

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MANCA OGRIČ

**ISKANJE VEZAVNIH MEST ZA TRANSKRIPCIJSKE
DEJAVNIKE, VPLETENE V IZRAŽANJE GENA *RANKL* V
OSTEOBLASTNIH CELIČNIH KULTURAH**

CHARACTERIZATION OF TRANSCRIPTION FACTORS
BINDING SITES, INVOLVED IN REGULATION
OF *RANKL* EXPRESSION IN OSTEOBLAST LIKE CELLS

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za klinično kemijo in biokemijo pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom asist. dr. Vida Mlakarja, univ. dipl. mikrobiol.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorju asist. dr. Vidu Mlakarja, univ. dipl. mikrobiol., za vodenje in vso pomoč pri eksperimentalnem delu in pisanju magistrske naloge.

Zahvala gre tudi moji celotni družini in fantu Damirju.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom asist. dr. Vida Mlakarja, univ. dipl. mikrobiol.

Manca Ogrič

VSEBINA

POVZETEK	I
Ključne besede.....	I
ABSTRACT	II
Seznam okrajšav	III
Kazalo slik	IV
Kazalo preglednic	V
1. UVOD.....	1
1.1. Kostna premena	1
1.1.1. Osteoblasti	1
1.1.2. Osteoklasti	2
1.1.3. Osteociti.....	3
1.1.4. Proces kostne remodelacije	3
1.2. Sistem RANKL/RANK/OPG	4
1.2.1. RANKL	5
1.2.2. RANK in OPG.....	7
1.3. Transkripcija in vplivi nanjo	7
2. NAMEN DELA	11
3. MATERIALI IN METODE	12
3.1. Materiali.....	12
3.1.1. Laboratorijska oprema	12
3.1.2. Kemikalije in reagenčni kompleti	13
3.1.3. Plazmidni vektorji	14
3.1.4. Oligonukleotidni začetniki	19
3.1.5. Oligonukleotidi.....	20

3.2.	Delo z bakterijami.....	21
3.2.1.	Priprava tekočega LB gojišča.....	21
3.2.2.	Priprava selektivnih LB agar plošč.....	21
3.2.3.	Priprava TE (Tris/EDTA) pufra	21
3.2.4.	Priprava 0,5 M EDTA	22
3.2.5.	Priprava preko-nočne kulture za izolacijo plazmidov	22
3.2.6.	Izolacija plazmidov.....	22
3.2.7.	Merjenje koncentracije plazmidne DNA.....	23
3.2.8.	Računalniško iskanje vezavnih mest	23
3.2.9.	Mutageneza.....	24
3.2.10.	Priprava preko-nočne kulture za transformacijo.....	27
3.2.11.	Transformacija mutiranega plazmida	27
3.2.12.	Izolacija mutiranega plazmida	28
3.2.13.	Sekvenčna reakcija	29
3.2.14.	Metiliranje plazmidnega vektorja F4	31
3.3.	Delo s celičnimi kulturami.....	32
3.3.1.	Celična kultura HOS.....	32
3.3.2.	Priprava gojišč	32
3.3.3.	Priprava fosfatnega pufra (PBS).....	32
3.3.4.	Precepljanje, tripsinizacija.....	32
3.3.5.	Transfekcija	33
3.3.6.	Liza celic.....	34
3.3.7.	Merjenje luciferazne aktivnosti	35
3.4.	EMSA	36
3.4.1.	Priprava 5X tris/borat/EDTA(TBE) pufra.....	37
3.4.2.	Priprava 6 % poliakrilamidnega gela.....	38
3.4.3.	Priprava celičnega ekstrakta	38

3.4.4.	Priprava vzorcev	38
3.4.5.	Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu in prenos na najlonsko membrano	40
3.4.6.	Detekcija kompleksov transkripcijskih dejavnikov z oligonukleotidi	41
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	42
4.1.	Rezultati iskanja vezavnih mest.....	42
4.2.	Sekvence in bioinformatična analiza	45
4.3.	Rezultati merjenja Luc/Rluc aktivnosti	46
4.4.	Rezultati EMS-e.....	50
4.4.1.	Rezultati interakcij s Sry.....	51
4.4.2.	Rezultati interakcij s c-Myb	52
5.	SKLEP	54
6.	LITERATURA	55
	Priloga 1.....	1

POVZETEK

Ena od glavnih regulatornih poti, ki je vključena v nastanek osteoporoze in sodeluje v uravnavanju kostne remodelacije, je sistem RANKL/RANK/OPG. Ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa-B (RANKL) je protein, ki ga proizvajajo osteoblasti in ki preko vezave na receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa-B (RANK) sproži diferenciacijo pre-osteoklastov in/ali aktivacijo zrelih osteoklastov in pospešuje proces resorpcije (razgradnje) kostnine. Poleg tega RANKL sodeluje tudi v laktaciji, proliferaciji rakavih celic in pri pridobljeni imunosti. Na izražanje gena *RANKL* vplivajo različni dejavniki, ki pa so relativno slabo poznani. V naši nalogi smo želeli s pomočjo analize promotorja gena *RANKL* odkriti vezavna mesta za specifične transkripcijske dejavnike, ki bi lahko imeli pomembno vlogo pri izražanju tega gena in posredno tudi na kostno razgradnjo. Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali plazmidne vektorje, v katere so bili vstavljeni različno dolgi odseki promotorja gena *RANKL*. Z merjenjem izražanja plazmidnih vektorjev v osteoblastnih celičnih kulturah smo identificirali pomembne regulatorne regije s potencialnimi vezavnimi mesti za transkripcijske dejavnike. Prepoznali smo regijo, ki je pomembna za vezavo aktivatorskih dejavnikov, in v tej regiji s pomočjo računalniških programov izbrali vezavni mesti za dva transkripcijska dejavnika, Sry in c-Myb. S specifičnimi mutacijami v ustreznem plazmidnem vektorju in statistično obdelavo podatkov smo izračunali statistično razliko med izražanjem plazmidnih vektorjev z in brez vezavnega mesta za Sry ali c-Myb. Na ta način smo dokazali, da ta dva transkripcijska dejavnika vplivata na izražanje gena *RANKL*. To smo dodatno potrdili z metodo EMSA – test zamika elektroforezne mobilnosti (ang. Electrophoretic mobility shift assay) na osnovi interakcij Sry in c-Myb iz celičnega ekstrakta z našimi oligonukleotidi. Zaključimo lahko, da naši rezultati nakazujejo na pomembno vlogo Sry in c-Myb pri uravnavanju kostne remodelacije, kar dosedaj še ni bilo objavljeno.

Ključne besede

RANKL, kostna premena, transkripcijski dejavnik, izražanje, osteoblastna celična kultura.

ABSTRACT

One of the main regulatory pathways involved in the development of osteoporosis and in regulation of bone remodeling is the RANKL/RANK/OPG system. The receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) is a protein produced by osteoblasts. By binding to the receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) it initiates the preosteoclast differentiation and/or activation of mature osteoclasts as well as facilitates the process of bone resorption. RANKL is also involved in lactation, cancer cell proliferation and acquired immunity. *RANKL* gene signaling is determined by various factors which are relatively unknown. With the analysis of *RANKL* gene promoter, our work aims to discover the specific transcription factors binding sites which could play an important role in signaling of this gene and indirectly affect bone resorption. In the experiment, we used plasmid vectors in which sections of different lengths of *RANKL* gene promoter were inserted. By measuring plasmid vectors signaling in osteoblastic cell cultures we identified important regulatory regions with potential transcription factors binding sites. We identified the region which is important for binding of activator factors. With computer programs, we selected from this region two binding sites for two transcription factors, Sry and c-Myb. With specific mutations in the corresponding plasmid vectors and statistical data processing we calculated the statistical difference between signaling of plasmid vectors with and without the binding site for Sry and c-Myb. In this way, it was proved that these two transcription factors influence *RANKL* gene signaling. Our findings were confirmed with the EMSA method (electrophoretic mobility shift assay) based on Sry and c-Myb interactions from the cell extracts with our oligonucleotides. To sum up, our results indicate the important role that Sry and c-Myb have in regulation of bone remodeling, which is a finding that has not been published yet.

Key words

RANKL, bone turnover, transcription factor, signaling, osteoblastic cell culture.

Seznam okrajšav

1,25 (OH)₂ D₃ – 1,25 dihidroksi vitamin D₃

AA:BAA – zmes akrilamida in bisakrilamida

BAC – reporterski konstrukt

CSF – kolonije stimulirajoči dejavnik

DTCS – reagent za ciklično sekveniranje (ang. Dye Terminator Cycle Sequencing)

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

EMSA – test zamika elektroforezne mobilnosti (ang. Electrophoretic mobility shift assay)

FBS – fetalni goveji serum

HOS – celična kultura osteoblastov

IL – interlevkin

M-CSF – makrofagni-kolonije stimulirajoči dejavnik

NF-Kb – jedrni dejavnik kappa-B

OPG – osteoprotegerin

PBS – fosfatni pufer

PLB – lizirajoči pufer

PTH – paratiroidni hormon

RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa-B

RANK – receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa-B

Sry – regija na kromosomu Y, ki določa spol (ang. Sex determining region Y)

TBE – tris/boratni/EDTA pufer

TEMED – tetrametiletilendiamin

TNF – tumor nekrotizirajoči dejavnik

Kazalo slik

Slika 1: Diferenciacija osteoblastov	1
Slika 2: Signalna pot v osteoklastogenezi	2
Slika 3: Kostna remodelacija.....	4
Slika 4: Sistem RANKL/RANK/OPG.....	5
Slika 5: Vpliv in vloge RANKL.....	6
Slika 6: Transkripcija	8
Slika 7: Proces nastanka kompleksa, pomembnega za začetek transkripcije.....	9
Slika 8: Plazmidni vektor pGL3 – basic.....	15
Slika 9: Plazmidni vektor pRL-TK.....	19
Slika 10: Shema poteka mutageneze	25
Slika 11: Princip metode EMSA	36
Slika 12: Rezultat iskanja vezavnih mest z računalniškim program TF Research	42
Slika 13: Matrika za Sry vezavno mesto.	43
Slika 14: Matrika za c-Myb vezavno mesto.	44
Slika 15: Sekvenca mutiranega plazmidnega vektorja F4-Sry z označeno vneseno mutacijo	45
Slika 16: Del sekvence mutiranega plazmidnega vektorja F4-c-Myb z označeno vneseno mutacijo	45
Slika 17: Grafični prikazi razmerji med Luc in Rluc aktivnostjo v eksperimentu 1	46
Slika 18: Grafični prikaz razmerij med Luc in Rluc aktivnostjo v eksperimentu 2	47
Slika 19: Sekvenca, ki razlikuje plazmidna vektorja F3 od F2	49
Slika 20: Sekvenca, ki razlikuje plazmidna vektorja F3 in F4 ter označeni vezavni mesti za Sry in c-Myb.....	49
Slika 21: Rezultati interakcij s Sry.	52
Slika 22: Rezultati interakcij s c-Myb_1..	53
Slika 23: Rezultati interakcij s c-Myb_2..	53

Kazalo preglednic

Preglednica I: Seznam uporabljene laboratorijske opreme	12
Preglednica II: Seznam uporabljenih kemikalij.....	13
Preglednica III: Seznam uporabljenih reagenčnih kompletov.....	14
Preglednica IV: Lastnosti pGL3 – basic plazmidnega vektorja	16
Preglednica V: Sekvence regulatorne regije gena <i>RANKL</i> v plazmidnih vektorjih, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu	16
Preglednica VI: Lastnosti oligonukleotidnih začetnikov, uporabljenih v mutagenezi	19
Preglednica VII: Lastnosti oligonukleotidnih začetnikov, uporabljenih v sekvenčni reakciji	20
Preglednica VIII: Lastnosti uporabljenih oligonukleotidov	20
Preglednica IX: Načrt za pripravo mešanice za mutagenozo.	26
Preglednica X: Program pomnoževanja – mutagenza	26
Preglednica XI: Načrt priprave mešanice za restrikcijo starega plazmida	27
Preglednica XII: Načrt za pripravo sekvenčne reakcije..	30
Preglednica XIII: Program pomnoževanja – sekvenčna reakcija.....	30
Preglednica XIV: Program sekveniranja LFR-a.....	31
Preglednica XV: Načrt za pripravo reagenčne mešanice – metilacija.....	31
Preglednica XVI: Načrt za pripravo transfekcijske mešanice	34
Preglednica XVII: Program luminimetra Biotek Synergy H4.....	35
Preglednica XVIII: Načrt za pripravo poliakrilamidnega gela.....	38
Preglednica XIX: Načrt priprave vzorcev za analizo interakcije s Sry..	39
Preglednica XX: Načrt priprave vzorcev za analizo interakcije s c-Myb_1..	39
Preglednica XXI: Načrt priprave vzorcev za analizo interakcije s c-Myb_2.....	40
Preglednica XXII: Izračunana razmerja med Luc in Rluc aktivnostjo v eksperimentu 1 ...	46
Preglednica XXIII: Izračunana razmerja med Luc in Rluc aktivnostjo v eksperimentu 2..	47
Preglednica XXIV: Izračunani statistični p v eksperimentu 1	48
Preglednica XXV: Izračunani statistični p v eksperimentu 2.....	48

1. UVOD

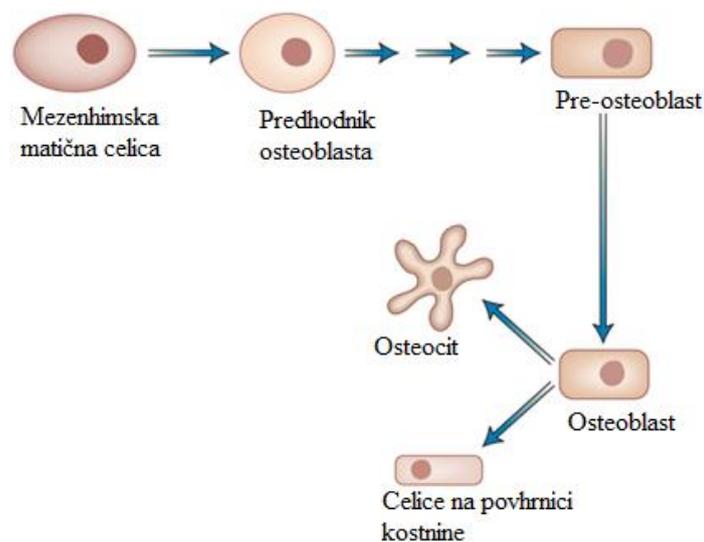
1.1. Kostna premena

Kosti se skozi naše celotno življenje obnavljajo s pomočjo biokemijskega procesa kostne preнове ali kostne remodelacije, kjer se staro kostno tkivo zamenjuje z novim. V ta proces so vključeni osteoklasti, osteoblasti in osteociti. (1, 2)

1.1.1. Osteoblasti

Osteoblasti so enojedrne celice, odgovorne za tvorbo kostnega matriksa. Razvijejo se iz mezenhimskih krvotvornih matičnih celic, ki se pod vplivom različnih dejavnikov spremenijo v preosteoblast in nadalje v osteoblast (slika 1).

Transkripcijska dejavnika, ki vplivata na diferenciacijo osteoblastov, sta Runx2 in Osterix. Na svoji površini izražajo receptorje za različne faktorje, ki so znani kot modulatorji kostne presnove, to so paratiroidni hormon (PTH), 1,25-dihidroksivitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃), estrogeni, ... Proizvajajo različne citokine, makrofagni kolonije stimulirajoči dejavnik (M-CSF), ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa-B (RANKL) in osteoprotegerin (OPG). Prvi je odgovoren za preusmeritev monocitne linije v osteoklastno, medtem ko druga dva vplivata na nadaljnjo osteoklastno diferenciacijo. (3, 4, 5)



Slika 1: Diferenciacija osteoblastov (<http://health-7.com/imgs/15/866.jpg>.)

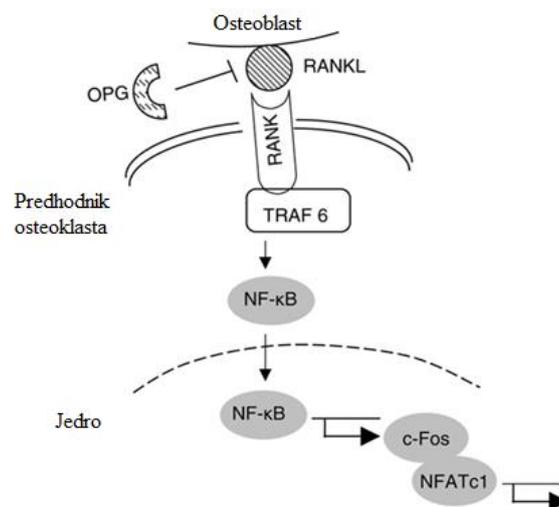
1.1.2. Osteoklasti

Osteoklasti so specializirane celice, odgovorne za resorpcijo kosti. Njihova produkcija je vpletena v različna patološka stanja in večina njih vodi v izgubo kostne gostote. So velike mnogojedrne celice, ki nastanejo s citoplazemskim zlitjem mononuklearnih predhodnih celic, ki izhajajo iz makrofagno-monocitne linije krvotvornih matičnih celic.

Sintetizirajo lizosomske encime (proti tartratu odporno kislino fosfatazo, katepsin K in druge), jih izločajo v zunajcelični prostor in lokalno znižujejo pH. Tako pripravijo idealne pogoje za topljenje kristalov hidroksiapatita, anorganske sestavine kosti, v kateri je skladiščen kalcij. Razgali se kolagenski matriks, ki ga kasneje razgradijo kolagenaze.

