

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATJAŽ OBRUL SUVAJAC

**PRISOTNOST TRANSKRIPCijskega DEJAVNIKA SRY V  
OSTEOBLASTIH IN NJEGOV VPLIV NA IZRAŽANJE  
PROTEINA RANKL**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATJAŽ OBRUL SUVAJAC

**PRISOTNOST TRANSKRIPCIJSKEGA DEJAVNIKA SRY V  
OSTEOBLASTIH IN NJEGOV VPLIV NA IZRAŽANJE  
PROTEINA RANKL**

**PRESENCE OF TRANSCRIPTIONAL FACTOR SRY IN  
OSTEOBLASTS AND ITS EFFECT ON PREOTEIN RANKL  
EXPRESSION**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljal 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 in somentorju za strokovno pomoč in nasvete pri opravljanju magistrske naloge, zaposlenim na Katedri za klinično kemijo in biokemijo ter svoji družini za nesebično podporo.

### **Izjava**

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

Matjaž Obrul Suvajac

Ljubljana, September 2014

# VSEBINA

<b>VSEBINA</b> .....	<b>I</b>
<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>III</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	<b>III</b>
<b>POVZETEK</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>KLJUČNE BESEDE</b> .....	<b>VI</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>VII</b>
<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 KOSTNA REMODELACIJA .....	2
1.1.1 <i>Osteoklastogeneza</i> .....	3
1.1.2 <i>Proces kostne remodelacije</i> .....	3
1.2 TRANSKRIPCIJSKI DEJAVNIKI .....	5
1.3 RANKL IN SISTEM RANK/RANKL/OPG .....	6
1.3.1 <i>Uravnavanje izražanja RANKL</i> .....	8
1.3.2 <i>RANKL v osteoblastih</i> .....	8
1.3.3 <i>PTH (Paratiroidni hormon)</i> .....	9
1.4 C-MYB .....	9
1.5 SRY .....	9
1.6 WNT/ $\beta$ -KATENINSKA SIGNALNA POT .....	10
<b>NAMEN DELA</b> .....	<b>12</b>
<b>MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>13</b>
1.7 MATERIALI .....	13
1.8 UPORABLJENE KEMIKALIJE .....	14
1.9 UPORABLJENI REAGENČNI KOMPLETI .....	15
1.10 VZORCI ZA DOLOČANJE RAZLIKE V IZRAŽANJU RANKL MED SPOLOMA .....	15
1.11 GOJENJE CELIC NA PLOŠČICI S ŠESTIMI LUKNJICAMI .....	15
1.12 ŠTETJE CELIC V NEUBAUERJEVI KOMORI .....	16
1.13 TRANSFEKCIJA – ORODJE ZA VNOS GENA V CELICO .....	16
1.14 IZOLACIJA RNA IZ CELIČNE KULTURE .....	17
1.14.1 <i>Homogenizacija</i> .....	18
1.14.2 <i>Fazna separacija</i> .....	18

1.14.3	<i>Izolacija RNA</i> .....	18
1.14.4	<i>Spiranje RNA</i> .....	19
1.14.5	<i>Ponovno raztapljanje RNA</i> .....	19
1.15	MERJENJE KAKOVOSTI IZOLIRANE RNA NA APARATU <i>AGILENT 2100 BIOANALYZER</i> .....	19
1.15.1	<i>Čiščenje elektrod</i> .....	20
1.15.2	<i>Priprava gela</i> .....	20
1.15.3	<i>Priprava barvila</i> .....	20
1.15.4	<i>Priprava vzorcev in lestvice</i> .....	20
1.15.5	<i>Dodajanje gelskega barvila</i> .....	20
1.15.6	<i>Končna priprava čipa</i> .....	21
1.16	OBRATNO PREPISOVANJE .....	21
1.17	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU .....	22
1.18	PREUČEVANJE RAZLIK V IZRAŽANJU RANKL MED MOŠKIMI IN ŽENSKAMI.....	24
1.19	IZOLACIJA PLAZMIDA IZ BAKTERIJ.....	25
1.20	MERJENJE KONCENTRACIJE IZOLIRANE DNA .....	25
1.21	IMUNOCITOKEMIČNO BARVANJE HOS CELIC .....	26
1.21.1	<i>Priprava PBS</i> .....	26
1.21.2	<i>Postopek imunocitokemičnega barvanja</i> .....	26
1.22	IMUNOHISTOKEMIČNO BARVANJE KOSTNIH VZORCEV .....	27
<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....		<b>29</b>
1.23	POTRJEVANJE PRISOTNOSTI SRY V KOSTNIH CELICAH Z IMUNOHISTOKEMIČNO ANALIZO KOSTNIH REZIN.....	29
1.24	PROUČEVANJE VPLIVA SRY NA RAZPOREDITEV C-MYB .....	30
1.25	UGOTAVLJANJE RAZLIK V IZRAŽANJU RANKL MED MOŠKIMI IN ŽENSKAMI.....	32
1.26	UGOTAVLJANJE VPLIVA SRY NA IZRAŽANJE RANKL V CELICAH HOS .....	34
<b>ZAKLJUČKI</b> .....		<b>38</b>
<b>LITERATURA</b> .....		<b>39</b>
<b>PRILOGE</b> .....		<b>41</b>

## Kazalo slik

<i>Slika 1: Proces kostne remodelacije</i> .....	4
<i>Slika 2: Shematski prikaz delovanja transkripcijskega dejavnika</i> .....	5
<i>Slika 3: Sistem RANK/RANKL/OPG</i> .....	7
<i>Slika 4: Vloga RANKL v kosti in drugih tkivih</i> .....	7
<i>Slika 5 Delovanje RANKL</i> .....	8
<i>Slika 6 Mreža v Neubauerjevi komori</i> .....	16
<i>Slika 7: Negativna kontrola</i> .....	29
<i>Slika 8: Vzorec moškega pri 40x povečavi</i> .....	29
<i>Slika 9: Vzorec kostnega mozga pri 40x povečavi</i> .....	30
<i>Slika 10: Netretirane celice HOS označene za c-Myb</i> .....	31
<i>Slika 11: Razlika v izražanju RANKL med moškimi in ženskami</i> .....	34
<i>Slika 12: Primerjava rezultatov relativne kvantifikacije</i> .....	37

## Kazalo preglednic

<i>Preglednica I: Uporabljena laboratorijska oprema</i> _____	13
<i>Preglednica II: Uporabljene kemikalije</i> _____	14
<i>Preglednica III: Uporabljeni reagenčni kompleti</i> _____	15
<i>Preglednica IV: Mešanica za transfekcijo</i> _____	17
<i>Preglednica V: Master miks za obratno prepisovanje</i> _____	22
<i>Preglednica VI: Program obratnega prepisovanja</i> _____	22
<i>Preglednica VII: Master miks za RT-PCR</i> _____	24
<i>Preglednica VIII: Master miks za RT-PCR (RANKL, SRY in RPLP0)</i> _____	24
<i>Preglednica IX: Uporabljena protitelesa</i> _____	26
<i>Preglednica X: Rezultati analize varianc izražanja RANKL pri moških in ženskah</i> _____	33
<i>Preglednica XI: Rezultati poskusa 1</i> _____	35
<i>Preglednica XII: Rezultati poskusa 2</i> _____	36
<i>Preglednica XIII: Rezultati poskusa 3</i> _____	37

## Povzetek

Kosti v človeškem telesu so vse življenje podvržene procesu kostne remodelacije. Pri remodelaciji kostnega tkiva, osteoklasti del kostnine razgradijo, novo kostnino pa na istem mestu izgradijo osteoblasti. Ko pride do neravnotežja med razgradnjo in izgradnjo kostnine se lahko pojavi vrsta patoloških stanj kot npr. postmenopavzalna osteoporoza, osteopetroza, ipd. Pomemben sistem ki uravnava kostno remodelacijo je sistem RANK/RANKL/OPG. Ta sistem poskrbi za odločilni signal, ki omogoča pre-osteoklastom, da se razvijejo v zrele celice, oziroma da se zreli osteoklasti aktivirajo.

V magistrskem delu smo želeli dokazati, da prisotnost transkripcijskega dejavnika SRY v celici zniža izražanje gena za RANKL v kulturi humanih osteoblastov (HOS). Ker je bil »in vitro« z luciferaznim testom na nivoju gena že dokazan vpliv transkripcijskega dejavnika SRY na izražanje gena za RANKL, smo želeli to potrditi tudi na celičnem modelu. V celice HOS izolirane iz ženske, smo vnesli plazmid pcDNA3, ki pa je vseboval »moški« gen za SRY. Kot negativni kontroli smo uporabili celice s plazmidom pcDNA3 brez gena za SRY in pa celice, katerim smo dodali samo transfekcijski reagent. Po izolaciji mRNA iz celic, smo s pomočjo RT-PCR izmerili izražanje gena za RANKL. Tekom raziskovalnega dela smo ugotovili, da celice HOS zelo slabo izražajo gen za RANKL in (posledično) je bila celo metoda RT-PCR premalo občutljiva, da bi dobili statistično značilne rezultate. Zato smo nadaljevali s kvalitativno imunohistokemično metodo in želeli potrditi samo prisotnost beljakovine SRY v celicah kostnih biopsijskih vzorcev. Kot negativno kontrolo smo uporabili žensko kostno tkivo. Primerjali smo tudi izražanje gena za RANKL pri moških in ženskah, v serumskih vzorcih, in dokazali signifikantno razliko med spoloma. Naši rezultati so pokazali, da je SRY zelo verjetno vpleten v uravnavanje izražanja RANKL v kosteh. Nadalje nas je zanimalo ali SRY vpliva na c-Myb, saj so prejšnje ugotovitve pokazale, da eden od proteinov SOX lahko interagira s c-Myb (transkripcijski dejavnik ki ima pomembno vlogo pri uravnavanju proliferacije progenitornih celic v kostnem mozgu). Opazili smo spremembe v lokalizaciji c-Myb, kar pomeni, da bi lahko ravno SRY vplival na c-Myb.

Zaključimo lahko, da smo prvi pokazali prisotnost SRY v osteoblastih kostnega tkiva ter dokazali razlike v izražanju RANKL med spoloma. To so pomembni zaključki, ki bodo nedvomno pomagali osvetliti razlike v kostnih procesih med spoloma tako v fiziološkem stanju kot pri boleznih in pri različnih zdravljenjih.

## Abstract

Bones in human body all undergo process of bone remodelling. In the process of bone remodelling osteoclasts remove bone from its surface, new bone is deposition the same place by osteoblasts. When imbalance between degradation and bone formation occur, it results in many pathological conditions, such as osteoporosis, osteopetrosis, etc. Important system that regulates bone remodelling is the system RANK/RANKL/OPG. System RANK/RANKL/OPG provides decisive signal that allows osteoclasts precursors to develop in mature cells.

In the master thesis, we want to prove that the presence of transcriptional factor SRY in the cells reduces expression of gene for RANKL in the culture of human osteoblast (HOS). As has already been shown at gene level with luciferase test, presence of transcriptional factor SRY has influence on expression of RANKL gene. It was necessary to confirm this observation on cell model. To confirm this hypothesis at the cellular level, human osteosarcoma cells isolated from woman, were transfected with pcDNA3 plasmid containing the gene for the “male” SRY protein. As a negative control, we used cells transfected only with the plasmid pcDNA3 without *SRY* gene, and non-transfected cells treated just with transfection reagent. Cells were then isolated and mRNA for gene expression was measured with RT-PCR. During the research work it was shown that cells of the human osteosarcoma express RANKL at lower levels, consequently the method of RT-PCR was insufficiently sensitive.

So we proceed with immunohistochemistry. We wanted to show, that protein SRY is present in males biopsy bone tissue. As negative control we used female bone tissue. With this experiment we showed that SRY has important role in regulation of RANKL expression. We have also compared expression of gene for protein RANKL between males and females. Here we proved significant difference between genders.

Given previous findings that one of the SOX proteins can interact with c-Myb, we examined whether the SRY is one who has influence. We have observed changes in the localization of c-Myb, which means that SRY could have effect on c-Myb.

We were first who showed presence of SRY in bone tissue. We have also proved that there is difference in RANKL expression between genders. These are important conclusions that will undoubtedly help to enlighten processes in bone tissue both in physiological condition as well as in disease and treatments.



