

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA ZUPANČIČ

**VPLIV GLUKOKORTIKOIDNEGA RECEPTORJA NA AKTIVNOST
PROMOTORJA GENA ZA LIGAND RECEPTORJA ZA AKTIVACIJO JEDRNEGA
DEJAVNIKA κ -B V SESALSKIH CELIČNIH LINIJAH**

**THE IMPACT OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR ON THE ACTIVITY OF THE
PROMOTOR OF THE GENE FOR RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR
FACTOR κ -B LIGAND IN MAMMALIAN CELL LINES**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Marije Nike Lovšin, univ. dipl. kem. Večina raziskovalnega dela je bilo opravljenega v laboratorijih Fakultete za farmacijo v Ljubljani, Sangerjevo sekvenciranje pa je opravilo podjetje GATC Biotech v Nemčiji.

ZAHVALA

Za mentorstvo, zaupanje, potrpežljivost, strokovne nasvete in spodbudo pri izvedbi raziskovalnega dela ter pisanju magistrske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorici asist. dr. Mariji Niki Lovšin, univ. dipl. kem. Hvala tudi ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za njihovo pomoč, prijaznost in potrpežljivost.

Posebna zahvala za vso podporo in spodbudo gre tudi mojim domačim in partnerju Robiju.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Marije Nike Lovšin, univ. dipl. kem.

Zupančič Maja

KAZALO VSEBINE

1	Uvod	1
1.1	Kostna prenova	1
1.2	Neuravnoteženost v kostni prenovi	2
1.3	RANKL/RANK/OPG signalna pot	3
1.4	Uravnavanje izražanja gena za RANKL	6
1.5	Endogeni glukokortikoidi in njihova vloga v telesu.....	9
1.6	Glukokortikoidni receptor (GR)	10
1.7	Terapevtska uporaba glukokortikoidov in njene posledice	11
1.8	Patogeneza nastanka glukokortikoidne osteoporoze	12
2	Namen	15
3	Materiali in metode.....	16
3.1	Materiali.....	16
3.2	Metode	20
3.2.1	Molekularno kloniranje.....	20
3.2.2	Delo z bakterijami	29
3.2.3	Delo s sesalskimi celičnimi kulturami	33
4	Rezultati	46
4.1	Molekularno kloniranje in delo z bakterijami	46
4.1.1	Restrikcija plazmida pCMV-FLAG	46
4.1.2	Priprava inserta z zapisom za gen <i>NR3C1</i>	48
4.1.3	Ligacija gena <i>NR3C1</i> v plazmid pCMV-FLAG in pomnoževanje rekombinantne DNK v bakterijah	50
4.2	Delo s sesalskimi celičnimi linijami.....	54
4.2.1	NaDS-PAGE elektroforeza in metoda prenosa po westernu	54
4.2.2	Luciferazni test.....	55

5	Razprava.....	61
5.1	Vpliv glukokortikoidnega receptorja NR3C1 na aktivnost promotorja človeškega gena za RANKL.....	61
5.2	Uporabnost dobljenih rezultatov	65
6	Sklep.....	67
7	Viri.....	68

KAZALO SLIK

Slika 1:	Večfazni proces kostne remodelacije.....	2
Slika 2:	RANKL/RANK/OPG signalizacija.....	6
Slika 3:	1,6 kb dolga regulatorna regija človeškega gena za RANKL s pripadajočimi transkripcijskimi dejavniki in regulatornimi elementi	8
Slika 4:	Vpliv 11β-HSD na lokalno biorazpoložljivost kortizola.....	9
Slika 5:	Proteinska struktura glukokortikoidnega receptorja NR3C1	10
Slika 6:	Slikovni prikaz negativnih glukokortikoidnih učinkov na kosti	14
Slika 7:	Neubauerjeva komora in mreža kvadrantov za štetje celic	35
Slika 8:	Shematski prikaz transfekcije z uporabe PolyJetTM In Vitro DNA Transfection Reagent-a.....	36
Slika 9:	Genska karta plazmida pCMV-FLAG	46
Slika 10:	Nukleotidno zaporedje MCS regije pCMV-FLAG s prikazanimi restriktazami in njihovimi cepitvenimi mesti.....	47
Slika 11:	Rezultat agarozne gelske elektroforeze po restrikciji pCMV-FLAG z restriktazama NotI in KpnI	48
Slika 12:	Rezultat agarozne gelske elektroforeze po pomnoževanju zapisa za gen za NR3C1 s pomočjo PCR	49
Slika 13:	Slike bakterijskih plošč posnete dan po transformaciji.....	51
Slika 14:	Rezultat agarozne gelske elektroforeze po restrikcijski analizi uspešnosti ligacije in transformacije.....	52

Slika 15: Sekvenčna analiza uspešnosti ligacije.....	53
Slika 16: Rezultat kontrole uspešnosti nanosov vzorcev z metodo prenosa po westernu z uporabo protiteles proti β -aktinu.....	54
Slika 17: Rezultat kontrole izražanja proteina NR3C1 v celicah HOS z metodo prenosa po westernu z uporabo protiteles proti FLAG oznaki.....	55

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Sekvenci uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov NotI in KpnI.....	22
Preglednica II: Receptura za pripravo PCR mešanice.....	23
Preglednica III: Program PCR pomnoževanja.....	23
Preglednica IV: Priprava restrikcijske zmesi za restrikcijo plazmida pCMV-FLAG.....	26
Preglednica V: Restrikcijska zmes za pripravo inserta.....	26
Preglednica VI: Receptura za defosforilacijo plazmida pCMV-FLAG.....	27
Preglednica VII: Priprava reakcijske zmesi za ligacijo.....	29
Preglednica VIII: Priprava reakcijske mešanice za restrikcijsko analizo.....	31
Preglednica IX: Lastnosti uporabljenih sesalskih celičnih linij HOS, HeLa in A549.....	33
Preglednica X: Primeri redčitev.....	35
Preglednica XI: Priprava reakcijske zmesi za transfekcijo celic na plošči z 12 luknjicami...	38
Preglednica XII: Priprava reakcijske zmesi za transfekcijo celic na plošči s 24 luknjicami .	43
Preglednica XIII: Uporabljene kombinacije in količine plazmidov za 1. biološko ponovitev transfekcije.....	43
Preglednica XIV: Uporabljene kombinacije plazmidov za 2. in 3. biološko ponovitev transfekcije.....	44
Preglednica XV: Relativna luciferazna aktivnost v celicah A549.....	56
Preglednica XVI: Relativna luciferazna aktivnost v celicah HeLa.....	58
Preglednica XVII: Relativna luciferazna aktivnost v celicah HOS.....	59

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Grafični prikaz relativne luciferazne aktivnosti v celicah A549	57
Graf 2: Grafični prikaz relativne luciferazne aktivnosti v celicah HeLa	58
Graf 3: Grafični prikaz relativne luciferazne aktivnosti v celicah HOS	59

POVZETEK

Glukokortikoidi so steroidni hormoni, nujno potrebni za normalen človeški razvoj in ohranjanje homeostaze v telesu, saj s signaliziranjem preko glukokortikoidnega receptorja NR3C1 vplivajo na potek številnih vnetnih, avtoimunskih in drugih bolezenskih stanj. Zaradi tega sintetični glukokortikoidi predstavljajo dragoceno in visoko učinkovito skupino protivnetnih in imunosupresivnih zdravilnih učinkovin, a njihovo terapevtsko uporabo omejujejo številni neželeni učinki. Eden izmed pomembnejših je glukokortikoidna osteoporoza, ki je definirana z močno zmanjšano formacijo kosti in njeno povečano razgradnjo, a natančen potek njenega nastanka še ni v celoti pojasnjen. Največjo uganko predstavlja molekularni mehanizem, po katerem naj bi NR3C1 vplival na ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa-B (RANKL) in posledično na aktivnost osteoklastov pri razgradnji kostnega tkiva, zato je bil namen našega raziskovalnega dela preučiti vpliv glukokortikoidnega receptorja na aktivnost promotorja človeškega gena za RANKL v treh sesalskih celičnih linijah in sicer A549, HeLa in HOS.

Z metodami tehnologije rekombinantne DNK smo pripravili plazmidni konstrukt, ki je vseboval zapis za gen *NR3C1* (pCMV-FLAG-NR3C1), in z metodo prenosa po westernu z uporabo specifičnih monoklonskih protiteles dokazali njegovo uspešno izražanje v sesalskih celicah HOS. Sledilo je merjenje vpliva NR3C1 na aktivnost promotorja človeškega gena za RANKL s pomočjo dvojnega luciferaznega testa. Za merjenje promotorske aktivnosti smo uporabili poročevalske plazmidne vektorje pGL3, ki nosijo zapis za luciferazo pod nadzorom različnih promotorjev. Za analizo aktivnosti promotorja gena za RANKL smo uporabili plazmidni konstrukt pGL3-F4, kjer je izražanje luciferaze pod vplivom 1.000 baznih parov dolge regije proksimalnega promotorja človeškega gena za RANKL. pGL3 vektorje smo skupaj s konstruktom z zapisom za NR3C1 transfecirali v tri sesalske celične linije. Dan po transfekciji smo izmerili luciferazno aktivnost. Receptor NR3C1 je vplival na povišanje promotorske aktivnosti gena za RANKL v sesalskih celičnih linijah A549 in HeLa, medtem ko je v osteokarcinomski celični liniji HOS povzročil znižano aktivnost promotorja.

Rezultati eksperimentalnega dela potrjujejo vpliv glukokortikoidnega receptorja NR3C1 na aktivnost promotorja gena za RANKL, s čimer smo raziskovanja usmerili v nadaljnje preučevanje tega celičnega mehanizma. S pridobitvijo informacije o načinu vezave in vpletenosti dodatnih regulatornih proteinov bi namreč razvoj novih učinkovin lahko potekal v smeri njihove večje učinkovitosti in selektivnosti pri doseganju želenega terapevtskega učinka z minimalnim učinkom na druge organske sisteme.

KLJUČNE BESEDE:

glukokortikoidna osteoporoza, glukokortikoidni receptor NR3C1, ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa-B (RANKL), molekulska kloniranje

ABSTRACT

Glucocorticoids are steroid hormones which are necessary for normal human development and maintenance of homeostasis in the body. With signaling through the glucocorticoid receptor NR3C1 they are regulating a number of inflammatory and autoimmune disease conditions. As a result, synthetic glucocorticoids represent a valuable and highly effective group of anti-inflammatory and immunosuppressive drugs, but their therapeutic use is limited by a number of side effects. One of the most important is glucocorticoid osteoporosis which is defined by highly reduced bone formation and its increased degradation, but the exact development of its formation is still not fully explained. The biggest puzzle represents the molecular mechanism by which NR3C1 affects receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL). Therefore, the aim of our research work was to study the effect of the glucocorticoid receptor on the activity of the human gene promoter for RANKL in three mammalian cell lines: A549, HeLa and HOS.

With methods of recombinant DNA technology we prepared a plasmid construct containing the insert NR3C1 (pCMV-FLAG-NR3C1). Its successful expression in mammalian cells was proved with western blot method using specific monoclonal antibodies. The influence of NR3C1 on the activity of the human gene promoter for RANKL was measured with a dual luciferase test. For measuring the activity of promoter reporting pGL3 vectors, which had the luciferase gene under the influence of various promoters, were used. Among them was 1.000 base pairs long region of the proximal human gene promoter for RANKL (F4 promoter). pGL3 vectors were transfected into various mammalian cell lines (A549, HeLa and HOS) together with the prepared plasmid construct (pCMV-FLAG-NR3C1) and a day after transfection the luciferase activity was measured. The NR3C1 receptor increased the activity of the human gene promoter for RANKL in A549 and HeLa mammalian cell lines, whereas in the osteocarcinoma cell line HOS caused a reduced promoter activity.

The results of the experimental work confirm the effect of the glucocorticoid receptor on the activity of the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, directing future researches into the further study of this cellular mechanism. By acquiring information about the way of binding and involvement of additional regulatory proteins, the development of new drugs could be carried out in the direction of their greater efficacy and selectivity in achieving the desired therapeutic effect with minimal effect on other organic systems.

KEY WORDS:

glucocorticoid osteoporosis, glucocorticoid receptor NR3C1, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), molecular cloning

SEZNAM OKRAJŠAV

Amp ^r	gen za rezistenco na ampicilin
ACTH	adrenokortikotropni hormon (angl. Adrenocorticotropic Hormone)
bp	bazni par
BRU	kostna remodelacijska enota (angl. Bone Remodeling Unit)
CRH	kortikoliberin (angl. Corticotropin-Releasing Hormone)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraoetna kislina
FBS	fetalni goveji serum (angl. Fetal Bovine Serum)
GIO	glukokortikoidna osteoporoza (angl. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis)
GR	glukokortikoidni receptor
GREs	glukokortikoidni odzivni elementi (angl. Glucocorticoid Responsive Elements)
LAR II	luciferazni reagent II (angl. Luciferase Assay Reagent II)
LB	Lauria Bertani
Luc	aktivnost kresničkine luciferaze
Luc2	gen za kresničkino luciferazo
MKG	mineralna kostna gostota
MCS	poliklonsko mesto (angl. Multiple Cloning Site)
OPG	osteoprotegerin
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
pDNK	plazmidna deoksiribonukleinska kislina
PLB	pufer za pasivno lizo (angl. Passive Lysis Buffer)
PTH	paratiroidni hormon
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RLA	relativna luciferazna aktivnost (angl. Relative Luciferase Activity)

RLU	relativna luciferazna enota (angl. Relative Luciferase Unit)
Rluc	renilina luciferaza
SD	standardni odklon

1 UVOD

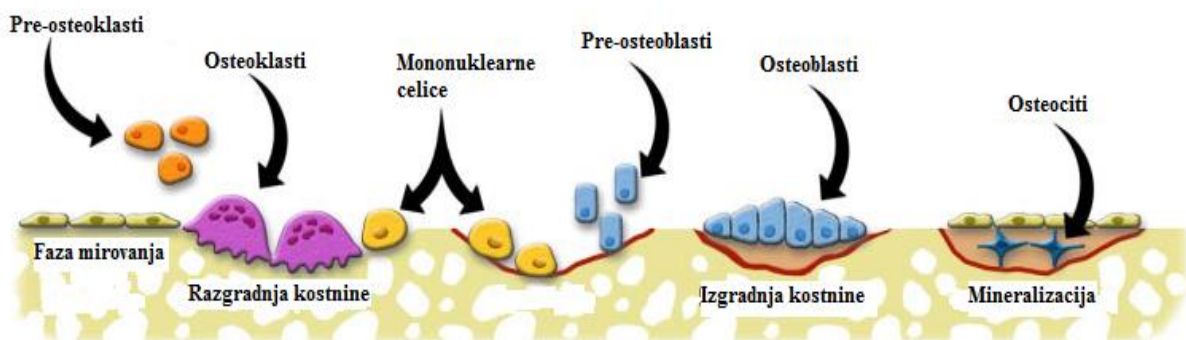
1.1 Kostna prenova

Kosti predstavljajo specializirano vezivno tkivo, sestavljeno iz organskega dela, ki daje kostem prožnost (kolagen in ne-kolagenski proteini), in mineralnega (anorganskega) dela, ki daje kostem trdnost (kalcijev hidroksi-apatit). Gre za živo tkivo, v katerem neprestano poteka intenziven biokemijski proces kostne prenove ali kostne remodelacije, s pomočjo katere se kostnina prilagaja mehanskim obremenitvam iz okolja, popravi škoda na kosteh ter ohranja homeostaza kalcija in fosfata (1). Kolagenske niti s starostjo izomerizirajo, kar vodi v njihovo togost, s procesom remodelacije pa se staro kostno tkivo zamenja z novim, s čimer se ohranja prožnost kosti. Obnova celotnega skeleta traja najmanj 10 let, saj se vsako leto zamenja 5 do 10 % kostnine (2).

V procesu kostne remodelacije sodelujejo specializirane kostne celice **osteoklasti**, ki razgrajujejo kostnino, in **osteoblasti**, ki skrbijo za njeno izgradnjo. Po začetnem zagonu razgradnje (resorpcije) kostnine je v pravilnem remodelacijskem ciklu na vrsti njena izgradnja (formacija) v enakem obsegu, a se razmerje med tema biokemijskima procesoma tekom življenja spreminja. V otroštvu in obdobju adolescence prevladuje aktivnost osteoblastov in s tem izgradnja, zato tedaj kostna masa doseže največjo mineralno kostno gostoto (MKG). Večja kot je dosežena vrednost MKG v tem obdobju, manjša je verjetnost za razvoj boleznih zmanjšane kostne mase v starosti. Med 25. in 35. letom sta procesa v ravnotežju, po 35. letu pa je razgradnja intenzivnejša od izgradnje, zato kosti postanejo krhke (2, 3).

Osteoklasti svojo nalogo razgradnje kostnine vršijo z izločanjem protonov in proteolitičnih encimov (katepsin K, kolagenaze, metaloproteinaze) v resorpcijsko lakuno. Gre za velike in večjedrne celice, ki nastajajo iz hematopoetskih celic monocitno-makrofagne vrste. V nasprotju z njimi so **osteoblasti** enojedrne celice, ki nastanejo iz mezenhimskih celic strome kostnega mozga. Delujejo počasneje kot osteoklasti, saj izgradnja kolagena tipa 1, ki predstavlja njihov glavni produkt, in drugih proteinov nastalega osteoida poteka 1–2 tedna, nato pa sledi do 3–mesečno nalaganje soli mineralov na osteoid (mineralizacija kosti). Omenjeni celični vrsti na kostni površini tvorita morfološko dinamično strukturo, imenovano kostna remodelacijska enota (angl. bone remodeling unit – BRU), kjer se vrši večfazna kostna prenova. V določenem trenutku je aktivnih približno 35 mio BRU (1, 2).

Osteociti predstavljajo mehano-senzorični sistem kostnine, saj s svojimi značilnimi izrastki omogočajo prenos dražljajev iz površine v in po tkivu, s čimer omogočajo zaznavanje potreb po kostni remodelaciji. Gre za del osteoblastov, ki ostanejo ujeti v kostnem matriksu po izgradnji kolagena. Drugi del osteoblastov ob zaključku remodelacije ostane na površini kostnine, kjer se pretvorijo v **neaktivne ploščate osteoblaste** (angl. lining cells) in tvorijo zaščitno plast. Po ustreznem mehanskem dražljaju se odmaknejo, kar razgali kost in kemotaktično privlači osteoklaste, s čimer se prične proces kostne prenovе (1–3). Večfazni proces kostne remodelacije je prikazan na Slika 1.



Slika 1: Večfazni proces kostne remodelacije (najdeno na (4)). V fazi mirovanja plast neaktivnih ploščatih osteoblastov (angl. lining cells) prekriva površino kostnine. Ob ustreznem dražljaju se ploščate celice razmaknejo in razgalijo kostno površino, kar kemotaktično privlači pre-osteoklaste. Po zbiranju in zlitju pre-osteoklastnih predhodnikov se zreli osteoklasti tesno pritrldijo na površino kostnine in s sekrecijo klorovodikove kisline ter proteolitičnih encimov razgradijo (resorbirajo) kost. Ko osteoklasti opravijo svoje delo, se odmaknejo iz erozijske lakune, njihove ostanke pa odstranijo mononuklearni fagociti. Po diferenciaciji in aktivaciji osteoblastov se prične faza izgradnje kostnine. Začetni sintezi osteoida sledi njegovo zorenje in na koncu mineralizacija. Del osteoblastov se pretvori v osteocite in ostanejo ujeti v kostnem matriksu, del pa se pretvori v neaktivne ploščate celice.

1.2 Neuravnoteženost v kostni prenovi

Uravnavanje intenzivnosti kostne prenovе, ki ohranja zdravo in mehansko kompetentno skeletno maso, je odvisno od ravnovesja v procesu resorpcije in formacije kosti. Na to vpliva število in/ali aktivnost osteoklastov in osteoblastov, ki sta uravnavana na več nivojih. V sistemsko regulacijo se vpletajo hormoni, kot so spolni, rastni in ščitnični hormoni, paratiroidni hormon (PTH), vitamin D (kalcitriol) in kortikosteroidi, med lokalne regulatorje pa spadajo številni citokini ter rastni in diferenciacijski dejavniki, med katere sodita osteoprotegerin (OPG) in ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (RANKL)

(3). Kakršna koli motnja v omenjenih regulacijskih sistemih vodi v razvoj skeletnih nenormalnosti, ki se izrazijo v povečani (osteopetroza) ali v zmanjšani kostni masi (osteoporoza) (1).

Osteoporoza je kronična degenerativna bolezen kostnega tkiva, za katero je značilno zmanjšane kostne mase s prisotnimi spremembami v mikroarhitekturi kosti. Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization – WHO) definira osteoporozo kot zmanjšanje MKG za 2,5 ali več standardne deviacije (SD) od največje MKG, dosežene v zgodnji odrasli dobi, z upoštevanjem spola in rase. Klinična pomembnost osteoporoze se zaradi krhkih in lomljivih kosti kaže v povečani verjetnosti za pojav zlomov (predvsem vretenc, zapestja in kolka) že ob najmanjših poškodbah in pri blagih padcih s stojne višine. Zaradi podaljševanja življenjske dobe število obolelih hitro narašča, kar zaradi dolgotrajnosti in zahtevnosti zdravljenja osteoporoznih zlomov predstavlja velik zdravstveni problem. Klinično sliko starejšega osteoporoznega bolnika zaradi imobilizacije ogroža še nevarnost pojava komplikacij, kot so večja verjetnost nastanka krvnih strdkov in s tem povezana tromboza ter embolija, in tudi druge internistične bolezni, kot je na primer pljučnica (2, 3, 5, 6).

1.3 RANKL/RANK/OPG signalna pot

Do odkritja RANKL/RANK/OPG signalne poti je veljalo prepričanje, da so glavni regulatorji kostne preнове osteoklasti, saj je od njihove intenzivnosti kostne resorpcije odvisna tudi aktivnost osteoblastov pri izgradnji kostnega matriksa. Povečano osteoklastno aktivnost opazimo pri mnogih osteopatskih motnjah, kot so pomenopavzalna osteoporoza, Pagetova bolezen, benigne in maligne novotvorbe kosti in revmatoidni artritis. Z odkritjem molekularne triade RANKL/RANK/OPG pa je postalo jasno, da je nastajanje in delovanje osteoklastov pravzaprav pod nadzorom celic osteoblastne vrste. Gre za regulatorni sistem, ki predstavlja enega od ključnih regulatorjev števila in aktivnosti osteoklastov, zato so se z njegovim odkritjem na področju biologije kosti odprle nove možnosti za raziskovanje tako nastanka motenj v kostnem tkivu kot njihovega preprečevanja in zdravljenja (1, 2, 7).

RANKL

Ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (angl. receptor activator of nuclear factor κ B ligand – RANKL) pripada naddružini ligandov tumorje nekrotizirajočih dejavnikov (angl. tumor necrosis factor ligand superfamily – TNFSF), ki po vezavi na svoj receptor uravnava proliferacijo in diferenciacijo celic. Gre za protein, sestavljen iz citoplazemske,

transmembranske in zunajcelične domene, kjer se nahaja vezavno mesto za receptor. Zapis zanj nosi gen *TNFSF11*, ki se izraža v kostnem mozgu, osteoblastih, osteocitih, limfocitih B in T ter v limfatičnih tkivih, kot so vranica, priželjc in limfni vozli, pa tudi v pljučih, srcu, skeletnih mišicah, mlečnih žlezah in placenti. V človeškem telesu se nahaja tako v topni kot transmembranski obliki (2, 8–10).

RANK

Receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (angl. receptor activator of nuclear factor κ B – RANK) spada v naddružino receptorjev tumorje nekrotizirajočih dejavnikov (angl. tumor necrosis factor receptor superfamily – TNFRSF). Gre za trimerni transmembranski protein, ki ga kodira gen *TNFRSF11A*. V nasprotju z RANKL je njegovo ekspresijo moč zaznati v manjšem številu tkiv in celic, kot so osteoklasti in njihovi prekurzorji, celice B in T, fibroblasti in dendritične celice. V manjši meri se izraža tudi v možganih, pljučih, srcu, skeletnih mišicah, ledvicah, jetrih in na koži. Vezavno mesto za RANKL predstavlja zunajcelična N-terminalna domena, ki vsebuje štiri s cisteinom bogate psevdoponovitve (7, 9, 10).

OPG

Osteoprotegerin (OPG) je topen protein, ki ga prav tako kot RANK uvrščamo v naddružino receptorjev tumorje nekrotizirajočih dejavnikov. Sestavljen je iz treh strukturnih domen, izmed katerih ima s cisteini bogata N-terminalna domena ključno vlogo, saj preko disulfidnih vezi omogoča dimerizacijo proteina, hkrati pa je bistvena za inhibicijo osteoklastogeneze. Osteoprotegerin se izraža v stromalnih celicah kostnega mozga, osteoblastih, limfocitih B in dendritičnih celicah ter v možganih, srcu, pljučih, koži, ledvicah in jetrih (1, 9, 10).

