



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

Identifikasjon av Nrf2-målgener i musecellelinje
66cl4 vha ChIP-sekvensering

Identification of Nrf2 target genes in metastatic
66cl4 cell line using ChIP-sequencing

Av / by

Amanda Friestad

Inger Lise Pedersen-Tangen

Ingrid Graneggen

Trondheim, 2021

Forord

Oppgaven ble gitt av førstelektor Kristin Gabestad Nørsett, PhD, på vegne av professor Geir Bjørkøy sin forskningsgruppe ved Senter for molekylær inflammasjonsforskning (CEMIR) ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Prosjektet ble gjennomført som bacheloroppgave på bioingeniørutdanningen ved NTNU i perioden mars - mai i 2021 og utgjør 20 studiepoeng.

Vi ønsker å takke professor Geir Bjørkøy og CEMIR for å legge til rette for at vi kunne gjennomføre dette bachelorprosjektet. Vi gir også en takk til forskningslabene ved Institutt for bioingeniørfag for lån av utstyr. Vi ønsker også å takke overingeniør Sten Even Erlandsen ved Genomics Core Facility (GCF) og forsker og daglig leder Morten Beck Rye ved kjernefasiliteten for bioinformatikkanalyser (BioCore), for sekvensering og påfølgende bioinformatikk av prøvemateriale.

Dernest ønsker vi å takke mastergradstudent Yuna Shin for tillaging av materiale til immunpresipitering, og for å gi oss inspirasjon til oppbygging og gjennomføring av vår oppgave. Til slutt ønsker vi spesielt å takke førstelektor Kristin Gabestad Nørsett, PhD, for svært god veiledning gjennom hele prosjektperioden. Hun stilte alltid opp for oss ved ethvert spørsmål, var alltid engasjert i diskusjoner, og motiverende når forsøkene følte vanskelig.

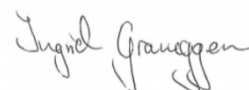
Vi vil også takke våre venner og familie for hjelp, bidrag, trøst og fest, når det har trengtes.



Amanda Friestad



Inger Lise Pedersen-Tangen



Ingrid Graneggen

Trondheim, 20. mai 2021

Sammendrag

Brystkreft er den mest prevalente kreftformen blant kvinner i Norge. I forskningen har transkripsjonsfaktorer og deres innvirkning på spredning av kreftceller blitt hyppigere undersøkt de siste årene. Hovedformålet med denne oppgaven er å finne ut hvilke nye målgener som transkriberes av transkripsjonsfaktoren Nrf2, og verifisere noen av de kjente målgenene ved hjelp av ChIP-PCR.

Metoden som er benyttet i denne oppgaven er hovedsakelig ChIP-PCR, for å verifisere at ChIP-prosedyren har vært vellykket. Litteratursøk ble utført for å finne ut hvordan spesielt kritiske trinn i ChIP-prosedyren kan utføres mest mulig optimalt. Det ble utført neste generasjons sekvensering og bioinformatikkanalyser (utført av kjernefasilitetene) for å finne de ulike DNA-sekvensene der Nrf2 har bundet seg.

Ved ChIP-PCR ble det verifisert at de kjente Nrf2-målgenene Txnrd1, Nqo1, Gsta3 og Gsta4 er målgener for Nrf2. Ved ChIP-sekvensering ble det funnet 94 bindingssteder for Nrf2 i musecellelinjen 66cl4 deriblant i genene Txnrd1, Nqo1 og Ephx1, hvorav 2 ble bekreftet ved hjelp av ChIP-PCR. I tillegg ble kritiske trinn i ChIP-prosedyren vurdert.

Abstract

Breast cancer is the most prevalent form of cancer for women in Norway. Transcription factors and their role in metastasis of cancer cells have increasingly been studied the last couple of years. The main purpose of this project was to find new target genes that are transcribed by the transcription factor Nrf2, and to verify some of these known target genes with ChIP-PCR.

The method used in this thesis is mainly ChIP-PCR, used to verify that the ChIP-procedure was successful. Next generation sequencing and bioinformatics analysis was also performed (by Core Facilities) to find the different DNA-sequences where Nrf2 has bound. Additionally, a search in existing literature was done to identify critical steps in the ChIP-procedure.

With ChIP-PCR the known Nrf2 target genes Txnrd1, Nqo1, Gsta3 and Gsta4 were verified to be target genes for Nrf2. Using ChIP-sequencing 94 binding sites for Nrf2 in the mouse cell line 66cl4 were found. Among these were Txnrd1, Nqo1 and Ephx1. Two of these were confirmed by ChIP-PCR. Critical steps in the ChIP-procedure were additionally evaluated.

Forkortelser

ARE	Antioksidantresponselement
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCA2	Breast cancer type 2 susceptibility protein
CDX	Cell Line-Derived Xenografts
CUL3	Cullin 3
C _T	Cycle threshold
Ephx1	Epoxide hydrolase 1
NFE2L2	Gen som koder for Nrf2
GCF	Genomics Core Facility
G6PD	Glukose 6-fosfathydrogenase
Gsta3	Glutathione S-Transferase Alpha 3
Gsta4	Glutathione S-Transferase Alpha 4
Gstm1	Glutation S-transferase Mu 1
Hmox1	Heme oxygenase 1
IP	Immunpresipitering
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
BioCore	Kjernefasiliteten for bioinformatikk
KD	Knock Down
KO	Knock Out
cDNA	Komplementært DNA
ChIP	Kromatinimmunpresipitering
ChIP-sek	Kromatinimmunpresipitering etterfulgt av sekvensering
Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1)
NGS	Neste generasjons sekvensering
NT	Non-Target
NTNU	Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Nrf2	Nuclear factor, erythroid 2 like 2
PCR	Polymerase chain reaction
RONS	Reactive oxygen and nitrogen species

ROS	Reactive oxygen species
qPCR	Quantitative PCR, Real-time PCR
RNA-Sek	RNA-sekvensering
CEMIR	Senter for molekylær inflammasjonsforskning
T _m	Smeltepunktstemperatur
Txnrd1	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic
TKT	Transketolase
TF	Transkripsjonsfaktor
TME	Tumormikromiljø

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Forkortelser	IV
1.0 Innledning	1
<i>1.1</i> <i>Brystkreft</i>	<i>1</i>
1.1.1 Kreftforekomst og risikofaktorer.....	1
1.1.2 Brystets anatomi.....	1
1.1.3 Sykdomsutvikling.....	2
1.1.4 Metastase	2
1.1.5 Brystkreftforskning	2
<i>1.2</i> <i>Sammenhengen mellom brystkreft og Nuclear factor, erythroid 2 like 2 (Nrf2)</i>	<i>4</i>
<i>1.3</i> <i>Nuclear factor, erythroid 2 like 2 (Nrf2) og dens beskyttende og kreftfremkallende egenskaper</i>	<i>4</i>
<i>1.4</i> <i>Identifikasjon av regulatoriske gener</i>	<i>7</i>
<i>1.5</i> <i>ChIP-sekvensering og -PCR</i>	<i>7</i>
1.5.1 ChIP.....	7
1.5.2 Generell prosedyre for utførelse av ChIP	8
1.5.3 ChIP-sekvensering.....	8
1.5.4 ChIP-PCR.....	9
<i>1.6</i> <i>Hensikten med oppgaven</i>	<i>10</i>
2.0 Materiale og metode	11
2.1 Musecellelinje 66cl4.....	11
2.2 Kromatinimmunpresipitering (ChIP).....	11
2.3 ChIP-PCR.....	13
2.4 Sekvensering.....	14

3.0 Resultater	15
3.1 ChIP-PCR viser at Nrf2 binder seg til utvalgte kjente Nrf2-bindingssteder.....	15
3.2 Resultater fra sekvensering	17
3.3 ChIP-PCR viser at Txnrd1, Nqo1, Gsta3 og Gsta4 er målgener for Nrf2, men ChIP-sekvensering viser lav til ingen signifikans for 66cl4 Nrf2 NT-cellelinjene.....	21
4.0 Diskusjon	27
4.1 Kjente målgener for Nrf2	27
4.2 Metodologiske betraktninger.....	29
5.0 Konklusjon	34
5.1 Videre arbeid.....	34
6.0 Referanser	35
7.0 Vedlegg	43

1.0 Innledning

1.1 Brystkreft

1.1.1 Kreftforekomst og risikofaktorer

Kreft er et paraplybegrep for sykdommer som involverer malign ukontrollert cellevekst. Kreftpasienter er en svært raskt voksende pasientgruppe, og det ble rapportert om lag 35.000 nye tilfeller i Norge i 2019 (1).

Brystkreft er den vanligste kreftformen blant kvinner i Norge i 2019, med en insidens på 22,3%, over lungekreft på 10,1% (1). Dette setter Norge i en særstilling i forhold til på verdensbasis, der lungekreft er den vanligst forekommende kreftformen for kvinner, mens brystkreft er den nest vanligste (2). Det er fastslått at om lag 10% av brystkrefttilfeller kan betegnes som arvelige, og kommer som følge av kjente genetiske mutasjoner i for eksempel BRCA1- og BRCA2-genene (3). Det er også mange ikke-arvelige risikofaktorer forbundet med brystkreft, ofte knyttet til det kvinnelige kjønn. Kombinasjonen av et vestlig kosthold, med høyt fettinnhold og lavt fiberinnhold i kosten, og langvarig bruk av prevensjonspiller eller østrogenstatninger øker risikoen for brystkreft. Dette er fordi brystvevet da blir overstimulert, samt at brystene er østrogensensitive (2,4,5). Risikoen for brystkreft øker også hos kvinner som starter menstruasjonen i tidlig alder, får sitt første barn etter fylte 30 år, eller har sen menopause. Fedme hos postmenopausale kvinner og alkoholinntak kan også være risikofaktorer (6).

1.1.2 Brystets anatomi

Brystene består av kjertelvev og 15-20 lobuli. Det er alveoler med sekretoriske epitelceller i veggene som utgjør kjertelvevet der morsmelk produseres. Utførselskanaler går fra alveolene i de ulike lobuli, og samles i melkeganger som fører videre ut til brystvortene. Myoepitelceller befinner seg rundt alveolene, og ved kontraksjon vil de bidra til å presse melk ut fra alveolene. Både kvinner og menn har melkekjertler, men disse videreutvikles ytterligere hos kvinner under puberteten og svangerskap, samt at epitelcellene i alveolene modnes under svangerskap (7). Ulike typer brystkreft deles inn etter hvor kreftcellene oppstår, og kan være invasive eller ikke-invasive (4).

1.1.3 Sykdomsutvikling

Tidlige tilfeller av brystkreft blir oppdaget ved rutinemessig mammografi (8). De fleste tilfeller oppdages derimot senere i forløpet, når det først oppstår mistanke etter at pasientene selv kjenner en “klump” i brystet som er annerledes fra brystets vanlige vev (9). Andre symptomer som kan oppstå er forandringer i brystets størrelse eller form, utflod fra brystvorten, tørr hud eller utslett på brystene (10,11). Overlevelseshraten er høyere jo tidligere kreften blir oppdaget. Dersom kreftcellene kommer seg ut i blod- og lymfebanene kan cellene spre seg til andre deler av kroppen, sette seg fast og vokse der. Slike spredninger, metastaser, gir en dårligere prognose for alle typer kreft uavhengig av plasseringen til primærtumoren (8).

1.1.4 Metastase

Metastase er vandring av malignt tumorvev til omliggende vev og organer, som følge av at kreftcellen har klart å bevege seg og adherere til ekstracellulær matriks og invadere vev (12). Denne vandringen kalles for *den metastatiske kaskade*. Når kreftcellen har festet seg til andre vev må den proliferere i vevet for å vokse som metastatisk kreft (13). Brystkreft synes å ha et spesifikt metastatisk mønster, der primær brystkreft oftest sprer seg til lymfeknuter, lunge, lever, skjelett og pleura (14).

1.1.5 Brystkreftforskning

Kreftforskning bruker ofte dyremodeller i forsøk, spesielt musemodeller. Musegenomet er svært likt menneskets eget (15). Det gjør at museforsøk kan brukes til å studere menneskelige sykdomstilstander. Mange gener for komplekse sykdommer er like i mennesker og mus. Mus vil også naturlig kunne utvikle mange av de samme tilstandene som mennesker. Derfor kan museforsøk gi innsikt i genetiske risikofaktorer i den menneskelige befolkningen. På grunn av musenes korte generasjonstid kan man studere flere generasjoner samtidig, noe som er en fordel med tanke på arvelige sykdommer. I tillegg er museforsøk kostnadseffektive, fordi mus er billige i drift og krever kun enkelt stell (16). *In vitro* museceller er ofte enkle å manipulere genetisk. *In vitro* eksperimenter som cellekulturer brukes til å lage nye behandlingsformer og finne nye biomarkører, samtidig som det kan gi forskere uvurderlig informasjon om kreftcellers oppførsel (17). En viktig faktor ved for eksempel cellekulturforskning, er at vekstforholdene er stort sett annerledes enn de som finnes normalt *in vivo*, nettopp fordi det finnes så mange muligheter for å kontrollere forholdene. Stor kontroll av vekstforhold er en fordel fordi det gir mulighet til å selektere hva det skal forskes på. Samtidig er det en ulempe ved at det ikke er gitt

hvordan forsøket vil fungere i det virkelige liv. Cellekulturer har mulighet til å replikere seg selv i det uendelige under visse forhold, og er derfor godt egnet til kreftforskning. Det vil da alltid være tilgang på relativt homogene cellepopulasjoner (18).

Cellelinjer kan som nevnt brukes for å gi et enkelt system hvor enkelte cellekomponenter studeres. Hypoteser dannet fra slike forsøk kan undersøkes nærmere i en dyremodell. Den mye brukte dyremodellen er å injisere celler fra cellelinjer inn i immunsupprimerte mus. Denne metoden kalles «Cell Line-Derived Xenografts» (CDX) (19).

Det er imidlertid viktig å vite at tumormikromiljøet (TME) ikke kun består av homogene celletyper. TME er komplekst sammensatt av kreftceller og stromale celler, og samspillet mellom disse er viktige for kreftutviklingen (20,21). Disse subpopulasjonene varierer når det kommer til karyotype, veksthastighet, evne til metastase, immunologiske kriterier, produksjon og uttrykk av kreftmarkører, samt sensitivitet til behandlinger (7,22–24).

Tumorheterogenitet er vist til å gi en stor variasjon i tumorer, spesielt i dyremodeller ved at de har forskjellig opprinnelse, finnes i forskjellig vev og cellulær opprinnelse, og ikke minst arter (22). De stromale cellene i en tumor omfatter blant annet endotelceller, immunceller og fibroblaster. Endotelceller gir angiogenese, som sikrer at tumoren får tilgang på oksygen og næring gjennom sirkulasjonen. Immunceller forsterker tumorigenensen (25). Fibroblastene er nyttige både for endotelceller ved angiogenese og for metastasering fra primærtumor og videre inn i sirkulasjonen (20). Tumorheterogenitet er derimot ikke en spesiell karakteristikk ved malign kreft, men finnes også i benigne krefttyper (22).

Spatial tumorheterogenitet refererer til forskjeller i tumorvev i samme kreftsykdom og mellom primærtumor og metastase (26). Spatial tumorheterogenitet kalles også for intra- og intertumoral heterogenitet. Temporal tumorheterogenitet refererer til molekylær endring av kreftceller over tid (26,27). Tumorheterogenitet bidrar til kreftvevsoverlevelse ved at det kan være vanskeligere å drepe kreftvevet, samtidig som at tumorheterogenitet gir forskere og klinikere et våpen for en mer spesifikk og individuell kreftterapi (22).

1.2 Sammenhengen mellom brystkreft og Nuclear factor, erythroid 2 like 2 (Nrf2)

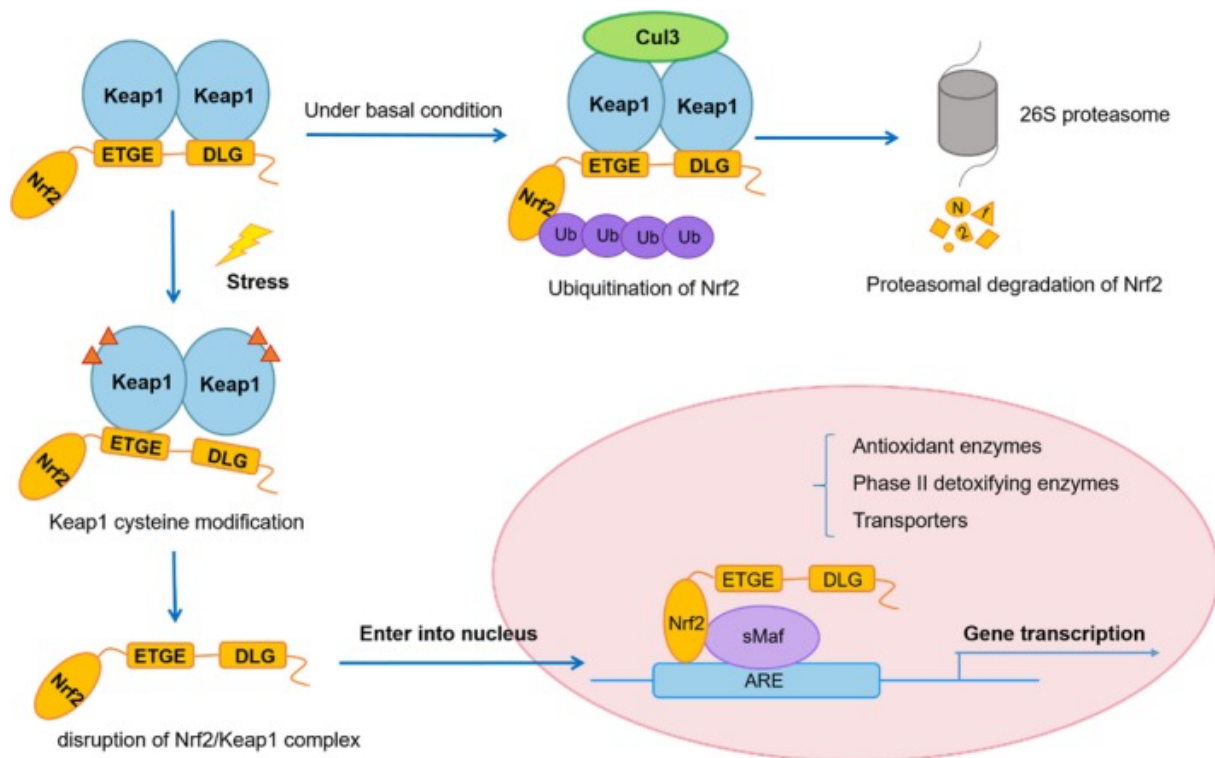
Det er viktig å forstå hvordan en tumors metastatiske egenskaper og progresjon reguleres for å kunne forbedre både diagnostikk og behandling av brystkreft. Dyremodeller er nyttige å bruke til dette formålet. Cellelinjen 66cl4 er et modellsystem som kan brukes for å studere metastatisk brystkreft. Når disse cellene settes tilbake i mus, utvikles primærtumor og metastatisk lungekreft. Cellelinjen 66cl4 er utviklet fra brystkreftmodellen 4T1 i mus, som er en modell for metastatisk brystkreft (28). Denne musemodellen består av totalt fem cellelinjer, som alle kan danne primærtumor. Cellelinjene har imidlertid ulike evner til metastasering (29). Cellelinjene er isolert fra en brysttumor i BALB/c/c3H mus (30).

Forsøk av Camilla Wolowczyk har vist at en konstitutiv aktivering av transkripsjonsfaktoren Nuclear factor, erythroid 2 like 2 (Nrf2) bidrar til aggressiviteten til musecellelinje 66cl4 ved å danne primærtumor og metastasere (31). Videreføring av det samme forsøket ved bruk av transkriptom sekvensering viste en rekke nye transkripter for immunceller som blir direkte eller indirekte regulert av Nrf2 (32). Wolowczyks museforsøk viste at musecellelinje 66cl4 med fullstendig undertrykt Nrf2 (Knock-Out) i mindre grad utviklet primærkreft i brystvev, og hadde heller ikke evne til å metastasere til lungevev (32). Dette er til forskjell fra andre studier som viser at Nrf2-undertrykte mus hadde større sannsynlighet for å danne leverkreft (33). Hypotesen til Wolowczyk og Bjørkøys forskningsgruppe er at Nrf2 i kreftceller regulerer uttrykket av sekrete faktorer som kontrollerer antallet og fenotype av medfødte immunceller med immunsuppressive egenskaper, og transkriptomanalysen av 66cl4 indikerer at Nrf2 kontrollerer uttrykket av blant annet kjemokinene CXCL3 og CXCL5. CXCL5 er kjent som et Nrf2-regulert gen (34). Det er antatt at aktiveringen av disse immuncellene bidrar til å danne metastaser.

1.3 Nuclear factor, erythroid 2 like 2 (Nrf2) og dens beskyttende og kreftfremkallende egenskaper

Transkripsjonsfaktoren Nrf2 uttrykkes normalt i alle vev, med høyest konsentrasjoner i hjerne-, hjerte-, lever-, lunge-, muskel- og nyrevev (35). Denne transkripsjonsfaktoren er helt essensiell for normal cellefunksjon ved at den har flere beskyttende oppgaver. Nrf2 kodes av NFE2L2-genet, og bidrar til celleoverlevelse under normale fysiologiske forhold ved å opprettholde intracellulær redoks-homeostase og å bidra til anti-inflammatoriske responser (36).

Nrf2 er en del av Nrf2/Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) signalveien som bidrar til redoks-homeostase i cellen. Ved basal tilstand blir Nrf2 degenerert i proteasomer etter ubiquitinerings av Keap1-CUL3-komplekset (CUL3 = Cullin 3). Ved oksidativt stress vil cystein på Keap1 modifiseres. Dette fører til en konformasjonsendring. Nrf2 frigjøres fra komplekset og går inn i cellekjernen. Her bindes Nrf2 til et antioksidantresponselement (ARE), og starter transkripsjonen av cellebeskyttende gener, som for eksempel antioksidierende enzymer og metaboliseringsenzymer (fase II detoksiske enzymer) (36). Se Figur 1.



Figur 1: Skjematisk fremstilling av Nrf2 under normale celleforhold og under stress (36).

På bakgrunn av at Nrf2 regulerer uttrykket av antioksidanter og andre cellebeskyttende enzymer, kan transkripsjonsfaktoren bidra til beskyttelse mot oksidative elektrofilske angrep og overdreven produksjon av anti-inflammatoriske produkter, samt at Nrf2 oppregulerer cytokinet IL-8 for å fremme anti-inflammatoriske tilstander (33,36,37).

Cellene kan få uheldig forskyvning av redoks-likevekten ved oksidativt stress. Oksidativt stress er forårsaket av frie radikaler fra “reactive oxygen and nitrogen species” (RONS). Frie radikaler er svært reaktive molekyler som har ett eller flere uparede elektroner i deres ytterste skall, og

kan formes når oksygen reagerer med bestemte molekyler. De frie radikalene kan dannes både endogent i naturlige biologiske prosesser, som for eksempel ved cellerespirasjonen i mitokondriene, eller eksogent som følge av blant annet forurensninger i miljøet, karsinogener og stråling (38,39). Nrf2 bidrar til å hemme de skadelige effektene av RONS ved å aktivere signalveier og få økt uttrykk av antioksidanter og antitoksiske enzymer i cellen (36), som nevnt i forrige avsnitt.