## **Ključne besede**

RANKL, osteoblastna celična kultura, SRY, RT-PCR, izražanje

## **Key words**

RANKL, osteoblast cell culture, SRY, RT-PCR, expression

## Seznam okrajšav

BMPs – (angl. Bone morphogenetic proteins) kostni morfogenetski protein

BMU –(angl. bone forming unit), enota tvorbe kosti

CREB – (angl.cAMP response element-binding protein ) cAMP odzivni element

CXCL12 – (angl. C-X-C motif chemokine 12) CXC kemokin

CXCR4 – (angl. C-X-C chemokine receptor type 4) C-X-C kemokinski receptor

DSH – (angl. Disheveled) neurejen (pomembna komponenta WNT signalne poti)

HMG – (angl. High-mobility group) skupina DNA vezočih proteinov

HOS – celice humanega osteosarkoma

ITAM – (angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif) aktivacijski motiv, ki temelji na tirozinu

LRP5 – (angl. Low-density lipoprotein receptor-related protein 5)

M-CSF – makrofagni-kolonije stimulirajoči dejavnik

NFATc1 – (angl. Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1) jedrni faktor aktiviranih T celic – 1

NF-Kb – jedrni dejavnik kappa-B

OPG – osteoprotegerin

OSCAR – (angl. osteoclast associated immunoglobulin-like Receptor) z osteoklasti povezan imunoglobulinom podoben receptor

PTH – paratiroidni hormon

RANK – receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa-B

RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa-B

RT- obratno prepisovanje oz. reverzna transkripcija

RT-PCR – (angl. real-time polymerase chain reaction) verižna reakcija s polimerazo v realnem času

RUNX2 – (angl. Runt-related transcription factor 2)

SOX–(angl. Sry-related HMG box ) HMG boks povezan s SRY

SRY – Regija na kromosomu Y, ki določa spol (angl. Sex determining region Y)

TCF/LEF1 – (angl.T-cell factor/lymphoid enhancer factor )

TNF – tumor nekrotizirajoči dejavnik

TRAF-6 (angl. TNF receptor associated factor 6)

WNT – (angl. Wingleless-related integration site)

# 1. UVOD

Kost je dinamičen organ, ki se vse življenje spreminja. V kostnem tkivu vse življenje poteka proces kostne preнове oziroma kostne remodelacije. Pri tem procesu se stara kostnina vseskozi zamenjuje z novo. Stara kost se najprej razgradi, nato pa jo zamenja nova kostnina.(1,2)

V proces kostne remodelacije sta vključeni dve vrsti celic, osteoklasti, ti razgrajujejo kostnino in pa osteoblasti, ki izgradijo novo kostnino. Aktivnost osteoblastov in osteoklastov je uravnavana na več nivojih, lokalno ali sistemsko. Na sistemskem nivoju so to hormoni (kalcitriol, rastni hormon, PTH, kortikosteroidi, ščitnični hormoni, spolni hormoni). Na lokalnem ravni pa kostno remodelacijo uravnavajo citokini, rastni dejavniki in diferenciacijski dejavniki (OPG, RANKL). Na lokalni ravni so se v novejših študijah kot zelo pomembne celice pokazali tudi osteociti. To so celice, ki izvirajo iz osteoblastov, ujetih v kostnem tkivu. Osteociti močno vplivajo na izražanje signalne molekule liganda receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa-B s kratico RANKL. Ta pa je nujno potrebna za dozorevanje osteoklastov in posledično za razgradnjo kosti. Pri miših so dokazali, da zmanjšano izražanje RANKL pomeni tudi manj BMU (»bone forming units«) kar pomeni, da je RANKL dražljaj za tvorbo BMU. Osteociti so glavni vir sklerostina, ki je antagonist signalni poti WNT s tem lahko osteociti nadzorujejo hitrost in obseg kostne remodelacije. Osteociti so odzivni tudi na druge dejavnike npr. PTH, ki jih spodbujajo k izločanju RANKL. (1)

Zelo velik pomen, na področju poznavanja procesa kostne remodelacije ima tudi odkritje sistema RANKL/RANK/OPG. Z odkritjem tega sistema je postalo jasno, da je delovanje osteoklastov pod nadzorom osteoblastov. Osteoblasti izločajo RANKL in OPG. RANKL se veže na osteoklaste in poveča njihovo število in aktivnost, OPG pa tekmuje za vezavo z RANKL in inhibira njegovo delovanje. V tem sistemu so hitro prepoznali možnosti za delovanje zdravil. Pri miših brez genov za RANK in RANKL se je pojavila popolna odsotnost osteoklastov in zato osteopetroza. (1)

Poleg zdravljenja osteoporoze pa je zelo pomembno tudi pravočasno odkrivanje te bolezni z namenom preprečiti hujše stranske učinke (zlomi). To bi bilo mogoče ugotoviti na genskem nivoju, kjer bi lahko odkrili posameznike s povečanim tveganjem za osteoporozo.

### 1.1 Kostna remodelacija

Proces kostne remodelacije oziroma kostne preнове poteka vse življenje, kar pomeni, da se kostnina neprestano odstranjuje in nadomešča z novo. Proces kostne preнове je ključnega pomena, za vzdrževanje skeleta in prilagajanje kosti zunanjim dejavnikom. Osnovna enota kosti je sestavljena iz osteocitov, osteoklastov in osteoblastov. Aktivnost teh enot uravnava mnogo dejavnikov: mehanske sile, hormoni, citokini, lokalni dejavniki, itd. (2)

S procesom kostne preнове se:

- Vzdržuje homeostaza kalcija
- Zamenja staro kostno tkivo
- Organizem prilagaja na okolje
- Popravijo poškodbe na kosteh.

V procesu kostne preнове sodelujejo kostne celice:

- **Osteoklasti** so celice, ki lahko resorbirajo staro, šibko kostnino v kratkem času. To so velike več jedrne celice, ki se razvijejo iz monocitov. Osteoklasti delujejo tako, da v prostor med kostnino in nagubano membrano osteoklasta spustijo proteolitične in druge encime. Signal za diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov so številni hormoni: PTH, estrogeni, androgeni, leptin in ščitnični hormoni). (3)
- **Osteoblasti** izhajajo iz mezenhimskih celic v kostnem mozgu. Delujejo mnogo počasneje kot osteoklasti, saj traja več tednov, da nadomestijo kostnino, ki so jo razgradili osteoklasti. Glavni produkt osteoblastov je kolagen tipa I, v manjši meri pa sintetizirajo tudi osteoklacin, osteonektin, BMP-je, itd. Osteoblasti imajo tudi receptor za estrogen.
  - o **Osteociti** so najštevilčnejše izmed vseh kostnih celic. Razvijejo se iz osteoblastov. So aktivno vključeni v kostno pre novo in kontrolne mehanizme. Služijo tudi kot mehano-senzorične celice in imajo zelo pomembno vlogo pri funkcionalni prilagoditvi kosti.

- **Neaktivni ploščati osteoblasti** (»lining cells«) so ploščate celice, ki pokrivajo 80-95% notranje površine kosti. Razvili naj bi se iz neaktivnih osteoblastov. Tvorijo zaščitno plast. Določene površinske molekule na teh celicah reagirajo z RANK, ki ga najdemo tudi na osteklastnih predhodnikih. S to interakcijo se lahko prične cikel kostne preнове. (2,3)

### 1.1.1 Osteoklastogeneza

Osteoklasti za diferenciacijo iz monocitov potrebujejo dva ključna citokina, to sta RANKL in M-CSF. RANKL naj bi služil nadzoru procesa preko aktivacije RANK, medtem ko je M-CSF potreben za proliferacijo iz monocitov. (4)

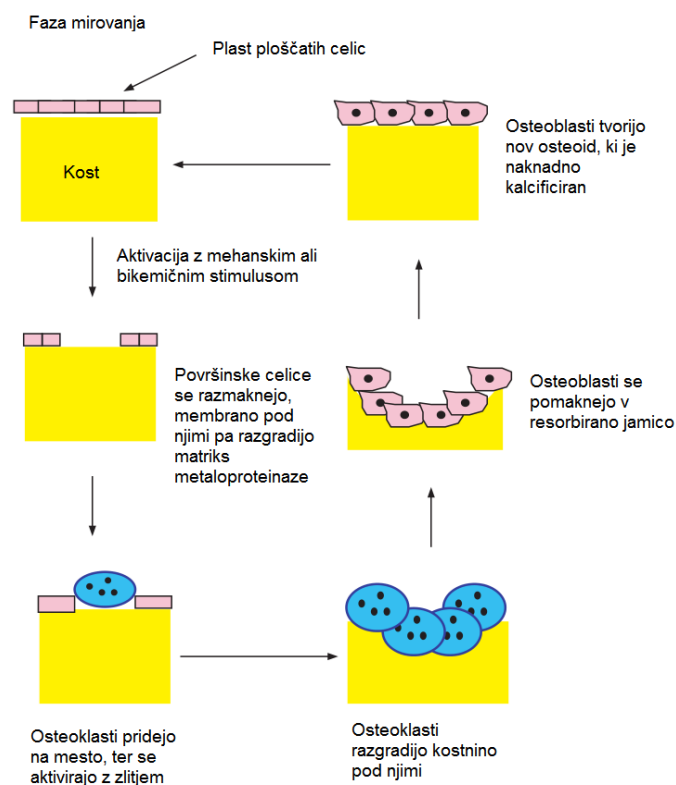
RANKL poveča fosforilacijo ITAM (angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif – transmembranski kompleks, ki je pomemben za prenos signala v celicah imunskega sistema), kar poveča izražanje imunoglobulinom podobnih receptorjev, kot je OSCAR (z osteoklasti povezan receptor), izražanje teh pa še okrepi signal ITAM. RANK-RANKL interakcija aktivira NFATc1 (jedrni faktor aktiviranih T celic – 1) po alternativni poti. Ta pot vključuje TRAF-6 (angl. TNF receptor associated factor – posrednik signala v celici), c-Jun in c-Fos, ki skupaj tvorita transkripcijski dejavnik, ter p38, ki pa je kinaza povezana z diferenciacijo apoptozo in avtofagijo. NFATc1 je ključen za osteoklastogenezo, saj se z njegovim prekomernim izražanjem odpravi potreba po RANKL v procesu osteoklastogeneze. Ob tem pa se tudi monociti, ki so NFATc1 (-/-) ne razvijejo v osteoklaste. (3,4)

### 1.1.2 Proces kostne remodelacije

Sam proces kostne remodelacije še ni popolnoma raziskan. Celoten proces traja 30 dni, skupaj z mineralizacijo pa 120 dni in ga lahko razdelimo v šest stopenj:

1. **Faza mirovanja** – plast tankih ploščatih »mirujočih« osteoblastov (angl. lining cells) se razprostira čez tanko kolagensko membrano na površini kosti.
2. **Faza aktivacije** – ploščate celice se razmaknejo, kar povzroči razkritje kolagenskega matriksa. To kemotaktično privabi osteoklaste. V procesu aktivacije naj bi sodelovale matriks metaloproteinaze, ki jih proizvajajo osteoblasti.

3. **Faza resorpcije** – zbiranje in zlitje osteoklastnih predhodnikov, tesno nalepljanje osteoklastov na kostno površino, priprava nagubane membrane, osteoklasti resorbirajo kost, osteoklasti se počasi premikajo ali pa so podvrženi apoptozi. Ta stopnja traja 2 tedna.
4. **Faza preobrata** – monociti in endostealne ploščate celice pripravijo površino lakun za izgradnjo nove kostnine, tako da odstranijo ostanke, ki so jih za sabo pustili osteoklasti. Ob tem na mesto lakune prihajajo predhodniki osteoblastov.
5. **Faza zgodnjega oblikovanja** – aktivni osteoblasti izgrajujejo osteoid.
6. **Faza poznega oblikovanja** – mineralizacija osteoida. Mineralizacija traja približno 2 -3 mesece.
7. **Faza mirovanja** – osteoblasti postanejo ploščate celice ali pa osteociti, če so ujeti znotraj novonastale kostnine. (2,3,4)



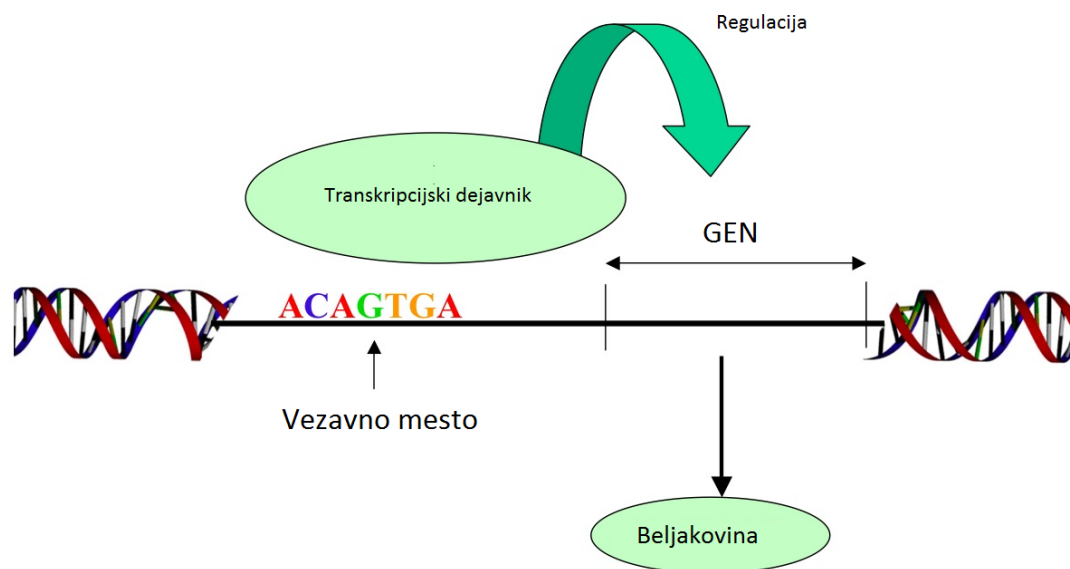
Slika 1: Proces kostne remodelacije

(Povzeto po: Datta H K, Ng W F, Walker J A et al. : The cell biology of bone metabolism. J Clin Pathol 2008. 61:577-587.)