Nastajanje in delovanje osteoklastov spodbujajo kolonije stimulirajoči faktorji (CSF), tumor nekrotizirajoči faktorji (TNF), RANKL, IL-1 (interlevkin-1) in IL-6 (interlevkin-6), ... (3, 4, 6, 7, 8)

V osteoklastogenezi, pod fiziološkimi pogoji, se RANKL, proizveden v osteoblastih, veže na receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa-B (RANK), ki je na površini predhodnikov osteoklastov. Ta povezava sproži delovanje adaptorskega proteina receptorja za tumor nekrotizirajoči faktor (TRAF6, ang. tumor necrosis factor receptor associated factor), ki vodi v aktivacijo jedrnega dejavnika kB (NF- κ B) in translokacijo v jedru. NF- κ B poveča izražanje c-Fos, ki nadalje reagira z jedrnim faktorjem aktiviranih celic T (NFATc1, ang. nuclear factor of activated T cells) in sproži transkripcijo v osteoklastogenetičnih genih in nadaljnjo diferenciacijo v zrele osteoklaste (slika 2). (7)



Slika 2: Signalna pot v osteoklastogenezi (7)

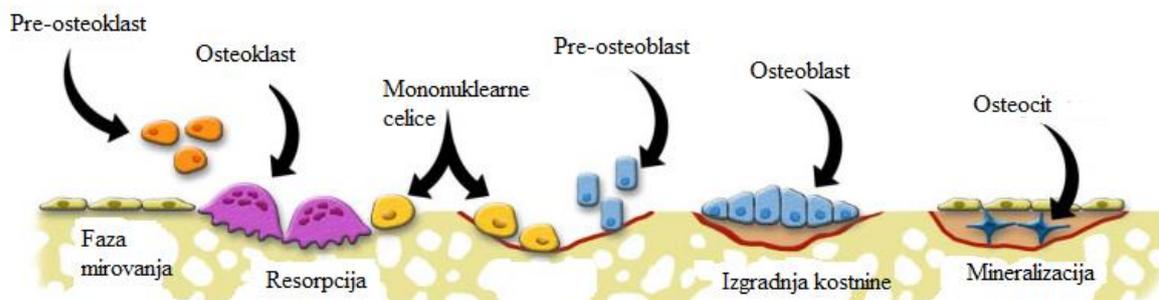
1.1.3. Osteociti

Osteociti so preoblikovani mirujoči osteoblasti, ki se lahko nahajajo na površini kosti (t. i. lining cell) ali pa med kostnimi lamelami. Imajo večje število izrastkov, tako da se lahko preko njih vežejo na površino kosti in tudi med seboj. (4)

1.1.4. Proces kostne remodelacije

Kostna remodelacija poteka v več fazah (slika 3).

- Faza mirovanja in aktivacije – mirujoči in ploščati osteoblasti (t. i. lining cell) so razporejeni čez kostnino in se ob dejavniku razmaknejo in razgalijo kostno površino.
- Privabljanje osteoklastov in razgradnja kostnine – izpostavljena kostna površina privabi osteoklaste s procesom kemotakse, pritrldijo se na površino kostnine in jo začnejo razgrajevati. Za uspešno razgradnjo kosti se osteoklasti močno pritrldijo na površino kostnine s specializiranimi podosomi, ki so bogati z aktinom. S temi podosomi prekrijejo čimvečjo površino kostnine in tvorijo membrano, ki poveča površino za sekrecijo klorovodikove kisline in proteolitičnega encima katepsin K na površino kostnine in s tem povzročijo njeno razgradnjo.
- Preobrat in privabljanje osteoblastov – ko osteoklasti opravijo svoje delo, se odmaknejo iz erozijske lakune, tja pa se naselijo mononuklearni fagociti, ki očistijo lakuno in izgradijo cementno kost, kemoatraktani pa privabijo osteoblaste, ki se diferencirajo in aktivirajo.
- Sinteza kostnega matriksa in mineralizacija – poteka v treh prepletajočih procesih: sinteza osteoidnega matriksa, njegovo zorenje in na koncu mineralizacija. Pri mineralizaciji sodeluje encim alkalna fosfataza in osteokalcin. Del osteoblastov se pretvori v osteocite, ki ostanejo v kostnem matriksu. (1, 5, 7, 9)



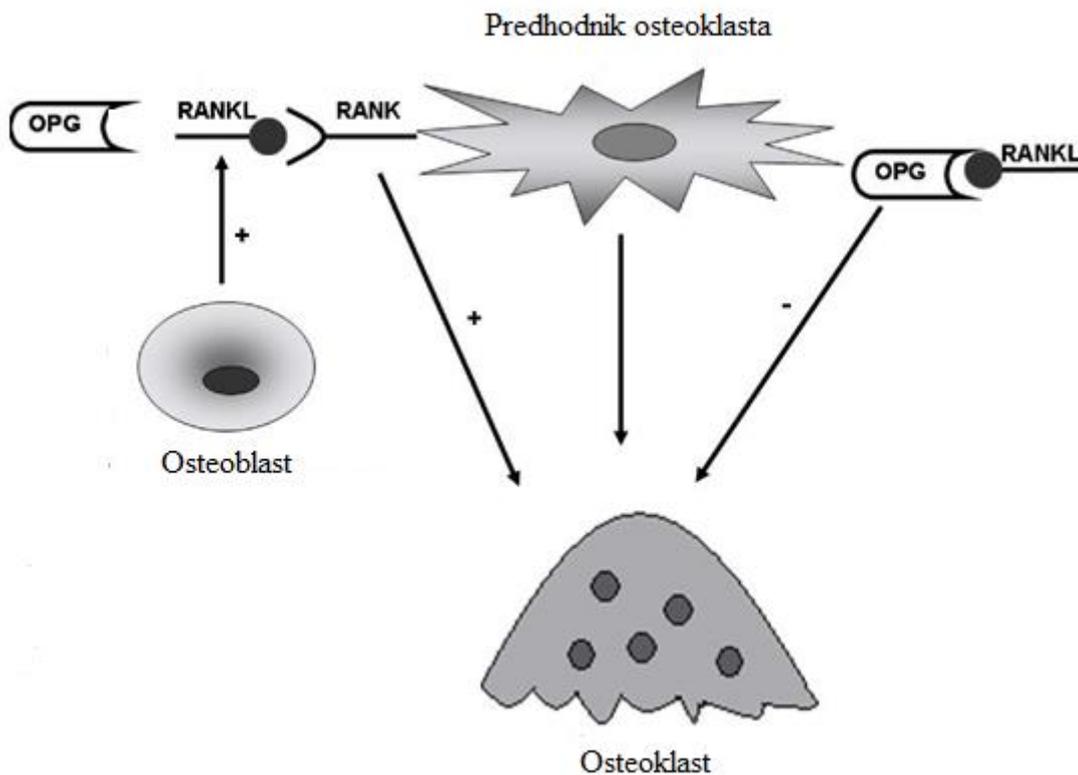
Slika 3: Kostna remodelacija (www.ns.umich.edu/Releases/2005/Feb05/bone.html.)

Nadzor procesa prenove kosti se dogaja na sistemskem in lokalnem nivoju. Sistemski regulatorji tega procesa so hormoni (PTH, kalcitonin, kalcitriol, estrogen, ...). Estrogeni zavirajo kostno razgradnjo in pospešujejo delovanje osteoblastov. Eden od glavnih učinkov na kosti je tudi vpliv estrogenov na RANKL/RANK/OPG signalno pot, saj zavirajo diferenciacijo in pospešujejo apoptozo osteoklastov. Lokalni regulatorji pa so vnetni citokini, rastni in diferenciacijski dejavniki (OPG, RANKL, IL-1, ...), ki so za regulacijo resorpcije kosti pomembnejši od prvih. Oboji uravnavaajo nastajanje in delovanje osteoklastov in osteoblastov. Njihovo usklajeno delovanje skrbi za vzpostavljanje ravnovesja med kostno razgradnjo in kostno izgradnjo (t. i. coupling). (1, 10, 11)

1.2. Sistem RANKL/RANK/OPG

Signalna pot RANKL/RANK/OPG je ena od dveh glavnih regulatornih poti, ki sta vključeni v razvoj osteoporoze in je ključna v procesu osteoklastogeneze. Po odkritju te signalne poti je postalo jasno, da je delovanje osteoklastov pod nadzorom osteoblastov.

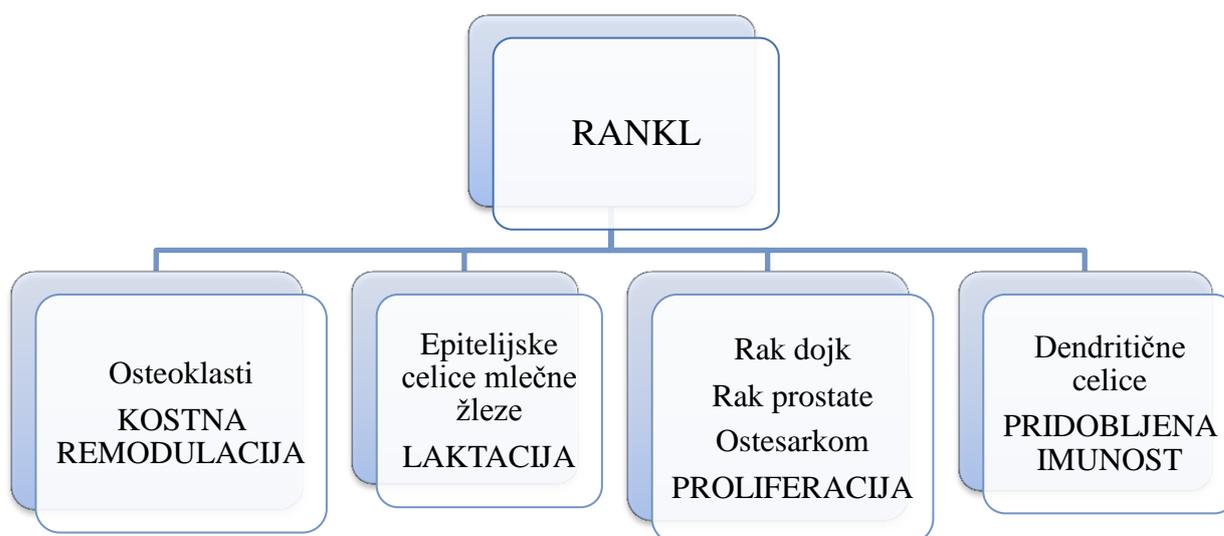
Osteoblasti izločajo RANKL in OPG, prvi se veže na RANK na membrani osteoklastov in poveča aktivnost in število osteoklastov. OPG je topni receptor za RANKL in z RANK tekmuje za vezavo na RANKL ter ga tako inhibira (slika 4). Poleg RANKL je za razvoj osteoklastov pomemben tudi M-CSF, ki ga proizvajajo krvotvorne matične celice. (1, 3, 7)



Slika 4: Sistem RANKL/RANK/OPG (23)

1.2.1. RANKL

RANKL spada v skupino TNF in je tip II homotrimerni transmembranski protein, ki se izraža v membranski in topni obliki. Topna oblika je rezultat proteolitične cepitve z disintegrinom in metaloproteinazo (protein ADAM) ter matriksno metaloproteinazo (MMP3 in 7). Gen *RANKL* je sestavljen iz 5 eksonov in je velik 33,9 kb. Kostne celice izražajo membransko obliko RANKL, torej se morajo osteoblasti fizično povezati s predhodniki osteoklastov, da aktivirajo RANK. Topno obliko RANKL pa proizvajajo aktivirani limfociti T in je prav tako aktivna ter se veže na RANK. Izražanje RANKL je stimulirano v osteoblastnih celicah, limfnih žlezah, timusu, pljučih in v majhnih količinah v vranici in kostnem mozgu. Hormoni in citokini stimulirajo resorpcijo kosti preko zviševanja izražanja RANKL v osteoblastih in zniževanja izražanja OPG. Poleg vloge v diferenciaciji osteoklastov ima še druge, predstavljene na sliki 5. (6, 7, 12, 13, 14, 15)



Slika 5: Vpliv in vloge RANKL (7)

Eden od stimulatorjev osteoblastnih celic je hormon PTH. To so dokazali s poizkusi na glodavcih, kjer sta sočasna redukcija RANKL in števila osteoklastov pri miših, ki niso proizvajale PTH, pokazala biološko relevantnost. (6, 16, 17)

PTH vpliva na izražanja RANKL preko aktivacije proteina kinazne A – cAMP poti in preko CREB (ang. cAMP response element binding protein). Vezavno mesto za CREB so identificirali 962 bp pred mestom začetka transkripcije gena *RANKL*. Da bi identificirali še dodatna pomembna regulatorna mesta v genu *RANKL*, so razvili BAC, transkripcijski reporterski konstrukt. V BAC so vstavili celoten mišji *RANKL* gen, vse od 5' do celotne 3' nekodirajoče regije. Nato so 3' nekodirajočo regijo zamenjali s kodirajočim zaporedjem za luciferazo z uporabo metode rekombinantne DNA. Z različnimi mutacijami in delecijami različnih regij znotraj BAC so lokalizirali pomembna območja, povezana s PTH. To mesto je veliko 2 kb in je locirano 76 kb pred mestom začetka transkripcije gena *RANKL*. Ta regija ima dva močno ohranjena CRE (cAMP-response element) in vezavno mesto za specifični transkripcijski dejavnik Runx2 v osteoblastih. Vezavo CREB in Runx2 na ta mesta so dokazali z metodo EMSA (ang. Electrophoretic mobility shift assay) in imunoprecipitacijo. (6, 18–22)

1.2.2. RANK in OPG

RANK tako kot RANKL spada v skupino TNF in je tip I homotrimerni transmembranski protein. Njegovo izražanje je bilo odkrito le na osteoklastnih prekurzorskih celicah, zrelih osteoklastih in dendritičnih celicah. Izražanje OPG so poleg osteoblastov našli še v srcu, ledvicah, jetrih, vranici in kostnem mozgu. Njegovo izražanje je regulirano z dejavniki, ki inducirajo izražanje RANKL. (7, 15)

1.3. Transkripcija in vplivi nanjo

Gen je segment DNA, ki kodira informacijo, potrebno za sintezo funkcionalnega biološkega produkta – proteinov, strukturne RNA (ribosomalne – rRNA in transportne – tRNA) in katalitične ali regulatorne molekule RNA. Je zaporedje nukleotidov, zgrajenih iz izmenjujočih se intronskih-nekodirajočih in eksonskih-kodirajočih območij. V človeškem genomu razlikujemo dve vrsti genov, in sicer nekodirajoče gene RNA in proteine kodirajoče gene. Večina jih spada med slednje. (36)

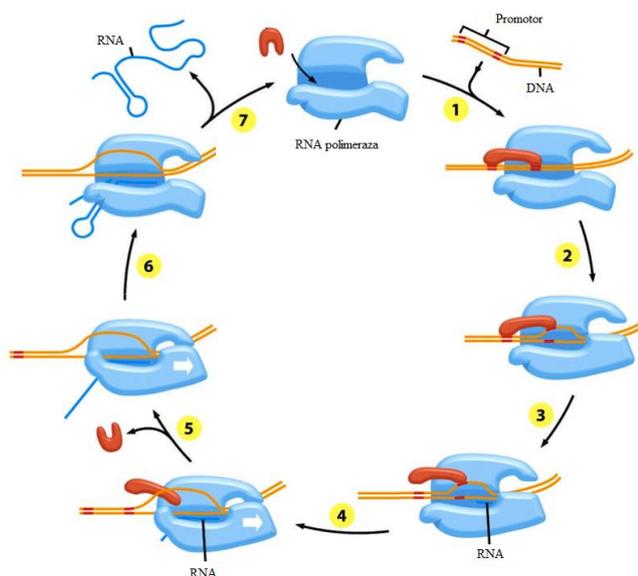
Razumevanje procesa prenosa informacije iz DNA v funkcionalni protein je postalo jasno ob odkritju informacijske – mRNA, tRNA in rešitvi genetskega koda. Te in druge informacije vodijo do centralne dogme molekularne biologije, ki definira tri ključne procese v prenosu genetske informacije. Prva je replikacija, kopiranje starševske DNA in nastanek hčerinskih DNA z identično nukleotidno sekvenco. Druga je transkripcija, proces, kjer se deli molekule DNA prepisejo v molekulo mRNA. In tretja je translacija, kjer se genetsko sporočilo, zapisano v molekuli mRNA prevede v protein s specifično sekvenco aminokislin. (37)

Proteine kodirajoči gen vsebuje promotor in druge regulatorne elemente, s katerimi se lahko proces transkripcije strogo regulira. Regulatorni elementi zagotavljajo signale, ki pomenijo začetek in konec strukturnega gena, sodelujejo v zagonu ali ustavitvi transkripcije, pomembni pa so tudi kot začetna točka replikacije ali rekombinacije. Pri transkripciji poteka prepisovanje enega gena naenkrat in ker je proces reguliran, poteka le prepisovanje informacij, ki jih celica v določenem trenutku potrebuje. Ena od kontrol je variacija v afiniteti RNA polimeraze do promotorja, drugo pa so aktivatorji in represorji transkripcije. (37)

V procesu transkripcije iz dvoverižne molekule DNA nastaja mRNA. V tem procesu glavno vlogo opravlja RNA polimeraza, ki je potrebna za sintezo mRNA in potrebuje molekulo DNA za njeno aktivnost, ne potrebuje pa oligonukleotidnih začetnikov tako kot DNA polimeraza. (37)