På tross av Nrf2 sine beskyttende egenskaper i cellene viser det seg at transkripsjonsfaktoren også bidrar til kreftcelleoverlevelse. Kontinuerlig aktivering av Nrf2 viser seg å gi en rekke fordelaktige egenskaper til kreftcellene og å fremme utviklingen av forskjellige krefttyper. Transkripsjonsfaktorer påvirker ulike vevs- og celletyper på ulike måter. Dette er fordi forskjellige deler av genomet blir uttrykt i ulike vev. Genene som Nrf2 transkriberer kan være pakket bort i enkelte celletyper, slik at Nrf2 ikke får startet transkripsjon av genene i disse vevstypene. Disse genene vil da ikke bli uttrykt i dette vevet (23).

Hyperaktivering av Nrf2 gir signifikant økt uttrykk av metabolske enzymer som glukose 6-fosfatdehydrogenase (G6PD) og transketolase (TKT) (36,40). Kjemoresistens kan også oppstå ved hyperaktivering, ved at nedstrømsproduktene av Nrf2 hindrer tilgang av medikamenter inn i kreftcellen og reduserer effekten av medikamenter. I tillegg kan hyperaktivering gi kreftcellene resistens mot RONS ved å oppregulere antioksidierende enzymer og demper sensitiviteten til cytotoksiske kjemoterapeutiske medikamenter (41,42). Dessuten vil Nrf2 interagere med andre signalveier for å hindre apoptose i kreftcellen (36,43).

Som nevnt tidligere er Nrf2 helt nødvendig for normal cellefunksjon. Når Nrf2 er undertrykt ved Knock Out (KO) eller Knock Down (KD), blir cellene mer utsatt for skader som følge av oksidativt stress og har større mulighet for karsinogenese. Nrf2 KO mus viser seg å være generelt mer utsatt for intracellulære redoks-forstyrrelser og har enklere for å utvikle medikamentforgiftning fordi de mangler ARE-regulert medikamentmetabolisme (44). NFE2L2 KO mus blir mer sensitive for eksogene kjemikalier som igjen gjør dem mer utsatt for lungefibrose og lungeskade, inkludert leverkreft. Antioksidanter og fase II enzymer som konjugerer produkter fra oksidasjonsreaksjoner synes også å være stort sett fraværende i Nrf2 KO mus, som gjorde dem mer utsatt for inflammasjon-indusert kreft (36).

Nrf2 regulerer over 100 gener, men eksakt antall er ukjent (45). Som beskrevet tidligere har Nrf2 både beskyttende og kreftfremkallende egenskaper. Dette er grunnlaget for at det foregår intens forskning på Nrf2s betydning innen ulike typer kreft, også brystkreft (46). Vedvarende overaktivering av Nrf2 har skadelig effekt i normale celler, og i kreftceller fører det til malign progresjon. Avvikende vedvarende aktivering kan skyldes blant annet endrede protein-protein interaksjoner, epigenetiske effekter og genetiske endringer (47). Det finnes lite informasjon om hvilke gener som transkriberes av Nrf2 ved brystkreft. Det er også i stor grad uvisst hvilke gener som blir transkribert når Nrf2 er konstitutivt aktivert.

1.4 Identifikasjon av regulatoriske gener

Det finnes flere ulike metoder for å identifisere regulatoriske gener. En av disse metodene baserer seg på å endre gener *in vitro* ved KD eller KO (23). Funksjonen til genene kan så undersøkes ved bruk av blant annet RNA-sekvensering (RNA-sek). Ved RNA-sek blir RNA omdannet til komplementært DNA (cDNA). Adaptorer festes på endene av cDNA-fragmentene. Deretter blir cDNA-et sekvensert (48). Genene som blir uttrykt kan da studeres. Alternativt kan kromatinimmunpresipitering etterfulgt av sekvensering (ChIP-sek) benyttes.

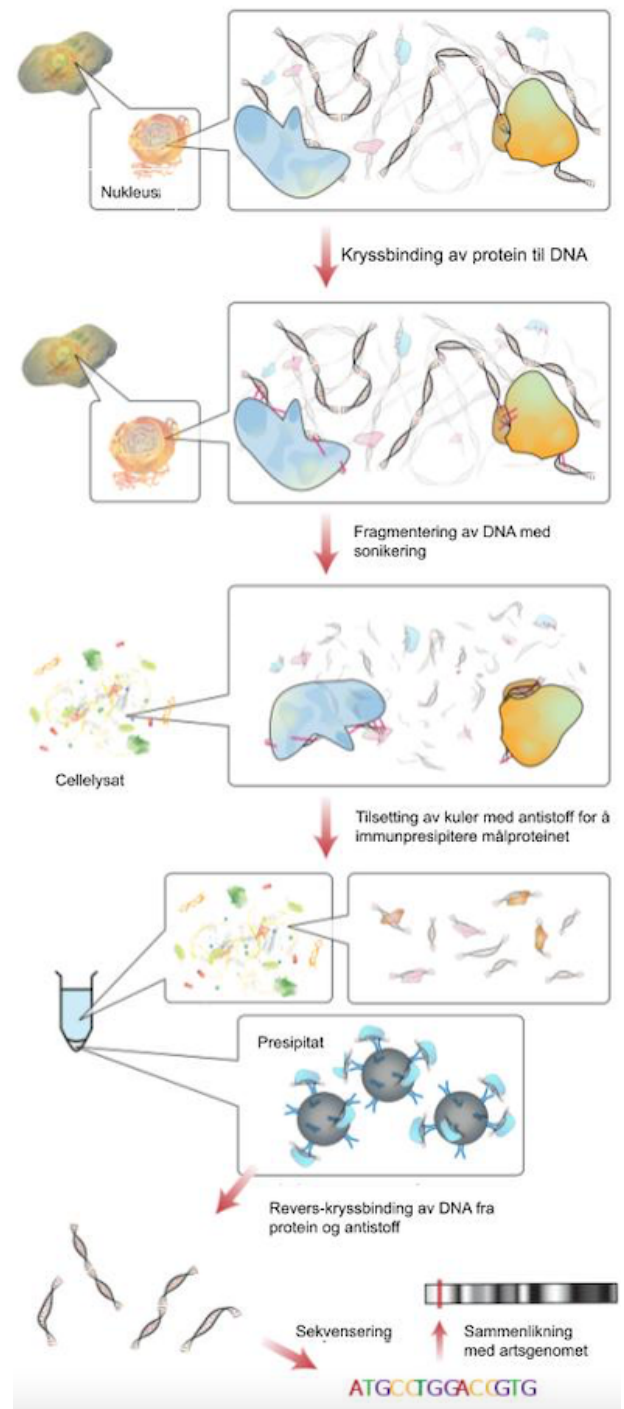
1.5 ChIP-sekvensering og -PCR

1.5.1 ChIP

Kromatinimmunpresipitering (ChIP) er en immunologisk metode for å isolere gener. Ved å bruke antistoffer mot DNA-bindende proteiner, som transkripsjonsfaktoren Nrf2, vil genene som dette proteinet bindes til bli isolert ved hjelp av ChIP (49). Denne teknikken er aktuell for å forstå hva som regulerer genuttrykket i ulike biologiske prosesser (50).

1.5.2 Generell prosedyre for utførelse av ChIP

ChIP kan deles inn i seks trinn, se figur 2. Det første trinnet er kryssbinding, der DNA-et fikseres med formaldehyd for å bevare kryssbindinger mellom protein og DNA (51). Deretter tilsettes glysin for å stanse kryssbindingen. Trinn to er cellelysering. Der blir RIPA-buffer eller glysinbuffer tilsatt og lyserer cellene, men bevarer DNA-et. Slik kan uønsket cellemateriale og cytosoliske proteiner fjernes, og kun bevart DNA tas med videre i prosessen (52). I trinn tre benyttes ultralyd til DNA-fragmentering (sonikering). Kromatinet brytes da opp i flere fragmenter av bestemte baseparlengder avhengig av forsøket som utføres. Dette er gunstig for å senere kunne bestemme lokalisasjonen til DNA-sekvensene. Videre utføres immunpresipitering i trinn fire, der det benyttes spesifikke antistoff som binder seg til det DNA-bindende proteinet. Ved hjelp av paramagnetiske kuler separeres komplekset mellom antistoffet, det DNA-bindende proteinet og DNA-et. Ubundet materiale kan fjernes. Til slutt reverseres kryssbindingene, og DNA-et som har blitt immunpresipitert kan undersøkes i videre analyser (53).



Figur 2: Trinnvis skissering over ChIP-prosedyren. Illustrasjonen er oversatt til norsk (93).

1.5.3 ChIP-sekvensering

Sekvensering er en metode som gir muligheten til å lese av baseparrekkefølgen i DNA. Ved neste generasjons sekvensering (NGS) gjennomføres sekvenseringen ved å benytte millioner av mindre DNA-fragmenter som analyseres i paralleller, og kartlegge disse mot et referansegenom for riktig art. En stor fordel ved NGS er at det gir svært god dybde i

bioinformatikken, og kan enkelt gi innsyn i både forventede og uforventede DNA variasjoner i form av mutasjoner. NGS kan benyttes både til å sekvensere hele genomer og spesielle områder av interesse, som for eksempel målgenene til Nrf2 (54). ChIP-seq er en teknikk som kan benyttes for å undersøke blant annet nukleosomposisjoner, histonmodifikasjoner og hvilke gener DNA-bindende proteiner bindes til (49).

1.5.4 ChIP-PCR

Polymerase chain reaction (PCR) er en amplifiseringsteknikk der bestemte DNA-sekvenser i en prøve blir amplifisert. Metoden benyttes til DNA-fragmenter som er mindre enn 10.000 nukleotider lange (23). For å kunne utføre en PCR-reaksjon er det nødvendig å vite hvilken DNA-sekvens som skal undersøkes, ettersom primerne som benyttes skal kunne binde seg til komplementær DNA-sekvens. Dersom det er ønskelig å kontrollere at materialet som er opparbeidet ved ChIP er av god nok kvalitet, og dermed verifisere ChIP-metoden, kan PCR brukes. Denne teknikken kalles ChIP-PCR og kan benyttes til flere ulike formål. PCR kan også benyttes for å verifisere utvalgte resultater for spesielt interessante gener som kommer frem av ChIP-seq. Da brukes det samme DNA-materialet som fra ChIP-seq i en PCR-kjøring. ChIP-PCR kan i tillegg benyttes for å undersøke mulige målgen, men det er da kun målgenene som det spesifikt letes etter som kan bli funnet.

PCR-reaksjonen består i hovedsak av denaturering ved ca. 90°C, deretter hybridisering ved ca. 50°C og til slutt polymerisering ved ca. 65°C. Trinnene gjentas i flere sykluser til DNA-sekvensen er tilstrekkelig amplifisert (55). Ved å benytte seg av real time-PCR (qPCR), kvantifiseres mengde produkt samtidig som amplifiseringen foregår. Dette muliggjøres ved å benytte en fluorescerende probe, for eksempel SYBR Green, som binder seg til dobbeltrådet DNA der primeren har bundet seg. Mengden DNA i prøven er proporsjonal med fluorescenssignalet (55). Threshold cycle (C_T) er krysningen mellom amplifikasjonskurven og threshold-linjen, og er et relativt mål av konsentrasjonen av PCR-produktet (56). For å korrigere mot bakgrunnsstøy plasseres C_T over alle kjente områder med støy. Ettersom SYBR Green binder seg uspesifikt må det utføres en smeltepunktanalyse til slutt for å fastslå at primerne ikke har bundet seg uspesifikt.

1.6 Hensikten med oppgaven

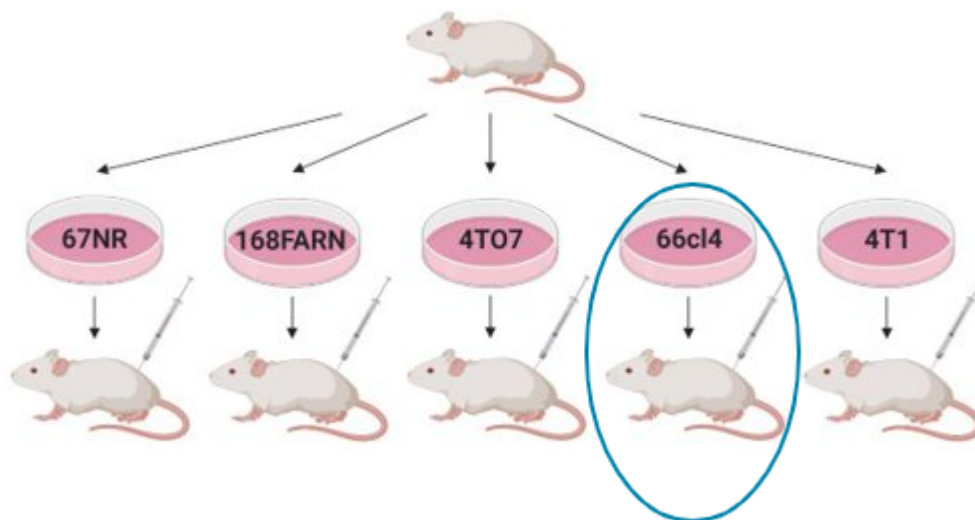
Det er foreløpig lite kjent hvordan transkripsjonsfaktoren Nrf2 påvirker brystkreft. Pågående arbeid i forskningsgruppen til Bjørkøy ved Senter for molekylær inflammasjonsforskning (CEMIR) antyder at transkripsjonsfaktoren Nrf2 ser ut til å spille en rolle ved spredning av brystkreft. Hovedhensikten med denne oppgaven er å finne hvilke DNA-sekvenser Nrf2 binder seg til ved hjelp av ChIP-sek. Dette arbeidet omfatter mer spesifikt følgende punkter:

- Gruppen skal sette seg inn i de ulike trinnene i ChIP-prosedyren, og finne ut mer om hvilke trinn som er kritiske for et optimalt resultat.
- Gruppen skal gjennomføre ChIP ut fra ferdig kryssbundet materiale preparert av Yuna Shin fra musecellelinjen 66cl4.
- Prøvematerialet som opparbeides ved ChIP skal benyttes til ChIP-PCR for å kontrollere at ChIP-prosedyren har foregått som ønskelig.
- Gruppen skal følge det pågående arbeidet med sekvenseringsanalyse som utføres av kjernefasiliteten Genomics Core Facility (GCF) ved Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet (NTNU).
- Dersom tiden tillater det, skal utvalgte resultater fra ChIP-sek verifiseres ved hjelp av ChIP-PCR.

2.0 Materiale og metode

2.1 Musecellelinje 66cl4

Forskningsgruppen ved CEMIR dyrket cellelinje 66cl4 fra musemodellen 4T1. Fra cellelinje 66cl4 ble det igjen dyrket frem en Non-Target (NT) cellelinje som har basale egenskaper. Denne cellelinjen kalles 66cl4 Nrf2 NT. I tillegg ble det laget en Knock-Down cellelinje kalt 3B7 hvor Nrf2 er undertrykt, men ikke fullstendig fjernet. Denne cellelinjen kalles 66cl4 Nrf2 KD 3B7. Prosedyren for celledyrkningen ligger vedlagt i vedlegg 1.



Figur 3: Skjematisk fremstilling av musecellemodell 4T1 med sirkel rundt musecellelinje 66cl4 som er brukt i disse forsøkene. Det er fra musecellelinje 66cl4 at Non-Target (NT) og Knock-Down (KD) 3B7 er dyrket frem av.

2.2 Kromatinimmunpresipitering (ChIP)

DNA og proteiner i cellene ble kryssbundet ved hjelp av 0,5% formaldehyd som beskrevet i vedlegg 1. Kryssbindingen ble stanset ved bruk av glysin. Cellene ble lysert med RIPA/glysinbuffer. Deretter ble DNA fragmentert til 200-500 bp ved ultralydsonikering, som beskrevet i vedlegg 1. Ferdig fragmentert DNA ble lagret ved -80°C . Kryssbinding og sonikering av celled materialet ble gjennomført av mastergradstudent Shin.

Kromatinfragmentene lagret ved -80°C ble tint på is. Protein A og G Dynabeads (Invitrogen, CA, USA) ble klargjort. Protein A Dynabeads og protein G Dynabeads ble pipettert i DNA LoBind eppendorfrør. Eppendorfrørene ble deretter plassert i en magnetholder, væsken ble avpipettert og kulene ble så vasket med RIPA vaskebuffer to ganger (vedlegg 2). RIPA vaskebuffer ble deretter tilsatt for å lage en suspensjon. Suspensjonen med Dynabeads ble oppbevart kjølig. Deretter ble kromatinfragmentene fordelt i nye eppendorfrør, for å få to

paralleller av hver cellelinje og hvert antistoff. Til immunpresipitering (IP) ble det brukt kromatin som var sonikert i 10 og 12 sykler (30 sek ON, 30 sek OFF). Sonikeringsprosedyren var på forhånd optimalisert til 12 sykler med 30 sekundersintervaller som gir DNA-fragmenter på 150 - 500 basepar.

Deretter ble det tilsatt suspensjon med Dynabeads til hver kromatinprøve. Prøvene ble inkubert med rotasjon i én time ved 4°C. Etter inkuberingen ble eppendorfrørene plassert i en magnetholder og supernatanten ble pipettert over til nye eppendorfrør. Det ble tilsatt α -Nrf2 antistoff (EP1808Y, abcam, 62352, MA, USA), α -Normal Rabbit IgG (Cell Signaling Technology, 2729, UK) og α -Histone H3 (Cell Signaling Technology, 4620, MA, USA) til hver sine paralleller. α -Normal Rabbit IgG ble benyttet som negativ kontroll. α -Histone H3 ble brukt som positiv kontroll. Antistoffene ble inkubert over natten ved inkubasjon med rotasjon ved 4°C.

Etter inkubering ble prøvene spunnet ned i en top-sentrifuge, og ytterligere suspensjon med Dynabeads ble tilsatt til hver av prøvene. Dette ble etterfulgt av inkubasjon med rotasjon ved 4°C i 150 minutter. Videre ble kulene vasket med tillaget vaskebuffer (se vedlegg 2 for tillagning). Prøvene ble igjen spunnet ned i en top-sentrifuge og plassert i en magnetholder, suspensjonen ble pipettert bort og RIPA vaskebuffer ble tilsatt til hver av prøvene. Prøvene ble inkubert med rotasjon ved 4°C i 5 minutter. Dette ble gjentatt fem ganger. Denne prosedyren ble gjennomført for en vask med henholdsvis LiCl vaskebuffer (vedlegg 3) og TE-buffer (vedlegg 4).

For å fjerne kryssbindingene, protein og RNA i prøvematerialet ble hver av prøvene resuspendert i TE-buffer og 1% RNaseA (QIAGEN, Tyskland, Cat no 19101). Prøvene ble blandet godt, og inkubert med risting ved 1200 rpm og 37°C i 30 minutter. Det ble videre tilsatt 10% SDS (Sigma-Aldrich, Tyskland) og Proteinase K (Roche, Sveits). Prøvene ble blandet godt ved bruk av vortex. Deretter ble prøvene inkubert med risting ved 1200 rpm og 55°C i én time. Temperaturen ble oppjustert til 65°C, og prøvene ble inkubert med risting over natten.

Det immunpresipiterte DNA-et ble rensert ved hjelp av QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). DNA-et ble vasket og isolert ved Buffer PB og Buffer PE fra PCR Purification kittet. Det isolerte DNA-et ble eluert i TE-buffer og rensert en siste gang, slik at det kun var igjen

isolert og rensed DNA som ble overført til PCR samme dag. Prosedyren til IP ligger vedlagt i vedlegg 5.

2.3 ChIP-PCR

PCR-forsøkene ble gjennomført 1 – 3 ganger. Det ble gjort forsøk med PCR-primere mot genene Thioredoxin reductase 1 (Txnrd1) (Sigma-Aldrich), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (Nqo1) (Sigma-Aldrich), Glutathione S-Transferase Alpha 3 (Gsta3) (Sigma-Aldrich), og Glutathione S-Transferase Alpha 4 (Gsta4) (Sigma-Aldrich) mot cellelinjene 66cl4 Nrf2 NT og 66cl4 Nrf2 KD 3B7. For Txnrd1-genet ble det benyttet to ulike primersekvenser kalt Txnrd1-P1 og Txnrd1-P2. Disse representerer to ulike bindingssteder for Nrf2. Primersekvensene er vist i vedlegg 6.

Det ble satt opp tre prøver for hver av cellelinjene. Det ble laget primer master mix for alle primersettene, se vedlegg 7. Primer master mixen bestod av sterilisert ionefritt vann, SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), og forward primer og reverse primer for de ulike målgenene. Deretter ble primer master mix fordelt i nye eppendorfrør til hver enkelt prøve. ChIP-DNA ble tilsatt. Det ble tatt ut ikke-IP kromatin for 10% input prøve. I tillegg til prøvene ble det laget tre kontroller; en kontroll uten DNA (kontamineringskontroll), en negativ kontroll presipitert med α -Normal Rabbit IgG, og en positiv kontroll presipitert med α -Histone H3. Prøvene presipitert med α -Normal Rabbit IgG, α -Histone H3 og α -Nrf2 ble laget etter samme prosedyre, se vedlegg 7. Primer master mix ble fordelt i PCR-brønner sammen med ChIP-DNA i tre paralleller. PCR-instrumentet ble innstilt etter metode vist i vedlegg 8.

Resultatene fra ChIP-PCR ble beregnet ved bruk av %input-metoden. Dette er en metode som normaliserer for kilder til variasjon i data fra ChIP-qPCR. I denne metoden blir mengden input kromatin normalisert. %input tar høyde for prøvematerialet som er tatt ut av prøven før PCR-analyse, slik at det blir justert for hva signalet ville vært dersom ikke noe prøvemateriale hadde blitt fjernet (57,58).

Beregningen av %input kan deles inn i to trinn. %input er et relativt begrep som forteller om forholdet mellom PCR-signaler fra immunpresipitert prøvemateriale og PCR-signalet fra tilhørende inputprøve (57). I trinn én beregnes justert Ct i forhold til aktuell mengde input ved å subtrahere log₂ av mengde input fra middelerdien til Ct. Videre kan %input beregnes i trinn

to. Da benyttes formel 1. For Ct (IP) benyttes Ct-verdien for aktuell prøve som %input skal beregnes for.

$$\%input = 100 \times 2^{(justert\ input - Ct(IP))} \quad (1)$$

2.4 Sekvensering

Bibliotekspreparering av ChIP-materialet og NGS ble gjennomført av kjernefasilitet GCF ved NTNU. Bioinformatikkanalysen ble gjennomført av kjernefasiliteten for bioinformatikk (BioCore). Biblioteksprepareringen ble gjennomført med QIAseq Ultralow Input Library Kit (QIAGEN) for 10 - 100 ng DNA, og selve sekvenseringen ble gjennomført på en Illumina NS500HO flowcelle ved 75 basepar for Single-End avlesninger.

For sekvenseringen ble “Illumina NextSeq systems” protokoll A for standard normalisert metode benyttet (se vedlegg 9). Denne prosedyren passer for prøvemateriale som har gjennomgått standard bibliotek kvantifikasjon og anbefalte kvalitetskontrollprosedyrer. Protokoll A vil denaturere og fortynne biblioteket. Først ble fortynning av NaOH, og HT1- og RSB-løsninger forberedt etter prosedyre (se vedlegg 9). Biblioteket ble denaturert med NaOH, og det denaturete biblioteket ble i dette forsøket fortynnet til 25 pM. Biblioteket ble så fortynnet igjen til “loading concentration” for bruk av et Output Kit. Løsningene ble så overført til reagenskassetter og sekvenseringen ble startet.

