inducerabara gener initieras via likartad JAK-STAT-signalering (Negishi et al., 2018).

2.6.2 Interferonsignaleringens växelverkan med värmechockproteiner

Reglering av IFN-uttrycket och IFN-förmedlad intercellulär signalering har påvisats ha flera kopplingar till HSP:er (figur 7B). Till exempel har HSP90 påvisats stabilisera TBK1 och underlätta dess växelverkan med IRF3 (Yang et al., 2006). Därutöver är JAK1 ett HSP90-klientprotein och därför har HSP90 en essentiell roll i fosforylering av STAT1 i respons till IFN-I-förmedlad signalering (Shang & Tomasi, 2006). Extracellulärt HSP70 har påvisats ha kapacitet att inducera en IFN-I-respons genom TLR2&4-receptorer (Kim et al., 2012). Vidare kan HSP70 under olika omständigheter fungera som inhibitor av PKR (Pang et al., 2002), som däremot påvisats vara essentiell för HSP70-proteinuttryck (Zhao et al., 2002).



Figur 7. Interferon typ I-signalering. Typ I interferoner (IFN-I) induceras genom aktivering av TLR4-receptorn (eng. toll-like receptor 4). TLR4-aktivering triggar signalkaskader som aktiverar TBK1 (eng. TANK-binding kinase 1) och IKK ϵ (eng. inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon) (A). Dessa aktiverar IRF3 (eng. interferon regulatory factor 3) och IRF7 genom fosforylering (eng. phosphorylation, P). IRF-transkriptionsfaktorer kan nu förflyttas till cellkärnan och stimulera IFN-I-uttrycket. Extracellulärt IFN-I binder till IFNAR-receptorn (eng. interferon- α/β receptor), som därmed rekryterar januskinas 1 (JAK1) och tyrosinkinasa 2 (TYK2). De aktiverade kinaserna fosforylerar STAT1 (eng. signal transducer and activator of transcription protein 1) och STAT2, varmed STAT1&2 binder IRF9. Komplexet förflyttas till cellkärnan och initierar transkription av proteinkinasa R (PKR). Värmechockprotein 70 (eng. heat shock protein 70, HSP70) och HSP90 växelverkar med IFN-I-signalering på ett flertal sätt (B). HSP90 stabiliserar TBK1 och underlättar dess växelverkan med IRF3. JAK1 är en HSP90-klient, vilket innebär att HSP90 har en essentiell roll i fosforylering av STAT1. Extracellulärt HSP70 kan inducera en IFN-I-respons genom TLR4-receptorn, medan cytosoliskt HSP70 fungerar som inhibitor av PKR. Däremot är PKR essentiell för HSP70-uttrycket. Figur 7A är modifierad från Negishi et al. (2018).

3 Målsättningar

Förstärkare har viktiga roller i regleringen av genuttrycket (Schoenfelder & Fraser, 2019). Nya resultat visar att deras aktivitet förändras vid stress, till exempel genom omställningar i eRNA-syntesen (Vihervaara et al., 2017). Mängden eRNA-transkript kan mätas med PRO-seq, en metod som påvisar aktiv transkription över hela genomet (Vihervaara et al., 2017). Opublicerade data från tidigare gjorda analyser med PRO-seq vid Sistonen-laboratoriet visar att det sker märkbara förändringar i eRNA-syntesen över hela genomet i värmestressade MEF-celler. Sju sekvenser, som enligt resultaten kunde inneha stressspecifik förstärkaraktivitet, valdes ut för att undersökas vidare i denna pro gradu-avhandling. Målsättningen med min avhandling var att bestämma om förändringar i mängden eRNA vid värmestress korrelerar med förändringar i förstärkarens aktivitet, det vill säga dess kapacitet att inducera en promotor.

För att klargöra hur värmechock inverkar på aktiviteten hos de utvalda förstärkarna studerades sekvenserna i MEF-celler med hjälp av luciferasanalys och qRT-PCR. En förstärkares exakta längd kan inte avgöras med PRO-seq, och därför bestämdes längden för de sju utvalda sekvenserna till de 1,5 kilobaspar (kb) som omringade startstället för eRNA-syntesen. De utvalda sekvenserna amplifierades från musens DNA med hjälp av polymeraskedjereaktion (eng. polymerase chain reaction, PCR), varefter de inkorporerades i luciferasrapportörplasmider, i vilka transkriptionen av luciferasgenen är proportionell mot den reglerande aktiviteten i det inkorporerande fragmentet. Konstruktionerna transfekterades in i MEF-celler som utsattes för värmechock vid 42 °C i 1 h. Efter behandlingen mättes luciferasaktivitet och mängden luciferas-mRNA med luciferasanalys respektive qRT-PCR i celllysat från de värmechockade cellerna som transfekterats med luciferaskonstruktioner.

Vidare var avsikten att bestämma om riktningen av en förstärkare inverkar på dess aktivitet, vilket gjordes genom att för en förstärkare framställa två olika typer av plasmidkonstruktioner i vilka förstärkaren i den ena typen var inkorporerad i motsatt riktning i relation till luciferaspromotorn än i den andra. Syftet med min pro gradu-avhandling var också, att i samband med att uppnå målsättningarna för arbetet, evaluera lämpligheten av de använda metoderna för kartläggning av förstärkaraktivitet vid värmestress inför vidare studier i stresskänsliga förstärkare inom forskningsgruppen.

De specifika målsättningarna för avhandlingen var att

1. bestämma om stresspecifika förstärkare kan styra transkriptionen under värmechock.
2. klargöra om aktiviteten hos värmekänsliga förstärkare är beroende på deras orientering.
3. evaluera olika metoders lämplighet för att undersöka förstärkaraktivitet vid värmestress.

4 Metoder

4.1 Cellinjer

I alla experiment användes vildtyps MEF-celler. Denna studie byggde vidare på resultat från tidigare utförda analyser av transkription över hela genomet med hjälp av PRO-seq, vid vilken kandidater för värmekänsliga förstärkare hos MEF-celler kartlagts genom detektering av eRNA-uttryck. Här analyserades sju MEF-förstärkarkandidater vidare, och därför användes MEF-celler genom hela studien. MEF-cellerna odlades i Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Sigma-Aldrich, USA) med 10 % fetalt kalvserum, 2,5 mM glutamin, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ul streptomycin samt icke-essentiella aminosyror på 60 mm-cellskålar. Cellerna inkuberades i 5 % CO₂ vid 37 °C (fysiologisk temperatur).

4.2 Dataanalys av förstärkarsekvenser

Sju sekvenser, här kallade EH2, EH9, EH12, EH14, EH17, EH18 och EH20, som enligt PRO-seq indikerats vara värmekänsliga förstärkare (tabell 1) analyserades med hjälp ENCODE SCREEN-databasen (<https://screen.encodeproject.org/>). SCREEN-databasen innehåller ca 1 310 000 möjliga reglerande sekvenser i människans genom och ca 527 000 i musens, vilka upptäckts inom ett såkallat ENCODE-forskningprojekt, genom kartläggning av kromatinmarkörer, växelverkan med CTCF och DNas-sensitivitet över hela genomet (ENCODE Encyclopedia: Genomic annotations, 2020). Databasens sekvenser är klassificerade enligt promotor-, förstärkar- och insulatorliknande, efter H3K4me3-markör, H3K27ac-markör respektive CTCF-interaktion. I analysen av de sju utvalda förstärkarsekvenserna mot SCREEN-databasen användes de genomiska koordinater som motsvarade förstärkarnas eRNA-sekvenser. Eftersom det inte är möjligt att avgöra förstärkares exakta längd med PRO-seq, bestämdes längden för de sju utvalda sekvenserna till en 1,5 kb lång sekvens som omringade startstället för eRNA-syntesen. Också HSE- och ISRE-motiv hos de utvalda sekvenserna analyserades, vilket utfördes manuellt.

Tabell 1. Förstärkarkandidater. Förstärkarkandidater som undersöktes vid denna pro gradu-avhandling valdes utgående från resultat i tidigare utförd PRO-seq (eng. precision nuclear run-on sequencing). Med PRO-seq hade uttryck av enhancer-RNA (eRNA) och mRNA både under kontrollförhållanden och vid värmechock i mus embryonala fibroblaster detekterats. En lämplig sekvens med längden 1,5 kilobaspar (kb) kring eRNA-transkriptionsstartstället bestämdes utgående från PRO-seq-data, och de genomiska koordinaterna nedan beskriver positionen för de 1,5 kb långa sekvenserna i musens DNA.

Förstärkare, namn	Koordinater, kromosom: start–slut	Närmast belägen gen	Genens mRNA-uttryck vid värmechock	Förstärkarens eRNA-uttryck vid värmechock
EH2	12: 85 201 162–85 202 662	EIF2B2	Inducerat	Inducerat
EH9	5: 135 879 257–135 880 757	HSPB1	Inducerat	Inducerat
EH12	5: 139 010 118–139 011 618	PDGFA	Inducerat	Inducerat
EH14	5: 148 632 303–148 633 803	UBL3	Inducerat	Inducerat
EH17	5: 147 736 329–147 737 829	FLT1	Inducerat	Inducerat
EH18	16: 4 267 355–4 268 855	CREBBP	Nedreglerat	Nedreglerat
EH20	4: 53 195 545–53 197 045	ABCA1	Nedreglerat	Nedreglerat

EIF2B2, eng. eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2; HSPB1, eng. heat shock protein beta-1 (gen för HSP27-proteinet); HSP27, värmechockprotein 27 (eng. heat shock protein 27); PDGFA, eng. platelet-derived growth factor subunit A; UBL3, eng. ubiquitin-like protein 3; FLT1, eng. fms-related tyrosine kinase 1; CREBBP, CREB-bindande protein; CREB, cAMP-responsivt elementbindande protein; cAMP, cykliskt adenosinmonofosfat (eng. cyclic adenosine monophosphate); ABCA1, eng. ATP binding cassette subfamily A member 1; ATP, adenosintrifosfat (eng. adenosine triphosphate).

4.3 In-fusionskloning

Genom kloning kan utvalda DNA-sekvenser inkorporeras i plasmider (Green & Sambrook, 2012, s. 158). Plasmider är korta (1–200 kb), cirkulära och extrakromosomala DNA-sekvenser som naturligt förekommer hos bakterier (Green & Sambrook, 2012, s. 158). Plasmider utnyttjas inom molekylärbiologi som transportörer av genetiskt material och kan vara genetiskt modifierade så att de är optimerade för specifika experiment (Green & Sambrook, 2012, s. 159). I den här studien användes rapportörplasmider, alltså plasmider i vilkas sekvens en rapportörgen innefattas. Genom kloning av ett fragment in i en rapportörplasmid kan fragmentets inverkan på transkriptionen av rapportörgenen analyseras i modellsystem (Green & Sambrook, 2012, s. 1336). Kloning var en av de centrala metoderna i det här arbetet, eftersom den användes till att inkorporera utvalda förstärkarsekvenser i luciferasrapportörplasmider,

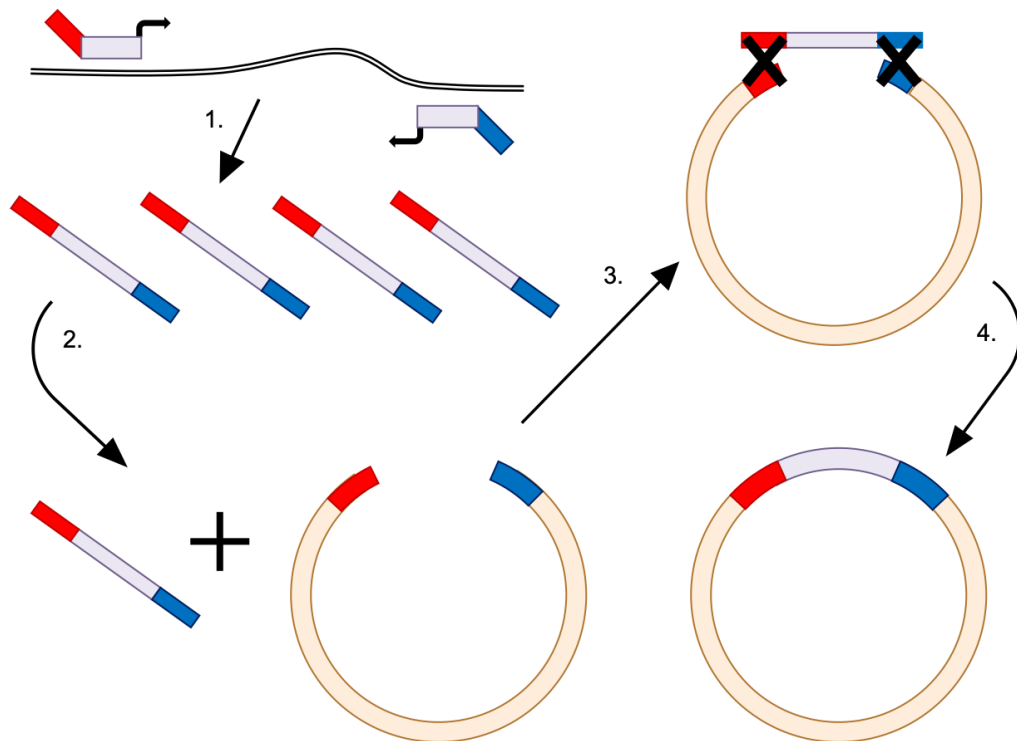
så att förstärkarnas inverkan på transkriptionen av luciferas vid värmechock senare kunde bestämmas. Den valda metoden för kloning var in-fusionskloning, en typ av kloning som sker i flera delsteg och innefattar flera PCR-reaktioner och homolog rekombination (Park et al., 2015). PCR utnyttjas vid in-fusionskloning för amplifiering av fragment och linjärisering av plasmid, medan homolog rekombination används för sekvensspecifik inkorporering av fragment i plasmider (Park et al., 2015).

Homolog rekombination är en naturlig mekanism med vilken dubbelsträngade DNA-brott repareras, genom utbyte av nukleotidsekvenser mellan två liknande eller identiska DNA-molekyler. Homolog rekombination förbereds genom att nukleotider bryts ned från de fria 5'-ändorna vid DNA-skadan, så att två enkelsträngade 3'-ändor, eller överhängen, erhålls. Överhängena invaderar den intakta, motsvarande DNA-molekylen, som fungerar som mall vid den därpå följande DNA-syntesen, vilken påbörjas vid överhängena. Vid denna syntes återfås den del av DNA som vid föregående steg brutits ned från de fria 5'-ändorna vid DNA-skadan samt de nukleotider som eventuellt förlorats vid själva skadan. Genom homolog rekombination produceras också nya variationer av DNA-sekvenser vid meiosen, alltså produktionen av könsceller. Homolog rekombination används också av vissa celler för upprätthållande av telomerer, det vill säga ändorna av kromosomerna, vilka annars förkortas vid varje celldelning. (Sung & Klein, 2006)

Med PCR amplifieras en utvald DNA-sekvens genom användning av termisk cykling. Vid upphettning denaturerar DNA och vid därpå följande nedkylning binder primrarna till det enkelsträngade DNA:t. Därefter replikeras DNA av ett värmeståligt polymeras. Primrar är oligonukleotider som för vardera DNA-sträng är komplementära till ändorna av den region som ska amplifieras och som är riktade så att replikationen från dem sker inåt mot den eftersökta regionen. DNA:t som genereras vid varje PCR-cykel används som templat i följande cykel vilket medför att den utvalda sekvensen amplifieras exponentiellt. (Saiki et al., 1988)

Vid in-fusionskloning amplifieras fragmenten med PCR, och primrarna till varje fragment utformas så att de har överhängen som är icke-komplementära till DNA-templet (figur 8). Överhängena är istället komplementära till de sista nukleotiderna i linjäriserade plasmiders respektive ändor. Plasmiderna linjäriseras med PCR, vid en position som överensstämmer med valet av överhängen vid amplifiering av fragmenten. Med hjälp av överhängena inkorporeras fragmenten därefter i

rapportörplasmider genom att utnyttja enzym som katalyserar homolog rekombination. Kloningsreaktionen kräver endast homologa överhängen mellan plasmid och fragment, vilka enkelt kan produceras genom primervalen i de förberedande PCR-reaktionerna. Med in-fusionskloning kan därför vilket som helst fragment klonas in i vilken plasmid som helst, vart som helst inne i denna plasmid. (Park et al., 2015)



Figur 8. Principerna för kloning av ett fragment in i en plasmid med hjälp av in-fusionskloning. Fragmentet, som ska inkorporeras i en plasmid, amplifieras med polymeraskedjereaktion (eng. polymerase chain reaction, PCR) (1). Primrarna i PCR-reaktionen utformas så, att de har överhängen (röd och blå) som är komplementära till ändorna av en linjäriserad plasmid (röd och blå). PCR-produkten och den linjäriserade plasmiden blandas ihop (2), tillsammans med enzym som katalyserar homolog rekombination mellan plasmiden och fragmentet (3), varmed fragmentet inkorporeras i plasmiden (4). Modifierad från Okegawa & Motohashi (2015).

Sju potentiellt stressspecifika förstärkare, här kallade EH2, EH9, EH12, EH14, EH17, EH18 och EH20 klonades med hjälp av in-fusionskloning in i luciferasrapportörplasmider (figur 9A), för att senare studeras i värmestressade MEF-celler. I dessa studier användes som positiv kontroll en plasmidkonstruktion innehållande promotorn till HSPA1A-genen (eng. heat shock protein family A member 1A) (figur 9B) vilken redan tidigare tillverkats i Sistonen-laboratoriet, eftersom PRO-seq-data påvisat att transkriptionen av HSPA1A ökar vid värmestress.

För EH9-, EH14- och EH17-förstärkarkandidater tillverkades plasmidkonstruktioner som förutom förstärkaren innehöll en promotor som enligt PRO-seq-data är okänslig mot proteinskadande stress (figur 9C). Promotorerna som genom in-fusionskloning tillades i förstärkarkonstruktionerna var promotorer för galektin 3-genen (LGALS3), PITPNA-genen (eng. phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform) och CTF8-genen (eng. chromosome transmission fidelity protein 8). Även en artificiell promotor, det vill säga SCP1-promotorn (eng. super core promoter 1) (Eurofins Genomics, Luxemburg) klonades till förstärkarkonstruktionerna.

In-fusionsreaktionerna utfördes med hjälp av In-Fusion HD Cloning-kittet (Takara, Japan), vars huvudkomponent är en enzymreagens som katalyserar den homologa rekombinationen mellan plasmider och fragment. In-Fusion-enzymet katalyserar homolog rekombination mellan DNA-sekvenser som har överhängen med 15–20-nuklotiders homologi. Luciferasrapportörplasmiden härstammar från Stark-laboratoriet och betecknas STARR-seq luciferase validation vector_ORI_empty (Addgene #99297; <http://n2t.net/addgene:99297>). Plasmiden innehåller den syntetiska LUC2-genen tillsammans med en polyadenyleringssignal som härstämmer från simianvirus 40 (SV40), ett prokaryot replikationsstartställe (eng. origin of replication, ORI) samt en gen för ampicillinresistens (bilaga B). LUC2 fungerar som rapportör-gen för mätning av aktiviteten hos förstärkare som med hjälp av kloning inkorporerats i plasmiden. Luciferasanalys bygger på LUC2-luciferasets förmåga att oxidera sitt substrat D-luciferin, varmed en detekterbar ljussignal avges (sektion 4.7.1). Plasmiden innehåller polyadenyleringssignalen för att LUC2-mRNA:t ska polyadenyleras i celler transfekterade med LUC2-konstruktioner (Proudfoot et al., 2002). Polyadenosinsvansen är viktig för hållbarheten av LUC2-mRNA-molekylen (sektion 2.2) och kan dessutom användas för rening av mRNA inför qRT-PCR. Genen för ampicillinresistens i rapportörplasmiden används för selektion av bakterier som upptagit plasmidkonstruktioner, genom att enbart bakterier för vilka transformationen lyckats kan skapa kolonier vid närvaro av ampicillin. Det prokaryota ORI:t behövs för amplifiering av plasmiden i bakterier och fungerar dessutom i vissa konstruktioner som LUC2-promotor.

4.3.1 Linjärisering av luciferasrapportörplasmid

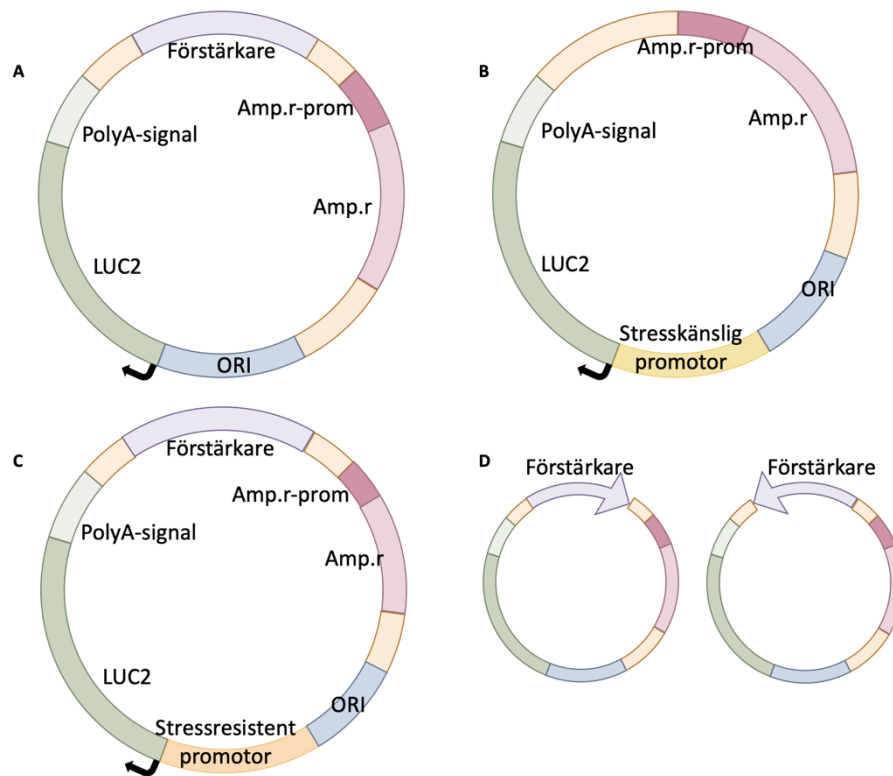
Luciferasrapportörplasmiden linjäriserades med PCR med hjälp av T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Vid alla PCR-reaktioner i den här studien användes Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs, USA) (bilaga D, tabell 1), eftersom Q5-polymeraset påvisats ha en ytterst låg felfrekvens (Pezza et al., 2012). Ett PCR-program som lämpar sig för Q5-polymeraset användes (bilaga D, tabell 2). För tillverkning av förstärkar-luciferaskonstruktioner valdes primrar som bröt luciferasplasmiden nedströms av LUC2-genen (bilaga D, tabell 3), så att förstärkaren kunde inkorporeras i plasmiden möjligen långt från ORI (figur 9A), som fungerar som promotor till LUC2-genen (Muerdter et al., 2018). Om förstärkaren istället hade inkorporerats i närheten av promotorn är det möjligt att eRNA-transkription från förstärkaren hade fortgått över LUC2-genen, varmed förstärkarens promotoraktivitet egentligen skulle ha detekterats. Stressresistenta promotorer tillades senare till förstärkarkonstruktioner, varmed promotorn placerades direkt uppströms av LUC2-genen. För kloning av stressresistenta promotorer till förstärkarkonstruktioner (figur 9C) valdes primrar som linjäriserade konstruktionerna mellan ORI och LUC2-genen (bilaga D, tabell 3). Primrarna för PCR-reaktionerna planerades med SnapGene-datorprogrammet (GSL Biotech LLC, USA).