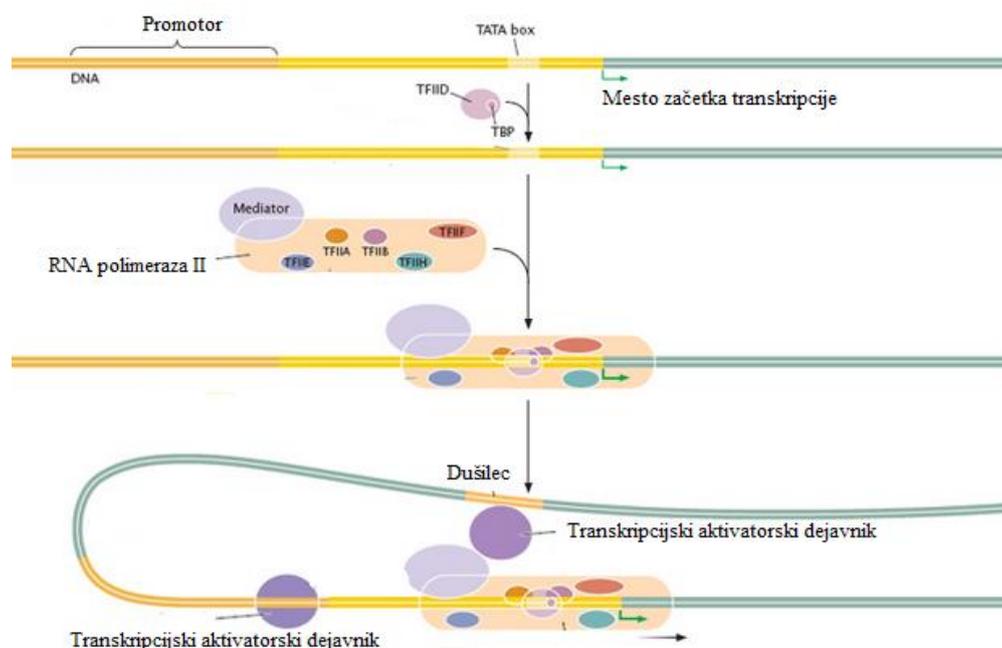
Proces transkripcije poteka v več korakih (slika 6):

- Transkripcijski dejavniki začnejo proces transkripcije tako, da omogočijo vezavo RNA polimeraze na promotor DNA, ki se nahaja 30 do 90 baznih parov stran od mesta začetka transkripcije (1).
- Encim helikaza ustvari transkripcijski mehurček (velik okoli 17 baznih parov), tako da prekine vodikove vezi znotraj dvovijačne DNA in ustvari matrico za sintezo molekule RNA (ena veriga DNA). Transkripcijski mehurček se tekom procesa premika naprej in razvija dvoverižno DNA (2).
- RNA polimeraza bere zaporedje DNA ($3' \rightarrow 5'$) in sestavlja antiparalelno komplementarno molekulo RNA z dodajanjem ustreznih nukleotidov. Nastaja dvojna vijačnica RNA–DNA (3, 4).
- RNA vijačnica se odvijaje iz kompleksa (5).
- Na $5'$ konec verige RNA se doda kapa in na $3'$ konec poli(A) rep, ki je sestavljen iz 20 do 250 adenilatnih ostankov (6).



Slika 6: Transkripcija (<http://i.imgur.com/H7wRD.png>)

Na splošno ima RNA polimeraza zelo majhno afiniteto do promotorja. Zato je začetek prepisovanja odvisen od delovanja enega ali več aktivatorskih proteinov. Evkariontske celice imajo tri različne RNA polimeraze (I, II in III), ki so specifične za različne molekule RNA. mRNA je prepisana z RNA polimerazo II. Za RNA polimerazo II so značilna mesta v promotorju in regulatornih regijah gena, ki so pomembna za njeno delovanje. Prvi regulatorni element je t. i. TATA box (TATAAAA sekvenca), ki je lociran 25 do 30 baznih parov pred mestom začetka transkripcije. To je vezavno mesto za transkripcijski dejavnik II D (TFIID), ki je potreben za vezavo RNA polimeraze. TFIID se na TATA box veže preko TATA vezočega proteina in skupaj s še dodatnimi transkripcijskimi dejavniki in RNA polimerazo tvorijo kompleks, pomemben za začetek transkripcije (slika 7). TATA box je zelo pogost, ampak našli so tudi gene, ki se izražajo brez njega. (37)



Slika 7: Proces nastanka kompleksa, pomembnega za začetek transkripcije
http://www.nature.com/scitable/nated/content/18943/pierce_13_17_large_2.jpg

V regulatorni regiji, to je regija, ki je več sto baznih parov pred mestom začetka transkripcije, so našli dodatne različne regulatorne elemente. Dva znana, ki sta tudi pogosta, sta še GC box (GGGCGG sekvenca) in CCAAT box (GCCAAT sekvenca). Ostale regulatorne elemente, ki pa imajo bolj kompleksno sekvenco, imenujemo »vzpodbujevalci« (ang. enhancers). Ti se lahko nahajajo tudi več tisoč baznih parov stran

od gena. Na te regulatorne elemente, opisane zgoraj, se vežejo specifični regulatorni proteini, imenovani transkripcijski dejavniki. V večini primerov imajo različne strukturne domene, s katerimi se specifično vežejo na DNA, in ostale domene, pomembne za aktivacijo ali interakcijo z drugimi regulatornimi dejavniki. (37)

2. NAMEN DELA

Regulatorna regija DNA, ki se nahaja do 1000 nukleotidov pred mestom začetka transkripcije gena *RANKL*, do sedaj še ni bila podrobneje raziskana, kljub temu, da prav te regije običajno igrajo ključno vlogo pri regulaciji genskega izražanja. Cilj raziskave je bil najti zaporedja DNA, ki so vpletena v regulacijo izražanja gena *RANKL*, in identificirati transkripcijske dejavnike, ki se vežejo na najdena zaporedja.

Hipoteze:

- Regulatorna regija, ki leži 1000 bp pred mestom začetka transkripcije, vsebuje elemente, vpletene v uravnavanje izražanja gena *RANKL*.
- Obstajajo transkripcijski dejavniki, ki se vežejo na ta zaporedja in vplivajo na izražanje gena *RANKL*.

Da bi hipoteze potrdili, bomo uporabili metode rekombinantne tehnologije DNA, mestno specifično mutagenozo, testiranje na celičnih kulturah osteoblastov (HOS) in rezultate potrdili z metodo EMSA, s katero bomo preiskovali interakcije med transkripcijskimi dejavniki in DNA.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

3.1.1. Laboratorijska oprema

Preglednica I: Seznam uporabljene laboratorijske opreme

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Avtomatske pipete	Eppendorf
Nastavki za pipete	Starlab
Epice različnih volumnov	Plasti brand, Eppendorf
Hladilnik	Gorenje
Zamrzovalnik	Gorenje
Tehtnica	Kern
Avtoklav	Steril Technik AG
Stresalnik	Labnet
Gorilnik Labogaz 206	Campinggaz
Centrifuga namizna	LMS
Centrifuga 5805 R	Eppendorf
Centrifuga 5415 R	Eppendorf
Centrifuga minispin	Eppendorf
Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific
Ciklični termostat C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad
Sekvenator – GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System	Beckam Coulter
Sterilne erlenmajerice	Različni proizvajalci
Petrijevke	Različni proizvajalci
Falkonke	TPP
Steklenice za celične kulture (75 mL)	TPP
Inkubator za celične kulture	Heraeus Instrument
Centrifuga za celične kulture	Thermo Scientific
Mikroskop Olympus CK 40	Olympus

Ploščice za celične kulture (12 luknjic)	TPP
Elektroforezni sistem	Bio-Rad
Transluminator	Vilber Lourmat
G:box	Syngene
Računalnik s programsko opremo Gene snap, Gene Tools	Syngene

3.1.2. Kemikalije in reagenčni kompleti

Preglednica II: Seznam uporabljenih kemikalij

Kemikalija	Proizvajalec
LB (Luria-Bertani)	Invitrogen
Agar	Sigma-Aldrich
Antibiotik ampicilin	Sigma-Aldrich
Destilirana voda	Elga aparat
Izopropanol	Merck KGaA
Tris baza (1 M)	Sigma-Aldrich
Na ₂ EDTAx2H ₂ O	Sigma-Aldrich
Borna kislina	Sigma-Aldrich
NaOH zrnca	J.T. Baker
Pufer NEB	Sigma-Aldrich
Pufer Dpn1	Sigma-Aldrich
Natrijev acetat, (3 M, pH 5,2)	Sigma Aldrich
Na ₂ EDTA, (100 mM, pH 8)	Sigma Aldrich
Etanol (100 %)	Merck KGaA
Medij za gojenje celičnih kultur DMEM	Sigma-Aldrich
Fetalni goveji serum (FBS)	Gibco
Antibiotik/antimikotik	Gibco
L-glutamin	Gibco

NaCl	Sigma-ALdrich
Na ₂ HPO ₄	Fluka
KH ₂ PO ₄	Fluka
HCl	Sigma-Aldrich
Trypsin	Gibco
AA:BAA (40 %)	Fluka
TEMED	Sigma-Aldrich
APS	Fluka

Preglednica III: Seznam uporabljenih reagenčnih kompletov

Reagenčni kompleti	Proizvajalec
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Nemčija
HotStar HiFidelity Polymerase Kit	QIAGEN, Nemčija
The TransformAid Bacterial Transformation Kit	Thermo Scientific, ZDA
GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit	Beckam Coulter, ZDA
X-treme GENE HP DNA transfection reagent	Roche, Švica
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, ZDA
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Scientific, ZDA
LightShift Chemiluminescent EMSA kit	Thermo Scientific, ZDA

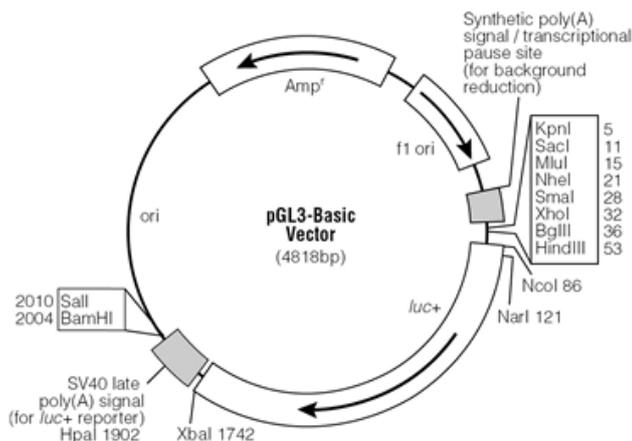
3.1.3. Plazmidni vektorji

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali plazmidne vektorje, pripravljene s pomočjo tehnologije rekombinante DNA.

Plazmidni vektorji imajo naslednje lastnosti:

- So zunajkromosomske molekule DNA, ki jih vsebujejo mnoge bakterijske celice.
- Imajo dvoverižno DNA v obliki sklenjenega kroga.
- Služijo vnosu fragmentov tuje DNA v gostiteljsko celico s procesom transformacije.
- Sprejmejo fragmente, dolge do 15 000bp.
- Imajo mesto ORI, kjer je mesto začetka replikacije;
- poliklonsko mesto – mesto, kjer so na relativno majhnem nukleotidnem zaporedju mesta za številne restrikcijske encime in
- Amp^r – mesto rezistence, zapis za encim, ki razgradi antibiotik ampicilin.
- Pomnožujejo se neodvisno od genomske DNA in na sproščen način, ker s tem nastane več kopij.
- Biti mora majhen, saj ga tako lažje ločimo od kromosomske DNA.
- Vsebovati mora prepoznavne označevalce, s pomočjo katerih jih lahko pregledujemo (npr. odpornost proti antibiotikom).
- Imeti mora le eno cepitveno mesto za določeno restrikcijsko endonukleazo. (28)

Za osnovni plazmidni vektor smo izbrali pGL3-basic (slika 8), ki se uporablja za kvantitativne analize dejavnikov, ki potencialno vplivajo na izražanje genov, velik je 4818 bp, vse njegove ostale lastnosti pa so zapisane v preglednici IV. Vsebuje luciferazni gen kresničke, s pomočjo katerega lahko kvantificiramo izražanje vstavljenega dela DNA z merjenjem luciferazne (Luc) aktivnosti.



Slika 8: Plazmidni vektor pGL3 – basic (<http://www.promega.com/~media/images/resources/figures/0700-0799/0746vaw4.gif?la=en>)

Preglednica IV: Lastnosti pGL3 – basic plazmidnega vektorja

Mesto na plazmidnem vektorju pGL3-basic	Nahajanje med bp
Poliklonsko mesto	1-58
Luciferazni gen (Luc)	88-1740
ORI	2318
Beta laktamazni gen	3080-3940

Med restrikcijski mesti v pGL3-basic, BglIII in HindIII so bili kovalentno vstavljeni različni odseki regulatorne regije gena *RANKL*.

Uporabljali smo že skonstruirane plazmidne vektorje, poimenovane F1, F2, F3, F4 in tekom eksperimentalnega dela magistrske naloge skonstruirane F4-Sry, F4-c-Myb, F4-met, katerih vnesena sekvenca je opisana v preglednici V.

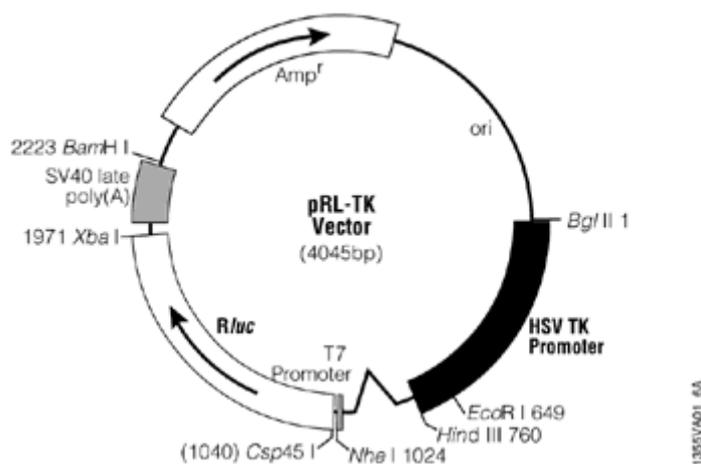
Preglednica V: Sekvence regulatorne regije gena *RANKL* v plazmidnih vektorjih, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu (podčrtani sta vezavni mesti za transkripcijska dejavnika, s sivo barvo pa označeni vnešeni mutaciji)

Plazmid	Vstavljen del regulatorne regije	Število baz
F1	<p>CTCCAGAAAGACAGCTGAGGATGGCAAGGGGAGTCTGGAACCACTGGAG TAGCCCCCAGCCTCCTCCTTGGAGGGCCCCCATGAAGGAGGCCCTTCAG TGACAGAGATTGAGAGAGAGGGAGGGCGAAAGGAAGGAAGGGGAGCCAG AGGTGGGAGTGGAAGAGGCAGCCTCGCCTGGGGCTGATTGGCTCCCGAG GCCAGGGCTCTCCAAGCGGTTTATAAGAGTTGGGGCTGCCGGGCGCCCT GCCCCGCTCGCCCGCGCCCCAGGAGCCAAAGCCGGGCTCCAAGTCGGC GCCCCACGTCGAGGCTCCGCCGAGCCTCCGGAGTTGGCCGCAGACAAG AAG</p>	346
F2	<p>AGAGGTTGGACAGGAAGGGTCTTTCAGAGATCATCAAATTTAACTTTCTA AATCCTAAGGAGGAAACCGAGACTCCAGGATGTGAAGTCCCTTCTCTAC CAAACTAGAAATGGATGCAGGAGGAATGTCTGAGGTGCAATCCTTATCCT TTAGCAAAGGTGTCCTCTGCGTCTTCTTTAACCATCTCTTGGACCTCC AGAAAGACAGCTGAGGATGGCAAGGGGAGTCTGGAACCACTGGAGTAGC CCCCAGCCTCCTCCTTGGAGGGCCCCCATGAAGGAGGCCCTTCAGTGAC AGAGATTGAGAGAGAGGGAGGGCGAAAGGAAGGAAGGGGAGCCAGAGGT GGGAGTGGAAGAGGCAGCCTCGCCTGGGGCTGATTGGCTCCCGAGGCCA GGGCTCTCCAAGCGGTTTATAAGAGTTGGGGCTGCCGGGCGCCCTG<u>CCC</u> GCTCGCCCGCGCCCCAGGAGCCAAAGCCGGGCTCCAAGTCGGCGCCC</p>	538