For bioinformatikkanalysen ble softwarepakken MACS2 (59) brukt. Denne softwarepakken er det mest brukte bioinformatikkanalyseverktøyet for ChIP-sek-analyser. Bioinformatikkanalysene ble gjort samlet i en pooled analyse for alle fem biologiske replikater i forsøket. Resultatene fra bioinformatikkanalysen ble illustrert i UCSC browser (60).

3.0 Resultater

3.1 ChIP-PCR viser at Nrf2 binder seg til utvalgte kjente Nrf2-bindingssteder

ChIP-prosedyren ble kontrollert ved å utføre qPCR med primere for de kjente Nrf2-målgene Txnrd1, Nqo1, Gsta3 og Gsta4.

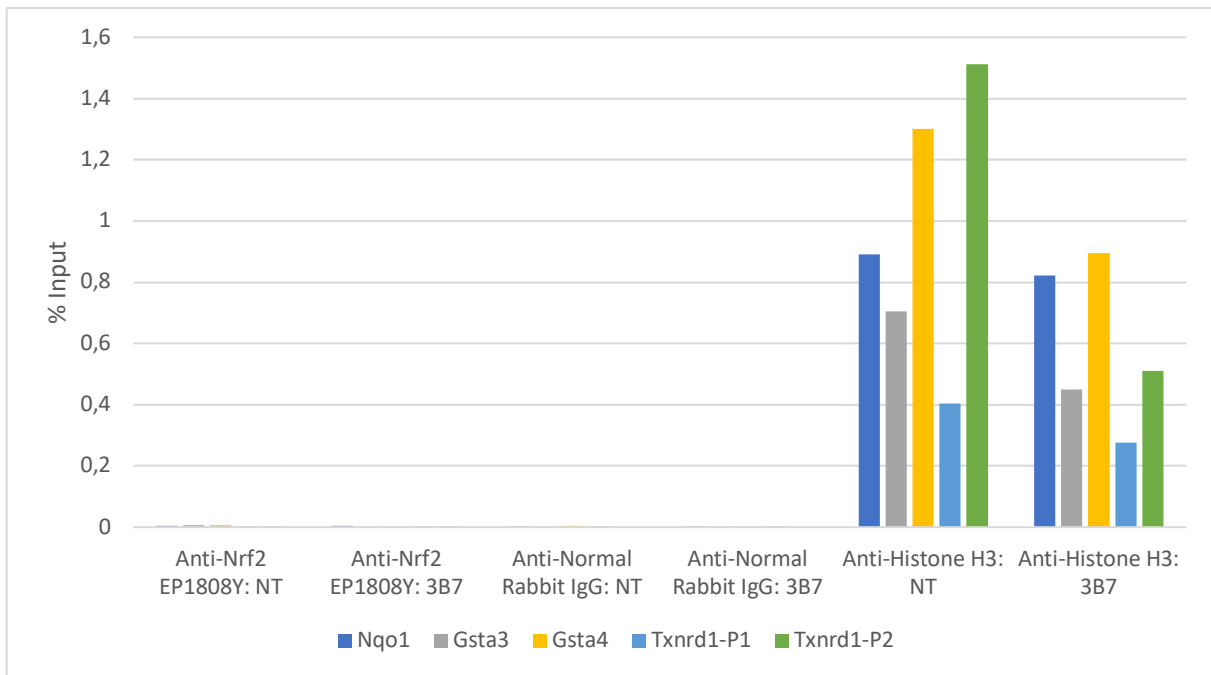
Resultatene indikerer at Nrf2 har bundet seg til målgene Txnrd1, Nqo1, Gsta3 og Gsta4 i varierende grad, i både 66cl4 Nrf2 NT- og KD-cellelinjene. Som forventet er %input for 66cl4 Nrf2 NT-cellene sterkere enn %input for 66cl4 Nrf2 KD-cellene, siden KD-cellene har fått slått ned Nrf2-transkripsjonen.

Figur 4 viser resultatene fra ChIP-PCR for DNA immunpresipitert med henholdsvis α -Nrf2, α -Normal Rabbit IgG og α -Histone H3. Figur 5 viser det samme, men uten %input for α -Histone H3. Figurene viser %input for genene fordelt på de forskjellige antistoffene. Resultatene for Nqo1 og Txnrd1 med primersett 1 (Txnrd1-P1) er representative for tre forsøk. Txnrd1 med primersett 2 (Txnrd1-P2), Gsta3 og Gsta4 er representativt for ett forsøk. %input er noe lavere for Txnrd1-genet, og høyere %input for Txnrd1-P1 indikerer at dette er en bedre primer for dette genet enn Txnrd1-P2.

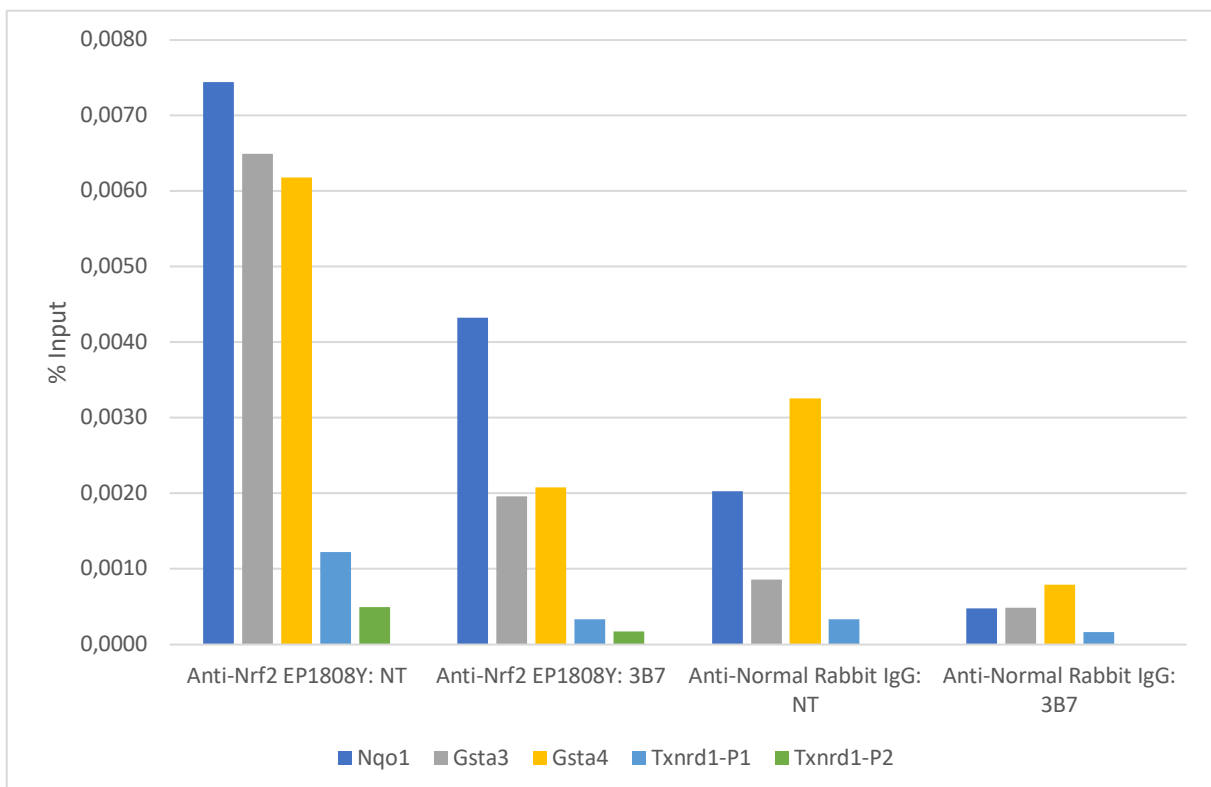
Som positiv kontroll ble det utført IP med antistoff mot histon, da det alltid er histon tilgjengelig i DNA-et. Det ble høy %input for α -Histone H3 i cellelinje 66cl4 Nrf2 NT og 66cl4 Nrf2 KD 3B7 for genene Txnrd1, Nqo1, Gsta3 og Gsta4. Det høye signalet for α -Histone H3 betyr at PCR-reaksjonen har foregått som normalt (figur 4). Det ble også benyttet en negativ kontroll med α -Normal Rabbit IgG. Signalene for denne kontrollen var lavere enn signalene for prøvene som var behandlet med α -Nrf2.

Smeltepunktet for de forskjellige genene ligger ved samme temperatur for tilhørende paralleller. Dette viser at primerne ikke binder seg uspesifikt. Eksempel på en smeltepunktsgraf for ett av primersettene ligger vedlagt (vedlegg 10). Tilsvarende smeltepunktskurve fremkom for alle primersettene.

For beregning av resultater ble %input-metoden benyttet. Eksempel på utregning ligger vedlagt i vedlegg 11. Som kjent fra kapittel 2.3 er det tatt ut 10% input fra alle prøver før IP.



Figur 4: ChIP-PCR viser høy %input for α -Histone H3 for genene *Nqo1*, *Gsta3*, *Gsta4* og *Txnrd1*. Dette indikerer at histoner er detektert i prøvematerialet for cellelinjene 66cl4 *Nrf2* Non-Target (NT) og 66cl4 *Nrf2* Knock Down (KD) 3B7. Resultatene for *Nqo1* og *Txnrd1-P1* er representativt for tre forsøk, og resultatene for *Txnrd1-P2*, *Gsta3* og *Gsta4* er representativt for ett forsøk. På grunn av høy %input av α -Histone H3, vises ikke resultatene fra IP α -*Nrf2* og IP α -Normal Rabbit IgG.

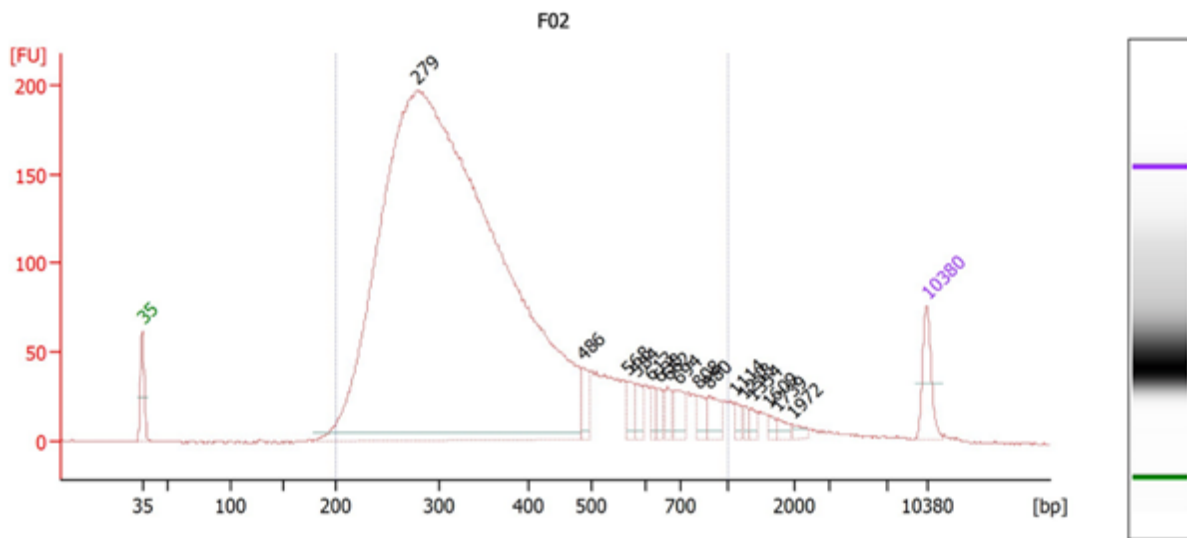


Figur 5: *Nqo1*, *Gsta3*, *Gsta4* og *Txnrd1* er målgener for *Nrf2* i cellelinjene 66cl4 *Nrf2* Non-Target (NT) og 66cl4 *Nrf2* Knock Down (KD) 3B7. Resultatet viser lavere %input i Non-Target og Knock-Down 3B7-cellelinjene med α -Normal Rabbit IgG som er benyttet som negativ kontroll, enn i de samme cellene immunpresipitert med α -*Nrf2*. Resultatene for *Nqo1* og *Txnrd1-P1* er representativt for tre forsøk, og resultatene for *Txnrd1-P2*, *Gsta3* og *Gsta4* er representativt for ett forsøk.

3.2 Resultater fra sekvensering

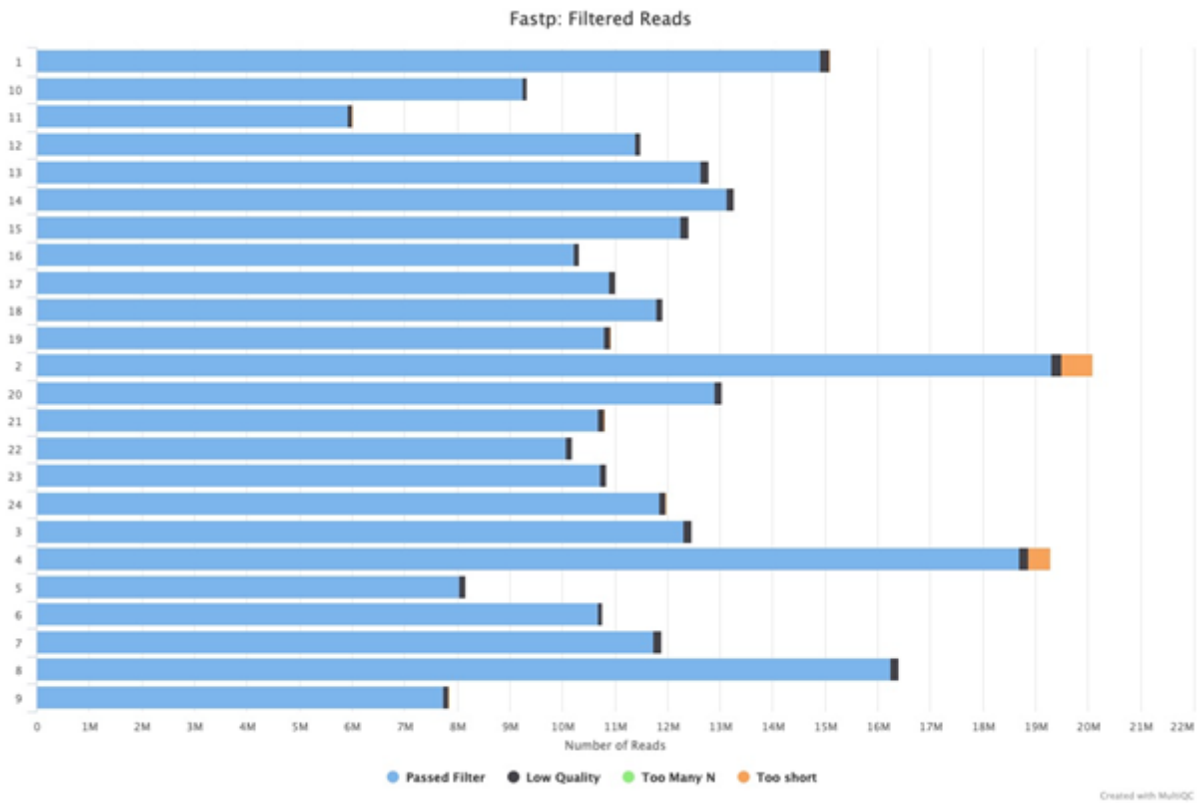
Sekvenseringen ble gjennomført av kjernefasiliteten GCF ved NTNU. Prøvematerialet som ble benyttet til sekvenseringen ble fremstilt av masterstudent Shin.

Fra biblioteksprepareringen ble det funnet at hoveddelen av DNA-fragmentene hadde en størrelse på omtrent 200 - 500 bp. Eksempel på dette vises for en prøve i figur 6. I biblioteksprepareringen blir det lagt til DNA-tagger på cirka 100 ekstra basepar. Resultatet viser at sonikeringen oppnådde ønsket fragmentlengde på 200 - 500 basepar.



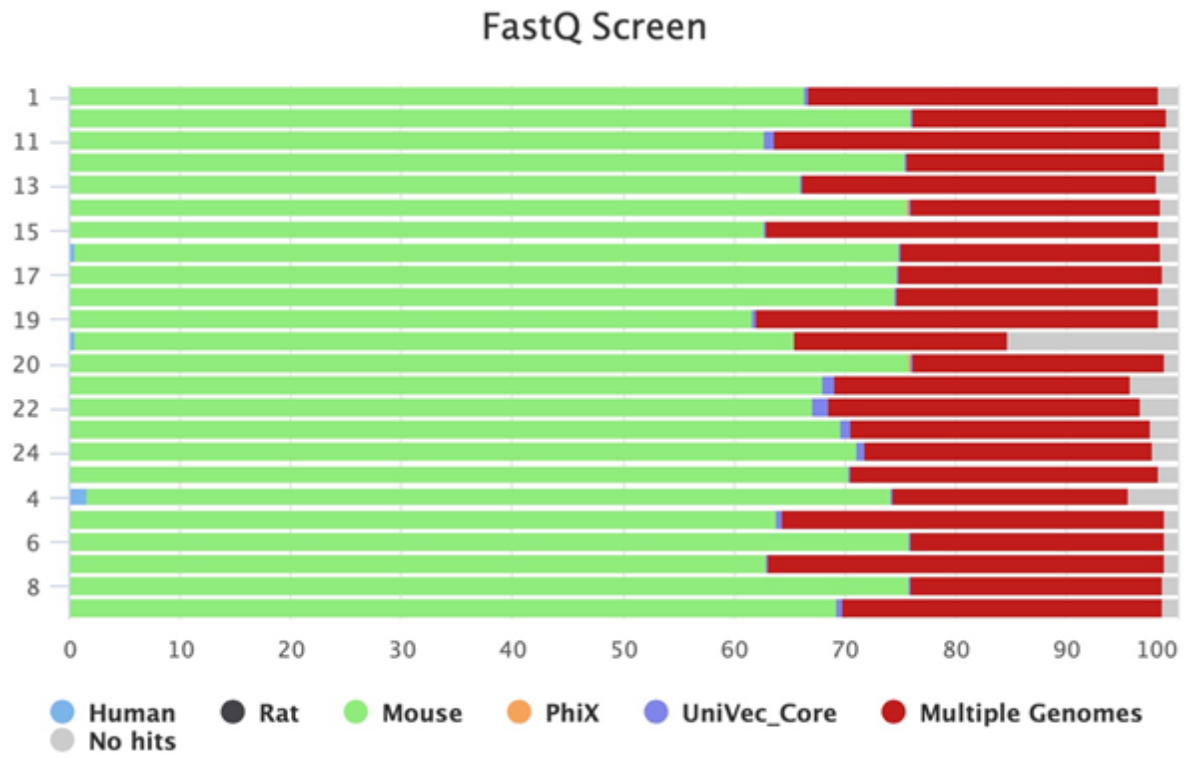
Figur 6: *Biblioteksprepareringen viser at baseparlengden til DNA-fragmentene i prøvene ligger hovedsakelig mellom 200-500 basepar. Toppene ved 35 og 10380 basepar er fra markører som er tilsatt som referanse. Figuren er representativt for samtlige prøver. Kurven til venstre er en densitetrisk fremstilling av resultatet. Figuren til høyre viser resultatet fra kapillærelektroforese. Begge figurene viser en høy tetthet av fragmenter rundt 300 basepar. Den representative prøven er replikat 5 for 66c14 Nrf2 Non-Target immunpresipitert med α -Nrf2.*

I kvalitetsrapporten fra sekvenseringen kommer det frem at det er oppnådd tilstrekkelig sekvenseringsdybde, da de fleste prøvene har 10 - 20 millioner reads. Figur 7 illustrerer dette.



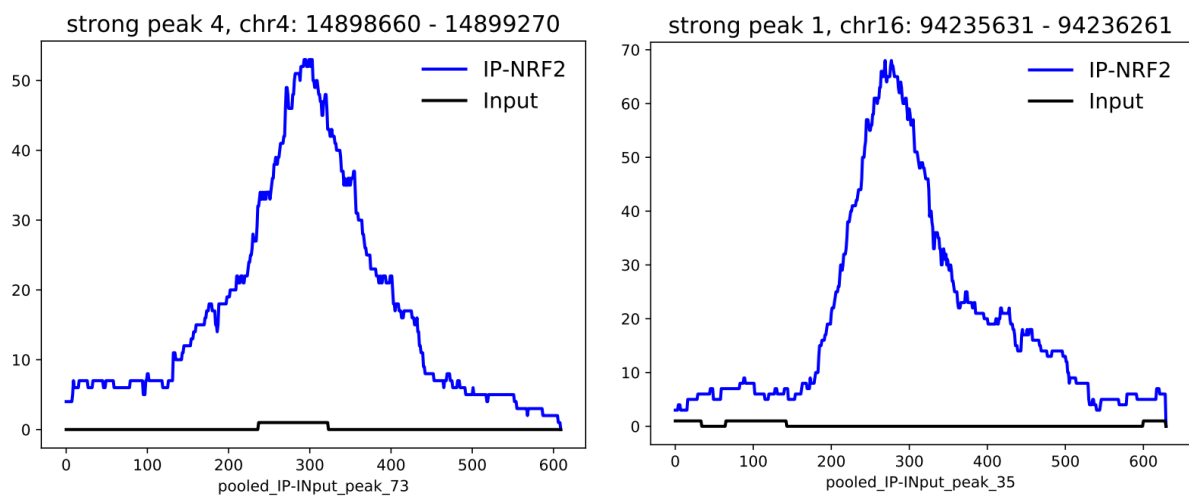
Figur 7: Kvalitetsrapporten for sekvenseringen viser at de fleste prøvene har mellom 10 og 20 millioner reads.

I tillegg er sekvenseringen kvalitetskontrollert opp mot et referansegenom for å kontrollere i hvor stor grad genomet tilsvarer mus. Resultatet viser at 65 - 70% av det sekvenserte prøvematerialet er spesifikt for mus, og resten er genmateriale som er likt for flere ulike arter. Figur 8 viser resultatet.

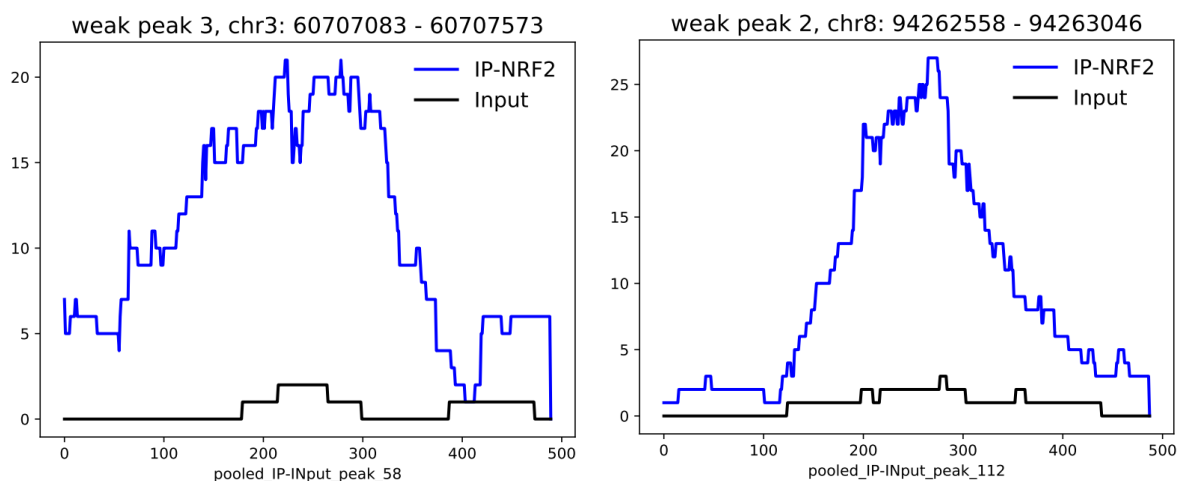


Figur 8: Kvalitetskontrollen for sekvenseringen viser at 60-75% av det sekvenserte prøvematerialet er spesifikt for mus.