## 1.2 Transkripcijski dejavniki

Strukturna enota gena, ki se nahaja pred začetkom transkripcije je promotor. To je zaporedje na molekuli DNA, ki določa, kje se bo vezala RNA polimeraza in s tem kje bo začetek transkripcije. Prepisovanje iz določenega promotorja nadzorujejo beljakovine, ki se vežejo na DNA in se imenujejo transkripcijski dejavniki. Kontrolni elementi v evkariontskem genomu, ki vežejo transkripcijske dejavnike se pogosto nahajajo daleč stran od promotorja, ki ga nadzorujejo. V nekaterih primerih se ta zaporedja nahajajo več tisoč baznih parov višje (nasproti smeri prepisovanja) ali nižje (v smeri prepisovanja) od promotorja. Rezultat takšne razporeditve je, da lahko prepisovanje iz enega promotorja nadzoruje več transkripcijskih dejavnikov. (5,6)

V osteogenezo in oblikovanje osteoklastov je vpletenih več transkripcijskih dejavnikov. Med njimi so največ proučevali: z RUNT povezan transkripcijski dejavnik 2 (Runx2), Osterix (Osx) in regija, ki določuje spol Y-box 9 (Sox9). (7)



Slika 2: Shematski prikaz delovanja transkripcijskega dejavnika

(Povzeto po: <https://howardhughes.trinity.duke.edu/blogs/2011/06/24/zinc-fingers-plasmids-and-my-battle-with-e-coli> 20.4.2014)

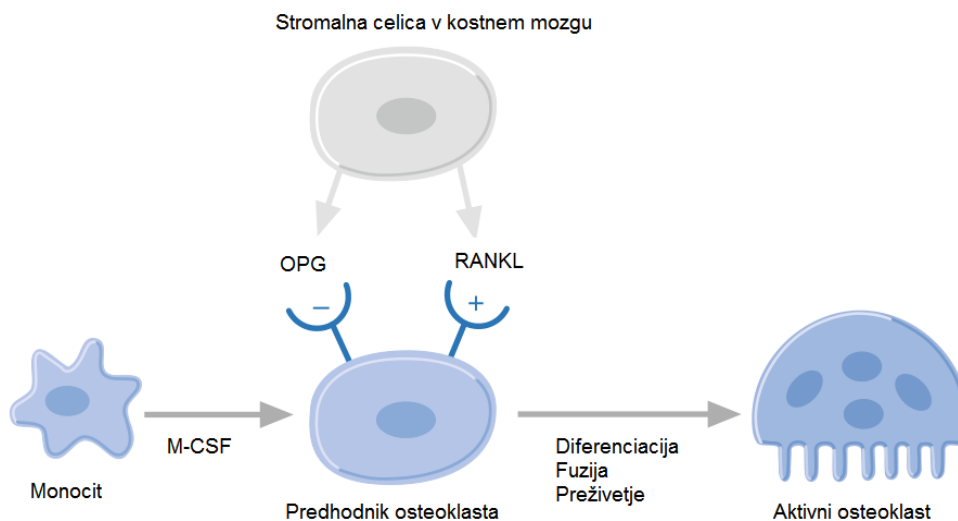


### **1.3 RANKL in sistem RANK/RANKL/OPG**

Sistem RANK/RANKL/OPG ima ključno vlogo v procesu kostne premene. Glavne celice, ki uravnavajo kostno premeno niso osteoklasti, kot so domnevali pred leti. Po odkritju regulatornega sistema RANKL/RANK/OPG je postalo jasno, da so glavne celice, ki nadzorujejo delovanje osteoklastov v resnici osteoblasti. Osteoblasti izločajo RANKL in osteoprotegrin (OPG). RANKL se veže na receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (RANK; receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B). RANK se nahaja v membrani osteoklastnih predhodnikov. Vezava RANKL na RANK povzroči, da se povečata število in aktivnost osteoklastov. OPG je topni receptor za RANKL in tekmuje z RANKL za vezavo na RANK. Na ta način OPG inhibira delovanje RANKL. Preko tega sistema osteoblasti, ki so sicer odgovorni za sintezo kostnega matriksa, uravnavajo tudi razgradnjo kosti.(2)

RANKL je skupaj z M-CSF(makrofagni kolonije stimulirajoči dejavnik) nujen tudi za sam razvoj osteoklastov iz krvotvornih matičnih celic. Iz teh celic se v kostnem mozgu razvijajo mononuklearne celice monocitno-makrofagne linije. Te celice preidejo do mesta razgradnje kostnine, se vežejo na kostni matriks in se pod vplivom RANKL in M-CSF preobrazijo v več jedrne zrele osteoklaste. (2)

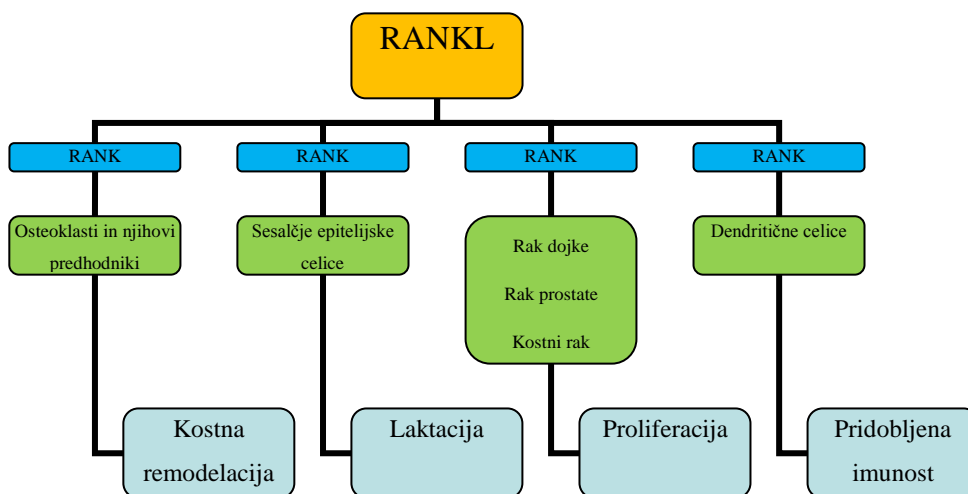
RANKL pa ni pomemben samo za diferenciacijo osteoklastov, ampak je tudi modulator delovanja in preživetja teh celic. Sistem RANKL/RANK/OPG sodeluje tudi pri preživetju in aktivaciji dendritičnih celic, aktivaciji celic T, razvoju limfatičnega sistema in mlečnih žlez, diferenciaciji celic B, pri termoregulaciji pri ženskah ter pri zvišanju telesne temperature ob vnetju. Sistem RANKL/RANK/OPG ponuja kar nekaj možnosti za zdravljenje z biološkimi zdravili. Pri miših brez genov za RANKL ali RANK se je razvila osteopetroza zaradi popolne odsotnosti osteoklastov. Pri miših brez gena za OPG pa se je že zelo zgodaj razvila osteoporoza zaradi povečane diferenciacije osteoklastov. (1,7,8,9,10)



Slika 3: Sistem RANK/RANKL/OPG

(Povzeto po: Bartl R, Frisch B: Osteoporosis: Diagnosis, Prevention, Therapy, Second Edition, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009, 1-27.)

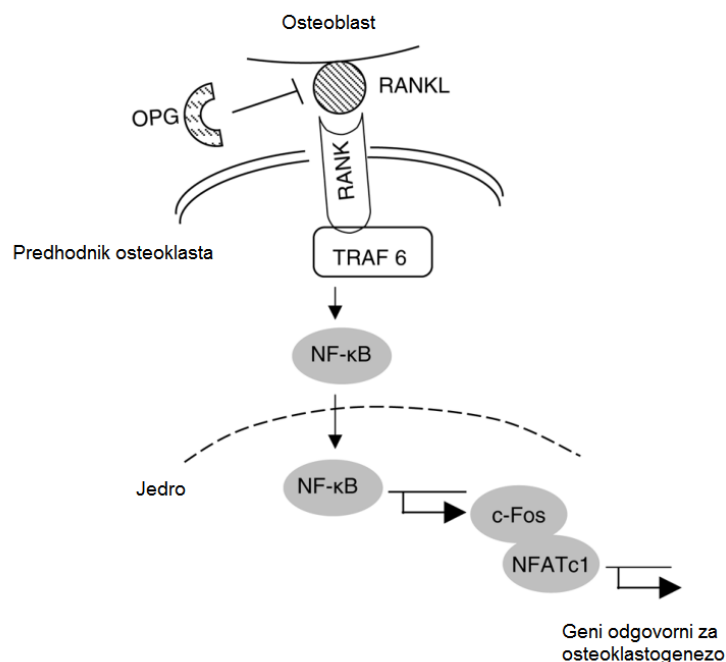
RANKL je homotrimerni transmembranski protein, ki se izraža kot vezan na membrano ali pa v topni obliki. Ta je rezultat proteolitične cepitve ali alternativnega spajanja. Ekspresijo RANKL stimulirajo enaki dejavniki, ki stimulirajo oblikovanje in aktivnost osteoklastov. RANKL je močno izražen v limfnih vozlih, priželjcu in pljučih. V vnetih sklepih se izraža v sinovijskih celicah in izloča iz aktiviranih T celic. Ti viri RANKL so posredno odgovorni za uničenje sklepa pri bolnikih z revmatoidnim artritisom.



Slika 4: Vloga RANKL v kosti in drugih tkivih

(Povzeto po: Boyce BF, Xing L: Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. Arthritis Res Ther, 2007; 9(1).)

RANKL tako kot TNF stimulira sproščanje nezrelih matičnih celic v krvni obtok. Za preklop v diferenciacijo osteoklastov je potrebno izražanje c-Fos v osteoklastnih predhodnikih. C-Fos je transkripcijski dejavnik, ki ga aktivira ravno RANKL. (7)



Slika 5 Delovanje RANKL

(Povzeto po: Boyce BF, Xing L: *Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. Arthritis Res Ther*, 2007; 9(1).)

### 1.3.1 Uravnavanje izražanja RANKL

PTH, prostaglandin E2, deksametazon, provnetni citokini (IL-1) in TNF, D3 stimulirajo izražanje RANKL. Na drugi strani pa estrogen in TGFβ zavirata izražanje RANKL. Znano je, da je nadzor regulacije OPG in RANKL ravno obraten. Nivo RANKL se poviša v malignih tumorjih in pri raku kosti. Rak in neuravanje mnogih citokinov in hormonov lahko spremeni kostno presnovo preko izražanja RANKL. (7,10,12)

### 1.3.2 RANKL v osteoblastih

Nekateri dokazi kažejo na to, da so celice osteoblastne linije pomemben vir RANKL. Ti dokazi temeljijo na lokalizaciji celic ki izražajo RANKL v kostnih rezinah in detekciji izražanja RANKL v celicah lobanje glodalcev. Vendar pa pri vseh raziskavah niso našli

RANKL v osteocitih. Ravno osteoblastni predhodniki naj bi bili pomemben vir RANKL v kosti. Podporne celice osteoklastov izražajo RANKL, medtem ko celice osteoblastne linije relativno osteoblastno specifične gene (npr. osteokalcin). (1)

### **1.3.3 PTH (Paratiroidni hormon)**

PTH je eden najmočnejših spodbujevalcev izražanja RANKL v osteoblastnih celicah. Na to lahko sklepamo iz sočasnega znižanja nivoja RANKL in števila osteoklastov pri glodalcih s pomanjkanjem PTH. PTH deluje preko aktivacije protein kinaze A (PKA) – cAMP poti. Za odziv je potrebna tarča te poti »protein, ki veže cAMP odzivni element« (CREB). (7)

### **1.4C-Myb**

c-Myb protein je transkripcijski dejavnik, ki ima ključno vlogo pri regulaciji proliferacije in diferenciacije progenitornih celic v kostnem mozgu. c-Myb je bil prvotno odkrit kot celični homolog v-Myb, ki je transformirajoči retrovirusni onkogen povezan z levkemijo pri pticah. Za c-Myb je dokazano, da deluje kot onkogen pri več vrstah tumorjev, tudi pri raku dojke. Geni, ki nosijo zapis za proinvazivne faktorje, kot sta CXCL12 in CXCR4 so bili odkriti kot tarče za ta transkripcijski dejavnik, torej c-Myb. (12,13)

C-Myb je bil pri našem delu pomemben zato, ker je bilo v diplomski nalogi z naslovom *Iskanje vezavnih mest za transkripcijske dejavnike vpletene v izražanje gena RANKL v osteoblastnih celičnih kulturah*, dokazano, da se lahko SRY in c-Myb vežeta na regulatorno regijo gena za RANKL. Pri tej nalogi so dokazali tudi, da imata vezavni mesti za ta dva transkripcijska dejavnika dejanski vpliv na izražanje RANKL na nivoju gena. (14)

### **1.5SRY**

SRY spada v skupino transkripcijskih dejavnikov SOX. Ta skupina ima mnoge pomembne vloge v razvoju, ki jih opravlja z aktivacijo ali represijo točno določenih genov preko interakcij z drugimi proteini. SOX skupina ima 20 članov, ki jih lahko razdelimo v 10 podskupin glede na podobnost zaporedja. SOX proteini se vežejo v vezavno mesto na DNA preko domene *high-mobility group* (HMG). Ta domena je sestavljena iz treh verig in se veže v mali žleb DNA. HMG je v sami skupini SOX zelo ohranjena, prepoznavno mesto

zanjo pa je A/TA/TCAAA/TG. Razlike med transkripcijskimi dejavniki nastanejo zaradi ostalih delov proteina. Za nas je zlasti zanimiva mutacija v SOX9, ki povzroči kostno dismorfologijo.

Protein SRY lahko razdelimo na 3 domene: N-končno domeno, srednjo domeno in C-končno domeno. Srednja domena je sestavljena iz 77 ostankov in se lahko veže na DNA – *high mobility group (HMG) box*. S primerjavo med različnimi živalskimi vrstami so ugotovili, da je samo ta regija ohranjena. HMG box je domena sestavljena iz približno 80 ostankov, ki omogoča, vezavo v mali žleb DNA veliki skupini beljakovin družine HMG-1/HMG-2. To družino lahko razdelimo v dve funkcionalni skupini:

- Transkripcijski faktorji, ki se vežejo specifični glede na zaporedje na DNA (SRY, SOX5, itd.)
- Transkripcijski faktorji, ki kažejo malo oz. nobene specifičnosti. (15,16)

## 1.6 WNT/ $\beta$ -kateninska signalna pot

Med iskanjem ključnih molekul, ki so vpletene v nastajanje in aktiviranje osteoblastov so raziskovalci ugotovili, da ima pri tem zelo pomembno vlogo signalna pot WNT/ $\beta$ -katenin. Z aktivacijo te signalne poti se kostna masa poveča preko različnih mehanizmov.

Skupina glikoproteinov WNT lahko sodeluje pri aktivaciji treh ločenih znotrajceličnih signalnih poti. Ena izmed teh je tudi WNT/ $\beta$ -katenin pot oz. kanonična WNT pot. Z genetskimi študijami so dokazali, da ima ta pot skupaj z BMP signaliziranjem in transkripcijskim dejavnikom RUNX2 (CBFA1/AML3) pomembno vlogo v razvoju skeleta, razvoju osteoblastov in oblikovanju kosti.