4.3.2 Amplifiering av förstärkar- och promotorfragment

Förstärkarkandidater (tabell 1) och promotorer som valts utgående från värmekänslighet amplifierades från musens DNA med PCR. Amplifiering av förstärkar- och promotorsekvenser utfördes i två delsteg, för att reaktionerna skulle vara så specifika som möjligt. Primrar till förstärkar- och promotorsekvenser kan nämligen inte fritt utformas, utan dikteras av DNA-sekvensen i förstärkaren respektive promotorn. Därmed binder dessa primrar inte nödvändigtvis till enbart den eftersökta sekvensen i hela genomet. Genom att med specifika primrar först amplifiera ett bestämt område i genomet, vilket innefattar den sökta sekvensen, erhålls en betydligt kortare DNA-sekvens i jämförelse med hela DNA:t, i vilken primrarna till förstärkar- och promotorsekvenserna binder till endast ett ställe.

Enligt denna princip amplifierades med hjälp av en första uppsättning primrar (bilaga D, tabell 4) segment som innefattade hela förstärkar- respektive promotorsekvensen, men som var längre än den och omringade den. För att hitta specifika primrar, så att endast en bestämd sekvens skulle amplifieras i reaktionen,

användes NCBI Primer-BLAST-sökmotorn (Ye et al., 2012). Efter PCR-reaktionen separerades PCR-produkterna med hjälp av agarosgelelektrofores i 1 %-agarosgel, med TBE som elektroforesbuffert (bilaga A), under 70 V i 45 minuter. Band av rätt storlek (bilaga D, tabell 4) skars ut och DNA:t renades ur gelen med PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo-kittet (Invitrogen, USA). Promotorsekvenserna samt de 1,5 kb långa förstärkarna amplifierades sedan från de ur agarosgelen renade PCR-produkterna. Primerparen i denna PCR-reaktion hade planerats så att vardera primer hade ett 20 nukleotider långt överhäng som var komplementärt till de 20 sista nukleotiderna i den linjäriserade luciferasrapportörplasmidens ändor (bilaga D, tabell 5). Överhängen tillades till den artificiella SCP1-promotorn med hjälp av motsvarande primrar (bilaga D, tabell 6). För att undersöka om riktningen av EH9-förstärkaren har en inverkan på dess aktivitet, utformades för denna förstärkare två uppsättningar primrar, så att de två olika uppsättningarna hade motsatta överhängen på primerparen. På detta sätt kunde EH9-förstärkaren inkorporeras i luciferasplasmiden i båda riktningarna i relation till ORI-promotorn (figur 9D).



Figur 9. Illustration av förstärkar- och promotor-luciferaskonstruktioner. LUC2-rapportörplasmiden innehåller LUC2-rapportör-genen (eng. luciferase 2) tillsammans med en polyadenyleringssignal (polyA-signal), ett prokaryot replikationsstartställe (eng. origin of replication, ORI) samt en gen för ampicillinresistens (Amp.r) tillsammans med dess promotor (Amp.r-prom). Varje förstärkarkandidat inkorporerades i rapportörplasmiden nedströms från LUC2-genen, för att på bästa sätt möjliggöra bestämning av sekvensens förstärkaraktivitet (A). I förstärkar-luciferaskonstruktionerna fungerade ORI som LUC2-promotor. I promotor-luciferaskonstruktioner innehållande stresskänsliga promotorer var promotorn placerad i rapportörplasmiden framför LUC2-genen (B). Till en del förstärkarkonstruktioner tillsattes en stressresistent promotor mellan ORI och LUC2-genen (C). En av de studerade förstärkarna inkorporerades i dess båda möjliga orienteringar i jämförelse med ORI, i skilda uppsättningar LUC2-rapportörplasmider (D).

4.4 Transformation

Efter kloning transformerades plasmidkonstruktionerna in i Stellar Competent HST08 *E. coli*-bakterier (Takara) för tillvekning av tillräckliga mängder plasmidkonstruktioner inför transfektioner. Stellar Competent HST08 *E. coli*-bakterieceller kan effektivt transformeras, vilket i detta experiment utfördes genom att bakterierna blandades med förstärkarkonstruktioner och utsattes för HS vid 42 °C i 45 sekunder. I bakterielösningen tillsattes efter HS-behandlingen rumstempererat SOC-medium (eng. super optimal broth with catabolite repression) (Takara), som främjar transformation av *E. coli* (Hanahan, 1983). Bakterielösningen inkuberades vid 37 °C i 1 h, varefter

den spreds ut på 1%-agarplattor tillverkade på LB-medium (eng. lysogeny broth) (bilaga A) innehållande 50 µg/ml ampicillin. Genom tilläggning av ampicillin i LB-mediet åstadkoms selektion av enbart de bakterier som upptagit plasmidkonstruktionerna, genom genen för ampicillinresistens i konstruktionen. LB-agarplattorna inkuberades vid 37 °C i 16 h. Lämpliga enskilda kolonier plockades därefter från plattorna till odlingsrör innehållande LB-medium med 50 µg/ml ampicillin, vilka inkuberades i rumstemperatur 2 h och därefter vid 37 °C i 16 h. Rening av plasmider från bakterielösningen utfördes följande dag med QIAprep Spin Miniprep-kittet (Qiagen, Tyskland). Före plasmidreningen påbörjades sparades dock en aliquot bakterielösning i 25 %-glycerol vid -80 °C.

För att verifiera att de renade plasmiderna innehöll det med hjälp av kloning inkorporerade förstärkarfragmentet sekvenserades plasmiderna med specifika sekvenseringsprimrar. Till sekvenseringen användes Mix2Seq-sekvenseringskittet (Eurofins Genomics). För plasmider som enligt sekvenseringsresultaten innehöll de korrekta förstärkarfragmenten tillverkades utifrån respektive glycerolstockar större mängder motsvarande bakterier. Plasmiderna renades ur dessa bakterielösningar med hjälp av NucleoBond Xtra Maxi-kittet (Macherey-Nagel, Tyskland).

4.5 Transfektion

4.5.1 Elektroporering

För att undersöka möjligtvis stresspecifika förstärkare i MEF-celler, transfekterades cellerna genom elektroporering med LUC2-konstruktioner innehållande dylika förstärkarfragment. Vid elektroporering skapas tillfälliga porer i cellmembranet med hjälp av ett elektriskt fält, varmed celler kan uppta plasmider (Neumann et al., 1982). Olika uppsättningar MEF-celler transfekterades med plasmidkonstruktioner innehållande olika förstärkar- och promotorsekvenser, som genom in-fusionskloning inkorporerats i LUC2-rapportörplasmider (nedan kallade experimentella plasmider).

Transfektionseffektiviteten mättes genom att varje uppsättning experimentella plasmider transfekterades tillsammans med kontrollplasmider. Den valda kontrollplasmiden innehöll LACZ-genen som kodar för β -galaktosidas, vars klyvningsprodukter kan mätas spektrofotometriskt och är i proportion till mängden LACZ-plasmid i cellysaten (sektion 4.7.2). I transfektionerna användes 2–4 miljoner MEF-celler upplösta i 400 µl Gibco Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, USA). Vid

varje transfektion transfekterades 10 µg av de experimentella plasmiderna tillsammans med 10 µg LACZ-plasmid. Transfektionerna utfördes i 4 mm-elektroporeringskvytter med GenePulser Xcell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) vid 240 V och 975 µF, varefter cellerna tilläts återhämta sig 48 h innan de behandlades med HS och skördades.

4.5.2 Inhibering av interferonrespons orsakad av transfektion

Eftersom plasmidtransfektion kan orsaka en IFN-I-respons i mammalieceller behandlades MEF-cellerna i en del experiment med 1 µM BX795-inhibitor av TBK1- och IKKε-kinaser samt med 1 µM C16-inhibitor av PKR, omedelbart efter transfektionen (Huerfano et al., 2013; Muerdter et al., 2018). Två inhibitorer användes parallellt för att förhindra cellen från att använda alternativa mekanismer för aktivering av en IFN-I-respons. Inhibering av IFN-I-responsen är viktigt, eftersom IFN-I-signalering kan motverka förstärkaraktivitet (Muerdter et al., 2018) och hämma proteinsyntesen (Srivastava et al., 1998) – inklusive translationen av LUC2-mRNA.

4.6 Behandlingar som inducerar värmechock

MEF-celler som transfekterats med förstärkar-luciferaskonstruktioner utsattes för HS för att mäta hur aktivitet hos förstärkare förändras under proteinskadande stress. Celler värmechockades vid 42 °C i 1 h. Efter behandlingen skördades de celler som skulle analyseras med qRT-PCR omedelbart, så att qRT-PCR-reaktionen skulle mäta mängden luciferas-mRNA vid HS. De celler som skulle studeras med luciferasanalys inkuberades ytterligare vid 37 °C i 3 h efter HS-behandling, för att åstadkomma translation av mRNA som syntetiserats under behandlingen. Alla celler skördades genom skrapning i PBS-lösning (eng. phosphate buffered saline) (Biowest, Frankrike).

4.7 Luciferasanalys

Aktiviteten hos reglerande sekvenser kan bestämmas med hjälp av luciferasanalys, som förbereds genom att sekvenser av intresse klonas in i luciferasrapportörplasmider (Gould & Subramani, 1988). Aktiviteten hos en inkorporerad sekvens bestäms genom mätning av dess inverkan på luciferasuttrycket, vilket utförs genom mätning av luciferasaktivitet i celllys (Gould & Subramani, 1988). Resultaten i luciferasanalys kan, så som i den här studien, normaliseras med hjälp av β-galaktosidasanalys (Smale, 2016).

4.7.1 Luciferasanalys med LUC2-luciferas

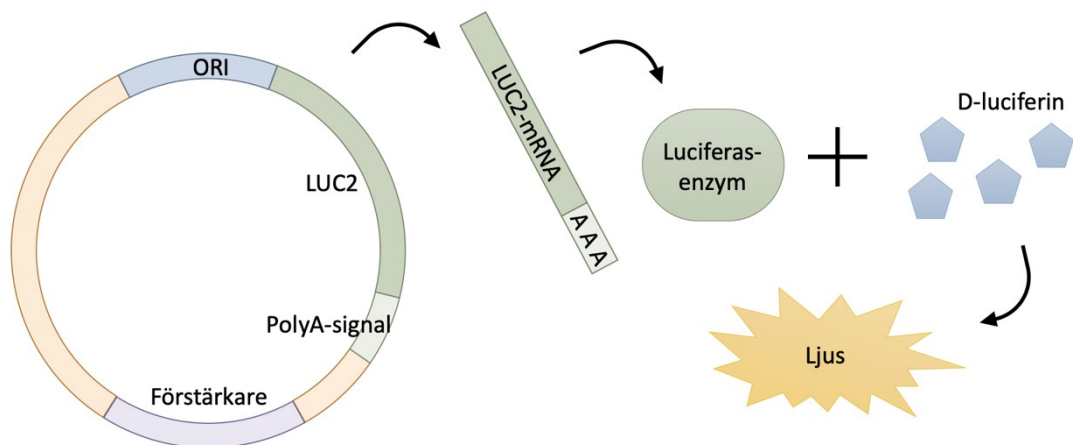
Olika typer av luciferaser har länge använts som rapportörgener för mätning av aktiviteten hos reglerande sekvenser, genom bestämning av sekvensens inverkan på luciferasuttrycket i celler transfekterade med luciferaskonstruktioner. Luciferasanalys bygger på luciferasers förmåga att effektivt oxidera substrat, varmed en detekterbar ljussignal vars styrka är i direkt proportion till mängden luciferas avges (figur 10). Genom att med luminometer mäta ljusintensiteten i celllysats från celler transfekterade med luciferaskonstruktioner, är det således möjligt att indirekt bestämma reglerande sekvensers inverkan på transkriptionen av luciferasgenen. Luciferasanalys utnyttjades i den här studien för att bestämma aktiviteten hos förstärkare i jämförelse med aktiviteten hos HSPA1A-promotorn vid värmestress. (Gould & Subramani, 1988)

Luciferasgenen hos den till det här arbetet valda luciferasrapportörplasmiden, det vill säga LUC2, är en syntetisk version av luciferas från eldflugan *Photinus pyralis* (eng. firefly luciferase, FLUC). LUC2-luciferaset producerar en över hundra gånger starkare ljussignal än FLUC och är kodonoptimerad för mammalieceller (Gil et al., 2012). LUC2, precis som FLUC, oxiderar sitt substrat D-luciferin i närvaro av Mg^{2+} , syre och adenosintrifosfat (eng. adenosine triphosphate, ATP), vilket resulterar i emission som kan mätas med luminometer (Gould & Subramani, 1988; Gil et al., 2012).

I den här studien användes luciferasanalys genom mätning av emission i D-luciferin behandlade celllysats från MEF-celler transfekterade med förstärkarluciferaskonstruktioner, vilka utsatts för HS och skördades efter återhämtning vid 37 °C i 3 h. Cellerna skördades i PBS med hjälp av skrapning och lyserades i 70 µl Cell Culture Lysis 5X Reagent (Promega, USA), varefter britelite plus-reagensen (PerkinElmer, USA), användes för mätning av luciferasaktiviteten i lysaten. För varje celllysats blandades 3 µl lysat med ytterligare 18 µl Cell Culture Lysis 5X Reagent (Promega) i triplikat i 96-hålsplattor, varefter 90 µl britelite plus-reagens tillsattes i varje brunn. Emissionen mättes därefter omedelbart med Hidex Sense-avläsare för mikropplattor (Hidex, Finland). Britelite plus-reagensen innehåller komponenter som modifierar den enzymatiska reaktionen hos luciferas, så att emissionen blir långvarig och har hög signalintensitet. Reagensen lämpar sig även för detektering av låga luciferasnivåer, vilket var orsaken till att den valdes till den här studien. Vidare innehåller Britelite plus-reagensen komponenter som lyserar celler. Alternativ till att

cellerna skördades, lyserades och därefter blandades med britelite plus-reagensen, hade cellerna kunnat odlas i 96-hålsplattor, varpå britelite plus-reagensen hade kunnat tillsättas direkt i mediet. Normalisering mot β -galaktosidas hade däremot inte varit möjligt i detta fall, varmed andra metoder för normalisering av resultaten skulle ha krävts.

Alternativt till luciferasanalys hade förstärkarna kunnat analyseras i andra typer av rapportörplasmider, till exempel i konstruktioner innehållande fluorofor-rapportörgener. Grönt fluorescerande protein (GFP) är en allmänt använd fluorofor som vid excitation emitterar grönt ljus, vilket möjliggör dess detektering (Close et al., 2011). Fördelen med GFP är att inget substrat behövs vid detektering av fluorescens, men metodens sensitivitet är låg i jämförelse med luciferasanalys (Close et al., 2011), vilket gjorde att luciferasanalys valdes till den här studien.



Figur 10. Översikt av luciferasanalys. Luciferasanalys bygger på luciferasers förmåga att oxidera sina substrat, varmed detekterbar luminiscens avges. LUC2-luciferaset (eng. luciferase 2) oxiderar substratet D-luciferin. Då luciferaspromotorn (i detta fall ORI-sekvensen (eng. origin of replication)) är aktiv, transkriberas luciferasgenen till luciferas-mRNA, som till följd av polyadenyleringssignalen (polyA-signal) polyadenyleras. På grund av polyadenosinsvansen hålls luciferas-mRNA stabilt och kan fungera som mall vid proteinsyntesen. Det färdiga luciferasproteinet oxiderar sitt substrat, varmed emission som kan mätas med luminometer avges. Ljusintensiteten är i direkt relation till mängden luciferas och därför kan luciferasmängden bestämmas genom mätning av den. Luciferasanalys kan användas för att indirekt bestämma aktiviteten hos reglerande sekvenser som inkorporerats i luciferasrapportörplasmider.

4.7.2 β -galaktosidasanalys

För att jämföra resultat från luciferasanalys emellan olika celllysater, transfekterades alla celler förutom med experimentella plasmider med en β -galaktosidas-kontrollplasmid. Kontrollplasmiden innehåller *E. coli* LACZ-genen som kodar för β -galaktosidasprotein. Plasmidkonstruktionen härstammar från Samuels- och Stanley-laboratorierna (New York University) (Addgene #24058; <http://n2t.net/addgene:24058>). LACZ-genen är placerad i plasmidkonstruktionen under kontrollen av en aktiv promotor från respiratoriskt syncytialvirus (RSV) och således är den basala transkriptionen av LACZ hög och stabil under alla förhållanden (Flug et al., 1987; Zheng & Baum, 2005). Eftersom β -galaktosidassyntesen inte märkbart förändras vid värmestress, och mängden β -galaktosidas i celler transfekterade med LACZ-plasmider därmed direkt reflekterar transfektionseffektivitet, är LACZ-plasmiden en lämplig laddningskontroll i undersökning av värmekänsliga förstärkare.

Vid β -galaktosidasanalys tillsätts i en alikvot av respektive celllysater buffert innehållande β -galaktosidassubstratet orto-nitrofenyl- β -galaktosid (eng. ortho-nitrophenyl- β -galactoside, ONPG), natriumfosfat och magnesiumklorid, det vill säga ONPG-buffert, som förbereds av ONPG-stocklösning, Mg^{2+} -buffert och natriumfosfatbuffert precis före användning (bilaga A) (Smale, 2016). β -galaktosidas hydrolyserar ONPG till galaktos och orto-nitrofenol, som har en gul färg (Stephenson 2016, s. 408). Orto-nitrofenol absorptionsen mäts med spektrofotometer vid 420 nm och är i direkt proportion till mängden β -galaktosidas och därmed till mängden LACZ-plasmid i lysaten (Smale, 2016; Stephenson 2016, s. 408). Mängden LACZ-plasmid i lysaten är i sin tur ett mått på transfektionseffektiviteten, varmed normalisering av resultat i luciferasanalys mot resultat i β -galaktosidasanalys möjliggör bestämning av verkliga skillnader i luciferasmängder olika celllysater emellan (Flug et al., 1987). I denna studie normaliserades resultaten i luciferasanalys med hjälp av β -galaktosidasanalys genom att 3 μ l av varje cellysat blandades med 200 μ l ONPG-buffert (bilaga A) i triplikat i 96-hålsplattor. Plattan inkuberades 2–4 h vid 37 °C, tills en gul färg blev synlig för blotta ögat. Orto-nitrofenol absorptionsen mättes vid 420 nm med Hidex Sense-avläsare (Hidex).

Istället för normalisering mot β -galaktosidas hade förslagsvis dubbel luciferasanalys kunnat utföras. I dubbel luciferasanalys används två olika luciferasproteiner i den experimentella plasmiden respektive kontrollplasmiden. Luciferaset som fungerar som

laddningskontroll bör klyva ett annat substrat än luciferaset i den experimentella plasmiden. Om luminiscensen som avges då kontrolluciferaset klyver sitt substrat är av annan våglängd än våglängden för luciferaset i den experimentella plasmiden, kan cellerna eller celllysaten behandlas med båda substraten samtidigt i samma 96-hålsplatta. Således mäts provet och kontrollen i exakt samma prov vid samma tidpunkt, vilket gör att resultaten blir pålitligare. β -galaktosidasanalys valdes ändå för normalisering på grund av kostnadseffektiva orsaker. (McNabb et al., 2005)

4.8 Kvantitativ polymeraskedjereaktion med omvänd transkription

Den transkriptionella aktiviteten hos en utvald gen kan mätas med kvantitativ polymeraskedjereaktion med omvänd transkription (eng. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) (Green & Sambrook, 2018) (figur 11). qRT-PCR är en metod för att bestämma mängden av en specifik RNA-molekyl i renat RNA-prov, vilket i denna studie kompletterar luciferasanalys (sektion 4.7). En förstärkares inverkan på transkriptionen av luciferas i MEF-celler transfekterade med luciferaskonstruktioner åstadkoms genom mätning av luciferas-mRNA-uttrycket. I qRT-PCR kombineras allmänna principer för PCR tillsammans med metoder som möjliggör detektering av PCR-produkternas kvantitet i realtid (Heid et al., 1996). Med hjälp av enzymet omvänt transkriptas transkriberas RNA till komplementärt DNA (eng. complementary DNA, cDNA), så att kvantiteterna av cDNA-molekylerna i provet är i proportion till mängderna RNA-molekyler i det ursprungliga RNA-provet (Green & Sambrook, 2018; Flisiński et al., 2012). Omvända transkriptaser förekommer naturligt hos bland annat retrovirus och är RNA-beroende DNA-polymeraser: de syntetiserar DNA utgående från RNA-templat (Baltimore, 1970). Efter cDNA-syntes amplifieras cDNA kvantitativt med hjälp av PCR (Green & Sambrook, 2018). Mängden PCR-produkt vid varje PCR-cykel bestäms med hjälp av en passlig teknik, exempelvis TaqMan-analys eller SYBR Green-metoden, vilka uppger mängden DNA i realtid genom fluorescens signaler (Green & Sambrook, 2018). Den fluorescens signalens intensitet är i direkt relation till mängden DNA i provet (Heid et al., 1996), och därmed till mängden RNA i det ursprungliga RNA-provet.