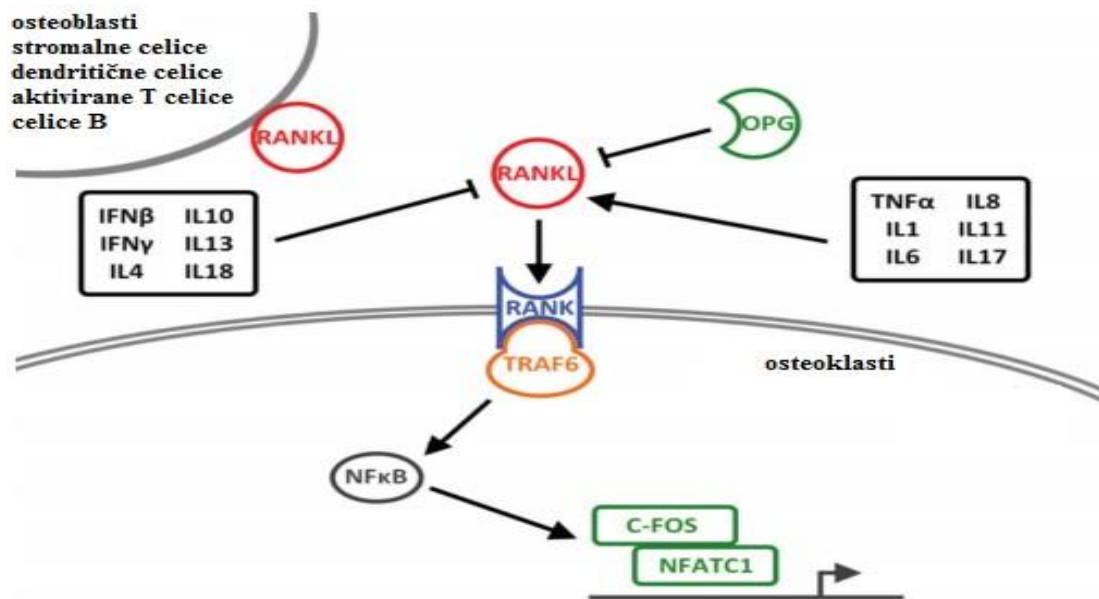
MEHANIZEM DELOVANJA

Regulacijski sistem RANKL/RANK/OPG je eden od ključnih lokalnih dejavnikov, ki preko uravnavanja procesa nastanka osteoklastov (osteoklastogeneza) in njihove aktivnosti vpliva na kostno razgradnjo. Nadzor nad osteoklasti vršijo osteoblasti, ki izločajo liganda RANKL in OPG. RANKL se veže na receptor RANK na površini osteoklastov in ob prisotnosti zadostne količine makrofagnega kolonijo stimulirajočega dejavnika (angl. macrophage colony-stimulating factor – M-CSF) povzroči njihovo proliferacijo in diferenciacijo, pospeši proces zlitja do nastanka večjedrnih celic, aktivira zrele osteoklaste in upočasni njihovo apoptozo. Omenjeni učinki so rezultat aktivacije transkripcijskih faktorjev NF κ B (jedrni dejavnik κ B) in NFATc1 (jedrni faktor aktiviranih T celic), kar vodi v povečano ekspresijo

osteoklastogenih genov. Vsi ti procesi delujejo v smeri pospeševanja kostne resorpcije in zmanjševanja kostne mase (2, 9–11).

Kot inhibitor kostne resorpcije deluje topni receptor OPG, ki z vezavo RANKL-a nevtralizira njegove biološke učinke in inhibira osteoklastogenezo, s čimer deluje v smeri povečane kostne mase (10). Na ta način osteoblasti poleg kostne formacije uravnavajo tudi proces kostne resorpcije, kar jih postavlja v vlogo glavnih regulatorjev kostne preнове. Ker OPG na kostnem tkivu izvaja učinke, nasprotujoče učinkom RANKL-a, so ravno spremembe v njunem razmerju vzrok pojava kostnih nepravilnosti. Natančen molekularni mehanizem, po katerem deluje RANKL/RANK/OPG regulacijski sistem, je predstavljen na Slika 2.

Pomembno vlogo regulacijske triade potrjuje tudi dejstvo, da je kostna homeostaza v veliki meri vodena prav s fino regulacijo razmerja med RANKL in OPG. V smeri povečane razgradnje kosti preko direktnega učinka na osteoklaste ali preko sistema RANKL/RANK/OPG delujejo PTH, vitamin D, kortikosteroidi, prostaglandin E2 in vnetni citokini kot so IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17 ter TNF α . Na drugi strani pa IFN β , IFN γ , IL-4, IL-10, IL-13, IL-18 in estrogeni preko opisanega regulacijskega sistema inhibirajo osteoklastne učinke. Upad estrogenov je eden od glavnih razlogov za razvoj pomenopavzalne osteoporoze pri ženskah. Povečano ekspresijo RANKL-a je moč zaznati tudi v malignih tumorskih celicah raka prostate, kar kaže na njegovo vpletenost v uničenje kosti pri nekaterih vrstah malignih novotvorb. Iz napisanega sledi zaključek, da lahko tako nekatera rakova obolenja kot deregulacija številnih citokinov in hormonov modulirajo kostno pre novo ravno preko vpliva na ekspresijo RANKL-a (7, 8).



Slika 2: RANKL/RANK/OPG signalizacija (prirejeno po (11)). Osteoblasti, stromalne in dendritične celice, aktivirane T celice in celice B izločajo RANKL, ki se veže na receptor RANK na osteoklastih. Po tej vezavi pride na intracelularni domeni receptorja do interakcije z adaptorskim proteinom receptorjem za tumor nekrotizirajoči faktor (angl. tumor necrosis factor receptor associated factor- TRAF6), kar vodi do aktivacije jedrnega dejavnika κB ($NF\kappa B$). Po translokaciji v jedro, $NF\kappa B$ regulira izražanje *c-Fos*, ki interagira z jedrnim faktorjem aktiviranih T celic (*NFATc1*), kar sproži prepisovanje (transkripcijo) osteoklastnih genov. Iz osteoblastov izločen topni receptor OPG z vezavo RANKL-a preprečuje naštete biološke učinke, s čimer uravnava proces kostne resorpcije. Aktivacijo RANK-a preprečujejo tudi vnetni citokini $IFN\beta$, $IFN\gamma$, IL-4, IL-10, IL-13, IL-18, medtem ko IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17 in $TNF\alpha$ z vzpodbujanjem delovanja RANKL-a delujejo osteoklastogeno.

Sistem RANKL/RANK/OPG sodeluje resda predvsem v procesu osteoklastogeneze in s tem v kostni prenovi, a prisotnost genov za proteine omenjene triade v drugih celicah in tkivih kaže na njihovo pomembno vlogo tudi v drugih bioloških procesih. Ti vključujejo preživetje in aktivacijo dendritičnih celic, aktivacijo celic T, diferenciacijo celic B, razvoj limfatičnega sistema in mlečnih žlez ter termoregulacijo pri ženskah (2).

1.4 Uravnavanje izražanja gena za RANKL

Struktura gena *TNSFS11*, ki nosi zapis za RANKL, pri ljudeh sestoji iz petih eksonov, ki obsegajo 33,9 kb (8). Nadzor nad njegovo transkripcijo oz. prepisovanjem vršijo različni regulatorni elementi, ki se nahajajo tudi do več sto baznih parov pred mestom začetka transkripcije in zagotavljajo signale, ki sodelujejo pri zagonu ali ustavitvi transkripcije. Nanje se vežejo številni regulatorni proteini imenovani transkripcijski dejavniki, ki s posebnimi

strukturnimi elementi prepoznajo in vežejo specifična zaporedja baz na kromosomu. Nekateri regulatorni proteini imajo prisotna še področja, s katerimi se vežejo na druge proteine ali pa se povezujejo med seboj, in področja, na katere se vežejo druge signalne molekule, kot so mali metaboliti ali hormoni. Le-ti s svojo vezavo povečajo ali zmanjšajo afiniteto interakcije med transkripcijskimi dejavniki in DNK, s čimer povečajo hitrost transkripcije gena oz. povzročijo njeno blokado (8, 12).

Nekatere izmed transkripcijskih faktorjev in pripadajoča vezavna mesta prikazuje Slika 3, na kateri je prikazana 1,6 kb dolga regulatorna regija, ki se nahaja pred mestom začetka transkripcije človeškega gena za RANKL. Prvi regulatorni element je t. i. TATA box (TATAAAA sekvenca), ki predstavlja vezavno mesto za transkripcijski dejavnik **II D** (TFIID). Le-ta je potreben za vezavo RNK polimeraze, ki s še dodatnimi transkripcijskimi dejavniki omogoča začetek transkripcije. **Runx2** predstavlja transkripcijski dejavnik, ki je nujno potreben pri diferenciaciji osteoblastov, transkripcijski faktor **CREB** pa je protein, ki veže Camp odzivni element (angl. Camp response element binding protein). Preko njega po aktivaciji protein kinaze A (PKA) – Camp poti svoje učinke posreduje hormon PTH. PTH je eden izmed najmočnejših spodbujevalcev izražanja RANKL v stromalnih in osteoblastnih celicah, kar dokazujejo glodalci, pri katerih so ob odsotnosti PTH dokazali biološko relevantno znižano raven ekspresije RANKL in števila osteoklastov. Naslednji pomemben stimulator ekspresije RANKL v osteoblastnih in stromalnih celicah je vitamin D, ki aktivira na vitamin D odzivne elemente (angl. vitamin D response elements – **VDREs**). Ti imajo svoje vezavno mesto na več regulatornih elementih, ki se nahajajo 16, 20, 22 in 69 kilo baz (kb) pred mestom začetka transkripcije (8). Citokini (IL-1, IL-6, TNF α in drugi), svoje učinke posredujejo preko gp130 signalnega pretvornika, ki aktivira transkripcijske dejavnike **STAT** in **MAPK** signalne poti, a njihova točna vezavna mesta še niso natančno določena. Na Slika 3 je označen tudi **C/EBP β** transkripcijski aktivator (angl. CCAAT/enhancer binding protein beta), za katerega obstajajo dokazi o vpletenosti v povečano ekspresijo RANKL in posledično povečano resorpcijo kosti pri veliko-celičnem tumorju kosti (angl. giant cell tumor – GCT) in revmatoidnem artritisu (8, 13, 14). Našteta je le peščica od stimulatorjev ekspresije RANKL, saj je veliko še nepoznanih, zaradi česar predstavljajo izziv številnim raziskovalcem regulacije izražanja gena za RANKL.

```

-1661 GAAGAAGAGGAGGAGGAGGAGGGGGAGGAGGAGACAATAAACCTACTTCCCAAAGTTAAC
-1601 AAACAAAAGAGTGGGAAGAGGTCAAAGACTACAAGGAGTAGAATTAACGTCAATTGTTTCT
                                VDRE                                CREB

-1541 ATGTTTGAGTCTGAAAATTTTTGTCCCTTCTCCACCAACCTATATATTGATACACATAT
-1481 AAATGCTAAAGGCATTTTTGAATTTGAACAGATCATTTTCTTTGTATGGCTGCCTTTAAA
-1421 AAAAATCAACCTGGTCACTCTTCTCAACATTTACTGAGGTCTAAGTGTTC AATT TAGA
                                RUNX2

-1361 ACACATGCTTTAATAACTCAGAGACCTGTCAATTTGTCACAAATCTTGCCTAGAGAAATAC
-1301 TCATTAGCGAATTAGGCAGAAAGAGGATGCAAAATAAAAAGGCACAGTAGTCCCTGATA
-1241 TCCATGGAAGACTGGTTCAGGACACCACAAACCCCTCCCCGCAAATACCAAAATCCAT
-1181 GGATGTTCAAGTTTCTTAACATATCATGGCATAGTATTTGCATTTAACCTACACACATCC
                                C/EBPβ

-1121 TCTTGACACTTGAAATTATCTTTAGATTATTTATAATACTTAATAGAATGTAATGCTA
-1061 TGTAAGTAGTTGTGTATCATTTAGGAAATGATCACAAGAAAAAAGTCTACAGATGTTAG
-1001 TCCAGACACAGCCATCCTTTTTTTTTTTTCAAAATATTTTTGATCTGTGGTTCATTGCAT
                                RUNX2

-941 CCACAGATGTGGAACCCATGGATACTGTGGGCTAACTGTATTAATAAAAAAGTGGAAACA
-881 TCCTAAGTTTCATGGGTGTTTAAATTTGGTCAAGCAACTTCCTTCTGAAGAAGTATCAGAAT
-821 TTGTGAGCAATGTTAATATTTTTGTTTTCTCACTAAGAGCCACAGTTCTGAATAGAGGTT
-761 TTTAAAAAGCCCTAGCAAGGTTTCTTTAGCAATGAAACTAACATTTAACTGTATCATCAG
-701 CTTTCGTGTTACATCTCTTTCTGACTGTTGGGTGAGCCCTCCTCGGATGCTTGCTTCTGG
-641 CTACACGCCCTTTACCCTTTCTCTGCACGTTTTTCATCTTTATAAAAGTCAGAGTTGGT
                                CREB

-581 GTCTATAGGCTCTCTACTGCCACATTCAAGACCTGCCTCGCTCAATGTCACCTTCAAGAT
-521 GCAGAAATAGGGATTTGGGAAGGGGATTGTGAAATTTTCGAAGTCTTCCAAAATACTTTG
                                C/EBPβ

-461 AGAAACTATATTTGGAAGCACTTTGGGGGGAGAGGTTGGACAGGAAGGGTCTTCAGAGAT
-401 CATCAAATTTAACTTTCTAATCCTAAGGAGGAAACCGAGACTCCAGGATGTGAAGTCCC
                                C/EBPβ

-341 TTCTCTACCAAACCTAGAATGGATGCAGGAGGAATGTCTGAGGTGCAATCCTTATCCTTFA
-281 GCAAAGGTGTCCTCTGCGTCTTCTTTAACCCTCTCTTTGGACCTCCAGAAAGACAGCTGA
-221 GGATGGCAAGGGGAGTCTGGAACCCTGGAGTAGCCCCCAGCCTCCTCCTTTGGAGGGCCC
                                RUNX2

-161 CCATGAAGGAGGCCCTTCAGTGACAGAGATTGAGAGAGAGGGGAGGGCGAAAGGAAGGAAG
-101 GGGAGCCAGAGGTGGGAGTGGAAAGAGGCAGCCTCGCCTGGGGCTGATTGGCTCCCCGAGGC
                                CCAAT-box

-41 CAGGGCTCTCCAAGCGGTTTATAAGAGTTGGGGCTGCCGGG
                                TATA-box

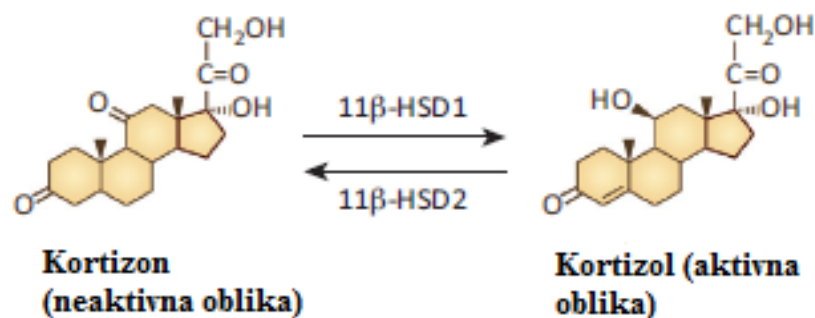
```

Slika 3: 1,6 kb dolga regulatorna regija človeškega gena za RANKL s pripadajočimi transkripcijskimi dejavniki in regulatornimi elementi (prirejeno po (13)). Prvi regulatorni element je TATA-box, ki z vezavo RNK polimeraze omogoča začetek transkripcije. Runx2 je transkripcijski dejavnik, nujno potreben pri osteoblastogenezi, preko proteina CREB in na vitamin D odzivnih elementov (VDRE) pa ekspresijo RANKL stimulirata PTH oz. vitamin D. Za povečano razgradnjo kosti pri revmatoidnem artritisu in veliko-celičnem tumorju kosti je odgovoren na sliki označen C/EBPβ transkripcijski faktor.

1.5 Endogeni glukokortikoidi in njihova vloga v telesu

Glukokortikoidi so skupaj z mineralokortikoidi predstavniki steroidnih hormonov, ki se sintetizirajo v skorji nadledvične žleze (t. i. kortikosteroidi). Regulirajo metabolizem glukoze in odziv na stres, zato jih pogosto imenujemo tudi stresni hormoni, saj se v smislu prilagoditve na stres pod njihovim vplivom sprožijo ustrezni presnovni, protivnetni in imunosupresivni učinki. Posegajo tudi na področje delovanja prebavnega, renalnega, reproduktivnega, hematopoetskega in centralnega živčnega sistema, kar jih postavlja v vlogo pomembnih regulatorjev homeostaze v telesu. Njihova sinteza in sproščanje je pod nadzorom osi hipotalamus-hipofiza-skorja nadledvične žleze (HPA os). Iz hipotalamusa sproščen kortikoliberin (CRH) stimulira izločanje kortikotropina (ACTH) iz hipofize, pod vplivom katerega skorja nadledvičnice izloča glukokortikoide. Ti z naraščajočo koncentracijo v krvi po principu negativne povratne zveze zavrejo sproščanje tako CRH iz hipotalamusa kot ACTH iz hipofize.

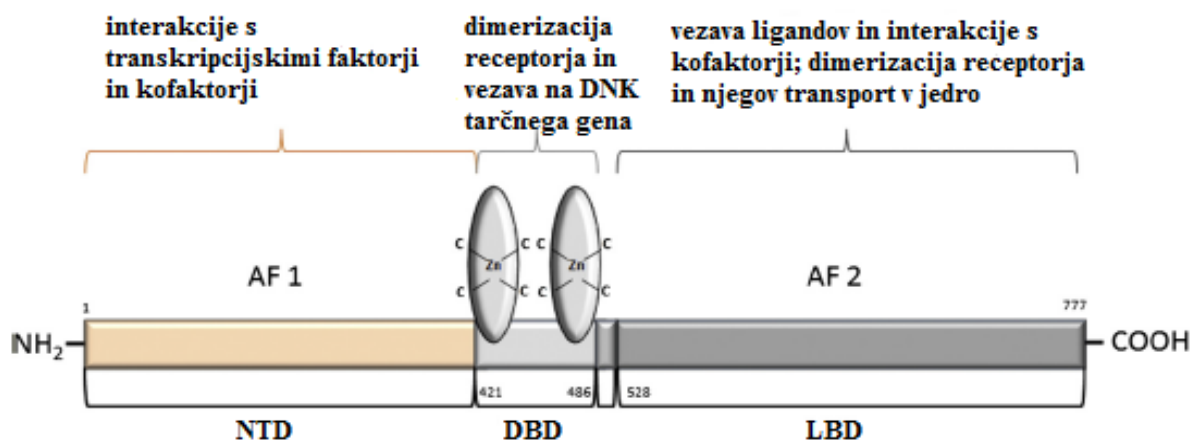
Najpomembnejši predstavnik endogenih glukokortikoidov je kortizol, saj poseduje večino glukokortikoidnih učinkov. Prostega, fiziološko aktivnega kortizola je v plazmi malo, saj ga je okoli 90 % vezanega na kortikosteroid vezoči globulin, njegovo biorazpoložljivost v tkivih pa omejuje znotraj celični metabolizem, voden s strani izoencimov 11 β -hidroksi-steroidne dehidrogenaze (11 β -HSD; prikazano na Slika 4) (15–18).



Slika 4: Vpliv 11 β -HSD na lokalno biorazpoložljivost kortizola (povzeto po (17)). Kortizon, ki predstavlja neaktivno obliko kortizola, se pod vplivom delovanja 11 β -hidroksi-steroidne dehidrogenaze 1 (11 β -HSD1) v citoplazmi celic pretvori v aktivno obliko (kortizol), ki se lahko veže na glukokortikoidni receptor in izvaja biološke učinke. V nasprotni smeri deluje 11 β -HSD2, izoencim, ki aktivno obliko pretvarja v neaktivno, s čimer preprečuje glukokortikoidne učinke. V različnih tkivih različna aktivnost obeh tipov encimov uravnava koncentracijo aktivnih oblik glukokortikoidov in s tem tkivno občutljivost na njih.

1.6 Glukokortikoidni receptor (GR)

Glukokortikoidi svoje učinke izvajajo pretežno preko vezave na glukokortikoidni receptor (GR) v citoplazmi tarčnih celic. Gre za od liganda odvisen transkripcijski faktor, ki spada v naddružino jedrnih receptorjev. Zapis zanj nosi pri ljudeh 2,5 kb velik gen *NR3C1*, ki se nahaja na kromosomu 5q31-32, in v odvisnosti od alternativnega spajanja devetega eksona kodira za različna podtipa GR (hGR α in hGR β). Večina glukokortikoidnih učinkov je posredovanih preko hGR α , zato le-ta velja za klasični GR. GR je modularni protein, sestavljen iz treh glavnih funkcionalnih domen in sicer iz N-terminalne transaktivacijske domene (NTD), centralne DNK vezavne domene (DBD) in C-terminalne ligand-vezavne domene (LBD). NTD vsebuje regijo AP1 z močno aktivacijsko funkcijo za transkripcijo, preko katere potekajo direktne interakcije s transkripcijskimi faktorji, kofaktorji in koregulatorji, preko DNK vezavne domene pa poteka vezava na specifična DNK zaporedja na promotorski regiji tarčnih genov, ki jih imenujemo glukokortikoidni odzivni elementi (angl. glucocorticoid responsive elements – GREs) (15, 17, 19, 20). Shematski prikaz strukture proteina je prikazan na Slika 5.



Slika 5: Proteinska struktura glukokortikoidnega receptorja NR3C1 (povzeto po (20)). N-terminalna domena (NTD) vsebuje transaktivacijsko domeno AP1, ki omogoča interakcije s transkripcijskimi faktorji, kofaktorji in koregulatorji. Centralna DNK vezavna domena (DBD) z dvojnimi cinkovimi prsti prepozna in veže specifična DNK zaporedja na tarčnem genu (GREs) ter omogoča dimerizacijo receptorja. Dimerizacijo omogoča tudi C-terminalna ligand-vezavna domena (LBD), ki vsebuje aktivacijsko domeno A2. Po vezavi liganda in ustreznih kofaktorjev pride do aktivacije receptorja in njegove translokacije iz citoplazme v jedro celice.

Po vezavi liganda na LBD receptorja v citoplazmi tarčnih celic pride do receptorske aktivacije in disociacije od multiproteinskega kompleksa. Kompleks hormon-receptor potuje nato v jedro, kjer se po homodimerizaciji veže na GREs ali prisotne transkripcijske faktorje. Vezava na pozitivne GREs vodi do aktivacije transkripcijskega procesa (transaktivacija) in posledično do sinteze ustreznega proteina (aneksin A1, IL-10, I κ B, serinska dehidrogenaza), medtem ko vezava na negativne GREs povzroči represijo ekspresije gena (VEGF, prostaglandini). Modulacija genske ekspresije lahko poteka tudi neodvisno od vezave aktiviranega GK na DNK tarčnega gena in sicer preko interakcij z drugimi transkripcijskimi faktorji, kot sta NF- κ B in aktivacijski protein-1 (AP1), zavora katerih naj bi vodila v zmanjšano sintezo IL-1, IL-6 in TNF α . Transaktivacija je glavni mehanizem, ki vodi do nastanka stranskih učinkov, medtem ko naj bi bila večina protivnetnih učinkov posledica transrepresije. Skladno s pleiotrofnimi učinki glukokortikoidov se gen *NR3C1* izraža praktično v vseh človeških celicah in tkivih, končni učinek pa je odvisen tako od vrste vezanega hormona kot od kombinacije, v kakršni so v času vezave kompleksa glukokortikoid-receptor na promotorsko regijo prisotni drugi transkripcijski dejavniki na promotorju tarčnih genov (15–19, 21, 22). Celični odziv na glukokortikoide naj bi bil močno odvisen tudi od konformacije jedrnega kromatina, saj le-ta pogojuje dostopnost dednega materiala za GR (19, 21–23).

Poleg zgoraj opisanih genomskih učinkov, ki se v polni meri razvijejo po nekaj urni aktivaciji receptorja, glukokortikoidi inducirajo tudi hitre negenomske signalne mehanizme. Le-ti so rezultat delovanja visokih koncentracij glukokortikoidov na membranske receptorje, sklopljene s kinaznim signalnim sistemom, oz. na receptorje v mitohondrijih, v katerih spremenijo prenos kationov in protonov (16, 19, 22).

1.7 Terapevtska uporaba glukokortikoidov in njene posledice

Sintetični glukokortikoidi (npr. deksametazon, budezonid, prednisolon) so zavrlo njihovega protivnetnega, imunosupresivnega, antiproliferativnega in antiangiogenega delovanja široko predpisovane zdravilne učinkovine pri bolezenskih stanjih, kot so kronična vnetja respiratornega trakta (astma in KOPB), mišično-skeletna obolenja (npr. revmatoidni artritis), kožne in očesne infekcije, pri rakavih obolenjih in bolnikih s transplantiranimi organi. Kljub vsem pozitivnim učinkom na številnih kliničnih področjih, pa njihovo uporabo omejuje širok repertoar stranskih učinkov. Ti so največkrat povezani z dolgotrajnim jemanjem visokih odmerkov in vključujejo spremembe na koži (tanjšanje kože, slabše celjenje ran in pogoste kožne infekcije), abdominalno debelost, glavkom in katarakto, gonadno disfunkcijo, iatrogeni

Cushingov sindrom, motnje delovanja CŽS, hipertenzijo, osteoporozo in zaostanek rasti pri otrocih (18, 24). Gre za stanja, ki jih opazimo tudi pri povečani produkciji endogenih glukokortikoidov, do katere pride bodisi zaradi staranja človeškega organizma bodisi zaradi bolezenskega obolenja (kot so npr. neiatrogeni Cushingov sindrom in tumorji nadledvičnice, hipofize ali hipotalamusa).