LRP5/6 (angl. lipoprotein receptor-related protein 5) je ključnega pomena v tej signalni poti. LRP5/6 tvori receptorski kompleks z Fz (angl. Frizzled – družina z G proteinom sklopljenih receptorjev). Na ta receptorski kompleks se veže beljakovina Wnt, kar povzroči fosforilacijo citoplazemskega dela LRP5/6, ob tem pa nastane tudi vezavno mesto za aksin. APC (angl. adenomatous polyposis coli – negativni regulator koncentracije beta katenina, povezan s celično adhezijo; tumor supresorski gen) in Dsh (angl. Dishevelled – citoplazemski fosfoprotein, ki deluje takoj za Fz in je v celično diferenciacijo) se vežeta na aksin in onemogočita nastanek glikogen sintaze kinaze  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Ker je GSK3 $\beta$  onemogočen, je s tem preprečena fosforilacija  $\beta$ -katenina. Ta se začne kopičiti v citoplazmi

in prehaja v jedro. V jedru se  $\beta$ -katenin veže na transkripcijski dejavnik TCF/LEF1, kar sproži izražanje tarčnih genov , večjo proliferacijo osteoblastov in tvorbo kostnine.  
(2,4,11,17)

## 2. Namen dela

V predhodnih genetskih študijah promotorja RANKL je bilo ugotovljeno, da sta transkripcijska dejavnika SRY in c-Myb vpletena v izražanje RANKL tako, da zmanjšata njegovo izražanje *in vitro* na genetskem nivoju. V našem diplomskem delu bomo natančneje preučili vlogo transkripcijskega faktorja SRY na izražanje RANKL na celičnem modelu, v bioptih humanega kostnega tkiva in serumskih vzorcih bolnikov. Želimo ugotoviti:

1. Ali je beljakovina SRY prisotna v celicah HOS in v kostnem tkivu moških.
2. Kako SRY vpliva na izražanje RANKL ter kaj se ob vnosu SRY zgodi z c-Myb.
3. Ali prisotnost pcDNA3-hSRY gena v celicah HOS zniža izražanje RANKL v primerjavi s HOS celicami tretiranimi samo s pcDNA3

Preveriti želimo dve hipotezi:

1. Ob prisotnosti SRY se zniža izražanje RANKL v kulturi humanih osteoblastnih celic HOS
2. Obstaja razlika v izražanju RANKL med moškimi in ženskami.

Za potrditev hipotez bomo uporabili metodo verižne reakcije polimerizacije v realnem času, ki nam bo dala odgovore o razliki oz. korelaciji v izražanju gena za RANKL. S pomočjo slikovnih tehnik imunocitokemije (imunofluorescence) in imunohistokemije bomo poskušali dokazati uspešno transfekcijo in pa SRY v kostnih vzorcih osteoporoznih in osteoartroznih bolnikov.

Za statistično analizo bomo uporabili računalniška programa za statistično obdelavo podatkov SPSS 20 in Microsoft Excel.

### 3. Materiali in metode

#### 3.1 Materiali

Preglednica I: Uporabljena laboratorijska oprema

Oprema	Proizvajalec
Avtomatske pipete	Eppendorf
Nastavki za pipete	Starlab
Epice različnih volumnov	Plasti brand, Eppendorf
Hladilnik	Gorenje
Zamrzovalnik	Gorenje
Tehnica	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
Sterilne erlenmajerice	Različni proizvajalci
Falkonke	TPP
Steklenice za celične kulture (75mL)	TPP
Inkubator za celične kulture	Heraeus Instrument
Centrifuga za celične kulture	Thermo Scientific
Mikroskop Olympus CX40	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija
Ploščice za celične kulture (6 luknjic)	TPP



ProLong® Antifade kit	Molecular probes™ , Invitrogen
Krovna stekelca Assistent 50 Elka	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Nemčija
Objektna stekelca Assistent 50 Elka	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Nemčija
Invertni svetlobni mikroskop CX40-SL	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija
Bidestilirana sterilna voda	
Hoechst 33342®	Molecular Probes™ , Invitrogen
Goveji serumski albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Stenheim, Nemčija
Medij DMEM	Sigma, Chemical Co.St.Louis, ZDA
Paraformaldehid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Stenheim, Nemčija
Triton X-100	Aldrich, Nemčija

### 3.2 Uporabljene kemikalije

Preglednica II: Uporabljene kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec
Antibiotik ampicilin	Sigma-Aldrich
Destilirana voda	Elga aparat
Isopropanol	Merck KGaA
Tris baza (1M)	Sigma-Aldrich
Na <sub>2</sub> EDTAx2H <sub>2</sub> O	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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fluka
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fluka
HCl	Sigma-Aldrich
Trypsin	Gibco

### 3.3 Uporabljeni reagenčni kompleti

Preglednica III: Uporabljeni reagenčni kompleti

Reagenčni kompleti	Proizvajalec
TRIzol ® Reagent	Ambion®, ZDA
HotStar HiFidelity Polymerase Kit	QIAGEN, Nemčija
FuGENE® HD Transfection Reagent	Thermo Scientific, ZDA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems ®
Eva Green qPCR Mix	Biotium Inc. ZDA
ab64264 - Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit	Abcam

### 3.4 Vzorci za določanje razlike v izražanju RANKL med spoloma

Za namen določanja razlike v izražanju RANKL med moškimi in ženskami smo uporabili serumske vzorce 112 preiskovancev. 42 preiskovancev je imelo diagnosticirano osteoartrozo, 58 jih je imelo osteoporozo, ostalih 12 pa je bilo kontrolnih preiskovancev. Izmed vseh je bilo 75 moških in 37 žensk.

### 3.5 Gojenje celic na ploščici s šestimi luknjicami

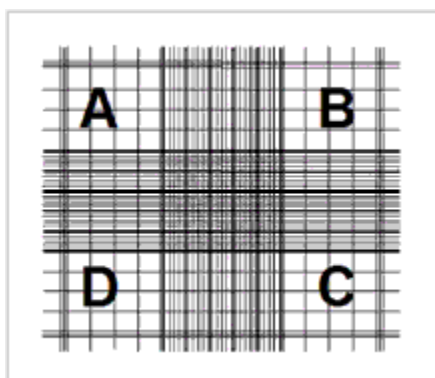
Za naš poskus smo potrebovali približno 100 000 celic. Poskus smo izvajali na celicah HOS (celice humanega osteosarkoma). Celice smo pred presaditvijo gojili v gojilni posodici s površino 75 cm<sup>2</sup>. Za uspešno rast potrebujejo celice ustrezen medij. V našem primeru smo celice gojili v mediju DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), ki smo mu dodali FBS (inaktiviramo komplement tako, da pol ure segrevamo odtaljenega na 56°C). V medij smo naknadno dodali še antibiotik, antimikotik ter L-Glutamin. Celice smo

gojili do 80-90% konfluentne rasti oz. tako dolgo da smo imeli dovolj celic za poskus. Presajanje celic smo izvedli po naslednjem postopku:

Celicam smo odvzeli rastni medij. Nato smo jih prelili z 3 mL mešanice tripsin-EDTA. Za tem je sledila inkubacija 3-5 minut, da so se vse celice odlepile od površine - število odlepljenih celic smo opazovali pod invertnim mikroskopom. Delovanje tripsina smo ustavili z dodatkom 5mL medija. Suspenzijo celic smo nato prenesli v falkonko in centrifugirali 2-3 min pri 1200 obratov na minuto. Supernatant smo previdno odpipetirali in preostanek celic resuspendirali v 1 mL svežega medija. Na koncu smo celice prešteli in jih določeno število (približno 100000/ luknjico) dali v vnaprej pripravljeno gojišče v ploščici s šestimi luknjicami. (18,19)

### 3.6 Štetje celic v Neubauerjevi komori

Za štetje smo 50  $\mu\text{L}$  suspenzije celic pomešali s tripanskim barvilom, v razmerju 1:2. Mešanico celic in barvila smo nanegli pod krovno stekelce na Neubauerjevi komori. Prešteli smo celice v štirih večjih krajnih kvadratih na stekelcu. Volumen enega kvadrata je  $0,1 \text{ mm}^3$  ( $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0,1\text{mm}$ ), kar je enako  $0,1\mu\text{L}$ . Izračunali smo povprečno število celic v vseh štirih kvadratih. S tem smo dobili približno oceno števila celic v  $0,1 \mu\text{L}$ . Tako smo ob upoštevanju redčitve izračunali število celic v  $1\mu\text{L}$ , kar smo kasneje upoštevali pri nacepljanju celic.



Slika 6 Mreža v Neubauerjevi komori

### 3.7 Transfekcija – orodje za vnos gena v celico

Transfekcija je postopek s katerim lahko tuje nukleinske kisline vnesemo v celico in s tem proizvedemo genetsko spremenjeno celico. Poznamo več metod transfekcije: biološke,

kemične in fizikalne. Idealna metoda za transfekcijo bi morala zagotoviti visoko učinkovitost, majhno citotoksičnost, minimalen vpliv na fiziologijo celice, ter biti enostavna za uporabo in ponovljiva.

Pri našem delu smo za transfekcijo uporabili *FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent*. To je večkomponentni reagent, ki z DNA tvori kompleks, ki se nato prenese v celico. *FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent* ima številne prednosti:

- visoka učinkovitost transfekcije, pri večini pogosto uporabljenih celičnih linij,
- povzroča minimalno citotoksičnost in spremembe v morfologiji; pri transfekciji ni potrebno odstraniti ravnega medija,
- primeren tako za prehodno kot trajno transfekcijo,
- ni potrebna menjava ravnega medija.

Najbolj uporabljane metode za transfekcijo so kemične. Pri teh metodah najpogosteje uporabljamo kationski polimer, kalcijev fosfat, kationski lipid in kationsko aminokislino.

Za transfekcijo smo v ploščico s šestimi luknjicami nacepili približno 100 000 celic, da je bila konfluentna rast približno 50-60%. Transfekcijski reagent smo segreli na sobno T in premešali. DNA (plazmid) smo razredčili tako da smo imeli 1µg DNA na 100 µL gojišča. Izračunano količino DNA smo nato razdelili v mikroepruvete. Razredčeni DNA smo dodali 3 µL transfekcijskega reagenta, močno pretresli in inkubirali 15 min na sobni T. Za tem smo 100 µL transfekcijskega kompleksa nanесли direktno na celice (ne na steno luknjice). Celice s transfekcijskim reagentom smo inkubirali 24 ur, nato pa smo iz celic s pomočjo TRIzol reagenta izolirali mRNA (18)

**Preglednica IV: Mešanica za transfekcijo**

<b>Komponenta</b>	<b>Količina (na luknjico)</b>
Plazmidna DNA	1000 ng/ konc. Plazmidne DNA
DMEM	100µL
FuGene	3µL

### **3.8 Izolacija RNA iz celične kulture**

Izolacija RNA iz samih celic je zelo pomemben korak, saj je ravno od natančnosti in previdnosti pri izolaciji odvisno nadaljnje delo. Pri našem poskusu smo se odločili za

izolacijo z liznim reagentom TRIzolom®. TRIzol® je za uporabo pripravljen reagent. Uporablja se za izolacijo visoko kakovostnih RNA, DNA in beljakovin iz celic in različnih tkivnih kultur. TRIzol® je enofazna raztopina sestavljena iz fenola, gvanidinijevega izotiocianata in drugih sestavin, ki služijo izolaciji RNA tako z visoko kot nizko molekulsko maso.

### **Reagenti:**

- TRIreagent
- kloroform
- izopropanol (2-propanol)
- 75% etanol
- voda
- PBS

#### **3.8.1 Homogenizacija**

Celicam smo odstranili medij in jih sprali z 1mL PBS (na luknjico). Nato smo dodali 1mL trizola (1mL trizola na 3,5cm površine), da bi izboljšali lizo celic smo lizat nekajkrat potegnili v pipeto. Uspešnost lize smo opazovali pod invertnim mikroskopom. Liza je bila uspešna, takrat ko smo v luknjici videli samo še ostanke celične membrane.

#### **3.8.2 Fazna separacija**

Celice z liznim reagentom smo prenesli v mikrocentrifugirke. Homogenizirane vzorce smo nato inkubirali 5 minut na sobni T. Dodali smo 0,2 mL kloroforma na 1mL liznega reagenta in močno pretresali 15 sekund. Da je potekla fazna separacija, smo pustili mešanico stati 5 minut na sobni T. Vzorce smo nato centrifugirali pri 12 000x g, 15 min na 4°C, po centrifugiranju je bila RNA v vodni fazi. Vodno fazo smo nato previdno odstranili in jo prenesli v novo mikrocentrifugirko.

#### **3.8.3 Izolacija RNA**

Vodni fazi smo dodali 0,5 mL izopropanola na 1 mL liznega reagenta in vzorce pustili stati 10 minut na sobni T. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali pri 12 000x g 10 min na 4°C. Oborina RNA je bila na dnu in ob strani mikrocentrifugirke. Nato smo previdno odstranili

supernatant, pri tem smo pazili da nismo odstranili slabo vidne oborine RNA ob steni mikrocentrifugirke. Po potrebi smo centrifugiranje podaljšali ali ponovili.

### **3.8.4 Spiranje RNA**

Oborino RNA, ki je ostala na dnu in ob strani smo sprali z 1mL 75% etanola na 1mL liznega reagenta. Mešanico smo premešamo in centrifugirali pri 7500 x g 5 min na 4°C. Spirek smo zavrgli, RNA pa sušili 5-10 min (ves etanol se mora posušiti).

### **3.8.5 Ponovno raztapljanje RNA**

Pelet RNA ki ostane po sušenju smo ponovno raztopili v 21 µL vode brez RNAz. 6 µL od tega smo prestavili v drugo mikrocentrifugirko in kasneje uporabili za merjenje koncentracije na aparatu Nanodrop. Da se je celotna RNA raztopila smo inkubirali 2x 10 min in med tem s pipeto spirali 1cm nad dnom mikrocentrifugirke, da smo odstranili morebitne ostanke RNA na steni mikrocentrifugirke.

## **3.9 Merjenje kakovosti izolirane RNA na aparatu *Agilent 2100 bioanalyzer***

Ker smo pri našem delu merili izražanje genov, je bila zelo pomembna kakovost izolirane mRNA. Kakovost izolirane RNA smo preverili s tako imenovanim »laboratorijem na čipu« (Agilent RNA 6000 Nano Kit). Pri tej metodi se za določanje količine RNA uporablja fluorescentno barvilo. Z uporabo mikrofluidne tehnologije nam sistem na čipu omogoča ločitev nabitih bioloških molekul v avtomatiziranem procesu pri katerem se zmanjša variabilnost zaradi rokovanja z vzorci. Aparat *Agilent 2100 bioanalyzer* za vzbujanje fluorescentne svetlobe interkalirajočih barvil uporablja laser, kar pripomore k višjemu nivoju občutljivosti. Podatki pa so predstavljeni na razumljiv in jasen način tudi v tradicionalni obliki z elektroferogramom.