Vid varje PCR-cykel mäter qRT-PCR-apparaturen ljusintensiteten i proverna, så att en kurva över ökning i ljusintensitet erhålls för varje prov (figur 11A). Apparaturen

fixerar ett tröskelvärde (eng. threshold) för ljusintensitet, och genom observation av antalet cykler som krävs för att uppnå tröskelvärdet erhålls så kallade Ct-värden (eng. cycle threshold) för proverna. Från Ct-värden av kända utspädningar av ett godtyckligt cDNA-prov erhålls en standardkurva. Den relativa mängden cDNA, och därmed RNA, kan bestämmas genom jämförelse av de experimentella provernas Ct-värden mot standardkurvan. Ju mera RNA det finns i ett prov, destu snabbare uppnås tröskelvärdet, vilket innebär lägre Ct-värden. (Heid et al., 1996)

4.8.1 qRT-PCR-metoder

TaqMan-analys är en qRT-PCR-metod som utnyttjar märkta DNA-sonder. Sonden måste vara komplementär till cDNA:t av intresse, inom det område som amplifieras med hjälp av de för ändamålet valda primrarna (figur 11C). Vidare används det värmetåliga DNA-polymeraset Taq-polymeras, som innehar exonukleasaktivitet och kan klyva den fluorescerande sonden. Sonden avger en fluorescent signal först då den klyvs, eftersom den fluorescerande markören finns på sondens 5'-ända, medan en så kallad släckare som absorberar ljus finns i 3'-ändan. Eftersom Taq-polymeraset syntetiserar den nya DNA-strängen i 5'- till 3'-riktning klyvs sondens 5'-ända först, varmed den fluorescanta nukleotiden släpps fri från resten av sonden och kan avge mätbar fluorescens. (Holland et al., 1991)

SYBR Green-metoden är en mindre specifik men kostnadseffektiv metod för detektering av RNA-kvantitet. I qRT-PCR med SYBR Green mäts PCR-produkter i realtid med hjälp av SYBR Green-färgämnet, som binder dubbelsträngat DNA (dsDNA) (figur 11B). Då färgämnet binder dsDNA avges fluorescerande ljus, vars intensitet är proportionell mot mängden dsDNA, det vill säga mängden PCR-produkt. (Ponchel et al., 2003)

4.8.2 Mätning av LUC2-mRNA med hjälp av qRT-PCR

I den här studien användes både SYBR Green-metoden och TaqMan-analys för kvantifiering av mRNA, vilket utfördes med QuantStudio 3-instrumentet (Applied Biosystems, USA). Inför qRT-PCR lyserades MEF-celler tranfekterade med förstärkar-konstruktioner med Buffert RLT, som tillhör RNeasy Plus Mini-kittet (Qiagen). RNA renades därefter ur celllysaten med hjälp kolumner som binder RNA, vilka innefattas i RNeasy Plus Mini-kittet. RNA som eluerats från kolumnerna användes därefter för framställning av cDNA. Emellertid kan eluat innehålla DNA-

kontaminationer, och för att avlägsna både genomiskt- och plasmid-DNA från proverna behandlades de med TURBO DNA-free DNase-kittet (Ambion, USA). Detta möjliggjorde att specifikt cDNA mättes i efterföljande kvantitativa PCR-reaktion. TURBO DNase-enzymet är en modifierad version av DNase I, med mångfaldig katalytisk aktivitet. Utgående från det DNase-behandlade RNA-provet syntetiserades cDNA med hjälp av iScript cDNA Synthesis-kittet (BioRad), som för cDNA-syntes utnyttjar en modifierad version av omvänt transkriptas från en cancercellinje från musen. I cDNA-kittet innefattas slumpmässiga hexamerprimrar samt oligo(dT)-primrar, som är komplementära till polyadenosinsvansen i mRNA. Med hjälp av dessa primrar syntetiseras cDNA från den totala mängden RNA. Inför efterföljande kvantitativa PCR-reaktioner späddes cDNA:t ut, och i de olika experimenten användes utspädningarna 1:20, 1:10 och 1:1.

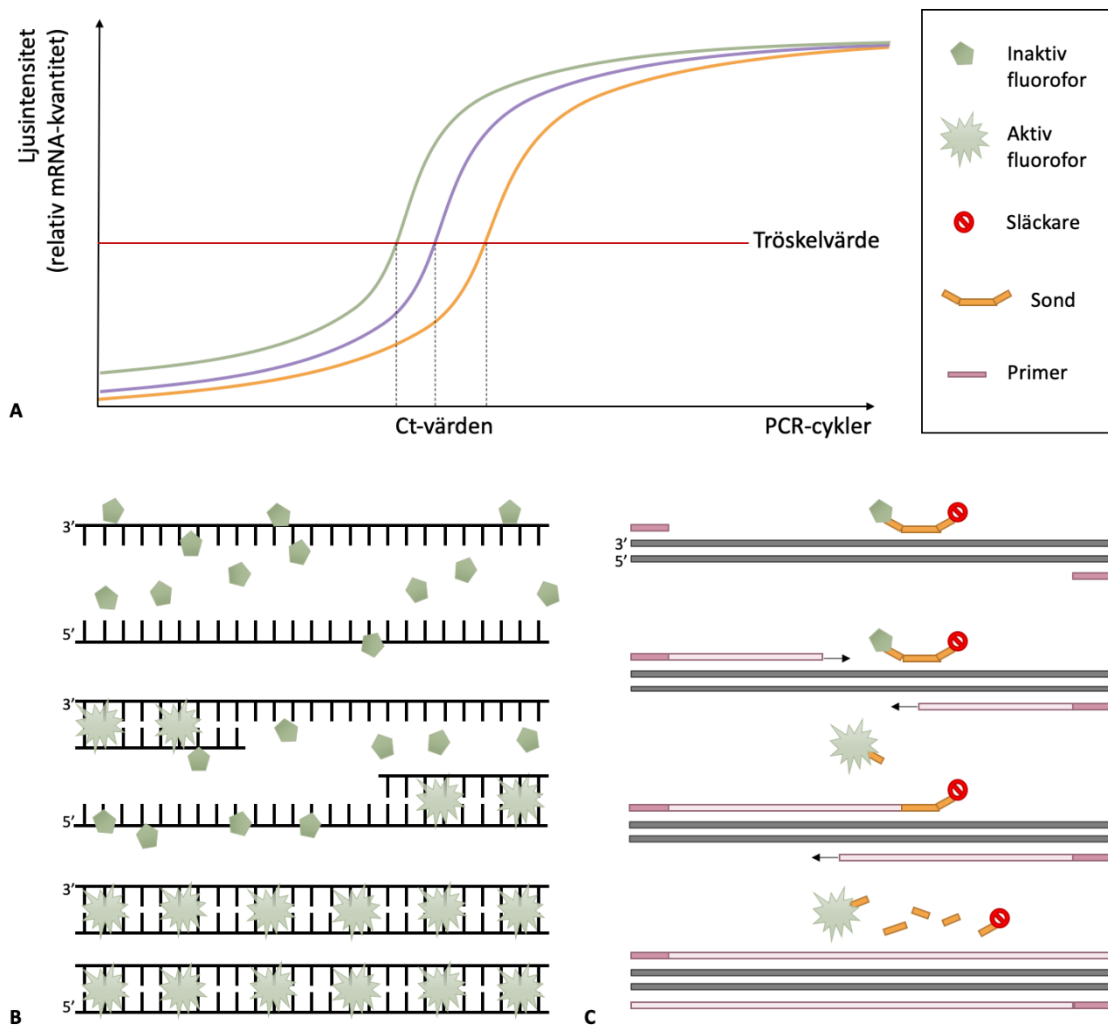
För kvantifiering av LUC2-cDNA användes främst SYBR Green-metoden, eftersom denna metod tillät detektering av LUC2-cDNA utan användning av specifika sonder. Till ändamålet användes SensiFAST SYBR Hi-ROX-kittet (Bioline Meridian Bioscience, USA), som innehåller SYBR Green-färgämnet, DNA-polymeras och deoxinukleosidtrifosfater (eng. nucleoside triphosphate, dNTP) (bilaga E, tabell 2). Ett PCR-program som rekommenderas i kittet användes (bilaga E, tabell 3). LUC2-cDNA kvantifierades i ett experiment med TaqMan-analys, varmed SensiFAST Probe Lo-ROX-kittet (Bioline Meridian Bioscience) användes (bilaga E, tabell 4). PCR-programmet i instruktionerna för kittet följdes (bilaga E, tabell 5).

Den uppmätta mängden LUC2-mRNA normaliserades mot LACZ-mRNA eller 18S-rRNA, genom att även LACZ-cDNA från LACZ-plasmid eller endogen 18S-cDNA amplifierades vid varje PCR-reaktion. Kontrollgenen bör vara en gen som är konstitutivt uttryckt och för vilken transkriptionen inte förändras märkbart under de förhållanden som undersöks i experimentet ifråga (Green & Sambrook, 2018). Uttrycket av β -galaktosidas från LACZ-plasmiden är högt och stabilt, eftersom LACZ-genen är placerad framför en aktiv RSV-promotor (Flug et al., 1987; Zheng & Baum, 2005). Likaså är 18S-rRNA konstitutivt uttryckt och en allmänt använd endogen kontroll (Thellin et al., 1999). 18S-cDNA detekterades med TaqMan-analys med sonder mot 18S-cDNA (Roche Life Science, Tyskland), medan LACZ-cDNA detekterades med både SYBR-Green-metoden och TaqMan-analys i olika experiment. Sonder och primrar för qRT-PCR-reaktioner finns upplistade i bilaga E, tabell 1.

Sonder med fluoroforen karboxyfluorescein (eng. carboxyfluorescein, FAM) och BHQ-1-släckaren (eng. black hole quencher-1) användes.

Standardkurvor för qRT-PCR-reaktioner förbereddes genom att en godtycklig blandning av cDNA-prov gjordes, utifrån vilken utspädningarna 1:1, 1:5, 1:25, 1:125 och 1:625 blandades. Efter mätning av utspädningarnas Ct-värden skapades standardkurvor i Microsoft Excel. Genom jämförelse av LUC2-Ct-värden mot LUC2-standardkurvan bestämdes relativa mängden LUC2-cDNA i proverna, och därmed relativa mängden LUC2-mRNA. På motsvarande sätt bestämdes relativa mängder av LACZ-mRNA och 18S-rRNA. Mängden LUC2-mRNA normaliserades slutligen mot kontrollgenens mRNA- respektive rRNA-mängder, för justering av eventuella laddningsfel.

I alla qRT-PCR-reaktioner amplifierades också negativa kontroller. I försöken användes en kontroll utan cDNA-templat (eng. no template control, NTC) och en kontroll utan omvänt transkriptas (eng. no amplification control, NAC). De negativa kontrollerna används för att kontrollera att cDNA inte kontaminerats, exempelvis med genomiskt DNA (gDNA), och för att detektera förekomst av eventuella primrar som basparat med varandra (Green & Sambrook, 2012, s. 509).



Figur 11. Kvantitativ polymeraskedjereaktion med omvänd transkription. Med hjälp av kvantitativ polymeraskedjereaktion med omvänd transkription (eng. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) kvantifieras RNA genom att först skrivas om till komplementärt DNA (eng. complementary DNA, cDNA), som sedan amplifieras kvantitativt med PCR, genom mätning av ljusintensitet som är proportionell mot mängden PCR-produkt. Ljusintensitet vid varje PCR-cykel mäts för varje prov som studeras, så att en kurva över förändringen i ljusintensitet erhålls för proverna (**A**). qRT-PCR-apparaturen fixerar ett tröskelvärde för ljusintensitet, och genom observation av antalet cykler som krävs för att uppnå tröskelvärdet erhålls Ct-värden (eng. cycle threshold) för proverna. PCR-produkterna kan kvantifieras i realtid exempelvis med hjälp av det fluorescanta färgämnet SYBR Green, vars ljusintensitet ökar då det binder dubbelsträngat DNA (**B**). Vid qRT-PCR med TaqMan-analys, används fluorescanta DNA-sonder, som är komplementära till en sekvens inne i cDNA:t (**C**). Den fluorescanta markören finns på sondens 5'-ända och en så kallad släckare finns på sondens 3'-ända. Taq-polymeras har exonukleasaktivitet och kan därför klyva sonden. Eftersom polymeraset syntetiserar den nya DNA-strängen i 5'- till 3'-riktning klyvs sondens 5'-ända först, varmed den fluorescanta nukleotiden släpps fri från resten av sonden och fluorescens avges. Figur 11C är modifierad från Yuan et al. (2000).

5 Resultat

5.1 Sekvensering av luciferaskonstruktioner

Enligt resultat i sekvensering fungerade in-fusionskloningsreaktionerna för EH2, EH9, EH12, EH14, EH17, EH18 och EH20, medan de misslyckades för fem andra förstärkarkandidater (EH11, EH13, EH15, EH16 och EH19). Vidare fungerade kloning av LGALS3-promotorn till luciferasrapportörplasmiden, medan kloningen misslyckades för två andra enligt PRO-seq stressresistenta promotorer (PITPNA- och CTF8-promotorer). In-fusionsklonning av den artificiella SCP1-promotorn till rapportörplasmiden misslyckades också enligt sekvenseringsresultat.

5.2 Analys av förstärkarkandidater med hjälp av SCREEN-databasen

Enligt analys av förstärkarkandidater (EH2, EH9, EH12, EH14, EH17, EH18 och EH20) mot ENCODE SCREEN-databasen, har alla utom en av de utvalda kandidaterna förstärkarsignatur (tabell 2). SCREEN-databasen innefattade inga reglerande sekvenser vars position skulle ha överlappat EH12-regionen. Den till EH12 närmaste sekvensen med förstärkarsignatur (EM10E0808185) i musens genom finns enligt databasen vid kromosom 5: 139 015 190–139 015 440. EM10E0808185-sekvensens startpunkt är ca 3,6 kb från EH12-sekvensens slutpunkt.

Genom manuell analys av förstärkarsekvenser och HSPA1A-promotorsekvensen upptäcktes att endast EH12 innefattar en kanonisk HSE-sekvens. ISRE-motiv fanns inte i en enda av sekvenserna. Förstärkar- och HSPA1A-promotorsekvenserna med utmärkta HSE-motiv finns samlade i bilaga C.

Tabell 2. Analys av utvalda förstärkarkandidater med hjälp av ENCODE SCREEN-databasen. Sekvenserna analyserades med SCREEN-databasen med hjälp av de genomiska koordinater som bestämts utgående från resultat i tidigare utförda PRO-seq-undersökningar (eng. precision nuclear run-on sequencing).

Förstärkare, namn	Koordinater, kromosom: start–slut	Motsvarande sekvens i SCREEN, kod	SCREEN-koordinater, kromosom: start–slut	Sekvenstyp (enligt SCREEN)
EH2	12: 85 201 162– 85 202 662	EM10E0543370	12: 85 201 221– 85 201 493	Förstärkar- signatur
		EM10E0543371	12: 85 201 555– 85 201 898	Förstärkar- signatur
EH9	5: 135 879 257– 135 880 757	EM10E0806849	5: 135 879 445– 135 879 795	Förstärkar- signatur
		EM10E0806850	5: 135 879 873– 135 880 223	Förstärkar- signatur
EH12	5: 139 010 118– 139 011 618	-	-	-
EH14	5: 148 632 303– 148 633 803	EM10E0811480	5: 148 632 638– 148 632 909	Förstärkar- signatur
EH17	5: 147 736 329– 147 737 829	EM10E0811168	5: 147 736 726– 147 737 063	Förstärkar- signatur
EH18	16: 4 267 355– 4 268 855	EM10E0614179	16: 4 267 860– 4 268 028	Förstärkar- signatur
		EM10E0614180	16: 4 268 030– 4 268 338	Förstärkar- signatur
EH20	4: 53 195 545– 53 197 045	EM10E0755697	4: 53 196 049– 53 196 349	Förstärkar- signatur
		EM10E0755698	4: 53 196 615– 53 196 816	Förstärkar- signatur

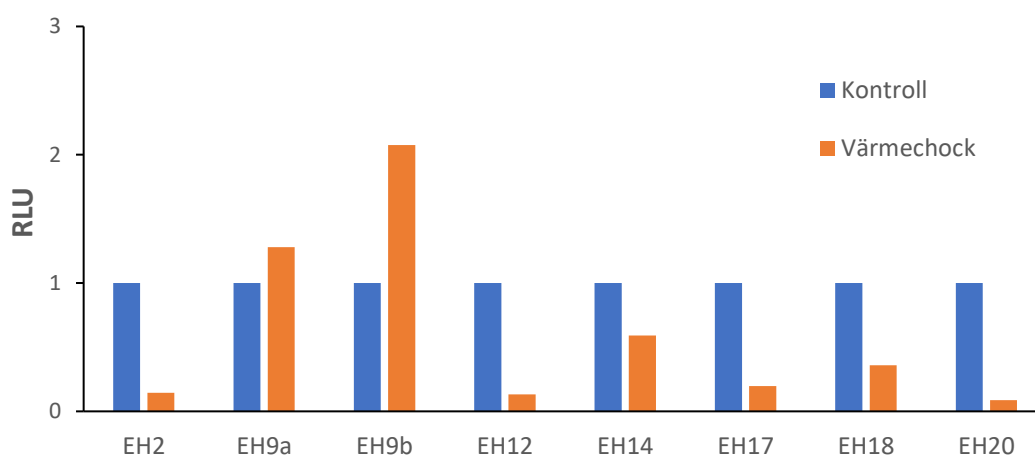
5.3 Luciferasanalys

5.3.1 Mätning av förstärkaraktivitet i celler som inte behandlats med inhibitorer av IFN-I-signalerings

Förstärkaraktivitet undersöktes med hjälp av luciferasanalys i celllysats från MEF-celler som transfekterats med förstärkar-luciferaskonstruktioner och som därefter tillåts växa vid 37 °C i 48 h, varefter de utsatts för HS vid 42 °C i 1 h med återhämtning vid 37 °C i 3 h. Luciferasaktiviteten i celllysaten, alltså indirekt luciferasmängden, bestämdes genom mätning av luminiscens som uppstår då luciferas klyver sitt substrat. Dessa värden normaliserades mot β -galaktosidasmängden i proverna, vilken också mättes indirekt genom spektrofotometrisk mätning av β -galaktosidas-klyvningsprodukter.

Då förstärkaraktivitet undersöktes med hjälp av luciferasanalys utan att inhibitorer av IFN-I-signalerings användes vid transfektion av förstärkar-luciferaskonstruktioner in i

MEF-celler, uppmättes förändrad luciferasaktivitet vid värmestress för alla celler transfekterade med förstärkar-luciferaskonstruktioner (figur 12). Luciferasaktiviteten och indirekt luciferasmängden, alltså därmed förstärkaraktiviteten, ökade endast för EH9, i förstärkarens båda riktningar (EH9a och EH9b). Den största ökningen i luciferasaktivitet påvisades för celllysat från celler transfekterade med EH9b-konstruktioner, för vilket luminescensen ökade med 108 % vid HS. Luciferasaktiviteten minskade till följd av HS för resten av förstärkarna, det vill säga för EH2, EH12, EH14, EH17, EH18 och EH20.

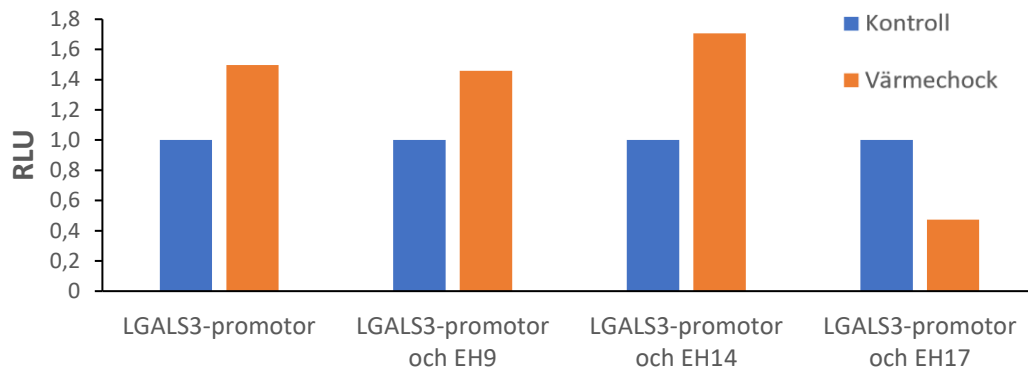


Figur 12. Förändring i luminescens vid värmechock hos celler transfekterade med förstärkar-luciferaskonstruktioner. Förstärkaraktivitet analyserades genom mätning av mängden LUC2-luciferas (eng. luciferase 2) med hjälp av luciferasanalys i MEF-celler som transfekterats med förstärkar-luciferaskonstruktioner. Cellerna hade därefter tillåtit växa vid 37 °C i 48 h, varefter de behandlades med värmechock vid 42 °C i 1 h med återhämtning vid 37 °C i 3 h. Genom mätning av luminiscens som uppstår då LUC2-luciferaset oxiderar sitt substrat D-luciferin kunde mängden LUC2 i samtliga celllysat indirekt bestämmas. Dessa värden normaliserades mot mängden β -galaktosidas i proverna, vilken också bestämdes indirekt genom spektrofotometrisk mätning av β -galaktosidas-klyvningsprodukter. Varje värmechockprov (röd) normaliserades mot den obehandlade kontrollen (blå) som gavs värdet 1. RLU, eng. relative light unit. n = 1.

5.3.2 Mätning av förstärkaraktivitet i celler som behandlats med inhibitorer av IFN-I-signalering

Genom att MEF-celler behandlades med BX975- och C16-inhibitorer av IFN-I-signalering i samband med transfektion förändrades resultaten något (figur 13). Behandling med inhibitorer av IFN-I-signalering utfördes, eftersom plasmidtransfektion kan orsaka en IFN-I-respons, vilket kan störa aktiviteten hos förstärkare (Huerfano et al., 2013; Muerdter et al., 2018). I motsats till resultaten ovan (figur 12) användes i detta experiment förstärkarkonstruktioner som även innehöll

LGALS3-promotorn framför LUC2-genen. Mängden luciferas förändrades vid HS för alla celler transfekterade med förstärkar-luciferaskonstruktioner (figur 13), men förändringen var fortfarande negativ för EH17. Vidare skedde en ökning i luciferasaktiviteten vid utsättning för HS även för den tomma konstruktionen som saknar inkorporerat förstärkarfragment.

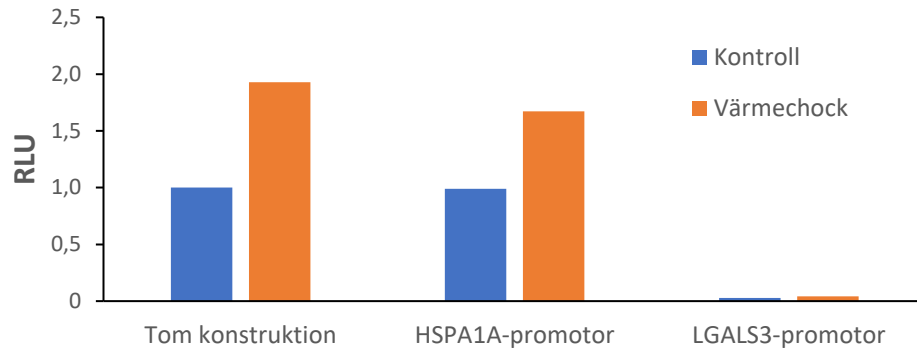


Figur 13. Förändring i luminescens vid värmechock hos celler transfekterade med luciferaskonstruktioner innehållande både förstärkare och LGALS3-promotor.