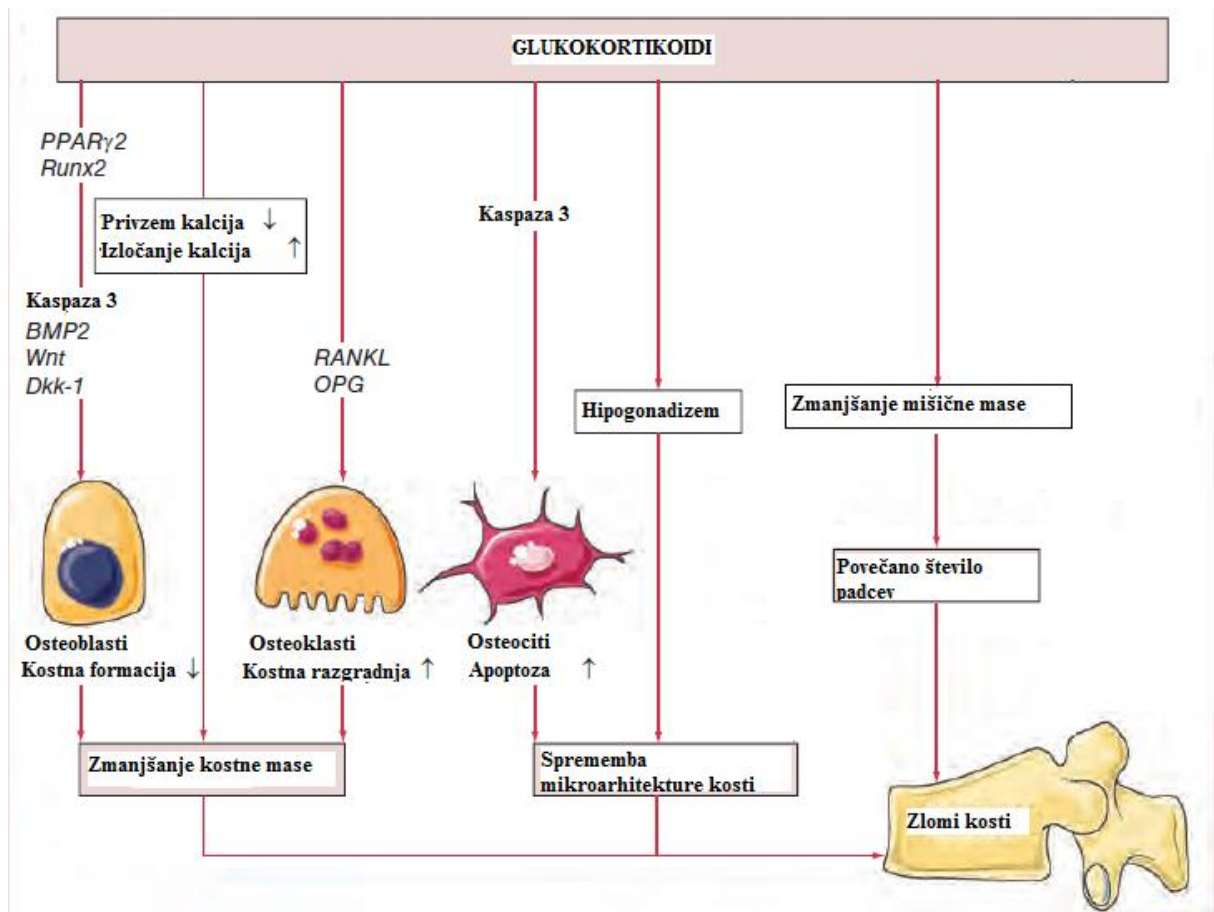
Med pomembnejše posledice povišanih koncentracij eksogenih glukokortikoidov v krvi spada glukokortikoidna osteoporozna (angl. glucocorticoid-induced osteoporosis – GIO). Učinek sintetičnih glukokortikoidov na skelet je odvisen od odmerka in trajanja terapije, obsega pa tako zaviranje tvorbe kosti in pospeševanje njene razgradnje kot tudi zmanjšanje sinteze kolagena ter rastnih faktorjev. Vsi ti učinki vodijo v zmanjšanje MKG, do njene največje izgube pa pride že v prvih 6–12 mesecih kroničnega jemanja, k čemur se pridružijo še učinki na mišično tkivo. Končni rezultat se izrazi v poslabšani kakovosti kosti, zato podatek, da tudi do polovico bolnikov, ki so na dolgotrajnem sistemskem glukokortikoidnem zdravljenju, doživi osteoporozne zlome, ni tako presenetljiv (21, 22, 25–27). Presenetljiv in zaskrbljujoč je podatek, da do njih ne pride pri vrednostih MKG, ki jih je postavila WHO pri definiciji osteoporoze, temveč že pri višjih. Najbolj so prizadeti tisti deli skeleta, kjer prevladuje trabekularna kost, zato so najpogostejši zlomi vretenc, reber in distalnih delov dolgih kosti. Ob ukinitvi glukokortikoidne terapije se kostna masa sicer poveča, a na izhodiščno vrednost se običajno ne vrne (20, 21, 25, 28).

1.8 Patogeneza nastanka glukokortikoidne osteoporoze

Patogeneza glukokortikoidne osteoporoze je zelo kompleksna, saj se direktnim učinkom na kostne celice pridružujejo tudi izvenskeletni učinki. Le-ti obsegajo povečano izločanje kalcija skozi ledvice in njegovo zmanjšano črevesno absorpcijo, do česar pride zaradi katabolnih učinkov glukokortikoidov na maščobe. Razgradnja maščob vodi namreč do manjše biorazpoložljivosti maščobotopnega vitamina D, ki je potreben za absorpcijo kalcija. To povzroči povečano izločanje PTH, ki s svojim osteoklastogenim delovanjem zagotavlja zadostno koncentracijo kalcija v serumu. Ojačanim učinkom PTH se pridruži še splošni neto katabolni učinek glukokortikoidov na ravni beljakovin organskega matriksa, ki prizadene nalaganje kostnine in pospešuje njeno resorpcijo. Katabolični učinek se izrazi tudi na skeletnih mišicah, ki kostem nudijo oporo, v njih pa glukokortikoidi zavrejo še nastajanje inzulinu podobnega rastnega dejavnika 1 (IGF-1), ki ima skupaj z rastnim hormonom pomembno vlogo pri delitvi in obnovi celic (18, 27, 28). Vsi ti izven skeletni biološki učinki

pomembno prispevajo k GIO, a glavni vir negativnih učinkov izvira iz direktnega vpliva na kostne celice.

Najizrazitejši učinek je viden na osteoblastnih celicah, v katerih ti steroidni hormoni preko inhibicije Wnt/ β katenin signalne poti zavirajo osteoblastogenezo, preko aktivacije pro-apoptotičnih genov in kaspazne signalne poti pa povzročijo njihovo apoptozo. Pri tem gre za od odmerka odvisen paradoksn efekt, saj glukokortikoidi v fizioloških pogojih spodbujajo osteoblastogenezo, s čimer prispevajo h kostni formaciji, z njihovo povečano endogeno produkcijo oz. z vnosom sintetičnih oblik pa je učinek ravno obraten. Z indukcijo adipogenega transkripcijskega faktorja PPAR γ preusmerijo diferenciacijo stromalnih celic kostnega mozga v tvorbo adipocitov, s čimer zmanjšujejo število preosteoblastnih celic, ki se lahko diferencirajo v zrele osteoblaste. Aktivacija kaspaze 3, ki predstavlja signalno pot za številne pro-apoptotične gene, je odgovorna tudi za povečano apoptozo osteocitov. K temu zaradi zmanjšane ekspresije žilnega endotelijskega rastnega faktorja (VEGF) prispeva še zmanjšana skeletna angiogeneza. Izguba osteocitov, mehano-senzoričnega sistema kostnega tkiva, vodi v zmanjšano število signalov, potrebnih za obnovo poškodovane kosti, in slabše prenašanje mehanskih obremenitev (25–27). Glukokortikoidni učinek na osteoklaste je posredovan direktno in indirektno preko učinka na osteoblastno celično linijo. Njihovo povečano število in podaljšana življenjska doba naj bi bila rezultat povečane ekspresije RANKL in M-CSF ter hkratno zmanjšanega izločanja topnega receptorja OPG iz osteoblastov, kar pozitivno vpliva na osteoklastogenezo (16). Natančen molekularni mehanizem, po katerem glukokortikoidi vplivajo na povečano ekspresijo RANKL, še ni popolnoma znan. Za razliko od pomenopavzalne osteoporoze je tako prevladujoča značilnost GIO dramatičen upad osteoblastne aktivnosti in s tem kostne formacije, medtem ko naj bi število osteoklastov ob njihovi podaljšani življenjski dobi ostalo nespremenjeno oz. le rahlo povečano (16). Nekatere izmed glukokortikoidnih učinkov na kosti slikovno predstavlja Slika 6.



Slika 6: Slikovni prikaz negativnih glukokortikoidnih učinkov na kosti (prirejeno po (26)). Glukokortikoidi svoje učinke na kosti posredujejo tako preko kostnih celic kot preko vpliva na izven skeletne mehanizme. Le-ti obsegajo zmanjšan privzem kalcija iz gastrointestinalnega trakta in njegovo povečano izločanje skozi ledvica, kar povzroči povečanje izločanja osteoklastogenega PTH. Katabolni učinek na mišične beljakovine se izrazi v zmanjšani mišični masi, ki kostem nudi oporo, zaviranje izločanja spolnih hormonov pa vodi v hipogonadizem, kar skupaj s povečano osteocitno apoptozo vodi v spremembo mikroarhitekture kosti. Tej se zaradi povečane apoptoze osteoblastov in njihove oslABLJENE funkcije ob hkratno povečani osteoklastogenezi pridruži še zmanjšana kostna masa, kar v končni fazi vodi do zlomov kosti že ob najmanjši obremenitvi.

2 NAMEN

Čeprav vloga RANKL ni omejena le na stimulacijo zorenja osteoklastov, je o njegovi genski regulaciji znanega presenetljivo malo. Uravnavanje izražanja gena za RANKL je pod vplivom transkripcijskih faktorjev, ki z vezavo na regulatorne elemente vplivajo na njegovo izražanje. Z odkritjem novih transkripcijskih faktorjev in regulatornih molekul, ki vplivajo na regulacijo izražanja gena za RANKL, bi lahko dobili boljši vpogled v genetsko uravnavanje procesa osteoklastogeneze in drugih bioloških procesov, v katere je RANKL vpleten.

Namen magistrske naloge je preučiti vpliv glukokortikoidnega receptorja NR3C1 na aktivnost promotornega gena za RANKL. V predhodnih mednarodnih študijah, npr. v ENCODE projektu (29), so ugotovili, da se NR3C1 veže na promotorsko zaporedje gena za RANKL v celični liniji pljučnega raka A549. V okviru raziskovalnega dela bomo preverjali naslednji hipotezi:

1. Glukokortikoidni receptor NR3C1 je ena izmed regulatornih molekul, ki vpliva na aktivnost promotornega gena za RANKL.
2. Glukokortikoidni receptor NR3C1 v različnih celičnih linijah različno vpliva na aktivnost promotornega gena za RANKL.

Da bi hipoteze potrdili ali ovrgli, bomo uporabili metode tehnologije rekombinantne DNK, s katerimi bomo pripravili plazmidni konstrukt z zapisom za glukokortikoidni receptor NR3C1. Nato bomo s postopkom transfekcije v sesalske celične linije vstavili plazmidni konstrukt z zapisom za NR3C1 in reporterski plazmidni konstrukt, ki vsebuje promotorsko zaporedje gena za RANKL. Po prepisovanju gena za luciferazo v prisotnosti ali odsotnosti NR3C1 v sesalskih celičnih linijah osteoblastov (celice HOS), tumorskih celicah materničnega vratu (celice HeLa) in pljučnih tumorskih celicah (celice A549), bomo z dvojnimi luciferaznimi testi izmerili vpliv glukokortikoidnega receptorja NR3C1 na aktivnost promotornega gena za RANKL.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Kemikalije:

- 10x T4 DNK ligazni pufer (NEB),
- agarozna (Sigma-Aldrich),
- akril-bisakrilamid mix (Fluka Analytical),
- amonijev persulfat- APS (Fluka Analytical),
- antibiotik ampicilin (Sigma-Aldrich),
- antibiotik/antimikotik (Gibco),
- EDTA (Sigma-Aldrich),
- enkrat prečiščena voda- dH₂O,
- etanol (Merck KgaA),
- fetalni goveji serum- FBS (Gibco),
- fosfatni pufer- PBS pufer (Lonza),
- glicin (Sigma-Aldrich),
- izopropanol (Merck KgaA),
- KCl (Sigma-Aldrich),
- Lauria-Bertani broth (Sigma-Aldrich),
- L-glutamin (Gibco),
- medij DMEM za gojenje celičnih kultur (Gibco),
- metanol (Merck KgaA),
- mleko v prahu (Fluka),
- N,N,N,N'- tetrametiletilendiamid- TEMED (Sigma-Aldrich),
- NaCl (Sigma-Aldrich),
- natrijev lavril sulfat- NaDS (Sigma-Aldrich),
- pufer CutSmart 10x (NEB),
- tripsin-EDTA (Gibco),
- tris baza (Sigma-Aldrich),
- Tween²⁰ (Sigma-Aldrich).

Označevalci velikosti, fluorescenčna barvila in fluorogeni substrati:

- označevalec velikosti nukleinskih kislin: DNA Ladder Nippon Genetics MWD01,
- proteinski standard SeeBlue[®] Plus2 Prestained Standard (Invitrogen),
- interkalirajoče fluorescentno barvilo SYBR Safe (Invitrogen),
- kemiluminiscenčni reagent SuperSignal[™] West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Invitrogen).

Bakterijski sev:

- E. coli sev TOP10 One Shot (Invitrogen).

Celične linije:

- sesalska celična linija HOS (ATCC),
- sesalska celična linija HeLa (ATCC),
- sesalska celična linija A549 (ATCC).

Protitelesa:

- primarna mišja monoklonska protitelesa proti β aktinu (Sigma-Aldrich),
- primarna mišja monoklonska protitelesa proti FLAG oznaki: Monoclonal ANTI-FLAG[®] M2 (Sigma-Aldrich),
- sekundarna kozja proti-mišja protitelesa: anti-mouse IgG (Cell Signaling).

Plazmidni vektorji:

- pK7-GR-GFP (ADDgene)- plazmidni vektor,
- pCMV-FLAG- plazmidni vektor,
- pGL3-basic (Promega),
- pGL3-SV40 (Promega),
- pGL3-F4 (pripravljen konstrukt na Katedri za klinično biokemijo, FFA, še neobjavljeno),
- pRL-SV40 (Promega).

Reagenčni kompleti:

- OIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen),
- Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (NEB),
- QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen),
- QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen),
- One Shot[®] TOP10 Chemically Competent E. coli (Invitrogen),
- AptaTaq Fast PCR Master kit (Roche),
- PureYield[™] Plasmid Midiprep System (Promega),
- PolyJet[™] In Vitro DNA Transfection Reagent (SignaGen),
- Dual-luciferase[®] Reporter Assay System (Promega).

Sestava uporabljenih pufrov in gelov:

Pufer	Sestava	
10x TBS pufer	250 mM Tris baza (pH= 7,4)	30 g
	1370 mM NaCl	80 g
	30 mM KCl	2 g
	Najprej dopolnimo z dH ₂ O do 900 mL, umerimo pH s HCl na 7,4, nato dopolnimo do 1000 mL	
1x TBS pufer	10x TBS pufer	100 mL
	dH ₂ O	do 1000 mL
Spiralni pufer za prenos western (0,1 % TTBS)	10x TBS pufer	100 mL
	Tween ²⁰	1 mL
	dH ₂ O	do 1000 mL
10x NaDS elektroforezni pufer za prenos western	Tris baza	30,25 g
	Glicin	144 g
	NaDS	10 g
	dH ₂ O	do 1000 mL
Prenašalni pufer za prenos western	10x NaDS elektroforezni pufer za prenos western	100 mL
	MeOH	200 mL
	dH ₂ O	do 1000 mL
Raztopina 5 % posnetega mleka v prahu (v/v)	Mleko v prahu	2,5 g
	1x TBS pufer	do 50 mL
Elektroforezni gel za prenos western	5 % koncentracijski gel	za 3 mL
	H ₂ O	2,10 mL
	30 % akril-bisakrilamid mix	0,50 mL
	1,5 M tris (pH= 6,8)	0,38 mL

	10 % NaDS	0,03 mL
	10 % amonijev persulfat (APS)	0,03 mL
	TEMED	0,003 mL
	8 % ločevalni gel	za 10 mL
	H ₂ O	4,0 mL
	30 % akril-bisakrilamid mix	3,3 mL
	1,5 M tris HCl (pH= 8,8)	2,5 mL
	10 % NaDS	0,1 mL
	10 % amonijev persulfat (APS)	0,1 mL
	TEMED	0,004 mL
50x TAE pufer	Tris baza	242 g
	Natehtano tris bazo raztopimo v 750 mL dH ₂ O, nato dodamo očetno kislino in EDTA	
	Očetna kislina	57,1 mL
	500 mM EDTA (pH= 8)	100 mL
	dH ₂ O	do 1000 mL
1x TAE pufer	50x TAE pufer	20 mL
	dH ₂ O	do 1000 mL

3.2 Metode

Pri celotnem laboratorijskem delu je bila zahtevana aseptična tehnika dela. Le-ta obsega nabor postopkov in tehnik, s katerimi zmanjšamo možnost vnosa mikroorganizmov iz okolja v kemikalije, gojišča in kulture mikroorganizmov, ki jih gojimo v laboratoriju (30). Uporabljali smo izključno steriliziran laboratorijski material, delovne površine pa smo vsakokrat predhodno dezinficirali s 70 % etanolom. Bakterijska gojišča, pufre in vodo smo sterilizirali v avtoklavu. Ker je pogost vir kontaminacij z mikroorganizmi ravno osebe, smo med delom ves čas nosili zaščitne rokavice in zaščitno haljo. S sesalskimi celičnimi linijami smo rokovali v komori z laminarnim pretokom zraka, z bakterijskimi pa izven komore ob prižganem plinskem gorilniku.

3.2.1 Molekulsko kloniranje

3.2.1.1 Izolacija plazmidne DNK

Priprava prekonočne kulture za izolacijo plazmida

Prekonočno kulturo smo pripravili tako, da smo v 15 mL falkonko nad plamenskim gorilnikom odpipetirali 5 mL tekočega gojišča Lauria Bertani (= LB) z dodanim ampicilinom (postopek priprave tekočega gojišča je opisan pod poglavjem: Delo z bakterijami). Vanj smo s pomočjo sterilnega nastavka za pipete nacepili eno samostojno kolonijo bakterij, ki so zrasle na selekcijskem trdnem gojišču (na agar plošči z dodanim ampicilinom), in kulturo bakterij inkubirali čez noč na 37 °C pri nežnem stresanju.

Izolacija plazmidne DNK- Miniprep

Plazmidno DNK (pDNK) smo iz prekonočne kulture izolirali po protokolu QIAprep Miniprep s pomočjo komercialno dostopnega reagenčnega kompleta OIAprep® Spin Miniprep Kit, ki nam v kratkem času omogoča izolirati do 2 µg plazmidne DNK. Izolacija temelji na alkalni lizi bakterijskih celic, ki ji sledi adsorpcija DNK na silika-gel membrano v prisotnosti visoke koncentracije soli. V ta namen smo preko-nočno kulturo prenesli v 2 mL sterilno mikrocentrifugirko in centrifugirali v namizni centrifugi Mini Centrifuge GmbH (proizvajalec Nippon Genetics) pri > 8.000 rpm 3 minute. Supernatant (gojišče) smo po centrifugiranju previdno odstranili in v mikrocentrifugirko odpipetirali preostanek prekonočne kulture. Dobljeno peletko bakterijskih celic smo resuspendirali v 250 µL pufra P1 z RNase raztopino s pomočjo vibracijskega mešalnika (IKA®Vortex Genius3), nato pa smo resuspendiranim celicam dodali 250 µL alkalnega lizirnega pufra P2. Ta vsebuje ionski detergent NaDS, ki

povzroči razpad bakterijskih membran in s tem sprostitev celične vsebine, in NaOH, ki povzroči denaturacijo kromosomske in plazmidne DNK ter proteinov. Za mešanje nismo uporabili vibracijskega mešalnika, saj bi lahko pretrgali genomsko DNK, temveč smo mešanico premešali z obračanjem mikrocentrifugirke. Če pustimo lizo potekati več kot 5 minut, se lahko zgodi ireverzibilna denaturacija plazmide DNK, zato smo po 3 minutni lizi celic reakcijo ustavili s 350 μL nevtralizacijskega pufru N3, vsebino takoj zmešali z obračanjem mikrocentrifugirke in centrifugirali pri 13.000 rpm 10 minut. Puffer N3 poleg nevtralizacije z visoko koncentracijo soli povzroči tudi precipitacijo denaturiranih proteinov, kromosomske DNK, celičnih ostankov in NaDS, medtem ko manjša plazmidna DNK renaturira in ostane topna. Med centrifugiranjem smo QIAprep kolono s silika-gel membrano prenesli v 2 mL zbiralno mikrocentrifugirko, vanjo prenesli celoten supernatant, v katerem je bila naša plazmidna DNK po 10-minutnem centrifugiranju, in centrifugirali pri 13.000 rpm 60 sekund. Po odlitju eluata smo QIAprep kolono najprej sprali s 500 μL pufru PB (odstranimo endonukleaze, ki bi lahko razgradile DNK), centrifugirali pri 13.000 rpm 60 sekund in odlili eluat. QIAprep kolono smo nato sprali še z 750 μL pufru PE (z njim odstranimo odvečno količino soli) in dvakrat centrifugirali pri 13.000 rpm 60 sekund, da smo odstranili ostanke pufru PE. Le-ta vsebuje etanol, ki lahko moti nadaljnje encimske reakcije. Po spiranju smo QIAprep kolono prenesli v novo, sterilno 1,5 mL mikrocentrifugirko, v center odpipetirali 50 μL dH_2O , pustili stati 1 minuto in ponovno centrifugirali 1 minuto pri 13.000 rpm. Tako dobljeni plazmidni DNK smo nato spektrofotometrično izmerili koncentracijo.

3.2.1.2 Spektrofotometrično merjenje koncentracije plazmidne DNK

Koncentracijo plazmidne DNK smo merili spektrofotometrično na kapljičnem spektrofotometru NanoDrop ND-1000 proizvajalca Thermo Scientific. Gre za nedestruktivno, enostavno in hitro metodo kvantifikacije nukleinskih kislin v raztopini, ki temelji na dejstvu, da organske baze v nukleinskih kislinah v raztopini absorbirajo UV-svetlobo pri valovni dolžini 260 nm. Pri merjenju ne potrebujemo kivet in velikih volumnov vzorcev. Površinska napetost, ki se ustvari med dvema optičnima vlaknoma kapljičnega spektrofotometra, drži vzorec na mestu nanosa in ustvari tekočinski valj, skozi katerega potuje svetloba (vir svetlobe je ksenonska žarnica). Prepuščeno svetlobo meri detektor s CCD kamero (Charge Coupled Device) pri valovnih dolžinah 230, 260 in 280 nm. Računalniški program nato izračuna koncentracije na podlagi Beer-Lambertovega zakona in jih poda v $\text{ng}/\mu\text{L}$ (29, 30).

Potek merjenja

Pred vsakim začetkom in po koncu merjenja smo spektrofotometer očistili z dH₂O, med samimi merjenji pa smo ga obrisali s papirjem. Ker smo pri vzorcih kot topilo uporabljali dH₂O, nam je le-ta služila za absorbanco slepe raztopine, katero smo izmerili pred merjenjem absorbance vzorcev. Njeno vrednost računalniški program odšteje od vrednosti absorbanc vzorcev. Za nanos smo potrebovali 1,5 µL vzorca. Koncentracijo plazmide DNA smo odčitali pri 260 nm, iz razmerja absorbanc A_{260}/A_{280} in A_{260}/A_{230} pa smo dobili podatke o čistosti vzorca.

3.2.1.3 Pomnoževanje zapisa za gen s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction - PCR) je hitra in specifična metoda, ki nam omogoča in vitro pomnoževanje do 10 kb dolgih odsekov DNK s pomočjo termično obstojne DNK polimeraze. Bistveno pri tej metodi je, da lahko z ustreznim načrtovanjem začetnih oligonukleotidov pomnožimo posamezni odsek DNK v kompleksni mešanici nukleinskih kislin (30).

Izvedba PCR reakcije

PCR reakcijo smo izvedli s pomočjo reagenčnega kompleta Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase po v Preglednica II napisani recepturi. Za omejitev odseka DNK, ki smo ga želeli pomnožiti, smo pri podjetju Sigma-Aldrich naročili oligonukleotidna začetnika NotInr3c1f in KpnInr3c1rev (sekvenci sta zapisani v Preglednica I). S tem smo na plazmidu pK7-GR-GFP območje pomnoževanja omejili na zapis za gen *NR3C1*.

Preglednica I: Sekvenci uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov NotI in KpnI

Ime	Sekvenca (5`-3`)
NotInr3c1f	5` ATGCGCGGCCGCAATGGACTCCAAAGAATCATTAACCTCCTGGT 3`
KpnInr3c1rev	5` GCATGGTACCCTTTTGATGAAACAGAAGTTTTTTGATATTTCCA TT 3`

Preglednica II: Receptura za pripravo PCR mešanice

Sestavina	Volumen
dH ₂ O	10,5 µL
5x Q5 reakcijski pufer (NEB)	5,00 µL
5x Q5 High GC Enhancer (NEB)	5,00 µL
10 µM istosmerni oligonukleotidni začetnik (NotInr3c1f)	1,25 µL
10 µM protismerni oligonukleotidni začetnik (KpnInr3c1rev)	1,25 µL
10 mM zmes vseh štirih deoksinukleotidov (dNTPs)	0,500 µL
pDNK (pk7-GR-GFP; c=47 ng/µL)	1,00 µL
Q5 High-Fidelity DNK polimeraza	0,500 µL
Celokupni volumen	25,0 µL

V izogib kontaminaciji smo reakcijsko zmes pripravili v PCR komori, ki smo jo predhodno očistili s 70 % etanolom, za tem pa smo prižgali še UV luč za 20 minut. Reagente, ki smo jih potrebovali za reakcijo, smo med pripravo hranili na ledu in jih pred uporabo premešali na vibracijskem mešalniku (z izjemo encima). Reakcijsko zmes smo pripravili v 0,2 mL sterilnih mikrocentrifugirkah po zgoraj napisanem vrstnem redu reagentov. Nazadnje smo v mešanico odpipetirali encim. Pomnoževanje je potekalo v cikličnem pomnoževalniku 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) po programu, ki smo ga prilagodili glede na dolžino matrične DNK (Preglednica III).