	CACGTCGAGGCTCCGCCGAGCCTCCG GAGTTGGCCGAGACAAGAAG	
F3	ATGCTTGCTTCTGGCTACACGC CCCTTTACCCTTTTCTCTGCACTGTTT TCATCTTTATAAAGTCAGAGTTGGTGTCTATAGGCTCTCTACTGCCACA TTCAAGACCTGCCTCGCTCAATGTCACCTTCAAGATGCAGAAATAGGGA TTTGGGAAGGGGATTGTGAAATTTTCGAAGTCTTCCAAAATACTTTGAG AAACTATATTTGGAAGCACTTTGGGGGG AGAGGTTGGACAGGAAGGGTC TTCAGAGATCATCAAATTTAACTTTCTAAATCCTAAGGAGGAAACCGAG ACTCCAGGATGTGAAGTCCCTTCTCTACCAAATAAGAATGGATGCAGGA GGAATGTCTGAGGTGCAATCCTTATCCTTTAGCAAAGGTGCCTCTGCG TCTTCTTTAACCCTCTCTTGGAC CTCCAGAAAGACAGCTGAGGATGGC AAGGGGAGTCTGGAACCACTGGAGTAGCCCCCAGCCTCCTCCTTGGAGG GCCCCATGAAGGAGGCCCTTCAAGTACAGAGATTGAGAGAGAGGGGAGG GCGAAAGGAAGGAAGGGGAGCCAGAGGTGGGAGTGGAAAGGGCAGCCTC GCCTGGGGCTGATTGGCTCCCGAGGCCAGGGCTCTCCAAGCGGTTTATA AGAGTTGGGGCTGCCGGGCGCCCTGCCCGCTCGCCCGCGCCCCAGGA GCCAAAGCCGGGCTCCAAGTCGGCGCCCCACGTCGAGGCTCCGCCGCAG CCTCCG GAGTTGGCCGAGACAAGAAG	762
F4	CACTAAGAGCCACAGTTCTGAATAGAGG TTTTTAAAAAGCCCTAGCAAG GTTTCTTTAGCAATG AAACTAA CATTTAACTGTATCATCAGCTTCGTGT TACATCTC TTTCCTGACTGTTGGGTG AGCCCTCCTCGG ATGCTTGCTTC TGGCTACACGC CCCTTTACCCTTTTCTCTGCACTGTTTTCATCTTTATA AAGTCAGAGTTGGTGTCTATAGGCTCTCTACTGCCACATTCAGACCTG CCTCGCTCAATGTCACCTTCAAGATGCAGAAATAGGGATTTGGGAAGGG GATTGTGAAATTTTCGAAGTCTTCCAAAATACTTTGAGAACTATATTT GGAAGCACTTTGGGGGG AGAGGTTGGACAGGAAGGGTC TTCAAGATCA TCAAATTTAACTTTCTAAATCCTAAGGAGGAAACCGAGACTCCAGGATG TGAAGTCCCTTCTCTACCAAATAAGAATGGATGCAGGAGGAATGTCTGA GGTGCAATCCTTATCCTTTAGCAAAGGTGTCTCTGCGTCTTCTTTAAC CCATCTCTTGGAC CTCCAGAAAGACAGCTGAGGATGG CAAGGGGAGTCT GGAACCACTGGAGTAGCCCCCAGCCTCCTCCTTGGAGGGCCCCCATGAA GGAGGCCCTTCAAGTACAGAGATTGAGAGAGAGGGAGGGCGAAAGGAAG GAAGGGGAGCCAGAGGTGGGAGTGGAAAGAGGCAGCCTCGCCTGGGGCTG ATTGGCTCCCGAGGCCAGGGCTCTCCAAGCGGTTTATAAGAGTTGGGGC TGCCGGGCGCCCTGCCCGCTCGCCCGCGCCCCAGGAGCCAAAGCCGG GCTCCAAGTCGGCGCCCCACGTCGAGGCTCCGCCGCAGCCTCCG GAGTT GGCCGAGACAAGAAG	898
F4-Sry	CACTAAGAGCCACAGTTCTGAATAGAGG TTTTTAAAAAGCCCTAGCAAG GTTTCTTTAGCAATG ACCCTAA CATTTAACTGTATCATCAGCTTCGTGT TACATCTC TTTCCTGACTGTTGGGTG AGCCCTCCTCGG ATGCTTGCTTC TGGCTACACGC CCCTTTACCCTTTTCTCTGCACTGTTTTCATCTTTATA	898

	<p>AAGTCAGAGTTGGTGTCTATAGGCTCTCTACTGCCACATTCAAGACCTG CCTCGCTCAATGTCACCTTCAAGATGCAGAAATAGGGATTTGGGAAGGG GATTGTGAAATTTTCGAAGTCTTCCAAAATACTTTGAGAACTATATTT GGAAGCACTTTGGGGGGAGAGGTTGGACAGGAAGGGTCTTTCAGAGATCA TCAAATTTAACTTTCTAAATCCTAAGGAGGAAAACCGAGACTCCAGGATG TGAAGTCCCTTCTCTACCAAACCTAGAATGGATGCAGGAGGAATGTCTGA GGTGCAATCCTTATCCTTTAGCAAAGGTGTCTCTGCGTCTTCTTTAAC CCATCTCTTGGACCTCCAGAAAGACAGCTGAGGATGGCAAGGGGAGTCT GGAACCACTGGAGTAGCCCCAGCCTCCTCCTTGGAGGGCCCCATGAA GGAGGCCCTTCAGTGACAGAGATTGAGAGAGAGGGAGGGCGAAAGGAAG GAAGGGGAGCCAGAGGTGGGAGTGGAAGAGGCAGCCTCGCCTGGGGCTG ATTGGCTCCCGAGGCCAGGGCTCTCCAAGCGGTTTATAAGAGTTGGGGC TGCCGGGGCGCCCTGCCCGCTCGCCCGCGCCCCAGGAGCCAAAGCCG GCTCCAAGTCGGCGCCCCACGTCGAGGCTCCGCCGAGCCTCCGGAGTT GGCCGCAGACAAGAAG</p>	
F4-c- Myb	<p>CACTAAGAGCCACAGTTCTGAATAGAGGTTTTTAAAAAGCCCTAGCAAG GTTTCTTTAGCAATGAAACTAACATTTAACTGTATCATCAGCTTCGTGT TACATCTCTTTCTGACTGGGGGGTGAGCCCTCCTCGGATGCTTGCTTC TGGCTACACGCCCCTTTACCCTTTTCTCTGCACTGTTTTCATCTTTATA AAGTCAGAGTTGGTGTCTATAGGCTCTCTACTGCCACATTCAAGACCTG CCTCGCTCAATGTCACCTTCAAGATGCAGAAATAGGGATTTGGGAAGGG GATTGTGAAATTTTCGAAGTCTTCCAAAATACTTTGAGAACTATATTT GGAAGCACTTTGGGGGGAGAGGTTGGACAGGAAGGGTCTTTCAGAGATCA TCAAATTTAACTTTCTAAATCCTAAGGAGGAAAACCGAGACTCCAGGATG TGAAGTCCCTTCTCTACCAAACCTAGAATGGATGCAGGAGGAATGTCTGA GGTGCAATCCTTATCCTTTAGCAAAGGTGTCTCTGCGTCTTCTTTAAC CCATCTCTTGGACCTCCAGAAAGACAGCTGAGGATGGCAAGGGGAGTCT GGAACCACTGGAGTAGCCCCAGCCTCCTCCTTGGAGGGCCCCATGAA GGAGGCCCTTCAGTGACAGAGATTGAGAGAGAGGGAGGGCGAAAGGAAG GAAGGGGAGCCAGAGGTGGGAGTGGAAGAGGCAGCCTCGCCTGGGGCTG ATTGGCTCCCGAGGCCAGGGCTCTCCAAGCGGTTTATAAGAGTTGGGG CTGCCGGGGCGCCCTGCCCGCTCGCCCGCGCCCCAGGAGCCAAAGCC GGGCTCCAAGTCGGCGCCCCACGTCGAGGCTCCGCCGAGCCTCCGGA GTTGGCCGCAGACAAGAAG</p>	898

Pri transfekciji smo uporabili še plazmidni vektor pRL-TK (ang. p Renilla Luciferase Reporter Vector) (slika 9), ki nosi zapis za luciferazo Renille (Rluc) in kateri nam je služil kot interna kontrola pri merjenju aktivnosti izražanja plazmidnih vektorjev.



Slika 9: Plazmidni vektor pRL-TK (<http://www.promega.com/~media/images/resources/figures/1300-1399/1355vaw4.gif?la=en>)

3.1.4. Oligonukleotidni začetniki

Pri delu smo uporabljali različne oligonukleotidne začetnike, ki smo jih potrebovali za specifične mutacije v plazmidu F4, kjer naj bi se nahajala vezavna mesta za transkripcijske dejavnike. Potrebovali smo jih tudi pri izvedbi sekvenčne reakcije. Oligonukleotidni začetniki so ključni element v metodah pomnoževanja, saj encim polimeraza sam ne zmore začeti reakcije.

Preglednica VI: Lastnosti oligonukleotidnih začetnikov, uporabljenih v mutagenezi (proizvajalec Sigma-Aldrich)

Oligonukleotidni začetniki	Sekvenca	Število baz
Sry-mut-istosmerni	5`TTCTTTAGCAATGAC <u>CC</u> TAACATTTAACTG	30
Sry-mut-obratnosmerni	3`AAGAAATCGTTACTG <u>GG</u> GATTGTAAATTGAC	
c-Myb-mut-istosmerni	5`TCTTTCCTGACTG <u>GGGG</u> GTGAGCCCTCC	28
c-Myb-mut-obratnosmerni	3`AGAAAGGACTGAC <u>CCCC</u> CACTCGGGAGG	

Preglednica VII: Lastnosti oligonukleotidnih začetnikov, uporabljenih v sekvenčni reakciji (proizvajalec Beckman Coulter)

Oligonukleotidni začetniki	Sekvenca	Število baz
GL primer 2	5` CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA	23
RV primer 3	5` CTAGCAAAATAGGCTGTCCC	20

3.1.5. Oligonukleotidi

Pri metodi EMSA – test zamika elektroforezne mobilnosti, kjer smo dobljene rezultate potrdili, smo uporabljali oligonukleotide. Oligonukleotidi so krajše verige DNA ali RNA, sestavljene iz nukleotidnih enot. Pripravili smo jih tako, da smo enoverižne istosmerne in obratnosmerne oligonukleotide zmešali in jih 5 min inkubirali pri 95°C.

Preglednica VIII: Lastnosti uporabljenih oligonukleotidov (proizvajalec Sigma)

Oligonukleotid	Sekvenca	Število baz
Oligonukleotid Sry	5` [Btn] TTCTTTAGCAATGAAACTAACATTTAACTG 3` AAGAAATCGTTACTCCGATTGTAAATTGAC [Btn]	30
Kompetitivni oligonukleotid Sry	5` TTCTTTAGCAATGAAACTAACATTTAACTG 3` AAGAAATCGTTACTCCGATTGTAAATTGAC	30
Mutirani oligonukleotid Sry	5` TTCTTTAGCAATGACCCTAACATTTAACTG 3` AAGAAATCGTTACTGGGATTGTAAATTGAC	30
Oligonukleotid c-Myb	5` [Btn] TCTTTCCTGACTGTTGGGTGAGCCCTCC 3` AGAAAGGACTGACAACCCACTCGGGAGG [Btn]	28
Kompetitivni oligonukleotid c-Myb	5` TCTTTCCTGACTGTTGGGTGAGCCCTCC 3` AGAAAGGACTGACAACCCACTCGGGAGG	28
Mutirani oligonukleotid c-Myb	5` TCTTTCCTGACTGGGGGGTGGAGCCCTCC 3` AGAAAGGACTGACCCCCCACTCGGGAGG	28

3.2. Delo z bakterijami

3.2.1. Priprava tekočega LB gojišča

Tekoče LB (Luria-Bertani) gojišče, ki smo ga uporabljali za pripravo preko-nočne kulture, smo pripravili tako, da smo natehtali in zmešali:

- 25 g LB in
- 1 L destilirane vode.

Nato smo mešanico avtoklavirali pri 121°C 15 minut na 1,2 atmosferi. Tekočemu LB gojišču smo antibiotik ampicilin dodajali pred njegovo uporabo pri delu.

3.2.2. Priprava selektivnih LB agar plošč

Osnovo za LB agar plošče smo pripravili enako kot tekoče LB gojišče, le da smo tu dodali še 15 g agarja in ravno tako avtoklavirali pri 121°C 15 minut. Gojišče smo nato ohladili na 55°C, dodali antibiotik ampicilin in ga aseptično nalili v sterilne plastične petrijevke.

3.2.3. Priprava TE (Tris/EDTA) pufra

Najprej smo pripravili 1 M Tris tako, da smo natehtali in zmešali:

- 21,1 g Tris baze in
- 800 mL vode.

In s HCl uravnali pH na 8.

V nadaljnjem koraku priprave pa smo zmešali:

- 1 mL 1 M Tris,
- 0,2 mL 0,5 M EDTA in
- vode do 100 mL.

3.2.4. Priprava 0,5 M EDTA

0,5 M EDTA smo pripravili z:

- 18,6 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
- 80 mL ultra čiste vode,
- 2 g zrnca NaOH, s katerimi smo uravnali pH na 8 in
- dodatkom ultra čiste vode do 100 mL.

3.2.5. Priprava preko-nočne kulture za izolacijo plazmidov

V 5 mL LB gojišča, ki smo mu dodali antibiotik ampicilin, smo pod sterilnimi pogoji z ezo precepili eno samostojno kolonijo iz ustreznih agar plošč (plošče z bakterijami, kjer so že transformirani plazmidni vektorji F1, F2, F3 in F4). Nato je sledila 8 h inkubacija pri 37°C pri nežnem tresenju na 300 rpm.

3.2.6. Izolacija plazmidov

Za izolacijo plazmidov F1, F2, F3 in F4 (tudi F4-Sry in F4-c-Myb) smo uporabili komercialno dostopni reagenčni komplet Plasmid Midi Kit proizvajalca Qiagen, ki vsebuje:

- Pufer P1,
- pufer P2,
- pufer P3,
- kolone Qiagen-tip 100,
- pufer QC,
- pufer QF.

Postopek izolacije:

- Preko-nočno kulturo, kjer so se bakterije močno namnožile, smo centrifugirali pri 6000 g 15 minut na 4°C.
- Odlili smo supernatant in dobljeno peletko na dnu raztopili s 4 mL pufra P1.
- Dodali smo 4 mL pufra P2, zmešali z vrtenjem epruvete, nato je sledila 5 minutna inkubacija na sobni temperaturi.

- Mešanici smo dodali ohlajen pufer P3 in inkubirali na ledu 15 minut.
- Po inkubaciji je sledilo centrifugiranje pri 20000 g približno 45 minut pri 4°C. V dobljenem supernatantu je bil naš plazmid.
- Supernatant smo ponovno centrifugirali 25 minut pri istih pogojih.
- Pripravili smo kolone QIAGEN-tip 100 tako, da smo jih prepojili s pufrom QBT in jih s tem uravnotežili.
- Na kolone smo dodali supernatant in pustili, da s pomočjo sile teže steče skozi kolono.
- Sledilo je spiranje z 20 mL pufra QC.
- Na koncu smo plazmide sprali s pufrom QF.
- Precipitirali smo jih z dodatkom 3,5 mL izopropanola sobne temperature in vse to centrifugirali pri 15000 g 30 minut pri 4°C.
- Odstranili smo supernatant in peletki dodali 2 mL 70 % etanola in ponovno centrifugirali 10 minut.
- Dobljeno peletko smo posušili na zraku in jo nato raztopili v TE pufu.

3.2.7. Merjenje koncentracije plazmidne DNA

Koncentracijo in čistočo izoliranih plazmidnih vektorjev smo izmerili na kapljičnem spektrofotometru Nanodrop ND-1000 proizvajalca Thermo Scientific. Merjenje absorbance poteka po principu površinske napetosti tekočine med dvema optičnima vlaknoma, saj se med njima naredi tekočinski valj, skozi katerega aparat na poti 1 mm izmeri absorbance pri 230, 260 in 280 nm. Koncentracijo aparat poda v ng/μL, čistočo pa kot razmerje med izmerjenimi absorbcami. Vir svetlobe je ksenonska žarnica, detektor pa CCD (Charge Coupled Device) kamera.

3.2.8. Računalniško iskanje vezavnih mest

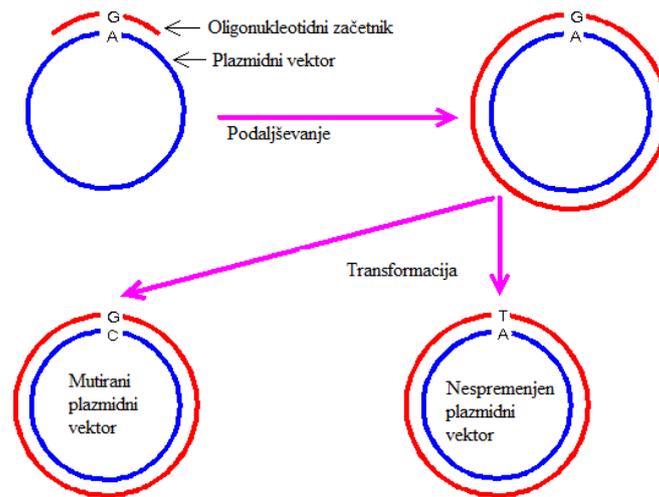
S pomočjo računalniškega programa TF Research, dostopnega na spletnem naslovu <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>, smo poiskali možna vezavna mesta transkripcijskih dejavnikov na regulatorno regijo gena *RANKL*. Program nam je poiskal več vezavnih mest, mi pa smo se osredotočili na vezavni mesti za transkripcijska dejavnika Sry in c-Myb.

Genska regija na kromosomu Y, ki določa spol (sex determining region Y), kodira protein – transkripcijski dejavnik Sry, član skupine DNA vezočih proteinov (high mobility group–box–HMG). V večini sesalcev je spol določen s prisotnostjo ali odsotnostjo gena za Sry. Ta transkripcijski dejavnik je ključen v embriogenezi kot začetnik diferenciacije testisov. Gen se nahaja na koncu krajšega kraka kromosoma Y. (24)

C-Myb pa je celični homolog transformiranega gena ptičjega mieloblastnega virusa in ptičjega levkemija virusa in spada v skupino MYB genov, ki kodirajo proteine – transkripcijske dejavnike. Gre za jedrni proto-onkogen, ki se izraža v krvotvornih matičnih celicah in je pomemben regulator hematopoeze, igra pomembno vlogo v procesu diferenciacije, proliferacije in programirane celične smrti. Potrdilo njegovi res pomembni vlogi v hematopoezi je dejstvo, da ob neizražanju c-Myb ne pride do razvoja krvnega sistema. (25–27, 33)

3.2.9. Mutageneza

Mutageneza je postopek oz. metoda, ki se uporablja za spremembo obstoječega nukleotidnega zaporedja. Za izvedbo potrebujemo oligonukleotidni začetnik, ki že vsebuje spremenjeno nukleotidno zaporedje, vendar je še vedno komplementaren okolici mesta, ki ga želimo spremeniti. Na sliki 10 je prikazan osnovni postopek mutageneze, in sicer najprej prileganje oligonukleotidnega začetnika z vneseno točkovno mutacijo in nato podaljševanje verige novega plazmida. V tej reakciji naj bi nastalo 50 % mutiranih plazmidih vektorjev in 50 % takih brez vnesene mutacije. Reagenčni kompleti, ki so komercialno dostopni, so vse boljše in se % mutiranih večja. (29)



Slika 10: Shema poteka mutageneze (www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9G.htm)

Uporabljali smo Hotstart HiFidelity Polymerase Kit, ki vsebuje

- Hotstart HiFidelity pufer,
- Hotstart HiFidelity encim DNA polimerazo.