Förstärkaraktivitet studerades i MEF-celler som transfekterats med förstärkar-luciferaskonstruktioner som också innehöll promotorn till galektin 3-genen (LGALS3) på ett dylikt sätt som beskrivits i figurtexten till figur 12. I samband med transfektion hade cellerna därtill behandlats med 1 μ M BX795- och 1 μ M C16-inhibitorer av IFN-I-signalering. Varje värmechockprov (röd) normaliserades mot den obehandlade kontrollen (blå) som gavs värdet 1. RLU, eng. relative light unit. n = 1.

5.3.3 Olika promotorers inflytande på luciferasuttrycket

För att undersöka funktionaliteten av luciferasrapportörplasmidens ORI-sekvens som promotor till LUC2-genen, jämfördes ORI-promotorn med två andra promotorer amplifierade från musens DNA (figur 14). Konstruktioner innehållande endast ORI som promotor (tom konstruktion) jämfördes med den stressresistenta LGALS3-promotorn samt den värmekänsliga HSPA1A-promotorn både under kontrollförhållanden och vid värmestress. Konstruktionerna innehöll inga förstärkare varför experimentet mätte promotorernas basala inverkan på transkriptionen av LUC2-genen. Märkbara skillnader i luciferasaktivitet mellan de olika konstruktionerna detekterades (figur 14). Den tomma konstruktionen och HSPA1A-promotorkonstruktionen hade liknande värden både under kontrollförhållanden och vid värmestress, medan luciferasaktiviteten hos celler transfekterade med konstruktioner innehållande LGALS3-promotorn var betydligt lägre.

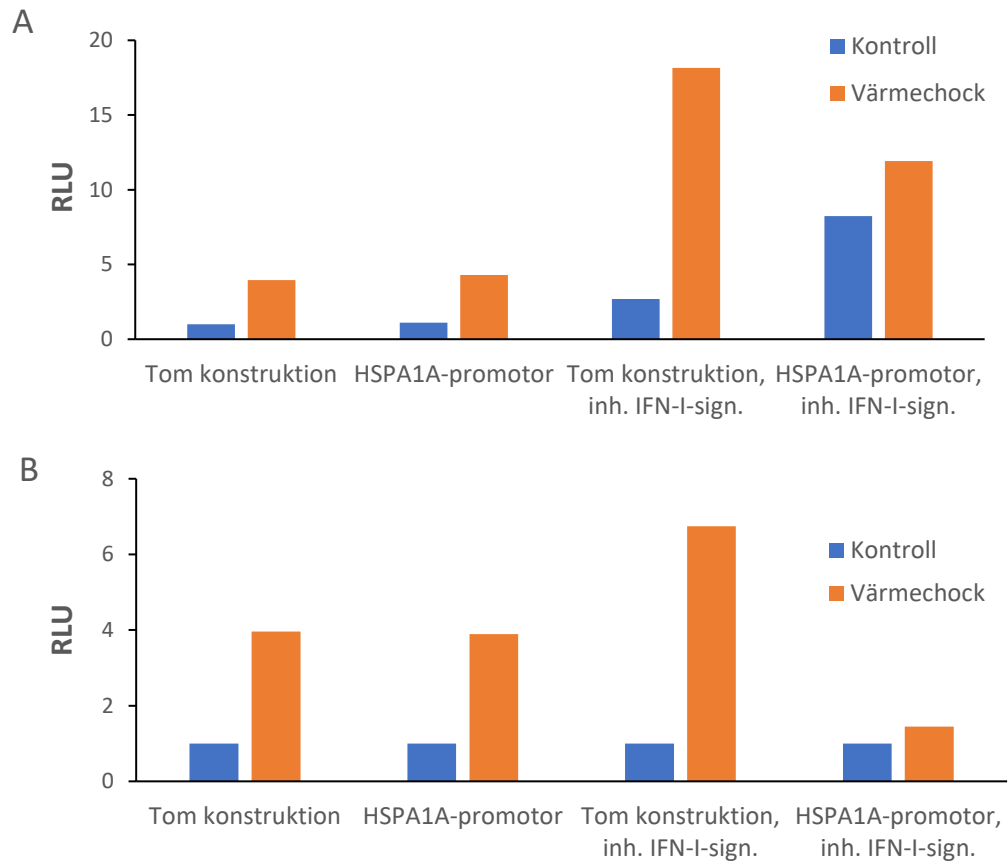


Figur 14. Jämförelse mellan olika promotorers basala inverkan på transkriptionen av luciferas.

Promotorers basala inverkan på luciferasuttrycket analyserades med luciferasanalys i MEF-celler som transfekterats med konstruktioner innehållande promotorn till HSPA1A-genen (eng. heat shock protein family A member 1A) eller galektin 3-genen (LGALS3) men inte förstärkarskvenser. Cellerna behandlades som beskrivits i figur 12. Alla prov är normaliserade mot den tomma konstruktionen under kontrollförhållanden vilken givits värdet 1. RLU, eng. relative light unit. n = 1.

5.3.4 Inverkan av inhibitorer av IFN-I-signalering på aktiviteten hos HSPA1A-promotorn

HSPA1A-promotorns inverkan på luciferasuttrycket i MEF-celler transfekterade med HSPA1A-promotor-luciferaskonstruktioner jämfördes med luciferasanalys mellan celler som behandlats med inhibitorer av IFN-I-signalering vid transfektion av konstruktionerna och celler som inte blivit behandlade (figur 15). En allmän ökning i luciferasaktivitet detekterades för celler som behandlats med inhibitorer av IFN-I-signalering vid transfektionen i jämförelse med celler som inte behandlats, både under kontrollförhållanden och vid värmechock (figur 15A). Användning av inhibitorer av IFN-I-signalering vid transfektionen stimulerade luciferassyntesen märkbart i celler transfekterade med HSPA1A-promotorkonstruktioner redan under kontrollförhållanden (figur 15A), vilket förminskade skillnaden i luciferasaktivitet mellan kontrollförhållanden och värmechock för HSPA1A-promotorkonstruktionen (figur 15B).

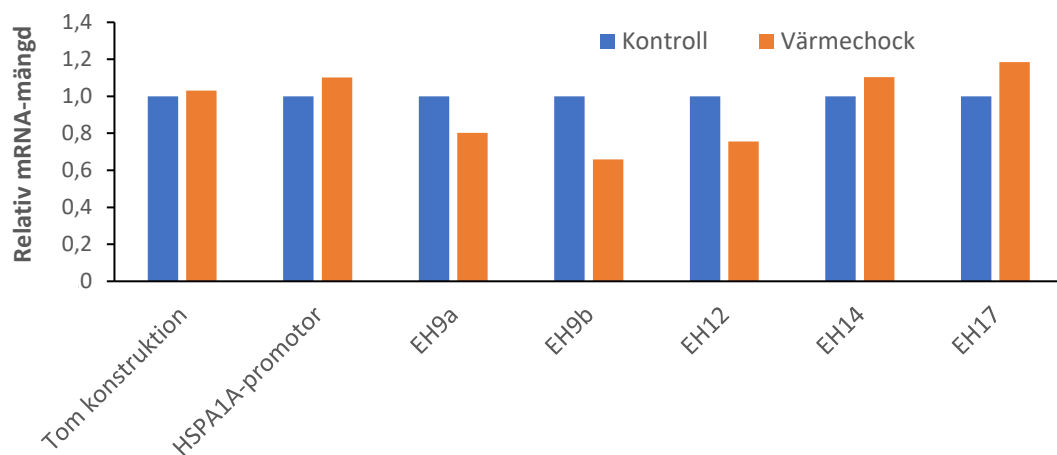


Figur 15. Jämförelse av HSPA1A-promotorns inverkan på luciferasuttrycket mellan celler transfekterade med HSPA1A-promotorkonstruktioner vilka antingen behandlats eller inte behandlats med inhibitorer av IFN-I-signalering vid transfektionen. Inverkan av inhibitorer av IFN-I-signalering på luciferasuttrycket i MEF-celler som transfekterats med luciferasplasmider innehållande HSPA1A-promotorn (eng. heat shock protein family A member 1A) undersöktes med luciferasanalys. Cellerna hade hanterats som beskrivits i figur 12, men i samband med transfektionen hade en andel av cellerna behandlats med 1 μ M BX795- och 1 μ M C16-inhibitorer av IFN-I-signalering. Alla prov normaliserades mot den tomma konstruktionen under kontrollförhållanden vilken gavs värdet 1 (A). Varje värmechockprov (röd) normaliserades också mot respektive obehandlad kontroll (blå) vilka gavs värdet 1 (B). RLU, eng. relative light unit. n = 1.

5.4 qRT-PCR

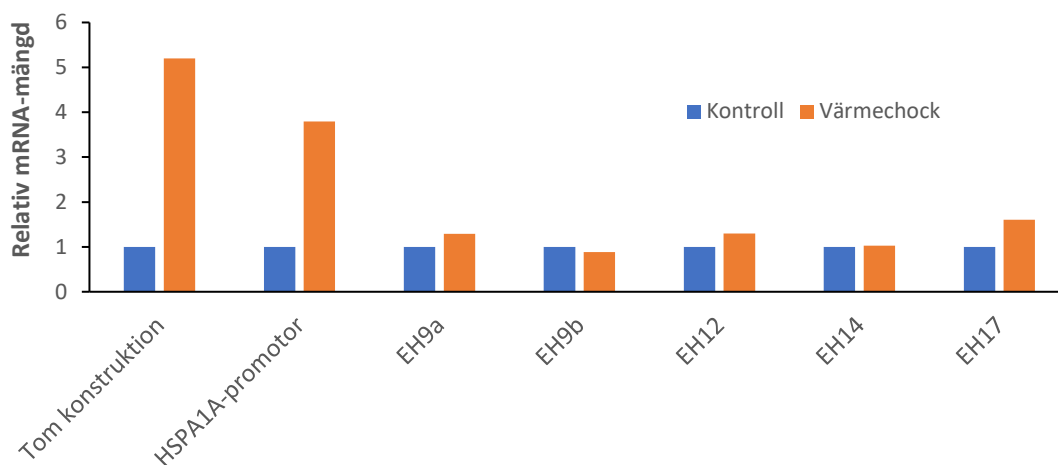
5.4.1 Mätning av LUC2-mRNA med SYBR Green-metoden

Förstärkaraktivitet studerades genom mätning av LUC2-mRNA-uttryck med qRT-PCR i celler transfekterade med förstärkar-LUC2-konstruktioner. LUC2-cDNA detekterades med hjälp av SYBR Green-färgämnet och normaliserades mot det endogena uttrycket av 18S, vars cDNA-mängd mättes med hjälp av TaqMan-analys (figur 16). Små förändringar i mängden LUC2-mRNA uppmättes vid värmestress jämfört med kontrollförhållanden för alla celler transfekterade med förstärkar-luciferaskonstruktioner, men en ökning detekterades endast för två av fem undersökta förstärkarkonstruktioner.



Figur 16. Förändring i mängden LUC2-mRNA vid värmechock hos celler transfekterade med förstärkar-luciferaskonstruktioner. Mängden mRNA från LUC2-genen (eng. luciferase 2) vid värmechock analyserades med qRT-PCR i MEF-celler som transfekterats med förstärkarkonstruktioner eller konstruktioner innehållande promotorn till HSPA1A-genen (eng. heat shock protein family A member 1A, HSPA1A). Cellerna tilläts växa vid 37 °C i 48 h efter transfektionen, varefter de behandlades med värmechock vid 42 °C i 1 h. De ur qRT-PCR erhållna Ct-värdena (eng. cycle threshold) användes för att i Microsoft Excel räkna ut relativa mRNA-mängder, genom jämförelse mot en standardkurva av Ct-värden vars motsvarande relativa mRNA-mängder var kända. Relativa LUC2-mRNA-värden normaliserades därefter mot relativa rRNA-värden av den endogena kontrollen 18S, varefter varje värmechockprov (röd) normaliserades mot den obehandlade kontrollen (blå) som gavs värdet 1. Komplementärt DNA (eng. complementary DNA, cDNA) till LUC2 mättes med SYBR Green-metoden och 18S-cDNA med TaqMan-analys. Framställning av proverna: renat RNA behandlades inte med deoxiribonukleas; cDNA-utspädning 1:20. n = 1.

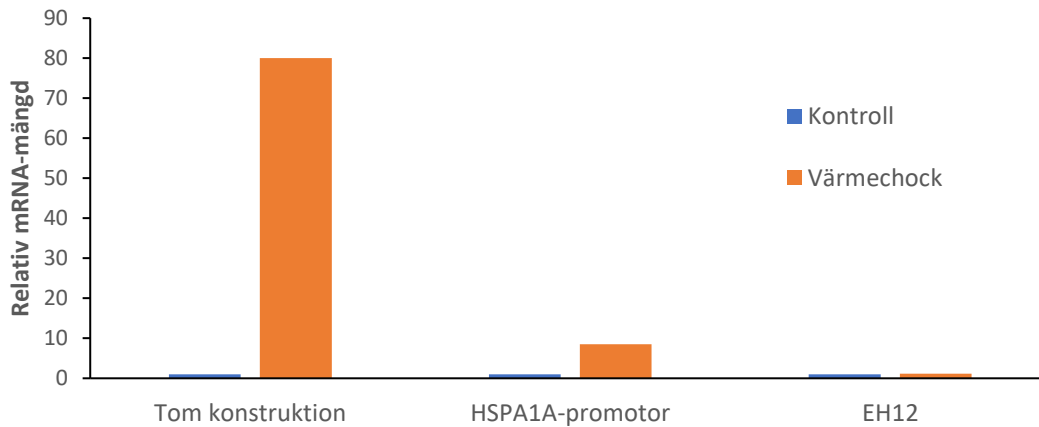
I ett annat försök med qRT-PCR detekterades små förändringar i LUC2-mRNA-mängder vid värmestress jämfört med kontrollförhållanden för alla celler transfekterade med förstärkar-luciferaskonstruktioner (figur 17). Däremot ökade mängden LUC2-mRNA märkbart för den tomma konstruktionen och HSPA1A-promotorkonstruktionen i de värmestressade cellerna. LUC2-mRNA ämnades normaliseras mot LACZ-mRNA-uttryck från LACZ-plasmid, men mätning av LACZ-mRNA med hjälp av SYBR Green-metoden misslyckades.



Figur 17. Förändring i mängden LUC2-mRNA vid värmechock hos celler transfekterade med förstärkar-luciferaskonstruktioner. Förstärkaraktivitet vid värmechock studerades med qRT-PCR på ett liknande sätt som beskrivits i figurtexten till figur 16. Mängden LUC2-mRNA skulle i detta fall normaliseras mot LACZ-mRNA, vilket dessvärre misslyckades. Varje värmechockprov (röd) normaliserades mot den obehandlade kontrollen (blå) som gavs värdet 1. LUC2- och LACZ-cDNA mättes med hjälp av SYBR Green-metoden. Framställning av proverna: renat RNA behandlades med deoxiribonukleas; cDNA-utspädning 1:10. n = 1.

5.4.2 Mätning av LUC2-mRNA med TaqMan-analys

LUC2-mRNA detekterades även med hjälp av TaqMan-analys (figur 18). Mängden LUC2-mRNA förändrades knappt vid värmechock för den undersökta förstärkarkonstruktionen, medan en märkbar ökning uppmättes för den tomma konstruktionen och för HSPA1A-promotorkonstruktionen. LUC2-mRNA ämnades normaliseras mot LACZ-mRNA-uttryck från LACZ-plasmid, men mätning av LACZ-mRNA misslyckades även i detta experiment, denna gång utförd med TaqMan-analys.



Figur 18. Förändring i mängden LUC2-mRNA vid värmechock hos celler transfekterade med EH12-förstärkarkonstruktioner eller HSPA1A-promotorkonstruktioner. Mängden LUC2-mRNA vid värmechock i MEF-celler som transfekterats med EH12-förstärkarkonstruktioner eller konstruktioner innehållande promotorn till HSPA1A-genen (eng. heat shock protein family A member 1A, HSPA1A) studerades som beskrivits i figur 16. Relativa LUC2-mRNA-värden ämnades normaliseras mot relativa LACZ-mRNA-värden, vilket dessvärre misslyckades. Varje värmechockprov (röd) normaliserades mot den obehandlade kontrollen (blå) som gavs värdet 1. LUC2- och LACZ-cDNA mättes med hjälp av TaqMan-analys. Framställning av proverna: renat RNA behandlat med deoxiribonukleas; cDNA-utspädning 1:1. n = 1.

6 Diskussion

Målsättningen med min avhandling pro gradu var att bestämma om genomet innefattar stressspecifika förstärkare, vars aktivitet förändras under proteinskadande stress. Ännu opublicerade resultat från PRO-seq-undersökningar vid Sistonen-laboratoriet visar att eRNA-uttrycket förändras för ett stort antal (ca 6000) förstärkare i MEF-celler vid antingen värmechock eller oxidativ stress. För att bestämma om det bland dessa sekvenser finns stressspecifika förstärkare undersöktes aktiviteten hos utvalda sekvenser vid värmestress med hjälp av luciferasanalys och qRT-PCR. De utvalda sekvenserna inkorporerades i luciferasrapportörplasmider i vilka transkriptionen av luciferas är proportionell mot aktiviteten i den inkorporerande reglerande sekvensen. Rapportörplasmiderna transfekterades in i MEF-celler som utsattes för värmestress, varefter LUC2-mRNA- och LUC2-proteinnivåer bestämdes.

Enligt PRO-seq-undersökningar, som detta arbete är baserat på, finns positiva samband mellan eRNA-uttryck från de studerade förstärkarkandidaterna och mRNA-uttryck från deras närmast belägna gener (tabell 1), vilket tyder på förstärkaraktivitet hos de utvalda sekvenserna. Vidare har alla de utvalda sekvenserna förutom EH12 förstärkarsignatur enligt ENCODE SCREEN-databasen (tabell 2). Att EH12 inte återfinns i SCREEN-databasen utesluter inte att sekvensen är en förstärkare, eftersom databasen enbart innefattar prognoser på reglerande sekvenser. Det är möjligt att EH12 erhåller reglerande aktivitet i stressade celler och saknar förstärkarsignaturer vid fysiologiska tillstånd, vid vilket genomet analyserats inom ENCODE-projektet. Trots att PRO-seq-undersökningar och material i SCREEN-databasen antyder att de utvalda sekvenserna har värmekänslig förstärkaraktivitet, erhöles motstridande resultat i den här studien (figur 12, 13, 16, 17 & 18). Detta orsakas antingen av att sekvenserna ändå inte är värmekänsliga förstärkare, eller av att de valda metoderna rubbat resultaten. Eftersom eRNA-uttryck, förstärkaraktivitet och genuttryck i allmänhet är sammankopplade fenomen (Mikhaylichenko et al., 2018), är det ändamålsenligt att utreda för möjliga metodologiska problem som inverkat på resultaten i denna studie.

6.1 Förstärkaraktivitet kan avta vid stress om inhibitorer av IFN-I-signalering inte använts vid transfektionen

Då förstärkarkonstruktioner transfekterades in i MEF-celler utan tillsatts av inhibitorer av IFN-I-signalering vid transfektionen minskade aktiviteten hos majoriteten av förstärkarkandidaterna vid värmestress enligt luciferasanalys (figur 12). Luciferasaktiviteten ökade för endast EH9 vid utsättning för värmechock, fastän PRO-seq-undersökningar antytt ökad aktivitet även för EH2, EH12, EH14 och EH17 (tabell 1). Luciferasaktiviteten minskade även för EH18 och EH20, vilket däremot var förväntat, baserat på eRNA-uttryck från dessa förstärkare (tabell 1). Den minskade luciferasaktiviteten vid värmestress hos celler transfekterade med EH2-, EH12-, EH14- och EH17-konstruktioner orsakas antingen av att förstärkarnas aktivitet förhindras i modellsystemet eller av att deras stimulerande effekt på luciferaspromotorn verkligen minskar i värmestressade celler. Det är möjligt att förstärkaraktiviteten minskar även i förstärkarnas ursprungliga miljö vid ökade temperaturer, eller att förstärkarna inte på ett ändamålsenligt sätt kan undersökas med hjälp av luciferasanalys i MEF-celler.

Att den minskade aktiviteten vid värmechock hos EH2, EH12, EH14 och EH17 (figur 12) skulle orsakas av minskad förstärkaraktivitet även i den ursprungliga miljön vid utsättning för stress borde inte stämma, eftersom de positiva sambanden mellan förändringar i eRNA- och mRNA-uttryck från närmast belägna gener (tabell 1) tyder på värmekänslig aktivitetsökning hos dessa förstärkare. Schoenfelder & Fraser (2019) påpekar dock en viss problematik i att slutsatser om förstärkaraktivitet dras genom jämförelse mot uttrycket av den till förstärkaren närmast belägna genen, eftersom förstärkares målgener kan vara helt andra än de som är närmast belägna. I EH2-, EH14- och EH17-sekvenserna innefattas inte kanoniska HSE-sekvenser men ett stort antal HSE-motiv (bilaga C), vilket tyder på värmekänslig aktivitet hos dessa förstärkare. Emellertid innehåller EH12-förstärkaren, som inte återfinns i SCREEN-databasen, en kanoniskt HSE-sekvens (bilaga C). Det är, på grund av dessa orsaker, trovärdigt att de minskade luciferasmängderna vid värmechock för EH2, EH12, EH14 och EH17 orsakas av problem i metodiken. Att luciferasaktiviteten ökade från celler transfekterade med EH9-konstruktioner vid värmestress (figur 12) i motsatts till EH2, EH12, EH14 och EH17, kan bero på att aktiviteten hos EH9 är så hög i stressade celler att ökningen kan detekteras trots potentiella problem med metoder.