Sekvenseringen for 66cl4 Nrf2 NT-cellelinjen i forhold til tilhørende inputprøver resulterte i totalt 180 steder i DNA-et der Nrf2 har bundet seg fast. Etter filtrering ble områder med kjent støy fjernet, og det var da 94 gjenværende bindingssteder. De 94 bindingssetene med kromosomplassering er presentert i vedlegg 12. To av de mest signifikante bindingssetene og minst signifikante bindingssetene for Nrf2 er illustrert i henholdsvis figur 9 og figur 10. Figurene viser signalene til IP Nrf2 mot tilhørende input. Noen av de detekterte bindingsstedene for Nrf2 er kjent fra før, mens de fleste er nye bindingssteder for Nrf2.

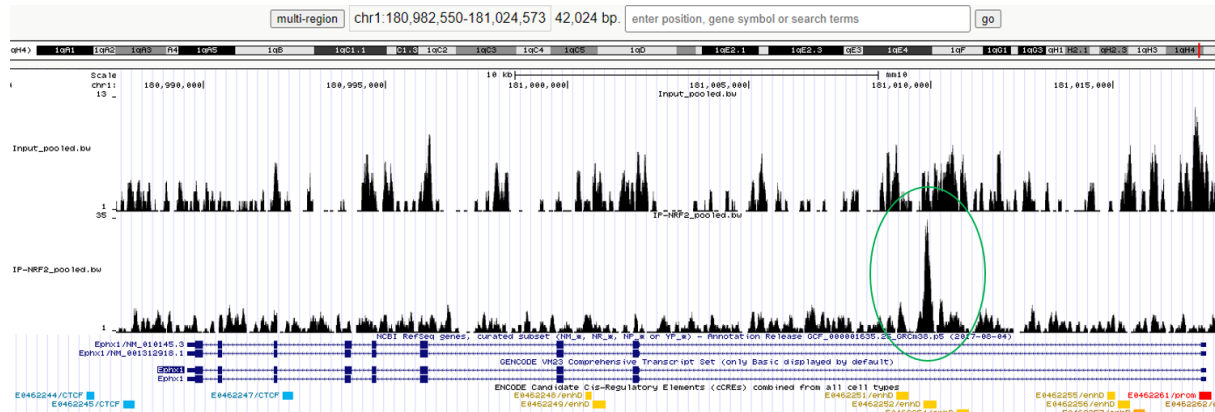


Figur 9: Sekvenseringsresultatet viser signifikante topper i kromosom 4 og kromosom 16. Disse to toppene er valgt ut som representative topper med høy signifikans. X-aksen er antall basepar og Y-aksen er signalstyrke.



Figur 10: Sekvenseringsresultatet viser mindre signifikante topper i kromosom 3 og kromosom 8. Disse to toppene er valgt ut som representative topper med mindre signifikans. X-aksen er antall basepar og Y-aksen er signalstyrke.

Av 10 kjente Nrf2-bindende gener (61) ble tre gjenfunnet som signifikante. Disse genene er Epoxide hydrolase 1 (Ephx1), Glutation S-transferase Mu 1 (Gstm1) (bundet i intron), og Heme oxygenase 1 (Hmox1) (bundet i enhancer). Figur 11 viser at Nrf2 har bundet seg i intron for Ephx1. I tillegg ble funnet et signifikant bindingssted for genet Slc48a1 (62). Nqo1 ble ikke funnet som signifikant, mens Gsta3 og Gsta4 ikke ga noen sekvenseringsresultater.



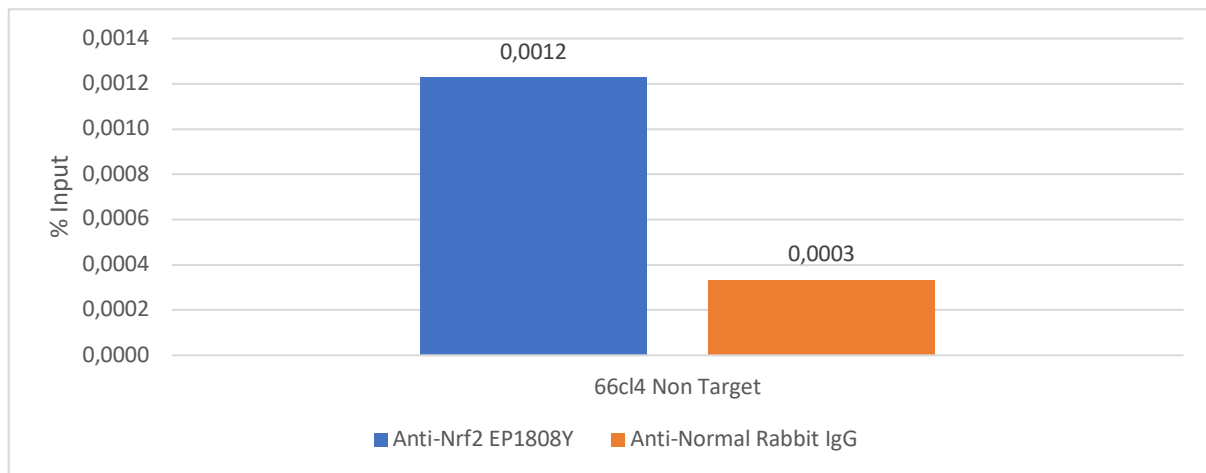
Figur 11: Sekvenseringsresultatet viser en signifikant topp med signalstyrke 35 for bindingssetet til Nrf2 i Ephx1-genet i 66cl4 Nrf2 NT-cellelinjen. Bindingssetet, merket med grønn sirkel, befinner seg i et intron. Toppene øverst i bildet representerer input-prøven, mens toppene nederst i bildet representerer DNA immunpresipitert med antistoff mot Nrf2. De gule boksene illustrerer kjente enhancer-regioner. Analyse av sekvenseringsdataene representerer data for fem biologiske replikater. Figuren er et utdrag fra UCSC Genome browser. Toppene illustrerer genomet, mens de horisontale strekene illustrerer genet.

Tilsvarende bioinformatikkanalyse av sekvenseringsresultatene for 66cl4 Nrf2 KD 3B7 resulterte i kun en signifikant topp. Sekvensering av 66cl4 Nrf2 KD 3B7-cellelinjen ga lavere resultater for Nrf2 enn 66cl4 Nrf2 NT-cellelinjen.

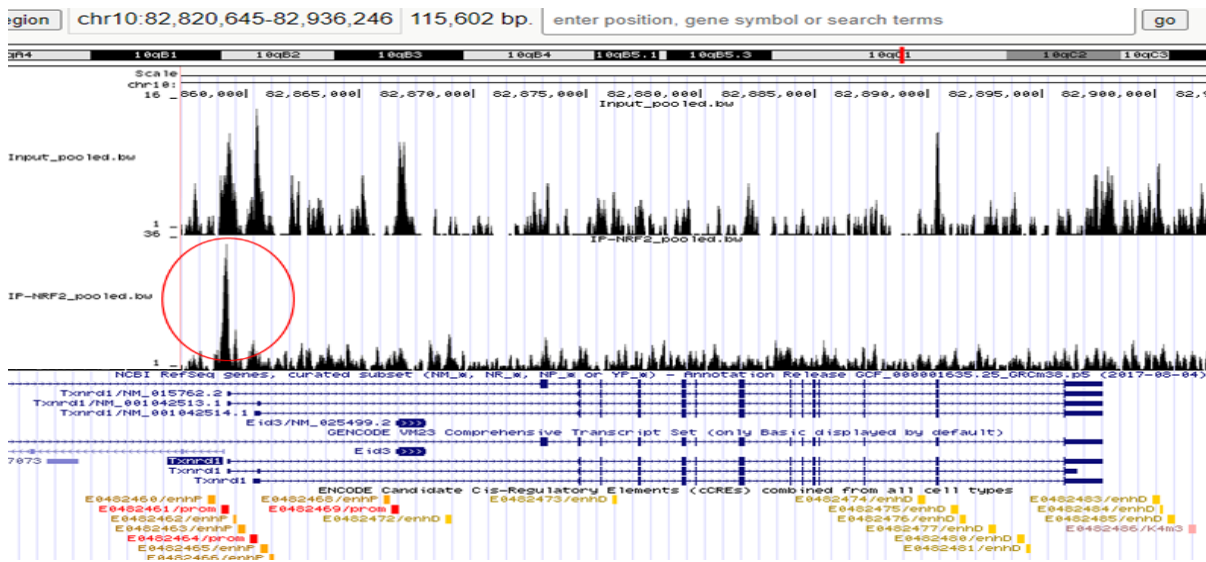
3.3 ChIP-PCR viser at Txnrd1, Nqo1, Gsta3 og Gsta4 er målgener for Nrf2, men ChIP-sekvensering viser lav til ingen signifikans for 66cl4 Nrf2 NT-cellelinjene

Det er kjent at Txnrd1 har et bindingssete for Nrf2. ChIP-PCR viser at det har bundet seg mer DNA immunpresipitert med antistoff mot Nrf2 til Txnrd1 enn DNA immunpresipitert med antistoff mot Normal Rabbit IgG. Dette resultatet er representativt for tre forsøk. I ChIP-PCR ble Txnrd1 beregnet til å ha en %input på 0,0012 på 66cl4 Nrf2 NT-cellelinje for α -Nrf2. Sekvenseringsresultatet viser en topp i promotorregionen for Txnrd1-genet. Denne toppen har oppnådd signalstyrke 36 i sekvenseringen. Toppen er i følge bioinformatikkanalysene ikke signifikant, men ser allikevel ut til å være en reell topp. Figur 12 illustrerer disse resultatene.

12A)



12B)

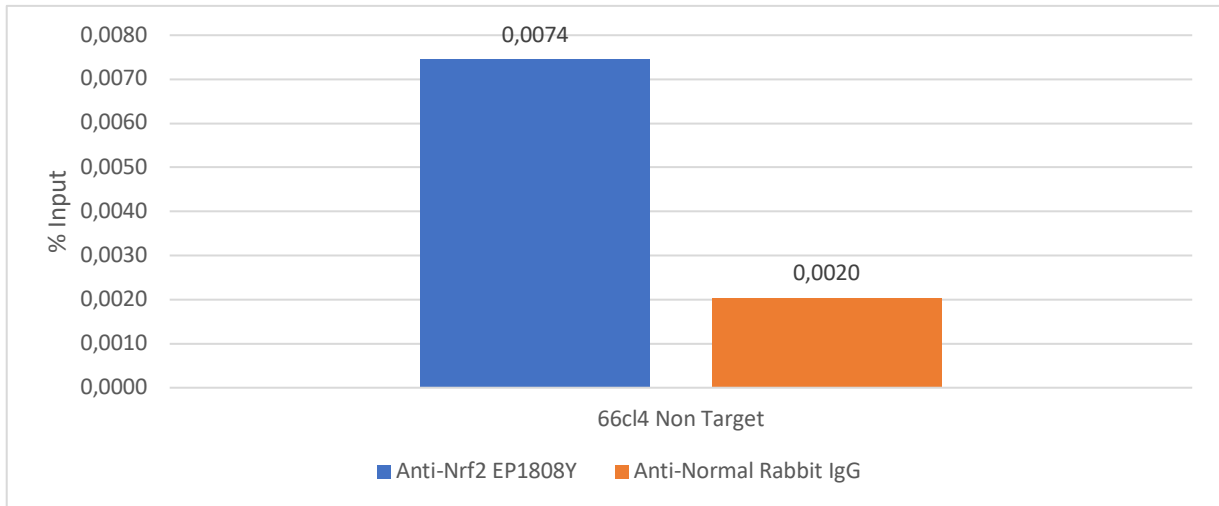


Figur 12: *Txnrd1* er et målgen for Nrf2 i cellelinje 66cl4 Nrf2 Non-Target (NT). Det er en signifikant topp med signalstyrke 36 for bindingssettet til Nrf2 i *Txnrd1*-genet i 66cl4 Nrf2 NT-cellelinjen. A: Resultatet viser høyere %input i 66cl4 Nrf2 Non-Target cellene med α -Nrf2, enn med α -Normal Rabbit IgG (negativ kontroll). Fra ChIP-PCR er %input beregnet til 0,0012 på 66cl4 Nrf2 NT immunpresipitert med α -Nrf2. Resultatene for *Txnrd1* er representativt for tre forsøk. B: Bindingssettet, merket med rød sirkel, befinner seg i promotoren. Toppene øverst i bildet representerer input-prøven, mens toppene nederst i bildet representerer DNA immunpresipitert med antistoff mot Nrf2 (merk ulik høyde for Y-askene). De gule boksene illustrerer kjente enhancer-regioner. Analyse av sekvenseringsdataene representerer data for fem biologiske replikater. Figuren er et utdrag fra UCSC Genome browser. Toppene illustrerer genomet, mens de horisontale strekene illustrerer genet.

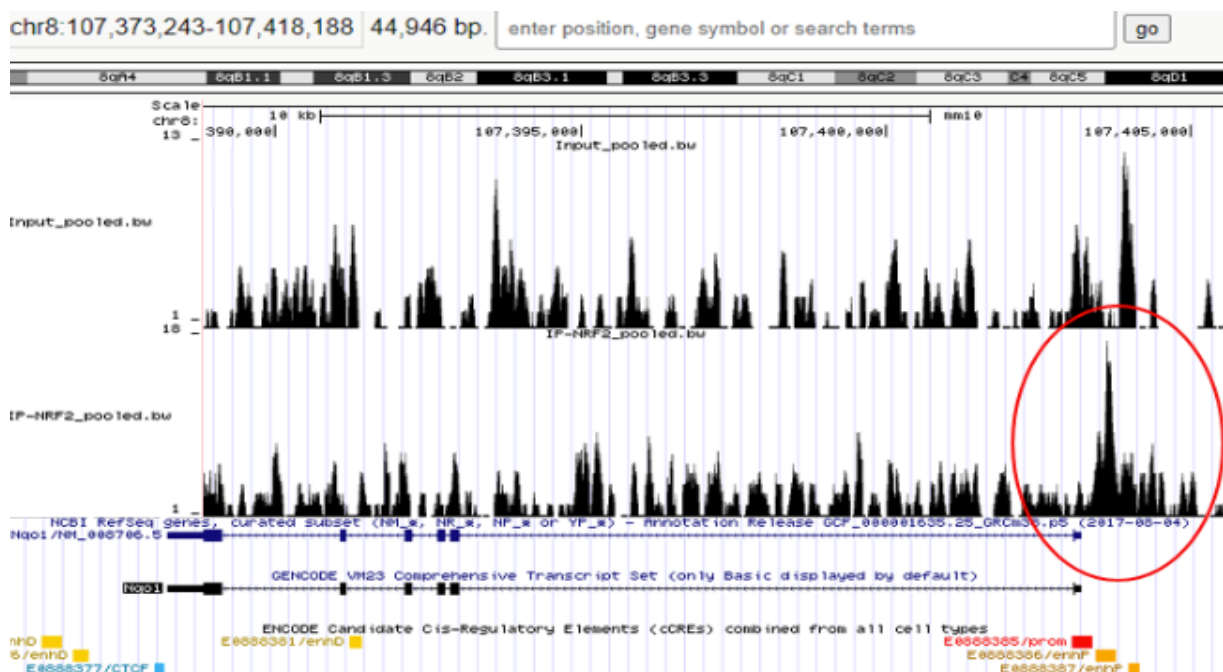
Som nevnt tidligere er Nqo1 også et kjent bindingssete for Nrf2. ChIP-PCR viser at det har bundet seg mer DNA immunpresipitert med antistoff mot Nrf2 til Nqo1 enn DNA immunpresipitert med antistoff mot Normal Rabbit IgG. Dette resultatet er representativt for tre forsøk. I ChIP-PCR ble Nqo1 beregnet til å ha en %input på 0,0074 på 66cl4 Nrf2 NT-cellelinje for α -Nrf2. Sekvenseringsresultatet viser en topp i promotorregionen for Nqo1-genet. Denne toppen har oppnådd signalstyrke 18 i sekvenseringen. Toppen er i følge

bioinformatikkanalysene ikke signifikant, men ser allikevel ut til å være en reell topp. Figur 13 illustrerer disse resultatene.

13A)



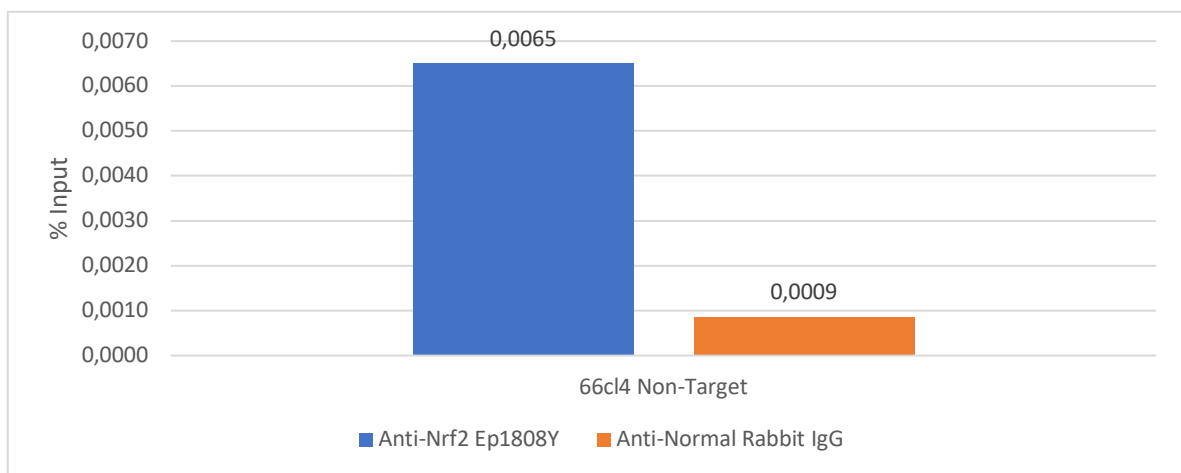
13B)



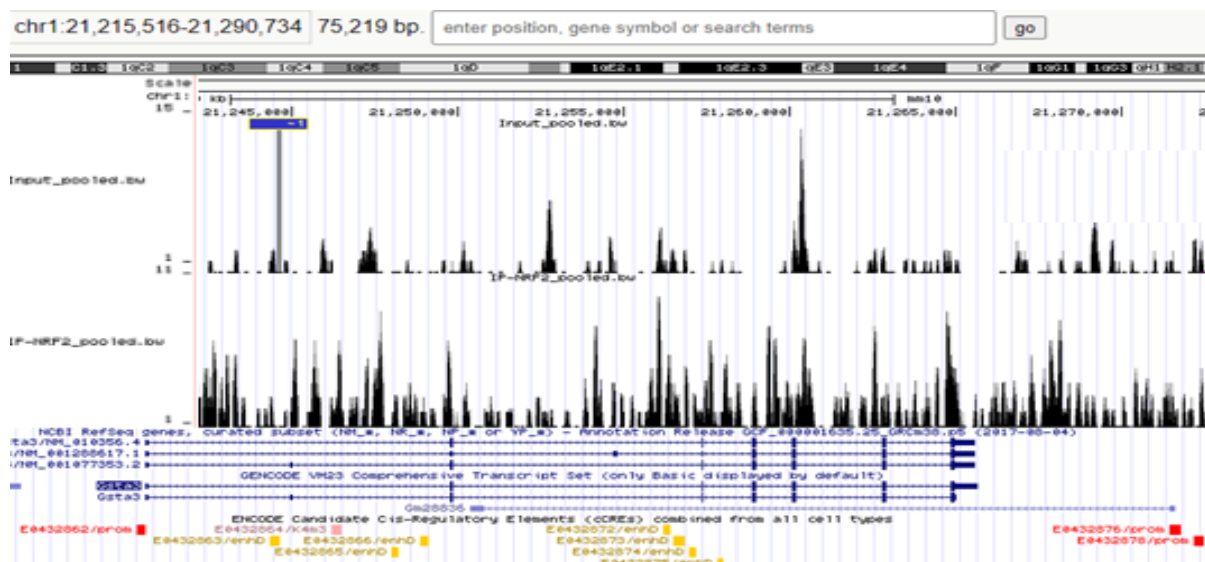
Figur 13: *Nqo1* er målgen for *Nrf2* i cellelinje 66cl4 *Nrf2* Non-Target (NT). A: Resultatet fra ChIP-PCR viser høyere %input i prøvemateriale fra 66cl4 *Nrf2* NT immunpresipitert med α -*Nrf2*, enn i tilsvarende prøvemateriale immunpresipitert med α -Normal Rabbit IgG (negativ kontroll). Fra ChIP-PCR er prosent input beregnet til 0,0074 på 66cl4 *Nrf2* NT immunpresipitert med α -*Nrf2*. Resultatene for *Nqo1* er representativt for tre forsøk. B: Sekvenseringsresultatet viser en topp i promotorregionen for *Nqo1*-genet i 66cl4 *Nrf2* NT. Bindingssetet, merket med rød sirkel, befinner seg i promotoren. Denne toppen ble ikke funnet å være signifikant. Toppene øverst i bildet representerer input-prøven, mens toppene nederst i bildet representerer DNA immunpresipitert med antistoff mot *Nrf2* (merk ulik høyde for Y-askene). De gule boksene illustrerer kjente enhancer-regioner. Analyse av sekvenseringsdataene representerer data for fem biologiske replikater. Figuren er et utdrag fra UCSC Genome browser. Toppene illustrerer genomet, mens de horisontale strekene illustrerer genet.

Gsta3 har også et kjent bindingssete for Nrf2. ChIP-PCR viser at det har bundet seg mer DNA immunpresipitert med antistoff mot Nrf2 til Gsta3 enn DNA immunpresipitert med antistoff mot Normal Rabbit IgG. Dette resultatet er representativt for ett forsøk. I ChIP-PCR ble Gsta3 beregnet til å ha en %input på 0,0065 på 66cl4 Nrf2 NT-cellelinje for α -Nrf2. Sekvenseringen av Gsta3 har ikke oppnådd signalstyrke som er høyere enn bakgrunnsstøyen, og er derfor ikke signifikant. Dette resultatet er illustrert i Figur 14.