DNA polimeraza:

- je izolirana iz *Pyrococcus* spp.,
- ima 3`-5` endonukleazno aktivnost,
- terminalno transferazno aktivnost in
- razpolovni čas > 4 ure na 95°C.

Pufer vsebuje:

- PCR dodatke,
- faktor SB (unikaten PCR dodatek, ki izboljša občutljivost in specifičnost reakcije) in
- optimizirane koncentracije dNTP-jev in MgSO₄.

Mutagenezo smo delali na plazmidu F4. Naredili smo dve, eno na vezavnem mestu za Sry (-731 AA>CC) in drugo za c-Myb (-680 TT>GG). Tako smo dobili dva nova plazmidna vektorja F4-Sry in F4-c-myb. S tem smo želeli pokazati morebitno razliko v izražanju gena *RANKL* v plazmidnem vektorju s prisotnim vezavnim mestom in brez njega.

Reagenčno mešanico smo pripravili po navodilu v preglednici IX, jo postavili v ciklični termostat ter nastavili program, opisan v preglednici X.

Preglednica IX: Načrt za pripravo mešanice za mutagenozo. *Uporabili smo oligonukleotidne začetnike, opisane v preglednici 3:c-Myb-mut-istosmerni, c-Myb-mut-obratnosmerni, Sry-mut-istosmerni in Sry-mut-obratnosmerni.

Mešanica	Koncentracija	1x
dH ₂ O		32
Pufer	5x	10
Oligonukleotidni začetnik*	100 μM	1
Plazmid F4	10 ng/μL	5
DNA Polimeraza	2,5 U/μL	2
		50 μL

Preglednica X: Program pomnoževanja – mutageniza

Temperatura (°C)	Čas (s)	Cikli
95	300	1
95	30	10
55	60	
68	20 minut	

Po končani opisani inkubaciji pri različnih temperaturah smo 25 μL mešanice z istosmernim oligonukleotidnim začetnikom zmešali z 25 μL mešanice z obratnosmernim oligonukleotidnim začetnikom. Dodali smo še 0,75 μL encima DNA polimeraze in nastavili še 18 ciklov po že opisanem načrtu v preglednici IX.

Po koncu smo nastavili še restrikcijo starega plazmida z namenom, da nam v mešanici ostane samo naš nov mutiran plazmid. Reakcijo smo nastavili po spodnjem načrtu v preglednici XI in inkubirali pri temperaturi 37°C 2 uri.

Preglednica XI: Načrt priprave mešanice za restrikcijo starega plazmida

Mešanica	koncentracija	1x
Mešanica iz mutageneze		17,5
Pufer NEB	10x	2
Pufer Dpn1	20 U/ μ L	10,5
		20 μ L

3.2.10. Priprava preko-nočne kulture za transformacijo

Dan pred transformacijo novega mutiranega plazmidnega vektorja F4-Sry in F4-c-Myb v bakterije smo pripravili preko-nočno kulturo tako, da smo 2 mL C medija zmešali z eno kolonijo bakterij *E. coli* iz agar plošče. C medij je komponenta Bacterial Transformation Kit, ki smo ga nadalje uporabili za transformacijo v bakterije. Preko-nočno kulturo smo inkubirali čez noč pri 37°C pri rahlem tresenju pri 300 rpm.

3.2.11. Transformacija mutiranega plazmida

Ko smo naredili novo rekombinantno molekulo DNA, plazmidna vektorja F4-Sry in F4-c-Myb, ju je potrebno prenesti v gostiteljsko celico, kjer se bosta lahko pomnoževala, to pa dosežemo s transformacijo bakterijskih celic *E. coli*.

Transformacija je direktno prenašanje gole DNA v celice. Zmožnost prenosa DNA v celice imenujemo kompetenca. Stopnjo kompetence, ki jo potrebujemo pri eksperimentalnem delu z *E. coli*, moramo sprožiti umetno. Naredimo lahko kemično obdelavo celic, ki vključuje inkubacijo na ledu, nefiziološke koncentracije dvovalentnih kationov in hiter toplotni šok. Poznamo pa še enostavnejšo obliko kemijske obdelave, to je izpostavljenost kalcijevemu kloridu v koncentracijah med 30–100nM in drugačno pot, električni šok ali elektroporacija. Bistvo te metode je depolarizacija membrane in nastanek por v njej. (29)

Mi smo transformacijo naredili s The TransformAid Bacterial Transformation Kit, ki predstavlja novo in hitro metodo priprave celic. Proizvajalci zagotavljajo učinkovitost transformacije kar med 10^6 – 10^7 transformacij na μ g plazmidne DNA. Vsi postopki se morajo po navodilih proizvajalca izvajati na ledu. Centrifugiranje poteka v navadni

namizni centrifugi pri sobni temperaturi in obratih 10000–12000 g. Celice se več kot 5 minut ne sme puščati na sobni temperaturi, saj se učinkovitost transformacije zelo zmanjša.

Sestavni deli kita so:

- C medij,
- T raztopina (A),
- T raztopina (B).

Postopek transformacije:

- Po navodilih kita Bacterial Transformation smo ogreli C medij na temperaturo 37°C.
- Ogreli smo agar plošče.
- 1,5 mL C medija smo zmešali s 150 µL preko-nočne kulture in inkubirali na 37°C 20 minut.
- Centrifugiranje 1 minuto.
- Supernatant smo odlili, peletko pa raztopili v 300 µL raztopine T, ki smo jo pripravili iz enakih delov T raztopine (A) in (B) ter inkubirali na ledu 5 minut.
- Centrifugiranje 1 minuto.
- Supernatant smo odlili, peletko pa raztopili v 120 µL raztopine T in inkubirali na ledu 5 minut.
- 5 µL plazmidne DNA smo prenesli v novo epico in po inkubaciji na ledu dodali 50 µL pripravljenih celic.
- Ponovno smo inkubirali na ledu.
- Nato smo mešanico pod sterilnimi pogoji nanесли na ogrete agar plošče.
- Agar plošče smo postavili v inkubator na 37°C čez noč.

3.2.12. Izolacija mutiranega plazmida

Na agarških ploščah so nam uspešno zrasle majhne kolonije transformiranih bakterijskih celic. Za izolacijo smo izbrali po 5 kolonij za plazmidni vektor F4-Sry in 5 za F4-c-Myb. Pripravili smo preko-nočno kulturo izbranih bakterijskih celic. Naslednji dan smo izolacijo mutiranega plazmidnega vektorja F4-Sry in F4-c-Myb opravili z zgoraj že opisanim postopkom s Plasmid Midi Kit in na koncu izmerili koncentracijo na Nanodropu.

3.2.13. Sekvenčna reakcija

Sekvenčna reakcija nam omogoča zaznavanje natančnega zaporedja nukleotidov določenega dela DNA, ki nas zanima.

Uporabljali smo sekvenator Beckam Coulter, katerega princip je sekveniranje po Sangerju, ločevanje različno dolgih odsekov DNA s kapilarno elektroforezo. Sekveniranje po Sangerju je zlati standard za detekcijo mutacij, je dolgotrajna in draga metoda, saj so reagenti fluorescenčno označeni. Dolžina sekvence, ki jo lahko prebere, je od 700 do 1000 bp.

S sekvenčno reakcijo smo preverili uspešnost mutageneze na izoliranem plazmidnem vektorju F4-Sry in F4-c-Myb.

Pripravili smo jo z GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit, ki vsebuje:

- DTCS (Dye terminator cycle sequencing Quick Start master mix) – reagent za ciklično sekveniranje,
- glikogen,
- mineralno olje in
- SLS – raztopino za nanašanje vzorca (ang. sample loading solution).

DTCS vsebuje:

- DNA polimerazo,
- naključne neoznačenedeoksi nukleotid-tri-fostate (dNTP),
- označene dideoksi nukleotid-tri-fostate (ddUTP, ddGTP, ddATP in ddCTP) in
- reakcijski pufer.

Koncentracijo plazmidnih vektorjev smo prilagodili na 150 ng/ μ L in mešanico pripravili po načrtu, opisanem v preglednici XII. Začetnika, GL primer 2 in RV primer 3, ki smo jih uporabljali, sta predstavljena v preglednici VII. Pripravljeno mešanico smo postavili v ciklični termostat in nastavili program, predstavljen v preglednici XIII.

Preglednica XII: Načrt za pripravo sekvenčne reakcije. * Uporabljali smo GL primer 2 in RV primer 3.

Mešanica	koncentracija	1x
dH ₂ O		4,7
Plazmidni vektor	150 ng/μL	1
Oligonukleotidni začetnik*	5 pmol/μL	0,64
DCTS	2,5x	4
		10 μL

Preglednica XIII: Program pomnoževanja – sekvenčna reakcija

Temperatura (°C)	Čas (s)	Cikli
96	20	30
50	20	
60	240	
4	vzdrževanje	

Po opravljeni inkubaciji smo naredili čiščenje z etanolno precipitacijo, s katero odstranimo komponente sekvenčne reakcije, ki bi motile nadaljnjo analizo, hkrati pa še koncentriramo fragmente, da zagotovimo njihovo zadostno svetilnost.

Postopek etanolne precipitacije:

- Najprej smo pripravili ustavitveno raztopino, ki je sestavljena iz 1 μL 3 M natrijevega acetata (pH 5,2), 1 μL 100 mM Na₂-EDTA (pH 8,0) in 0,5 μL 20 mg/mL glikogena in jo dodali sekvenčni mešanici. Glikogen je del kompleta za sekvenčno reakcijo.
- Nato smo v epici zmešali sekvenčno mešanico in 30 μL mrzlega 95 % (v/v) etanola, povzročili precipitacijo in centrifugirali pri 14000 rpm na 4°C 20 minut.
- Supernatant smo previdno odstranili in peletko dvakrat sprali z 200 μL 70 % (v/v) etanola, po vsakem spiranju smo centrifugirali na 14000 rpm na 4°C 3 minute.
- Na koncu smo peletko posušili in jo raztopili v raztopini za nanašanje vzorca (SLS), ki je del kita za sekvenčno reakcijo.

Nato smo vzorček v SLS prenesli na ploščo, prekrili vzorec s kapljico mineralnega olja, s čimer smo preprečili izhlapevanje. Ploščo smo postavili v aparat in izbrali program LFR-a, predstavljen v preglednici XIV. Po končani sekvenčni reakciji smo pregledali sekvenco in preverili uspešnost mutagenoze na plazmidnih vektorjih F4-Sry in F4-c-Myb in izbrali dva s pravilno sekvenco.

Preglednica XIV: Program sekveniranja LFR-a

Proces	Temperatura	Moč	Čas
Kapilara	50°C		
Denaturacija	90°C		120 s
Iniciacija vzorca		2 kV	15 s
Separacija		4 kV	110 min

3.2.14. Metiliranje plazmidnega vektorja F4

Pri tej metodi smo uporabljali CpG metiltransferazo, ki metilira vse citozinske ostanke znotraj dvovertične verige na mestih 5' ...CG... 3'. V reagenčnem kompletu je NeBuffer 2 (10x) in S-adenozilmetionin (SAM, 32 mM). Reagenčno mešanico smo pripravili po preglednici XV in jo inkubirali eno uro pri 37°C.

Preglednica XV: Načrt za pripravo reagenčne mešanice – metilacija

	Koncentracija	1x
dH ₂ O		14
NeBuffer 2	10x	2
SAM	1600 µM	2
Plazmid F4	1 µg	1
Metiltransferaza	4 U/µL	1
		20 µL

3.3. Delo s celičnimi kulturami

3.3.1. Celična kultura HOS

Uporabljali smo celično kulturo osteoblastov (HOS), ki je človeškega izvora. Je adherentna celična kultura, raste na površini. Izolirana je iz kosti 13-letne deklice, obolele z osteosarkomom.

3.3.2. Priprava gojišč

Pri delu s celičnimi kulturami smo uporabljali čisti DMEM in DMEM z dodatki. Slednjega smo pripravili tako, da smo zmešali:

- 500 mL čistega DMEM (komercialno dostopnega),
- 50 mL fetalnega govejega seruma (FBS),
- 5,5 mL antibiotik/antimikotika in
- 5,5 mL L-glutamina.

3.3.3. Priprava fosfatnega pufra (PBS)

Za pripravo 10x PBS smo natehtali in zmešali:

- 80 g NaCl,
- 2 g KCl,
- 14,4 g Na₂HPO₄,
- 2,72 g KH₂PO₄ in
- 800 mL ultra čiste vode.

pH smo nastavili na 7,4 s HCl, dolili z ultra čisto vodo do 1 L in avtoklavirali na 121°C 20 minut.

3.3.4. Precepljanje, tripsinizacija

Za gojenje celic smo uporabljali T75 steklenice. Ko so celice dosegle 80–100% konfluentnost, smo jih precepili po spodnjem postopku:

- odstranili smo izrabljen medij,
- dodali 2 mL ogretega tripsina,

- inkubirali 3 minute v inkubatorju.
- Potem smo dodali 5 mL medija, prestavili v falkonko in
- centrifugirali 4 minute na 1200 obratih.
- Po končanem centrifugiranju smo odstrani medij in celice raztopili v 1 mL čistega medija.
- Del teh smo naprej prestavili v novo steklenico z 10 mL ogretega medija, kjer so ponovno začele svojo rast.

3.3.5. Transfekcija

Transfekcija je močno analitično orodje, s katerim lahko študiramo funkcijo in regulacijo genov ter funkcijo proteinov v celici. Transfekcije lahko razdelimo v tri skupine, biološko, kemično in fizikalno. Gre za postopek, v katerem genski material dostavimo v specifične regije znotraj celice in jih tako genetsko spremenimo. Idealna metoda mora imeti visoko transfekcijsko učinkovitost, nizko citotoksičnost, minimalni efekt na fiziologijo in mora biti enostavna za uporabo. (30, 31)

Za transfekcijo smo najprej pripravili ploščico z več luknjicami in v vsaki 40 000 celic, kot je navedeno v navodilih reagenčnega kompleta. To smo storili po istem postopku, kot je opisano pri prejšnji točki, le da smo celice še prešteli pod mikroskopom in izračunali ustrezne volumne. Celice smo prešteli s pomočjo hemocitometra, tako da smo jim dodali barvilo Tripan modro v razmerju 1:1. 40 000 celic smo prenesli v luknjice s 500 μ L medija in jih inkubirali 5 ur.

Za transfekcijo smo uporabili X-treme GENE HP DNA transfection reagent. Prednosti tega reagenčnega kompleta, kot ga navajajo proizvajalci, so:

- Proizveden je za transfekcijo širokega spektra evkariontskih celic.
- Uporablja se ga lahko v zelo različnih aplikacijah, za raziskovanje izražanja genov, produkcijo proteinov, študije vpliva zdravilnih učinkovin.
- Citotoksičnost in sprememba morfologije celic je minimalna.
- Deluje zelo dobro v prisotnosti seruma kot tudi brez.

Mešanico smo pripravili po načrtu, opisanem v preglednici XVI. V transfekcijske mešanice smo dodali pripravljene plazmidne vektorje, predstavljene v preglednici V.

Plazmidni vektor pRL-TK smo uporabili za interno kontrolo, saj izraža aktivnost luciferaze Renille (Rluc), s katero normaliziramo zmerjene aktivnosti luciferaze (Luc) naših plazmidnih vektorjev.

Preglednica XVI: Načrt za pripravo transfekcijske mešanice (pX je naš izbrani plazmid(F1, F2, F3, F4, F4-Sry, F4-c-Myb, F4-met ali pGL3), pRL-TK je kontrolni plazmid, X-gene reagent je del reagenčnega kompleta)

Mešanica	
Medij DMEM	do 50 μ L
pX	450 ng
pRL-TK	50 ng
X-gene reagent	1,5 μ L
	50 μ L

Volumne plazmidov, ki smo jih vstavili v celice, smo preračunali glede na njihove koncentracije in nato prilagodili volumen medija. Po dodatku X-gene reagenta smo inkubirali mešanico 15 minut in nato razdelili volumne v prej pripravljene celice, ki so se razraščale 5 ur. Celice smo nato postavili v inkubator za 18–72 ur.

3.3.6. Liza celic

Za lizo celic smo:

- pripravili pasivni lizirajoči puffer (PLB), tako da smo 5x PLB, del reagenčnega kompleta Dual-Luciferase Reporter Assay System, razredčili z ultra čisto vodo.
- Celicam, katerim smo odstranili medij in jih spirali s PBS, smo dodali 100 μ L PLB, stresali 15 minut in dobljene lizirajoče raztopine prenesli v epice ter jih shranili v zamrzovalnik do analiziranja.

3.3.7. Merjenje luciferazne aktivnosti

Luciferazno aktivnost smo merili na aparatu Biotek Syngen H4 in uporabljali reagenčni komplet Dual-Luciferase Reporter Assay System. Osnova kompleta je merjenje dveh reporterskih encimov znotraj enega sistema. Gen za encim luciferazo (Luc) imamo v osnovnem pGI3-basic plazmidu, medtem ko smo vsem transfekcijskim mešanici dodali pRL-TK plazmidni vektor, ki izraža drug reporterski encim – luciferazo Renille (Rluc).