RNA je termodinamsko stabilna molekula, ki pa jo zelo hitro razgradijo RNAze, ki so prisotne povsod. Kot rezultat encimske razgradnje se v vzorcu pojavijo kratki odseki RNA, ki lahko v pomenijo napačne rezultate v nadaljnji analizi. Zgodovinsko se je intergriteta RNA določala z uporabo elektroforeze na agaroznem gelu. Tipična gelska slika je bila sestavljena iz dveh lis 28S in 18S rRNA, poleg teh pa se je lahko pojavilo še nekaj lis, kjer so bili krajši odseki RNA. Kot čista RNA se smatra tista, ki ima razmerje 28S:18S približno 2.0 ali višje. S prihodom avtomatizirane analize RNA, kot jo omogoča *Agilent 2100 bioanalyzer* pa se je pojavila potreba po orodju za standardizacijo nadzora kvalitete

RNA. V ta namen so razvili računalniški algoritem, ki nam omogoča izračun *RNA Integrity number* (RIN). V praksi je RIN število med 1 in 10. 1 opisuje najbolj razgrajeno RNA, medtem, ko 10 pomeni najbolj intaktno RNA. Za uporabo pri RT-PCR je priporočljiva RNA z RIN nad 7. (21)

### **3.9.1 Čiščenje elektrod**

Pred samo pripravo vzorcev za analizo je bilo potrebno pripraviti aparat. Najprej smo čistilni čip napolnili 350 $\mu$ L RNase zap. Čip smo za 1 minuto vstavili v aparat *Agilent 2100 bioanalyser*. Nato smo čip spraznili in ga napolnili z vodo brez RNaz in jo dali v aparat za 10 sekund.

### **3.9.2 Priprava gela**

Reagente smo pred uporabo 30 minut pustili na sobni temperaturi, da so se ogreli. Nato smo 550 $\mu$ L gelskega matriksa odpipetirali v epruveto za filtriranje. V mikrocentrifugi smo gel centrifugirali 10 minut pri 1500g. Filtrirani gelski matriks smo nato razdelili v RNase-free mikrocentrifugirke - 65 $\mu$ L v vsako. Gelski matriks lahko shranimo v hladilniku za 4 tedne, en alikvot pa zadostuje za 2 čipa.

### **3.9.3 Priprava barvila**

Barvilo vsebuje DMSO, zato moramo z njim ravnati kot s potencialnim mutagenom in biti pri delu z njim še posebej previdni. Barvilo se mora pred uporabo segreti na sobno temperaturo, za to smo ga 30 minut inkubirali pri sobnih pogojih. Nato smo izvedli tako imenovani »spin down« (kratko centrifugiranje), da smo vso barvilo spravili na dno centrifugirke. 1 $\mu$ L barvila smo dodali 65 $\mu$ L filtriranega gela. Mešanico smo nato dobro premešali na vibracijskem mešalu in centrifugirali 10 minut pri 13 000 X g.

### **3.9.4 Priprava vzorcev in lestvice**

Pred uporabo smo vzorce in lestvico odtajali na ledu. Da smo se izognili nastanku sekundarne strukture smo vzorce denaturirali 2 minuti pri 70°C. 4 $\mu$ L vsakega vzorca smo nato pripravili v mikrocentrifugirke.

### **3.9.5 Dodajanje gelskega barvila**

Barvilo smo pred uporabo 30 minut odtajali na sobni T in ga pri tem zaščitili pred svetlobo. 9 $\mu$ L barvila smo odpipetirali na dno luknjice, ki je bila označena za dodajanje barvila.

### 3.9.6 Končna priprava čipa

Štoparico smo nastavili na 30 sekund in zaprli pokrov nastavka za čip. Bat smo enakomerno potisnili tako daleč, da je posebna ročka bat ustavila. Počakali smo 30 sekund in ročko sprostili. Bat se je počasi dvignil na 0,7 mL nato smo ga potegnili na 1mL. Pokrov čipa smo nato odprli in v vsako luknjico dodali še 9  $\mu$ L v dve luknjici označeni z G. Za tem smo v luknjico označeno za lestvico in 12 luknjic z vzorci dodali še 5  $\mu$ L markerja. 1 $\mu$ L lestvice smo odpipetirali v luknjico označeno s simbolom za lestev. V ostalih 12 luknjic pa smo dodali naše vzorce. Za vsak vzorec smo si označili v katero luknjico smo ga odpipetirali. Ko so bile vse sestavine ploščici smo čip postavili na stresalnik Agilent za 1 minuto. Po stresanju je bil čip pripravljen za analizo v aparatu.

### 3.10 Obratno prepisovanje

Pri preučevanju izražanja genov je zelo pomemben korak obratno prepisovanje oz. reverzna transkripcija. Ob uporabi pravih reagentov, lahko mRNA prepíšemo v enoverižno cDNA, kar nam omogoča izvedbo nadaljnjih analiz (RT-PCR, PCR, ...). Pri našem delu smo uporabili *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, ki je posebej validiran in optimiziran za arhiviranje cDNA za uporabo pri kvantifikaciji in študijah ekspresije. *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* sestavljajo naključni začetniki za prepis RNA v cDNA. cDNA, ki jo dobimo ne potrebuje čiščenja, saj korak inkubacije pri 85°C 5 minut zagotavlja, da se inaktivirajo vse komponente potrebne za reverzno transkripcijo (začetniki in encim). Ta komplet nam omogoča pretvorbo 2 $\mu$ g RNA v reakcijskem volumnu 20  $\mu$ L.

Kit sestavljajo:

- 10x RT pufer (1mL)
- 10x RT naključni začetniki (1mL)
- 25x dNTP mix (100nM)
- MultiScribe Reverse transcriptase 50 U/ $\mu$ L
- Inhibitor RNAs (100 $\mu$ L)

Za sintezo enoverižne cDNA iz celokupne RNA smo najprej pripravili 2-kratni master mix (20  $\mu$ L). Komponente smo počasi odtajali na ledu. Glede na število vzorcev smo izračunali količine, ki jih potrebujemo. »Master miks« (MM) smo pripravili v večjo mikrocentrifugirko – za vse vzorce in standarde. Nato smo MM razdelili v manjše



mikrocentrifugirke – po 5,8 $\mu$ L. Izolirano RNA smo raztopili v vodi brez RNAz do končnega volumna 14,2 $\mu$ L. RNA smo normirali tako, da smo jo v reakcijo vedno dali 1500 ng. Nato smo vzorce dali v »cycler« in izvedli prepisovanje RNA v cDNA po programu v tabeli. (22,24)

**Preglednica V: Master miks za obratno prepisovanje**

<b>Komponenta</b>	<b>Količina</b>
Pufer	2 $\mu$ L
dNTP	0,8 $\mu$ L
RT naključni začetnik	2 $\mu$ L
Multi scribe reverzna transkriptaza	1 $\mu$ L
RNA	14,2 $\mu$ L

**Preglednica VI: Program obratnega prepisovanja**

<b>Korak</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>3.</b>	<b>4.</b>
T[°C]	25	37	85	4
čas [min]	10	120	5	$\infty$

### 3.11 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR) oz. kvantitativni PCR (qPCR) je močno analitsko orodje s katerim lahko pomnožimo, identificiramo in kvantificiramo nukleinske kisline. Zmožnost tako količinskega določanja, kot tudi zaznavanje točno določenih genov je zelo pomembno tako v raziskovalni, kot tudi v diagnostični uporabi.

Pri metodi RT-PCR je ključna fluorescenčna reporterska molekula, s pomočjo katere lahko spremljamo napredovanje pomnoževanja DNA molekule. Glede na način pridobivanja signala je reporterska molekula lahko s fluoroforom označen oligonukleotid ali pa samo fluorescenčno barvilo, ki se veže v dvojno vijačnico. V praksi so najbolj uporabljeni s fluoroforji označeni začetniki (TaqMan). Ti se med podaljševanjem vgradijo v vijačnico, nakar jih Taq polimeraza s svojo 5'-3' eksonukleazno aktivnostjo razcepi, kar povzroči povečanje fluorescence. Metode ki temeljijo na označenih začetnikih lahko istočasno

zaznajo hitrost pomnoževanja DNA in potrdijo identiteto pomnožene tarče. Na ta način dobimo visoko specifičnost in občutljivost. (23)

Kot alternativa dragim in za izdelavo zahtevnim TaqMan začetnikom se za količinsko določanje DNA uporabljajo barvila, ki se vežejo v DNA verigo. Popolno barvilo za RT-PCR bi moralo imeti sposobnost se optimalno vezati v dsDNA, kar bi zagotovilo visoko detekcijsko občutljivost. S tem pa ne sme vplivati na analizo talilne krivulje. Barvilo naj se tudi nebi vezalo na ssDNA ali na kratke DNA odseke.

Pri našem delu smo se odločili za uporabo reagenčnega kompleta EvaGreen qPCR Mix. Barvilo EvaGreen (EG) je univerzalno in uporabno za vsako tarčno zaporedje. Rezultati, ki jih dobimo na ta način po specifičnosti niso primerljivi z TaqMan začetniki, vendar lahko specifičnost izboljšamo z uporabo talilne krivulje. EG spada med novejša PCR barvila. Uporablja se na mnogih področjih: kvantifikacija DNA, kvantifikacija pri kapilarni elektroforezi, kvantitativni PCR, talilna analiza na laboratoriju na čipu, itd. EG ima nekaj prednosti pred drugimi podobnimi barvili. Lahko ga uporabljamo v visokih koncentracijah, kar zagotavlja robusten signal in tudi oster vrh talilne krivulje. EG pa je zaradi spektralnih lastnosti mogoče uporabljati na večini obstoječih aparaturo, poleg tega pa se je barvilo izkazalo tudi kot zelo obstojno.(21)

Pri našem delu smo uporabljali Eva Green qPCR Mix, ki vsebuje:

- HOT FIREPol DNA polimerazo
- 5x Eva Green qPCR pufer
- 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- dNTP-je
- Eva Green barvilo

Za kvantifikacijo smo si najprej pripravili standardne krivulje za preučevani gen TNFSF11 in hišne gene RPLP0, ACTB in UBC. Standardne krivulje smo pripravili tako, da smo redčili izolirano DNA znane koncentracije. Pri TNFSF11 smo uporabili drugačne (2-kratne) redčitve kot pri hišnih genih (4-kratne). Uporabili smo 3x5 µL vsake redčitve.

Za vsak gen smo nato pripravili »master miks« (MM), tako da je vsak vseboval začetnike za določen gen. MM in začetnike smo med pripravo hranili na ledu, saj pri višjih temperaturah obstaja možnost tvorbe dimerov. (24,25)

**Preglednica VII: Master miks za RT-PCR**

<b>Komponenta</b>	<b>Količina</b>
EvaGreen Mix	2 $\mu$ L
Smerni začetnik	0,25 $\mu$ L
Protismerni začetnik	0,25 $\mu$ L
DNA	5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	2,5 $\mu$ L

V vsako luknjico smo nato napipetirali 5  $\mu$ L MM in 5 $\mu$ L vzorca - standarda. Na koncu smo neodvisno na drugi strani ploščice dodali še »no template control« (NTC), kjer smo namesto standarda dodali 5  $\mu$ L ultra čiste vode. S to negativno kontrolo smo dokazali, da pri našem poskusu ni prišlo do nespecifičnega pomnoževanja. Ko smo ploščico napolnili, smo jo pokrili s folijo, tako smo jo lahko za krajši čas hranili v hladilniku.

### **3.12 Preučevanje razlik v izražanju RANKL med moškimi in ženskami**

Za preučevanje korelacije med RANKL in SRY smo serumske vzorce bolnikov z izhodiščno koncentracijo cDNA 100 ng/ $\mu$ L razredčili na koncentracijo 2,5 ng/ $\mu$ L. To smo naredili tako, da smo 58,5  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O dodali 1,5  $\mu$ L vsakega vzorca. Pri vsakem vzorcu smo določali 3 gene – SRY, RANKL in RPLP0 in 6 standardov. Standarde smo pripravili z redčitvami cDNA z znano koncentracijo. Za vsak gen smo torej pripravili master miks za 100 vzorcev.

**Preglednica VIII: Master miks za RT-PCR (RANKL, SRY in RPLP0)**

<b>Komponenta</b>	<b>Količina</b>
EvaGreen Mix	3 $\mu$ L
Smerni začetnik	0,75 $\mu$ L
Protismerni začetnik	0,75 $\mu$ L
cDNA	6 $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O	4,5 $\mu$ L

### 3.13 Izolacija plazmida iz bakterij

Za transfekcijo želenega gena za Sry v celico smo morali plazmid s tem genom izolirati iz bakterijske kulture. To smo izvedli s pomočjo *QIAprep Spin Miniprep Kit*. Ta reagenčni komplet nam omogoča v kratkem času izolirati in očistiti do 2 $\mu$ g plazmidne DNA. Reagenčni komplet vsebuje:

- QIAprep Spin kolone
- Puffer P1
- Puffer P2
- Puffer N3
- Puffer PB
- Puffer PE
- Puffer EB

Najprej smo bakterijsko kolonijo vzeli iz trdnega gojišča in jo raztopili v tekočem mediju z dodanim antibiotikom (ampicilinom). Bakterije smo nato gojili v mešalnem inkubatorju približno 8 ur, pri 250 obratih in 37°C. Plazmid smo nato izolirali po protokolu, ki je bil priložen reagenčnemu kompletu. V zadnji fazi smo plazmid iz kolone sprali v sterilnem okolju (v mikrobiološki komori).

### 3.14 Merjenje koncentracije izolirane DNA

Po končani izolaciji plazmidne DNA smo njeno koncentracijo izmerili na aparatu Nanodrop ND-1000, proizvajalca Thermo Scientific. Aparat izmeri absorbanco vzorca na razdalji 1mm pri valovnih dolžinah 230, 260 in 280 nm, za kar uporablja ksenonsko žarnico in CCD kamero kot detektor. Za merjenje s tem aparatom potrebujemo zelo majhno količino vzorca – približno 10  $\mu$ L, saj se zaradi izkoriščanja površinske napetosti med dvema optičnima vlaknoma naredi zelo majhen tekočinski valj. Aparat nam koncentracijo poda v ng/ $\mu$ L, čistočo DNA ali RNA pa kot razmerje med izmerjenimi absorbancami.