Preglednica III: Program PCR pomnoževanja

Začetna denaturacija	95 °C	4min
Prileganje in podaljševanje (30 ciklov)	95 °C	15 s
	55 °C	15 s
	72 °C	1 min 30s
Zaključno podaljševanje	72 °C	10 min
Ohlajanje	4 °C	∞

Uspešnost pomnoževanja oz. prisotnost zelenega pomnoženega odseka smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu.

3.2.1.4 Agarozna gelska elektroforeza

Elektroforeza pomeni ločevanje nabitih molekul v električnem polju in je standardna metoda za ločevanje in čiščenje molekul DNK različnih velikosti. Molekula DNK je zaradi prisotnih fosfatnih skupin negativno nabita in v električnem polju potuje proti pozitivno nabiti elektrodi- anodi. Zaradi velikosti DNK za ločevanje uporabljamo manj premrežen gel iz agaroze. Ločitev molekul poteka na osnovi velikosti, pri čemer krajši fragmenti lažje potujejo skozi zamrežen gel agaroze, zato v istem času prepotujejo daljšo pot kot večji fragmenti. Detekcija DNK po elektroforezi poteka s pomočjo interkalirajočih fluorescenčnih barvil, ki se vstavijo v dvovertične nukleinske kisline in pri vzburjanju z UV svetlobo emitirajo vidno svetlobo. Ker gre za nedestruktivno separacijsko metodo, lahko DNK molekule po ločitvi izrežemo iz gela in uporabimo za molekulsko kloniranje (29, 30).

Priprava 1 % agaroznega gela

Koncentracija agaroze določa stopnjo premreženosti gela, zato je pomemben dejavnik, ki vpliva na ustrezno ločbo fragmentov. Ker je znašala velikost DNK fragmentov, ki smo jih v okviru raziskovanja ločevali, 2 do 7 kb, smo za učinkovito ločevanje uporabljali 1 % agarozni gel.

V čisto erlenmajerico s širokim vratom smo natehtali ustrezno količino agaroze in ji dodali 1x TAE pufer. Zmes smo segrevali v mikrovalovni pečici toliko časa, da se je agarozna popolnoma raztopila. Ko se je raztopljena agarozna mešanica dovolj ohladila, smo vanjo v digestoriju odpipetirali barvilo SYBR Safe v razmerju 1 : 10.000 in rahlo premešali. Mešanico smo vlili v očiščen veliki nosilec za gel, ki smo ga predhodno dobro vpeli v kadičko, in vstavili glavniček za tvorbo desetih vdolbinic oz. žepkov. Po 45. minutah oz. ko se je gel strdil, smo odstranili glavniček in gel na nosilcu prenesli v očiščeno elektroforezno kadičko.

Postopek elektroforeze

V elektroforezno kadičko smo vlili toliko 1x TAE pufru (zagotavlja ustrezen pH in nabite delce, ki omogočajo električno prevodnost medija), da je bil gel popolnoma potopljen. V vdolbinice v gelu (žepke) smo previdno nanesti 4 μ L standarda velikosti DNK (uporabljen DNA Ladder Nippon Genetics MWD01) in celokupne volumne naših vzorcev, ki smo jih predhodno zmešali s 6-kratnim nanašalnim pufrom. Glicerol v nanašalnem pufru poveča viskoznost vzorca in olajša njegovo nanašanje v žepke, barvna indikatorja ksilen cianol in bromfenol modro pa obarvata vzorec in omogočita spremljanje potovanja DNK. Elektroforeza, ki pri agarozni poteka horizontalno, je potekala pri konstantni napetosti 80 V

toliko časa, da je pas modrega barvila dosegel $\frac{3}{4}$ dolžine gela. Po končani elektroforezi smo nosilec z gelom prenesli v aparat G-Box (SYNGENE), kjer smo s programom *GeneSnap* fotografirali gel pod UV svetlobo.

3.2.1.5 Izolacija želenega fragmenta DNK (plazmida) iz agaroznega gela

Želene odseke DNK smo iz agaroznega gela izolirali s pomočjo reagenčnega kompleta QIAquick[®] Gel Extraction Kit.

Potek izolacije

Najprej smo s sterilnim skalpelom pod UV lučjo iz gela izrezali želeni DNK fragment in ga prenesli v sterilno 2 mL mikrocentrifugirko. Po tehtanju izrezanega koščka smo gelu dodali predpisan volumen pufru QG iz omenjenega reagenčnega kompleta in inkubirali v vodni kopeli pri 50 °C 10 minut oz. toliko časa, da se je gel popolnoma raztopil. Pufer QG služi temu, da se gel raztopi in zagotavlja, da se DNK kasneje veže na silika-gel membrano. Po raztapljanju smo raztopini gela dodali izopropanol v razmerju volumen izopropanola : masa gela = 1 : 1 in premešali z obračanjem mikrocentrifugirke. Tako pripravljen vzorec smo prenesli na QIAquick kolono, ki smo jo vstavili v 2 mL zbiralno mikrocentrifugirko in centrifugirali v namizni centrifugi 1 minuto pri 13.000 rpm. Dobljeni eluat smo zavrgli in na kolono zopet nanесли 500 µL pufru QG ter centrifugirali 1 minuto pri 13.000 rpm. Za spiranje kolone smo nanjo nanесли 750 µL pufru PE, počakali 2–5 minut in centrifugirali pri 13.000 rpm 1 minuto. Eluat smo zavrgli in ponovili postopek centrifugiranja, da smo se v celoti znebili etanola iz pufru PE. Kolono smo prenesli v sterilno 1,5 mL mikrocentrifugirko, za elucijo vzorca DNK na sredino odpipetirali 30 µL dH₂O, počakali 1 minuto in centrifugirali pri 13.000 rpm 1 minuto. V eluatu smo po že opisanem postopku spektrofotometrično izmerili koncentracijo DNK in vzorec do naslednje uporabe shranili na -20 °C.

3.2.1.6 Restriksijske reakcije

Za rezanje (restrikcijo) plazmidov uporabljamo restriksijske endonukleaze (restriktaze), ki na točno določenih mestih cepijo molekulo DNK. Restriktaze so encimi, ki prepoznajo 4–8 bp dolga zaporedja v dvovertični DNK in katalizirajo hidrolizo obeh vertig na vezavnem mestu ali v njegovi okolici, s čimer dobimo tope ali lepljive konce (30). Z uporabo restriktaz smo razrezali ekspresijski plazmid pCMV-FLAG in produkt PCR reakcije.

Za razrez pCMV-FLAG smo v 1,5 mL mikrocentrifugirki pripravili reakcijsko mešanico, ki jo prikazuje Preglednica IV. Izbrali smo encima NotI in KpnI (proizvajalec NEB), ki z

enkratno cepitvijo plazmida v poliklonskem mestu omogočita linearizacijo plazmida, ter pufer, v katerem imata maksimalno aktivnost. Podatek o najustreznejšem pufru smo našli na NEB internetni strani. Encima smo do uporabe hranili na ledu, v reakcijsko mešanico pa smo ju odpipetirali nazadnje.

Preglednica IV: Priprava restrikcijske zmesi za restrikcijo plazmida pCMV-FLAG

Sestavina	Volumen
pDNK (pCMV-FLAG; c= 125 ng/μL)	10 μL
dH₂O	1,5 μL
Pufer CutSmart 10x (NEB)	1,5 μL
Encim NotI (NEB)	1,0 μL
Encim KpnI (NEB)	1,0 μL
Celokupni volumen	15 μL

Tako pripravljeno zmes smo 3 ure inkubirali v vodni kopeli na 37 °C. Produkte restrikcije smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo, čemur je sledil izrez razrezanega plazmida iz gela po že opisanem postopku.

Za pripravo inserta smo zapis za gen *NR3C1* po recepturi, zapisani v Preglednica V, razrezali na enak način. Ker smo NotI in KpnI restrikcijski mesti v pomnožen zapis za gen vnesli s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov, smo za restrikcijo uporabili isti par restriktaz. S tem smo dobili lepljive konce, ki so se komplementarno prilegali razrezanemu pCMV-FLAG.

Preglednica V: Restrikcijska zmes za pripravo inserta

Sestavina	Volumen
PCR produkt (c= 6 ng/μL)	25 μL
dH₂O	9,0 μL
Pufer CutSmart 10x (NEB)	4,0 μL
Encim NotI (NEB)	1,0 μL
Encim KpnI (NEB)	1,0 μL
Celokupni volumen	40 μL

Po restrikciji je sledilo čiščenje dobljenega inserta s komercialno dostopnim reagenčnim kompletom QIAquick® PCR Purification Kit.

3.2.1.7 Defosforilacija plazmida po restrikcijski reakciji

Za defosforilacijo plazmida pCMV-FLAG po restrikciji smo uporabili telečjo črevesno alkalno fosfatazo (encim CIP; angl: Calf intestinal Alkaline Phosphatase). Ta v alkalnem mediju katalizira hidrolizo organskih monofosfatnih estrov, s čimer poteče defosforilacija oz. odvzemanje fosfatne skupine s 5'-koncev lineariziranega plazmida. S tem postopkom smo dokončno preprečili samozapiranje plazmida in ligacijo omogočili le z insertom, ki s prisotno 5' fosfatno skupino lahko tvori kovalentno vez s 3' hidroksilno skupino na plazmidu.

Potek defosforilacije

Reakcijo defosforilacije smo izvedli po navodilih proizvajalca NEB. V 1,5 mL mikrocentrifugirki smo najprej zmešali razrezan pCMV-FLAG, pufer, ki zagotavlja ustrezne pogoje za delovanje encima, in dH₂O. Po kratkem centrifugiranju smo v reakcijsko zmes odpipetirali še encim CIP in mikrocentrifugirko inkubirali v vodni kopeli na 37 °C 2,5 ure. Po poteku reakcije je sledilo čiščenje defosforiliranega plazmida po protokolu iz QIAquick®PCR Purification Kit-a in spektrofotometrično merjenje njegove koncentracije.

Preglednica VI: Receptura za defosforilacijo plazmida pCMV-FLAG

Sestavina	Volumen
pDNK (razrezan pCMV-FLAG; c= 33 ng/μL)	21 μL
Pufer CutSmart 10x (NEB)	2,5 μL
dH₂O	0,50 μL
Encim CIP (NEB)	1,0 μL
Celokupen volumen	25 μL

3.2.1.8 Čiščenje razrezanega plazmida in inserta

Pripravljen insert oz. defosforiliran plazmid pCMV-FLAG smo očistili po protokolu QIAquick® PCR Purification z uporabo kompleta QIAquick® PCR Purification Kit. Gre za reagenčni kit, s katerim lahko očistimo DNK fragmente dolge od 100 bp do 10 kb, ki jih dobimo po PCR reakciji ali drugih encimskih reakcijah. S tem se znebimo uporabljenih

encimov, soli iz pufrov in odrezanih oligonukleotidov po restrikciji ter oligonukleotidnih začetnikov in nepomnoženih DNK fragmentov iz PCR reakcije.

Potek čiščenja

Celokupnemu volumnu dobljenega DNK fragmenta iz gela smo dodali 5 volumnov pufru PB, ki s pravo koncentracijo soli in ustrezno pH vrednostjo zagotavlja optimalno vezavo fragmentov na kasneje uporabljeno silika-gel membrano. Če je bila tako dobljena mešanica oranžne ali vijolične barve, smo ji dodali 10 μ L 3 M natrijevega acetata in premešali, da smo dobili rumeno barvo reakcijske mešanice, saj le-ta nakazuje na optimalno pH vrednost za kasnejšo vezavo DNK. Celoten volumen smo prenesli na QIAquick kolono s silika-gel membrano, ki smo jo vstavili v 2 mL zbiralno mikrocentrifugirko, in centrifugirali v namizni centrifugi na 13.000 rpm 1 minuto. Dobljeni filtrat smo zavrgli in kolono sprali s 750 μ L pufru PE s centrifugiranjem na 13.000 rpm 1 minuto. Postopek centrifugiranja smo po odlitju filtrata ponovili, da smo se v celoti znebili etanola, prisotnega v pufru PE. Po prenosu kolone v novo 1,5 mL mikrocentrifugirko smo DNK iz kolone eluirali z dodatkom 30 μ L dH₂O, počakali 1 minuto in centrifugirali na 13.000 rpm 1 minuto. Po spektrofotometričnemu merjenju koncentracije je sledila ligacija očiščenega inserta NR3C1 v lineariziran in defosforiliran plazmid pCMV-FLAG.

3.2.1.9 Ligacija

S postopkom ligacije smo med sabo povezali pripravljena fragmenta nukleinskih kislin, pri čemer smo dobili rekombinantno molekulo pDNK. Ligacijo smo izvedli s pomočjo encima DNK-ligaza, ki katalizira tvorbo kovalentne fosfodiesterne vezi med 5' fosfatom ene verige in 3' hidroksilno skupino druge verige DNK (30). Uporabili smo DNK-ligazo bakteriofaga T4, ki je v tehnologiji rekombinantne DNK najpogosteje uporabljena.

Potek ligacije

Pripravljen insert z zapisom za gen *NR3C1* smo v plazmid pCMV-FLAG vstavili po navodilih proizvajalca NEB s pomočjo T4 DNK-ligaze. Ker je bila koncentracija inserta po čiščenju nizka, molarno razmerje vektor : insert ni znašalo 1 : 3, kar bi bilo skladno z navodili, temveč 1 : 1,5. Delo je potekalo na ledu, s čimer smo znižali encimsko aktivnost DNaz. V 1,5 mL mikrocentrifugirki smo pripravili reakcijsko zmes, zapisano v spodnji preglednici. T4 DNA-ligazo smo iz zamrzovalnika vzeli tik pred uporabo in jo k ostalim reagentom dodali nazadnje. Tako pripravljeno zmes smo čez noč inkubirali na 4 °C.

Preglednica VII: Priprava reakcijske zmesi za ligacijo

Sestavina	Volumen
pCMV-FLAG (c= 2,6 ng/ μ L)	10,5 μ L
Insert (c= 3,4 ng/ μ L)	11,0 μ L
10x T4 DNK ligazni pufer (NEB)	2,50 μ L
T4 DNK-ligaza (NEB)	1,00 μ L
Celokupni volumen	25,0 μ L

Poleg vzorca smo pod enakimi pogoji pripravili še negativno kontrolo, ki je namesto inserta vsebovala ultra čisto vodo.

3.2.2 Delo z bakterijami

Pripravi rekombinantne molekule DNK sledi vnos v gostiteljsko bakterijsko celico, kjer lahko pride do pomnožitve pDNK. Pri genskem inženirstvu postopek vnašanja vektorskih molekul v bakterijske celice imenujemo transformacija. Zelo malo bakterijskih vrst je naravno kompetentnih, t. j. sposobnih privzeti tujo DNK, zato je pri večini bakterij potrebno kompetenco umetno inducirati (30). Za postopek transformacije smo izbrali kompetentne celice *Escherichia coli* (*E. coli*) seva TOP10, ki smo jih gojili v gojišču LB, ki vsebuje pepton, kvasni ekstrakt in natrijev klorid (NaCl).

3.2.2.1 Priprava tekočega gojišča LB z dodanim ampicilinom (gojišče LBA)

Tekoče gojišče LBA smo pripravili tako, da smo v avtoklavirano pol litrsko steklenico natehtali 8 g LB Broth praška in dodali 400 mL dH₂O. Mešanico smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C in tlaku 1,3 bare. Ko se je mešanica ohladila, smo nad plamenskim gorilnikom dodali antibiotik ampicilin, da je njegova končna koncentracija v gojišču znašala 100 μ g/mL, premešali in gojišče do uporabe shranili v hladilniku.

3.2.2.2 Priprava selektivnih LB agar plošč

Osnovo za LB agar plošče smo pripravili enako kot tekoče LB gojišče, le da smo tu dodali še 6 g agarja v prahu. Mešanico smo avtoklavirali po zgoraj napisanem programu. Ko se je mešanica nekoliko ohladila, smo ji dodali antibiotik ampicilin (100 μ g/mL), premešali in ob plinskem gorilniku vlili v plastične sterilne petrijevke. Ko se je agar strdil, smo plošče prenesli v hladilnik.

3.2.2.3 Bakterijska transformacija

Ker smo z ligacijsko zmesjo transformirali kompetentne bakterijske celice *E. coli* seva TOP10, smo transformacijo izvedli po protokolu za One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli*. Vsi postopki se morajo po navodilih proizvajalca izvajati na ledu, saj že 5–minutna inkubacija kompetentnih celic na sobni temperaturi močno zmanjša transformacijsko učinkovitost. Pomembna je tudi aseptična tehnika dela (delo poteka na sterilni delovni površini ob uporabi plinskega gorilnika in sterilnega materiala ter gojišč).

Postopek transformacije

Na ledu smo počasi odtalili 50 μ L-ski alikvot kompetentnih celic, ki je bil shranjen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, vanj takoj po odtajanju odpipetirali 5 μ L ligacijske zmesi vzorca in kontrole ter narahlo premešali. Sledila je 30 minutna inkubacija transformacijske zmesi na ledu, čemur je sledilo 45 sekundno segrevanje na $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ v vodni kopeli in nato takojšnja nekaj minutna inkubacija na ledu. Gre za postopek toplotnega šoka, s katerim smo umetno inducirali kompetenco celic *E. coli*. Toplotni šok predstavlja stres za celice in povzroči odprtje por v celični membrani, kar omogoči vstop DNK v celico. Celicam smo nato dodali 250 μ L segretega LB gojišča brez ampicilina in jih 1 uro inkubirali na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ s stresanjem na 225 rpm. Tako smo dali bakterijam, ki so sprejele plazmid, čas, da so razvile rezistenco na ampicilin, kar nam je kasneje na selektivnem agar gojišču omogočilo identifikacijo kolonij, ki so sprejele plazmid. Po 1 uri smo 100 μ L transformacijske zmesi nanесли na predhodno ogreto LBA ploščo, preostanek pa smo 5 minut centrifugirali v namizni centrifugi na 3.000 rpm. Po centrifugiranju smo večino supernatanta odstranili, v preostanku pa resuspendirali dobljeno peletko celic. Tako smo dobili skoncentrirane celice, ki smo jih po enakem postopku nanесли na predhodno ogreto selekcijsko trdno gojišče. Ko sta bili plošči suhi, smo ju ovili v alu-folijo in obrnjeni navzdol inkubirali čez noč pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2.4 Kontrola uspešnosti ligacije in transformacije

Uspešnost ligacije smo preverili na tri načine. Najprej smo dan po transformaciji vizualno pregledali plošče, z restrikcijsko analizo smo preverili, ali zrasle kolonije vsebujejo insert, nazadnje pa smo s sekvenčno analizo potrdili ustreznost nukleotidnega zaporedja odseka DNK, ki smo ga sklonirali.

Restriksijska analiza

Restriksijsko analizo smo izvedli po zgoraj opisanem postopku *Restrikcija plazmida* z encimoma NotI in KpnI. Plazmidno DNK v tem primeru predstavlja rekombinantna DNK, ki smo jo izolirali iz zraslih bakterijskih kolonij na agar plošči po protokolu QIAprep Miniprep (princip izolacije je opisan pod točko 3.2.1.1 Izolacija plazmidne DNK). Za negativno kontrolo restriksijske analize smo namesto rekombinantne DNK v eno mikrocentrifugirko odpipetirali intakten plazmid pCMV-FLAG. Po združitvi vseh komponent smo zmes 2 uri inkubirali v vodni kopeli na 37 °C.

Preglednica VIII: Priprava reakcijske mešanice za restriksijsko analizo

Sestavina	Volumen
dH₂O	3,0 µL
Pufer CutSmart 10x (NEB)	1,0 µL
pDNK	5,0 µL
Encim NotI (NEB)	0,50 µL
Encim KpnI (NEB)	0,50 µL
Celokupni volumen	10 µL

V preglednici je napisana reakcijska mešanica za restrikcijo plazmidov iz ene bakterijske kolonije, pripravili pa smo 10 reakcijskih mešanic, saj smo analizirali rekombinantno DNK izolirano iz 10 kolonij. Po končani restrikciji je sledila analiza dobljenih fragmentov z elektroforezo na agaroznem gelu in vizualizacija rezultata s fotografiranjem gela pod UV svetlobo.

Sekvenčna analiza

3 vzorce, ki smo jih dobili po izolaciji plazmidov iz 3 zraslih bakterijskih kolonij s pomočjo reagenčnega kompleta QIAprep[®] Spin Miniprep Kit, smo poslali na sekvenciranje podjetju GATC Biotech v Nemčijo, kjer so po Sangerjevi metodi določili zaporedje nukleotidov v izolirani molekuli DNK. Za sekvenčno analizo so potrebovali 5 µL plazmidne DNK s koncentracijo 80–100 ng/µL in 5 µL ustreznega oligonukleotidnega začetnika s koncentracijo 5 µM. Izbrali smo istosmerni začetnik CMVF, ki je bil komplementaren delu plazmidne DNK v MCS regiji pred začetkom nukleotidnega zaporedja za insert.

3.2.2.5 Priprava večjih količin plazmidne DNK- Midiprep

Z uporabo reagenčnega kompleta PureYield™ Plasmid Midiprep System smo iz bakterijskih celic, ki so vsebovale rekombinantno DNK, izolirali večje količine plazmidov. V osnovi gre za enake korake izolacije kot pri uporabi reagenčnega kompleta OIAprep® Spin Miniprep Kit, le da je tu količina izolirane plazmidne DNK mnogo višja. Izolacija tako vključuje korak lize bakterijskih celic, kateri sledi vezava plazmidne DNK na silika-gel membrano, le-to pa na koncu speremo in eluiramo z membrane s pomočjo vakuumu, s katerim so DNK donosi večji.

Priprava prekonočne kulture

Za pripravo prekonočne kulture smo najprej v 15 mL falkonko nad plamenskim gorilnikom odpipetirali 5 mL tekočega LBA gojišča. Vanj smo s pomočjo sterilnega nastavka za pipete nacepili eno samostojno kolonijo bakterij, ki so zrasle na agar plošči po transformaciji, in kulturo bakterij inkubirali 6 ur na 37 °C pri nežnem stresanju. Po 6-urni inkubaciji smo kulturo ob plinskem gorilniku prelili v avtoklavirano stresalno erlenmajerico, dolili še 95 mL LBA gojišča in jo čez noč inkubirali s stresanjem na 37 °C.

Postopek izolacije

100 mL prekonočne kulture, kjer so se bakterije močno namnožile, smo prelili v dve 50 mL centrifugirki in centrifugirali 10 minut pri 5.000 g v centrifugi 5415R (proizvajalec Eppendorf) z rotorjem s spremenljivim nagibom. Supernatant smo zavrgli, dobljeno peletu bakterijskih celic pa smo s pomočjo vibracijskega mešalnika resuspendirali v 3 mL Cell Resuspension Solution. Lizo celic smo napravili z dodatkom 3 mL Cell Lysis Solution, po katerem smo raztopino nežno premešali z obračanjem centrifugirke, in jo inkubirali pri sobni temperaturi 3 minute. Liziranim celicam smo po inkubacijski dobi dodali 5 mL Neutralization Solution, s katero smo ustavili reakcijo lize, nežno premešali z obračanjem centrifugirke in nato 15 minut centrifugirali pri 5.000 g. Medtem smo čistilno kolono PureYield™ Clearing column vstavili na vrh vezavne kolone s silika-gel membrano (PureYield™ Binding column) in ju skupaj vpeli na vakuumsko črpalko. V čistilno kolono smo po centrifugiranju previdno prenesli supernatant s plazmidno DNK in preostankom celične vsebine, ki se je nismo znebili s centrifugiranjem, in vklopili vakuumsko črpalko na 400 barov, da je celotna tekočina stekla skozi obe koloni. Po odstranitvi čistilne kolone, na katero so se vezali ostanki celične vsebine, smo na vezavno kolono z vezano DNK odpipetirali 5 mL Endotoxin Removal Wash ter priključili vakuumsko črpalko. S tem smo se znebili endonukleaz, ki bi lahko razgradile DNK. Kolono smo nato sprali z 20 mL Column Wash Solution z etanolom, jo priključili na

vakuum, da je raztopina stekla skozi kolono, in jo pustili priključeno na vakuumsko črpalko še dodatno minuto, da se je membrana popolnoma posušila.

Elucijo plazmidne DNK z membrane smo izvedli z eluatorjem Eluator™ Vacuum Elution Device, ki smo ga priklopili na vakuumsko črpalko, na vrh pa smo vstavili vezavno kolono. Na kolono smo nanесли 600 µL Nuclease-Free Water in zagnali vakuumsko črpalko. V dobljenem eluatu smo spektrofotometrično izmerili koncentracijo izolirane rekombinantne DNK.