Problemen vid utförandet av luciferasanalys kan bero på ett flertal orsaker. Luciferaspromotorn i förstärkar-luciferaskonstruktionerna är en annan än den eller de promotorer som förstärkaren reglerar i sin ursprungliga miljö. Det är möjligt att EH2, EH12, EH14 och EH17 (figur 12) inte kan växelverka med just luciferasgenens promotor i luciferaskonstruktionen, det vill säga ORI-sekvensen. Inkonsekvenserna i aktiviteten hos förstärkarna kunde även bero på sekvensvalet: förstärkarsekvenserna valdes så att de omringade startstället för eRNA-syntesen med 1,5 kb. Det är möjligt att denna begränsning orsakade förlust av nödvändiga sekvenser för fungerande förstärkaraktivitet. Längre sekvenser kring startstället för eRNA-syntesen kunde undersökas, dock inom ramen för kapaciteten av luciferasrapportörplasmiden ifråga. De märkbart kortare sekvenserna som enligt ENCODE SCREEN-databasen har förstärkarsignatur, innefattas ändå i de här redan analyserade 1,5 kb långa sekvenserna (tabell 2). Däremot kan nämnas att det är osannolikt att den använda återhämtningstiden 3 h för luciferasanalys inte varit tillräcklig för fullständig luciferassyntes, eftersom luciferasaktivitet kunde detekteras för vissa konstruktioner (figur 13). I en forskning där luciferasanalys användes för att studera syntes av värmechockproteiner i olika skeden av neurondifferentieringen, användes emellertid tiderna 4 h, 5 h och 5,5 h för återhämtning av värmechock (Oza et al., 2008).

På grund av de inkonsekventa resultaten i förstärkaraktivitet (figur 12) misstänktes en allmän repressionsmekanism av förstärkarna i modellsystemet, vilken i enlighet med Muerdter och medarbetare (2018) misstänktes vara en följd av att förstärkarkonstruktionerna transfekterats in i MEF-celler utan att cellerna i samband med transfektion behandlats med inhibitorer av IFN-I-signalering. Behandling med inhibitorer av IFN-I-signalering vid transfektion är viktigt, eftersom plasmidtransfektion kan orsaka en IFN-I-respons i mammalieceller (Huerfano et al., 2013; Muerdter et al., 2018). Vidare kan IFN-I-signalering störa, eller till och med eliminera, aktiviteten hos en del förstärkare (Muerdter et al., 2018). Att aktiviteten hos en del förstärkare till och med minskade i värmechockade celler (figur 12), kunde bero på att IFN-I-signalering skulle motarbeta förstärkaraktivitet speciellt vid värmestress. Det här kunde orsakas av att IFN-I-signaleringen skulle tillta vid ökade temperaturer. Att både HSP70 och HSP90 kan medverka i och förstärka IFN-I-signalering (figur 5B) ger antydning på detta. Värmechockproteiners medverkan i interferonresponsen är ändå i stort sätt oklar, vilket försvårar förståelsen av resultaten.

Endast en upprepning av luciferasanalys där förstärkarkonstruktionerna transfekterats in i MEF-celler utan att cellerna därefter behandlats med inhibitorer av IFN-I-signalering hann göras, eftersom laborationsarbetet måste avslutas på grund av COVID-19-pandemin. Eftersom försöket inte upprepades är resultaten endast riktgivande. Baserat på dem valdes ändå att göra försök där MEF-cellerna behandlades med inhibitorer av IFN-I-signalering direkt efter att de transfekterats med förstärkarkonstruktioner. Genom behandling med BX975- och C16-inhibitorer av IFN-I-signalering direkt efter transfektion förändrades resultaten i luciferasanalys något (figur 13). Eftersom även detta försök hann göras endast en gång, kan inga slutsatser dras från resultaten. Luciferasaktiviteten förändrades för alla celler transfekterade med förstärkarkonstruktioner vid värmestress (figur 13), men förändringen var fortfarande negativ för EH17. Baserat på resultat i PRO-seq hade en ökning i luciferasaktiviteten även för EH17 förväntats (tabell 1). I detta försök användes konstruktioner som innehöll förutom den inkorporerande förstärkaren, en tillsatt promotor mellan luciferasgenen och ORI. Promotorn i detta fall var promotorn till LGALS3-genen som amplifierats ur musens DNA.

6.2 Tilläggning av promotorer framför LUC2-genen i rapportörplasmider kan störa LUC2-uttrycket

I luciferasrapportörplasmiden som i den här studien användes för att undersöka förstärkaraktivitet, det vill säga STARR-seq luciferase validation vector_ORI_empty-plasmiden (#99297, AddGene), fungerar plasmidens ORI-sekvens som promotor till luciferasgenen. En ytterligare promotorsekvens, det vill säga promotorn till LGALS3-genen, placerades mellan ORI och luciferasgenen i färdiga förstärkarkonstruktioner, eftersom det på grund av tidigare resultat (figur 12) vid detta skede av studien misstänktes att ORI:s promotoraktivitet förhindras i stressade celler.

Emellertid kan transkriptionen av luciferas störas då promotorsekvenser klonas in mellan ORI och luciferasgenen, eftersom den tillagda promotorn kan vara i konflikt med ORI (Muerdter et al., 2018). Enligt en metodrapport om STARR-seq luciferase validation vector_ORI_empty av Muerdter och medarbetare (2018) är det därför fördelaktigt att inte placera promotorsekvenser mellan ORI och luciferasgenen. I metodrapporten poängteras att ORI-sekvensen fungerar som en ytterst inducerbar promotor som kan växelverka med människans förstärkare (Muerdter et al., 2018), vilket även torde stämma för musens förstärkare. I metodrapporten undersöktes ett flertal

promotorers inverkan på den basala transkriptionen av luciferas. Luciferasuttrycket stördes till varierande grad av olika tillagda promotorer, och enligt rapporten störde den artificiella SCP1-promotorn transkriptionen av luciferas minst (Muerdter et al., 2018). Att använda SCP1-promotorn i dessa experiment hade varit lämpligt, men infusionskloning av SCP1-promotorn till förstärkarkonstruktioner misslyckade enligt sekvenseringsresultat. På grund av detta valdes LGALS3-promotorn till experimenten i motsats till rekommendationerna av Muerdter och medarbetare (2018).

Den värmeresistenta LGALS3-promotorns inverkan på luciferasuttrycket jämfördes mot ORI-promotorn och den värmekänsliga HSPA1A-promotorn med hjälp av luciferasanalys. I undersökningarna användes rapportörplasmider som endast innefattade tillagda promotorer men inga förstärkare. Värmekänsligheten hos LGALS3- och HSPA1A-promotorerna hade tidigare kartlagts med hjälp PRO-seq-undersökningar utförda i Sistonen-laboratoriet. Både ORI och HSPA1A-promotorn gav upphov till märkbar ökning i luciferasaktivitet vid värmestress, medan luciferasaktiviteten hos celler transfekterade med LGALS3-konstruktionen var negligerbar i jämförelse med de två andra konstruktionstyperna (figur 14). Givetvis borde flera upprepningar av försöket göras för att uppnå pålitlighet av resultaten, men den första upprepningen tyder på att LGALS3-promotorn stör transkriptionen av luciferas märkbart. Det är därför möjligt att minskad luciferasaktivitet hos celler transfekterade med EH17-konstruktionen, även då cellerna behandlats med inhibitorer av IFN-I-signalering vid transfektion (figur 13), beror på LGALS3-promotorns förekomst i EH17-konstruktionen. Experiment med tillsatts av inhibitorer av IFN-I-signalering i samband med transfektion borde upprepas med förstärkarkonstruktioner som saknar den ytterligare LGALS3-promotorn mellan ORI och luciferasgenen.

På motsvarande sätt som luciferasanalys (figur 14 & 15) visade qRT-PCR (figur 17 & 18) att luciferasuttrycket ökar vid värmechock i celler transfekterade med den tomma luciferasrapportörplasmiden där ORI fungerar som promotor till luciferasgenen. Resultaten visar tillsammans att promotoraktiviteten hos plasmidens ORI ökar i värmestressade celler. ORI-sekvensen innehåller ett flertal HSE-motiv (5'-nGAAn-3') (bilaga B), vilket tyder på HSF-förmedlad inducering av ORI-sekvensens promotoraktivitet. Luciferas-rapportörplasmidens ORI-sekvens innehåller inte HSE-konsensussekvensen 5'-nGAAnnTTCnnGAA-3', men ett område med tre

närliggande HSE-motiv: 5'-TTCTCCCTTCGGGAA-3' (bilaga B). För att redogöra om ORI-sekvensen verkligen binder HSF1 vid värmestress kunde förslagsvis ChIP-qPCR-metoden (eng. chromatin immunoprecipitation coupled with quantitative polymerase chain reaction) användas. Med ChIP-qPCR är det möjligt att bestämma om en eftersökt DNA-sekvens växelverkar med ett protein av intresse, genom att DNA sammanbinds till associerande proteiner, DNA-protein-komplex renas och komplex innehållande det eftersökta proteinet precipiteras (Mukhopadhyay et al., 2008). Därefter lösgörs DNA från proteinet och analyseras med qPCR, med hjälp av specifika primrar mot den eftersökta sekvensen (Mukhopadhyay et al., 2008). Att ORI induceras av stress innebär att förstärkarnas inverkan på transkriptionen av luciferas vid värmechock kan vara svårare att mäta. Trots att ORI-sekvensen inte utgör en optimal promotor för undersökning av förstärkare vid värmestress, kan den användas ifall värmechockprover för förstärkarkonstruktioner jämförs mot motsvarande prover för den tomma konstruktionen.

Vidare visar luciferasanalys att trots att ORI-promotorn aktiveras av värmestress, induceras den ytterligare av BX795- och C16-inhibitorer av IFN-I-signalering (figur 15). Det vill säga, fastän ORI-promotorn aktiveras av värmechock, kan den fortfarande påverkas av ytterligare faktorer med kapacitet att inducera den – så som exempelvis förstärkare. Att luciferasaktivitet minskar vid värmestress för celler transfekterade med majoriteten av förstärkarkonstruktionerna (figur 12 & 13), beror därför sannolikare på egenskaper hos förstärkarna än hos ORI-promotorn.

6.3 eRNA-syntes kan störa transkriptionen av LUC2-rapportörigenen

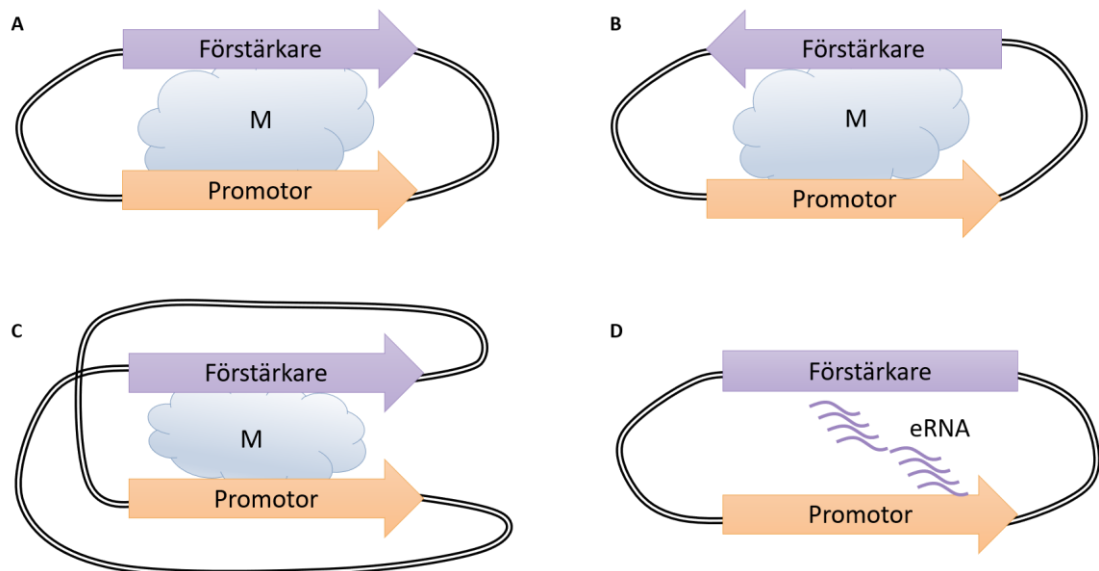
Förstärkaraktiviteten sjunker enligt luciferasanalys för EH2, EH12, EH14 (figur 12) och EH17 (figur 12 & 13) vid utsättning för värmechock, trots tidigare PRO-seq-resultat, vilka visar att stress aktiverar de ifrågavarande förstärkarna (tabell 1). Denna minskning kan orsakas av luciferasgenens nedtystning i förstärkar-luciferas-konstruktioner i samband med eRNA-syntes. Det är möjligt att RNAPII stöter bort transkriptionsfaktorer från luciferaspromotorn i samband med eRNA-syntes, på ett liknande sätt som eRNA-transkriptionen kan stöta bort kromatinbundna proteiner i gDNA (Kaikkonen & Adelman, 2018; sektion 2.3.1). Eftersom förstärkarsekvensen är placerad ca 1 kb uppströms från luciferasgenens promotor är en dylik bortstötning orsakad av eRNA-transkription möjlig. I detta fall skulle det vid värmestress ökade

eRNA-uttrycket hos EH2, EH12, EH14 (figur 12) och EH17 (figur 12 & 13), vilket tidigare detekterats med PRO-seq (tabell 1), orsaka en sänkning i transkriptionen av luciferas i rapportsystemet. Detta förklarar däremot inte varför luciferasaktiviteten för EH18 och EH20 inte ökar stressberoende (figur 12), trots att dessa förstärkares eRNA-transkription enligt PRO-seq minskar vid värmechock (tabell 1). Vidare stiger luciferasaktiviteten för EH9 (figur 12 & 13) och EH14 (figur 13) vid värmechock, trots att PRO-seq-analysen visade att mängden eRNA från dessa förstärkare stiger i värmestressade celler (tabell 1). Det är möjligt att eRNA-transkriptionen för dessa förstärkares del är lägre eller inte når fram till ORI. Flera upprepningar av försöken borde göras för att klargöra orsakerna till den minskade luciferasaktiviteten vid värmestress hos celler transfekterade med förstärkar-luciferaskonstruktioner. Om de minskade luciferasaktiviteterna vid utsättning för värmechock verkligen orsakades av avstötning av transkriptionsfaktorer i samband med eRNA-syntes, skulle denna syntes – alltså en central egenskap hos förstärkare (Andersson et al., 2014) – vara ett fenomen som märkbart stör undersökning av förstärkare i rapportörplasmider. Emellertid visar flera tidigare publikationer att förstärkare framgångsrikt kunnat studeras med hjälp av luciferasrapportörplasmider (Andersson et al., 2014; Muerdter et al., 2018; Nardini et al., 2019). Det är möjligt att vissa förstärkare kan analyseras i rapportsystem medan andra borde studeras med hjälp av andra metoder. De tidigare nämnda metoderna ChIP- och PRO-seq kan generera prognoser på reglerande sekvenser, men visar ingen specifik funktion hos sekvenserna (Muerdter et al., 2015). Förstärkarna kunde däremot studeras i sin ursprungliga miljö genom nedtystning eller inducering av deras endogena uttryck och aktivitet (Kaikkonen & Adelman, 2018). Förstärkarsekvenserna eller delar av dem (till exempel startstället för eRNA-syntesen) kunde elimineras med hjälp av sekvensspecifika endonukleaser (Kaikkonen & Adelman, 2018). Även själva eRNA-transkripten kunde blockeras genom användning av exempelvis siRNA (Kaikkonen & Adelman, 2018).

6.4 Orienteringen av EH9-förstärkaren har inte en betydande inverkan på dess aktivitet

Luciferasaktivitet hos celler transfekterade med EH9-konstruktioner ökade vid värmestress oavsett förstärkarens orientering i plasmidkonstruktionen (figur 12), vilket visar att riktningen av EH9 inte märkbart påverkar förstärkarens funktion i modellsystemet. Resultatet antyder att aktiviteten hos EH9-förstärkaren är till viss mån oberoende av dess orientering. Flera upprepningar av försöket skulle krävas för att uppnå tillräcklig validitet av resultaten samt för att klargöra exakta skillnader mellan de två orienteringarna. Vidare bör flera värmekänsliga förstärkare undersökas för att dra slutsatser om orienteringens betydelse för värmekänsliga förstärkare överlag. Resultaten är ändå i enlighet med tidigare resultat, till exempel av Nardini och medarbetare (2019), som studerat förstärkare hos malaria *Anopheles coluzzi*.

Att orienteringen av en förstärkare i specifikt plasmidkonstruktioner inte har en märkbar betydelse för dess aktivitet är intressant. En plasmid är en kort och cirkulär, och således begränsad DNA-sekvens, jämfört med gDNA, som kan böja sig så att avlägsna sekvenser kan växelverka sinsemellan (figur 2). Hur de utvalda förstärkarna stimulerar transkriptionen av luciferas i förstärkar-luciferaskonstruktionerna i de här utförda experimenten är oklart. Det är utifrån dessa undersökningar omöjligt att veta om förstärkarna inducerar luciferaspromotorn genom fysisk växelverkan (figur 19A,B&C), via eRNA-transkript (figur 19D) eller genom någon tillsvidare okänd mekanism. En möjlig fysisk kontakt mellan förstärkaren och luciferaspromotorn i förstärkarkonstruktionerna väcker många frågor. Om fallet var att förstärkaren skulle inducera luciferaspromotorn genom fysisk kontakt (figur 19A,B&C), kunde plasmiden i så fall böja sig så att förstärkaren nådde promotorn i samma riktning oavsett dess orientering i plasmiden (figur 19A&C)? Är alltså plasmidsekvensen tillräckligt böjlig för att formationen av dylika öglor ska vara möjlig? Eller kan en förstärkare inducera en promotor oavsett hur den är riktad i förhållande till promotorn (figur 19A&B)? Detta skulle innebära att transkriptionsfaktorer på förstärkaren respektive promotorn kunde växelverka sinsemellan oavsett hur de är vinklade, vilket direkt bestäms av promotor- och förstärkarsekvensernas riktning, eftersom transkriptionsfaktorer binder DNA sekvensspecifikt (Todeschini et al., 2014).



Figur 19. Teoretiska alternativ för hur en förstärkare kan inducera en promotor i plasmidkonstruktioner. Det är möjligt att en förstärkare som är inkorporerad i en rapportörplasmid reglerar rapportörgenens promotor genom fysisk kontakt (A). Eventuellt kan förstärkaren stimulera promotorn oavsett hur de två sekvenserna är orienterade i jämförelse med varandra (A&B). Det är också möjligt att förstärkaren reglerar promotorn i samma orientering i jämförelse med den, oavsett hur förstärkaren är riktad i plasmidkonstruktionen (A&C). Dessutom kan förstärkaren reglera promotorn genom enhancer-RNA (eRNA) (D). Observera att förstärkaren är olika riktad i plasmidkonstruktionen (A) jämfört med konstruktionerna (B&C).

6.5 Inhibitorer av IFN-I-signalering kan orsaka stimulering av HSPA1A-promotorn

Enligt luciferasanalys orsakade användning av inhibitorer av IFN-I-signalering vid plasmidtransfektion stimulering av luciferasuttrycket i celler transfekterade med HSPA1A-promotorkonstruktioner redan under kontrollförhållanden (figur 15A). Detta gjorde att skillnaden i luciferasaktivitet mellan kontrollförhållanden och värmechock blev liten i relation till celler som transfekterats med tomma konstruktioner (figur 15B). Trots att flera upprepningar av experimentet krävs för att bestämma hur inhibitorer av IFN-I-signalering inverkar på aktiviteten hos HSPA1A-promotorn, antyder resultatet att inhibitorerna stimulerar HSPA1A-promotorn. Betyder då detta att IFN-I-signalering hämmar HSPA1A-uttrycket? Kubo och medarbetare (1996) visade att HSP70 nedreglerades av IFN-I&II-behandling i en osteosarkoma-celinje från människan. Dock finns också bestridande resultat, till exempel av Dubois och medarbetare (1988), som visade att IFN-behandling stimulerade HSP:er i L-celler från musen. Enligt manuell analys av HSPA1A-promotorsekvensen innefattar den inga ISRE-motiv och borde således inte direkt regleras av interferonsignalering.

Baserat på dessa resultat kan växelverkan mellan interferon- och värmechockresponsen rubba resultaten i experiment som innefattar plasmid-transfektion, både då interferonsignaleringen inhiberas vid transfektionen eller inte. Eftersom undersökningar av genetiskt material i modellsystem kräver transfektion, tyder resultaten på en övergripande problematik i studier av värmestress. Genom fortsatt forskning i växelverkan mellan interferoner och värmechockproteiner skulle kanske lösningar till denna problematik hittas.

6.6 Mätning av LUC2-mRNA med qRT-PCR kräver vidare optimering

Skillnader i uttrycket av LUC2-mRNA mellan fysiologiska förhållanden och värmechock hos MEF-celler transfekterade med förstärkar-luciferaskonstruktioner analyserades med qRT-PCR (figur 16, 17 & 18). Avsikten var att genom att undersöka LUC2-mRNA-uttryck bestämma förstärkarens kapacitet att inducera LUC2-rapportör-genen. Dessvärre var undersökning av LUC2-mRNA-uttrycket med hjälp av qRT-PCR på många sätt problematiskt under laborationen för pro gradu-arbetet. I den enda upprepningen där mängden LUC2-mRNA kunde normaliseras mot en kontrollgen, i detta fall 18S, verkade resultaten missvisande (figur 16). I experimentet hade RNA-proverna inte behandlats med DNas och NAC-kontrollen uppvisade en lika stark signal som proverna. Det är därför troligt att qRT-PCR-reaktionen även detekterade mängden LUC2-gen, det vill säga mängden förstärkarkonstruktion i proverna (sektion 4.8.2). Detta är möjligt eftersom LUC2-genen inte innehåller introner (Muerdter et al., 2018) och är därmed av ungefär samma storlek som LUC2-cDNA. Primrarna mot LUC2-cDNA kan således även amplifiera LUC2-genen från plasmiden. Försöket upprepades på grund av dessa orsaker med tilläggning av DNas-behandling före utförande av cDNA-syntes, vilket dessvärre inte gav tydligare resultat på grund av annan problematik (figur 17).

Normalisering mot LACZ-mRNA misslyckades i varje upprepning där LACZ-kontrollen skulle användas (figur 17 & 18), eftersom qRT-PCR-apparaturen inte uppgav Ct-värden för LACZ (maskinens meddelande: "Undefined"). För att kontrollera om problemet berodde på att proverna var för utspädda (1:10) (figur 17) upprepades experimentet med outspädda prover (figur 18). Vidare misstänktes att LACZ-detektering inte fungerade med hjälp av SYBR Green-metoden (figur 17), och därför mättes LACZ-mRNA i det optimerade försöket med TaqMan-analys (figur 18).