### 3.15 Imunocitokemično barvanje HOS celic

Preglednica IX: Uporabljena protitelesa

Primarno protitelo	Lastnost in usmeritev
62824	Anti-c-Myb (ovčje)
117635	Anti-c-Myb (zajčje)
Sekundarno protitelo	Lastnost in barva
Osličje proti ovčjemu	Označeno s TxRed (555-rdeča)
Ovčje proti zajčjemu	Označeno s FITC (488-zelena)
Osličje proti mišjemu	Označeno s TxRed (555-rdeča)

#### 3.15.1 Priprava PBS

Za spiranje celic in pripravo ostalih reagentov smo si pripravili fosfatni pufer s pH 7,4. To smo storili tako, da smo v 800 mL destilirane vode raztopili 80 g NaCl, 2 g KCl, 36,3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*12H<sub>2</sub>O in 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Nato smo s HCl pH uravnali na 7,4 in z destilirano vodo dopolnili do 1 litra.

#### 3.15.2 Postopek imunocitokemičnega barvanja

Pred nacepitvijo pritrjenih celic HOS smo v ploščico s šestimi luknjicami pripravili krovna stekelca. Krovna stekelca smo v mikrobiološki komori očistili tako, da smo jih sprali v 100% etanolu, nato pa še v deionizirani vodi. Suha stekelca smo nato položili na dno luknjice. V ploščico smo nato nacepili približno 60 000 celic na luknjico. Celice smo zatem inkubirali 6-8 ur, da so se pritrdile na podlago in je bila konfluenta 50-70%.

Po nacepiti smo celicam odvzeli gojišče in jih sprali s PBS. Nato smo celice fiksirali z 10% formaldehidom. Po petnajstminutni inkubaciji smo formaldehid odstranili in vzorce sprali s PBS. Za tem smo za 10 minut dodali 0,25% raztopino Triton x100, to je detergent, ki povzroči permeabilnost membran, hkrati pa ne vpliva na proteinske interakcije ter spremembo epitopov. Za tem smo trikrat po 10 minut spirali s PBS. Nespecifična vezavna mesta smo blokirali z 10% BSA TPBS. Celice smo nato inkubirali s primarnimi protitelesi SRY (v razmerju 1:500) in cMyb (v razmerju 1:83) preko noči. Uporabili smo protitelo proti cMyb, ki je bilo izolirano iz ovce.

Naslednji dan smo vzorce petnajst minut spirali s PBS. Nato je sledila inkubacija s sekundarnimi protitelesi. Vzorce smo inkubirali s sekundarnim protitelesom označenim s TxRed (555), ki je bilo izolirano iz osla in usmerjeno proti ovčjim epitopom. Po enourni inkubaciji v temi smo vzorce zopet 15 minut spirali s PBS. Za to da smo lahko določili kje v celici se nahajajo obarvani proteini smo z barvilom DAPI obarvali celično jedro in jedrca. Celice smo 30 minut inkubirali 5% barvilom DAPI. Po barvanju jeder smo 15 minut spirali s PBS. Na koncu smo stekelca z iglo previdno odstranili iz luknjic. Da bi preprečili bledenje smo na objektno stekelce kanili kapljico preparata »antifade« oz. glicerola. Na to kapljico smo položili krovno stekelce s celicami, tako da so bile celice obrnjene navzdol. Ob straneh smo krovna stekelca zalepili, da bi preprečili premikanje, ki bi lahko povzročilo slabšo kakovost rezultatov.

### **3.16 Imunohistokemično barvanje kostnih vzorcev**

Za imunohistokemično barvanje smo uporabili vzorce treh pacientov, ženske z osteoporozo, moškega z osteoporozo in moškega z osteoartrozo. Za določanje smo uporabili *Mišji in zajčji specifični HRP/DAB (ABC) detekcijski komplet (Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection Kit*. Tehnika temelji na inkubaciji vzorca z nekonjugiranim primarnim protitelesom, ki je specifično za naš tarčni antigen. Biotinilirano sekundarno protitelo nato reagira s primarnim protitelesom. Sekundarno protitelo je označeno z encimom streptavidinom, ki ob dodatku substrata obarva določen del tkiva.

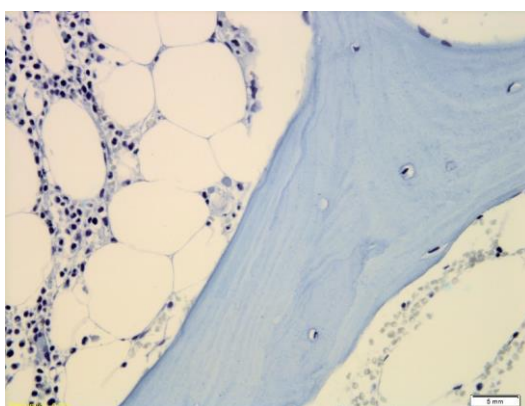
V formalinu fiksirane in v parafinu shranjene kostne vzorce smo najprej deparafinizirali in rehidrirali. Vzorce smo nato prekrili z vodikovim peroksidom za 10 minut. Z vodikovim peroksidom smo blokirali delovanje endogenih peroksidaz, kar v nadaljevanju pomeni manj motenj ozadja. Za tem smo vzorce spirali z TTBS pufrom 10 minut in dodali proteinski blok. Nato smo dodali primarno protitelo proti SRY. Vzorce z primarnim protitelesom smo inkubirali čez noč pri 4°C. Z inkubacijo čez noč smo omogočili vezavo tudi protitelesom z nižjo afiniteto. Naslednji dan smo vzorce spirali z TTBS 10 minut in jim nato dodali sekundarno protitelo na katero je bil vezan biotin. Po triminutni inkubaciji smo vzorce 10 minut spirali z TTBS. Za tem je sledila 10 minutna inkubacija s streptavidin peroksidazo, ki smo jo spet spirali 10 minut s TTBS. Kot substrat za peroksidazo smo uporabili DAB (3,3-diaminobenzidin), ki po encimsko katalizirani reakciji tvori rjavo

obarvanje na mestih kjer se je vezalo primarno protitelo. Ostanek substrata smo sprali s TTBS. Za barvanje jeder smo dodali hematoksilin-eozin, ki se veže v jedro in nam omogoča lokalizacijo obarvanih struktur v celici. Na koncu smo vzorce še enkrat sprali v etanolih naraščajočih koncentracij ter vzorce fiksirali s smolo DPX.

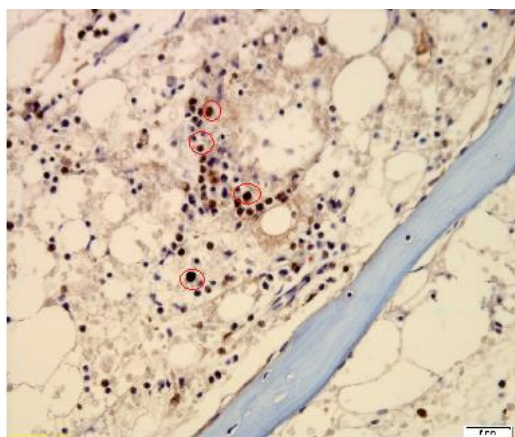
## 4. Rezultati in Razprava

### 4.1 Potrjevanje prisotnosti SRY v kostnih celicah z imunohistokemično analizo kostnih rezin

SRY se kot »moški gen« izraža v osteoblastih pri moških. Zaradi njegovega možnega vpliva na izražanje RANKL smo se odločili za ugotavljanje prisotnosti beljakovine SRY v kostnih celicah z imunohistokemično metodo. Ker se SRY izraža v osteoblastih, smo kot negativno kontrolo uporabili kost ženske z osteoporozo (Slika 7). Pri tem vzorcu po pričakovanjih ni prišlo do obarvanja. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili vzorec kostnega mozga, kjer se nahajajo tudi predhodniki osteoblastov, tu je SRY prisoten praktično povsod.



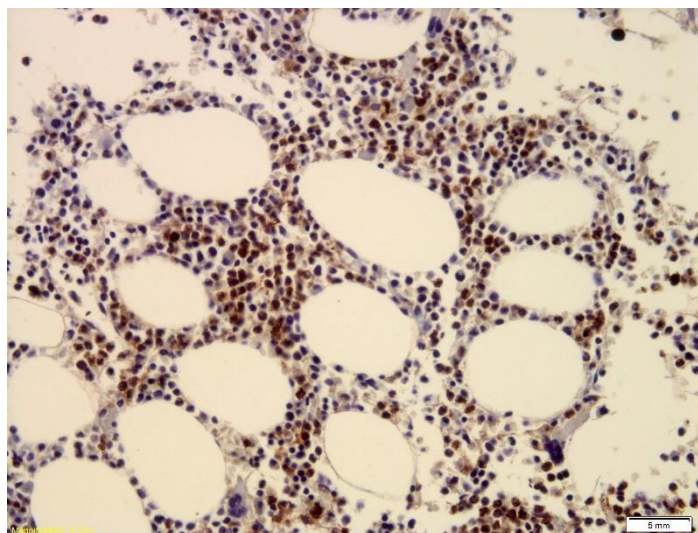
Slika 7: Negativna kontrola



Slika 8: Vzorec moškega pri 40x povečavi



Na sliki 8 vidimo imunohistokemično barvan vzorec kosti moškega z osteoporozo. Pri tem barvanju smo uporabili primarno protitelo proti SRY (protitelo 135239). Vidimo lahko, da kostne celice izražajo SRY. Na sliki je označenih nekaj izmed mnogih celic v katerih je prisoten SRY, ki se je pokazal kot rjavo obarvan. SRY je prisoten tako na površini kosti kot tudi v citoplazmi. Takšen rezultat smo pričakovan pri moških.



Slika 9: Vzorec kostnega mozga pri 40x povečavi

Na sliki 9 vidimo vzorec kostnega mozga moškega, ki smo ga imunohistokemično barvali za SRY s primarnim protitelesom 135239. Iz mezenhimskih matičnih celic v kostnem mozgu se razvijejo tudi predhodniki osteoblastov. Na tej sliki vidimo močno pozitiven rezultat, SRY je prisoten praktično v vseh celicah – močno rjavo obarvane so skoraj vse celice. S tem poskusom smo kot prvi s slikovno tehniko pokazali prisotnost SRY v kostnem tkivu. Takšen rezultat nakazuje na to, da je SRY neposredno vpleten v procese, ki vplivajo na presnovo kosti.

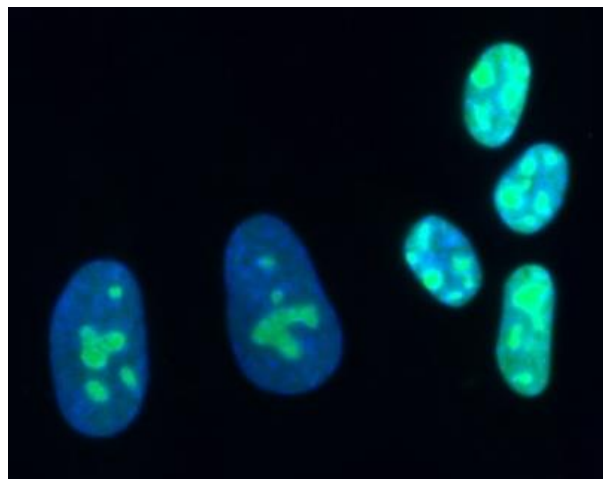
#### 4.2 Proučevanje vpliva SRY na razporeditev c-Myb

V magistrski nalogi z naslovom *Iskanje vezavnih mest za transkripcijske dejavnike, vpletene v izražanje gena RANKL v osteoblastnih celičnih kulturah* (14), je bilo nakazano, da obstaja možnost sodelovanja med SRY in c-Myb. Oba transkripcijska dejavnika imata možnost vezave na regulatorno regijo gena za beljakovino RANKL. Zato smo se odločili da bomo proučili na kakšen način lahko SRY vpliva na razporeditev c-Myb v celicah humanega osteosarkoma. Naš namen je bil pokazati kaj se zgodi, ko v celice izolirane iz ženske vstavimo gen, ki je značilen izključno za moško populacijo. V različne luknjice na

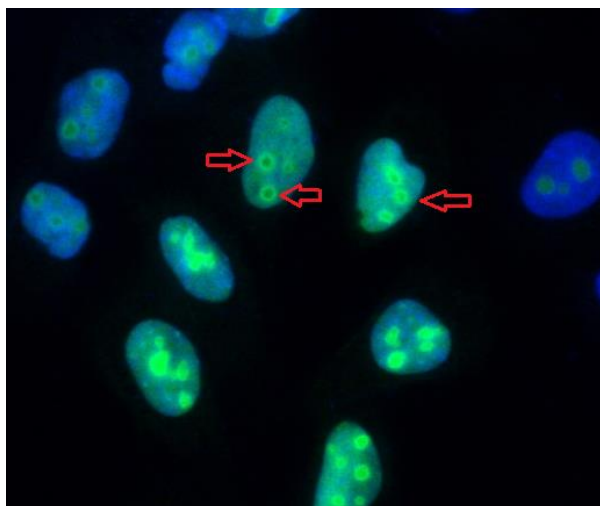
ploščici s šestimi luknjicami smo nacepili celično kulturo HOS. Nato smo celice v nekaterih luknjicah tretirali s plazmidom, ki je nosil zapis za beljakovino SRY, v drugih luknjicah pa smo pustili celice HOS netretirane. Vse pa smo nato označili s primarnim protitelesom specifičnim za c-Myb.