3.2.3 Delo s sesalskimi celičnimi kulturami

Gojenje in delo s sesalskimi celičnimi kulturami je potekalo v celičnem laboratoriju, ki je razdeljen v območje za sprejem novega materiala in območje, kjer ni kontaminantov. Najpomembnejša oprema celičnega laboratorija je laminarij (= LAF komora), saj s HEPA filtri zagotavlja čisto delovno okolje. Pred pričetkom in po končanem delu komoro dezinficiramo s 70 % etanolom in za 20 minut prižgemo UV luč. Z etanolom dezinficiramo tudi ves potreben material in opremo, ki jo vnašamo v komoro. Da preprečimo kontaminacijo s strani osebja, pri delu obvezno uporabljamo rokavice, ki jih razkužujemo z etanolom, in nosimo zaščito za čevlje ter zaščitno haljo, ki ju uporabljamo le v celičnem laboratoriju. Celične kulture zahtevajo natančno kontrolirano okolje za gojenje, zato v ta namen uporabljamo celične inkubatorje, ki nudijo potrebne pogoje za rast, kot so temperatura, stopnja vlažnosti in raven CO₂ (31).

Raziskovalni del smo nadaljevali na treh sesalskih celičnih linijah (HOS, HeLa in A549- opisi v Preglednica IX), ki smo jih gojili v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂ v ustreznem rastnem mediju. Uporabili smo Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (= DMEM), ki smo mu dodali 10 % FBS (fetalni goveji serum), 1 % L-glutamina in 1 % antibiotik/antimikotika (preprečujeta bakterijsko in glivično okužbo gojišča). Rastni medij smo zamenjali na 2–3 dni, ob doseženi konfluentnosti pa smo celice subkultivirali.

Preglednica IX: Lastnosti uporabljenih sesalskih celičnih linij HOS, HeLa in A549

Ime celične linije	Organizem	Tkivo	Morfologija	Fenotip
HOS	Človek (deklica, obolela za osteosarkomom)	Kosti (celična kultura osteoblastov)	Mešana-fibroblastna in epiteljska	Adherentna celična linija (raste pritrjeno na površino)

HeLa	Človek (ženska z rakom na materničnem vratu)	Maternični vrat	Epitelijska	Adherentna celična linija
A549	Človek (moški s pljučnim rakom)	Pljuča	Epitelijska	Adherentna celična linija

3.2.3.1 Gojenje in subkultiviranje celičnih kultur

Uporabljene tumorske celične linije nimajo kontaktne inhibicije, zato se ne prenehajo deliti, ko v monosloju prerastejo celotno gojitveno površino. Ko dosežejo 100 % konfluentnost in nimajo več prostora za širitev, se njihova rast in razmnoževanje močno upočasnita ali celo ustavita, gojišče se iztroši, nastajati pa začnejo tudi toksični produkti. Da ohranimo zdravo, viabilno celično linijo in uspešno razmnoževanje, je potrebno celične linije subkultivirati (precepljati), predno dosežejo konfluentnost (31).

Postopek subkultiviranja

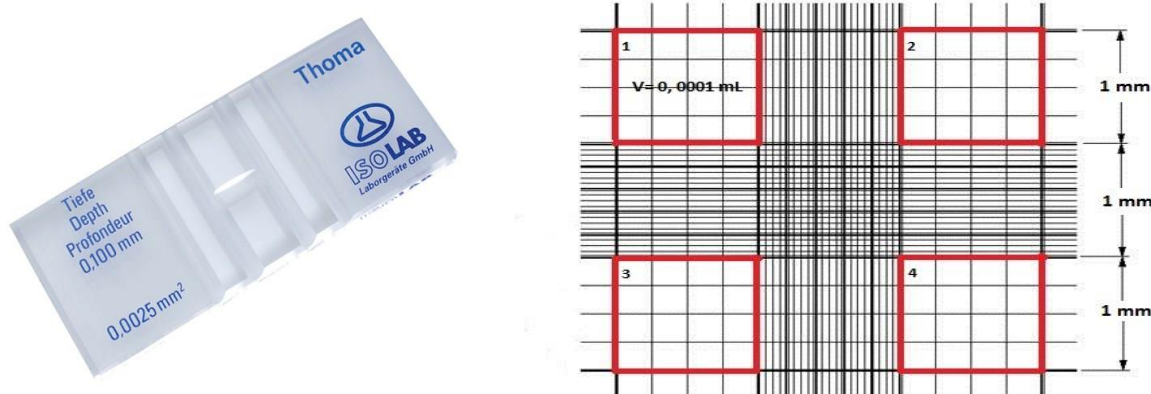
Celice smo gojili v 10-centimetrskih gojitvenih petrijevkah. Ko so prerasle 80–90 % gojitvene površine, smo jih precepili v sveže gojišče. Najprej smo jim s pipeto odstranili iztrošen medij in jih sprali s 5 mL fosfatnega pufru (PBS). Dodali smo jim 1 mL 0,25 % tripsin-EDTA, ki razgrajuje ekstracelularne proteine, s katerimi so celice pritrjene na podlago, in petrijevko za 2 minuti postavili v inkubator. Po pretečenem času smo petrijevko nežno pretresli in pod invertnim svetlobnim mikroskopom preverili, če so se celice odlepile od podlage. Z dodatkom 5 mL svežega medija DMEM s serumom smo zaustavili delovanje tripsina, celotno vsebino petrijevke prenesli v 15 mL centrifugirko in celice 5 minut centrifugirali na sobni temperaturi pri 1.000 rpm. Med centrifugiranjem smo si pripravili novo gojitveno petrijevko, na katero smo si označili datum, vrsto celične linije, številko pasaže in redčitev. Po odlitju supernatanta (medija s tripsinom) smo peletko celic nežno resuspendirali v 5 mL svežega segretega medija DMEM s serumom in ustrezen volumen tako dobljene celične suspenzije prenesli v pripravljeno gojitveno petrijevko, kjer smo ji glede na želeno redčitev dodali svež segret medij (primeri redčitev so podani v Preglednica X). Da smo celice prerazporedili po celotni površini, smo petrijevko zavrteli v obliki osmice in nato prenesli v inkubator. Preostanek celične suspenzije smo porabili za eksperiment.

Preglednica X: Primeri redčitev

Redčitev	Volumen celične suspenzije	Volumen dodanega medija	Celokupni volumen
1 : 2	5,0 mL	5,0 mL	10 mL
1 : 4	2,5 mL	7,5 mL	10 mL
1 : 10	1,0 mL	9,0 mL	10 mL

3.2.3.2 Štetje celic v Neubauerjevi komori

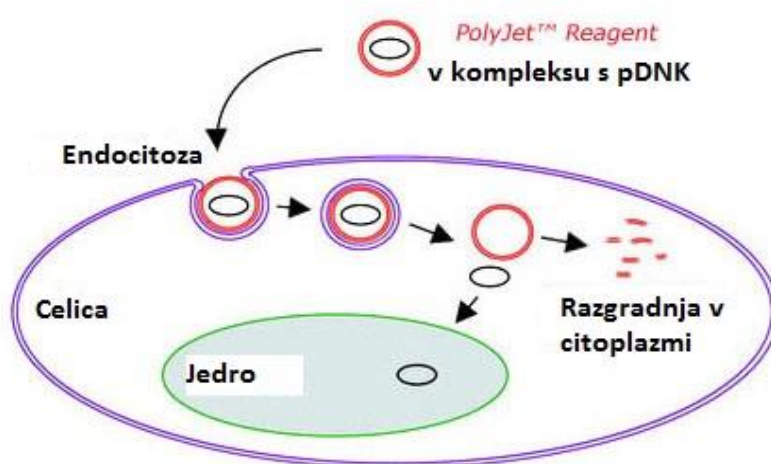
Za potrebe eksperimentov, pri katerih smo potrebovali določeno število celic, smo morali določiti koncentracijo celic v celični suspenziji. To smo storili z ročnim štetjem celic s pomočjo Neubauerjeve komore za štetje celic (Slika 7). Gre za komoro iz posebnega stekla, na katerega je vgravirana mreža kvadratov določene velikosti za štetje (Slika 7). Volumen enega kvadrata znaša $0,1 \text{ mm}^3$, kar je enako $0,1 \text{ }\mu\text{L}$. $10 \text{ }\mu\text{L}$ resuspendiranih celic smo nanесли pod krovno stekelce očiščene Neubauerjeve komore in pri tem pazili, da se niso tvorili zračni mehurčki. Celice smo pod 4-kratno povečavo invertnega svetlobnega mikroskopa prešteli v štirih večjih krajnih kvadratih na stekelcu. Z izračunom povprečnega števila celic v vseh štirih kvadratih smo dobili približno oceno celic v $0,1 \text{ }\mu\text{L}$, kar smo kasneje upoštevali pri nacepljanju celic za eksperiment.



Slika 7: Neubauerjeva komora in mreža kvadrantov za štetje celic

3.2.3.3 Transfekcija

Pojem transfekcija se nanaša na ne-virusne načine vnosa tujega genskega materiala v sesalske celice, s čimer dobimo genetsko spremenjeno celico. S tem nam je omogočeno proučevanje genske regulacije in analiza izražanja ter ugotavljanja funkcije proteinov v sesalskih celicah (31). Želen genetski material smo v celice vnesli z uporabo PolyJet™ In Vitro DNA Transfection Reagent-a, ki nam omogoča visoko učinkovitost transfekcije v številne sesalske celice ob nizki citotoksičnosti in minimalnem vplivu na fiziologijo celice, hkrati pa je tudi enostaven za uporabo. Njegovo delovanje je shematsko prikazano na Slika 8.



Slika 8: Shematski prikaz transfekcije z uporabo PolyJet™ In Vitro DNA Transfection Reagent-a (najdeno na (32)). PolyJet™ In Vitro DNA Transfection Reagent je biorazgradljiv kationski polimer, ki se veže na DNK molekulo in z njo tvori komplekse. Le-ti lahko s procesom endocitoze vstopijo v celico, znotraj katere se polimer razgradi (kemična metoda transfekcije), vnesen genetski material pa se lahko izrazi.

Nacep celic na ploščo za gojenje celic

Dan pred transfekcijo smo celice nacepili na ploščo za gojenje celic. Za gojitveno ploščo z 12 luknjicami smo potrebovali $1 * 10^5$ celic na luknjico, da smo na dan trasfekcije zagotovili 80–90 % konfluentnost rasti celic, kot zahteva uporabljena metoda transfekcije. Po zgoraj opisanem postopku smo po tripsinizaciji prešteli celice v suspenziji in po spodnjem postopku izračunali potreben volumen celične suspenzije in dodanega medija (zapisan je primer za 3 nacepitve):

- Potrebno število celic za 3 luknjice: $N = 3 * 1 * 10^5 = 300\,000$ celic.
- Ker luknjice na izbrani plošči sprejmejo 0,75 mL celic z medijem, končni volumen celične suspenzije za 3 luknjice znaša: $V_k = 3 * 0,75 \text{ mL} = 2,25 \text{ mL}$.

- Povprečno število prešteti celic na mL = začetna koncentracija celic: $c_z = 4,6 * 10^5$ celic/mL.

Volumen potrebnih celic smo izračunali po naslednjih enačbah:

Enačba 1: Izračun volumna celične suspenzije

$$c_z * V_z = c_k * V_k \text{ in } c_k = \frac{N}{V_k}$$

Legenda:

Oznaka	Pomen
c_z	začetna koncentracija celic (povprečno število prešteti celic na mL)
c_k	končna koncentracija celic na mL v luknjici
N	število potrebnih celic
V_z	potreben volumen celične suspenzije za eksperiment
V_k	končni volumen celic z medijem v luknjici

- Potreben volumen celične suspenzije: $V_z = (c_k * V_k)/c_z = (N/V_k * V_k)/c_z = 300\ 000$ celic/ $(4,6 * 10^5$ celic/mL) = 0,65 mL.
- Volumen dodanega medija: $V_m = V_k - V_z = 2,25$ mL – 0,65 mL = 1,6 mL.

Izračunana volumna celic (V_z) in medija (V_m) smo zmešali v 10 mL centrifugirki in po 0,75 mL suspenzije odpipetirali v luknjice na plošči, ki smo jo za 24 ur postavili v inkubator. Na dan transfekcije smo 30–60 minut pred samim eksperimentom celice pogledali pod invertnim svetlobnim mikroskopom in jim dodali 0,75 mL svežega segretega medija DMEM s serumom.

Postopek transfekcije

Na dan transfekcije smo z različnimi kombinacijami DNK plazmidov in PolyJet™ reagenta (količine v Preglednica XI) transfecirali izbrane sesalske celice po navodilih proizvajalca:

- Za vsako luknjico na plošči smo v 1,5 mL mikrocentrifugirko odpipetirali predpisan volumen medija DMEM brez seruma, saj le-ta moti nastanek transfekcijskih kompleksov.
- Dodali smo potrebno količino pDNK in premešali s pipetiranjem.

- V drugi mikrocentrifugirki smo v ustreznem volumnu medija DMEM brez seruma razredčili potreben volumen PolyJet™ reagenta, rahlo premešali s pipetiranjem in celoten volumen naenkrat prenesli v mikrocentrifugirko s pDNK.
- Po rahlem mešanju s pipeto smo mešanico 10–15 minut inkubirali na sobni temperaturi, da so se oblikovali kompleksi med kationskim polimerom in pDNK.
- Po inkubacijski dobi smo celotno mešanico kapljično nanegli v gojitvene luknjice s celicami, premešali z rahlim vrtinčenjem plošče v obliki osmice in celice vrnili v inkubator.

Preglednica XI: Priprava reakcijske zmesi za transfekcijo celic na plošči z 12 luknjicami

Sestavina	Količina na luknjico za ploščo z 12 luknjicami
Medij DMEM brez seruma	38 µL
pDNK	0,75 µg
PolyJet™ reagent	2,25 µL

12–18 ur po transfekciji smo celicam odstranili medij s kompleksi, saj le-ti delujejo citotoksično, in jim dodali ustrezno količino svežega segretega medija DMEM s serumom in antibiotikom.

3.2.3.4 NaDS-PAGE elektroforeza

Po pripravi rekombinantne plazmidne molekule DNK pCMV-FLAG-NR3C1 smo želeli preveriti, če se NR3C1 v sesalskih celicah uspešno izraža. V ta namen smo plazmid pCMV-FLAG z vključkom in brez njega (le-ta služi kot negativna kontrola) vnesli v celice HOS in po dveh dneh z NaDS-PAGE elektroforezo ter metodo prenosa po westernu z uporabo specifičnih monoklonskih protiteles detektirali nastale proteine.

Izolacija proteinov iz transfeciranih celic in njihovo ločevanje s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE elektroforeza)

48 ur po transfekciji smo naredili lizo celic po naslednjem postopku:

- Celice smo po odstranitvi medija najprej sprali s PBS pufrom.
- Po spiranju smo v luknjice s celicami odpipetirali 0,5 mL hladnega PBS pufra in jih s strgalom za celice nežno odlepili z dna luknjic.

- Celoten volumen pufra s celicami smo prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirke in vsebino 7 minut centrifugirali na 2.000x g v predhodno na 4 °C ohlajeni namizni centrifugi.
- Po centrifugiranju smo previdno odstranili supernatant (pufer), peletki celic pa smo dodali 20 µL Sample Loading Buffer-a (= nanašalni pufer, ki vsebuje NaDS, glicerol in barvilo bromfenol modro); ker je bil pripravljen kot 6-kratni koncentrat, smo ga predhodno ustrezno redčili v dH₂O, da smo dobili 2-kratni koncentrat (= 2 dela dH₂O in 1 del barvila), v katerem smo nežno resuspendirali celice.
- NaDS povzroči lizo celic (denaturira beljakovine na membrani), sproščene proteine pa smo dokončno denaturirali z 10–minutnim kuhanjem v termobloku na 95 °C.

Med pripravo vzorcev smo si pripravili gel. Za ločevanje proteinov v glavnem uporabljamo bolj zamrežene poliakrilamidne gele v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS), ki omogoča ločevanje proteinov na osnovi njihove velikosti. Denaturirane polipeptidne verige vežejo NaDS, zaradi česar dobijo negativni naboj. Ker je količina vezanega NaDS premosorazmerna z velikostjo peptida in neodvisna od aminokislinskega zaporedja, NaDS-peptidni kompleksi v poliakrilamidnem gelu migrirajo skladno z njihovo molekulsko maso (30). NaDS-PAGE poteka vertikalno, pri čemer je gel zgoraj in spodaj v stiku z 1x NaDS elektroforeznim pufrom, ki ga dobimo z redčenjem 50x NaDS elektroforeznega pufra.

Po že napisani recepturi smo pripravili 5 % koncentracijski (zbiralni) in 8 % ločevalni gel. TEMED, ki sproži polimerizacijo gela, smo v gel dodali tik pred vlivanjem. Med pripravljeni stekleni plošči z 0,75 mm stranskima vmesnikoma smo najprej vlili ločevalni gel in nanj odpipetirali 1 mL izopropanola, s čimer smo izravnali površino gela in preprečili dostop kisiku, ki preprečuje polimerizacijo. Po 30 minutah smo odstranili izopropanol in na ločevalni gel vlili še koncentracijskega, na vrh katerega smo vstavili glavniček za tvorbo 10 žepkov. Vlivanje mora potekati počasi in previdno, da se v gel ne ujamejo zračni mehurčki. Po strditvi gela smo stekleni plošči dobro pritrdili v elektroforezno kadičko (proizvajalec BioRad) in vanjo vlili 1x NaDS elektroforezni pufer. V vsak žepok smo odpipetirali 20 µL pripravljenega vzorca, vzporedno pa smo nanesti še 10 µL proteinskega standarda SeeBlue[®] Plus2 Prestained Standard, ki nam je služil kot označevalec velikosti. Elektroforeza je potekala 50 minut pri stalni napetosti 100 V in toku 30 mA, pri čemer so proteini potovali od katode proti pozitivni anodi.

3.2.3.5 Prenos po westernu

Proteine, ločene z NaDS-PAGE, najbolj specifično detektiramo z uporabo protiteles. Ker so protitelesa velike molekule in težko difundirajo skozi zamrežen poliakrilamid, gela ne moremo inkubirati neposredno v raztopini protiteles. Proteine moramo zato prenesti na nitrocelulozno, PDVF ali najlonsko membrano, kar lahko storimo s pomočjo pasivne difuzije ali elektroforeznega prenosa (= prenos western= »western blot«). Prenos temelji na migraciji negativno nabitih proteinov v električnem polju iz gela na površino membrane, kjer so dostopni primarnim protitelesom (30).

Postopek prenosa proteinov na nitrocelulozno membrano smo izvedli po navodilih XCell II Blot Module (Invitrogen). V ta namen smo v celici za prenos sestavili »sendvič« iz dveh gobic, filter papirja, gela in membrane ustrezne velikosti, kateri je zopet sledil filter papir in dve gobici. Vse našteje komponente smo predhodno namočili v prenašalnem pufru, v katerem je prenos tudi potekal. Celico za prenos smo skupaj s posodo z ledom vstavili v XCell II Blot Module in dolili ustrezno količino prenašalnega pufra. Prenos je potekal 1 uro pri 100 V in 355 mA.

Po končanem prenosu smo membrano 1 uro inkubirali v raztopini blokirnega sredstva, t. j. v raztopini 5 % posnetega mleka v prahu. S tem smo na membrani blokirali prosta vezavna mesta za proteine, s čimer smo preprečili kasnejšo vezavo dodatnih proteinov (npr. protiteles za detekcijo). S primarnimi mišjimi protitelesi proti β aktinu, ki se konstitutivno izraža v vseh celicah, smo najprej preverili, ali smo na membrano pri vseh treh vzorcih nanесли isto količino celičnega lizata. Ker je v tej fazi celotna površina membrane zasedena, se lahko primarna protitelesa na membrano vežejo le, če je na posameznih mestih prisoten ustrezen antigen (30). Po prekonočni inkubaciji smo nevezana primarna protitelesa sprali in membrano inkubirali v raztopini sekundarnih protiteles, ki se vežejo na primarna mišja protitelesa (kozja proti-mišja protitelesa: anti-mouse IgG) in so označena s hrenovo peroksidazo. Tako označena sekundarna protitelesa omogočajo, da ob inkubaciji membrane v raztopini ustreznega kemi-luminiscenčnega substrata na mestu vezave sekundarnih protiteles nastane svetloba, ki jo lahko zaznamo s fotografiranjem membrane v temnem prostoru. V ta namen je po spiranju nevezanih sekundarnih protiteles sledila inkubacija membrane v kemi-luminiscenčnem substratu SuperSignal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate. Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca, ga v stiku z membrano pustili 5 minut in nato membrano fotografirali v aparatu G-Box. Po spiranju smo membrano preko noči inkubirali v raztopini primarnih mišjih monoklonskih protiteles usmerjenih proti FLAG oznaki na preučevanem proteinu in po

tem še v raztopini sekundarnih kozjih protiteles označenih s hrenovo peroksidazo, ki se vežejo na uporabljena primarna mišja protitelesa. Kot označevalec velikosti detektiranih proteinov nam je služil proteinski standard SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard. Celoten postopek specifične detekcije je po blokiranju potekal na naslednji način:

Spiranje membrane v 0,1 % TTBS pufru 2x po 5 minut ob rahlem stresanju na sobni temperaturi.



Inkubacija membrane v 20 mL raztopini primarnih protiteles proti β aktinu, ki smo jih v razmerju 1 : 5.000 redčili v raztopini 5 % posnetega mleka v prahu- inkubacija je potekala čez noč na 4 °C ob rahlem stresanju.



Spiranje membrane v 0,1 % TTBS pufru 3x po 5 minut ob rahlem stresanju na sobni temperaturi, s čimer smo odstranili presežna primarna protitelesa.



Inkubacija membrane v 20 mL raztopini sekundarnih protiteles, ki smo jih v razmerju 1 : 10.000 redčili v raztopini 5 % posnetega mleka v prahu- inkubacija je potekala 1 uro na sobni temperaturi ob rahlem stresanju.



Spiranje membrane v 0,1 % TTBS pufru 3x po 3 minute ob rahlem stresanju na sobni temperaturi, s čimer smo odstranili presežna sekundarna protitelesa.



Detekcija z reagentom SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate, ki vsebuje kemiluminiscenčni substrat za hrenovo peroksidazo (luminol) in peroksidazni pufer: po inkubaciji membrane z luminolom v priloženem pufru hrenova peroksidaza oksidira luminol.



Detekcija nastale svetlobe z aparatom za detekcijo fluorescence in kemiluminiscence (G-Box).



Spiranje membrane v 0,1 % TTBS in inkubacija v 20 mL raztopini primarnih protiteles proti FLAG oznaki, ki smo jih v razmerju 1 : 1.000 redčili v raztopini 5 % posnetega mleka v prahu- inkubacija je potekala čez noč na 4 °C ob rahlem stresanju.



Spiranje membrane v 0,1 % TTBS pufru 3x po 5 minut ob rahlem stresanju na sobni temperaturi, s čimer smo odstranili presežna primarna protitelesa.



Inkubacija membrane v 20 mL raztopini sekundarnih protiteles, ki smo jih v razmerju 1 : 10.000 redčili v raztopini 5 % posnetega mleka v prahu- inkubacija je potekala 1 uro na sobni temperaturi ob rahlem stresanju.



Spiranje membrane v 0,1 % TTBS pufru 3x po 3 minute ob rahlem stresanju na sobni temperaturi, s čimer smo odstranili presežna sekundarna protitelesa.



Detekcija z reagentom SuperSignal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate.



Detekcija nastale svetlobe z aparatom za detekcijo fluorescence in kemiluminiscence- G-Box.

3.2.3.6 Luciferazni test

Vezavo in s tem vpliv glukokortikoidnega receptorja NR3C1 na izražanje gena za RANKL smo merili z uporabo poročevalskega sistema Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System. Gre za dvojni luciferazni test, ki nam omogoča hkratno izražanje in merjenje dveh poročevalskih encimov (eksperimentalna kresničkina (Luc) in kontrolna renilina (Rluc) luciferaza) v enem vzorcu. Z normalizacijo aktivnosti eksperimentalnega encimskega poročevalca z aktivnostjo interne kontrole zmanjšamo vpliv eksperimentalnega dela na dobljene rezultate in tako povečamo njihovo zanesljivost.

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili pGL3 reporterske vektorje, ki imajo vstavljen luciferazni poročevalski gen (Luc2) pod kontrolo različnih promotorjev. Skupaj s pripravljeno rekombinantno DNK pCMV-FLAG-NR3C1 oz. s praznim pCMV-FLAG smo jih v sesalske celice HOS, HeLa in A549 vnesli z uporabo PolyJet[™] In Vitro DNA Transfection Reagent-a po že opisanem postopku. Najprej smo dan pred transfekcijo na ploščo za gojenje celic s 24

luknjicami nanesti $1,2 \cdot 10^5$ celic, končni volumen resuspendiranih celic in dodanega medija pa je znašal 0,5 mL na luknjico. Na dan transfekcije smo 30–60 minut pred eksperimentom celicam dodali 0,5 mL svežega segretega medija DMEM s serumom in v 1,5 mL mikrocentrifugirkah pripravili mešanice različnih kombinacij plazmidne DNK in PolyYet™ reagenta po spodnji recepturi:

Preglednica XII: Priprava reakcijske zmesi za transfekcijo celic na plošči s 24 luknjicami

Sestavina	Količina na luknjico za ploščo s 24 luknjicami
Medij DMEM brez seruma	25 μ L
pDNK	0,50 μ g / 0,25 μ g
PolyJet™ reagent	3,0 μ L / 1,5 μ L

0,5 μ g je bila količina dodane pDNK, ki jo je predstavljala kombinacija enega izmed pGL3 vektorjev in pCMV-FLAG z vstavljenim zapisom za NR3C1 oz. praznim pCMV-FLAG (služi kot negativna kontrola). 0,25 μ g pDNA smo uporabili v primeru transfekcije celic s samo enim vektorjem, kar nam je služilo za kontrolo pravilnosti delovanja vektorjev z genom za luciferazo oz. za kontrolo luciferazne aktivnosti praznih celic in vektorja pCMV-FLAG. Temu primerno smo zmanjšali tudi količino dodanega PolyYet™ reagenta.