14A)



14B)

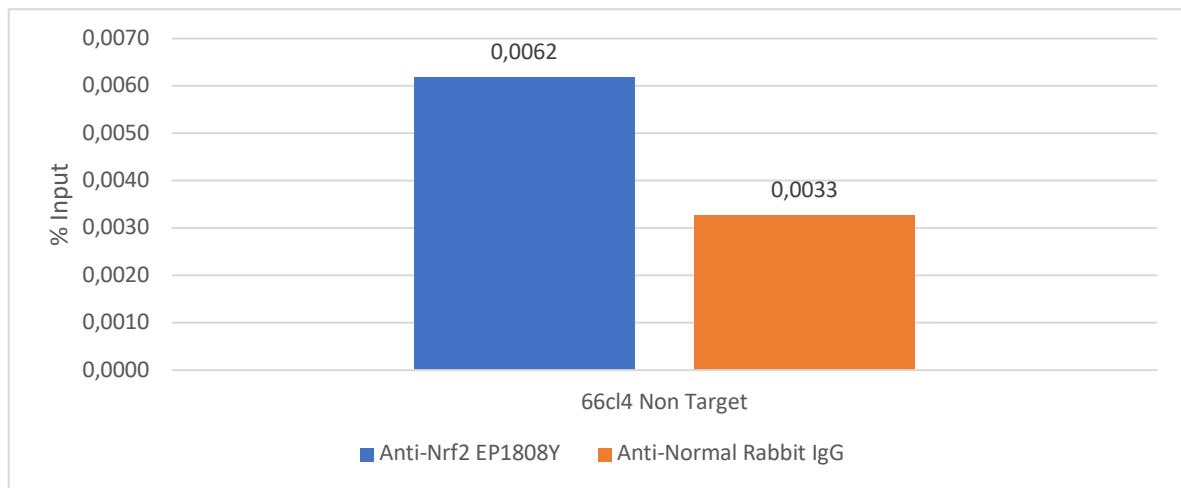


Figur 14: *Gsta3* er et målgen for Nrf2 i cellelinje 66cl4 Nrf2 Non-Target (NT). Det er ingen signifikante toppe for bindingssetet til Nrf2 i *Gsta3*-genet i 66cl4 Nrf2 NT-cellelinje. A: Resultatet viser høyere %input i prøvemateriale fra 66cl4 Nrf2 NT immunpresipitert med α -Nrf2, enn i tilsvarende prøvemateriale immunpresipitert med α -Normal Rabbit IgG (negativ kontroll). Fra ChIP-PCR er %input beregnet til 0,0065 på 66cl4 Nrf2 NT-cellelinje for anti-Nrf2. Resultatet for *Gsta3* er representative for ett forsøk. B: Sekvenseringsresultatet viser ingen signaler som er høyere enn bakgrunnsstøyen, og er derfor ikke signifikant for *Gsta3*-genet i 66cl4 Nrf2 NT. Toppene øverst i bildet representerer input-prøven, mens toppene nederst i bildet representerer DNA immunpresipitert med antistoff mot Nrf2. Merk ulike høyde for Y-aksene. De gule boksene illustrerer

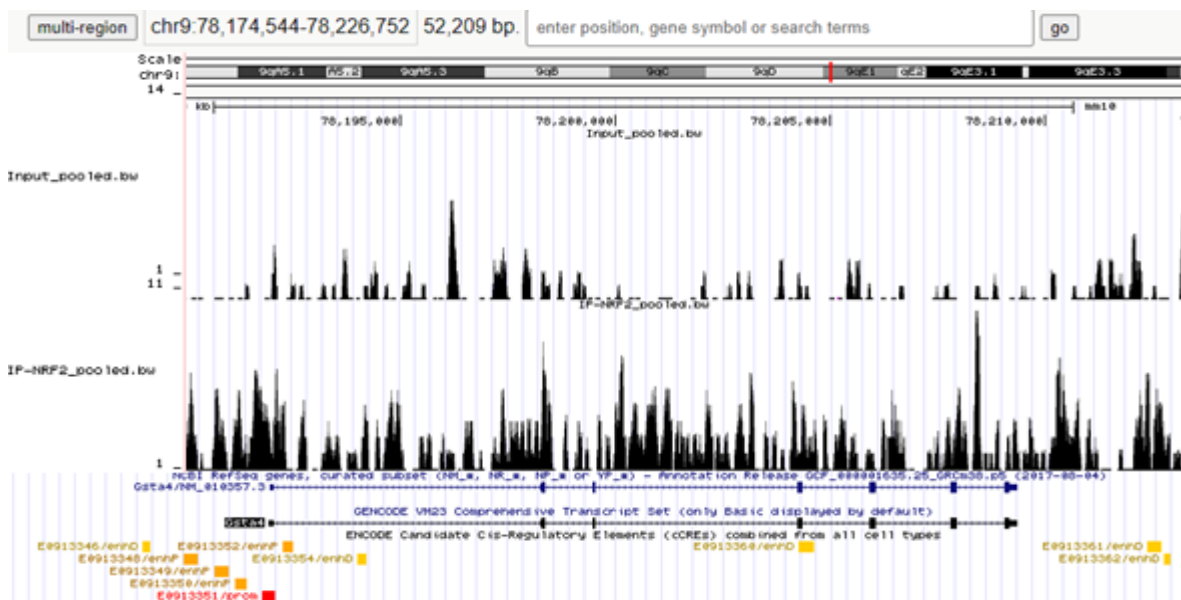
kjente enhancer-regioner. Analyse av sekvenseringsdataene representerer data for fem biologiske replikater. Figuren er et utdrag fra UCSC Genome browser. Plasseringen i genomet vises øverst i figuren, og illustrasjon av genet vises nederst.

Fra litteraturen er det også funnet at Gsta4 har et kjent bindingssete for Nrf2. ChIP-PCR viser at det har bundet seg mer DNA immunpresipitert med antistoff mot Nrf2 til Gsta4 enn DNA immunpresipitert med antistoff mot Normal Rabbit IgG, som forventet. Dette resultatet er representativt for ett forsøk. I ChIP-PCR ble Gsta4 beregnet til å ha en %input på 0,0062 på 66c14 Nrf2 NT-cellelinje for α -Nrf2. Sekvenseringen av Gsta4 har ikke oppnådd signalstyrke som er høyere enn bakgrunnsstøyen og er derfor ikke signifikant. Disse resultatene er vist i Figur 15.

15A)



15B)



Figur 15: *Gsta4* er et målgen for Nrf2 i cellelinje 66cl4 Nrf2 Non-Target (NT). Det er ingen signifikante toppler for bindingssetet til Nrf2 i *Gsta4*-genet i 66cl4 Nrf2 NT-cellelinje. A: Resultatet viser høyere %input i prøvemateriale fra 66cl4 Nrf2 NT immunpresipitert med α -Nrf2, enn i tilsvarende prøvemateriale immunpresipitert med α -Normal Rabbit IgG (negativ kontroll). Fra ChIP-PCR er %input beregnet til 0,0065 på 66cl4 Nrf2 NT-cellelinje for α -Nrf2. Resultatet for *Gsta4* er representative for ett forsøk. B: Sekvenseringsresultatet viser ingen signaler som er høyere enn bakgrunnsstøyen, og er derfor ikke signifikant for *Gsta4*-genet i 66cl4 Nrf2 NT. Toppene øverst i bildet representerer input-prøven, mens toppene nederst i bildet representerer DNA immunpresipitert med antistoff mot Nrf2. Merk ulik høyde for Y-aksene. De gule boksene illustrerer kjente enhancer-regioner. Analyse av sekvenseringsdataene representerer data for fem biologiske replikater. Figuren er et utdrag fra UCSC Genome browser. Plasseringen i genomet vises øverst i figuren, og illustrasjon av genet vises nederst.

4.0 Diskusjon

4.1 Kjente målgener for Nrf2

Som vist i sekvenseringsresultatene og vedlegg 12 ble det funnet 94 bindingssteder for Nrf2 i 66cl4 Nrf2 NT-cellelinjen. Mastergradsstudent Shin har foreløpig funnet ut at 36 av de 94 genene er forankret i litteraturen som kjente bindingssteder for Nrf2 i andre vev. Blant disse er det bindingssteder for Nrf2 i genene *Hmox1*, *Ephx1* og *Gstm1* (61,63–67). Dette er en indikasjon på at forsøket har oppnådd pålitelige resultater, fordi disse målgenene for Nrf2 allerede er kjent i litteraturen.

Sekvensering av 66cl4 Nrf2 KD 3B7-cellene ga bare ett bindingssete for Nrf2. Dette er som forventet da Nrf2 er undertrykt i 66cl4 Nrf2 KD 3B7-cellene. Dette tilsvarer resultatet fra ChIP-PCR, hvor 66cl4 Nrf2 NT-cellene generelt ga høyere %input enn 66cl4 Nrf2 KD 3B7-cellene for de testede genene.

Ephx1 er kjent å bli regulert av Nrf2 og koder for et enzym som konverterer sykliske etere (epoksider) til trans-dihydrodioler (36,68). Dette gjør at *Ephx1* detoksifiserer kjemikalier med lav molekylvekt som benzen. *Hmox1* koder normalt for et kataboliseringsenzym som spalter heme til biliverdin (36). *Gstm1* er viktig i bekjempelsen av fremmede bakterier ved å katalysere nukleofiler i cellen (69). Det at disse kjente målgenene for Nrf2 blir detektert som signifikante i vår sekvenseringsanalyse viser at ChIP-sek analysen har vært vellykket. Vi kan dermed stole på at de nye bindingsstedene for Nrf2 som har fremkommet av denne studien er relle bindingssteder.

Txnrd1 er et kjent Nrf2-regulert gen som koder for et antioksidantenzym. Dette genet er dermed viktig i reguleringen av cellulær redokshomeostase (36,70,71). Resultatene fra ChIP-PCR viser at *Txnrd1* er et målgen for Nrf2. Det sterke utslaget i sekvenseringsanalysen for *Txnrd1* kan vurderes som et reelt bindingssete for Nrf2 på grunn av en tydelig topp i promotorregionen, selv om sekvenseringsprogramvaren ikke gjør det. Bioinformatikkanalysen har i dette tilfellet filtrert ut *Txnrd1* som et ikke-signifikant målgen, på tross av det sterke signalet. Årsaken til dette er trolig forårsaket av en for streng signifikansgrense ved bioinformatikkanalysene. Bindingssetet for Nrf2 ligger i promotorregionen for genet, noe som også styrker antakelsen om at sekvenseringsresultatet for *Txnrd1* kan anses som signifikant.

I ChIP-PCR ble det benyttet to ulike primersett for Txnrd1. Dette representerer to ulike bindingssteder for Nrf2. Txnrd1-P1 ble vurdert som det beste primersettet fordi det har betydelig høyere %input enn Txnrd1-P2. Denne forskjellen kan komme av at sekvensen for Txnrd1-P1 er mer tilgjengelig i Txnrd1-genet enn sekvensen til Txnrd1-P2. I sekvenseringen oppnådde Txnrd1 signalstyrke 35 og observeres som en tydelig topp. Siden vi har fått et reelt bindingssete i ChIP-sekvenseringen, og et reelt signal fra ChIP-PCR, betyr dette at det er overenstemmelse mellom resultatene.

Nqo1 er et kjent målgen for Nrf2 som katalyserer reduksjonen og detoksifiseringen av reaktive kinoner som kan forårsake oksidativt stress på cellene (36). Resultatet fra tre forsøk med ChIP-PCR viste at Nrf2 også binder seg til Nqo1, og sekvenseringsresultatet viser at bindingssetet ligger i promotorregionen. Nqo1 har fått en høy %input for 66cl4 Nrf2 NT og 66cl4 Nrf2 KD 3B7-cellelinjene. Allikevel har bioinformatikkverktøyet MACS2 vurdert resultatet som ikke signifikant. Dette er sannsynligvis fordi signifikansgrensen er satt for høyt. Det er også en relativt høy støytopp på input-linjen rett ved regionen for bindingssetet for Nrf2. Dette er muligens grunnen til at MACS2 tolker toppen som ikke signifikant. Toppen kan likevel ansees som reell siden den ligger i promotorregionen for Nqo1.

Resultatet for forsøket med ChIP-PCR viste også at Nrf2 binder seg til Gsta3 og Gsta4. Gsta3 og Gsta4 er begge alfa-glutation s-transferaser. Fra ChIP-PCR får man omtrent samme %input hos Gsta3 som Gsta4. Til forskjell fra Nqo1 og Txnrd1 er ikke Gsta3 og Gsta4 representative for mer enn ett ChIP-PCR forsøk, slik at man ikke kan si sikkert om de er sikre målgen for Nrf2. De initiale forsøkene viser derimot at de gir gode og forventede svar. Sekvensering og påfallende bioinformatikkanalyser ga ingen signifikante resultater for Gsta3 og Gsta4. Til forskjell fra Txnrd1 og Nqo1 var det ikke mulig å skille eventuelle reelle topper fra nærliggende støytopper.

Selv om Gsta3 og Gsta4 er kjente målgener for Nrf2, er det ikke sikkert at disse genene blir uttrykt i brystkreftvev. Dette kan som nevnt tidligere skyldes at disse genene er pakket bort i brystkreftcellene på grunn av forskjellig metylering av histoner, og vil dermed ikke transkriberes (72–74). En annen mekanisme er cellenes celledifferensiering, der den enkelte cellen og dens datterceller “husker” sitt genuttrykksmønster etter celledifferensiering (72). Dersom brystkreftcellenes hukommelse tilsier at Gsta3 og Gsta4 ikke er viktige deler av cellens

“jeg”, skal ikke cellene ha disse genene uttrykt. Dette kan være årsakene til at sekvenserings- og bioinformatikkanalysene ikke ga noen signifikante resultater.

Flere av bindingsstedene som ble funnet signifikante ligger i promotorregionen til gener, slik som *Txnrd1* og *Nqo1*. Andre gener kan ligge i enhancerregioner oppstrøms for genet. Bioinformatikken viste at *Ephx1* var et av de mest signifikante resultatene fra analysen, der bindingssetet til *Nrf2* derimot ble funnet i et intron. Det har i flere forskningsprosjekter blitt funnet at bindingsseter for transkripsjonsfaktorer også kan ligge i intron (75,76). Problemet med å ha bindingssete i intronet er at man ikke kan være sikker på om bindingssetet regulerer transkripsjon av *Ephx1* eller et annet gen. Det ble på forhånd ikke gjennomført ChIP-PCR mot dette genet for å kontrollere ChIP-materialet. Derfor vil det være interessant å gjennomføre en ChIP-PCR for *Ephx1*-målgenet for å se hvilke utslag dette genet får i forhold til målgenene som opprinnelig ble valgt ut til å gjennomføre ChIP-PCR.

4.2 Metodologiske betraktninger

For å få et godt resultat fra ChIP-sekvensering er det viktig at ChIP-prosedyren fungerer optimalt. Kritiske trinn i prosedyren omfatter blant annet fiksering, sonikering og hvilke antistoffer som benyttes ved immunpresipitering. ChIP er en DNA-isoleringsmetode som er svært anvendbar til flere forskjellige typer forsøk og eksperimenter. Bindingen av antistoff og antistoffets kvalitet er trolig det viktigste trinnet i ChIP (53).

Kryssbinding og lysering fra ChIP har foregått som ønsket ved at PCR-resultatene viser at antistoff har bundet seg til de ulike målgenene. Dersom kryssbindingen eller lyseringen ikke hadde blitt gjennomført tilstrekkelig, ville ikke antistoff ha bundet seg, og man ville ikke fått de signalene man forventer fra PCR. Kryssbinding i dette forsøket er som kjent gjort med formaldehyd. Optimaliseringsforsøk av ChIP viser at 10 minutter med formaldehyd er tilstrekkelig for å oppnå god kryssbinding (77), men inkubering med formaldehyd varierer stort sett fra forsøk til forsøk (53). Kryssbinding gjennomført av Shin har brukt samme betingelser som anbefalt av Kus-Liśkiewicz (77).

Den største faren ved bruk av formaldehyd i kryssbinding er overfiksering. Dette kan føre til at det ikke er mulig å få det immunpresiperte materialet som er interessant. Årsaken til dette er ikke kjent (53). Det er mulig at forlenget kryssbinding kan maskere histonepitoper, fordi

binding til nukleosomassosierte proteiner favoriseres (53). På denne måten vil det ikke lengre være mulighet til å binde til ønskede epitoper. Formaldehyd kan også denaturere epitoper av interesse (78). For lang inkubering av prøvematerialet kan føre til permanent kryssbinding (77). Permanent kryssbinding vil også gjøre det vanskeligere å fragmentere DNA-et ved sonikering, og opptil 90% av startmaterialet kan gå tapt (53).

Et problem ved bruk av formaldehyd er at det kan dannes indirekte bindinger mellom protein og DNA. I tillegg kan proteiner brettes ut og antigenbindingssteder kan på den måten gå tapt. Dessuten er formaldehyd karsinogent og må brukes med forsiktighet. Dette er blant grunnene til at andre stoffer og metoder nå undersøkes for bruk i mer spesifikke tilfeller der det skal brukes kryssbinding.

Bruk av UV-lys eller laser er en alternativ måte å lage protein-DNA, protein-RNA og protein-protein kryssbindinger på (53,79,80). Forsøk viser at å bruke laser på 266 nm med en frekvens på 1 KHz i 60 femtosekunders pulser gir god kryssbinding av proteiner til DNA i humane cellekjerner (79). Disse parameterene gir ikke protein-protein kryssbinding som bidrar til støy. I motsetning til formaldehyd vil lys tillate bruk av lipaser, nukleaser og proteaser som alternative klippemetoder for sonikering, fordi lys vil i mindre grad skape kjemiske strukturforandringer på samme måte som kjemiske fikseringsmetoder. Fiksering med lys er også en raskere metode, med 80 minutter for UV-lys og 15 minutter med laser (79). En stor svakhet med bruk av UV-lys for å kryssbinde protein til DNA er at UV-lyset kan ødelegge DNA-et dersom det blir brukt med feil intensitet (53). Celis et al. (1976) fant at bølgelengder på under 2950 Ångström ga hindret kryssbinding i vevet. Selv om Lejnine et al. (79) ikke fant bevis på at lasermetoden deres hadde gitt skade eller endret integriteten på DNA-et eller proteinene var dette et kjent problem.

I biblioteksprepareringen kan man observere at sonikeringen av DNA-fragmentene har blitt gjennomført som ønsket ved at flertallet av baseparene ligger innenfor 200 - 500 nukleotider lange fragmenter. For å finne plasseringen til en ønsket DNA-sekvens, er det viktig å fragmentere DNA-et slik at det blir ca. 100 - 500 bp langt (53). Det er viktig å oppnå denne lengden for å ha mulighet til å isolere genområdet av interesse, slik at det kan finnes igjen i et genomkart (53).

Kjente faktorer som påvirker sonikering inkluderer prøvevolum, dybden på sonikeringsproben, sonikeringsstyrke og varigheten av sonikeringen (81). Prøvevolumet ved sonikering burde ikke overstige 1,0 mL (53). En svakhet dersom det blir benyttet SDS i løsninger av små volum, er at SDS har en tendens til å bidra til skumdannelse. Skum vil hindre effektiv sonikering. Det har blitt utprøvd flere ulike metoder for å motvirke dette, som blant annet å plassere proben på minst 1,0 cm dybde, lagre prøvematerialet på is, og å tilsette glasskuler i prøvematerialet (82). Orlando et al. (82) poengterer derimot at optimalisering av sonikering ikke er kritisk, såfremt materialet skal brukes til å vise binding av et protein til et bestemt sted ved screening.

Industristandarden for PCR-produkter er 50 - 150 bp lange fragmenter (83). Det er viktig at fragmentene etter sonikering er lengre enn PCR-produktet man vil frem til, slik at primerne kan feste seg. Selv om de fleste produsenter av reagenser og verktøy for PCR oppgir at amplikonstørrelse vil være av betydning for amplifikasjonseffekten ved qPCR, er det usikkert om dette er blitt vist ved forsøk (83). Det kan derimot bli argumentert for at lengden på amplikonene vil påvirke deteksjonstid, ved at store fragmenter med mange basepar ga høyere deteksjonstid (83).

Fragmentstørrelse på immunpresipitert DNA har også implikasjoner til sekvenseringsanalysene. Ved bibliotekspreparering blir IP-DNA i lengdeområdet 150 - 300 bp selektert (49). Det er viktig å legge til at Illumina-instrumentene ser ut til å ha bias ved å selektere de kortere fragmentene i biblioteksprepareringen (49,84). I andre forsøk blir det indikert at DNA-fragmenter på om lag 200 bp legger til rette for høyest oppløsning på ChIP-sek data (85). Lengre fragmenter på over 500 bp ser ut til å gi lavere oppløsning på materialet fra sekvenseringsanalysen (84).

I samtlige av artiklene som er studert for denne rapporten blir det oppgitt at det er ønskelig å fragmentere DNA til ChIP til lengder på mellom 100 - 800 bp (49,52,53,61,63,82,86). Omfattende litteratursøk viser imidlertid ingen umiddelbare svar på hvorfor denne baseparlengden er optimal. Søk på diskusjonsforum på ResearchGate så ut til å henvise i riktig retning av Encode-prosjektet og artikkelen fra Landt et al. (87). Landt et al. forteller kun at man ønsker DNA-fragmenter rundt 100 - 300 bp for ChIP-analyser. Referansene (88,89) brukt for dette oppgir ingen årsak til hvorfor 100 - 300 bp skulle være det mest fornuftige valget for optimalisert ChIP-analyse.

Som vist tidligere i diskusjon og i resultat kan det konkluderes med at antistoffene α -Nrf2, α -Normal Rabbit IgG og α -Histone H3 som ble brukt i ChIP-PCR har vært relativt gode og spesifikke for analysen. Valget av antistoff er uansett en av de aller mest kritiske trinnene i en ChIP-analyse, nettopp fordi resultatet er avhengig av et antistoff som har klart å binde seg til ønskede DNA-fragmenter (53).

Antistoffet som skal brukes til ChIP må være spesifikt for proteinet som forsøket er ute etter å finne, og det burde ha høy affinitet til antigenet (90). Polyklonale antistoffer er å foretrekke over monoklonale antistoffer, fordi dette kan motvirke eventuell epitopmaskering som følge av fiksering og kryssbinding (78,82). Ved gjennomføring av selve immunpresipiteringen skal det ifølge Orlando et al. (82) være tilstrekkelig å tilsette 0,2 - 1 μ g antistoff per 0,5 mL alikvot med 30 - 60 μ g DNA. Overskudd av antistoffer i løsningen vil gi et høyere DNA-utbytte, men vil også gi mindre spesifikk antistoffbinding (82). Dette betyr at det ikke nødvendigvis vil være fordelaktig å ha antistoffene i overskudd i IP. I tillegg ser det ut som at bruk av magnetiske kuler, som for eksempel Dynabeads, reduserer bakgrunnsstøy mye bedre enn Sepharose (82). Dersom Sepharose blir benyttet må prosedyren inkludere flere vasketrinn for å fjerne bakgrunnsstøy, som igjen gjør metoden sårbar for å miste bundet materiale.

En svakhet ved vanlig ChIP er at metoden er avhengig av antistoffer som er av god nok kvalitet til å tilstrekkelig binde seg til et målprotein, samtidig som det må kunne tåle vanskelige bindings- og vaskeforhold. Biotin-(strept)avidinbindingen er en av de sterkeste ikke-kovalente interaksjonene vi kjenner til, og kan benyttes til å styrke antistoff-antigen bindingen ved ChIP-analyser (86). Den største fordelen med å bruke et slikt system er at signal-til-støy ratioen blir større, og at ko-binding med biotin-avidin gjør systemet mer robust mot vask (86). Denne typen system kan derimot kun brukes dersom forsøket kun er ute etter signal som sier noe om binding, og ikke dersom forsøket er ute etter å vite mengden som bindes (53).

De ulike kvalitetskontrollene som er inkludert i forsøket viser at immunpresipiteringen har gått som ønsket. Dette bekreftes både i PCR-resultatet og sekvenseringsresultatet. Dersom primerne ikke hadde vært spesifikke ville man fått flere smeltepunktstopper i smeltepunktanalysen fra qPCR, og man kunne oppnå lavere prosentandel av spesifikt murint materiale fra kvalitetskontrollen i sekvenseringen. Kvalitetskontrollrapporten fra biblioteksprepareringen

viser også at det har blitt laget sikkert nok prøvemateriale slik at man har oppnådd en sekvenseringsdybde på 10 - 20 millioner reads, som var ønskelig. Man kan dermed være sikker på resultatet fra sekvenseringen (91). I tillegg var det satt en høy signifikansgrense for å filtrere ut ikke-signifikante resultater fra analysen. I den forrige delen av diskusjonskapittelet ble det bemerket at signifikansgrensene kanskje var for høye, slik at MACS2-programmet ikke oppdaget eller anerkjente resultater som faktisk var reelle.