Na sliki 10 lahko vidimo, da je c-Myb lokaliziran v jedrcih. Tu smo celice označili s primarnim protitelesom proti c-Myb – 117635. V drugi luknjici pa smo celicam dodali plazmid z zapisom za SRY. Pri tem poskusu smo opazili spremembe v lokalizaciji c-Myb. Na sliki 11 lahko vidimo spremembo lokalizacije (označeno s puščico) c-Myb, ki potuje na rob jedrca ob prisotnosti transkripcijskega faktorja SRY. Za razliko od celic brez Sry kjer c-Myb v celoti izpolnjuje jedrce. Takšnih rezultatov v literaturi ne zasledimo nikjer. So pa izsledki vsekakor zanimivi, saj je bilo na nivoju gena že dokazano, da SRY in c-Myb zelo verjetno sodelujeta. Kot lahko zasledimo tudi v nekaterih člankih (12,13), je c-Myb pomemben pri uravnavanju celičnega cikla, vpliva pa tudi na uravnavanje matriks metaloproteinaz pri malignih tvorbah.

V diplomskem delu smo želeli prikazati tudi lokalizacijo proteina SRY v jedru, vendar žal ne obstaja protitelo, ki bi bilo specifično samo za SRY, saj so si beljakovine iz skupine SOX med sabo zelo podobne.



Slika 10: Netretirane celice HOS označene za c-Myb



Slika 11 : Celice HOS tretirane s pcDNA3/SRY in označene s primarnim protitelesom proti c-Myb

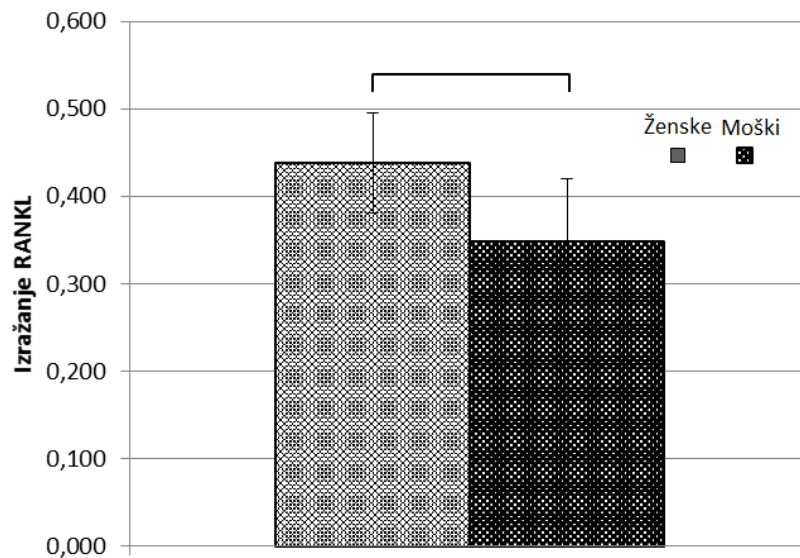
#### 4.3 Ugotavljanje razlik v izražanju RANKL med moškimi in ženskami

Osteoporozna je bolezen kosti, ki je pogostejša pri ženskah. Z znižanjem koncentracije proteina RANKL lahko omilimo posledice osteoporoze. Ker ženske nimajo transkripcijskega dejavnika SRY, in ker je bilo na nivoju gena že dokazano [14], da se ob prisotnosti transkripcijskega dejavnika iz družine SOX zniža izražanje RANKL. Nas je zanimalo tudi, ali morda obstaja statistično značilna razlika v izražanju RANKL med moškimi in ženskami. V ta namen smo uporabili serumske vzorce 112 preiskovancev, ki so imeli postavljeno diagnozo osteoartroze (42 preiskovancev) in z diagnozo osteoporoze (58 preiskovancev), 12 vzorcev je bilo kontrolnih. 75 preiskovancev je bilo moških, ostalih 37 pa so bile preiskovanke.

Preglednica X: Rezultati analize varianc izražanja RANKL pri moških in ženskah

		Spol	N	Std. Odklon		
lnRANKL	Moški		75	1,098		
	Ženske		34	2,761		
		<b>Test neodvisnih vzorcev</b>				
		<b>Varianca</b>		<b>t test enakosti varianc</b>		
		<b>F</b>	<b>Signifikanca</b>	<b>t</b>	<b>df</b>	<b>sig. (dvostranska)</b>
lnRANKL	Privzamemo enakost varianc	29,643	0,000	2,874	107	0,005
	Privzamemo neenakost varianc	/	/	2,164	37,817	0,037

V prvi tabeli je prikazana opisna statistika. V tem primeru se rezultati ne porazdeljujejo normalno, zato smo uporabili logaritmirane vrednosti koncentracije RANKL, ki se po logaritemski transformaciji porazdeljujejo normalno. V drugi tabeli smo s Kolmogorov-Smirnovim testom pri logaritmiranih rezultatih dokazali normalnost porazdelitve. Potem pa smo v naslednjem koraku s t-testom dobili  $p=0,037$ , kar je manj od 0,05. To pomeni, da lahko sprejmemo alternativno hipotezo, ki pravi da variance obeh skupin niso enake. S tem smo dokazali da obstaja statistično značilna razlika med moškimi in ženskami v izražanju RANKL. Kot lahko vidimo iz slike 11, je izražanje RANKL nižje pri moških. Ker SRY ni značilen za žensko populacijo, lahko iz rezultatov, glede na to da smo prisotnost SRY dokazali tudi v sami kostnini, posredno sklepamo na vpliv SRY na fiziologijo kosti pri ljudeh. V literaturi podobnih študij, ki v katerih bi raziskovalci proučevali RANKL pri obeh spolih nismo zasledili. Izražanje RANKL pri moški in ženski populaciji merili raziskovalci Finlay in sodelavci (26), ki so proučevali izražanje RANKL v serumu in kosteh moških in žensk, vendar pa niso dokazali višjih vrednosti pri ženskah v primerjavi z moškimi.



Slika 11: Razlika v izražanju RANKL med moškimi in ženskami

#### 4.4 Ugotavljanje vpliva Sry na izražanje RANKL v celicah HOS

Namen magistrske naloge je bil tudi dokazati, ali gen za moško beljakovino SRY povzroči znižanje izražanja RANKL v celicah HOS izoliranih iz ženske. Da bi to dokazali smo iz celic, v katere smo vnesli plazmid pcDNA3, ki je vseboval gen za SRY (pcDNA3/Sry) izolirali mRNA in s pomočjo RT-PCR merili izražanje gena za RANKL. Kot negativni kontroli smo uporabili celice, ki smo jih tretirali popolnoma enako kot proučevane, s to razliko, da smo v eno skupino vnesli samo plazmidni vektor pcDNA3, drugi skupini celic pa smo dodali samo transfekcijski reagent brez plazmidnega vektorja.

Tekom poskusa smo ugotovili, da je učinkovitost pomnoževanja našega proučevanega gena *TNFSF11* (RANKL) nižja kot pa je učinkovitost pomnoževanja hišnih genov. Možen vzrok za to bi lahko bilo slabše izražanje *TNFSF11* v celicah HOS. Zaradi slabe učinkovitosti pomnoževanja smo se odločili, da namesto absolutne kvantifikacije z umeritveno s standardi in umeritveno krivuljo, rezultate analiziramo z metodo relativne kvantifikacije –  $\Delta\Delta C_t$ .

Pri metodi relativne kvantifikacije imamo za vsak vzorec hišni (referenčni gen) in tarčni (proučevani gen). Podatke za določanje relativnega izražanja smo najprej uredili v tabeli (Preglednica 10). Izračunali smo povprečje triplikatov meritev za naš proučevani gen

*TNSFS11* (RANKL) in vse tri hišne gene. Potem smo podatke normalizirali, tako da smo od preučevanega gena odšteli hišne gene. V naslednjem koraku pa smo podatke normalizirali še glede na sam poskus. Sam poskus je bil zasnovan tako, da smo naredili dva kontrolna poskusa in enega ki smo ga preučevali. Tako smo od preučevanega poskusa odšteli še ob kontrolna poskusa. Dobili smo tri podatke iz katerih smo izračunali geometrično sredino. V zadnjem koraku pa smo naredili še relativno kvantifikacijo.

### Enačba 1:

$$\Delta C_{t\text{tarčni gen}} = C_{t\text{kontrolni}} - C_{t\text{tretirani}} \quad \text{in} \quad \Delta C_{t\text{referenčni gen}} = C_{t\text{kontrolni}} - C_{t\text{tretirani}}$$

### Enačba 2:

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_{t\text{referenčni gen}} - \Delta C_{t\text{tarčni gen}}$$

### Enačba 3:

$$\text{Razmerje} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

Preglednica XI: Rezultati poskusa 1

Poskus 1	RANKL	UBC	ACTB	RPLP0	RANKL-UBC	RANKL-ACTB	RANKL-RPLP0
SRY/pcDNA3	31,96	22,95	17,33	14,82	9,01	14,63	17,14
	32,19	23,01	17,84	14,71	9,18	14,34	17,47
	32,07	22,90	17,51	14,64	9,17	14,56	17,44
povprečje	32,07	22,95	17,56	14,72	9,12	14,51	17,35
pcDNA3	31,89	22,99	17,62	14,77	8,90	14,28	17,12
	32,22	23,05	17,61	14,93	9,17	14,61	17,29
povprečje	32,06	23,02	17,62	14,85	9,04	14,44	17,21
NIČ	32,09	23,28	17,57	15,12	8,81	14,52	16,97
	Poskus 1	RANKL-UBC	RANKL-ACTB	RANKL-RPLP0	geom.sr.	2 <sup>-geom.sr.</sup>	
	pcDNA3/SRY-pcDNA3	0,08	0,07	0,15	0,09	0,94	
	pcDNA3/SRY-NIČ	0,31	-0,01	0,38	-0,09	1,06	

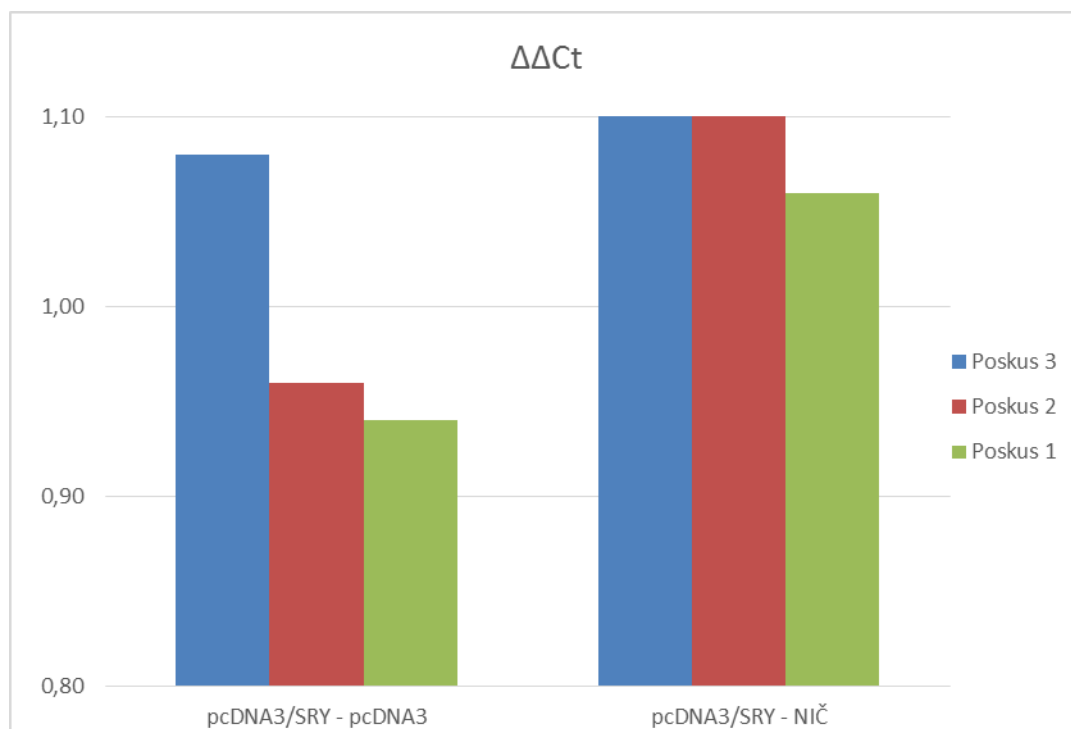
Preglednica XII: Rezultati poskusa 2

poskus 2	RANKL	RPLP0	ACTB	UBC	RANKL-RPLP0	RANKL-ACTB	RANKL-UBC
pcDNA3/SRY	32,29	16,01	18,26	23,31	16,28	14,02	8,98
	32,14	16,14	17,99	23,22	16,00	14,15	8,92
povprečje	32,21	16,08	18,13	23,26	16,14	14,09	8,95
pcDNA3	32,37	16,39	18,11	23,64	15,98	14,26	8,73
	32,92	16,42	18,41	23,65	16,50	14,51	9,28
	32,36	16,27	18,56	23,66	16,10	13,80	8,70
povprečje	32,55	16,36	18,36	23,65	16,19	14,19	8,90
NIČ	32,76	16,40	18,39	23,55	16,36	14,37	9,20
	32,90	16,12	18,13	23,57	16,79	14,77	9,33
	32,16	16,16	17,68	23,35	15,99	14,48	8,80
povprečje	32,60	16,22	18,06	23,49	16,38	14,54	9,11
	poskus 2	RANKL-RPLP0	RANKL-ACTB	RANKL-UBC	geom. sr.	2 <sup>geom. sr.</sup>	
	pcDNA3/SRY-pcDNA3	-0,05	-0,10	0,05	0,06	0,96	
	pcDNA3/SRY-NIČ	-0,24	-0,46	-0,16	-0,26	1,20	

V zgornjih preglednicah so zbrani rezultati meritev izražanja hišnih genov ter gena za RANKL v mRNA izolirani iz celic HOS. V treh različnih ponovitvah je bil v celice enkrat vstavljen pcDNA3/SRY, drugič samo pcDNA3, v tretji ponovitvi pa smo dodali samo transfekcijski reagent brez plazmida. Z metodo  $\Delta\Delta Ct$  smo nato analizirali vsak poskus in rezultate prikazali grafično. Ker je izražanje gena za RANKL pri celicah HOS slabo, nismo dobili statistično značilnih rezultatov. Tudi nikjer v literaturi ne najdemo podobnih rezultatov merjenja izražanja SRY v kostnih celicah. Tako žal ne moremo zaključiti ali prisotnost SRY, kot člana iz družine proteinov SOX, v kostnem tkivu znižuje nivo izražanja gena za protein RANKL.