Na vsaki celični liniji smo izvedli tri biološke ponovitve v duplikatih. Kombinacije in količine uporabljenih plazmidov za 1. biološko ponovitev so napisane v spodnji preglednici.

Preglednica XIII: Uporabljene kombinacije in količine plazmidov za 1. biološko ponovitev transfekcije

	Prazne celice	pCMV-FLAG	pCMV-FLAG-NR3C1
pGL3-basic	250 ng	250 ng + 250 ng	250 ng + 250 ng
pGL3-basic	250 ng	250 ng + 250 ng	250 ng + 250 ng
pGL3-SV40	250 ng	250 ng + 250 ng	250 ng + 250 ng
pGL3-SV40	250 ng	250 ng + 250 ng	250 ng + 250 ng
pGL3-F4	250 ng	250 ng + 250 ng	250 ng + 250 ng
pGL3-F4	250 ng	250 ng + 250 ng	250 ng + 250 ng
Prazne celice	Prazne celice	250 ng	250 ng

Za ustrezno izvedbo luciferaznega testa smo v transfekcijske mešanice s pGL3 vektorji dodali še 20 ng pRL-SV40 vektorja, ki z zapisom za gen za renilino luciferazo (Rluc) omogoča normalizacijo dobljenega luminiscenčnega signala.

Pri prvi biološki ponovitvi smo v celice vnesli vse možne kombinacije uporabljenih plazmidov, posamezne pGL3 plazmide, samo rekombinantno DNK in prazen plazmid pCMV-FLAG, pri naslednjih dveh bioloških ponovitvah pa smo pripravili le naslednje kombinacije:

Preglednica XIV: Uporabljene kombinacije plazmidov za 2. in 3. biološko ponovitev transfekcije

	pCMV-FLAG	pCMV-FLAG-NR3C1
pGL3-basic		250 ng + 250 ng
pGL3-basic		250 ng + 250 ng
pGL3-F4	250 ng + 250 ng	250 ng + 250 ng
pGL3-F4	250 ng + 250 ng	250 ng + 250 ng

V vse transfekcijske mešanice smo dodali 20 ng pRL-SV40.

12–18 ur po transfekciji smo celicam odstranili medij s kompleksi in jim dodali 0,5 mL svežega segretega rastnega medija DMEM s serumom, 24 ur po transfekciji pa smo naredili lizo transfeciranih celic, čemur je sledilo merjenje luminiscence.

Liza celic

Lizo transfeciranih celic smo naredili s pufrom za pasivno lizo (Passive Lysis Buffer = PLB), ki je del reagenčnega kompleta. Celicam smo najprej odstranili medij in jih sprali z 0,5 mL PBS. Dodali smo 100 µL PLB pufru na luknjico in ploščo 15 minut stresali na sobni temperaturi.

Merjenje luminiscence

Med lizo celic smo po navodilih proizvajalca pripravili potrebne reagente za merjenje luminiscence:

- Luciferazni reagent (Luciferase Assay Reagent II = LAR II): vsebuje substrat in potrebne kofaktorje za potek encimske reakcije s kresničkino luciferazo (Luc).
- Stop & Glo reagent: zaustavi reakcijo, ki jo katalizira kresničkina luciferaza, in aktivira renilino luciferazo (Rluc).

V luknjice na mikrotitrski ploščici smo najprej odpipetirali pripravljen LAR II reagent (100 μL /luknjico) in nato po 25 μL celičnega lizata, pri čemer smo pazili, da ni prišlo do tvorbe zračnih mehurčkov. Tako pripravljeno ploščo smo vstavili v čitalec mikrotitrskih plošč BioTek in izmerili luminiscenco. Program merjenja smo nastavili tako, da je aparat ploščo najprej pretresel, nato pa je sledilo 10–sekundno merjenje luminiscence v vsakem vzorcu, s premorom 2 sekund med merjenji. Po meritvi kresničkine luciferaze smo ploščo vzeli iz aparata, v luknjice odpipetirali po 100 μL Stop & Glo reagenta in ponovili merjenje za renilino luciferazo. Dobljene rezultate o aktivnostih obeh encimov smo normalizirali (aktivnost Luc/aktivnost RLuc), s čimer smo zmanjšali vpliv eksperimentalnega dela na dobljene rezultate.

3.2.3.7 Statistična obdelava rezultatov

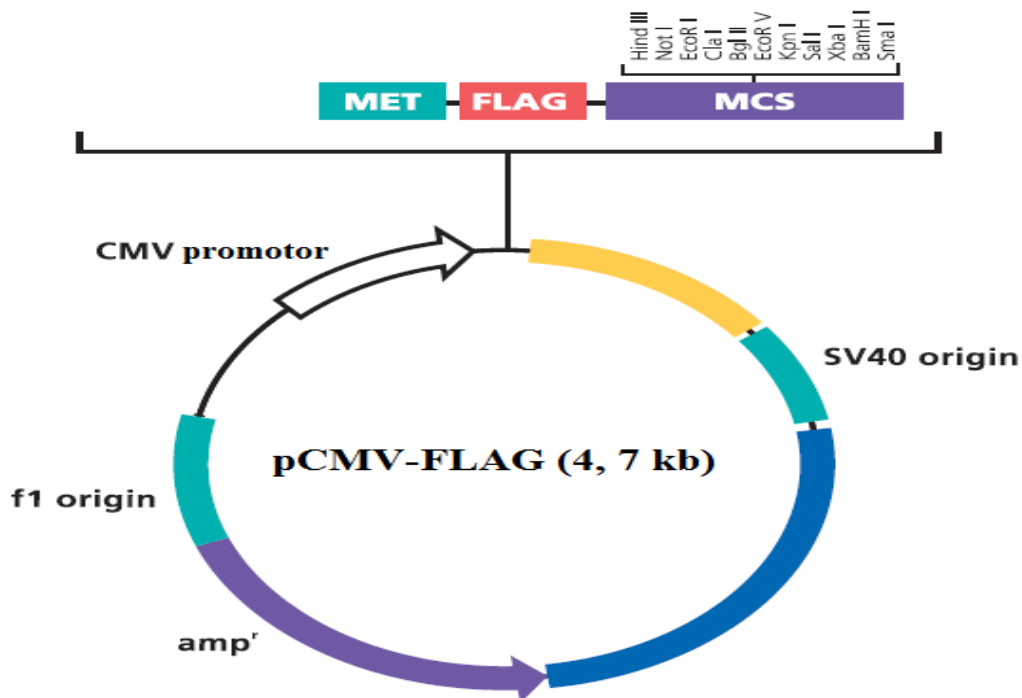
Statistično obdelavo dobljenih rezultatov smo naredili z računalniškim programom Microsoft Excel. Pri izbrani stopnji tveganja $\alpha = 0,05$ uporabljenega dvostranskega t-testa smo testirali ničelno in alternativno hipotezo o enakosti oz. neenakosti izražanja gena za luciferazo pod vplivom glukokortikoidnega receptorja NR3C1 ter le v primeru, da je bila dobljena p-vrednost manjša od α sprejeli alternativno hipotezo o neenakosti izražanja. Rezultate smo prikazali kot povprečno vrednost meritev \pm standardna deviacija iz treh bioloških ponovitev, ki smo jih na istem vzorcu izvedli v duplikatu, nato pa je sledila še grafična predstavitev rezultatov.

4 REZULTATI

4.1 Molekulsko kloniranje in delo z bakterijami

4.1.1 Restrikcija plazmida pCMV-FLAG

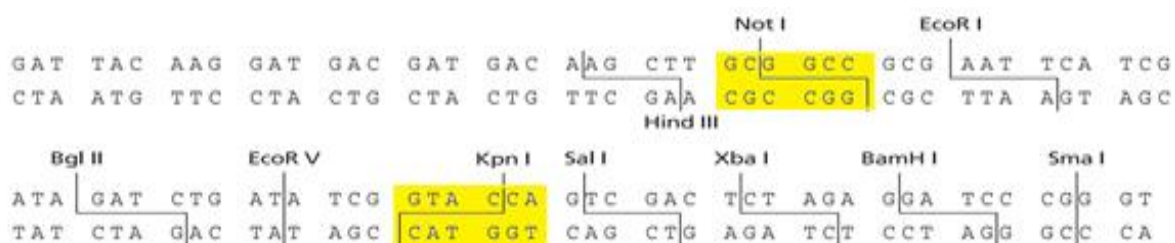
Plazmid pCMV-FLAG je komercialni ekspresijski plazmid, velik 4.700 bp, ki omogoča izražanje rekombinantnih proteinov v sesalskih celicah. Na N- koncu pred območjem z več mesti za kloniranje ima dodan podaljšek (FLAG oznako), ki se v obliki fuzijskega proteina prepiše skupaj s tarčnim proteinom, kar v kasnejših stopnjah omogoča detekcijo z vezavo protiteles (anti-FLAG protitelesa). Plazmid nosi gen za encim beta-laktamaza (amp^r), ki omogoča selekcijo bakterij z vstavljenim genom po transformaciji na gojišču, ki vsebuje ampicilin. Ker ne vsebuje negativnih selekcijskih označevalcev, ki omogočajo razlikovanje gostiteljskih celic, ki so sprejele plazmid z vstavljenim genom (insertom), od tistih, ki so sprejele prazen plazmid, je potrebno kolonije z uspešno vstavljenim genom identificirati s sekvenciranjem plazmidne DNK. Slika 9 prikazuje gensko karto plazmida pCMV-FLAG, na kateri so poleg splošnih elementov, značilnih za vse komercialno dostopne plazmide, prikazana še cepitvena mesta za restriksijske endonukleaze.



Slika 9: Genska karta plazmida pCMV-FLAG (najdeno na (33)). Vsem plazmidom je skupno mesto začetka podvojevanja (angl. origin of replication – ORI; na sliki označeno kot SV40 origin), prisotnost selekcijskih označevalcev (amp^r) in območje z več mesti za kloniranje

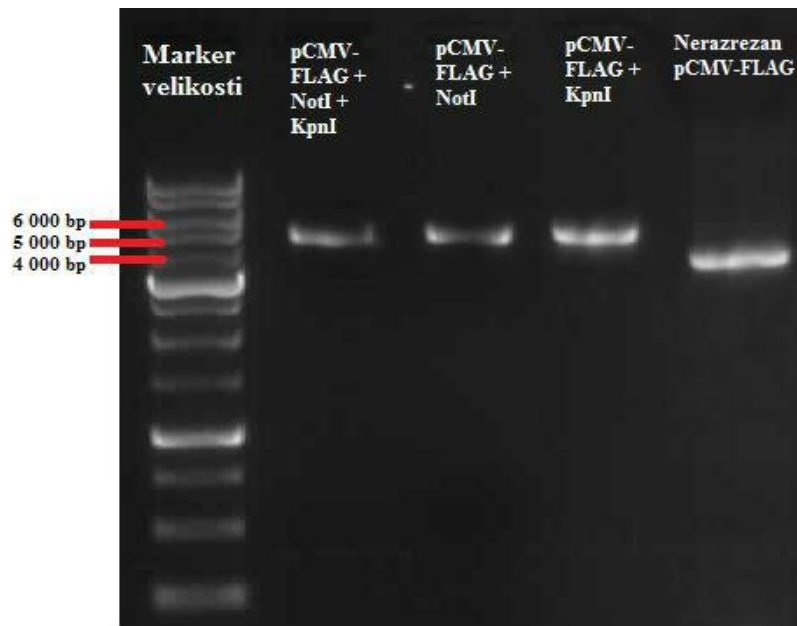
(angl. multiple cloning site, MCS). Tu se nahajajo nukleotidna zaporedja, ki jih pri pCMV-FLAG prepoznajo in cepijo napisane restriktaze. Gen za želeni protein vstavimo v mesto MCS, ki mora vsebovati zaporedje za začetek in konec translacije (START in STOP kodon). Na promotor, ki se nahaja pred območjem z več mesti za kloniranje (MCS), se veže RNK polimeraza, ki omogoča prepis gena v mRNA. Ekspresija vstavljenega gena je pri pCMV-FLAG pod nadzorom konstitutivnega promotorja CMV.

pCMV-FLAG smo razrezali z restriktazama NotI in KpnI, saj prepoznata in režeta specifično nukleotidno zaporedje, ki se nahaja le znotraj MCS regije, kar je prikazano na spodnji sliki. S tem smo dobili lineariziran plazmid z lepljivima koncema, ki se zaradi nastanka nekomplementarnih nukleotidnih baz po uporabi različnih encimov ne moreta povezati.



Slika 10: Nukleotidno zaporedje MCS regije pCMV-FLAG s prikazanimi restriktazami in njihovimi cepitvenimi mesti (najdeno na (33)). Uporabljeni encimi NotI in KpnI prepoznata označeni nukleotidni zaporedji, ki se nahajata le znotraj MCS regije plazmida in sta med seboj oddaljeni 35 bp.

Restrikcijo plazmida smo izvedli s kombinacijo obeh encimov, za negativno kontrolo nam je služil nerazrezan plazmid, za pozitivno kontrolo delovanja posameznih encimov pa smo plazmid razrezali z vsakim encimom posebjaj. Poleg vzorcev smo na gel nanesti še marker velikosti DNA Ladder Nippon Genetics MWD01. Po restrikciji je sledila agarozna gelska elektroforeza, rezultat katere prikazuje Slika 11.



Slika 11: Rezultat agarozne gelske elektroforeze po restrikciji pCMV-FLAG z restriktazama NotI in KpnI. Marker velikosti DNA Ladder Nippon Genetics MWD01 (prvi nanos) označuje lestvico 13. DNA fragmentov z znanimi dolžinami (od 250 bp pa vse do 10.000 bp), s katerimi si pomagamo pri določitvi velikosti vzorcev. Pod drugim nanosom se nahaja lisa plazmida, ki smo ga obdelali s kombinacijo obeh restriktaz. Ker režeta le 35 bp narazen, je po pričakovanjih na gelu prisotna le ena lisa pri približno 5.000 bp. Linearizirano obliko DNK dobimo tudi pri uporabi posameznih encimov (pozitivni kontroli), zato je prisotnost lise pri 5.000 bp pri tretjem in četrtem nanosu dokaz uspešnega delovanja posameznih restriktaz. Za negativno kontrolo (peti nanos) nam je služila nerazrezana krožna oblika plazmida, ki se med potovanjem skozi agarozni gel lahko dodatno zvije in zavzame manjši volumen. Posledično skozi gel potuje hitreje, zato je njegova lisa prisotna nižje kot lisa razrezanega plazmida. Njegova odsotnost pri nanosu vzorcev, obdelanih z NotI in KpnI, je dokaz popolne restrikcije plazmida z uporabljenima restriktazama.

Da smo ob ligaciji zagotovo preprečili samozapiranje lineariziranega plazmida (samoligacijo), kar naj bi sicer preprečili že z uporabo različnih restriktaz, smo razrezanemu plazmidu pCMV-FLAG po agarozni gelski elektroforezi in izolaciji iz gela s 5'-koncev odstranili fosfatno skupino. Le-ta je potrebna za tvorbo estrske vezi s 3' hidroksilno skupino pri ligaciji, zato z njeno odstranitvijo preprečimo samozapiranje plazmida. Tako je bil donor fosfatne skupine za tvorbo estrske vezi insert. Gre za reakcijo defosforilacije, ki smo jo izvedli s pomočjo telečje črevesne alkalne fosfataze (encim CIP).

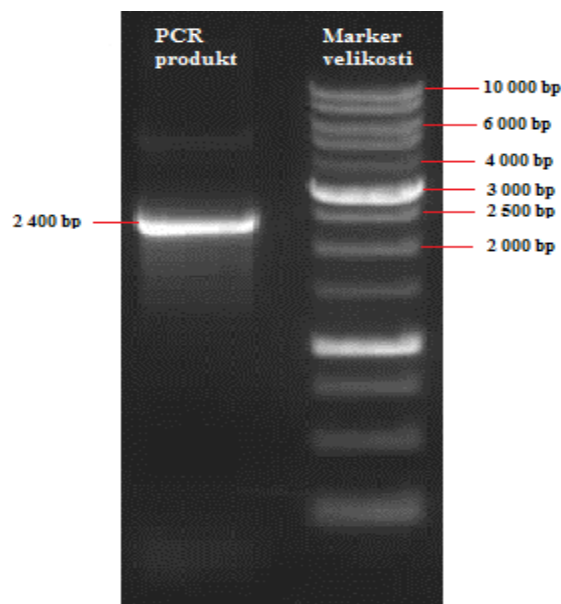
4.1.2 Priprava inserta z zapisom za gen NR3C1

Zapis za gen *NR3C1* smo naročili v obliki rekombinantnega plazmida pK7-GR-GFP preko ADDgene in je prispel v obliki bakterij na trdnem gojišču LB z dodanim ampicilinom. Po izolaciji plazmida iz bakterijskih kolonij in spektrofotometričnemu merjenju koncentracije je

sledilo pomnoževanje zapisa za gen *NR3C1* s pomočjo verižne reakcije s polimerazo. Z elektroforezo na agaroznem gelu smo potrdili prisotnost želenega pomnožka, nato pa smo po izolaciji gena iz gela le-tega razrezali z ustreznima encimoma in tako insert pripravili za kloniranje.

Pomnoževanje zapisa za gen NR3C1 s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR)

S PCR reakcijo smo iz plazmida pK7-GR-GFP z uporabo ustreznih oligonukleotidnih začetnikov pomnožili približno 2.400 bp velik zapis za NR3C1. Uporabljeni oligonukleotidni začetnika NotInr3c1f in KpnInr3c1rev sta bila načrtovana tako, da sta se deloma prilegala vsak na svoj konec gena, deloma pa nista bila komplementarna matrični DNK in sta v tem delu nosila zapis za restrikcijski endonukleazi NotI in KpnI. S tem pristopom smo pomnožili gen za glukokortikoidni receptor NR3C1 in mu hkrati dodali še restrikcijski mesti, ki smo ju kasneje uporabili za kloniranje v ekspresijski plazmid pCMV-FLAG. Prisotnost želenega pomnoženega odseka smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu, rezultat katere prikazuje Slika 12. Na gel smo nanесли celoten volumen reakcijske mešanice po PCR reakciji in marker velikosti DNA Ladder Nippon Genetics MWD01.



Slika 12: Rezultat agarozne gelske elektroforeze po pomnoževanju zapisa za gen za NR3C1 s pomočjo PCR. Pod nanosom vzorca (PCR produkt) vidimo prisotnost pomnoženega odseka pri velikosti približno 2.400 bp, kar potrjuje uspešnost pomnoževanja in prisotnost gena za NR3C1.

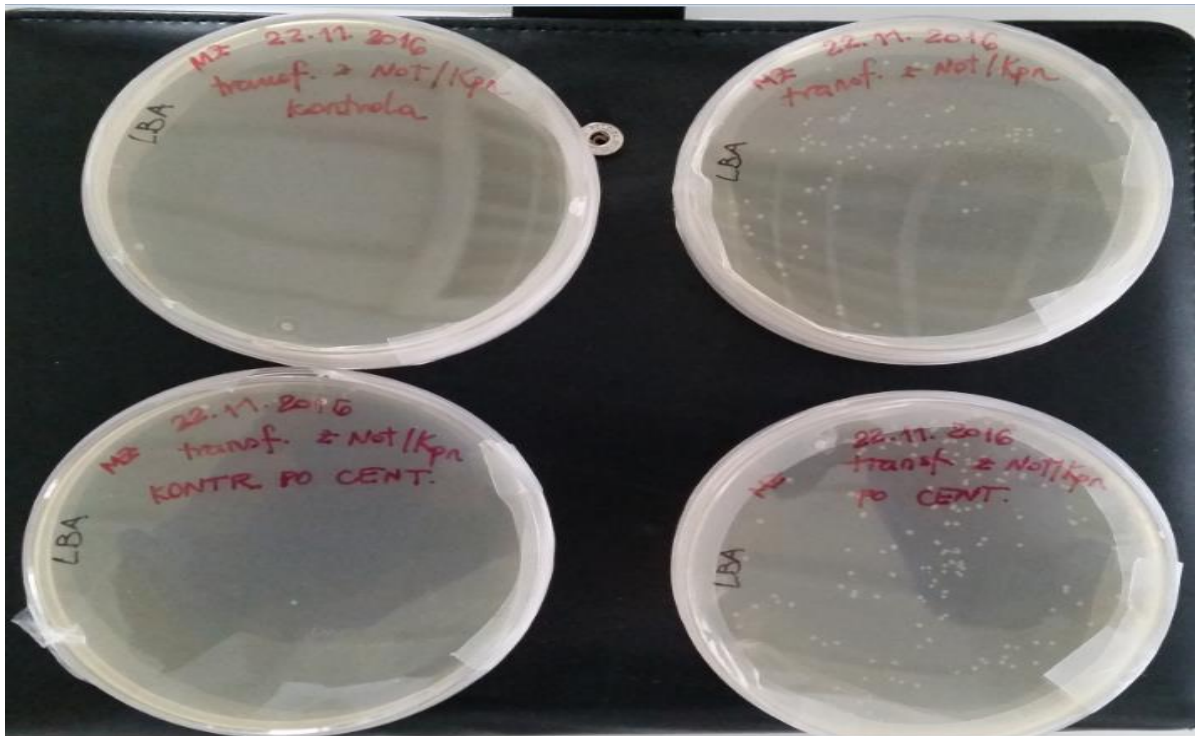
Restrikcija zapisa za gen NR3C1 z encimoma NotI in KpnI

Ker sta oligonukleotidna začetnika vsebovala nukleotidno zaporedje, ki ga prepoznata restriksijski endonukleazi NotI in KpnI in ki ga znotraj samega zapisa za gen ne najdemo, smo za restrikcijo zapisa za NR3C1 uporabili isti par encimov kot za restrikcijo pCMV-FLAG. S tem smo zagotovili kompatibilnost t. i. lepljivih koncev in prileganje želenih fragmentov DNK, s čimer nam je bila omogočena ligacija tako pridobljenega inserta v lineariziran plazmid pCMV-FLAG.

4.1.3 Ligacija gena NR3C1 v plazmid pCMV-FLAG in pomnoževanje rekombinantne DNK v bakterijah

Lineariziran plazmid pCMV-FLAG in gen z zapisom za NR3C1 smo ligirali, da je nastal rekombinanten plazmid pCMV-FLAG-NR3C1. Ligacija pomeni spajanje dveh fragmentov nukleinskih kislin različnega izvora s pomočjo encima DNK-ligaza, pri čemer dobimo rekombinantno molekulo DNK. DNK-ligaze so od ATP odvisni encimi, ki katalizirajo tvorbo kovalentne fosfodiesterne vezi med 5' fosfatom ene verige in 3' hidroksilno skupino druge verige DNK. Tako dobljen konstrukt smo vnesli v kompetentne celice *E.coli* seva TOP10 One Shot s postopkom transformacije, s čimer smo omogočili njegovo pomnožitev. Sev TOP10 One Shot ima zmanjšano možnost mobilizacije vnesenega genskega materiala, nima prisotne endonukleaze (*enda*) in ni sposoben rekombinacije (*recA*), kar omogoča večjo stabilnost vključka. Za selekcijo bakterij po transformaciji s tujo DNK smo v gojišče dodali antibiotik ampicilin. Ker je bila informacija za odpornost proti antibiotiku vezana na vstavljeno pDNK, so na gojišču zrasle le tiste bakterije, ki so tujo DNK sprejele.

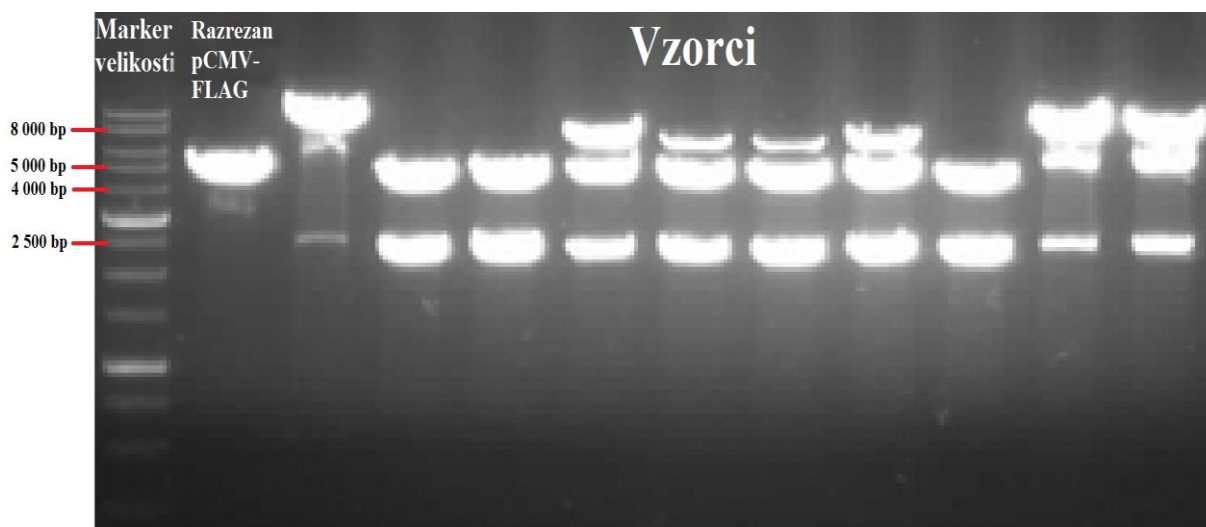
Slika 13 prikazuje prvi način preverjanja uspešnosti ligacije in transformacije. Dan po transformaciji smo vizualno pregledali selekcijsko trdno gojišče in na plošči z vzorčno ligacijsko zmesjo pričakovali prisotnost bakterijskih kolonij. Le-teh na plošči po transformaciji bakterij z negativno kontrolo, ki je namesto inserta vsebovala le dH₂O in razrezan pCMV-FLAG, nismo pričakovali, saj zaradi odsotne 5' fosfatne skupine na pCMV-FLAG ligaza ne more opraviti svojega dela.