Optimeringsförsöken förändrade inte situationen vilket visar att problematiken i LACZ-mätningen berodde på andra orsaker. Det är möjligt att apparaturen vid mätningstillfället inte fungerade optimalt eller att transfektionseffektiviteten av MEF-cellerna varit så låg att LACZ-mRNA-koncentrationerna var för låga för att mätas med de två qRT-PCR-metoderna. Trovärdiga LUC2-standardkurvor kunde inte heller göras, eftersom Ct-värdena för alla mRNA-utspädningar var höga. Detta antyder att även mängden LUC2-mRNA i proverna var låg (Heid et al., 1996), möjligen på grund av låg transfektionseffektivitet. Endast två miljoner celler användes vid transfektionerna, vilket senare, vid luciferasanalys, utökades till fyra miljoner. Alla qRT-PCR-undersökningar (figur 16, 17 & 18) utfördes utan behandling med inhibitorer av IFN-I-signalering i samband med transfektionen, vilket också kan ha inverkat på resultaten (sektion 6.1). Mätning av LUC2-mRNA med qRT-PCR är möjligt, eftersom det tidigare lyckats i flera forskningar där LUC2-genen använts som rapportör (Lukowski et al., 2015; Deng et al., 2013).

Resultaten från båda experimenten där LACZ-mRNA skulle användas som kontroll (figur 17 & 18) saknar validitet, eftersom mängden LUC2-mRNA inte kunde normaliseras mot LACZ-kontrollen. De riktiggivande resultaten erhållna i dessa experiment tyder ändå på att LUC2-mRNA-uttrycket stiger vid utsättning för värmechock hos celler transfekterade med HSPA1A-promotorkonstruktioner eller med tomma konstruktioner, vilket överensstämmer med resultat i luciferasanalys (figur 14 & 15B; sektion 6.2). Resultaten indikerar vidare att förändringar i mängden LUC2-mRNA vid värmestress är mycket små i celler transfekterade med förstärkarkonstruktioner, i jämförelse med celler transfekterade med HSPA1A-promotorkonstruktionen eller med den tomma konstruktionen (figur 17).

7 Avslutning

Syftet med min avhandling pro gradu var att bestämma om genomet innefattar förstärkare vars reglerande aktivitet förändras vid värmestress. Utvalda förstärkarsekvenser inkorporerades i LUC2-rapportörplasmider och konstruktionerna transfekterades in i MEF-celler som utsattes för värmechock. Därefter bestämdes mängden LUC2-mRNA och LUC2-protein med qRT-PCR respektive luciferasanalys. Enligt båda metoder minskade förstärkaraktiviteten vid värmestress hos majoriteten av de förstärkarkandidater vars aktivitet baserat på tidigare utförd PRO-seq hade förväntats öka. Inga av experimenten hann upprepas på grund av avbrott i laborationsarbetet som orsakades av COVID-19-pandemin, och därför är resultaten enbart riktgivande.

Med luciferasanalys visades att aktiviteten hos promotorn till HSPA1A-genen, som kodar för ett HSP70-protein, ökar då celler behandlas med inhibitorer av IFN-I-signalering (figur 15A). Det är alltså möjligt att IFN-I-responsen fungerar hämmande på uttrycket av HSPA1A-genen. Tidigare resultat visar att HSP70-chaperoner kan inhibera PKR (Pang et al., 2002), ett proteinkinase vars uttryck ökar av IFN-I-signalering och som därmed aktiverar apoptos (Negishi et al., 2018; Srivastava et al., 1998). Inhibering av HSP-uttrycket vid IFN-I-responsen skulle således stimulera PKR-funktionen ytterligare. Växelverkan mellan interferoner och värmechockproteiner både under fysiologiska förhållanden och vid stress borde undersökas vidare för att kartlägga hur interferon- och värmechockresponsen är sammanbundna. Många komponenter av dessa responssystem är möjliga läkemedelsmål (Lazarev et al., 2018; Gal-Ben-Ari et al., 2019), och således skulle dylik forskning kunna underlätta förutsägelse av läkemedlets effekt.

Både vid luciferasanalys och qRT-PCR detekterades att LUC2-rapportörplasmidens ORI-sekvens, som också fungerar som promotor till LUC2-genen, aktiveras av värmechock (figur 14, 15, 17 & 18). Vid transfektion av rapportörplasmiderna in i MEF-celler användes inhibitorer av IFN-I-signalering, eftersom signaleringen aktiveras av plasmidtransfektion och kan leda till inhibering av förstärkaraktivitet (Muerdter et al., 2018). Enligt luciferasanalys aktiverades ORI-sekvensen ytterligare av behandlingen (figur 15A), vilket antyder att sekvensen inte är en optimal promotor till LUC2-genen. Dessvärre visade andra resultat att LUC2-uttrycket störs avsevärt om en alternativ promotor placeras framför LUC2-genen (figur 14). Ifall den

ifrågavarande rapportörplasmiden i fortsättningen används vid undersökning av värmekänsliga förstärkare måste därför ORI-sekvensen fungera som promotor till LUC2-genen, trots ovannämnd problematik.

Fortsatta studier i värmekänsliga förstärkare är säkerligen av stor betydelse för förståelsen av både stress och olika patologiska tillstånd. Kunskap om reglerande sekvensers roll i de omställningar av genuttrycket som är sammankopplade med sjukdomsförlopp kan ge nya läkemedelsmål. Å ena sidan är förstärkare centrala reglerare av genuttrycket (Muerdter et al., 2015), å andra sidan utnyttjas värmechockresponsen av cancerceller för metastasering och upprätthållande av proteostas (Joutsen & Sistonen, 2019). Forskning om hur aktiviteten hos förstärkare förändras under stress skulle därför ge viktig information om den transkriptionella omstrukturering som sker i cancercellen.

Tillkännagivanden

Jag vill rikta ett stort och varmt tack till mina omtänksamma och grundliga handledare Samu Himanen och Mikael Puustinen, av vilka jag har fått lära mig mycket nytt. Många tack till Lea Sistonen som tog med mig i sin forskningsgrupp, så att jag fått ta del av den intressanta forskning som görs inom den. Jag vill tacka alla i forskningsgruppen för stor hjälp och stöd samt roliga stunder i laboratoriet. Det har varit en lärorik, rolig och minnesvärd tid.

På grund av COVID-19-krisen blev jag dessvärre tvungen att avsluta uppgifterna i laboratoriet i förtid. Försöken hann inte upprepas och jag hann inte fullfölja planen för pro gradu-avhandlingen och uppnå avhandlingens ursprungliga målsättningar. Planen var att undersöka alla förstärkare även vid oxidativ stress, samt att upprepa alla experiment även i HSF1^{-/-}-MEF-celler för att klargöra betydelsen av HSF1 för stressspecifika förstärkare. HSF1-uttrycket i de olika cellinjerna hade i detta fall verifierats med hjälp av Western Blot, och oxidativ stress hade inducerats i cellerna med den kinoninnehållande föreningen menadion (2-metyl-1,4-naftokinon, vitamin K3), som orsakar ackumulering av ROS (Nutter et al., 1992).

Under laborationen hade jag med hjälp av in-fusionskloning tillverkat konstruktioner innehållande promotorer för IRF7- och POU3F1-gener, vilka enligt PRO-seq-data är känsliga mot oxidativ stress. Det fanns inte möjlighet att utnyttja dessa som positiva kontroller i studier av förstärkare vid oxidativ stress, eftersom de här experimenten inte hann inledas. Vidare hann flera förstärkarkonstruktioner, som under laborationen för pro gradu-arbetet tillverkats med in-fusionskloning, inte studeras med qRT-PCR. De undersökningar som hann göras kunde inte heller upprepas på grund av avbrottet. Jag hoppas att stressspecifika förstärkare studeras vidare i framtiden, eftersom de har många intressanta och viktiga egenskaper som långt ännu är outforskade.

Litteraturförteckning

- Allen BL, Taatjes DJ. (2015). The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 16:155-166.
- Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, Hoof I, Bornholdt J, Boyd M, ..., Sandelin A. (2014). An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature.* 507: 455–461.
- Baltimore D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature.* 226: 1209-1211.
- Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci.* 69: 3613-3634.
- Boellmann F, Guettouche T, Guo Y, Fenna M, Mnayer L, Voellmy R. (2004). DAXX interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci* 101: 4100–4105.
- Bonev B, Cavalli G. (2016). Organization and function of the 3D genome. *Nat Rev Genet.* 17: 661–678.
- Boyle AP, Davis S, Shulha HP, Meltzer P, Margulies EH, Weng Z, Furey TS, Crawford GE. (2008). High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell.* 132: 311-322.
- Budzyński MA, Puustinen MC, Joutsen J, Sistonen L. (2015). Uncoupling stress-inducible phosphorylation of heat shock factor 1 from its activation. *Mol Cell Biol* 35: 2530–2540.
- Chen H, Du G, Song X, Li L. (2017). Non-coding transcripts from enhancers: New insights into enhancer activity and gene expression regulation. *GPB.* 15: 201-207.
- Close DM, Hahn RE, Patterson SS, Baek SJ, Ripp SA, Sayler GS. (2011). Comparison of human optimized bacterial luciferase, firefly luciferase, and green fluorescent protein for continuous imaging of cell culture and animal models. *J Biomed Opt.* 16: 047003.
- De Santa F, Barozzi I, Mietton F, Ghisletti S, Polletti S, Tusi BK, Muller H, Ragoussis J, Wei CL, Natoli G. (2010). A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS Biol.* 8: e1000384.
- Deng GF, Liu SJ, Sun XS, Sun WW, Zhao QH, Liao WP, Yi YH, Long YS. (2013). A conserved region in the 3' untranslated region of the human LIMK1 gene is critical for proper expression of LIMK1 at the post-transcriptional level. *Neurosci Bull.* 29: 348-354.
- Dubois MF, Mezger V, Morange M, Ferrieux C, Lebon P, Bensaude O. (1988). Regulation of the heat-shock response by interferon in mouse L cells. *J Cell Physiol.* 137: 102–109.
- ENCODE Project Consortium. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 489: 57-74.
- ENCODE Encyclopedia, Version 4: Genomic annotations, Stanford University. 2020. <https://www.encodeproject.org/data/annotations/>. Hämtad 14.4.2020.
- Flisiński M, Brymora A, Bartłomiejczyk I, Wiśniewska E, Gołda R, Stefańska A, Pączek L, Maniatus J. (2012). Decreased hypoxia-inducible factor-1 α in gastrocnemius muscle in rats with chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* 35: 608-618.
- Flug F, Copp RP, Casanova J, Horowitz ZD, Janocko L, Plotnick M, Samuels HH. (1987). cis-acting elements of the rat growth hormone gene which mediate basal and regulated expression by thyroid hormone. *J Biol Chem.* 262: 6373-6382.
- Furey TS. (2012). ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nat Rev Genet.* 13: 840–852.
- Gal-Ben-Ari S, Barrera I, Ehrlich M, Rosenblum K. (2019). PKR: A Kinase to Remember. *Front Mol Neurosci.* 11: 480.
- Ghavi-Helm Y, Jankowski A, Meiers S, Viales RR, Korbel JO, Furlong EEM. (2019). Highly rearranged chromosomes reveal uncoupling between genome topology and gene expression. *Nat Genet.* 51: 1272-1282.
- Gil JS, Machado HB, Herschman HR. (2012). A method to rapidly and accurately compare the relative efficacies of non-invasive imaging reporter genes in a mouse model and its application to luciferase reporters. *Mol Imaging Biol.* 14: 462-471.
- Goldman SR, Ebright RH, Nickels BE. (2009). Direct detection of abortive RNA transcripts in vivo. *Science.* 324: 927–928.

- Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Thiele DJ. (2018). Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19: 4-19.
- Gould SJ, Subramani S. (1988). Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal. Biochem.* 175: 5-13.
- Green MR, Sambrook J. (2012). *Molecular Cloning. 4:e utgåvan.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Green MR, Sambrook J. (2018). Quantification of RNA by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Cold Spring Harb Protoc.*
- Grossi V, Forte G, Sanese P, Peserico A, Tezil T, Signorile ML, ..., Loconte DC. (2018). The longevity SNP rs2802292 uncovered: HSF1 activates stress-dependent expression of FOXO3 through an intronic enhancer. *Nucleic Acids Res.* 46: 5587-5600.
- Haberle V, Stark A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 19: 621-637.
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166: 557-580.
- Himanen SV, Sistonen L. (2019). New insights into transcriptional reprogramming during cellular stress. *J Cell Sci.* 132: jcs238402.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994.
- Hentze N, Le Breton L, Wiesner J, Kempf G, Mayer MP. (2016). Molecular mechanism of thermosensory function of human heat shock transcription factor Hsf1. *eLife.* 5: e11576.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 7276-7280.
- Hu Z, Tee WW. (2017). Enhancers and chromatin structures: regulatory hubs in gene expression and diseases. *Biosci Rep.* 37: BSR20160183.
- Huang YC, Su CJ, Korolev N, Berezhnoy NV, Wang S, Soman A, ..., Nordenskiöld L (2018). The effect of linker DNA on the structure and interaction of nucleosome core particles. *Soft Matter.* 14: 9096-9106.
- Huerfano S, Ryabchenko B, Forstová J. (2013). Nucleofection of expression vectors induces a robust interferon response and inhibition of cell proliferation. *DNA Cell Biol.* 32: 467-479.
- Hunt C, Calderwood S. (1990). Characterization and sequence of a mouse hsp70 gene and its expression in mouse cell lines. *Gene.* 87: 199-204.
- Hüttenhofer A, Schattner P, Polacek N. (2005). Non-coding RNAs: hope or hype?. *Trends Genet.* 21: 289-297.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, ..., Nabeshima Y. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 236: 313-322.
- Jaeger AM, Leah N Makley LN, Jason E Gestwicki JE, Thiele DJ. (2014). Genomic Heat Shock Element Sequences Drive Cooperative Human Heat Shock Factor 1 DNA Binding and Selectivity. *J Biol Chem.* 289: 30459-30469.
- Joutsen J, Da Silva AJ, Luoto JC, Budzynski MA, Nylund AS, de Thonel A, ..., Sistonen L. (2020). Heat Shock Factor 2 Protects against Proteotoxicity by Maintaining Cell-Cell Adhesion. *Cell Rep.* 30: 583-597.e6.
- Joutsen J, Sistonen L. (2019). Tailoring of proteostasis networks with heat shock factors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11.
- Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, ..., Young RA. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature.* 467: 430-435.
- Kaikkonen MU, Adelman K. (2018). Emerging Roles of Non-Coding RNA Transcription. *Trends Biochem Sci.* 43: 654-667.
- Kim MY, Shu Y, Carsillo T, Zhang J, Yu L, Peterson C, ..., Oglesbee M. (2013). HSP70 and a novel axis of type I interferon-dependent antiviral immunity in the measles virus-infected brain. *J Virol.* 87: 998-1009.
- Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 24: 7130-7139.

- Kouzarides T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128: 693–705.
- Kubo T, Tamura Y, Takahashi K, Imanishi J, Hirasawa Y. (1996). Expressions of heat shock proteins under heat-stress and interferon-treatment: An in vitro study on osteosarcoma. *Pathophysiology*. 3: 233-239.
- Kuehner JN, Pearson EL, Moore C. (2011). Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12: 283-294.
- Lazarev VF, Sverchinsky DV, Mikhaylova ER, Semenyuk PI, Komarova EY, Niskanen SA, ..., Margulis BA. (2018). Sensitizing tumor cells to conventional drugs: HSP70 chaperone inhibitors, their selection and application in cancer models. *Cell Death Dis*. 9: 41.
- Liang G, Lin JC, Wei V, Yoo C, Cheng JC, Nguyen CT, ..., Jones PA. (2004). Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 7357–7362.
- Lis JT, Mason P, Peng J, Price DH, Werner J. (2000). P-TEFb kinase recruitment and function at heat shock loci. *Genes Dev*. 14: 792-803.
- Liu X, Bushnell DA, Kornberg RD. (2013). RNA polymerase II transcription: structure and mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 1829: 2-8.
- Lukowski SW, Rothnagel JA, Trezise AE. (2015). CFTR mRNA expression is regulated by an upstream open reading frame and RNA secondary structure in its 5' untranslated region. *Hum Mol Genet*. 24: 899-912.
- Ma L, Bajic VB, Zhang Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol*. 10: 925–933.
- Mahat DB, Kwak H, Booth GT, Jonkers IH, Danko CG, Patel RK, ..., Lis JT. (2016a). Base-pair-resolution genome-wide mapping of active RNA polymerases using precision nuclear run-on (PRO-seq). *Nat Protoc*. 11: 1455–1476.
- Mahat DB, Salamanca HH, Duarte FM, Danko CG, Lis JT. (2016b). Mammalian Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-wide Transcriptional Regulation. *Mol Cell*. 62: 63-78.
- Matlin AJ, Clark F, Smith CW. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6: 386-398.
- Mayya VK, Duchaine TF. (2019). Ciphers and Executioners: How 3'-Untranslated Regions Determine the Fate of Messenger RNAs. *Front Genet*. 10:6.
- McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem*. 278: 21592-21600.
- McNabb DS, Reed R, Marciniak RA. (2005). Dual luciferase assay system for rapid assessment of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 4: 1539-1549.
- Mikhaylichenko O, Bondarenko V, Harnett D, Schor IE, Males M, Viales RR, Furlong EEM. (2018). The degree of enhancer or promoter activity is reflected by the levels and directionality of eRNA transcription. *Genes Dev*. 32: 42–57.
- Mouse Genome Sequencing Consortium. (2009). Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol*. 7: e1000112.
- Müller-Storm HP, Sogo JM, Schaffner W. (1989). An enhancer stimulates transcription in trans when attached to the promoter via a protein bridge. *Cell*. 58: 767–77.
- Muerdter F, Boryń ŁM, Woodfin AR, Neumayr C, Rath M, Zabidi MA, ..., Stark A. (2018). Resolving systematic errors in widely used enhancer activity assays in human cells. *Nat Methods*. 15: 141–149.
- Muerdter F, Boryń ŁM, Arnold CD. (2015). STARR-seq – principles and applications. *Genomics*. 106: 145-150.
- Mukhopadhyay A, Deplancke B, Walhout AJ, Tissenbaum HA. (2008). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) coupled to detection by quantitative real-time PCR to study transcription factor binding to DNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Protoc*. 3: 698-709.
- Nardini L, Holm I, Pain A, Bischoff E, Gohl DM, Zongo S, ..., Riehle MM. (2019) Influence of genetic polymorphism on transcriptional enhancer activity in the malaria vector *Anopheles coluzzii*. *Sci Rep*. 9: 15275.
- Negishi H, Taniguchi T, Yanai H. (2018). The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 10.

- Nutter LM, Ngo EO, Fisher GR, Gutierrez PL. (1992). DNA strand scission and free radical production in menadione-treated cells: correlation with cytotoxicity and role of NAD(P)H quinone acceptor oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 267: 2474–2479.
- Okegawa Y, Motohashi K. (2015). A simple and ultra-low cost homemade seamless ligation cloning extract (SLiCE) as an alternative to a commercially available seamless DNA cloning kit. *Biochem Biophys Rep.* 4: 148-151.
- Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10: 2657-2683.
- Oza J, Yang J, Chen KY, Liu AY. (2008). Changes in the regulation of heat shock gene expression in neuronal cell differentiation. *Cell Stress Chaperones.* 13: 73–84.
- Pang Q, Christianson TA, Keeble W, Koretsky T, Bagby GC. (2002). The anti-apoptotic function of HSP70 in the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase-mediated death signaling pathway requires the Fanconi anemia protein, FANCC. *J Biol Chem.* 277: 49638–49643.
- Park J, Throop AL, LaBaer J. (2015) Site-specific recombinational cloning using gateway and in-fusion cloning schemes. *Curr Protoc Mol Biol.* 110: 3.20.1-3.20.23.
- Pezza JA, Kucera R, Sun L (New England Biolabs, Inc.). (2012). Polymerase Fidelity: What is it, and what does it mean for your PCR?
- Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, ..., Markham AF. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* 3: 18.
- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell.* 108: 501-512.
- Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. (2016). mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.* 44: 7511-7526.
- Rittié L, Perbal B. (2008). Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *J Cell Commun Signal.* 2: 25-45.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Schoenfelder S, Fraser P. (2019). Long-range enhancer-promoter contacts in gene expression control. *Nat Rev Genet.* 20: 437–455.
- Shang L, Tomasi TB. (2006). The heat shock protein 90-CDC37 chaperone complex is required for signaling by types I and II interferons. *J Biol Chem.* 281: 1876–1884.
- Shi Y, Kroeger PE, Morimoto RI. (1995). The carboxyl-terminal transactivation domain of heat shock factor 1 is negatively regulated and stress responsive. *Mol Cell Biol.* 15: 4309–4318.
- Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI. (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* 12: 654–666.
- Sies H, Berndt C, Jones DP. (2017). Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86: 715-748.
- Smale ST. (2016). β -Galactosidase Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 5.
- Sorger PK, Nelson HCM. (1989). Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell.* 59: 807–813.
- Srivastava SP, Kumar KU, Kaufman RJ. (1998). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 273: 2416-2423.
- Sung P, Klein H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 739-750.
- Stephenson FH. (2016). *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology.* 3:e utgåvan. London: Academic Press (Elsevier Inc.).
- Sullivan EK, Weirich CS, Guyon JR, Sif S, Kingston RE. (2001). Transcriptional activation domains of human heat shock factor 1 recruit human SWI/SNF. *Mol Cell Biol.* 21: 5826– 5837.
- Szabo Q, Bantignies F, Cavalli G. (2019). Principles of genome folding into topologically associating domains. *Sci Adv.* 5:eaaw1668.

- Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*. 16: 123-140.
- Tanaka N, Kawakami T, Taniguchi T. (1993). Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol Cell Biol*. 13: 4531-4538.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*. 75: 291-295.
- Todeschini AL, Georges A, Veitia RA. (2014). Transcription factors: specific DNA binding and specific gene regulation. *Trends Genet*. 30: 211-219.
- Vihervaara A, Mahat DB, Guertin MJ, Chu T, Danko CG, Lis JT, Sistonen L. (2017). Transcriptional response to stress is pre-wired by promoter and enhancer architecture. *Nat Commun*. 8: 255.
- Vihervaara A, Duarte FM, Lis JT. (2018). Molecular mechanisms driving transcriptional stress responses. *Nat Rev Genet*. 19: 385–397.
- Vuister GW, Kim SJ, Orosz A, Marquardt J, Wu C, Bax A. (1994). Solution structure of the DNA-binding domain of *Drosophila* heat shock transcription factor. *Nat Struct Mol Biol*. 1: 605–614.
- Watson JD, Crick FHC. (1953). Molecular structure of Nucleic Acids. *Nature*. 171: 737-738.
- Wilson DN, Doudna Cate JH. (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4.
- Wu X, Brewer G. (2012). The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene*. 500: 10-21.
- Yang K, Shi H, Qi R, Sun S, Tang Y, Zhang B, Wang C. (2006). HSP90 regulates activation of interferon regulatory factor 3 and TBK-1 stabilization in Sendai virus-infected cells. *Mol Biol Cell*. 17: 1461–1471.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13:134.
- Young RA. (1991). RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem*. 60: 689-715.
- Yuan CC, Peterson RJ, Wang CD, Goodsaid F, Waters DJ. (2000). 5' Nuclease assays for the Loci CCR5- Δ 32, CCR2-V64I, and SDF1-G801A related to pathogenesis of AIDS. *Clin. Chem*. 46: 24-30.
- Zhao M, Tang D, Lechpammer S, Hoffman A, Asea A, Stevenson MA, Calderwood SK. (2002). Double-stranded RNA-dependent protein kinase (pkr) is essential for thermotolerance, accumulation of HSP70, and stabilization of ARE-containing HSP70 mRNA during stress. *J Biol Chem*. 277: 44539–44547.
- Zheng C, Baum BJ. (2005). Evaluation of viral and mammalian promoters for use in gene delivery to salivary glands. *Mol Ther*. 12: 528-536.
- Zuo J, Rungger D, Voellmy R. (1995). Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1. *Mol Cell Biol*. 15: 4319-4330.
- Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R. (1998). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stressensitive complex with HSF1. *Cell*. 94: 471-480.

Bilaga A: Receptbilaga

Agarplattor (20 plattor)

2,5 g agaros
1 µg/ml ampicillin
250 ml LB-medium

Agarosgel (en gel)

400 mg agaros
40 ml TBE
2 µl Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Tyskland)

100 x Mg²⁺-buffert (100 µl)

10 µl 1 M MgCl₂ (→ 0,1 M)
31,5 µl 14,3 M β-merkaptoetanol (→ 4,5 M)
→ 100 µl H₂O

0,1 M Natriumfosfatbuffert (250 ml)

2,67 g Na₂HPO₄ (→ 60 mM)
1,38 g NaH₂PO₄ (→ 40 mM)
→ 250 ml H₂O

ONPG-buffert (12 ml)

2 ml 4 mg/ml ONPG-stocklösning (se nedan)
120 µl 100 x Mg²⁺-buffert (se ovan)
9,88 ml 0,1 M natriumfosfatbuffert (se ovan)

4 mg/ml ONPG-stocklösning (10 ml)

40 mg ONPG
10 ml 0,1 M natriumfosfatbuffert (se ovan)

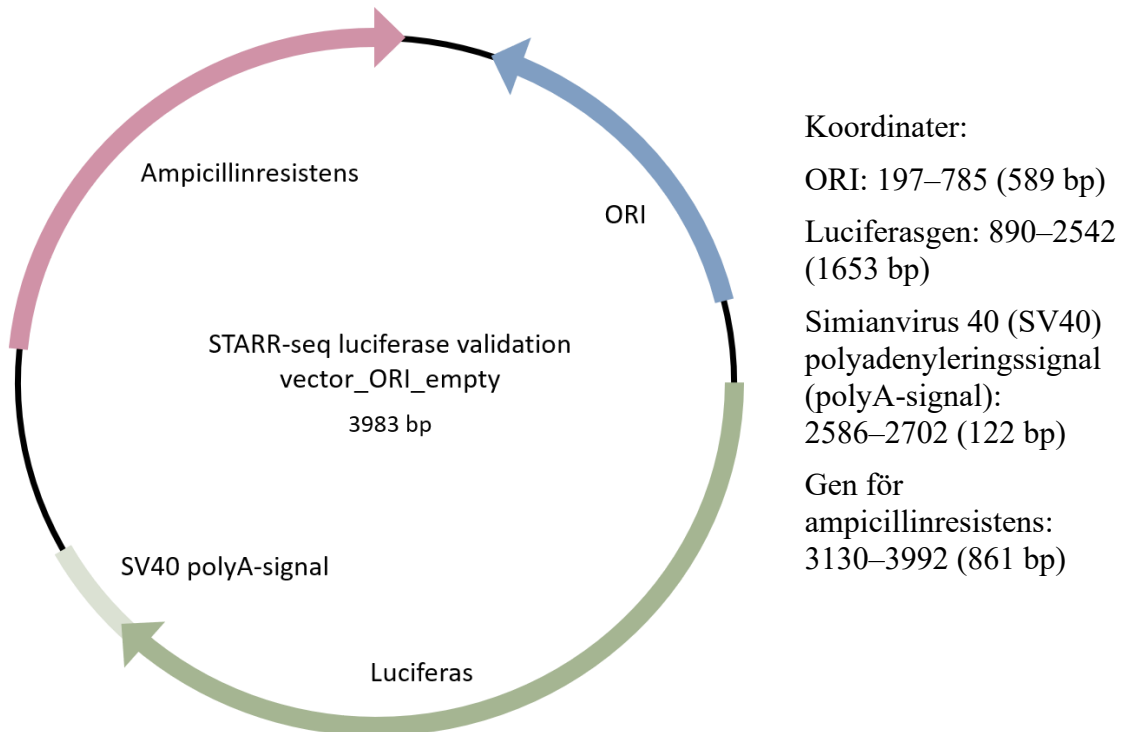
10 x TBE (1 l)

108 g TRIS (→ 445 mM)
55 g H₃BO₃ (→ 445 mM)
40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (→ 10 mM)
→ 1 l H₂O

Bilaga B: Luciferasrapportörplasmid

I experimenten användes STARR-seq luciferase validation vector_ORI_empty (Plasmid #99297, AddGene) från Stark-laboratoriet (Research Institute of Molecular Pathology (IMP), Vienna Biocenter).

Plasmidkarta över luciferasrapportörplasmiden



Modifierad från <https://www.addgene.org/browse/sequence/190936/>.

Luciferasrapportörplasmidens ORI-sekvens

ORI-sekvensen i luciferasrapportörplasmiden (5'→3'). 5'-GAA-3' utmärkt med gult och motsvarigheten 5'-TTC-3' i orange. HSE-liknande sekvenser markerade med fetstil:

```
TTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACC
CTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCAG
CTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTC
AGCCCCACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCG
CCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTT
GAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAG
TTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTT
TTTGGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAA
```

Bilaga C: Förstärkar- och promotorsekvenser

Sekvenser till studerade förstärkare samt till HSPA1A-promotorn (5'→3'). 5'-GAA-3' utmärkt med gult och motsvarigheten 5'-TTC-3' i turkost. HSE-liknande sekvenser markerade med fetstil och kanoniska HSE-sekvenser markerade med rött:

HSPA1A-promotor:

TGAGACAGCCTC**TTC**TCACACACAGACAGACAGACAGACAGATACACAGACACACACACACACACAGAGACAGACAAAACCATTAAGACATGCACTAGGCT**TTC**CTCAGATCAGGTTGCC**TTC**CTTAGCAACCTATGGTGGAGTAATTTAGCTCACTCTAAGGATGGCTGTTAGGATCCCCGCACCCTCCAAGCTTAAAAAAA
AAAAAA**GAAAAGAA**GAGTCAGGGTCCAACATATGTAGCTCAGGCAATACTCTGCCTCCA**TTC**CTAACA
GTTGGGATTAAAGGCTTGAGCCTCCAGGCGGCTCCAGCAACT**TTC****TTC****TAGCTTTCATAGAA**GTAGGG
CTCAAAGTCTCATC**TTC**GACCCTG**TTC**CCACACCAGCCCCATCTCCGAGCCATCCTGTCTGAAAAATC
CGGAGTGCTG**GAA**TCCTAGGC**TTC**GGTCCCTCTCTTGATTGTAACCTCTGTCT**TTC**AGGGTCAATACCA
T**TTC**AAAAAGGTCTTAAGATGTCTGCCTCCGATTTGAGCTCAGACTAA**TTC**CAGCCACTTGTGTCCC
TCAAGCGTCCAGCCCCAT**TTC****TTC**TTGATTGCCAACCAACCCAAAAATTAATACAACCTGGGGATC
TGTGTGT**GAA**GAGCCACATAGTAATCCCAACACTTAAAGACGATGAGGCCTAAGGATGGTGGC**TTC**CA
ATAGACCATGACTGTAAATCAGTCAAACCTAA**GAAAATTC**TCAACCCATCAAACGAGGACCAACTGGG
ACACAGAGGC**TTC**TGCCCACTCCAATCAGAGCC**TTC**CCAGCTCACCTGGGATCTCTACGCC**TTC**GAT
CCAGTTTG**GAA**AATTT**GAA**GTGCTGAGCCCCTACGAGCAGGGAGCTCCAG**GAA**CATCCAACTGAGC
AGCCGGGGTCCCCCCCACCCCCACCCCGCCCTCCCGCAACTTTGAGCCTGTGCTGGGACAGAGCC
TCTAG**TTC**CTAAATTAGTCCATGAGGTCAGAGGCAGCACTGCCATTGTAACGCGATTGGAGAGGATCA
CGTACCAGGACACGCCCCAGGCATCTCCCTGGGTCTCCTAAACTTGCGGGGA**GAA**GTTTTAGCCCT
TAAGTTTTAGCCTTTAACCCCATAT**TTC****GAA**CTGTGCGAGTTGGC**GAA**ACCCACAAATCACAACAA
ACTGTACACAACACCGAGCTAGAGGTGATCT**TTC**TTGTCCA**TTC**CACACAGGCCTTAGTAATGCGTCTG
CCATAGCAACAGTGTCACTAGTAGCACCAGCAC**TTC**CCCACACCCTCCCCCTCAG**GAA**TCCGTACTCT
CCAGT**GAA**CCCC**GAA**ACCTCTGGAGAG**TTC**TGGACAAGGGCG**GAA**CCCACAACCTCCGATTACTCAAG
GGAGGCGGG**GAA**GCTCCACCAG**ACGCGAAACTGCTGGAA****GATTCCT***GGCCCCAAGGCCCTCCCGGC
TCGCTGATTGGCCAGCGGAGAGTGGGCGGGCCGGT**GAA**GACTCCTTAAAGGCGCAGGGCGGGCAGC
AGGTC

* HSPA1A-promotorns HSE-sekvens hos musen (Hunt & Calderwood, 1990)

EH2:

GCAACCCCCACCCCCATCCTCACGTTGCTGGTCTGGCCAGGGCCCCAG**GAA****GAAATCACTAAGA**
AGGATTGAGTGTCAA**TTC**CCAAACTAATCCTCTCAATGCACACAGGCCACGACGGGCTG**TTC**CTGCG
CGGGCCCCCTCCTCCCTGCCCGAGACCCTGGTGGCTGCCCGCCGCTGTCAGGCCCTGCTGCTAGCT
TTGAGACCAATTAAGGGCCTTAATCACCGAGTGGCGGGCGGCTCAGCGTTAACAACCTGTCTGC
CCACCAGTCTCC**TTC**CTGGGGCGTTGAGGAGAGGATGACCCCTCACAG**TTC**TCCTC**GAA**GGAGCAT**GA**
AATTGTAT**TTC**CAACAACAGTGCAGTGGCCGCCATCCAGGG**GAA**CGCCCGCTCCCCCTGTGCTGCCCTG
CTGGTC**TTC**TGCATGTTGCTGGCTCCTCTCTAGCTGTGGGGCTCGGGACAGGCATGAGCATCC
TCTGAGCACTAATGTCAATTG**TTC**CTGCCAGCCAGCACTGCCAAGTCTGAGCTCAG**GAA**GGCGGGGGT
ACTCCCTGCCAGCCAGAGCAAATTAGGTGCCCGGATGTTGAGGTCTGTTGGCAT**TTC**CTGTGTGGC
TTTGGCTGGTGGGCCAAGCCAGTGGGATGCCCTCTTGACCTGAGCTGGGCCAAACAGGCCTGTCCAG
AGTTTTGAGCCCACTGAC**TTC**TGCCTCTGTGCCACAGG**GAA****TTC****TTC****TAGAA**AAAAAGTCCACT**T**
TTCCCTAGTATGA**TTC**CACTGAGTAGCTATCCTCTCCCTTGTAGGGGACTATAACAACCCAGGCCTGG
CCAGTCCCTAGCTAGTCTGTCCAGAGCCCGA**TTC****TTC**AGGCCAG**GAA****TTC****GAA****AGCC****TTC**CTAAGCTG
TCTGGACAGGGTGAGCCCC**TTC**TGTGTGCTTGAGGTTACTACTACATGACTTAGACTGGACACTCCCA
AGGTTGTTTG**GAA**TGCTA**TTC**CTTAGGCCGCTCCAGACTGCATCT**GAA**GGCTCTTGGGACCGGGG
CTCTAG**TTC**GGGACTCAGCAG**GAA**GCCCCGCCCCAGACTGCAAGTCCAGACCAGT**TTC**ACTTGC
GGCCCTCGAGCATTGCTGGCTCT**TTC**CTCAATCCTTGTT**TTC**TTTGGCAGAGGTCTCTGGGACACCA
GATTGTCCAAAATA**GAA**GAC**TTC**ACGATACTTATT**TTC**CCAAA**GAA**CAGTATCTGTAACACAATCAG
GCCCTTTGTGTAGTGCAGGTCACAGCCACCCCTCTCCGGCCCTGCCT**TTC**CTACTCCAGCCAGGT
CCCTTGGGGCGT**GAA****GACTCTTTCATTC**CTGGCCTAAGATGGGACAAGACTGGGCAGAGACGGCAGAG
CCAAATCCTACCCTAGAGGTCATTACTAGTCCACACAA**TTC**CCCTACACACACACATACTCCCT**T**
TTCAAGACTTAGGTGCCATTAGAGCCCTGG**GAA**AAGCAGGACATAGGACAAACTTAAGAGTCAGAGGT
TTGCT

EH9:

TATGACACACATATGAAAGTCAGAAACAACCTTTC TGCTCTCTCTTTC ACTCTGTGAGCCCCAGGA
CTCACCAGGCTTAGTGGCAAGTGTCTTTACCTACTAAGCCATTTTAACAGTCCACACA GAA CGCACTT
AGCATGGTTTTGCTACAACCTGAA TTTGACAAGGGAGTGTTA GAA GGGCCTAGG GAA AGTCTAAGTTTTG
GTCAAGCAATGCCTGTGTGCACACTGCAGCCCTTTAGCCTTTACAGAGCAA GAA GTCGCAGACGGCAC
AGGGGGCGGGGAGGCAATAGCAGAGGA GAA ACTTGA TTC ACAGCCCTGGAGAC TTC CAGAA CATCCA
GTCCAATGGTCTCATTGTGCAGAT GAAGAAA AATGAGTCACATTTGCTGGCCTCTGGCCAAGGTCAAAA
GCACTCAGGTCCCCAGACTCCCTAGCTAGACAGA TTC TCTCGGCTCTACGGCCAA GAA CAGTTGGGGA
TGGAGAA TGGCTCCCTAGCCCTGTACCTGGCCCTTGTGATCCCC TTC AGTAATGATGGGGGTAGG
CAAGC TTC ATGCCAGTGGG GAA ATCAGACTCCAGGGAGACACATTGAGATG TTC TGGGAGAGACCCC
AGACACCCCCACGTGCAGTGTGTATACCGATGACTATGCTTAT TTC TGGTACCCAGTAAAGCCGGTG
ACTGGTACAATCCATCAGCTGTGCGGCCTCTCTGCCTAGCAGCTCCCG GAA GACTCCAGAGTG TTC TC
TGAGGCTGAGCCA GAA AGGGAGGGGCTGGCTGGGGTGCAGCTGGCAGAGGCCTGTCAAGGGTGTGGCT
GGCATGGCCAAAACCTCAGGCACT TTC GAA AAGGGAGGAGGGAGTCACT TTC TCAGAGCACTCCAGACG
TTGAGGTTACAGACAAGAGGAGGGGCTC TTC CATGGAG GAA ACCCCAGACTCCGCA GAA GTGGGGCTA
TGGCCTGTGAGCCACAGAG TTC AGG GAA ATCTCTAGATGATAAAGTTGCTCCTGTCTC TTC CCCCCTC
CACCCCTCTACCC TTC CTGCCCACCCAGCTCCTCCATATATCTCTGCTTGGCCTT GAA CTCATTATG
TAGAGCAGGTTAATCTCAGACTCAGATCTGCCTGC TTC TGGCTCTCAACT GAA GGCTTGGACCATGCT
CCTCCTATACCT TTC TCTCTCTCTCTC TTC TACCCTCCCT TTC TTC CCTCTGTGTCTCCATCCTCTTT
TTTTTTTTTTTTTTTT TTC TTC AGTGTCTGG GAA TT GAA CCCAGACTCCATGATAATGCAGAGGAG TTC T
ACCACTGAGCCATACCCCATGCCATCTTTTACTCTTTTT TTC TTATTTTTATGTATATGGGTGTTTT
TTTTTACCTGCCTCATGTCTGTGCACACATGTATGTAATCTA GAA GAGGACTT GAA TCTCTTAGAG
CTA GAA TCAGGGGCTGGGA TTC GAA CCCCCTCTCTG GAA TTGCAACAAGTGCTCATAGCTGCAGAG
ATAA

EH12:

CGGATGGTCACCTGGCATAGGTAAGGCCAGCCTCCCAGCATCTGAGGACCAGGTGAGAAAGGGATGTG
GCAAGCAGGGCTCTA TTC TTA GAA GGTGGTATCCTCCAGGGCTGCCAAGGCTGGCCAGGACACCTCC
CTTGCTGACAGTTGCTGGGCCA GAA ATGGGGAGGCAG GAA AGGCCACACAGCAGAT TTC CAAATAGAC
TCTACTTGAGATGTTTGGACCATATGCACCCTCACTCCCACCCAA GAA AAGA GAA CTAGGGACAGGGA
CCAGCCATGGGAGCCTCA GAA GATCTAT GAA AACTGACAGGCCAAGGAGGCACTGG GAA CCAGT GAA A
TTTTGC TTC CAATCCA GAA AGATAACAGTGTCTCTCAT GAAGAA ATACAGTTGATGGCTCCAGTGGGA
CTCC TTC TCTAGA GAA GACACCA GAA AACCAGAGACACCGTT GAA TATGG GAA TGTATCTAGGATTGA
G TTC CTGGTGGCCGTCTATCTCCATCTCATCTGGATAGTCACTATAGCCACCTCTACTTA TTC ACT
ACAGAGGGCTGAGAGG GAA CTGGAGGGACTGGGCCT GAA A GAA CTC TTC TTC TCCTGCCCTCCAG
GACAACCCAGATCCTGAGAGCTCCTAGAT TTC CTTG TTC CAGCCCCACCTCTCCATGGG GAA ATGATG
AGCTGGCCTCTAGTGGGGAGGGCAGGACAGGAGAGGACAGGGTAATT GAA AATGCA TTC CAGACTGGT
GATACAGCAGTGGCCCCAGGGCAGGGAGGGCACCCTCAGCTGCTG TTC TG GAA GAT TTC CTGACGTC
TGAT TTC CCTGAG GAA GAGGAGA GAA TGGTATGAGGTGAGATGGGG GAA GACTCCTGCCCTGGAGGGT
ACAGC GAA CCTTAAAAGCCACCTCTCCTTG GAA GC TTC TCAGGTCCCTCCCCAACACACACAACCTC
TGGATCTAGCTTGGTCTAGGGTACAGTGGACAGCCTCTCTTG TTC CTATTAC TTC ACCAGGATGTACT
CTCTGTGGTCCAGAGCCTGAGGCAGGTGAGATAGATGGCTCATACTGCCCTTGGGGG GAA GGGGACTG
GTAGGTTTACTCTAAGAGGTGGGACT TTC TG AAGGGAGGGAGAA GAGTGG GAA TGAGGGCTGACTAGG
TTAGCTG TTC TCCACCAGCTGTG TTC TGTGCTAACCTGTGCCAGGCACTGCCCAATGGTCT TTC CCT
GCATGTTTGTGTTTAGGTCTTGGGACCTCCAAGCACACAATGTGTGCTCTCCAGGCCTTGATGGGGCAA
CTGGATCACA GAAGTGAACTCTTTTC TGCCCTAAACTATATAATCAATCCCTGTGA TTC CAGAGAG
CTAGGTGATGGGTGCCCTTTGGTGGAGATATCCTTTAA GAA GATAACAAAACAAGG TTC ACCGTCCCTG
GAA TTC CATTACCCAAGAGGCCA TTC TCTTGA CTACAGAGCTCTTGCCCT TTC CTCCCTAG TTC AT
CCAA

EH14:

ATTATCATCTATCTTGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTAT
TTATGTATCTAGCTATCTATGTATATATGTTTATATATTTATCTATGTATGTACATACATATCTATCT
ATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT
TGTG TTC ACCTA TTC AGCTAGGCAGGAGGT TTC TCT GAA GCTTGGGTTACAGGTCTGTCTAT TTC TGG
C TTC TACACAGGTGTTGG GAATCTGAACTCGGGTTC TCAGTTTGCACAGCAAATGCT TTC CCCACTA
AACCCCTCTCCGCAACCCATGATTGGGCCTGCATTTTTTATCTATAGCTGTCAACATAGCAGATAGC
AGCCTGTC TTC GAA AGTTAAGTCAGCCAGCTTTACAT TTC CTAGTCAATCCCATTGTGGTCAATGGTG
TGCTAACCTCTATGAGCGATTGGTCTTAGCTATTAAT TTC CATGTG TTC CTGGTAAATCTGGCGTAT