For å kontrollere kvaliteten til prøvematerialet er det viktig å benytte kvalitetskontroller i alle ledd. Ulike kontroller kan benyttes for å utelukke ulike artefakter. De som brukes til dette formålet er stort sett input DNA (prøve med ikke-IP DNA), mock IP (IP-materiale uten antistoffer) og ikke-spesifikk IP (bruk av antistoffer mot annen art) (49). Av de tre alternativene er input DNA mest brukt. Input DNA korrigerer for bias relatert til amplifisering eller DNA-fragmentering. Denne kontrollen har blitt brukt i denne oppgaven for å kunne beregne %input etter gjennomført ChIP-PCR. %input brukes også til normalisering ved analyser av resultatene fra ChIP-sek. Det har i dette prosjektet blitt benyttet α -Normal Rabbit IgG som ikke-spesifikk IP til å kontrollere mot uspesifikk binding i ChIP-PCR-oppsettet, da dette antistoffet ikke skal binde seg til dette prøvematerialet. Det er også fornuftig å bruke en positiv kontroll, som vil binde seg til områder som normalt finnes i DNA-et som undersøkes. α -Histone H3 er ofte brukt som positiv kontroll, da det vil binde seg til nukleosomer som finnes i alle celler (82,92). Den positive kontrollen bekrefter dermed tilstedeværelse av DNA i prøvematerialet. Resultatene til positive og negative kontroller i ChIP-PCR bekrefter at ChIP-prosedyren har foregått som forventet, og at det er akseptabelt å bruke IP-materialet i videre analyser.

5.0 Konklusjon

Ved ChIP-sek ble det funnet 94 bindingssteder for Nrf2 i cellelinje 66cl4. Noen av disse er kjent fra før. Binding av Nrf2 til de kjente Nrf2-målgenene Txnrd1 og Nqo1 er verifisert ved hjelp av ChIP-PCR. Dette betyr at man i større grad kan stole på at resultatene fra sekvenseringen stemmer, og at de foreløpig ukjente målgenene som ble funnet transkriberes av Nrf2.

5.1 Videre arbeid

Forskningsgruppen til Bjørkøy har tidligere gjennomført RNA-sek på de samme cellene som har blitt brukt til ChIP-PCR og ChIP-sek. Resultatene fra denne analysen viser at 39 gener er nedregulert i 66cl4 KD Nrf2 3B7 i forhold til 66cl4 Nrf2 NT. Nå som resultatene fra ChIP-sek er ferdig er det naturlig å sammenlikne RNA-sek resultatene med ChIP-sek resultatene for å finne likheter og ulikheter, samt vurdere potensielt nye målgener.

I tillegg kan det være interessant å gjennomføre en bioinformatikkanalyse fra den samlede (pooled) analysen med mindre streng signifikansgrense. På denne måten vil man forvente å få flere signifikante topper, og spesielt at Txnrd1 blir vurdert som et signifikant målgen for Nrf2.

Utvalgte Nrf2-målgener fra ChIP-sek bør verifiseres ved hjelp av ChIP-PCR, ettersom tiden ikke tillot dette for bachelorprosjektet. Aktuelle gener kan blant annet være Ephx1 og Hmox, slik at man med større sikkerhet kan stole på resultatene fra ChIP-sek. Senere vil det være aktuelt å gjøre nytt litteratursøk for å finne ut hvilke målgener som er interessante, og designe primere for disse.

6.0 Referanser

1. Larsen IK, Møller B, Johannesen T, Robsahm T, Grimsrud T, Larønningen S, mfl. Cancer in Norway 2019. Oslo: Cancer Registry of Norway;
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* november 2018;68(6):394–424.
3. Apostolou P, Fostira F. Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. *BioMed Res Int.* 2013;2013:1–11.
4. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res [Internett].* 2. oktober 2017 [sitert 22. mars 2021];50. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5625777/>
5. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol.* desember 2016;59(4):651–72.
6. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ.* 9. september 2000;321(7261):624–8.
7. Sand O, Sjaastad ØV, Haug E, Bjålie JG. Menneskekroppen. Fysiologi og anatomi. I: *Menneskekroppen Fysiologi og anatomi.* 3. utg. Gyldendal; 2018. s. 69, 622–3.
8. Alkabban FM, Ferguson T. Breast Cancer. I: *StatPearls [Internett].* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [sitert 24. mars 2021]. Tilgjengelig på: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482286/>
9. Kosir MA. Breast Cancer - Gynecology and Obstetrics [Internett]. *Merck Manuals Professional Edition.* [sitert 24. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.merckmanuals.com/professional/gynecology-and-obstetrics/breast-disorders/breast-cancer?query=Breast%20Cancer>
10. Brystkreft [Internett]. 2019 [sitert 24. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.helsenorge.no/sykdom/kreft/brystkreft/>
11. Rahman SA, Al-Marzouki A, Otim M, Khalil Khayat NEH, Yousuf R, Rahman P. Awareness about Breast Cancer and Breast Self-Examination among Female Students at the University of Sharjah: A Cross-Sectional Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 1. juni 2019;20(6):1901–8.
12. Scully OJ, Bay B-H, Yip G, Yu Y. Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics.* oktober 2012;9(5):311–20.
13. Chaffer CL, Weinberg RA. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science.* 25. mars

- 2011;331(6024):1559–64.
14. diSibio G, French SW. Metastatic Patterns of Cancers: Results From a Large Autopsy Study. *Arch Pathol Lab Med*. 1. juni 2008;132(6):931–9.
 15. Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. desember 2002;420(6915):520–62.
 16. Why use the mouse in research? [Internett]. yourgenome. [sitert 8. april 2021]. Tilgjengelig på: /facts/why-use-the-mouse-in-research
 17. Gómez-Cuadrado L, Tracey N, Ma R, Qian B, Brunton VG. Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis Model Mech*. 1. september 2017;10(9):1061–74.
 18. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res BCR*. 2011;13(4):215.
 19. Serpa J. Tumor microenvironment: the main driver of metabolic adaptation [Internett]. Cham: Springer; 2020 [sitert 27. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=6129280>
 20. Arneth B. Tumor Microenvironment. *Medicina (Mex)* [Internett]. 30. desember 2019 [sitert 8. april 2021];56(1). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7023392/>
 21. Yoon NK, Maresh EL, Shen D, Elshimali Y, Apple S, Horvath S, mfl. Higher Levels of GATA3 Predict Better Survival in Women with Breast Cancer. *Hum Pathol*. 1. desember 2010;41(12):1794–801.
 22. Heppner GH, Miller BE. Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences. *CANCER METASTASIS Rev*. 1983;2(1):5–23.
 23. Alberts B, Hopkin K, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K, mfl. *Essential cell biology. I: Essential cell biology*. 5. utg. W. W. Norton & Company; 2019. s. 286–7, 341–3, 355–7, 718–29.
 24. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*. januar 2010;1805(1):105.
 25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. mars 2011;144(5):646–74.
 26. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. februar 2018;15(2):81–94.
 27. Heppner GH. Tumor Heterogeneity. *Am Assoc Cancer Res*. juni 1984;44(6):2259–65.

28. Schrörs B, Boegel S, Albrecht C, Bukur T, Bukur V, Holtsträter C, mfl. Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Front Oncol.* 23. juli 2020;10:1195.
29. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 15. mars 1992;52(6):1399–405.
30. Dexter DL, Kowalski HM, Blazar BA, Fligiel Z, Vogel R, Heppner GH. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* oktober 1978;38(10):3174–81.
31. Wolowczyk C, Neckmann U, Aure MR, Hall M, Johannessen B, Zhao S, mfl. A breast cancer specific NRF2 driven oxidative stress response that predicts aggressive development. Upublisert.
32. Wolowczyk CI. Novel pathways to metastasis of breast cancer. [Trondheim]: Norwegian University of Science and Technology; 2020.
33. Lee I-T, Luo S-F, Lee C-W, Wang S-W, Lin C-C, Chang C-C, mfl. Overexpression of HO-1 Protects against TNF- α -Mediated Airway Inflammation by Down-Regulation of TNFR1-Dependent Oxidative Stress. *Am J Pathol.* august 2009;175(2):519–32.
34. Gebel S, Diehl S, Pype J, Friedrichs B, Weiler H, Schüller J, mfl. The Transcriptome of Nrf2^{-/-} Mice Provides Evidence for Impaired Cell Cycle Progression in the Development of Cigarette Smoke-Induced Emphysematous Changes. *Toxicol Sci.* mai 2010;115(1):238–52.
35. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11. oktober 1994;91(21):9926–30.
36. Wu S, Lu H, Bai Y. Nrf2 in cancers: A double-edged sword. *Cancer Med.* mai 2019;8(5):2252–67.
37. Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, mfl. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun.* september 2016;7(1):11624.
38. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, mfl. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* april 2018;Volume 13:757–72.
39. Chandrasekaran A, Idelchik M del PS, Melendez JA. Redox control of senescence and

- age-related disease. *Redox Biol.* april 2017;11:91–102.
40. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, mfl. Nrf2 Redirects Glucose and Glutamine into Anabolic Pathways in Metabolic Reprogramming. *Cancer Cell.* juli 2012;22(1):66–79.
 41. Lee S, Lim M-J, Kim M-H, Yu C-H, Yun Y-S, Ahn J, mfl. An effective strategy for increasing the radiosensitivity of Human lung Cancer cells by blocking Nrf2-dependent antioxidant responses. *Free Radic Biol Med.* august 2012;53(4):807–16.
 42. Cho J-M, Manandhar S, Lee H-R, Park H-M, Kwak M-K. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: Implication to cancer cell resistance. *Cancer Lett.* februar 2008;260(1–2):96–108.
 43. Faraonio R, Vergara P, Di Marzo D, Pierantoni MG, Napolitano M, Russo T, mfl. p53 Suppresses the Nrf2-dependent Transcription of Antioxidant Response Genes. *J Biol Chem.* desember 2006;281(52):39776–84.
 44. Enomoto A. High Sensitivity of Nrf2 Knockout Mice to Acetaminophen Hepatotoxicity Associated with Decreased Expression of ARE-Regulated Drug Metabolizing Enzymes and Antioxidant Genes. *Toxicol Sci.* 1. januar 2001;59(1):169–77.
 45. Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer* [Internett]. 19. juli 2012 [siteret 8. april 2021];12(8). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3836441/>
 46. Tascioglu Aliyev A, Panieri E, Stepanić V, Gurer-Orhan H, Saso L. Involvement of NRF2 in Breast Cancer and Possible Therapeutical Role of Polyphenols and Melatonin. *Molecules.* januar 2021;26(7):1853.
 47. Kitamura H, Motohashi H. NRF2 addiction in cancer cells. *Cancer Sci.* april 2018;109(4):900–11.
 48. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* januar 2009;10(1):57–63.
 49. Park PJ. ChIP-Seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet.* oktober 2009;10(10):669–80.
 50. Farnham P. Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nat Rev Genet.* september 2009;10(9):605–16.
 51. Mundade R, Ozer HG, Wei H, Prabhu L, Lu T. Role of ChIP-seq in the discovery of transcription factor binding sites, differential gene regulation mechanism, epigenetic marks and beyond. *Cell Cycle.* 30. oktober 2014;13(18):2847–52.

52. Schmidt D, Wilson MD, Spyrou C, Brown GD, Hadfield J, Odom DT. ChIP-seq: using high-throughput sequencing to discover protein-DNA interactions. *Methods San Diego Calif.* juli 2009;48(3):240–8.
53. Das PM, Ramachandran K, vanWert J, Singal R. Chromatin immunoprecipitation assay. *BioTechniques.* desember 2004;37(6):961–9.
54. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child - Educ Pract Ed.* desember 2013;98(6):236–8.
55. Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics. I: Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics. 8. utg. Elsevier; 2019. s. 938–55.
56. Real-Time PCR: Understanding Ct [Internett]. [sitert 19. mars 2021]. Tilgjengelig på: [//www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html](http://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html)
57. ChIP Analysis - NO [Internett]. [sitert 12. april 2021]. Tilgjengelig på: [//www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/epigenetics-noncoding-rna-research/chromatin-remodeling/chromatin-immunoprecipitation-chip/chip-analysis.html](http://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/epigenetics-noncoding-rna-research/chromatin-remodeling/chromatin-immunoprecipitation-chip/chip-analysis.html)
58. Lacazette E. A laboratory practical illustrating the use of the ChIP-qPCR method in a robust model: Estrogen receptor alpha immunoprecipitation using MCF-7 culture cells. *Biochem Mol Biol Educ.* 2017;45(2):152–60.
59. Thomas R, Thomas S, Holloway AK, Pollard KS. Features that define the best ChIP-seq peak calling algorithms. *Brief Bioinform.* mai 2017;18(3):441–50.
60. UCSC Genome Browser Home [Internett]. [sitert 15. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://genome-euro.ucsc.edu/index.html>
61. Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, Srivastava S, Arenillas D, Happel C, mfl. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.* september 2010;38(17):5718–34.
62. Campbell MR, Karaca M, Adamski KN, Chorley BN, Wang X, Bell DA. Novel Hematopoietic Target Genes in the NRF2-Mediated Transcriptional Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:1–12.
63. Chorley BN, Campbell MR, Wang X, Karaca M, Sambandan D, Bangura F, mfl. Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X

- receptor alpha. *Nucleic Acids Res.* august 2012;40(15):7416–29.
64. Almeida M, Soares M, Ramalhinho AC, Moutinho JF, Breitenfeld L. Prognosis of hormone-dependent breast cancer seems to be influenced by KEAP1, NRF2 and GSTM1 genetic polymorphisms. *Mol Biol Rep.* juni 2019;46(3):3213–24.
 65. Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A. The story so far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol-Ren Physiol.* mars 2004;286(3):F425–41.
 66. Jarmi T, Agarwal A. Heme oxygenase and renal disease. *Curr Hypertens Rep.* februar 2009;11(1):56–62.
 67. Cheng H, Huang C, Tang G, Qiu H, Gao L, Zhang W, mfl. Emerging role of EPHX1 in chemoresistance of acute myeloid leukemia by regurlating drug-metabolizing enzymes and apoptotic signaling. *Mol Carcinog.* mai 2019;58(5):808–19.
 68. Lu AY, Thomas PE, Ryan D, Jerina DM, Levin W. Purification of human liver microsomal epoxide hydrase. Differences in the properties of the human and rat enzymes. *J Biol Chem.* august 1979;254(13):5878–81.
 69. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 22. september 2005;45(1):51–88.
 70. Nguyen P, Awwad RT, Smart DDK, Spitz DR, Gius D. Thioredoxin reductase as a novel molecular target for cancer therapy. *Cancer Lett.* mai 2006;236(2):164–74.
 71. Fu B, Meng W, Zeng X, Zhao H, Liu W, Zhang T. TXNRD1 Is an Unfavorable Prognostic Factor for Patients with Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Res Int.* 2017;2017:1–8.
 72. Alberts B, Hopkin K, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K, mfl. *Essential cell biology. Fifth edition / Bruce Alberts, Karen Hopkin, Alexander D. Johnson, David Morgan, Martin Raff, Keith Robert, Peter Walter.; International student edition.* New York, London: WWNorton & Company; 2019.
 73. Kulis M, Esteller M. DNA Methylation and Cancer. I: Advances in Genetics [Internett]. Elsevier; 2010 [sitert 11. mai 2021]. s. 27–56. Tilgjengelig på: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123808660600022>
 74. Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Res.* 15. juni 2016;76(12):3446–50.
 75. Stratigopoulos G, Padilla S, LeDuc CA, Watson E, Hattersley AT, McCarthy MI, mfl. Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. *Am J Physiol Regul Integr*

- Comp Physiol. april 2008;294(4):R1185–96.
76. Stratigopoulos G, LeDuc CA, Cremona ML, Chung WK, Leibel RL. Cut-like Homeobox 1 (CUX1) Regulates Expression of the Fat Mass and Obesity-associated and Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator-interacting Protein-1-like (RPGRIP1L) Genes and Coordinates Leptin Receptor Signaling. *J Biol Chem*. 21. januar 2011;286(3):2155–70.
 77. Kus-Liśkiewicz M. ChIP — Does it work correctly? The optimization steps of chromatin immunoprecipitation. *Acta Biol Hung*. desember 2016;67(4):373–8.
 78. Orlando V. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci*. mars 2000;25(3):99–104.
 79. Lejnine S, Durfee G, Murnane M, Kapteyn HC, Makarov VL, Langmore JP. Crosslinking of proteins to DNA in human nuclei using a 60 femtosecond 266 nm laser. *Nucleic Acids Res*. 15. september 1999;27(18):3676–84.
 80. Celis JE, Fink M, Kaltoft K. On the use of ultraviolet light to study protein-DNA crosslinking. *Nucleic Acids Res*. 1. april 1976;3(4):1065–72.
 81. Spencer V. Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods*. september 2003;31(1):67–75.
 82. Orlando V, Strutt H, Paro R. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods San Diego Calif*. februar 1997;11(2):205–14.
 83. Debode F, Marien A, Gérard A, Francis F, Fumière O, Berben G. Development of real-time PCR tests for the detection of *Tenebrio molitor* in food and feed. *Food Addit Contam Part A*. 3. august 2017;34(8):1421–6.
 84. Tan G, Opitz L, Schlapbach R, Rehrauer H. Long fragments achieve lower base quality in Illumina paired-end sequencing. *Sci Rep*. desember 2019;9(1):2856.
 85. Diaz R, Sanchez A, LE BERRE V, Bouet J. High-Resolution Chromatin Immunoprecipitation: ChIP-Sequencing. *Methods Mol Biol*. juli 2018;61–73.
 86. Viens A, Mechold U, Lehrmann H, Harel-Bellan A, Ogryzko V. Use of protein biotinylation in vivo for chromatin immunoprecipitation. *Anal Biochem*. februar 2004;325(1):68–76.
 87. Landt SG, Marinov GK, Kundaje A, Kheradpour P, Pauli F, Batzoglou S, mfl. ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome Res*. september 2012;22(9):1813–31.
 88. Ren B, Robert F, Wyrick JJ. Genome-Wide Location and Function of DNA Binding

- Proteins. *Science*. 22. desember 2000;290(5500):2306–9.
89. Iyer VR, Horak CE, Scafe CS, Botstein D, Snyder M, Brown PO. Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature*. januar 2001;409(6819):533–8.
 90. Overview of Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) [Internett]. *Cell Signaling Technology*. [sitert 14. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.cellsignal.com/applications/chip-and-chip-seq/regulation-expression-in-cell-and-tissue>
 91. Sequencing Coverage for NGS Experiments [Internett]. [sitert 11. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/coverage.html>
 92. A Step-by-Step Guide to Successful Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assays [Internett]. 2021 [sitert 16. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Step-by-Step-Guide-to-Successful-ChIP-Assays.pdf>
 93. Diagram illustration the principles of Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-sequencing). [Internett]. 2021 [sitter 14. April 2021]. Tilgjengelig på: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chromatin_immunoprecipitation_sequencing.svg.

7.0 Vedlegg

Innholdsfortegnelse

Vedlegg 1: Crosslink 66cl4 Nrf2 KD 3B7, NT cells

Vedlegg 2: Tillaging av RIPA og Complete

Vedlegg 3: Tillaging av LiCl

Vedlegg 4: Tillaging av TE-buffer

Vedlegg 5: IP after cross-linked and sonicated 66cl4 cells

Vedlegg 6: PCR-primere

Vedlegg 7: Prosedyre til PCR primer master mix

Vedlegg 8: PCR-innstillinger

Vedlegg 9: Prosedyre for bibliotekspreparering

Vedlegg 10: Eksempel på smeltepunktsgraf for Nqo1

Vedlegg 11: Beregningseksempel for prosent input

Vedlegg 12: Pooled IP input peaks

Vedlegg 1: Crosslink 66c14 Nrf2 KD 3B7, NT cells

Material required

- 66c14 Nrf2 KD 3B7, NT cells
- Formaldehyde
- Glycine (125 mM)
- Bioruptor Pico
- 1.5 ml Bioruptor Microtubes for chromatin shearing
- Chilled centrifuge at 4°C
- Heat block (37°C and 55°C)
- Incubator at 65°C

Enzymes and buffers required

Protease inhibitor cocktail (complete)

50X stock

Stored at -20°C

PBS/EDTA (complete)

1 mM EDTA

PBS

1X complete

RIPA/Glycine buffer (complete)

10 mM Tris pH 8.0

1 mM EDTA

140 mM NaCl

1% Triton X-100

0.1% SDS

0.1 % Na-Deoxycholate

125 mM glycine

1X complete

RNaseA (Qiagen Cat no 19101)

The enzyme has been boiled to get rid of DNases

[10 mg/ml]

Stored at room temp

Proteinase K (Roche 03115828001)

[20.6 mg/ml]

Stored at +4°C

RipA buffer (cold)

10 mM Tris pH 8.0

1 mM EDTA

140 mM NaCl

1% Triton X-100

0.1% SDS

0.1% Na-Deoxycholate

1X complete

TE buffer (cold)

10 mM Tris-HCl pH 8.0

1 mM EDTA

Plate cells

*Below applies for each cell line separately

- Use four 90% confluent (exponentially growing) 75 cm flasks of cells
- Remove the medium using pipettes
- Wash the cells x2 with the 10 ml pre-warmed PBS (use pipettes)
- Trypsinate the cells using 2 ml trypsin-EDTA (make sure cells are well-separated after 5 - 10 minutes)
- NB! Hard to generate single cell suspension!
- Add 8 ml pre-warmed DMEM each flask and pipette up and down
- Check with microscope to see if cells are singularized
- Collect all cells in one flask (individually for each cell line)

- Count the cell suspension: ~cells/ml
 - o Prepare 2 eppendorf tubes for each cell line
 - o Add 10 ul of cells to each tube
 - o Add 10 ul of tryptophan blue to each tube
 - o Mix well by pipetting
 - o Take 10 ul out and apply to slide and count cells
 - o Total number of cells in each flask = number of live cells per ml * 30 ml
 - o Number of possible plates = Total number of cells / 3 mill cells
 - o Calculate volume you need for each plate
 - o Volume for 3 mill cells = 3 mill cells / number of live cells per ml
 - o Media volume: 20 ml – Volume for 3 mill cells
 - Plate 3 mill cells (3B7, NT) in 10 x 150 cm dishes in total 20 ml DMEM
 - o Add media to each plate first
 - o Add cells and swirl to mix
- Incubate the cells at 37°C and 5% CO₂ for 2 days

Cross-link cells

- We have 9 dishes to cross-link
- Prepare PBS/EDTA/1X Complete
 - o 6 ml each dish x 20 = 120 ml
 - o Prepare 90 ml: 117.5 ml PBS + 240 µl 0.5 M EDTA + 2400 µl Complete
- Prepare RIPA/Glycine/1X Complete
 - o Prepare 10 ml: 9800 µl stock of RIPA/glycine buffer + 200 µl Complete

1. Crosslink 3 dishes of cells together

- Count one dish for each cell line

2. Wash cells with PBS

- Draw off media (pour off)
- Wash the cells x 2 with 15 ml pre-warmed PBS (pour off)
- Add 20 ml warm PBS

3. Cross-link with 0.5% formaldehyde

- Work in a ventilation hood
- Add 0.5% formaldehyde directly to PBS
- 270 μ l formaldehyde in 20 ml PBS
- Incubate cells on a rocking platform for exactly 10 minutes at RT