Slika 13: Slike bakterijskih plošč posnete dan po transformaciji. Zgornji dve bakterijski plošči prikazujeta bakterijske kolonije, zrasle pred centrifugiranjem transformacijske zmesi, spodnji gojišči pa prikazujeta bakterijske kolonije, zrasle po skoncentriranju celic s pomočjo centrifugiranja. Na levi strani sta prikazani bakterijski plošči, na kateri smo nanесли kontrolno ligacijsko oz. transformacijsko zmes (razrezan pCMV-FLAG brez inserta). Na desni strani se nahajata plošči z vzorčno ligacijsko zmesjo, ki sta polni bakterijskih kolonij, kar skupaj s samo dvema kolonijama na kontrolnih ploščah kaže na uspešno izvedeno ligacijo in transformacijo.

Restriksijska analiza uspešnosti ligacije in transformacije

Z restriksijsko analizo smo poleg podatka o prisotnosti inserta v izoliranem plazmidu dobili tudi podatek, ali je le-ta vstavljen na pravo mesto. Izolirane plazmide iz bakterijskih kolonij (po Miniprep-u) smo razrezali z encimoma NotI in KpnI. V primeru uspešne ligacije smo tako po restrikciji na agaroznem gelu pričakovali prisotnost dveh fragmentov z velikostjo 2.400 bp (ustreza zapisu za gen *NR3C1*) oz. 4.700 bp (ustreza velikosti pCMV-FLAG). Na Slika 14 sta pri večini nanosov (od nanosa 4 do nanosa 12) vidna fragmenta pravih velikosti, kar kaže na uspešnost ligacije in transformacije. Fragment, viden pri velikosti približno 7.000 bp, nakazuje na nepopolno restrikcijo plazmidov in prisotnost nerazrezane rekombinantne DNK v vzorcu, kar ravno tako potrjuje uspešnost ligacije. Pri nanosu št. 2 se nahaja negativna kontrola, ki jo predstavlja pCMV-FLAG brez inserta, razrezan z uporabljenima encimoma. Po pričakovanjih je prisotna samo 1 lisa pri velikosti približno 5.000 bp.



Slika 14: Rezultat agarozne gelske elektroforeze po restrikcijski analizi uspešnosti ligacije in transformacije. Pod nanosom 1 se nahaja marker velikosti DNA Ladder Nippon Genetics MWDO, od nanosa 3 do nanosa 12 pa se nahajajo vzorci. Pod nanosom 2 vidimo le eno liso pri približno 5.000 bp, ki pripada razrezanemu plazmidu pCMV-FLAG brez inserta in služi kot negativna kontrola. Od nanosa 3 do nanosa 12 vidimo prisotnost 2 oz. 3 lis, od katerih lisa pri velikosti približno 7.000 bp pripada nerazrezani rekombinantni molekuli DNK (kaže na uspešnost ligacije in transformacije, a na nepopolnost restrikcije), lisa pri velikosti približno 5.000 bp pripada razrezanemu plazmidu pCMV-FLAG (lisa se nahaja pri isti velikosti kot lisa negativne kontrole), pri velikosti 2.400 bp pa se nahaja insert NRC31. Ker ni pri nobenem nanosu prisotna le lisa, ki bi sovpadala z liso negativne kontrole, to potrjuje uspešnost ligacije in transformacije pri vseh analiziranih plazmidih.

Sekvenčna analiza

Sekvenčna analiza nam omogoča identifikacijo in natančno določitev zaporedja nukleotidov v molekuli DNK. Z uporabo klasične Sangerjeve metode lahko uspešno določimo 700–1.000 bp dolge sekvence nukleotidnega zaporedja, če je koncentracija tarčne DNK dovolj visoka. Da smo potrdili uspešnost kloniranja in odsotnost mutacij, smo dobljene rezultate sekvenčne analize primerjali s teoretičnim zelenim zaporedjem. Ker so se rezultati ujemali, smo s sekvenciranjem dokončno potrdili uspešnost ligacije NR3C1 med restrikcijski mesti NotI in KpnI v plazmid pCMV-FLAG, kar prikazuje Slika 15.

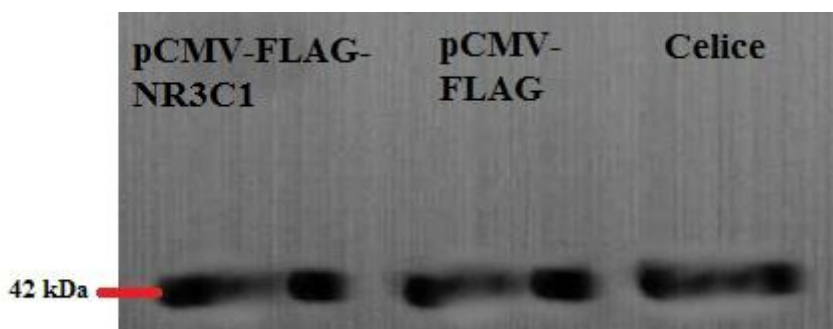


Slika 15: Sekvenčna analiza uspešnosti ligacije. Slika prikazuje rezultat sekvenciranja po Sangerjevi metodi, s katero smo uspešno določili 770 bp dolgo zaporedje. Ker se ujema s teoretičnim zaporedjem NR3C1, to dokončno potrjuje uspešnost ligacije inserta NR3C1 v pCMVFLAG. Na sliki je z rumeno barvo označen peptid FLAG, ki se prepíše skupaj z zapisom za NR3C1 in omogoča detekcijo s pomočjo protiteles proti FLAG oznaki.

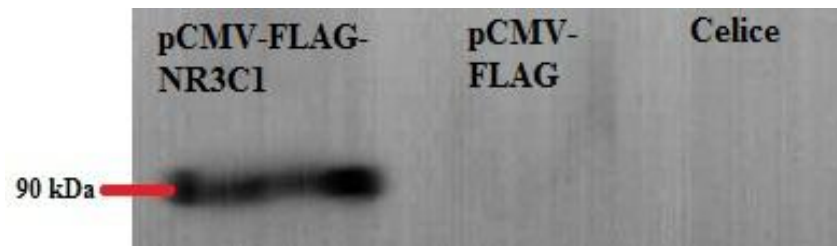
4.2 Delo s sesalskimi celičnimi linijami

4.2.1 NaDS-PAGE elektroforeza in metoda prenosa po westernu

Da smo dokazali uspešnost izražanja NR3C1 pod kontrolo CMV promotorja v ustvarjeni rekombinantni molekuli, smo le-to transfecirali v celice HOS. Če z uporabo PolyJet™ In Vitro DNA Transfection Reagent-a uspešno dostavimo genetski material v sesalsko celico in če v njej pride do izražanja glukokortikoidnega receptorja, lahko le-tega detektiramo z uporabo protiteles proti FLAG oznaki. Za negativno kontrolo smo uporabili pCMV-FLAG brez inserta in netransfecirane celice, s katerimi smo izključili možnost, da bi celice same po sebi izražale preučevan protein. Pred detekcijo glukokortikoidnega receptorja smo s protitelesi proti β aktinu, ki se neodvisno od eksperimentalnih pogojev izraža v vseh celicah, najprej preverili, ali smo na membrano pri vseh vzorcih nanесли isto količino celičnega lizata. Rezultat prikazuje Slika 16, ki smo jo dobili po detekciji z reagentom SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate in slikanju membrane z aparatom za detekcijo fluorescence in kemiluminiscence (G-Box). Na membrani je pri vseh nanosih vidna lisa pri 42 kDa, kar sovpada z velikostjo proteina β aktin in potrjuje uspešnost nanosov iste količine celičnega lizata pri vseh vzorcih. Rezultat kontrole ekspresije glukokortikoidnega receptorja prikazuje Slika 17, na kateri je le pod nanosom vzorca (nanos 1) vidna lisa pri približno 90 kDa (teoretična velikost proteina NR3C1 znaša 87 kDa), medtem ko le-te pri negativni kontroli in netransfeciranih celicah ne vidimo. S tem rezultatom smo potrdili, da se je glukokortikoidni receptor NR3C1 uspešno izrazil v celični liniji HOS.



Slika 16: Rezultat kontrole uspešnosti nanosov vzorcev z metodo prenosa po westernu z uporabo protiteles proti β -aktinu. Pod 1. nanosom se nahaja vzorec (rekombinantna molekula DNK), pod nanosom 2 prazen pCMV-FLAG in pod zadnjim nanosom netransfecirane celice. Pri vseh nanosih je vidna lisa pri 42 kDa, kar pripada lisi β -aktina in potrjuje uspešnost nanosov iste količine celičnega lizata pri vseh vzorcih.



Slika 17: Rezultat kontrole izražanja proteina NR3C1 v celicah HOS z metodo prenosa po westernu z uporabo protiteles proti FLAG oznaki. Lisa pri nanosu 1 pri približno 90 kDa dokazuje prisotnost tarčnega proteina NR3C1 v vzorcu, medtem ko je pri nanosu pCMV-FLAG (drugi nanos) in netransfeciranih celicah (tretji nanos) ni.

4.2.2 Luciferazni test

Pripravljeno rekombinantno molekulo DNK pCMV-FLAG-NR3C1 smo uporabili za testiranje vpliva glukokortikoidnega receptorja NR3C1 na aktivacijo promotorja gena za RANKL v treh različnih sesalskih celičnih linijah, kar je bil končni cilj raziskovalnega dela. Vpliv smo merili s pomočjo dvojnega luciferaznega testa z uporabo pGL3 vektorjev, ki imajo vstavljen luciferazni poročevalski gen (Luc2) in so optimizirani za izražanje proteinov v sesalskih celicah. Na koncu zapisa za luciferazo se nahaja poliklonsko mesto (MCS), kamor lahko vstavimo različne transkripcijske regulatorne elemente. Tako smo uporabili pGL3 vektorja, ki sta imela ekspresijo luciferaznega gena pod kontrolo promotorjev SV40 (omogoča konsistentno visoko ekspresijo proteina; oznaka: pGL3-SV40) in F4 (1.000 bp dolga regija proksimalnega promotorja za človeški gen za RANKL; oznaka: pGL3-F4). Za negativno kontrolo luciferazne aktivnosti je služil pGL3 brez promotorske regije (oznaka: pGL3-basic). V primeru vezave in vpliva NR3C1 na RANKL promotorsko regijo pGL3-F4 vektorja, smo pričakovali spremembo v sintezi luciferaze in s tem spremembo v odzivu v primerjavi s sintezo luciferaze pod vplivom praznega pCMV-FLAG. Za normalizacijo oz. interno kontrolo smo uporabili plazmid pRL-SV40 z genom za renilino luciferazo (Rluc), ki ima konstitutivno izražanje pod kontrolo SV40 promotorja, s čimer omogoča normalizacijo učinkovitosti transfekcije.

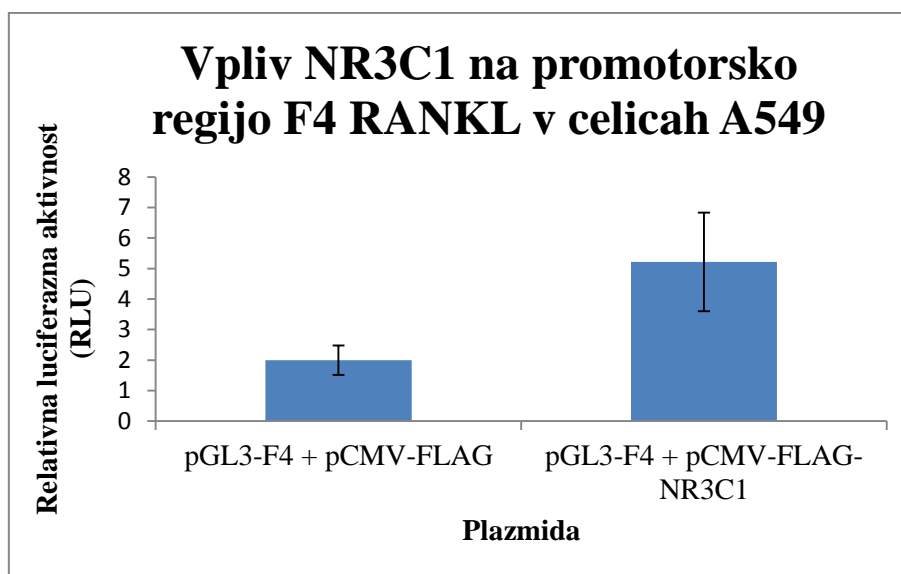
Izmerjene vrednosti aktivnosti Luc in Rluc smo normalizirali (aktivnost Luc/aktivnost Rluc) in tako dobili relativno luciferazno aktivnost posameznih plazmidov, izraženo v relativnih luciferaznih enotah (RLU). Relativna luciferazna aktivnost netransfeciranih celic in celic, ki so vsebovale le ekspresijski plazmid, je bila pri vseh treh celičnih linijah nizka, kar je razvidno iz rezultatov v Priloga 1, Priloga 2 in Priloga 3. S tem smo dokazali, da same celice,

uporabljen plazmid pCMV-FLAG in pCMV-FLAG-NR3C1 nimajo luciferazne aktivnosti. RLU vrednosti celic s posameznimi pGL3 vektorji se pri vseh celičnih linijah ujemajo s predvidevanji o stopnji izražanja luciferaze glede na prisoten promotor, kar potrjuje pravilnost delovanja plazmidov z luciferaznim poročevalskim genom. Za posamezne pare plazmidov smo iz normaliziranih vrednosti luciferazne aktivnosti za vsako biološko ponovitev izračunali povprečno relativno luciferazno aktivnost, izraženo v RLU, in standardni odklon (SD; Preglednica XV, Preglednica XVI, Preglednica XVII) ter izrisali grafe (Graf 1, Graf 2, Graf 3). Za preverjanje pravilnosti alternativne hipoteze o neenakosti izražanja luciferaze pod vplivom NR3C1, smo pri izbrani stopnji tveganja $\alpha=0,05$ za vsako celično linijo izračunali p-vrednost dvostranskega t-testa. Le-ta predstavlja statistično značilnost in nam pove, kolikšna je stopnja tveganja, da dobljeni rezultati o sintezi luciferaze pod vplivom NR3C1 ne odražajo dejanske razlike v aktivaciji promotorjev. Če je p-vrednost manjša od 0,05, potem so razlike v sintezi gena med vzorci in kontrolami statistično značilne oz. signifikantne, zato lahko zavržemo ničelno hipotezo in sprejmemo verjetnejšo alternativno o neenakosti izražanja.

Preglednica XV: Relativna luciferazna aktivnost v celicah A549

	vzorec	Celice, kotransfecirane s pGL3-F4 in pCMV-FLAG	Celice, kotransfecirane s pGL3-F4 in pCMV-FLAG-NR3C1
aktivnost Luc/aktivnost Rluc (RLU)	1-p1	2,2738	5,8765
	1-p2	2,6588	6,864
	2-p1	1,7313	3,4337
	2-p2	1,2855	3,6095
	3-p1	2,1888	7,0762
	3-p2	1,8343	4,4405
povprečje		1,995417	5,216733
standardni odklon		0,480556	1,610673
p vrednost		0,00352	

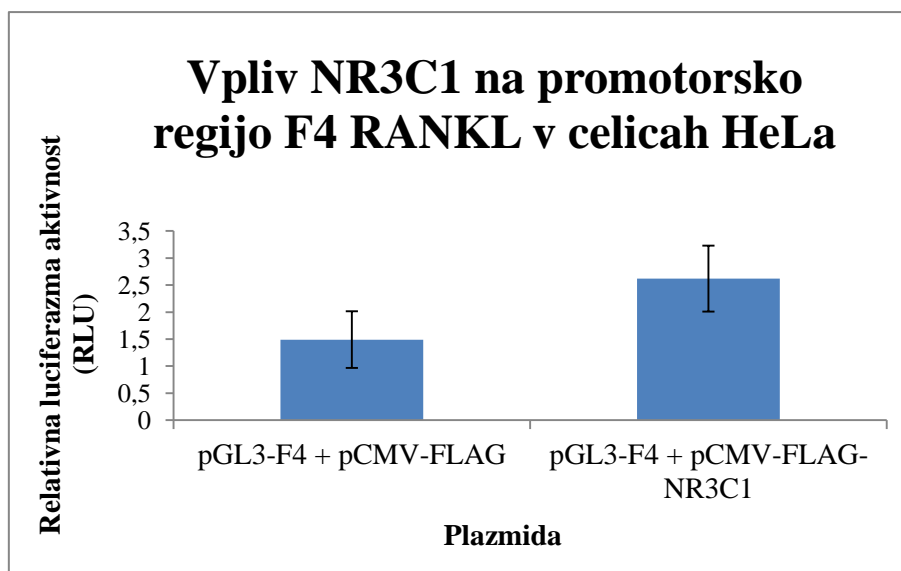
V preglednici so predstavljene RLU vrednosti, ki smo jih dobili v celicah A549 pri vseh treh bioloških ponovitvah, iz katerih smo izračunali povprečno RLU vrednost in standardni odklon, iz povprečnih RLU vrednosti pa še p-vrednost. Oznake 1-p1 do 3-p2 predstavljajo zaporedno številko biološke ponovitve in številko duplikata.



Graf 1: Grafični prikaz relativne luciferazne aktivnosti v celicah A549. Na x-osi je predstavljen vektor pGL3 s promotorjem F4, ki smo ga v celice A549 transfecirali skupaj s praznim pCMV-FLAG (levi graf) oz. s pCMV-FLAG-NR3C1 (desni graf). y-os predstavlja povprečno vrednost relativne luciferazne aktivnosti, izračunano iz vseh treh bioloških ponovitev (izražena v RLU), na grafu pa sta označena tudi standardna odklona. p-vrednost, ki smo jo izračunali iz povprečnih RLU vrednosti, je manjša od stopnje tveganja α in znaša 0,00352, kar pomeni, da med vzorcema obstaja statistično pomembna razlika v aktivnosti promotorjev. Iz tega sledi, da NR3C1 signifikantno poveča aktivnost RANKL promotorja F4 v celicah A549, kar se odraža v povečani sintezi in s tem aktivnosti luciferaze.

Preglednica XVI: Relativna luciferazna aktivnost v celicah HeLa

	vzorec	Celice, kotransfecirane s pGL3-F4 in pCMV-FLAG	Celice, kotransfecirane s pGL3-F4 in pCMV-FLAG-NR3C1
aktivnost Luc/aktivnost Rluc (RLU)	1-p1	1,156	2,7579
	1-p2	1,1876	2,4135
	2-p1	1,5269	2,1165
	2-p2	0,9195	1,8303
	3-p1	1,8078	3,2207
	3-p2	2,3447	3,3659
povprečje		1,490417	2,617467
standardni odklon		0,521793	0,609256
p vrednost		0,00653	

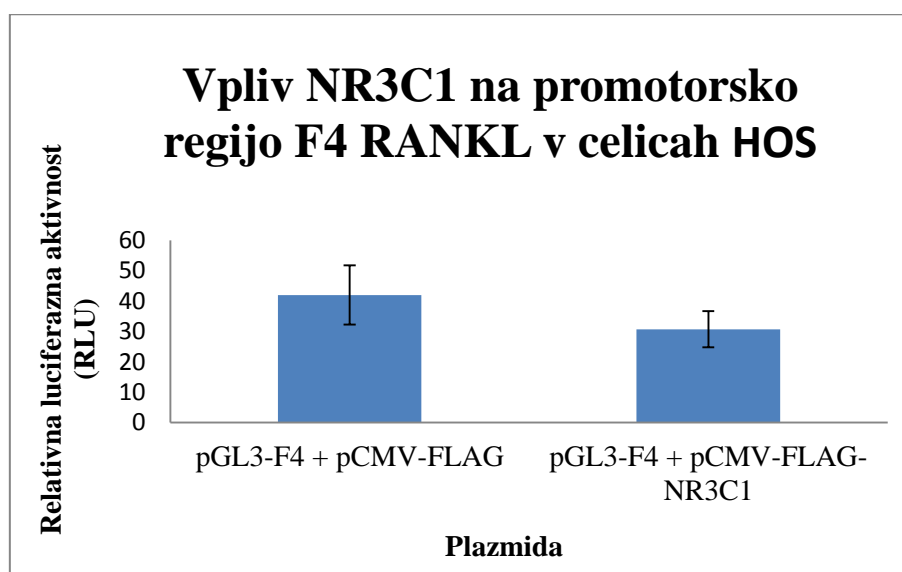


Graf 2: Grafični prikaz relativne luciferazne aktivnosti v celicah HeLa. Na x-osi je predstavljen vektor pGL3 s promotorjem F4, ki smo ga v celice HeLa transfecirali skupaj s praznim pCMV-FLAG (levi graf) oz. s pCMV-FLAG-NR3C1 (desni graf). y-os predstavlja povprečno vrednost relativne luciferazne aktivnosti, izračunano iz vseh treh bioloških ponovitev (izražena v RLU), na grafu pa sta označena tudi standardna odklona. Izračunana p-vrednost znaša 0,00653, kar je manj od izbrane α , in potrjuje statistično pomembno razliko

v relativni luciferazni aktivnosti med vzorcema. Zaradi tega lahko tudi pri celicah HeLa zaključimo s trditvijo, da NR3C1 signifikantno poveča aktivnost F4 promotorja.

Preglednica XVII: Relativna luciferazna aktivnost v celicah HOS

	vzorec	Celice, kotransfecirane s pGL3-F4 in pCMV-FLAG	Celice, kotransfecirane s pGL3-F4 in pCMV-FLAG-NR3C1
aktivnost Luc/aktivnost Rluc (RLU)	1-p1	46,50925	27,77377
	1-p2	41,93272	30,21627
	2-p1	46,67113	30,06025
	2-p2	48,83051	42,34673
	3-p1	22,68882	28,87297
	3-p2	45,61753	25,3272
povprečje		42,04166	30,7662
standardni odklon		9,744856	5,950314
p vrednost		0,0409	



Graf 3: Grafični prikaz relativne luciferazne aktivnosti v celicah HOS. Na x-osi je predstavljen vektor pGL3 s promotorjem F4, ki smo ga v celice HOS transfecirali skupaj s

praznim pCMV-FLAG (levi graf) oz. s pCMV-FLAG-NR3C1 (desni graf). y-os predstavlja povprečno vrednost relativne luciferazne aktivnosti, izračunano iz vseh treh bioloških ponovitev (izražena v RLU), na grafu pa sta označena tudi standardna odklona. Tudi v tem primeru je p-vrednost manjša od izbrane stopnje tveganja α , saj znaša 0,0409, zaradi česar lahko zaključimo, da NR3C1 tudi v celicah HOS signifikantno poveča stopnjo sinteze luciferaze, ki je pod vplivom F4 regije promotorja gena za RANKL.

5 RAZPRAVA

Kljub temu da vse več raziskovalcev kostne biologije v zadnjih letih interpretira glukokortikoidno osteoporozo primarno kot zmanjšanje kostne formacije, k čemur prispeva močno oslABLJENA funkcija osteoblastov ter njihova in osteocitna povečana apoptoza, in sekundarno kot povečanje kostne resorpcije, ravno slednji proces predstavlja glavno terapevtsko tarčo pri zdravljenju GIO (34). Pri načrtovanju in sintezi učinkovitih anti-katabolnih zdravilnih učinkovin pa naletimo na ovire, saj so natančni celični mehanizmi in signalne poti, po katerih glukokortikoidi vplivajo na povečano kostno razgradnjo, še vedno neznani in predstavljajo predmet aktualnih raziskav. V večini študij zadnjega desetletja navajajo povečanje razmerja RANKL/OPG kot ključno determinanto povečane osteoklastne aktivnosti, pri čemer predstavlja neznanko molekularni mehanizem, ki prispeva k povečani ekspresiji RANKL. Pri raziskovalnem delu smo se zato osredotočili na glukokortikoidni receptor NR3C1 in njegov učinek na aktivnost promotorja gena za ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa-B (RANKL) v treh sesalskih celičnih linijah. Kot predstavnica kostnih celic nam je služila celična kultura osteoblastov (celice HOS), medtem ko celice HeLa izvirajo iz karcinoma materničnega vratu, celice A549 pa pripadajo celicam pljučnega raka, za katerega je značilno povečano izražanje gena za RANKL.

5.1 Vpliv glukokortikoidnega receptorja NR3C1 na aktivnost promotorja človeškega gena za RANKL

Pred analizo vpliva glukokortikoidnega receptorja NR3C1 na aktivnost promotorja človeškega gena za RANKL smo za izražanje proteina NR3C1 z molekulskim kloniranjem najprej pripravili plazmidni vektor pCMV-FLAG-NR3C1. Po transfekciji celične linije HOS s pripravljenim plazmidom smo z metodo prenosa po westernu z uporabo specifičnih monoklonskih protiteles proti FLAG oznaki dokazali, da je protein NR3C1 prisoten v transfeciranih celicah (Slika 17). S tem smo potrdili uspešnost priprave rekombinantnega plazmida pCMV-FLAG-NR3C1, kar smo potrdili tudi z določitvijo nukleotidnega zaporedja (Slika 15). Po dobljenem dokazu o uspešni sintezi proteina NR3C1 v sesalski celični liniji HOS so sledile meritve njegovega vpliva na aktivnost promotorja gena za RANKL. Dobljena razlika v stopnji izražanja gena za luciferazo je bila statistično gledano dovolj velika ($p=0,0409$), da lahko govorimo o signifikantni razliki v aktivnosti promotorja v celicah HOS (glej Preglednica XVII in Graf 3). V nasprotju s celičnima linijama A549 in HeLa pride v osteokarcinomski liniji do zmanjšane sinteze gena v celicah kotransfeciranih s pGL3-F4

vektorjem in plazmidom pCMV-FLAG-NR3C1 v primerjavi s celicami, ki so bile kotransfecirane s pCMV-FLAG z odsotnim zapisom za glukokortikoidni receptor. Vpliv NR3C1 na aktivnost promotorja F4 je v celicah HOS torej ravno obraten kot pri ostalih dveh karcinomskih celičnih linijah, a lahko kljub temu zavrtnemo ničelno hipotezo, saj se statistika našega vzorca od kontrolnega parametra pomembno razlikuje, zaradi česar je alternativna hipoteza o neenakosti izražanja verjetnejša.