Za analizo smo potrebovali mikrotitrne ploščice in opravili meritev:

- Najprej smo na računalniku nastavili program, opisan v preglednici XVII.
- V luknjico na mikrotitrski ploščici smo dodali 20 μ L naše shranjene lizirajoče raztopine.
- Dodali smo 100 μ L LAR II, potekla je bioluminiscenčna reakcija, ki jo katalizira Luc, in tako izmerili njeno aktivnost v vzorcu (LAR II smo pripravili tako, da smo luciferazni substrat II raztopili v luciferaznem pufru II in ga shranili na -70°C).
- Takoj po prvem merjenju smo dodali Stop&Glo reagent, ki smo ga pripravili iz 50x koncentriranega substrata Stop&Glo in Stop&Glo pufra. Po dodatku tega reagenta pa je potekla bioluminiscenčna reakcija, ki jo katalizira Rluc, in tako izmerili še njeno aktivnost.
- Dobili smo rezultat Luc in Rluc aktivnosti, ki smo ga izrazili kot razmerje med njima in s tem vrednosti znormalizirali. Tako smo dobili vrednosti izražanja regulatornih regij gena *RANKL*, ki so vstavljene v plazmidnih vektorjih.

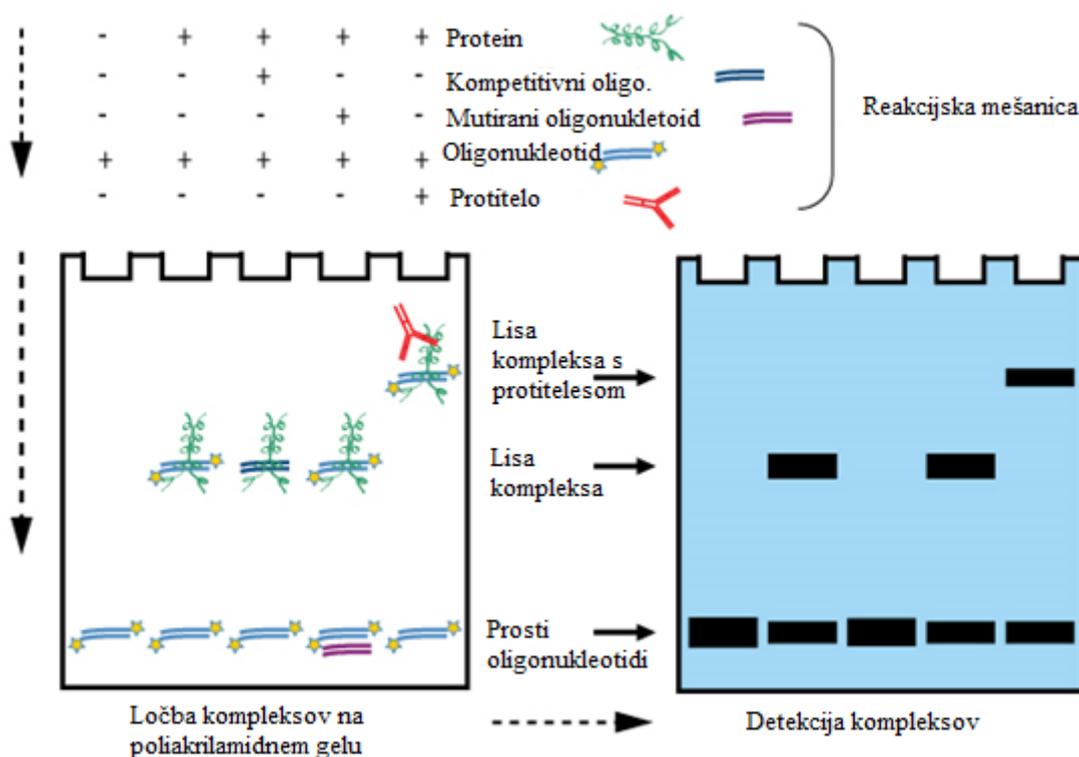
Preglednica XVII: Program luminimetra Biotek Synergy H4

Aktivnost	Čas (s)
Tresenje nastavljeno na srednje	5
Merjenje Luc aktivnosti	5
Mikrotitrna ploščica gre ven	
Tresenje nastavljeno na srednje	5
Merjenje Rluc aktivnosti	5

Plazmidne vektorje smo med seboj primerjali s t-testom, s katerim smo preverjali domneve o enakosti dveh povprečij. Eksperiment smo dvakrat ponovili.

3.4. EMSA

Z metodo EMSA – Test zamika elektroforezne mobilnosti, ki je pomembna metoda za raziskovanje regulacije genov in interakcij med DNA in proteini, smo dobljene rezultate pri delu s celičnimi kulturami potrdili. Osnova metode EMSA je dejstvo, da kompleksi DNA-proteina potujejo počasneje kot samostojni DNA fragmenti, ko jih naneseemo na poliakrilamidni gel, kar lahko izrabljamo za detekcijo interakcij. Shematski prikaz je predstavljen na sliki 11.



Slika 11: Princip metode EMSA (<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=7EDAC33E-3981-4E58-8A57-057A8280C68F>.)

Prednosti metode so:

- odkrivanje kompleksov z različnimi stehiometrijami in konformacijami,
- vir DNA vezočih proteinov je lahko celični ekstrakt, transkripcijski produkt,...
- je kvalitativna metoda za identifikacijo specifičnih DNA vezočih proteinov,

- z njo se lahko analizira tudi termodinamične in kinetične parametre.

Uporabljali smo LightShift Chemiluminescent EMSA kit, ki je sestavljen iz:

EMSA komponent:

- 10x vezavni pufer (100 mM Tris, 500 mM KCl, 10 mM DTT; pH 7,5),
- kontrolni material,
- Poly(dI.dC) – nespecifični kompetitor (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ v 10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 7,5),
- glicerol (50 %),
- MgCl_2 (100 mM),
- 5x nanašalni pufer;

in komponent za detekcijo:

- streptavidin peroksidazni konjugat,
- kemiluminiscenčni substrat,
- raztopino luminola,
- raztopino peroksida,
- pufer za blokiranje,
- spiralni pufer (4x),
- pufer za uravnoteženje substrata.

3.4.1. Priprava 5X tris/borat/EDTA(TBE) pufra

Za pripravo TBE pufra smo natehtali:

- 60,55 g Tris baze (1 M),
- 25,65 g borne kisline (0,83 M),
- 1,86 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Do 1000 mL smo dolili bidestilirano čisto vodo. Raztopino smo postavili na magnetno mešalo. Pripravljen TBE pufer s pH 8,3 avtoklaviramo na 121°C 20 minut in tlaku 0,1 mPa in ohladimo na sobno temperaturo. Pri pripravi 6 % poliakrilamidnega gela smo potrebovali 0,5x TBE pufer, ki smo ga pripravili tako, da smo 5X desetkrat redčili.

3.4.2. Priprava 6 % poliakrilamidnega gela

6 % poliakrilamidni gel v 0,5x TBE smo pripravili po načrtu, opisanem v preglednici XVIII. 10 % amonijev persulfat (APS) pa smo naredili tako, da smo APS zmešali z ultra čisto vodo in pripravili 10 % raztopino.

Preglednica XVIII: Načrt za pripravo poliakrilamidnega gela

Mešanica		
AA:BAA	40 %	1,65 mL
TBE	5x	1,1 mL
H ₂ O		do 11 mL
TEMED		8,25 µL
APS	10 %	79 µL

3.4.3. Priprava celičnega ekstrakta

Celični ekstrakt, ki je vseboval 7,5 milijona celic, smo pripravili z NE-PER Nuclear in Cytoplasmic Extraction Reagents in pripravili 50 µL vzorčke, ki smo jih shranili na -70°C.

3.4.4. Priprava vzorcev

Vzorčke, ki smo jih nanegli na gel, smo pripravili po preglednicah XIX, XX in XXI ter jih inkubirali, kot je navedeno v navodilih, 20 minut.

Preglednica XIX: Načrt priprave vzorcev za analizo interakcije s Sry. Vsi volumni v μL .

Komponenta		Vz_1	Vz_2	Vz_3	Vz_4	Vz_5	Vz_6	Vz_7
dH ₂ O	10x	12	9	9	9	9	7	7
pufer		2	2	2	2	2	2	2
polydIdC	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1	1	1	1	1	1	1
MgCl ₂	100 mM	1	1	1	1	1	1	1
Glicerol	50 %	2	2	2	2	2	2	2
Oligonukleotid	10 fmol/ μL	2	2	2	2	2	2	2
Kompetitivni oligonukleotid	2 pmol/ μL	-	-	-	-	-	2	-
Mutirani oligonukleotid		-	-	-	-	-	-	2
Celični ekstrakt		-	3	3(2:1)	3(3:1)	3(4:1)	3	3

Preglednica XX: Načrt priprave vzorcev za analizo interakcije s c-Myb_1. Vsi volumni v μL .

Komponenta	Vz_1	Vz_2	Vz_3	Vz_4	Vz_5	Vz_6	Vz_7
dH ₂ O	12	9	9	9	9	7	8
Pufer	2	2	2	2	2	2	2
Poly(dI.dC)	1	1	1	1	1	1	1
MgCl ₂	1	1	1	1	1	1	1
Glicerol	2	2	2	2	2	2	2
Oligonukleotid	2	2	2	2	2	2	2
Kompetitivni oligonukleotid	-	-	-	-	-	2	-
Protitelo	-	-	-	-	-	-	1
Celični ekstrakt	-	3	3(2:1)	3(4:1)	3(8:1)	3	3

Preglednica XXI: Načrt priprave vzorcev za analizo interakcije s c-Myb₂. Vsi volumni v μL .

Komponenta	Vz_1	Vz_2	Vz_3	Vz_4	Vz_5	Vz_6	Vz_7	Vz_8
dH ₂ O	12	9	9	9	9	7	8	7
puffer	2	2	2	2	2	2	2	2
polydIdC	1	1	1	1	1	1	1	1
MgCl ₂	1	1	1	1	1	1	1	1
glicerol	2	2	2	2	2	2	2	2
Oligonukleotid	2	2	2	2	2	2	2	2
Kompetitivni oligonukleotid	-	-	-	-	-	2	-	-
Mutirani oligonukleotid	-	-	-	-	-	-	-	2
Protitelo	-	-	-	-	-	-	1	-
Celični ekstrakt	-	3	3(2:1)	3(4:1)	3(8:1)	3	3	3

3.4.5. Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu in prenos na najlonsko membrano

Pred nanosom vzorčkov smo sestavili ogrodje za gel, postavili v kadičko z 0,5X TBE in nastavili pre-elektroforezo, da se je naš gel prepojil, za 1 h pri 100 V. 5 μL 5x nanašalnega pufra smo zmešali z 20 μL našega vzorčka in nanesli na gel. Nato smo nastavili elektroforezo na 100 V približno 1 h. Med tem časom smo pripravili najlonsko membrano, ki smo jo namakali v 0,5X TBE 10 minut. Po končani elektroforezi smo sestavili sendvič z gelom, membrano, filter papirjem in elektroforetskimi gobicami. Prenos na membrano je potekal pri 380 mA 30 minut. Po končanem prenosu na membrano smo membrano takoj postavili v transluminator za 15 minut, da je poteklo premreženje.

3.4.6. Detekcija kompleksov transkripcijskih dejavnikov z oligonukleotidi

Sledil je postopek detekcije oligonukleotidov, označenih z biotinom po naslednji točkah:

- Najlonsko membrano smo inkubirali v pufri za blokiranje vezavnih mest 15 minut.
- Nato še dodatnih 15 minut v istem pufri, le z dodatkom streptavidin peroksidaznega konjugata. V tem koraku se je streptavidin vezal na biotin na oligonukleotidih, ki so z njim označeni.
- Sledilo je več korakov spiranja in 5-minutna inkubacija v pufri za uravnoteženje substrata.
- Po tej inkubaciji smo najlonsko membrano nežno obrisali in nanjo kapnili delovno raztopino substrata, ki smo jo pripravili iz raztopine luminola in raztopine peroksida. Tu je potekla encimska reakcija, ki smo jo po 5 minutah detektirali z CCD (Charge Coupled Device) kamero v G:box.
- V programu smo nastavili program slikanja (detekcija 3 minute) in analizirali fotografijo.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Rezultati iskanja vezavnih mest

Z računalniškim program TF Research smo poiskali vezavna mesta v regulatornih regijah gena *RANKL*. Na sliki 12 je predstavljen izpis programa in označena vezavna mesta, na katera smo se osredotočili mi. Izbrali smo vezavno mesto za Sry, ki je AACTAA (score 94,5) ter za c-Myb, ki je TTTCCTGACTGTTGGGTG (score 85,2).

TTTCITTAGC AATGAAACTA ACATTTAACT GTAATCATCAG CTTCTGTGTTA	entry	score
----->	M00148	<u>SRY</u> 94.5
<lt;-----	M00116	C/EBPa 91.9
<lt;-----	M00130	HFH-2 91.2
<lt;-----	M00148	SRY 90.0
<lt;-----	M00075	GATA-1 86.5
<lt;-----	M00076	GATA-2 85.8
CAATCTTTTC CTGACTGTTG GGTGAGCCCT CCTCGGATGC TTGCTTCTGG	entry	score
----->	M00004	<u>c-Myb</u> 85.2

Slika 12: Rezultat iskanja vezavnih mest z računalniškim program TF Research

Glede na izbrana vezavna mesta smo se odločili za mutacijo, s katero smo spremenili pogoje vezave in preverili vpliv na izražanje gena *RANKL*. Mutacijo smo izbrali glede na matriko, ki smo jo dobili na spletu, in nam je pokazala možna zaporedja za vezavno mesto za Sry in c-Myb. (33–34)

Iz matrike za Sry (slika 13) so razvidne različne sekvence, ki še dajejo pravo vezavno mesto za Sry, in sicer je teh 23. Na mestu AAA v večini dobljenih sekvenc prevladujejo A, ki so v parih primerih lahko zamenjani s T, nikoli pa s C. V enem primeru je lahko tretji A zamenjan z G. Mesto, kjer je največkrat C, se lahko zamenja z G, ampak nikoli z A ali T. Mesto WAM, predstavljeno v matriki, kaže veliko različnih možnosti, in na skoraj vsakem mestu je možnost vseh štirih nukleotidov. Glede na predstavljeno smo se odločili, da naredimo mutacijo AA>CC (AAACTAA>ACCCTAA) in vezavno mesto za Sry spremenili tako, da vezava transkripcijskega dejavnika ni možna.

```

AC M00148
XX
ID V$SRY_01
XX
DT 08.06.95 (created); hiwi.
XX
NA SRY
XX
DE sex-determining region Y gene product
XX
BF T00996; SRY; Species: mouse, Mus musculus.
BF T00997; SRY; Species: human, Homo sapiens.
XX
P0      A      C      G      T
01     19      0      0      4      A
02     22      0      0      1      A
03     16      0      1      6      A
04      0     17      6      0      C
05     14      0      1      8      W
06     13      5      2      3      A
07     12      8      2      1      M
XX
BA 23 selected binding sequences
XX
CC 5 rounds of selection from random dekamers

```

Slika 13: Matrika za Sry vezavno mesto (33), M pomeni A ali C, W pa A ali T.

Iz matrike za vezavno mesto c-Myb (slika 14) lahko razberemo, da je veliko možnih vezavnih sekvenc, kar 60. Z N so označena mesta, kjer je lahko postavljen kateri koli nukleotid, in to je kar 5 mest. Omenila bi pomemben del vezavnega mesta, to je del GTT (TTTCCTGACTGTTGGGTG), kjer je vezavno mesto funkcionalno le v primeru tega zaporedja. Ti nukleotidi niso nikoli zamenjani z ostalimi tremi. Zato smo se odločili za mutacijo TT>CC (TTTCCTGACTGTTGGGTG>TTTCCTGACTGCCGGGTG).

```

AC M00004
XX
ID V$CMYB_01
XX
DT 19.10.92 (created); ewi.
XX
NA c-Myb
XX
DE c-Myb
XX
BF T00138; c-Myb; Species: mouse, Mus musculus.
XX
P0      A      C      G      T
01      1      12     6      8      N
02      6      15     5      1      C
03      6      10     9      5      N
04     16      5     14     3      R
05     16     11     8      2      N
06      9     16     8     16     N
07      8      4     34     5      G
08     20      1     25     5      R
09      4     49      2      5      C
10     18     18     20     4      N
11      0      0     60     0      G
12      0      0      0     60     T
13      0      0      0     60     T
14     11      1     47     1      G
15      6      6     21     5      G
16      1      7     15     11     K
17      2      2     12     4      G
18      1      0     11     1      G
XX
BA 9 c-Myb binding sites in SV40 DNA + 51 selected single binding sites
XX
CC Matrix of [905] has been inverted to be compatible

```

Slika 14: Matrika za c-Myb vezavno mesto (34, 35), N pomeni katerikoli nukleotid, R pomeni A ali G, K pa G ali T.

4.2. Sekvence in bioinformatična analiza

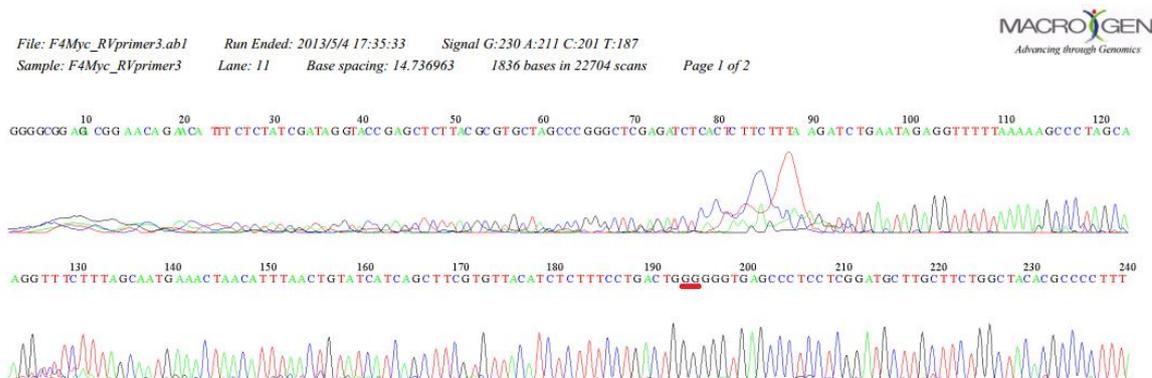
Dobljene sekvence na sekvenatorju smo primerjali z znanimi in potrdili vnos prej omenjenih mutacij v plazmidne vektorje, F4-Sry in F4-c-Myb. Sekvenca zunaj mesta mutacije je ostala ista.