4. Add glycine to stop cross-linking

- Add final concentration of 125 mM glycine
- 2 ml of 1.25 M glycine in 20 ml PBS
 - 2 ml x 8 dishes = 16 ml glycine
- Incubate with shaking for minimum 5 min at RT

5. Wash and harvest cells

- Have the cells on ice if possible
- Remove cross-linking buffer and throw in special waste bottle (pour off)
- Wash cells x 2 with 15 ml cold PBS (pour off)
- Remove PBS (pour off)
- Add 6 ml PBS/1mM EDTA/1X complete to each dish
- Scrape cells and transfer to 1 x 50 ml tubes
 - Collect from 4 x dishes in one tube (will be approx. 30 ml in each tube)
- Centrifugation at 3000 rpm for 5 min at 4°C

6. Resuspend cells in RIPA/Glycine buffer

- Remove buffer (pour off)
- Resuspend cell pellets in RIPA buffer/125 mM Glycine/1X Complete (1 ml)
- Transfer to eppendorf tubes
- Immediately pipette cells gently up and down several times
- Snap-freeze and store at -80°C

Sonicate and reverse cross-links of Input and Pellet

- Add 1X Complete to RIPA buffer
 - 3 ml: 2940 μ l stock + 60 μ l Complete

1. Thaw samples

- Thaw samples
- Spin down at top speed, 4°C, 5 min
- Resuspend the cell pellet in 300 µl RIPA buffer + 1X Complete (300 µl)
- Transfer the samples to special tubes for sonication

2. Sonicate

- Remember to cool the Bioruptor before use (takes ~20 minutes)
- Use 30 sec ON/ 30 sec OFF
- 12 cycles 30 sec on/30 sec off
- Sonicate and transfer the sonicated samples to new eppendorf tubes
 - The machine cannot work continuously for more than 1 hour
 - After one round of sonication the machine must rest for at least 30 minutes (If it doesn't rest it won't work properly and it will affect the quality of the experiment)

3. Spin down

- Centrifuge at top speed, 4°C, 15 min
- Transfer the supernatant to a fresh pre-cooled eppendorf tube
 - The supernatant is the chromatin fraction
- Resuspend (as good as you can) the Pellet in TE-buffer (30 µl)
- (In order to estimate % DNA solubilized)
- Keep pellet on ice

4. Remove Input for control of digestion (and later use in qPCR)

- Remove 10% volume of the supernatant (30 µl)
- Keep on ice and reverse cross-links overnight

5. Freeze chromatin

- Sample volume of the chromatin fraction ~300 µl
- Snap-freeze chromatin in liquid nitrogen
- Store at -80°C

6. Reverse the cross-links of Input and Pellet

- Add 1 μ l RNaseA [10 mg/ml], mix well, vortex, spin down
- Incubate at 37°C heat block for 30 min
- Add 5.0 μ l 10% SDS and 2.5 μ l Proteinase K [20 mg/ml], mix well, vortex, spin down
- Incubate at 55°C heat block for 1 hour
- Incubate at 65°C overnight

Vedlegg 2: Tillaging av RIPA og Complete

RIPA Wash buffer (0.5X complete)

Solution	C1	C2	Prepare buffer (ml)	Prepare buffer (µl)	Prepare 50 ml stock
Tris pH 8.0	1000 mM	10 mM	0,010	10,00	0,50
EDTA	500 mM	1 mM	0,002	2,00	0,10
NaCl	5000 mM	140 mM	0,028	28,00	1,40
Triton X-100	10 %	1 %	0,100	100,00	5,00
SDS	10 %	0,1 %	0,005	5,00	0,50
Na-Deoxycholate	10 %	0,1 %	0,010	10,00	0,50
<i>DDW</i>			0,835	835,00	41,50
Complete PI	50 x	0,5 x	0,01	10	
Total volum	1 mL	50 mL			
			Stock		Complete
			990,00		10,0
			1980,00		20,0
			4950,00		50,0
			11880,00		120,0

Vedlegg 3: Tillaging av LiCl

LiCl Wash Buffer (0,5X Complete)

Solution	C1	C2	Prepare buffer (ml)	Prepare buffer (ul)	Prepare 50 ml stock
LiCl	5000 mM	250 mM	0,050	50,00	2,50
Tris pH 8,0	100 mM	10 mM	0,010	10,00	0,50
EDTA	500 mM	1 mM	0,002	2,00	0,10
NP-40	10 %	0,5 %	0,050	50,00	2,50
Na-Deoxycholate	10 %	0,5 %	0,050	50,00	2,50
<i>DDW</i>			0,828	828,00	41,4
Complete PI	50 X	0,5 X	0,010	10,00	
Total volume	1 ml	50 ml			
			Stock		Complete
				990,00	10,0
				1980,00	20,0
				2970,00	30,0
				5940,00	60,0

Vedlegg 4: Tillaging av TE-buffer

TE Buffer

Reagens	Kvantitet	Sluttkonsentrasjon
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	0,2 mL	1 mM
Tris-Cl (1 M, pH 8,0)	1 mL	10 mM
H ₂ O	Til 100 mL	

Vedlegg 5: IP after cross-linked and sonicated 66cl4 cells

Material required

- Chilled centrifuge at 4°C
- Heat block with shaking (37°C, 55°C and 65°C)
- Magnet
- RNaseA (Qiagen, Tyskland), Proteinase and Complete
- QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Tyskland)
- Protein A and G Dynabeads (Invitrogen, CA, USA)

Enzymes and buffers required

(check all reagents if you have enough. If not, make more)

Protease inhibitor cocktail (Complete)

- 50X Stock
- Stored at -20°C

RNaseA (Qiagen Cat no 19101)

- 10 mg/ml
- Stored at room temperature

Proteinase K (Roche 03115828001)

- 20,6 mg/ml
- Store at +4°C

RIPA Wash buffer (cold)

- 10 mM Tris pH 8.0
- 1 mM EDTA
- 140 mM NaCl
- 1 % Triton X-100
- 0,1% SDS
- 0,1% Na-Deoxycholate

TE buffer (cold)

- 10 mM Tris-HCl pH 8,0
- 1 mM EDTA

LiCl Wash buffer (cold)

- 250 mM LiCl
- 10 mM Tris pH 8,0
- 1 mM EDTA
- 0,5% NP-40
- 0,5% Na-Deoxycholate

IP with antibodies

1. Prepare wash buffers if more is needed

- LiCl wash buffer in 50 ml tube.
- RIPA wash buffer in 50 ml tube
- Prepare 0,5X complete/RIPA wash buffer in 15 ml tube
 - 3ml: 2970 ul stock + 30 ul complete

2. Thaw chromatin

- Take the chromatin fractions from -80°C.
- Thaw samples on ice.
- Prepare 12 (2 antibodies * 2 samples each 3 cell lines) new Eppendorf tubes and label with antibody names
 - Each IP: 12 samples (6 samples each antibody)
 - Sample volume = ca. 270 ul (from 3 dishes of cells, enough for 4 IPs) (270 ul = 300 ul - Input (30 ul))
- Divide the volume of each sample into 3 tubes

Input Concentration of 66cl4 NT, 66cl4 Nrf2 KD 3B4, 66cl4 Nrf2 KD 3B7

		Concentration (ng/ul)	260/280	260/230
Input	NT	128 (10 cycles)	1,9	2,6
		248 (12 cycles)		
	3B4	20 (10 cycles)	1,9	2,7
		287 (12 cycles)		
	3B7	314 (10 cycles)	1,9	2,7
		217 (12 cycles)		

Chromatin volume needed for each antibody

	Volume per 25 ug of chromatin (EP1808Y)	Volume per 2ug of chromatin (Normal Rabbit IgG)
NT	10 cycles: 195 ul 12 cycles: 100 ul	10 cycles: 16 ul 12 cycles: 8 ul
3B4	10 cycles: rest 12 cycles: 87 ul	10 cycles: 16 ul 12 cycles: 7 ul
3B7	10 cycles: 79 ul 12 cycles: 115 ul	10 cycles: 6 ul 12 cycles: 9 ul

3. Prepare sufficient protein A & G Dynabeads

- Beads needed per IP: 20 ul for preclearing, 20 ul for IP and ca. 10 ul excess = 50 ul beads.
 - 1:1 mix of protein A and protein G
 - 1 IP: 25 ul protein A beads + 25 ul protein G beads = 50 ul
 - 15 IPs: 375 ul protein A beads + 375 ul protein G beads = 750 ul.
- Pipette the desired amount into a 1,5 ml special tube.
- Use a magnet rack to wash the beads x2 with 1 ml RIPA wash buffer.
- Resuspend the beads to their original volume in RIPA wash buffer (750 ul) and keep at 4°C.

4. Preclear chromatin with beads

- For every IP you will perform, add 20 ul washed beads to the chromatin.
 - Add 20 ul to each of the chromatin samples (use the same tube).
 - Remember suspending the bead tube before!
- Incubate with rotation at 4°C. for 1 hour.

5. Bind antibodies overnight

- Remove beads using magnet rack
 - Keep the supernatants.
 - Transfer the supernatants to fresh 1,5 ml special IP tubes (DNA LoBind tubes).
- Add antibody to the tubes and incubate with rotation at 4°C overnight

IP #	Name	Source	Conc.	Used per IP	ul added	Cat #
IP 1	Normal Rabbit IgG	Rabbit	size: 250 ul (1mg/ml)	2 ug	2 ul	2729S
Dilute this control antibody to the same concentration (not dilution) as the specific test antibody in the chromatin immunoprecipitation. This is typically 1 ul (1 ug) to 5 ul (5 ug) of control antibody for one immunoprecipitation. Higher background signal may result if an excessive amount of rabbit IgG isotype control is used.						
IP 2	Anti-Nrf2 antibody (EP1808Y) - Chip grade	Rabbit	Size: 100 ul (0,715 ug/ul)	2 ug	2,8 ul	ab62352
Use 2 ug for 25 ug of chromatin (10x10 ⁶ cells)						

IP with protein A/G beads and reverse cross-links

1. Prepare wash buffer

- Add 0,5X Complete to RIPA wash buffer
 - 30 ml: 29700 ul stock + 300 ul Complete
- Add 0,5X Complete to LiCl wash buffer
 - 6 ml: 5940 ul stock + 60 ul Complete

2. IP with protein A/G beads

- Take out the DNA LoBind tubes from the rotating mixer and put on ice.
- Spin down liquid from lids of tubes in a benchtop centrifuge.
- Add 20 ul beads per IP and incubate a further 2 - 3 hours with rotation at 4°C.

3. Wash beads

- Perform all washes on ice with rotation at 4°C.
- Prior to collecting beads on magnet, spin tubes briefly to collect beads from tube lids in benchtop centrifuge.
- Use a magnet to collect beads.
- Wash x5 with 500 ul RIPA wash buffer (5 min per wash).
- Wash x1 with 500 ul LiCl wash buffer (5 min)
- Spin tubes briefly to collect beads from tube lids in benchtop centrifuge
- Put on magnetic stand and remove buffer.

4. Rinse beads

- Use a final 500 ul wash of cold TE-buffer (no protease inhibitors)

- Incubate in rotation at 4°C (5 min)
- Spin tubes briefly to collect beads from tube lids in benchtop centrifuge
- Put on magnetic stand and remove buffer.

5. Digest with RNaseA

- Resuspend the beads in 100 ul TE-buffer containing 1% v/v RNaseA (10mg/ml) (1 ul).
- Resuspend the beads in 100 ul TE-buffer. Then add 1 ul RNaseA to each tube.
- Mix well, vortex, spin down.
- Incubate at 37°C for 30 min with shaking (1200 rpm to keep beads in suspension)

6. Digest with proteinase K

- Add 2,5 ul 20% SDS and 5 ul Proteinase K (10mg/ml)
- Mix well, vortex, spin down
- Incubate at 55°C for 1 hour with shaking (1200 rpm)

7. Reverse cross-links

- Increase temperature to 65°C and incubate with shaking overnight.

Purify immunoprecipitated chromatin

Hentet fra Quick-Start Protocol for QIAquick PCR Purification Kit.

1. Purify immunoprecipitated DNA

- Bring the 12 sample tubes back to general lab
- Use the QIAquick PCR purification kit (Qiagen)
- Sample volume ~ 100 ul
- Add 500 ul (5 volumes) of Buffer PB to each tube and resuspend/vortex
- Place the tubes on magnetic stand and wait until beads aggregate
- Transfer the suspended sample to QIAquick columns and collection tubes
- To bind DNA, centrifuge for 1 min at room temperature
- Discard flow-through and place the QIAquick column back into the same tube
- To wash, add 750 ul of Buffer PE to the QIAquick column
- Centrifuge for 1 min at room temperature to wash DNA
- Discard flow-through and place the QIAquick column back into the same tube
- Centrifuge the QIAquick column once more in the provided 2 ml collection tube for 1 min to remove residual wash buffer.
- Place each QIAquick column in the new Eppendorf tubes
- Prior to elution, allow column to dry for 5 min on bench
- To elute DNA, add 30 ul of TE-buffer to the center of the QIAquick membrane
- Let the column stand for 1 min
- Centrifuge for 1 min at room temperature
- Throw away QIAquick columns
- Freeze everything for ChIP-PCR amplification
 - Samples are stored at -20°C

Vedlegg 6: PCR-primere

Oligo navn	Oligo #	Len	Pur	Scale	MW	Tm	ug/OD	OD	ug	nmol	Epsilon 1/(mMcm)	Dimer	2ndry	GC%	ul for 100uM	Sequence (5'-3')
Nqo1 Fwd	8815813355-10/0	20	DST	0.025	6093	64.3	32.6	9.32	304.1	49.9	186.7	No	Weak	55	499	AGTCACCTTTGCACGCTAGG
Nqo1 Rev	8815813355-20/0	20	DST	0.025	6144	64.0	30.0	13.4	402.3	65.5	204.6	No	Very Weak	50	654	TCTAAGAGCAGAACGCAGCA
Gsta3 Fwd	8815813355-30/0	20	DST	0.025	6086	64.2	31.2	12.6	394.2	64.8	194.5	No	None	50	647	ATCCTCATTGACAGCCGAAG
Gsta3 Rev	8815813355-40/0	20	DST	0.025	6151	64.3	30.6	11.48	352.1	57.3	200.5	No	Very Weak	55	572	CAGTGTTCAGAGGCCAGACA
Txnrdr1_P1 Fwd	8815813355-50/0	19	DST	0.025	5909	64.4	31.2	10.56	330.3	55.9	188.9	No	None	57.8	559	CAGCGAGGATGTTGTACGG
Txnrdr1_P1 Rev	8815813355-60/0	20	DST	0.025	6157	63.6	31.5	12.8	403.7	65.6	195.2	No	None	50	655	TAAAGAGCTGCGGGTTCCTA
Txnrdr1_P2 Fwd	8815813355-70/0	20	DST	0.025	6101	63.2	30.9	12.28	380.4	62.4	196.9	No	None	45	623	ACAGTGTGCGCCAAAGCATTTA
Txnrdr1_P2 Rev	8815813355-80/0	20	DST	0.025	6093	64.1	32.8	9.56	314.0	51.5	185.5	No	None	55	515	ACGCCTGCTCAGTGCTAAGT
Gsta4 Fwd	8815813355-90/0	20	DST	0.025	6133	63.9	31.7	12.6	400.1	65.3	193.1	No	Very Weak	55	652	GGTTCGCCCGTAGAGAATGT
Gsta4 Rev	8815813355-100/0	21	DST	0.025	6418	63.7	33.5	12.0	401.6	62.7	191.3	No	Moderate	42.8	627	CACGTTGGTTAACGCTTTGTT

Målgene og sekvensene er først funnet fra Mahotra, D. et al, Nucleic Acids Research, 2010 Vol. 30, No. 17 side 5718 – 5734. DOI: 10.1093/nar/gkq212

Vedlegg 7: Prosedyre til primer master mix

66cl4 cells for ChIP-PCR (17.03.21)

Prosedyre fra forsøk 17. mars 2021. Prosedyren er senere tilrettelagt for forsøk 26. april 2021.

Component	1x
SYBR Select Master Mix (2X)	10
Forward primer (2,5 uM)	2
Reverse primer (2,5 uM)	2
DNA template	2
Water	4
Total reaction volume	20

Samples

DNA samples	INPUT:	66cl4	3	DNA diluted 1:2 in TE
	Nrf2 NT, 14 cycles (06.03.20)			
	66cl4 Nrf2 KD 3B7, 14 cycles (26.02.20) 66cl4 Nrf2 KD 3B4, 14 cycles (23.09.20)			
DNA samples	IP Anti Nrf2 (EP1808Y):	66cl4	3	DNA diluted 1:2 in TE
	Nrf2 NT, 12 cycles (06.03.20) IP 15.03.21			
	66cl4 Nrf2 KD 3B7, 12 cycles (25.02.20) IP 15.03.21 66cl4 Nrf2 3B4, 12 cycles (23.09.20) IP 15.03.21			
DNA samples	IP Rabbit IgG:	66cl4	3	DNA diluted 1:2 in TE
	Nrf2 NT, 12 cycles (06.03.20) IP 15.03.21			
	66cl4 Nrf2 KD 3B7, 12 cycles (25.02.20) IP 15.03.21 66cl4 Nrf2 3B4, 12 cycles (23.09.20) IP 15.03.21			
Total DNA samples			9	
Primer sets	Nqo1		2	
	Txnrd1-P1			
Total primer samples			2	
Parallels in qPCR			3	
TOTAL qPCR reactions			54	

Primer master mix (1)

Component	1x	# of reactions	Master mix volume (+16%)	1.16
Water	4	27	125.3	
SYBR Select Master Mix (2X)	10	27	313.2	
Reverse primer	2	27	62.6	
Forward primer	2	27	62.6	
Total	18.00		563.76	563.76

Aliquot: 59.40 µl into the primer+DNA master mix

Primer + DNA master mix (42)

Component	1x	# of reactions	Master mix volume (+10%)	1.10
Primer master mix	18	3	59.40	
DNA	2	3	6.60	
Total	20.00		66.00	

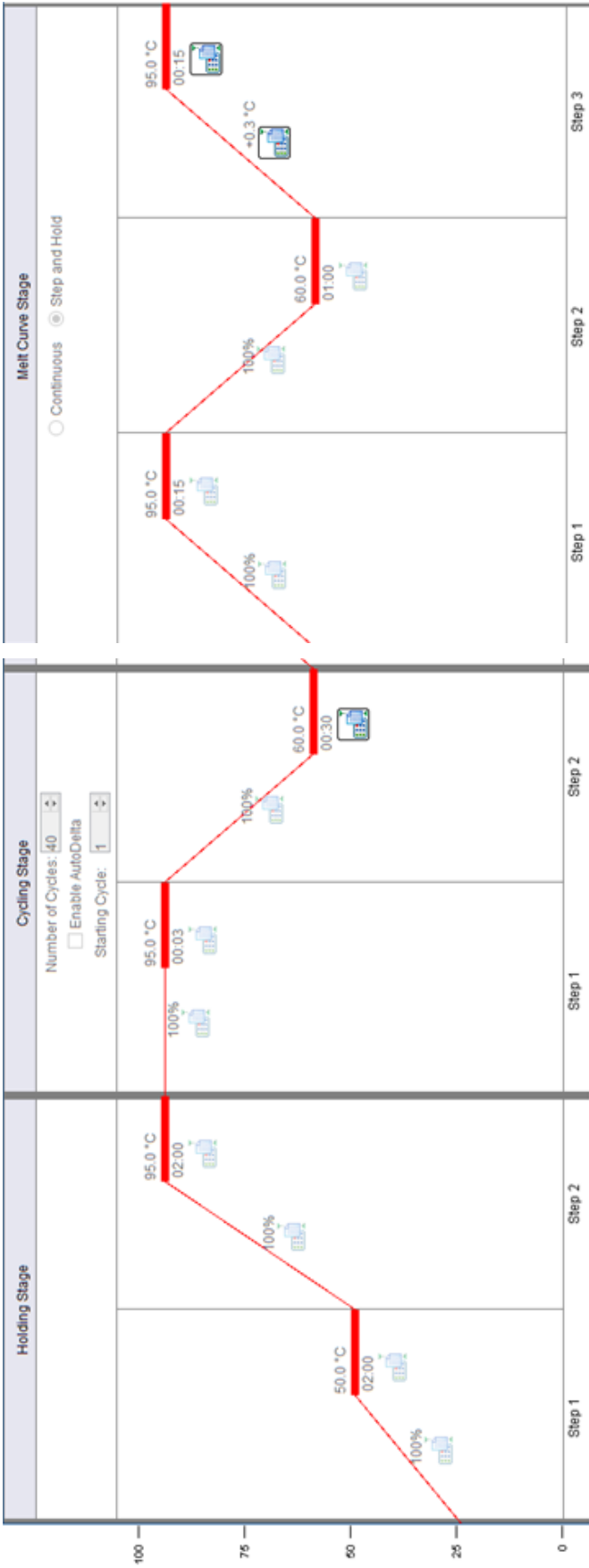
Aliquot: 20.00 µl into each well

No DNA template (1)

Component	1x	# of reactions	Master mix volume (+16%)	1.16
SYBR Select Master Mix (2X)	10	3	34.8	
Forward primer	2	3	7.0	
Reverse primer	2	3	7.0	
No template	0			
Water	6	3	20.9	
Total reaction volume	20		69.60	

Aliquot: 20.00 µl into each well

Vedlegg 8: PCR-innstillinger



Vedlegg 9: Prosedyre for bibliotekspreparering

Protokoll A: Standard Normalization Method

(Hentet fra: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/nextseq/nextseq-denature-dilute-libraries-guide-15048776-09.pdf 13. april 2021)

Use protocol A to denature and dilute libraries that have been normalized using standard library quantification and quality control procedure recommended in the library prep documentation.

NOTE

Typically, it is important that no more than 1 mM NaOH is in the final solution after diluting with HT1. However, introducing 200 mM Tris-HCl ensures that the NaOH is fully hydrolyzed in the final solution. As a result, template hybridization is not affected even if the final NaOH concentration after diluting HT1 is greater than 1 mM.

Prepare reagents

Prepare a Fresh Dilution of NaOH

1. Combine the following volumes in a microcentrifuge tube:
 1. Laboratory-grade water (800 ul)
 2. Stock 1,0 N NaOH (200 ul)The result is 1 ml of 0,2 N NaOH.
2. Invert the tube several times to mix.

NOTE: Use the fresh dilution within 12 hours.

Prepare HT1

1. Remove HT1 from -25°C to -15°C storage and thaw at room temperature.
2. Store at 2°C to 8 °C until you are ready to dilute denatured libraries.

Prepare RSB

NOTE: In place of RSB, you can use 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 with 0,1% Tween 20.

1. Remove the tube of RSB from -25 °C to -15°C storage and thaw at room temperature.
2. Store thawed RSB at 2°C to 8°C until you are ready to dilute libraries.

Denature Libraries

1. Combine the following volumes of library and freshly diltuted 0,2 N NaOH in a microcentrifuge tube.

Starting Library Concentration	Library	0,2 N NaOH
4 nM	5 ul	5 ul
2 nM	10 ul	10 ul
1 nM	20 ul	20 ul
0,5 nM	40 ul	40 ul

2. Vortex briefly and then centrifuge at 280 x g for 1 minute.
3. Incubate at room temperature for 5 minutes.
4. Add the following volume of 200 mM Tris-HCl, pH 7.