Z eksperimentalnim delom na karcinomskih celicah A549 smo želeli raziskati, ali je vzrok za povečano izražanje gena za RANKL pri pljučnem raku glukokortikoidni učinek. Močno povečano izražanje gena za RANKL je namreč ena izmed karakteristik pljučnega raka, kar potrjuje uporaba denosumaba v njegovi terapiji (35). Povprečne RLU vrednosti, dobljene z meritvami aktivnosti Luc in Rluc v celicah A549, kažejo na več kot dva-kratno povečano aktivnost promotorja za RANKL pod vplivom glukokortikoidnega receptorja v primerjavi z vplivom praznega ekspresijskega plazmida pCMV-FLAG (glej Preglednica XV in Graf 1). Gre za signifikantno razliko ($p = 0,00352$), pri kateri lahko pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$ s 95 % verjetnostjo trdimo, da ni posledica naključja, temveč odraža dejansko razliko v stopnji aktivacije promotorja. Ker so ti rezultati skladni z opažanji raziskovalcev pri ENCODE projekt-u o vplivu NR3C1 na aktivnost promotorja gena za RANKL v celicah A549 obstaja verjetnost, da je povečano izražanje gena za RANKL posredovano ravno z glukokortikoidnimi receptorji, saj se v terapiji raka sintetični glukokortikoidi uporabljajo za zmanjšanje vnetja. Ne moremo pa na osnovi teh rezultatov z gotovostjo trditi, da je vpliv glukokortikoidnega receptorja posredovan preko vezave na regulatorne proteine in ni posledica neposrednega stika z regulatornimi elementi na promotorski regiji.

Ker v literaturi še ni podatka o povečanem izražanju gena za RANKL pri karcinomu materničnega vratu, smo celično linijo HeLa uporabili kot model z nespremenjenim izražanjem gena. Kljub temu je tudi v teh celicah prišlo do signifikantno povečane aktivnosti promotorja za RANKL, saj je p-vrednost, ki smo jo dobili pri t-testu, manjša od izbrane stopnje tveganja α (glej Preglednica XVI in Graf 2). Razlike v povprečnih RLU vrednostih med celicami s pGL3-F4 vektorji, ki so bile izpostavljene delovanju NR3C1 oz. ki njegovemu vplivu niso bile podvržene, so dovolj velike, da lahko zavržemo ničelno hipotezo o enakosti izražanja in sprejmemo alternativno. Povečana aktivnost promotorja za RANKL v prisotnosti NR3C1 sovпада z opažanji raziskovalcev o vpletenosti gena za GR v razgradnjo kosti pri nekaterih vrstah ne-skeletnih malignih novotvorb.

Pri komentiranju dobljenih rezultatov velja še omeniti, da smo na vseh treh celičnih linijah potrdili pravilnost delovanja poročevalskega sistema, s transfekcijo celic s praznim plazmidom pCMV-FLAG in netretiranimi celicami pa smo izključili možnost o njihovi luciferazni aktivnosti in dokazali odsotnost njihovega vpliva na rezultat o aktivnosti promotorja.

Vsi ti pozitivni rezultati in dokazane preučevane razlike na prvi pogled sicer potrjujejo pravilnost izbire reagentov in metod ter uspešnost pri kontroliranju in vodenju celičnih reakcij, a bi za njihovo večjo zanesljivost in prenosljivost nekatere korake raziskovalnega dela lahko izvedli nekoliko drugače.

Pri transfekcijskem postopku smo v celice vnesli plazmidni konstrukt z zapisom za NR3C1 (0,5 µg/mL) in tako v njih dosegli povišano koncentracijo proteina NR3C1 v primerjavi z netransfeciranimi celicami. V transfeciranih celicah je bila koncentracija proteina supra fiziološka, torej mnogo višja kot je koncentracija endogenega proteina. Takšne koncentracije imajo lahko drugačen vpliv na konformacijo glukokortikoidnega receptorja (22), kakor koncentracije, ki jih ponavadi srečamo pri bolnikih na glukokortikoidni terapiji, in lahko vodijo do tvorbe nefizioloških interakcij. Ker je ravno od aktivacije in načina konformacije GR odvisen končni učinek, naši rezultati o modulaciji promotorja gena za RANKL niso direktno primerljivi z reguliranjem izražanja gena v človeškem organizmu.

Za eksperimente smo uporabili tri različne sesalske celične linije, izmed katerih sta dve predstavnici karcinomskih celic materničnega vratu oz. pljučnega raka (A549 in HeLa), celična linija HOS pa pripada kulturi človeških celic kostnega izvora. Ker gre za osteoblastom podobne celice, ravno tako izražajo osteoblastne markerje ter številne citokine in rastne faktorje, s čimer najbolje posnemajo pogoje v človeškem telesu, katerim so glukokortikoidi podvrženi pri izvajanju svojih učinkov na kostne celice. Glukokortikoidne receptorje najdemo namreč v skoraj vseh človeških celicah, a v njih, zaradi odvisnosti končnega učinka od celične vsebine in trenutnega fiziološkega oz. patofiziološkega stanja, na različne načine modulirajo izražanje na tisoče genov (36). Glede na to, da so bili pri transfekcijah celic in izvedbi luciferaznega testa uporabljeni reagenti in eksperimentalni postopki enaki pri vseh treh celičnih linijah, je lahko eden izmed razlogov za obraten učinek NR3C1 na transkripcijo gena za luciferazo v celicah HOS ravno v prisotnosti drugačnih citokinov in rastnih dejavnikov ter regulatornih proteinov in koregulatorjev, ki preko aktivacije ali represije prepisovanja genov sodelujejo pri genskem prepisovanju. Na njihovo sodelovalno vlogo lahko sklepamo tudi iz majhnih razlik v RLU vrednostih med biološkimi ponovitvami pri celicah A549

kotransfeciranih s pGL3-F4 in pCMV-FLAG (glej Preglednica XV). Pri teh je bila aktivacija promotorja bolj ali manj konstantna, medtem ko je bila ob prisotnosti glukokortikoidnega receptorja NR3C1 odvisna tudi od prisotnih kofaktorjev, ki vplivajo na njegovo sposobnost aktivacije promotorja, kar se odraža v večji variabilnosti rezultatov.

Če v prilogah pogledamo vrednosti Luc in Rluc, dobljene pri vseh načinih transfekcije, lahko opazimo, da so te najnižje pri celični liniji HOS, kar kaže na nizko tvorbo obeh merjenih proteinov (Luc in Rluc). Vzrok za to je lahko nižja učinkovitost transfekcije pri teh celicah, slabše učinkovita liza celic, iz katerih se nasintetizirani proteini ne sprostijo v celoti, ali prisotnost drugačnih transkripcijskih faktorjev. Da vzrok nizkih vrednosti ni neučinkovita liza celic smo pri zadnji biološki ponovitvi na celicah HOS dokazali z nadaljevanjem lizirnega postopka po prvih meritvah luciferazne aktivnosti in ponovnim merjenjem le-te, po katerem se rezultati niso bistveno razlikovali med seboj. Razlog je zato verjetno v manj učinkovitem transfekcijskem postopku, čemur lahko botruje transfekcijski reagent (PolyJetTM), še verjetneje pa so razlike med aktivnostmi promotorja med celičnimi linijami posledica prisotnosti različnih transkripcijskih faktorjev.

Luciferazni testi so dali informacijo o aktivnosti promotorja za RANKL v prisotnosti in odsotnosti NR3C1, a s tem rezultatom ne moremo z gotovostjo trditi, da NR3C1 vpliva na izražanje gena za RANKL. Za potrditev vpliva NR3C1 na izražanje gena bi bilo potrebno določiti nivo izražanja gena za RANKL v sesalskih celicah z metodo kvantitativne PCR reakcije v realnem času (qPCR). qPCR je metoda, ki za razliko od uporabljenega testa ekspresijo gena ne meri na ravni proteinov, temveč na transkripcijski ravni.

Zaradi majhnega števila podatkov, dobljenih za eno celično vrsto, smo zanje privzeli, da se porazdeljujejo normalno in s pomočjo računalniška programa Microsoft Excel izračunali statistično značilnost (p-vrednost) Studentovega t-testa. Da bi bili rezultati bolj reprezentativni in prenosljivi na celotno populacijo izbrane celične vrste, bi bilo potrebno na eni celični liniji narediti več bioloških ponovitev in po preverjanju normalnosti porazdelitve spremenljivke (Shapiro-Wilk test) izbrati ustrezen parametričen oz. neparametričen test za izračun statistične značilnosti. Z večjim številom podatkov namreč zmanjšamo standardno napako in interval zaupanja ter z večjo natančnostjo ocenimo postavljene hipoteze.

5.2 Uporabnost dobljenih rezultatov

Da pride med glukokortikoidno terapijo do povečane kostne resorpcije, ki je posledica porušenega ravnotežja med RANKL in OPG v prid RANKL, so raziskovalci odkrili že v prejšnjem stoletju. S poskusi na celičnih kulturah človeških osteoblastov, tretiranih z deksametazonom, so dokazali od odmerka in časa trajanja glukokortikoidne administracije odvisno povečanje izražanja gena za RANKL (37). Nadgradnjo njihovemu odkritju zasledimo v članku (34) iz leta 2007, ko so se raziskovalci usmerili v preučevanje mehanizma, ki vodi do omenjenega neželenega učinka. V ta namen so testirali vpliv deksametazona na aktivnost promoterja mišjega gena za RANKL v mišjih celicah osteoblastne linije. Po seriji delecijских mutacij na domnevnih vezavnih mestih za deksametazon na mišjem RANKL promotorju so prišli do zaključka, da omenjeni sintetični steroidni hormon poveča ekspresijo mišjega gena za RANKL preko GREs na mestih -642/-628 od mesta začetka transkripcije ali preko AP-1 vezavnega mesta. Podobnih raziskav, ki bi potrdile ali ovrgle vpletenost teh vezavnih mest na človeškem RANKL promotorju v novejših raziskovalnih člankih ni zaslediti, kakor ni zaslediti raziskav o vplivu samega glukokortikoidnega receptorja na ekspresijo človeškega gena za RANKL. Omenjeno odkritje zaradi uporabe mišjega promoterja ni direktno prenosljivo na človeško populacijo, odpira pa skupaj z našim dokazom o domnevnem vplivu GR na aktivnost 1.000 bp dolge regije proksimalnega promoterja za človeški gen za RANKL nove možnosti za raziskovanje. Eksperimentalno delo bi lahko nadaljevali z uporabljenim pGL3-F4 vektorjem, na katerem bi s točkovnimi mutacijami oz. z delecijami nukleotidnih baz na mestih, ki sovpadajo z mesti -642/-628 na mišjem RANKL promotorju in z AP1 vezavnim mestom, na F4 promotorju dokazovali signifikantne razlike v prepisovanju gena za luciferazo v primerjavi z nemutiranim zaporedjem.

Ker pa je v zadnjih letih v literaturi vse več dokazov o vpletenosti dimerizacije GR na pojav neželenih učinkov na kosti, bi bilo smotrno preučiti tudi vlogo dimerizacijskega procesa pri aktivaciji promoterja gena za RANKL. V tem primeru bi bil točkovnih mutacij in/ali delecij deležen zapis za gen *NR3C1* in sicer v DBD funkcionalni domeni, ki omogoča dimerizacijo receptorja. Če bi po tem posegu prišlo do signifikantnih razlik v sintezi gena za luciferazo po kotransfekciji celic s pGL3-F4 vektorjem v primerjavi z nemutiranim zapisom za *NR3C1*, bi se z nadaljnimi raziskavami lahko usmerili v preučevanje procesov in regulatornih molekul, ki se vpletajo v dimerizacijo glukokortikoidnega receptorja. S študijami učinkov različnih ligandov na glukokortikoidni receptor so namreč že dokazali, da homodimerni GR svoje učinke posredujejo preko vezave na pozitivne GREs, pri čemer sicer učinkovito zatrejo

ekspresijo vnetnih citokinov, a obenem pustijo negativen pečat na kosteh s povečanjem ekspresije gena za RANKL in zmanjšanjem ekspresije gena za OPG. Po drugi strani pa so z ligandi, ki ne sprožijo dimerizacije GR in zatorej signale posredujejo pretežno preko zaviranja transkripcijskih faktorjev NF- κ B in AP1, dokazali enako učinkovitost pri protivnetnem delovanju z odsotnostjo neželenih učinkov na kosteh (38). Ali je dimerizacija res glavni vzrok opisanemu divergentnemu učinku v zadnjih letih preučujejo s sintezami selektivnih agonistov glukokortikoidnih receptorjev (SEGRAs), ki svoje učinke posredujejo samo oz. pretežno preko transrepresije (27, 37). S tem se želijo izogniti neželenim stranskim učinkom na kostno tkivo, ki so posredovani s transaktivacijo, a se hkrati z njimi izognejo tudi morebitnim pozitivnim učinkom, ki jih prinaša samo vezava na pozitivne GREs. Sinteza učinkovitih SEGRAs z visokim razmerjem med koristmi in tveganjem tako ostaja izziv, kakor ostaja izziv razumevanje do kakšne mere različne izoforme in polimorfizmi GR vplivajo na njihov biološki odgovor (27). Ravno zaradi različne dovzetnosti GR za ligande bi bil vpliv dimerizacije bolj smiselno preučevati direktno na genu za GR in ne s pomočjo deksametazona oz. SEGRAs, kakor je moč zaslediti v vseh, do sedaj objavljenih študijah.

6 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo s preučevanjem vpliva glukokortikoidnega receptorja NR3C1 na aktivnost promotorja gena za ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa-B (RANKL) v sesalskih celičnih linijah A549, HeLa in HOS pripomogli k razumevanju kompleksnosti glukokortikoidnega signaliziranja pri povzročanju glukokortikoidne osteoporoze. Z raziskovalnim delom smo namreč dokazali signifikatne razlike v aktivnosti promotorja človeškega gena za RANKL pod vplivom NR3C1 na vseh treh uporabljenih celičnih linijah, zato lahko z veliko verjetnostjo pritrdimo zastavljeni hipotezi:

- ✓ Glukokortikoidni receptor NR3C1 je ena izmed regulatornih molekul, ki vpliva na aktivnost promotorja gena za RANKL.

Ker je bila količina nastale luciferaze pri pGL3-F4 vektorjih med celičnimi kulturami različna, to potrjuje različen vpliv NR3C1 na aktivnost RANKL promotorja v različnih celičnih linijah. Medtem ko je pri celicah A549 in HeLa GR povzročil povečano sintezo proteina, je bila le-ta zmanjšana pri celicah HOS, s čimer lahko sprejememo tudi drugo zastavljeno hipotezo:

- ✓ Glukokortikoidni receptor NR3C1 v različnih celičnih linijah različno vpliva na aktivnost promotorja gena za RANKL.

Z opravljenim eksperimentalnim delom smo tako potrdili vpletenost glukokortikoidnega receptorja NR3C1 v aktivacijo promotorja gena za ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa-B. Ker pa z dobljenimi rezultati ne moremo z gotovostjo vedeti, ali je do spremembe v aktivnosti promotorja prišlo zaradi vezave NR3C1 na regulatorne proteine gena za RANKL ali zaradi neposrednega stika z DNK molekulo, smo nadaljnja raziskovanja usmerili v iskanje dotičnih vezavnih mest na omenjenem promotorju, ki sodelujejo v tej aktivaciji.

7 VIRI

1. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D: The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15 (6): 457–75.
2. Bedrač SM, Ostanek B, Mlakar V, Zupan J, Kocjan T, Prež, et al.: Sodobni pogled na nastanek osteoporoze. *Farm Vestn.* 2012; 63 (5–6): 269–78.
3. World Health Organisation: Prevention and management of osteoporosis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15293701>, dostopno: avgust 2017.
4. <http://ns.umich.edu/Releases/2005/Feb05/bone.html>, dostopno: avgust 2017.
5. World Health Organisation: Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO_TRS_843_eng.pdf.
6. Sandhu SK, Hampson G: The pathogenesis, diagnosis, investigation and management of osteoporosis. *J Clin Pathol.* 2011; 64 (12): 1042–50.
7. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM: RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006; 12 (1): 17–25.
8. O'Brien CA: Control of RANKL gene expression. *Bone.* 2010; 46 (4): 911–9.
9. Boyce BF, Xing L: Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473 (2): 139–46.
10. Bedrač SM, Marc J: Sistem RANKL/RANK/OPG - Nova tarča za zdravila za zdravljenje osteoporoze. *Farm Vestn.* 2008; 59 (4): 175–8.
11. Vrtačnik P, Marc J, Ostanek B: Epigenetic mechanisms in bone. *Clin Chem Lab Med.* 2014; 52 (5): 589–608.
12. Boyer R: Temelji biokemije. Študentska založba, Ljubljana, 2005: 325-331.
13. Ng PK-S, Tsui SK-W, Lau CP-Y, Wong C-H, Wong WH-T, Huang L, et al.: CCAAT/enhancer binding protein beta is up-regulated in giant cell tumor of bone and regulates RANKL expression. *J Cell Biochem.* 2010; 110 (2): 438–46.
14. Tsushima H, Okazaki K, Ishihara K, Ushijima T, Iwamoto Y: CCAAT/enhancer-binding protein β promotes receptor activator of nuclear factor-kappa-B ligand (RANKL) expression and osteoclast formation in the synovium in rheumatoid arthritis.

- Arthritis Res Ther 2015; 17: 31.
15. Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V: The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Glucocorticoid, Mineralocorticoid, Progesterone, and Androgen Receptors. *J Biol Chem.* 2006; 58 (4): 782–97.
 16. Zhou H, Cooper MS, Seibel MJ: Endogenous Glucocorticoids and Bone. *Bone Res* 2013; 1 (2): 107–19.
 17. Kadmiel M, Cidlowski JA: Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2013; 34 (9): 518–30.
 18. Samo R: Seminarji iz patološke fiziologije. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 3. izdaja, 2014: 97-105.
 19. Nicolaides NC, Charmandari E, Chrousos GP, Kino T: Recent advances in the molecular mechanisms determining tissue sensitivity to glucocorticoids: novel mutations, circadian rhythm and ligand-induced repression of the human glucocorticoid receptor. *BMC Endocr Disord.* 2014; 14 (1): 71.
 20. Strehl C, Buttgereit F: Optimized glucocorticoid therapy: Teaching old drugs new tricks. *Mol Cell Endocrinol.* 2013; 380 (1–2): 32–40.
 21. Pajek J, Jensterle Sever M: Glukokortikoidi v nefrologiji I: Farmakologija in stranski učinki. *Zdr Vestn.* 2015; 84 (3): 232–47.
 22. Scheschowitsch K, Leite JA, Assreuy J: New insights in glucocorticoid receptor signaling-more than just a ligand-binding receptor. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017; 8 (FEB): 19–21.
 23. John S, Sabo PJ, Thurman RE, Sung M-H, Biddie SC, Johnson TA, et al.: Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat Genet.* 2011; 43 (3): 264–8.
 24. Oakley RH, Cidlowski JA: The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 132 (5): 1033–44.
 25. Briot K, Roux C: Glucocorticoid-induced osteoporosis. *RMD Open.* 2015; 1: e000014.
 26. Kuchuk NO, Hoes JN, Bijlsma JWJ, Jacobs JWG: Glucocorticoid-induced osteoporosis: An overview. *Int J Clin Rheumtol.* 2014; 9 (3): 311–26.

27. Moutsatsou P, Kassi E, Papavassiliou AG: Glucocorticoid receptor signaling in bone cells. *Trends Mol Med*. 2012; 18 (6): 348–59.
28. Mazzantini M, Di Munno O: Glucocorticoid-induced osteoporosis: 2013 update. *Reumatismo* . 2014; 66 (2): 144–52.
29. <https://www.encodeproject.org/>, dostopno: december 2016
30. Molek P, Vodnik M, Ravnikar M: Skripta za vaje iz Farmacevtske biotehnologije. Ljubljana; 2012: 11-13;19-29; 86-98.
31. Pečar Fonović U, Obermajer N, Jevnikar Z, Mirković B, Rojnik M, Hafner A, Kos J: Vaje iz farmacevtske biokemije. 2. izdaja. Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo: Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana; 2011: 69-75; 93; 99-107
32. <http://signagen.com/In-Vitro-DNA-Transfection-Reagents/SL100688/PolyJet-DNA-In-Vitro-Transfection-Reagent>, dostopno: avgust 2017.
33. http://www.newdesignfile.com/post_pcdna3-1-vector-map-E_94470/, dostopno: avgust 2017
34. Kondo T, Kitazawa R, Yamaguchi A, Kitazawa S: Dexamethasone promotes osteoclastogenesis by inhibiting osteoprotegerin through multiple levels. *J Cell Biochem*. 2008; 103 (1): 335–45.
35. De Castro J, García R, Garrido P, Isla D, Massuti B, Blanca B, et al. Therapeutic potential of denosumab in patients with lung cancer: Beyond prevention of skeletal complications. *Clin Lung Cancer*. 2015; 16 (6): 431–46.
36. Weikum ER, Knuesel MT, Ortlund EA, Yamamoto KR: Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017; 18 (3): 159–74.
37. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, et al.: Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: Potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*. 1999; 140 (10): 4382–9.
38. Rauch A, Gossye V, Bracke D, Gevaert E, Jacques P, Van Beneden K, et al.: An anti-inflammatory selective glucocorticoid receptor modulator preserves osteoblast

- differentiation. *FASEB J.* 2011; 25 (4): 1323–32.
39. Schäcke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K. Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): Novel ligands with an improved therapeutic index. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 275 (1–2): 109–17.
 39. HOS ATCC® CRL-1543™
https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1543.aspx?geo_country=si,
dostopno: april 2017.
 40. HeLa ATCC® CRM-CCL-2™
<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRM-CCL-2.aspx>, dostopno: april 2017.
 41. A549 ATCC® CCL-185
<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-185.aspx>, dostopno: april 2017.

Priloga 1

Rezultati merjenja aktivnosti Luc in Rluc, dobljeni po transfekciji celic A549 s posameznimi vektorji, z vsemi kombinacijami vektorjev in aktivnost praznih celic:

Transfecirani vektorji	Številka duplikata	Aktivnost Luc	Aktivnost Rluc
pGL3-basic	1	1062	57665
	2	851	30140
pGL3-SV40	1	22526	61705
	2	23587	73820
pGL3-F4	1	3415	45291
	2	4341	71992
pGL3-basic + pCMV-FLAG	1	1251	264554
	2	1141	248758
pGL3-SV40 + pCMV-FLAG	1	31623	329288
	2	34729	289738
pGL3-F4 + pCMV-FLAG	1	5520	252190
	2	6477	353114
pGL3-basic + pCMV-FLAG-NR3C1	1	1314	148984
	2	1135	88106
pGL3-SV40 + pCMV-FLAG-NR3C1	1	57268	171026
	2	48310	157838
pGL3-F4 + pCMV-FLAG-NR3C1	1	9289	131271
	2	5494	123724

Prazne celice	1	631	613
pCMV-FLAG	1	628	656
pCMV-FLAG-NR3C1	1	445	573

Priloga 2

Rezultati merjenja aktivnosti Luc in Rluc, dobljeni po transfekciji celic **HeLa** s posameznimi vektorji, z vsemi kombinacijami vektorjev in aktivnost praznih celic:

Transfecirani vektorji	Številka duplikata	Aktivnost Luc	Aktivnost Rluc
pGL3-basic	1	1175	189935
	2	1167	180889
pGL3-SV40	1	82499	266821
	2	59736	228398
pGL3-F4	1	5629	315477
	2	5718	259396
pGL3-basic + pCMV-FLAG	1	1857	613083
	2	2145	744076
pGL3-SV40 + pCMV-FLAG	1	71851	773015
	2	79663	796779
pGL3-F4 + pCMV-FLAG	1	9221	797656
	2	9435	794459
pGL3-basic + pCMV-FLAG-NR3C1	1	1541	333203
	2	2101	407038

pGL3-SV40 + pCMV-FLAG-NR3C1	1	39942	241226
	2	93942	424178
pGL3-F4 + pCMV-FLAG-NR3C1	1	12094	438524
	2	11706	485031
Prazne celice	1	584	796
pCMV-FLAG	1	661	1222
pCMV-FLAG-NR3C1	1	520	971

Priloga 3

Rezultati merjenja aktivnosti Luc in Rluc, dobljeni po transfekciji **celic HOS** s posameznimi vektorji, z vsemi kombinacijami vektorjev in aktivnost praznih celic:

Transfecirani vektorji	Številka duplikata	Aktivnost Luc	Aktivnost Rluc
pGL3-basic	1	569	1629
	2	449	1783
pGL3-SV40	1	4569	16854
	2	20754	45170
pGL3-F4	1	1026	1169
	2	1363	1747
pGL3-basic + pCMV-FLAG	1	416	3820
	2	491	5380
pGL3-SV40 + pCMV-FLAG	1	13356	31751
	2	11885	31147

pGL3-F4 + pCMV-FLAG	1	2089	4476
	2	1357	2779
pGL3-basic + pCMV-FLAG-NR3C1	1	460	3122
	2	458	2759
pGL3-SV40 + pCMV-FLAG-NR3C1	1	13623	37887
	2	16068	37634
pGL3-F4 + pCMV-FLAG-NR3C1	1	1347	4481
	2	1043	2463
Prazne celice	1	398	453
pCMV-FLAG	1	445	646
pCMV-FLAG-NR3C1	1	417	852