AATGGCAATGACCATGTTGCTCTTGTCTTGCCTGTTACATGGTGGGTAGCATTC TCTCTTTTATGATT
ATTTATGAA GGATGACTGTTGACCGTGA TTC TTC TCATCCTTGAGGTCTCAATTGTGGACGGA TTC TT
GGCTGATGATTC AGT TTC TTGAGTGATTATG GAA CCATCTAGATCT TTC TTC TTGAGTCAGTCTAG G
AATGAGTCTATTTGTT GAA AATTTAAATTTATTAGCACACATTC CATGATGTGACCTCATTATAATA
TC TTC TTATTATAATATGCTCAATAATGT TTC TGT TTC CTTATTC ATGGTTAAGTGA TTC ATAGCCAC
TGTTA TTC TTC TCATTAGTCTTGCCA GAA GTGTATAATTTTGTAC TTC TGTC TTC TTACTTTGG
TTTTTATTC TCTTTTAAATATACTTAATTGGTGTGTGT GAA TATGTATGTGTATGAGTGTATGTGT
TGTTGTGTGTGTGGTGTATGTGAGAGAGAGTGTGTGTATGTATGTGTGTATATGTATGTGTGTATGT
TGAGTGTGAGTGTATGTGTGTGTATGTGTGTATGTGTGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGT
TGTGTATTATATGGTATGTGTGTATGTGTGTGTGTGTGTATGTGTACATGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGCGCCCTTG GAA GCCAGAGGCATTGGATGCCTT GAA TTGCAGATAATTGT GAA CCACCTGATGTAT
GTACTG GAA AT GAA CTTTGACCTGTGCAA GAA CAGTACATGCTCTTAACTGCTGAGCCATCTC TTC A
GCTCCCGCCACCCCTTTTTTGGAGACAGGGTCTAAAGCTGA GAA AGGCCTGCCTCAGGCTCCTGAGC
ATCTGGGAGCACAGCGCTGCAGTCCAGGCCTGGC TTC TCTCACCTCTCCAGATTTGGACTCAGCCTCT
AGTT

EH17:

AGATGGA GAA TCTGGTT TTC AGATACTACGCCACTTATCTGCATGTGAGAGAGTGCAAATCTTATCCT
GGGATCTATGTCTTTATCGACTAAAGCCTACC TTC AGGGTGCTGTTGAGTACTGTT TTC ATTAATGTT
TGTTGCCT TTC CTTTAGGTTTTTGGACAAGGTCTCACTCCACAGTCACAGCAATCCTCCTGCCTCAG
CCTCTTAAGTACTGTATGCCAGCTCCTTGACATTGTGCATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TGTGTTTACGGCATTAVTGGTGTGCTTGGGGCATATGCAGAGGCTGTA TTC CTCAATCCTATCTCC
ACC TTC TTC ATTAGTCAGTCTCACACT GAA CCAGAGGCTGACTAGCAAGCCCTGAGCATCTGCCT
GCTACATGGGGTTACAGGTGTATGCTCATACCCCGGGTGTCTTTTAAAGTCAGTGGTG GAA CCCACAC
TTAATCCCCATGCTTGTACAACAAGTACTTTACCCACTGAGCCATCCCTCCATCTTTGATATCAAAGC
GTTT GAA AAGACGTCTGCTT TTC AAAGCAGGA TTC TCAAGTTGCAATCACAGAGAGCATCGGTGTGAC
AGGTGGGCTACACTGGACTAAGACGACTTGTCTGTG TTC AGT TTC TACCACAGAGGACTCTGCCCTGA
GGGTTTTGGTCCATAGAGATGTCCTGCTGGCCGAGTATGCCTGGTACTCTCTCTACATCACATGG
CTTATTTATATTATGACTCATAGAGCCTTTATCACATGATTATTTATATTATGACTCATA GAA CCT TTC
GAGACAATAATGT TTC AGCTTAATCACAATTTAAAGGCTGAGATGGG GAA TAATTTGAGGATCTCAAT
AGCCTGTCTCAGAGGCAGAC GAA TGGCTCTCCAGGCACTATCTTGTGACTAATCTTAGTCATCGT
TACATGTCATCT GAA AACAGT TTC CTCGTGGATCT GAA TTAGTGTCTCAGATCC TTC TCTAGCCTGA
GGGGGGTCTACA TTC TTC TGCATACCATCAGGGACAACACAGCTAGCTGGCCGACTGACTACCTAAC
TAGTCTATGTGTGGCGGGCTACTGGAGTTGTAGACAGCTGTGAGCTGCCGTGTGGGTGCTGGGACTTG
AA CTGGGGTCTTTT GAA GTGCTCTTAACCAATGAGCCATCTCTCTGGCCCCAAAGCCAGCTCTTTGA
GTTATGTAAGTACTCACTTTACTAGA GAA TCTCTTGGATACACAGTGCCAGAGTCCCAAGGTGACAG
TCTTGACCTGAGTGAGCCTGGAGCTGATCTGTACAGAGGCTGCC TTC TTC ACAAGGAGGTCTCT
CTCACTGGCCCTGTGATTA GAAAAGAA ACAGCTGGCCAGTTGTGGCAGATGCC TTTAATACCAGCACT
TGGGAGGCAGACGCAGGTGGATCTCTGTGAG TTC CAGGACAGCCTGGTCTATATAGA GAA ATAAATAA
AT

EH18:

ACAGAA TGTGTTTCTTCTTGATT CAGATGCTGCCATGTTTTTTGTTTTTTTGTTTTTTGTTTTTTTG
TTTTTTGTTTTTTTAGATCCTGGATGTGAGACCCC TTC TGTCACACCATAG GAA TACT TTC TTC
ATCTGTTTTGATGCT TTC TTGTATGTAGAA ACAATGTAATT TTC TTTTCTTCCCT TTC TTTTGTCT
TTTTTTTT TTC GGTGACAGGATCACTAGTCAGCGATGTAATT TTC TTGCCAATCAACAGTGTGCA GAA G
CACAGCGTGACGCAGTAAATGTCTAACAGCGATGCTCAGCTGACCTGGGACGAGAGGTAACCTGGACC
AGTTGTAGGTACCACTGGAGCCCATCCACCGTCTAT GAA AGGTGAGACTAATCCCCACCATCAGTGA
GG GAA TGCTGTGCACTAGAGCGCGCCCTCGCGAC TTC AAGCTCCAGGACCTCATGCTATGGGCCCTCT
CCCTAAATCCACACTCCCTCTCGACCCAGCTCAGTGACCCGAGTGCCATTATCCT TTC CTCAGGATC
TCAGGCGGGGATCTCTGTCTGTGGCCAAGGCTGGACAGGCTCCGTGCTCTCGGGCCACCTAGCT
CTAGCCAGGTGACCCGCTGCTCTCGGACAGGCGGCCCCAACGCCAGGCGCCCGCTGCTGGCTTG
GGGTGGGCGAGCCTTGGGTCCCACTGCCAGCGCTGGCAGCCATCGAGACTGCTCTGCTTAAAGATCC
CGGCGTCTCTCTTTGGGGTCCCAGAGGCGTGAGGTGTGCAGT GAA GGGCACTGGCGGGATAGGGGTGA
GGCCCAGGTCCCGC TTC AATTCTTC CACATCCGCTTGTCCCA GAA ACGGGAGGCGCCCTGCCACCGCG
CAGGGCCAGC TTC GAA ACCATCCCTGAA GCAGTCCAGACGCTGCAGTCTGTTAACCTTGGCAGGTC
GCTAGGACCTCTGG GAA CTTTTAA GAA GACAAGTATCTGGATCCCACCCAGCTGATTGACTTGGGGG
TAGTAGTGCA GAA CGTGTATTT TTC ACTCTCACCTAGTGAGTCTAAGGCCCTCGGTGT GAA GAGCAC
CTAACTGTGAGCTGCAGGTCTCTTTTGTATCAAGCCCGTTTAACTTGGCTTGTACACACCCGAGTCC
TTC CAAAGTCTTGGCTCTGCACTAAGGTTACCTA GAA ACACAGGCCCTGGGTCTAGCTGGGACTTTTTG

CCCTCACCCAGGAGGGGGAGTGGGGTCTCTTTGTTTTGCACTAGACTCTTGCAAAGTAACTACCGACC
CCGACCGCTG **TTC**CCAGCCAGGTTAAGGAGGCACAAGACTA **GAA**TCTGGATCCTC **GAAT****TTCCTG****TTC**
AGAAGGGGTTGCCAGGTCTAGCAAATAAAAGTGCAGCGTG **TTC**AGTTAAATGCTACTCTCAGATCAAC
CATGAGTTATCTTTTAGTTTATCT **GAA**ATATTGTGCAGG **GAA**GCCTGTAAACGCAGCGCTCGGGACGT
GTGG

EH20:

TTGTAACCTCCTACAAC **TTC**AGTTTGGCGG **TTC**TGCCACTGACTACAGTCATAGA **TTC**TCACCCGCTC
TTTTGCATAACAATTGCCACCTCAAAG **GAA**CACAG **GAA**AGCTATGAGAGGCCCTTTAA **GAA**TTAAAGAC
ATCTAATCTATGCATTTACTTATCTATCATGTATGCGCATCGCTTGCG **TTCCTTC****CAAACACT****TTC**TA
AGC **TTC**AGGTATCCAAGC **TTC**TATCTGGCTGGCTCCAGCTTTGCAAGACGAG **GAA**GAGCAGCAGTAGC
AACGCCTGTACAGCCCGTGCCTTTTGTGCCTG **GAA**TGACCT **GAA**GCTGGCAAGGAGAGACAGTTT **GA**
ATTTCCAGGCAGGCTAAAAGGCCTTGGCT **GAA**GAGCTGAGGAT **TTC**ACAACGCCGAGG **GAA**AGCCT **TT**
CCATAAAGAGAT **GAA**GGGATATG **GAA**AAAACCTGCAAT **TTC**TGCAAATTGG **GAA**CAACTA **GAA**GGTG **GAA**
GTGTCCTA **GAA**GTCCAGATGGGGTCTAACGTGACCGTCTGCC **TTC**CTCGGT **TTC**CGTCACAACCTGC
AAACCACACTATCACAACCTGTTACTATATACAGGGCCTAAGTCCCT **TTC**ATCCAGCTCTAGGGGAG
TCAGAGGCTGTGTTGTCTACC **TTC**ACGCGCATGCGCGCC **TTC**CAGATACT **TTC**TAAGCAGCAGCAGCA
GCAGCGCCCAGATCCGGTGATTTAA **GAAAATTC**CTCTCATCTTATACCTT **GAA**ATGATCAATGCGTAA
TCT **GAA**GCGGTCTCAGAGTCTGTGGTCTGTTAAGAGTCAAT **GAA**ATG **GAA**GGAGAGGACGAGTCAAGA
CTTGCTAGGGTCTG **GAA**CTACAAC **TTC**CAGCAGACACCGCGCTTTGTGTTTGGCT **TTC**TGGTGGGCGT
GTCCAAGGCCTAGGACGCTTAAAGCGGCGAGACCTCTTGGGGCCAGATCTCTGCAGAGCTAGCCAGCT
GGAGTG **TTC**CAGCCACAGGAGGCCTGCGAGCA **GAA**TCCTTTTAGATCTGCTGTTGTCAAT **GAA**CTAGC
AGTCAG **TTCATTAGAA**AGGACACCGGTTAAGCAT **TTC**CAAGCCTGTTTT **GAA** **TTC**ATCAGCTCT **TTC**T
CTAGCTCTAGCTCCACAAATCCTAAGTTGTCCAT **TTC**AACAAATAAAAACTTAG **GAA**AATACCATCTGT
AAAACCTGTTGTGTCAACACAATTGTTT **TTC**TGTTACTGGTATCCATAGGCAGTACTTAGTGTCCCAC
TTATTAAGACTCAGCGTGACCCACAAG **GAATTC****TTTAAAGAA**CCAGTGGATAAAAGTAAAACTTGA
TTTTAAATTTTGTCT **TTCGTTTCTACTTCTTC**TAATGGAGTGTCTTTAAAAACATAGCATGCC **TTC**AAA
GTGCATATTTTTAAAAAATGATTTACATTGTGACATACTC **TTC****AAATAGAA****CGCTTTC**AAATACTGCT
TTGCTTT **TTC**TTACAG **GAA**GACAACAACAAAAATG **TTC**TCTGGTAGCATAGTCTA **GAA**CATCGG **TTC**T
CAAC

Bilaga D: Polymeraskedjereaktion

Tabell 1. Reagenser per PCR-prov. I polymeraskedjereaktion (eng. polymerase chain reaction, PCR) med Q5-polymeras behövs nedan listade komponenter.

Reagens	Koncentration/massa/volym
Q5-buffert (5 x)	5 µl
dNTP (deoxinukleosidtrifosfat, eng. deoxynucleoside triphosphate)	0,16 mM
Framåtriktad primer	0,5 µM
Bakåtriktad primer	0,5 µM
DNA	plasmid-DNA: 5–10 ng, gDNA: 60–80 ng
MgCl	1 mM
Q5-polymeras	0,02 U/µl
H ₂ O	→ 25 µl

Tabell 2. PCR-program utformat för Q5-polymeras. Vid polymeraskedjereaktion (eng. polymerase chain reaction, PCR) med Q5-polymeras kan nedanstående PCR-program följas.

Steg	Temperatur, °C	Tid, sek
1	50	15
2	98	120
3	98	6
4	55–63	30
5	72	40/kb
6	Upprepning av steg 3–5 27 gånger (totalt 28 gånger)	
7	72	180
8	4	förvaring

Tabell 3. Primrar för linjärisering av luciferasrapportörplasmid. Luciferasrapportörplasmiden linjäriserades inför in-fusionskloning med hjälp av polymeraskedjereaktion. Vid polymeraskedjereaktionerna användes olika primrar beroende på fragmentet som inkorporerades.

Ändamål	Framåtriktad primer (5'→3')	Bakåtriktad primer (5'→3')
Tillverkning av förstärkarkonstruktioner	TCGTCGCCGCACTTA TGACTG	CGGATCCTTATCGATT TTACCACATTTGTAGA G
Tillverkning av POU3F-1, IRF7- promotorkonstruktioner	GCCACCATGGAAGA TGCCAAAAC	CGCCAGCAACGCGG
Tillverkning av LGALS3-, CTF8-, PITPNA- och SCP1- promotorkonstruktioner	GCTTGGCAATCCGGT ACTGT	GCGTCAGACCCCGTAG AAAA

Tabell 4. Primrar för amplifiering av amplifieringssekvenser. I en första omgång av polymeraskedjereaktion amplifierades så kallade amplifieringssekvenser som innefattar sekvensen som skulle inkorporeras i luciferasrapportörplasmider (fragmentsekvensen).

Sekvens, namn	Framåtriktad primer (5'→3')	Bakåtriktad primer (5'→3')	Sekvenslängd, bp
EH2	GGACACCCTACACCCGAAAC	CCGCTACCATAGACGCTTCC	1689
EH9	TCTGCTCTATTCCTTGCGGG	TGACATCATTGTGCCGGGTC	3230
EH11	GTGAGATTCTAGGCTGCCACTG TT	CTGCACAGCTTCAAGCATCG	2075
EH12	CTCATTTTGCACAGGGCCAC	TGCTCCTTGGACGAGACCTA	2987
EH13	TCCAGCCTAGACTGAGTCCC	GCTACATCCAGGGGAGATGC	4388
EH14	GTCTGGAGTATCGCCAGCTC	ATACGGTGTTAGCCCCTCCT	1534
EH15	GCCAGGGTTTACGTTCTCA	GCTAGGATGGCTTTGGAGCA	3253
EH16	GAGATCAGGCGAAGCCCTAC	TCTGCGCTGTTTGTACCTGT	2832
EH17	CGGTGGTTTGGAGGGTTCAT	GACGGGACCCTACTGGGTTA	3473
EH18	CCCTATGGCCCTAGCATTGG	TGCCAACGGCCATTCTACTT	3805
EH19	TCGGTCATTTGCTGCTCAGT	AGGGGAAGAGCATCCGTTTG	5314
EH20	CTGTGGTCAGGCACGTTAGT	CTCTTTATCCGGGTGGTCGG	5342
IRF7-promotor	CATGTCCTCCAGTCCTACGC	CACATACCTGGTACCGGAGC	3098
POU3F1-promotor	CCTATGACGGTCCTCAGTGC	GCTCAATTTCCGCCTGCATC	2676
CTF8-promotor	CTCAACCACCCATCGTTCT	CACAACCTCCTCCTCCCAAC	3101
LGALS3-promotor	GTTATTGGTGCGTGGGAAGC	GGAATCCTGGGCGATGTCTT	3442
PITPNA-promotor	CCTGAATGCTCCCCGGATTT	CAGTTCTGCCTGCTCCTTCA	2535

Tabell 5. Primrar för amplifiering av fragmentsekvenser. I den andra omgången av polymeraskedjereaktion amplifieras så kallade fragmentsekvenser ur amplifieringssekvenserna. Dessa inkorporerades i luciferasrapportörplasmider.

Sekvens, namn	Framåtriktad primer (5'→3')	Bakåtriktad primer (5'→3')	Sekvenslängd, bp
EH2	GTAAAATCGATAAGGATCCGCAAC CCCCACC	AGTCATAAGTGC GGCGACGAAGCA AACCTCTGACTCTTAAGTTTGTC	1540
EH9a	GTAAAATCGATAAGGATCCGATG ACACACATATGAAAGTCAGAAAAC AACTTTTCTGCT	AGTCATAAGTGC GGCGACGATTAT CTCTGCAGCTATGAGCACTTGT	1540
EH9b	AGTCATAAGTGC GGCGACGATATG ACACACATATGAAAGTCAGAAAAC AACTTTTCTGCT	GTAAAATCGATAAGGATCCGTTAT CTCTGCAGCTATGAGCACTTGT	1540
EH11	GTAAAATCGATAAGGATCCGTGTTG TAGCCCAAGCCTGACTGAC	AGTCATAAGTGC GGCGACGATACA GAGACCACTGGTATCTACCACC	1540
EH12	GTAAAATCGATAAGGATCCGATGG TCACCTGGCATAGGTAAGG	AGTCATAAGTGC GGCGACGAACAT TGGATGAACTAGGGAGGAAAAG	1540
EH13	GTAAAATCGATAAGGATCCGGGGG GAATGGAAAAAATGGGC	AGTCATAAGTGC GGCGACGACATC ATATCCTATTGGGTGACAATGCC	1540
EH14	GTAAAATCGATAAGGATCCGTCCGT GACTTTCAATTTGTAGGTG	AGTCATAAGTGC GGCGACGACTCA ATCCCAGGTGGGAGTT	1540
EH15	GTAAAATCGATAAGGATCCGGCTG AGCCATCTCATCAGCC	AGTCATAAGTGC GGCGACGACACT CATTACCTTCCGGCCT	1540
EH16	GTAAAATCGATAAGGATCCGTTTAG AAGGTCATTATGACTAAGTTGTTAT GCTTTTGTCT	AGTCATAAGTGC GGCGACGACTTA AAAATTTCTGTTATTCTGCTTTTTA TTCTCTTCAG	1540
EH17	GTAAAATCGATAAGGATCCGCAGA GTAGCCAGAGATGGAGAAT	AGTCATAAGTGC GGCGACGACTCT ATATAGACCAGGCTGTCTTGAAC	1540
EH18	GTAAAATCGATAAGGATCCGCACG GTATATGAACGTAGTTCTCAACAG	AGTCATAAGTGC GGCGACGAACAG GCTTCCCTGCACAATATTTT	1540
EH19	GTAAAATCGATAAGGATCCGGCCT GGCCACAAAGCAG	AGTCATAAGTGC GGCGACGATGTT AGCCCTGCCAGGC	1540
EH20	GTAAAATCGATAAGGATCCGTTGTA ACTCCTACAACTTTCAGTTTGGCG	AGTCATAAGTGC GGCGACGAGTTG AGAACCGATGTTCTAGACTATGCT	1540
IRF7- promotor	AAAAGGCCGCGTTGCTGGCGCTGA GGACTTCTGGAAGAGCAG	TTGGCATCTTCCATGGTGGCCAGGC AGGGTGTGGCTTAA	1026
POU3F1- promotor	AAAAGGCCGCGTTGCTGGCGGCCA AGATCCAGGAAAACCC	TTGGCATCTTCCATGGTGGCAGTGA GCCGCTGAGCCTG	1040
CTF8- promotor	TTTTCTACGGGGTCTGACGCTTCT GGAGGGACAAAAG	ACAGTACCGGATTGCCAAGCATTG CTGCGCACTTC	1049
LGALS3- promotor	TTTTCTACGGGGTCTGACGCAGTCA GCAGAATGGGG	ACAGTACCGGATTGCCAAGCTACT CTTTTCCCCGGGC	1060
PITPNA- promotor	TTTTCTACGGGGTCTGACGCTGGGA TTCTGGGATTGAACC	ACAGTACCGGATTGCCAAGCTCTC TGCGGCAACCAAGCGT	1048

Tabell 6. Primrar för tilläggning av överhången till SCP1-promotorn. Överhången tillsattes till den artificiella SCP1-promotorn (eng. super core promoter 1) med hjälp av polymeraskedjereaktion.

Sekvens, namn	Framåtriktad primer (5'→3')	Bakåtriktad primer (5'→3')	Sekvenslängd, bp
SCP1	TTTTCTACGGGGTCTGACGCTACT TATATAAGGGGGTGGGGGC	ACAGTACCGGATTGCCAAGCCGGT CCGTAGGCACGT	120

Bilaga E: qRT-PCR

Tabell 1. Sonder och primrar för qRT-PCR-reaktioner. Sonderna innefattar fluoroforen karboxyfluorescein (eng. carboxyfluorescein, FAM) och BHQ-1-släckaren (eng. black hole quencher-1).

	Sond (5'→3')	Framåtriktad primer (5'→3')	Bakåtriktad primer (5'→3')
LUC2	FAM-CATCATGGATAG CAAGACCG-BHQ1	TCGTGAGCAAGA AAGGGCTG	AGTCACGAAGGTG TACATGC
LACZ	FAM-GAAAACCCTGGC GTTACCCA-BHQ1	TATGGCGAGATC GATCCCGT	TATTACGCCAGCT GGCGAAA
18S	FAM-TTCCCAGTA AGTGCGGGTC- BHQ1	GCAATTATTCCCC ATGAACG	GGGACTTAATCAA CGCAAGC

Tabell 2. Reagenser per prov i qRT-PCR med SYBR Green.

Reagens	Koncentration/volym
SensiFAST SYBR Hi- ROX Mix	5 µl
Framåtriktad primer	400 nM
Bakåtriktad primer	400 nM
cDNA- templat	2 µl
H ₂ O	→ 10 µl

Tabell 3. PCR-program för qRT-PCR med SYBR Green.

	Temperatur, °C	Tid, sek
1	95	120
2	95	5
3	60	30
4	Upprepning av steg 2–3 39 gånger (totalt 40 gånger)	

Tabell 4. Reagenser per prov i qRT-PCR med TaqMan-analys.

Reagens	Koncentration/volym
SensiFAST Probe Lo- ROX Mix	5 µl
Framåtriktad primer	200 nM
Bakåtriktad primer	200 nM
Sond	100 nM
cDNA- templat	2 µl
H ₂ O	→ 10 µl

Tabell 5. PCR-program för qRT-PCR med TaqMan-analys.

	Temperatur, °C	Tid, sek
1	95	180
2	95	10
3	60	30
4	Upprepning av steg 2–3 39 gånger (totalt 40 gånger)	