Starting Library Concentration	200 mM Tris-HCl, pH 7
4 nM	5 ul
2 nM	10 ul
1 nM	20 ul
0,5 nM	40 ul

5. Vortex briefly and then centrifuge at 280 x g for 1 minute.

Dilute Denatured Libraries to 20 pM

1. Add the following volume of prechilled HT1 to the tube of denatured libraries

Starting Library Concentration	Prechilled HT1

4 nM	985 ul
2 nM	970 ul
1 nM	940 ul
0,5 nM	880 ul

The result is a 20 pM denatured library

2. Vortex briefly and then centrifuge at 280 x g for 1 minute.
3. Place the 20 pM libraries on ice until you are ready to proceed to final dilution.

Dilute Libraries to Loading Concentration

High Output Kits

1. Dilute the denatured 20 pM library solution to 1,8 pM as follows.
 1. Denatured library solution (117 ul)
 2. Prechilled HT1 (1183 ul)

The total volume is 1,3 ml at 1,8 pM.
2. Invert to mix and then pulse centrifuge.
3. If you plan to add a PhiX control, proceed to *Denature and Dilute PhiX control (Protocols A-D)* on page 13. Otherwise, see *Next Steps* on page 18.

Mid Output Kits

1. Dilute the denatured 20 pM library solution to 1,5 pM as follows.
 1. Denatured library solution (97 ul)
 2. Prechilled HT1 (1203 ul)

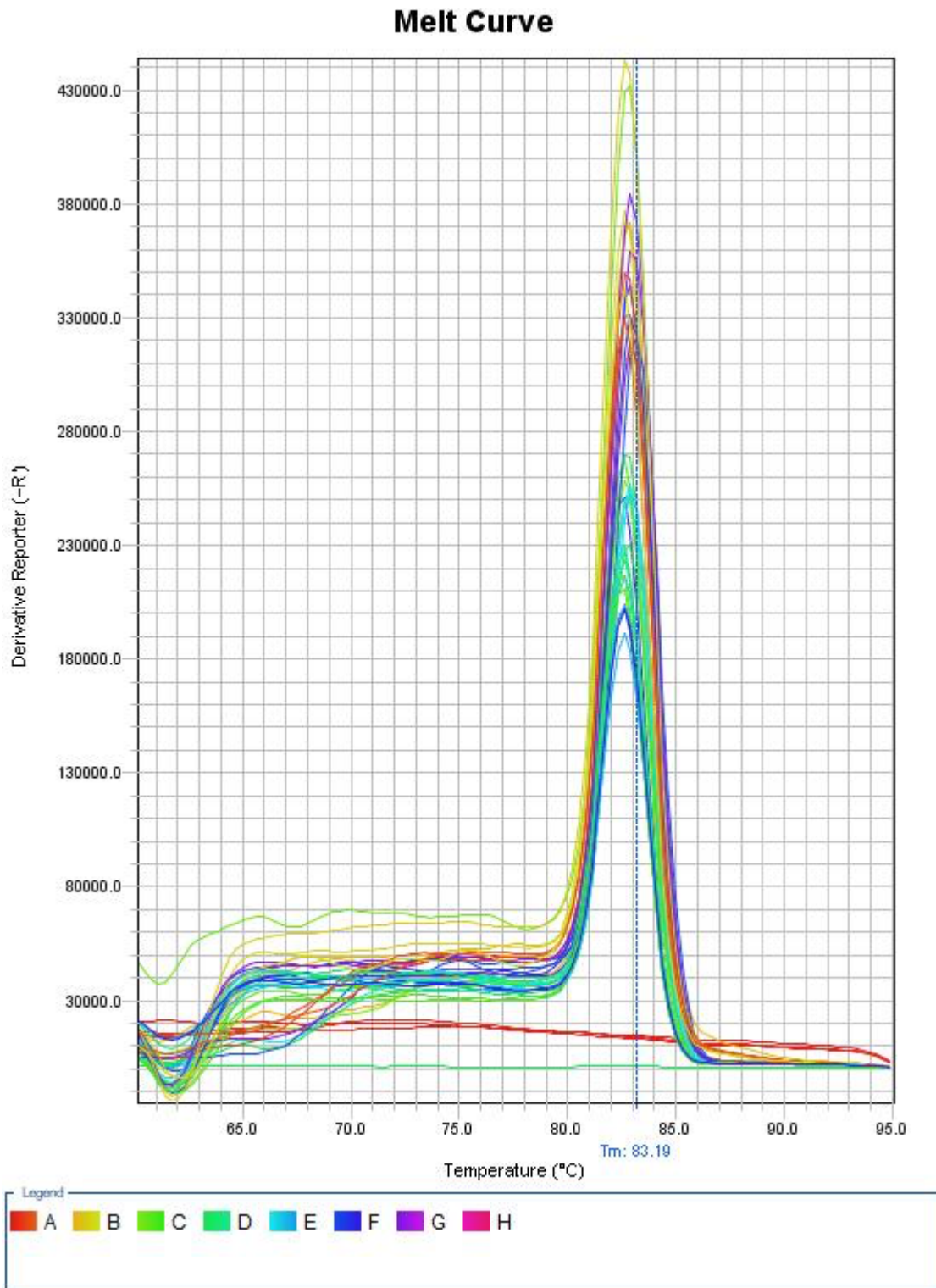
The total volume is 1,3 ml at 1,5 pM
2. Invert to mix and then pulse centrifuge.
3. If you plan to add a PhiX control, proceed to *Denature and Dilute PhiX control (Protocols A-D)* on page 13. Otherwise, see *Next Steps* on page 18.

Next steps

After denaturing and diluting your libraries and preparing the optional PhiX control, you are ready to load libraries onto the reagent cartridge and set up the sequence run. See the *NextSeq*

500 System Guide (document # 15046563) or NextSeq 550 System Guide (document # 15069765)

Vedlegg 10: Eksempel på smeltepunktsgraf for Nqo1



Vedlegg 11: Beregningseksempel for prosent input

Sample Name	Target Name	Prall 1	Parallell 2	Ct Raw	Adjusted input to 100% (Ct Input - 3,3219 (10%))	Ct SD	$\Delta C(t)$ (C(t) adjusted input sample x - C(t) IP sample x)	Percent input $100 \times 2^{-\Delta C(t)}$
Input NT	Nqo1			19,45	16,13	0,19		
Input 3B7	Nqo1			18,52	15,20	0,09		
IP: Nrf2 EP 1808Y: NT	Nqo1			29,85		0,40	-13,71	0,0074
IP: Nrf2 EP 1808Y: 3B7	Nqo1			29,70		0,46	-14,50	0,0043
IP Normal Rabbit IgG: NT	Nqo1	31,51	31,93	31,72		0,29	-15,59	0,0020
IP Normal Rabbit IgG: 3B7	Nqo1	33,12	32,62	32,87		0,36	-17,67	0,0005
IP Histone H3: NT	Nqo1			34,88		0,37	-18,74	0,0002
IP Histone H3: 3B7	Nqo1			22,48		0,13	-7,28	0,6428

*En parallell er fjernet. De to gjenstående parallellene er manuelt skrevet inn i filen for å beregne gjennomsnitt og standardavvik.

Vedlegg 12: Pooled IP input peaks

```
# This file is generated by MACS version 2.1.1.20160309
# Command line: callpeak -f BAM -t IP_pooled.bam -c Input_pooled.bam -g 1870000000 -n
pooled_IP-INput
# ARGUMENTS LIST:
# name = pooled_IP-INput
# format = BAM
# ChIP-seq file = ['IP_pooled.bam']
# control file = ['Input_pooled.bam']
# effective genome size = 1.87e+09
# band width = 300
# model fold = [5, 50]
# qvalue cutoff = 5.00e-02
# Larger dataset will be scaled towards smaller dataset.
# Range for calculating regional lambda is: 1000 bps and 10000 bps
# Broad region calling is off
# Paired-End mode is off

# tag size is determined as 86 bps
# total tags in treatment: 60198312
# tags after filtering in treatment: 47382114
# maximum duplicate tags at the same position in treatment = 1
# Redundant rate in treatment: 0.21
# total tags in control: 51530051
# tags after filtering in control: 34196682
# maximum duplicate tags at the same position in control = 1
# Redundant rate in control: 0.34
# d = 88
# alternative fragment length(s) may be 88,510,575 bps
```


chr	start	end	length	abs_summit	pileup	-log10(pvalue)	fold_enrichment	-log10(qvalue)	name
chr1	40033899	40034006	108	40033941	20.21	16.03524	8.12806	9.86307	pooled_IP-INput_peak_1
chr1	45860465	45860635	171	45860535	24.54	20.69623	9.78767	14.10862	pooled_IP-INput_peak_2
chr1	143632999	143633096	88	143633040	14.43	9.67029	5.91526	4.18256	pooled_IP-INput_peak_3
chr1	181009830	181009936	107	181009898	22.37	8.40735	3.89556	3.11645	pooled_IP-INput_peak_4
chr1	182071987	182072166	180	182072109	25.26	20.09868	9.02538	13.5751	pooled_IP-INput_peak_5
chr1	183387786	183387898	113	183387827	18.04	12.18861	6.34768	6.42096	pooled_IP-INput_peak_6
chr10	12299054	12299148	95	12299110	18.04	12.6372	6.60483	6.85258	pooled_IP-INput_peak_7
chr10	92878078	92878238	161	92878200	18.04	13.82184	7.29826	7.87402	pooled_IP-INput_peak_8
chr10	119727124	119727212	89	119727177	16.6	11.69687	6.74506	5.97219	pooled_IP-INput_peak_9
chr10	119757396	119757485	90	119757423	17.32	12.74773	7.02166	6.91906	pooled_IP-INput_peak_10
chr11	75383550	75383810	261	75383643	29.59	19.36886	7.64764	12.97207	pooled_IP-INput_peak_11
chr11	82174985	82175081	97	82175012	16.6	11.69687	6.74506	5.97219	pooled_IP-INput_peak_12
chr11	100198775	100198898	124	100198834	30.31	25.42371	10.43743	18.34202	pooled_IP-INput_peak_13
chr11	120387329	120387445	117	120387400	23.82	13.58947	6.2042	7.72104	pooled_IP-INput_peak_14
chr12	8076195	8076304	110	8076256	13.71	8.69764	5.63866	3.33797	pooled_IP-INput_peak_15
chr12	98522217	98522319	103	98522271	18.76	13.82184	7.57486	7.87402	pooled_IP-INput_peak_16
chr12	113625530	113625633	104	113625589	12.99	6.6833	4.66366	1.69745	pooled_IP-INput_peak_17

chr	start	end	length	abs_summit	pileup	-log10(pvalue)	fold_enrichment	-log10(qvalue)	name
chr12	115334194	115334333	140	115334258	15.16	6.9063	4.03904	1.84058	pooled_IP-INput_peak_18
chr13	12813942	12814179	238	12814080	29.59	23.98167	10.0574	17.03583	pooled_IP-INput_peak_19
chr13	13025930	13026074	145	13025985	25.26	21.90563	10.06427	15.10229	pooled_IP-INput_peak_20
chr13	14034035	14034181	147	14034111	21.65	17.1725	8.68126	10.91453	pooled_IP-INput_peak_21
chr13	34398979	34399081	103	34399033	21.65	17.1725	8.68126	10.91453	pooled_IP-INput_peak_22
chr13	66300098	66300210	113	66300166	20.21	12.3311	6.03054	6.55919	pooled_IP-INput_peak_23
chr14	30564536	30564657	122	30564611	34.64	17.65711	5.94044	11.36401	pooled_IP-INput_peak_24
chr14	99548103	99548269	167	99548165	17.32	12.74773	7.02166	6.91906	pooled_IP-INput_peak_25
chr15	9016194	9016311	118	9016237	36.81	9.23779	3.15065	3.84554	pooled_IP-INput_peak_26
chr15	27219487	27219587	101	27219550	20.21	16.03524	8.12806	9.86307	pooled_IP-INput_peak_27
chr15	97786822	97786915	94	97786874	29.59	16.03933	6.11812	9.86455	pooled_IP-INput_peak_28
chr16	9132258	9132367	110	9132304	20.21	16.03524	8.12806	9.86307	pooled_IP-INput_peak_29
chr16	11456404	11456566	163	11456482	42.58	44.57899	16.70268	35.14319	pooled_IP-INput_peak_30
chr16	14350871	14351017	147	14350961	16.6	11.69687	6.74506	5.97219	pooled_IP-INput_peak_31
chr16	14352756	14352880	125	14352809	23.1	19.50378	9.23447	13.02702	pooled_IP-INput_peak_32
chr16	55616571	55616663	93	55616603	16.6	11.69687	6.74506	5.97219	pooled_IP-INput_peak_33

chr	start	end	length	abs_summit	pileup	-log10(pvalue)	fold_enrichment	-log10(qvalue)	name
chr16	94060215	94060314	100	94060269	17.32	11.43644	6.24023	5.75826	pooled_IP-INput_peak_34
chr16	94235832	94236061	230	94235907	32.48	30.79792	12.83027	23.13297	pooled_IP-INput_peak_35
chr16	94956614	94956707	94	94956630	15.16	10.67058	6.19186	5.04474	pooled_IP-INput_peak_36
chr17	4626209	4626482	274	4626292	23.82	19.50378	9.51107	13.02702	pooled_IP-INput_peak_37
chr17	6433865	6433952	88	6433899	25.98	10.48627	4.48503	4.94694	pooled_IP-INput_peak_38
chr17	13905737	13905851	115	13905791	18.76	13.82184	7.57486	7.87402	pooled_IP-INput_peak_39
chr18	23774355	23774490	136	23774420	15.16	10.67058	6.19186	5.04474	pooled_IP-INput_peak_40
chr18	50498902	50499018	117	50498965	17.32	12.74773	7.02166	6.91906	pooled_IP-INput_peak_41
chr18	81253059	81253164	106	81253107	14.43	9.67029	5.91526	4.18256	pooled_IP-INput_peak_42
chr19	4046047	4046151	105	4046145	19.49	12.89518	6.65837	7.05795	pooled_IP-INput_peak_43
chr19	9978533	9978675	143	9978609	25.98	21.06359	9.83982	14.44668	pooled_IP-INput_peak_44
chr19	36451219	36451349	131	36451287	22.37	10.22378	4.67467	4.70391	pooled_IP-INput_peak_45
chr19	40675409	40675578	170	40675514	27.43	24.37279	10.89407	17.35529	pooled_IP-INput_peak_46
chr19	43771688	43771865	178	43771798	21.65	17.1725	8.68126	10.91453	pooled_IP-INput_peak_47
chr19	46227507	46227635	129	46227560	27.43	17.93685	7.38092	11.63009	pooled_IP-INput_peak_48
chr2	5615055	5615146	92	5615121	18.76	13.82184	7.57486	7.87402	pooled_IP-INput_peak_49
chr2	6965358	6965493	136	6965437	21.65	17.1725	8.68126	10.91453	pooled_IP-INput_peak_50

chr	start	end	length	abs_summit	pileup	-log10(pvalue)	fold_enrichment	-log10(qvalue)	name
chr2	18019236	18019358	123	18019292	21.65	14.42945	7.07864	8.44819	pooled_IP-INput_peak_51
chr2	31128125	31128212	88	31128142	12.99	7.75449	5.36206	2.50403	pooled_IP-INput_peak_52
chr2	34869759	34869857	99	34869799	19.49	14.91803	7.85146	8.86747	pooled_IP-INput_peak_53
chr2	112433537	112433663	127	112433592	20.21	16.03524	8.12806	9.86307	pooled_IP-INput_peak_54
chr2	118659236	118659329	94	118659270	22.37	16.37119	7.82032	10.17369	pooled_IP-INput_peak_55
chr3	51670875	51670974	100	51670908	13.71	8.16043	5.29691	2.8885	pooled_IP-INput_peak_56
chr3	56239819	56239976	158	56239902	30.31	28.18617	12.00047	20.68988	pooled_IP-INput_peak_57
chr3	60707284	60707373	90	60707356	13.71	7.53305	4.90424	2.4093	pooled_IP-INput_peak_58
chr3	69118881	69118997	117	69118959	20.93	14.11521	7.25196	8.15494	pooled_IP-INput_peak_59
chr3	102270956	102271073	118	102271007	19.49	13.7025	7.12722	7.83219	pooled_IP-INput_peak_60
chr3	104322748	104322845	98	104322803	15.16	10.67058	6.19186	5.04474	pooled_IP-INput_peak_61
chr3	107823298	107823609	312	107823450	37.53	27.85611	9.63238	20.42463	pooled_IP-INput_peak_62
chr3	108013342	108013442	101	108013400	23.82	14.46726	6.65687	8.48032	pooled_IP-INput_peak_63
chr3	121577174	121577280	107	121577215	29.59	20.88354	8.40401	14.27381	pooled_IP-INput_peak_64
chr3	123256890	123256987	98	123256946	15.88	10.67058	6.46846	5.04474	pooled_IP-INput_peak_65
chr3	126811767	126811927	161	126811810	15.16	10.67058	6.19186	5.04474	pooled_IP-INput_peak_66

chr	start	end	length	abs_summit	pileup	-log10(pvalue)	fold_enrichment	-log10(qvalue)	name
chr3	137879441	137879568	128	137879490	20.93	12.9197	6.56427	7.0817	pooled_IP-INput_peak_67
chr3	142191675	142191856	182	142191813	41.14	8.92154	2.80921	3.54492	pooled_IP-INput_peak_68
chr3	146655082	146655266	185	146655176	31.76	26.47301	10.83192	19.17393	pooled_IP-INput_peak_69
chr3	152677240	152677334	95	152677274	15.88	9.31679	5.62596	3.89843	pooled_IP-INput_peak_70
chr4	3252789	3252924	136	3252869	40.42	15.88087	4.60182	9.78808	pooled_IP-INput_peak_71
chr4	3256979	3257136	158	3257039	31.76	13.03856	4.67939	7.19749	pooled_IP-INput_peak_72
chr4	14898861	14899070	210	14898958	29.59	26.90069	11.72387	19.48192	pooled_IP-INput_peak_73
chr4	89234547	89234669	123	89234611	19.49	12.69885	6.54604	6.90955	pooled_IP-INput_peak_74
chr4	89351639	89351756	118	89351696	21.65	17.1725	8.68126	10.91453	pooled_IP-INput_peak_75
chr4	132624377	132624530	154	132624468	21.65	15.25735	7.55055	9.18591	pooled_IP-INput_peak_76
chr5	14073259	14073402	144	14073339	26.7	23.13135	10.61747	16.21274	pooled_IP-INput_peak_77
chr5	15022113	15022214	102	15022189	20.93	8.71601	4.38598	3.35109	pooled_IP-INput_peak_78
chr5	15552441	15552655	215	15552587	31.76	9.87633	3.63953	4.37795	pooled_IP-INput_peak_79
chr5	15713538	15713625	88	15713575	15.16	9.21906	5.32714	3.82815	pooled_IP-INput_peak_80
chr5	136109234	136109341	108	136109299	20.21	12.3311	6.03054	6.55919	pooled_IP-INput_peak_81
chr6	49928213	49928314	102	49928281	18.04	13.82184	7.29826	7.87402	pooled_IP-INput_peak_82

chr	start	end	length	abs_summit	pileup	-log10(pvalue)	fold_enrichment	-log10(qvalue)	name
chr6	55014368	55014455	88	55014410	17.32	12.74773	7.02166	6.91906	pooled_IP-INput_peak_83
chr6	88779881	88780004	124	88779954	20.21	13.8672	6.87328	7.91727	pooled_IP-INput_peak_84
chr6	113487412	113487530	119	113487474	22.37	11.60728	5.31599	5.92191	pooled_IP-INput_peak_85
chr6	116514980	116515073	94	116515044	18.76	9.25272	4.94119	3.85098	pooled_IP-INput_peak_86
chr6	125672012	125672107	96	125672053	20.21	16.03524	8.12806	9.86307	pooled_IP-INput_peak_87
chr7	8527944	8528052	109	8528001	23.82	14.99303	6.93517	8.9405	pooled_IP-INput_peak_88
chr7	27383361	27383499	139	27383418	16.6	10.25134	5.86653	4.72387	pooled_IP-INput_peak_89
chr7	30117985	30118090	106	30118033	20.21	10.92847	5.30205	5.28597	pooled_IP-INput_peak_90
chr7	40388300	40388410	111	40388363	19.49	14.91803	7.85146	8.86747	pooled_IP-INput_peak_91
chr7	70398766	70398853	88	70398785	14.43	9.67029	5.91526	4.18256	pooled_IP-INput_peak_92
chr7	75587919	75588015	97	75587977	18.04	13.82184	7.29826	7.87402	pooled_IP-INput_peak_93
chr7	102025873	102025976	104	102025932	19.49	14.91803	7.85146	8.86747	pooled_IP-INput_peak_94
chr7	118104822	118104931	110	118104865	15.88	10.67058	6.46846	5.04474	pooled_IP-INput_peak_95
chr8	19750404	19750491	88	19750429	16.6	11.65545	6.71945	5.96869	pooled_IP-INput_peak_96
chr8	19919275	19919362	88	19919316	25.26	8.87152	3.75146	3.49703	pooled_IP-INput_peak_97
chr8	19922369	19922552	184	19922511	14.43	8.00894	4.90418	2.74728	pooled_IP-INput_peak_98

chr	start	end	length	abs_summit	pileup	-log10(pvalue)	fold_enrichment	-log10(qvalue)	name
chr8	19922825	19922967	143	19922874	13.71	7.24672	4.72773	2.15405	pooled_IP-INput_peak_99
chr8	20016326	20016415	90	20016366	70.73	21.83437	3.98493	15.10229	pooled_IP-INput_peak_100
chr8	20036266	20036353	88	20036344	18.76	7.28745	3.95295	2.18713	pooled_IP-INput_peak_101
chr8	20156865	20156963	99	20156909	24.54	9.32029	4.06664	3.89989	pooled_IP-INput_peak_102
chr8	20302708	20302800	93	20302776	36.81	9.14659	3.12771	3.75891	pooled_IP-INput_peak_103
chr8	20503385	20503472	88	20503430	20.93	10.92847	5.48248	5.28597	pooled_IP-INput_peak_104
chr8	20615069	20615179	111	20615123	23.82	6.41011	3.1021	1.47501	pooled_IP-INput_peak_105
chr8	20827799	20827941	143	20827808	20.93	8.51448	4.2919	3.2127	pooled_IP-INput_peak_106
chr8	60859670	60859799	130	60859756	21.65	16.83304	8.47741	10.61735	pooled_IP-INput_peak_107
chr8	69454446	69454533	88	69454482	18.76	12.18861	6.58825	6.42096	pooled_IP-INput_peak_108
chr8	75083922	75084062	141	75083961	23.82	16.87909	7.97455	10.66024	pooled_IP-INput_peak_109
chr8	75089608	75089818	211	75089708	27.43	21.89293	9.47514	15.10229	pooled_IP-INput_peak_110
chr8	78110403	78110526	124	78110474	20.93	16.03524	8.40466	9.86307	pooled_IP-INput_peak_111
chr8	94262759	94262846	88	94262818	13.71	7.53305	4.90424	2.4093	pooled_IP-INput_peak_112
chr8	107139892	10714000	109	107139939	22.37	16.31975	7.79112	10.12425	pooled_IP-INput_peak_113
chr9	23168287	23168415	129	23168343	16.6	11.69687	6.74506	5.97219	pooled_IP-INput_peak_114
chr9	103670754	103671075	322	103670959	31.76	26.6287	10.91858	19.32	pooled_IP-INput_peak_115
chr9	119641997	119642170	174	119642086	22.37	16.31975	7.79112	10.12425	pooled_IP-INput_peak_116
chr9	122471683	122471850	168	122471763	26.7	20.74566	9.23456	14.13852	pooled_IP-INput_peak_117
chrX	32310456	32310556	101	32310493	20.21	16.03524	8.12806	9.86307	pooled_IP-INput_peak_118