	Project : Default	System : GenomeLab System	Operator : Manual analysis
	Sample : F4_sry_RV.A06_13051015PF		Instrument : GenomeLab System (Ver. 10.2.3)
	Result : Untitled		

Base Sequence:

```
1 GTGCCAGAACATTTACTCTATCGATAGGTACCGAGCTCTTACGCGTGTAGCCCGGGCTCGAGATCTCACTAAGAGCCACAGTTCTGAATAGAGGTTTTAAAAAGCCCT
111 AGCAAGGTTTCTTTAGCAATGACCTAACATTTAACTGTATCATCAGCTTCGTGTTACATCTTTTCTGACTGTGGGTGAGCCCTCCTCGGATGCTTGTCTCTGGCTA
221 CACGCCCTTTACCCCTTTCTCTGCACTGTTTTTCATCTTTATAAAGTCAGAGTTGGTGTCTATAGGCTCTCTACTGCCACATCAAGACCTGCCTCGCTCAATGTCACCT
331 TCAAGATGCAGAAATAGGATTTGGGAAGGGGATTGTGAAATTTTCGAACTCTCCAAAATACTTTGAGAACTATATTTGGAAGCACTTTGGGGGGAGAGGTTGGACAG
441 GAAGGTTCTCAGAGATCATCAAAATTTAACTTTCTAAATCCTAAGGAGAAACCGAGACTCCAGGATGTGAACTCCCTTCTTACCAAATAAGATGGATGCAGGAGGAA
551 TGCTGAGGTGCAATCCTTATTCCTTTAGCCAAAGTGTCTCTGCGTTTTCTTTAACCCTATCTTTGGACCTCCCGAAAAGACAGGTTGAAGGGATGGCCAAANGG
661 GAGTTTTGGGAACCCCTTGGAGTTAACCCCAAGCCCTCTCTCTTTGGAAGGNCCTTGAGG
```

Slika 15: Sekvenca mutiranega plazmidnega vektorja F4-Sry z označeno vneseno mutacijo



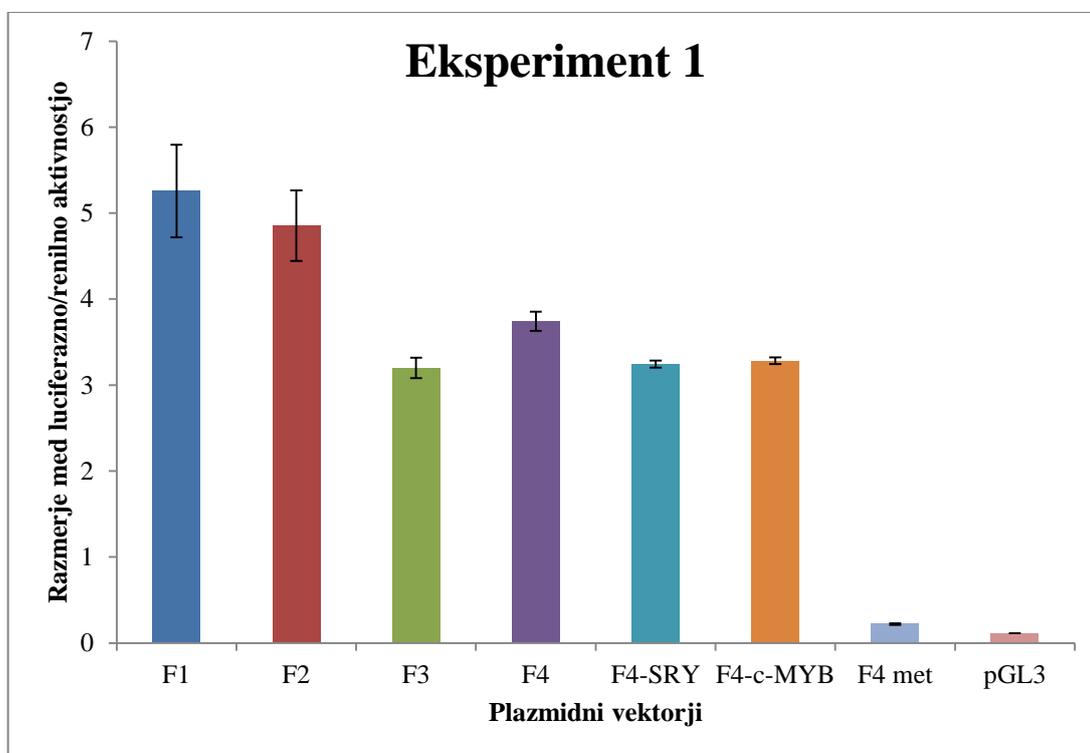
Slika 16: Del sekvence mutiranega plazmidnega vektorja F4-c-Myb z označeno vneseno mutacijo

4.3. Rezultati merjenja Luc/Rluc aktivnosti

Naredili smo dva celotna eksperimenta in v preglednicah XXII in XXIII so podana izračunana razmerja med izmerjeno Luc in Rluc aktivnostjo. Popolni rezultati so v Prilogi 1. Grafični prikaz izračunanih aktivnosti je prikazan na slikah 17 in 18.

Preglednica XXII: Izračunana razmerja med Luc in Rluc aktivnostjo v eksperimentu 1

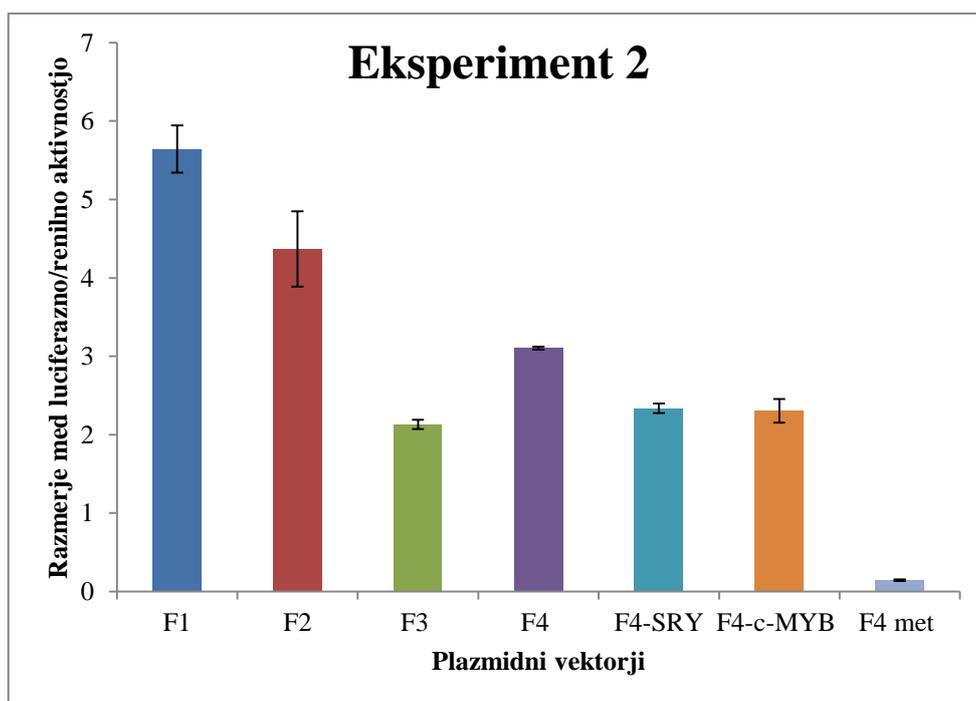
	F1	F2	F3	F4	F4-SRY	F4-c-MYB	F4 met	pGL3
1	4,634	4,669	3,017	3,75	3,204	3,217	0,219	0,115
2	4,811	5,635	3,151	3,553	3,32	3,349	0,246	0,117
3	6,328	4,256	3,429	3,925	3,211	3,281	0,196	0,111
Povprečje	5,257	4,853	3,199	3,742	3,245	3,283	0,220	0,114
Standardna deviacija	0,931	0,708	0,21	0,186	0,065	0,066	0,025	0,002
Standardna napaka	0,54	0,41	0,12	0,11	0,04	0,04	0,01	0



Slika 17: Grafični prikazi razmerji med Luc in Rluc aktivnostjo v eksperimentu 1

Preglednica XXIII: Izračunana razmerja med Luc in Rluc aktivnostjo v eksperimentu 2

	F1	F2	F3	F4	F4-SRY	F4-c-MYB	F4 met
1	5,137	5,545	2,112	3,083	2,393	2,112	0,128
2	5,62	3,81	2,041	3,155	2,392	2,208	0,156
3	6,171	3,784	2,241	3,078	2,224	2,594	0,153
Povprečje	5,643	4,37	2,131	3,105	2,337	2,305	0,146
Standardna deviacija	0,517	0,82	0,102	0,043	0,097	0,255	0,015
Standardna napaka	0,3	0,48	0,06	0,02	0,06	0,15	0,01



Slika 18: Grafični prikaz razmerij med Luc in Rluc aktivnostjo v eksperimentu 2

Izračunali smo dvostranski t-test med izražanjem plazmidnih vektorjev in poiskali statistične razlike v izražanju. Naša ničelna hipoteza je, da sta plazmida enaka, alternativna pa, da sta si različna. Če je izračunan p večji od α , za katero smo si izbrali vrednost 0,05, privzamemo ničelno hipotezo – plazmida sta si enaka, med njima ni statistične razlike. Izračuni p so podani v preglednicah XXIV in XXV.

Preglednica XXIV: Izračunani statistični p v eksperimentu 1

Plazmidna primerjava	p
F1, F2	0,58
F2, F3	0,02
F3, F4	0,03
F3, F4-Sry	0,74
F3, F4-C-Myb	0,55
F4, F4-Sry	0,01
F4, F4-c-Myb	0,02
F4, F4 met	0,00
F4, pGl3	0,00

Preglednica XXV: Izračunani statistični p v eksperimentu 2

Plazmidna primerjava	p
F1, F2	0,13
F2, F3	0,02
F3, F4	0,00
F3, F4-Sry	0,06
F3, F4-C-Myb	0,34
F4, F4-Sry	0,00
F4, F4-c-Myb	0,01
F4, F4 met	0,00

Iz izračunanega statističnega p med plazmidnima vektorjema F1 in F2 (0,58 v eksperimentu 1 in 0,13 v eksperimentu 2), ki je večji od 0,05, lahko razberemo, da imata enako izražanje, saj med njima ni statistično značilne razlike.

Medtem ko se izražanje plazmidnega vektorja F3 že statistično razlikuje od izražanja F1 in F2, saj je izračunani p (v obeh eksperimentih 0,02) manjši od 0,05. Izražanje se zmanjša, torej lahko iz tega sklepamo, da se v regulatornih regijah, v katerih se F2 in F3 plazmidna

vektorja razlikujeta (slika 19), nahajajo operatorski elementi, ki vežejo represorske proteine.

```
ATGCTTGCTTCTGGCTACACGCCCTTTACCCTTTTCTCTGCACTGTTTTTCATCTTTATAAAGTCAGAGTTGG
TGTCTATAGGCTCTCTACTGCCACATTCAAGACCTGCCTCGCTCAATGTCACCTTCAAGATGCAGAAATAGGG
ATTTGGGAAGGGGATTGTGAAATTTTCGAAGTCTTCCAAAATACTTTGAGAAACTATATTTGGAAGCACTTTG
GGGGGAGAGGTTGGACAGGAAGGGTC
```

Slika 19: Sekvenca, ki razlikuje plazmidna vektorja F3 od F2

Izražanje F4 plazmidnega vektorja, ki vsebuje najdaljšo regulatorno regijo gena *RANKL*, se v primerjavi z F3 poveča in se tudi statistično razlikuje med njima, saj je p (0,00 v eksperimentu 1 in 0,03 v eksperimentu 2) manjši od 0,05. Pri tem lahko sklepamo, da so v delu, v katerem se razlikujeta F3 in F4 (slika 20), vezavna mesta za aktivatorske dejavnike. S pomočjo računalniškega programa TF Research za iskanje vezavnih mest transkripcijskih dejavnikov smo pokazali, da to mesto vsebuje vezavna mesta za Sry in c-Myb.

```
CACTAAGAGCCACAGTTCTGAATAGAGGTTTTTAAAAAGCCCTAGCAAGGTTTCTTTAGCAATGAAACTAACA
TTTAACTGTATCATCAGCTTCGTGTTACATCTCTTTTCCTGACTGTTGGGTGAGCCCTCCTCGGATGCTTGCTT
CTGGCTACACGC
```

Slika 20: Sekvenca, ki razlikuje plazmidna vektorja F3 in F4 ter označeni vezavni mesti za Sry in c-Myb

Da bi ugotovili, ali imajo predlagana vezavna mesta resnično vpliv na izražanje gena *RANKL*, smo v vezavna mesta vnesli mutacije (-731 AA>CC) za Sry in drugo (-680 TT>GG) za c-Myb. S temi spremembami smo popolnoma onemogočili vezavo transkripcijskih dejavnikov. Predpostavljali smo, da bi morali v tem primeru zaznati razliko v izražanju poročevalnega gena Luc, ki pa bi bila podobna izražanju plazmidnega vektorja s krajšo regulatorno regijo *RANKL* (F3). Iz slike je razvidno, da obstaja statistično značilna razlika med F4 in F4-Sry ter med F4 in F4-c-Myb. Statistično značilne razlike pa ni med F3 in F4-Sry ter med F3 in F4-c-Myb. Izražanje teh treh plazmidnih vektorjev, F3, F4-Sry in F4-c-Myb, je bilo primerljivo in lahko sklepamo, da smo z vnesenimi mutacijami uspeli popolnoma izničiti aktivnost te regulatorne regije DNA.

Ta eksperiment kaže tudi na možnost sodelovanja med transkripcijskima faktorjema Sry in c-Myb. Na to lahko sklepamo zato, ker mutacija v kateremkoli od dveh vezavnih mest vodi v enako in popolno izničenje aktivnosti regulatorne regije, kar bi pomenilo, da sta za

povišanje izražanja poročevalnega gena potrebna oba transkripcijska dejavnika, ki se vežeta relativno blizu skupaj (35 bp).

S tem eksperimentom, ki je bil opravljen na celični liniji HOS, pridobljeni iz 13-letne deklice, obolele s humanim osteosarkomom, smo dokazali funkcionalnost mesta za vezavo transkripcijskega dejavnika Sry. Znano je, da je Sry transkripcijski dejavnik, značilen za moške in se nahaja na kromosomu Y. To bi torej pomenilo, da se na ta del DNA ne more vezati Sry, ampak nek drug transkripcijski dejavnik. Najrbž gre za transkripcijski dejavnik, ki je član skupine Sox, kamor spada tudi Sry. Skupina SOX, transkripcijski dejavniki, opravljajo zelo različne, a pomembne vloge v razvoju, tako z aktivacijo ali represijo specifičnih genov preko interakcij z drugimi proteini. Le-teh je okoli 20 in so razdeljeni v 10 podskupin glede na podobnost sekvence. SOX proteini se vežejo na vezavno mesto na DNA preko domene high-mobility group (HMG). HMG domena je sestavljena iz treh verig in se veže v mali žleb DNA. Ta domena je v skupini SOX zelo ohranjena in njihovo prepoznavno mesto je A/TA/TCAAA/TG. Razlika med transkripcijskimi dejavniki nastane zaradi ostalih delov proteina. Mutacije v genih za te transkripcijske dejavnike vodijo v razvoj različnih anomalij. Pri ljudeh je pomembna mutacija v SOX9, ki povzroči kostno dismorfologijo. (38)

Plazmidni vektor F4 met smo uporabili za dokaz vpliva metilacije na izražanje proteinov. Ob metiliranju regulatorne regije gena *RANKL* smo ugotovili, da le-ta povzroči popolno ustavitev izražanja poročevalnega gena. To je skladno z znanimi podatki, da metilacija DNA lahko utiša gensko izražanje. (39) V naš eksperiment smo vključili negativno kontrolo zato, da bi preverili, kolikšno je ozadje izražanje. Za ta namen smo uporabili osnovni plazmidni vektor p-GL3, ki je izkazoval zanemarljivo izražanje glede na vse ostale plazmidne vektorje.

4.4. Rezultati EMS-e

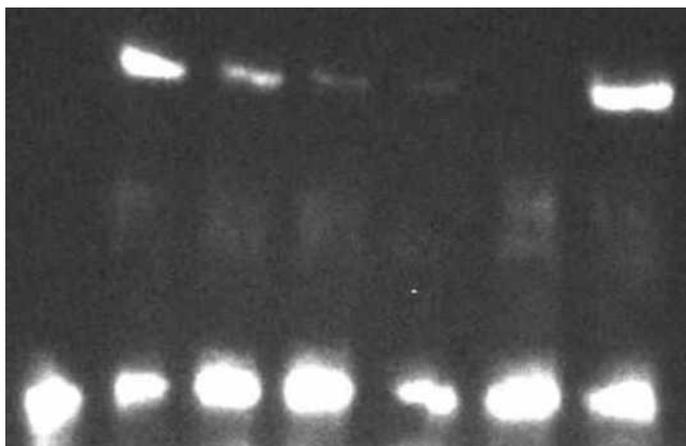
Da bi dodatno potrdili funkcionalnost identificiranih vezavnih mest v regulatorni regiji gena *RANKL*, smo izvedli preizkus vezave transkripcijskih dejavnikov na DNA, ki ima enako zaporedje, kot se nahaja v genovski DNA.

4.4.1. Rezultati interakcij s Sry

Slika 21 prikazuje preizkus zmožnosti vezanja transkripcijskih dejavnikov na vezavno mesto za Sry. Iz dobljene najlonske membrane lahko razberemo naslednje informacije.

- Prvi vzorec nam pokaže količino oligonukleotidov, ki smo jih uporabljali. Služi nam kot negativna kontrola brez dodatka jedrnega ekstrakta, s katero ugotovimo hitrost potovanja biotinitiranih oligonukleotidov v primeru odsotnosti transkripcijskega dejavnika.
- V drugem lahko vidimo, da je prišlo do interakcije transkripcijskega dejavnika (najverjetneje družine SOX), ki je prisoten v neredčenem jedrnem ekstraktu z biotinitiranim oligonukleotidom. Interakcijo vidimo kot upočasnitev potovanja biotinitiranega oligonukleotida skozi gel zaradi prisotnosti vezanega transkripcijskega dejavnika.
- V naslednjih treh vzorcih opazimo padanje intenzitete svetlobe na račun redčenja jedrnega ekstrakta. S tem lahko dokažemo, da je med transkripcijskim dejavnikom in oligonukleotidom stehiometrijsko razmerje, saj zmanjšana množina vodi v zmanjšanje števila biotinitiranih oligonukleotidov, ki se jim skrajša potovanje. S tem smo potrdili specifičnost vezave, saj v nasprotnem primeru redčenja jedrnega ekstrakta ne bi opazili zmanjšanja intenzitete premika.
- V predzadnjem vzorčku pa smo biotinitiranemu začetniku dodali nebiotinitiran začetnik v 200-kratnem prebitku. Iz slike lahko razberemo, da ni prišlo do premika biotinitiranega oligonukleotida, saj je celoten transkripcijski dejavnik prevzel nebiotinitiran enak oligonukleotid. S tem smo preučili specifičnost vezave.
- V zadnji reakciji smo hoteli preveriti, kakšna je sposobnost vnesenih mutacij, da preprečijo vezavo transkripcijskega dejavnika na biotinitiran oligonukleotidni začetnik. Vidimo lahko, da je prišlo do premika, kar pomeni, da oligonukleotidi z mutacijo kljub prebitku niso bili sposobni v reakciji kompeticije vezati transkripcijskega dejavnika.

S to serijo eksperimentov smo potrdili specifično vezavo transkripcijskega dejavnika, ki ni Sry, na predlagano vezavno mesto AAATAA ter potrdili funkcionalnost te regije pri izražanju gena *RANKL* tudi na nivoju interakcije DNA-protein.



Slika 21: Rezultati interakcij s Sry. Razporeditev vzorčkov glej v preglednici XIX.

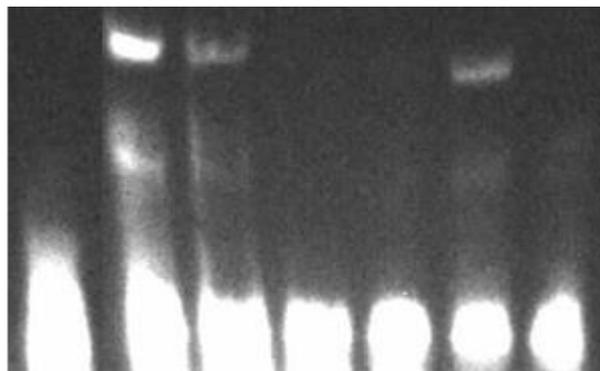
4.4.2. Rezultati interakcij s c-Myb

Preskus zmožnosti vezave na vezavno mesto smo preverili tudi s transkripcijskim dejavnikom c-Myb (sliki 22 in 23).

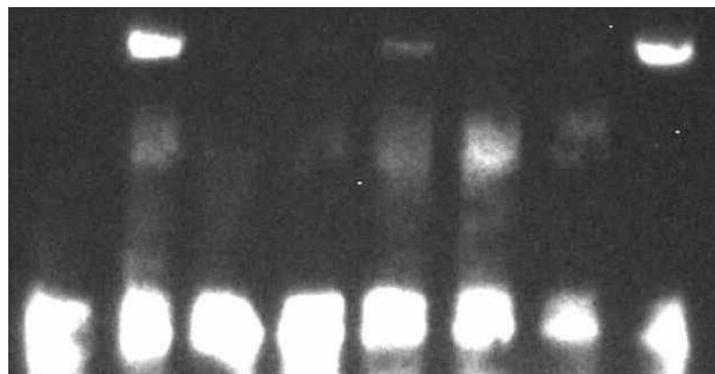
- Prvi vzorec nam pokaže količino osnovnega oligonukleotida, ki vstopa v reakcijo v vseh nadaljnjih vzorcih in je naša negativna kontrola.
- Naslednji štirje vzorci so reakcije z različnimi redčitvami jedrnega ekstrakta. Prisotnost interakcije med transkripcijskim dejavnikom c-Myb in biotiniliranim oligonukleotidom vidimo kot upočasnitev potovanja biotiniliranega oligonukleotida. Opazimo pa tudi padanje intenzitete svetlobe na račun redčenja jedrnega ekstrakta, kar nam potrди stehiometrijsko razmerje med transkripcijskim dejavnikom in biotiniliranim oligonukleotidom. S tem smo potrdili specifičnost vezave med njima, saj v nasprotnem primeru ne bi opazili zmanjšane svetlobe.
- Povezavo smo ponovno preverili s kompetitivnim oligonukleotidom, ki smo ga dodali v 200-kratnem prebitku. Iz slike je razvidno, da ni prišlo do premika biotiniliranega oligonukleotida, saj je očitno celoten transkripcijski dejavnik prevzel kompetitivni oligonukleotid.
- V predzadnjih dveh reakcijah smo podobno kot pri Sry poskusili potrditi specifičnost vezave z uporabo kompetitivnega oligonukleotida, ki je vseboval mutacijo. Pokazali smo, da z vnosom mutacije uspešno onemogočimo vezavo transkripcijskega dejavnika na vezavno mesto TTCCTGACTGTTGGGTG za c-Myb, saj mutirani oligonukleotid ni uspel vezati transkripcijskega dejavnika.

- Transkripcijski dejavnik smo identificirali s pomočjo poliklonskega protitelesa proti c-Myb. Pri dokazovanju identitete proteina s pomočjo protiteles pričakujemo dve možnosti. Zaradi vezave protitelesa na transkripcijski dejavnik lahko nastanejo super kompleksi, ki še dodatno upočasnijo potovanje biotinitirane oligonukleotida (t. i. super-shift) ali pa protitelo zaradi opsonizacije proteina povsem prekrije vezavno mesto in tako onemogoči vezavo proteina in oligonukleotida. V preiskusu se v zadnji koloni vidi nezmožnost vezave opsoniziranega proteina na oligonukleotid, saj je premik biotinitiranih oligonukleotidov povsem izginil.

S tem eksperimentom smo dodatno dokazali, da prihaja na tem delu regulatorne regije gena *RANKL* do vezave transkripcijskega dejavnika c-Myb.



Slika 22: Rezultati interakcij s c-Myb_1. Razporeditev vzorčkov glej v preglednici XX.



Slika 23: Rezultati interakcij s c-Myb_2. Razporeditev vzorčkov glej v preglednici XXI.

5. SKLEP

Med eksperimentalnim delom smo uspeli izdelati orodja, s katerimi smo potrdili zastavljene hipoteze, saj smo dokazali, da sta vsaj dva segmenta v regulatorni regiji gena *RANKL*, ki vplivata na njegovo izražanje in vsebujeta operatorske elemente za vezavo transkripcijskih dejavnikov.

Med uporabljenimi plazmidnimi vektorji smo dokazali razlike v izražanju in določili dve regiji v regulatorni regiji gena *RANKL*, ki sta pomembni pri izražanju le-tega. Ena regija je pomembna za vezavo represorskih dejavnikov (slika 19), saj se je plazmidnemu vektorju F3 s to regijo zmanjšalo izražanje. Druga pa je regija (slika 20), kamor se vežejo aktivatorski dejavniki, kar smo dokazali z zvišanim izražanjem plazmidnega vektorja F4. Dela, ki sta v tej regiji pomembna pri izražanju gena *RANKL*, sta vezavno mesto za Sry AAATAA in za c-Myb TTTCCTGACTGTTGGGTG.

Pokazalo se je, da transkripcijska dejavnika najverjetneje sodelujeta med seboj, saj je mutacija v kateremkoli od dveh vezavnih mest vodila v enako in popolno izničenje regulatorne regije.

S specifičnimi mutacijami vezavnih mest za Sry in c-Myb, ki so zmanjšale izražanje gena *RANKL*, smo potrdili vpliv omenjenih dveh transkripcijskih dejavnikov.

Za dokaz, da se transkripcijska dejavnika Sry in c-Myb vežeta na identificirani regulatorni regiji, smo z metodo EMSA preverili njune interakcije s tem delom DNA in vezavo tudi potrdili.

Z našimi rezultati smo prvi dokazali vpletenost onkogenega c-Myb in od spola odvisnega transkripcijskega dejavnika Sry na kostno razgradnjo, kar usmerja naše nadaljnje raziskave na čisto nova področja.

6. LITERATURA

1. Mencej Bedrač S, Ostanek B, Mlakar V, Zupan J, Kocjan T, Preželj J, Marc J: Sodobni pogled na nastanek osteoporoze. *Farmaceutski vestnik*, 2012; 5–6: 269–278.
2. World Health Organization: Prevention and management of osteoporosis. *Who tech report series*, 2003; 921: 1–192.
3. Bono CM, Einhorn TA: Overview of osteoporosis: pathophysiology and determinants of bone strength. *Eur Spine J.*, 2003; 12(2): 90–96.
4. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P: *Interna medicina*. 4. izdaja, Littera Picta d.o.o., Ljubljana, 2011, 973–974.
5. Baron R: Anatomy and ultrastructure of bone – histogenesis, growth and remodeling. Chapter 1, 2008. Dosegljivo na: <http://www.endotext.org>.
6. O'Brien CA: Control of RANKL gene expression. *Bone*, 2010; 46: 911–919.
7. Boyce BF, Xing L: Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*, 2007; 9(1).
8. Karsenty G, Wagner EF: Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*, 2002; 2: 389–406.
9. Teitelbaum SL, Ross FP: Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*, 2003; 4: 638–649.
10. Manolagas SC: Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 2000; 21 (2): 115–137.
11. Deroo BJ, Buensuceso AV: Minireview: Estrogen receptor – mechanistic insights from recent studies. *Mol Endocrinol*, 2010; 24: 1703–1714.
12. Raisz LG: Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts and prospects. *J Clin Invest.*, 2005; 115(12): 3318–3325.
13. Kanamaru F, et al: Expression of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in human T cells. *Immunol. Lett.*, 2004; 94: 239–246.
14. Suda T, et al.: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* 1999; 20: 345–357.

15. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM.: RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*, 2006; 12: 17–25.
16. Ueno Y, Shinki T, Nagai Y: In vivo administration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses the expression of RANKL mRNA in bone of thyroparathyroidectomized rats constantly infused with PTH. *J Cell Biochem*, 2003; 90: 267–77.
17. Miao D, Li J, Xue Y: parathyroid hormone-related peptide is required for increased trabecular bone volume in parathyroid hormone-null mice. *Endocrinology*, 2004; 145: 3554–62.
18. Heintz N: Analysis of mammalian central nervous system gene expression and function using bacterial artificial chromosome –mediated transgenesis. *Hum Mol Genet*, 2000; 9: 937–43.
19. Neilsen LB, McCormick SP, Young SG: A new approach for studying gene regulation by distant DNA elements in transgenic mice. *Scand Clin Lab Invest*, 1999; 229: 33–9.
20. Copeland NG, Jenkins NA, Court DL: Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet*, 2001; 2: 769–79.
21. Ducy P, Karsenty G: Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol*, 1995; 15: 1858–69.
22. Fu Q, Manolagas SC, O'Brien CA. Parathyroid hormone controls receptor activator of NF- κ B ligand gene expression via a distant transcriptional enhancer. *Mol Cell Biol*, 2006; 26: 6453–68.
23. Fili S, Karalaki M, Schaller B: Therapeutic implications of osteoprotegerin. *Cancer Cell Int*, 2009; 9: 26.
24. Pascal B, Sim H, Knowler K, Vilain E: Human Sry inhibits β -catenin-mediated transcription. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008; 40(12): 2889–2900.
25. Nicolaidis NC, Gualdi R: Positive autoregulation of c-myc expression via Myb binding sites in the 5' flanking region of the human c-myc gene. *Mol Cell Biol*, 1991; 11(12): 6166–6176.
26. Knopfova L, Beneš P: c-Myb regulates matrix metalloproteinases 1/9, and cathepsin D: implications for matrix-dependent breast cancer cell invasion and metastasis. *Mol. Cancer*, 2012; 11: 15.
27. Premkumar E, Il-Hoan Oh: The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene*, 1999; 18: 3017–3033.

28. Boyer R F, Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 338-359.
29. Howe C, Gene cloning and manipulation, 2. izdaja, Cambridge University Press, Cambridge, 1997: 29, 120–125.
30. Kyung Kim T, Eberwine JH: Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Biochem*, 2010; 397(8): 3173–3178.
31. Recillas-Targa F: Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol Biotechnol*, 2006; 34(3): 337–354.
32. Dasse E, Volpe G, Walton DS: Distinct regulation of *c-myb* gene expression by HoxA9, Meis1 and Pbx proteins in normal hematopoietic progenitors and transformed myeloid cells. *Blood Cancer*, 2012; 2(6).
33. Pontiggia A, Rimini R, Harley V R, Goodfellow, P N, Lovell-Badge R, Bianchi M E: Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY--DNA complexes. *EMBO J*, 1994; 13: 6115–6124.
34. Nakagoshi H, Nagase T, Kanei-Ishii C, Ueno Y, Ishii S: Binding of the *c-myb* proto-oncogene product to the simian virus 40 enhancer stimulates transcription. *J. Biol. Chem*, 1990; 265: 3479–3483.
35. Howe K M, Watson R J: Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by *c-myb* protein. *Nucleic Acids Res*, 1991; 19: 3913–3919.
36. Jezernik K, Vrenič P, Sterle M, *Celična biologija*, 1.izdaja, DZS, Ljubljana, 2012: 137–140.
37. Lehninger A L, Nelson D L, Cox M M, *Principles of Biochemistry*, 2.izdaja, Worth Publishers, New York, 1993: 856–979.
38. Wilson M, Koopman P: Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Current opinion in genetics & development*, 2002; 12: 441–446.
39. Slotkin RK, Martienssen R: Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genetic.*, 2007; 8(4): 272–85.

Priloga 1

Rezultati merjenja Luc in Rluc aktivnost

Eksperiment 1

	F1 Luc	F1 Rluc	F1 razmerje	F2 Luc	F2 RLuc	F2 razmerje
1	14606	3152	4,634	20061	4297	4,669
2	13542	2815	4,811	21283	3777	5,635
3	17964	2839	6,328	15769	3705	4,256
Povprečje			5,257			4,853
Standardna deviacija			0,931			0,708
Standardna napaka			0,54			0,40

F3 Luc	F3 Rluc	F3 razmerje	F4 Luc	F4 RLuc	F4 razmerje
16330	5412	3,017	19794	5279	3,75
14178	4500	3,151	21147	5952	3,553
17099	4986	3,429	21391	5450	3,925
		3,199			3,742
		0,21			0,186
		0,12			0,11

F4-Sry Luc	F4-Sry Rluc	F4-Sry razmerje	F4-c-Myb Luc	F4-c-Myb Rluc	F4-c-Myb razmerje
19636	6128	3,204	17116	5320	3,217
15589	4695	3,32	17808	5317	3,349
19153	5965	3,211	23948	7299	3,281
		3,245			3,283
		0,065			0,066
		0,04			0,04

F4 met Luc	F4 met Rluc	F4 met razmerje	pGL3 Luc	pGL3 Rluc	pGL3 razmerje
314	1434	0,219			0,115
340	1381	0,246			0,117
229	1167	0,196			0,111
		0,22			0,114333
		0,025			0,002494
		0,01			0,00

Eksperiment 2

	F1 Luc	F1 Rluc	F1 razmerje	F2 Luc	F2 Rluc	F2 razmerje
1	48489	9440	5,137	61707	7221	5,545
2	42316	7529	5,620	31965	8389	3,810
3	59164	9588	6,171	28200	7453	3,784
Povprečje			5,643			4,379
Standardna deviacija			0,517			0,824
Standardna napaka			0,30			0,48

F3 Luc	F3 Rluc	F3 razmerje	F4 Luc	F4 Rluc	F4 razmerje
15249	7221	2,112	75025	24338	3,083
10708	5246	2,041	59514	18865	3,155
9672	4315	2,241	69600	22610	3,078
		2,131			3,105
		0,102			0,043
		0,06			0,02

F4-Sry Luc	F4-Sry Rluc	F4-Sry Razmerje	F4-c-Myb Luc	F4-c-Myb Rluc	F4-c-Myb razmerje
74663	31195	2,393	20561	9735	2,112
63375	26493	2,392	29148	13200	2,208
71490	32145	2,224	35214	13576	2,594
		2,337			2,305
		0,097			0,255
		0,06			0,15

F4 met Luc	F4 met Rluc	F4 met razmerje
890	6950	0,128
509	3263	0,156
639	4167	0,153
		0,146
		0,015
		0,01