Preglednica XIII:Rezultati poskusa 3

Poskus 3	RANKL	ACTB	UBC	RPLP0	RANKL-ACTB	RANKL-UBC	RANKL-RPLP0
pcDNA3/SRY	32,58	18,46	23,59	16,94	14,12	8,99	15,64
	33,20	18,97	23,80	17,07	14,23	9,40	16,13
	32,86	19,14	24,15	17,08	13,72	8,71	15,78
	33,08	19,59	24,71	17,71	13,49	8,37	15,37
povprečje	32,93	19,04	24,06	17,20	13,89	8,87	15,73
pcDNA3	32,86	18,89	24,46	16,96	13,98	8,41	15,90
	33,09	19,04	24,13	17,20	14,05	8,96	15,89
	33,83	19,51	24,88	17,92	14,32	8,95	15,91
povprečje	33,26	19,14	24,49	17,36	14,12	8,77	15,90
NIČ	32,89	19,23	24,11	17,24	13,66	8,78	15,65
	33,09	18,66	23,80	16,91	14,42	9,29	16,18
	33,45	19,10	24,39	17,39	14,35	9,06	16,06
	33,24	19,25	24,51	17,62	13,98	8,73	15,62
povprečje	33,17	19,06	24,20	17,29	14,11	8,96	15,88
	Poskus 3	RANKL-ACTB	RANKL-UBC	RANKL-RPLP0	geom.sr.	2 <sup>-geom.sr.</sup>	
	pcDNA3/SRY-pcDNA3	-0,35	-0,54	-0,01	-0,11	1,08	
	pcDNA3/SRY-NIČ	-0,38	-0,66	-0,16	-0,34	1,27	



Slika 12: Primerjava rezultatov relativne kvantifikacije



## 5. Zaključki

Namen magistrske naloge je bil ugotoviti, ali transkripcijski dejavnik SRY prisoten v osteoblastih ter ali vpliva na izražanje glavne regulatorne beljakovine za osteoklastogenezo in aktivacijo osteoklastov, RANKL in ali bi lahko bil odgovoren za razlike v izražanju RANKL oziroma za razlike v kostnih procesih med spoloma. Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo:

1. Protein SRY je prisoten v kostnem tkivu moških, pri ženskah pa po pričakovanjih njegove prisotnosti z imonohistokemično analizo kostnih rezin nismo uspeli dokazati. Prisoten je tudi v kostnem mozgu moškega, kjer se nahajajo predhodniki osteoblastov.
2. SRY spremeni lokacijo c-Myb, saj smo z metodo imunocitokemičnega barvanja pokazali, da je c-Myb, ki se je prvotno nahajal v jedrcih spremenil lokacijo in se premaknil nekoliko bolj na rob jedrca potem, ko smo v celice vnesli SRY. To potrjuje, da SRY in c-Myb delujeta skupaj.
3. Izražanje gena za RANKL se med moškimi in ženskami razlikuje, in sicer je statistično značilno nižje pri moških. Zaradi premajhnega izražanja SRY v celicah HOS nismo mogli pokazati, da je razlika v izražanju med spoloma odvisna od SRY.

V naši nalogi smo prvi dokazali prisotnost SRY v osteoblastih kostnega tkiva ter dokazali razlike v izražanju RANKL med spoloma. To so pomembni zaključki, ki bodo nedvomno pomagali osvetliti procese v kostnem tkivu tako v fiziološkem stanju kot pri boleznih in pri različnih zdravljenjih. V prihodnje pa bi bilo priporočljivo izvesti dodatne študije v vplivu ostalih proteinov iz skupine SOX na kostno biologijo.

## 6. Literatura

1. Xiong J, O'Brien A C: Osteocyte RANKL: New Insights Into the Control of Bone Remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research* 2012; 27(3): 499-505.
2. Mencej Bedrač S, Ostanek B, Mlakar V, Zupan J, Kocjan T, Preželj J, Marc J: Sodobni pogled na nastanek osteoporoze. *Farmacevtski vestnik*, 2012; 5-6: 269-278.
3. Bartl R, Frisch B: *Osteoporosis: Diagnosis, Prevention, Therapy, Second Edition*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009, 1-27.
4. Datta H K, Ng W F, Walker J A et al. : The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008. 61:577-587.
5. Lodish et al: *Molecular Cell Biology*, 5th edition, W. H. Freeman, New York, 2003: 447-490.
6. Boyer R F, *Temelji biokemije*, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 338-359.
7. Boyce BF, Xing L: Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*, 2007; 9(1).
8. O'Brien CA: Control of RANKL gene expression. *Bone*, 2010; 46: 911-919.
9. Wada T, Nakashima T et al: RANKL-RANK signaling in osteoklastogenesis and bone disease. *Trends in Molecular Medicine* 2006; 12(1): 17-25.
10. Walsh C M, Choi Y: Biology of the TRANCE axis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2003; 14:251-263.
11. Miyamoto T: Regulators of Osteoclast Differentiation and Cell-Cell Fusion. *The Keio Journal of Medicine* 2011; 60(4): 101-105.
12. Knopfova L, Beneš P et al: c-Myb regulates matrix metalloproteinases 1/9, and cathepsin D: implications for matrix- dependent breast cancer cell invasion and metastasis. *Molecular Cancer* 2012; 11:15.
13. Quintana A M, Zhou E Ye et al: Dramatic Repositioning of c-Myb to Different Promoters during the Cell Cycle Observed by Combining Cell Sorting with Chromatin Immunoprecipitation. *PLoS ONE* 2011; 6(2):1-12.
14. Ogrič M: Iskanje vezavnih mest za transkripcijske dejavnike vpletene v izražanje gena RANKL v osteoblastnih celičnih kulturah.

15. Werner M H, Huth J R et al: Molecular Basis of Human 46X,Y Sex Reversal Revealed from the Three-Dimensional Solution Structure of the Human SRY-DNA Complex. *Cell*1995; 81: 705-714.
16. Rocissana L J, Kawanabe N, Kajiya H, et al: Functional Role for Heat Shock Factors in the Transcriptional Regulation of Human RANK Ligand Gene Expression in Stromal/Osteoblast Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2003, 279(11): 10500-10507.
17. Krishnan V, Bryant H U et al: Regulation of bone mass by Wnt signaling. *The Journal of Clinical Investigation* 2006; 116: 1202-1209.
18. Protocols and applications guide, 1/10 Transfection, Promega
19. Mori K, Le Goff B et al: Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa B. *Journal of Pathology* 2007; 211: 555-562.
20. Mohseny A B, Machado I et al: Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. *Laboratory investigation* 2011; 91: 1195-1205.
21. Schroeder A, Mueller O et al: The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*2006; 7:3.
22. <http://www.biocompare.com/Product-Reviews/41110-High-Capacity-cDNA-Reverse-Transcription-Kit-From-Applied-Biosystems/>, html
23. Nielsen H: *RNA: Methods and protocols*, first edition, Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2011: 3-28.
24. Mao F, Leung W Y et al: Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR application. *BMC Biotechnology* 2007; 7:
25. Finlay D, Chehade M et al: Circulating RANKL is inversely related to RANKL mRNA levels in bone in osteoarthritic male. *Arthritis Research & Therapy* 2008, 10:R2.

## 7. Priloge

Poskusi PCR v realnem času

Poskus 1	Pozicija	Vzorec	Cp	povp.Cp	Poskus 1	Pozicija	Vzorec	Cp	povp.Cp
RANKL	C1	NIČ	31,89	32,09	UBC	C10	NIČ	23,18	23,28
RANKL	C2	NIČ	32,06		UBC	C11	NIČ	23,18	
RANKL	C3	NIČ	32,31		UBC	C12	NIČ	23,48	
RANKL	B1	pcDNA3	31,89	31,89	UBC	B10	pcDNA3	22,87	22,99
RANKL	B2	pcDNA3	31,80		UBC	B11	pcDNA3	22,95	
RANKL	B3	pcDNA3	31,99		UBC	B12	pcDNA3	23,15	
RANKL	E1	pcDNA3	32,09	32,22	UBC	E10	pcDNA3	22,97	23,05
RANKL	E2	pcDNA3	32,14		UBC	E11	pcDNA3	22,97	
RANKL	E3	pcDNA3	32,43		UBC	E12	pcDNA3	23,20	
RANKL	A1	pcDNA3/SRY	31,84	31,96	UBC	A10	pcDNA3/SRY	22,84	22,95
RANKL	A2	pcDNA3/SRY	32,09		UBC	A11	pcDNA3/SRY	22,98	
RANKL	A3	pcDNA3/SRY	31,95		UBC	A12	pcDNA3/SRY	23,03	
RANKL	D1	pcDNA3/SRY	32,12	32,19	UBC	D10	pcDNA3/SRY	23,02	23,01
RANKL	D2	pcDNA3/SRY	32,18		UBC	D11	pcDNA3/SRY	22,94	
RANKL	D3	pcDNA3/SRY	32,26		UBC	D12	pcDNA3/SRY	23,07	
RANKL	F1	pcDNA3/SRY	32,15	32,07	UBC	F10	pcDNA3/SRY	22,84	22,90
RANKL	F2	pcDNA3/SRY	31,97		UBC	F11	pcDNA3/SRY	22,89	
RANKL	F3	pcDNA3/SRY	32,10		UBC	F12	pcDNA3/SRY	22,98	

Poskus 1	Pozicija	Vzorec	Cp	povp.Cp	Poskus 1	Pozicija	Vzorec	Cp	povp.Cp
ACTB	C4	NIČ	17,51	17,57	RPLPO	C7	NIČ	14,99	15,12
ACTB	C5	NIČ	17,21		RPLPO	C8	NIČ	15,04	
ACTB	C6	NIČ	17,63		RPLPO	C9	NIČ	15,33	
ACTB	B4	pcDNA3	17,48	17,62	RPLPO	B7	pcDNA3	14,66	14,77
ACTB	B5	pcDNA3	17,57		RPLPO	B8	pcDNA3	14,69	
ACTB	B6	pcDNA3	17,80		RPLPO	B9	pcDNA3	14,96	
ACTB	E4	pcDNA3	17,59	17,61	RPLPO	E7	pcDNA3	14,98	14,93
ACTB	E5	pcDNA3	17,53		RPLPO	E8	pcDNA3	14,81	
ACTB	E6	pcDNA3	17,72		RPLPO	E9	pcDNA3	15,01	
ACTB	A4	pcDNA3/SRY	17,18	17,33	RPLPO	A7	pcDNA3/SRY	14,73	14,82
ACTB	A5	pcDNA3/SRY	17,24		RPLPO	A8	pcDNA3/SRY	14,73	
ACTB	A6	pcDNA3/SRY	17,57		RPLPO	A9	pcDNA3/SRY	14,99	
ACTB	D4	pcDNA3/SRY	17,74	17,84	RPLPO	D7	pcDNA3/SRY	14,64	14,71
ACTB	D5	pcDNA3/SRY	17,84		RPLPO	D8	pcDNA3/SRY	14,61	
ACTB	D6	pcDNA3/SRY	17,95		RPLPO	D9	pcDNA3/SRY	14,89	
ACTB	F4	pcDNA3/SRY	17,49	17,51	RPLPO	F7	pcDNA3/SRY	14,58	14,64
ACTB	F5	pcDNA3/SRY	17,44		RPLPO	F8	pcDNA3/SRY	14,60	
ACTB	F6	pcDNA3/SRY	17,61		RPLPO	F9	pcDNA3/SRY	14,73	

Poskus 2	Pozicija	Vzorec	Cp	povp.Cp	Poskus 2	Pozicija	Vzorec	Cp	povp.Cp
RANKL	A1	NIČ	32,12	32,16	RPLP0	A4	NIČ	16,09	16,16
RANKL	A2	NIČ	31,93		RPLP0	A5	NIČ	16,14	
RANKL	A3	NIČ	32,19		RPLP0	A6	NIČ	16,26	
RANKL	F1	NIČ	32,78	32,76	RPLP0	F4	NIČ	16,12	16,40
RANKL	F2	NIČ	33,2		RPLP0	F5	NIČ	16,31	
RANKL	F3	NIČ	32,73		RPLP0	F6	NIČ	16,48	
RANKL	H1	NIČ	32,81	32,90	RPLP0	H4	NIČ	16,16	16,12
RANKL	H2	NIČ	32,24		RPLP0	H5	NIČ	16,07	
RANKL	H3	NIČ	32,95		RPLP0	H6	NIČ	16,55	
RANKL	E1	pcDNA3	32,29	32,92	RPLP0	E4	pcDNA3	16,37	16,42
RANKL	E2	pcDNA3	32,94		RPLP0	E5	pcDNA3	16,4	
RANKL	E3	pcDNA3	32,9		RPLP0	E6	pcDNA3	16,49	
RANKL	G1	pcDNA3	32,42	32,36	RPLP0	G4	pcDNA3	16,3	16,27
RANKL	G2	pcDNA3	32,3		RPLP0	G5	pcDNA3	16,23	
RANKL	G3	pcDNA3	32,99		RPLP0	G6	pcDNA3	16,49	
RANKL	C1	pcDNA3	32,61	32,37	RPLP0	C4	pcDNA3	16,39	16,39
RANKL	C2	pcDNA3	32,33		RPLP0	C5	pcDNA3	16,38	
RANKL	C3	pcDNA3	32,4		RPLP0	C6	pcDNA3	16,64	
RANKL	D1	pcDNA3/SRY	31,98	32,14	RPLP0	D4	pcDNA3/SRY	16,01	16,14
RANKL	D2	pcDNA3/SRY	32,3		RPLP0	D5	pcDNA3/SRY	16,12	
RANKL	D3	pcDNA3/SRY	32,91		RPLP0	D6	pcDNA3/SRY	16,16	
RANKL	B1	pcDNA3/SRY	31,92	32,29	RPLP0	B4	pcDNA3/SRY	16	16,01
RANKL	B2	pcDNA3/SRY	32,21		RPLP0	B5	pcDNA3/SRY	16,02	
RANKL	B3	pcDNA3/SRY	32,36		RPLP0	B6	pcDNA3/SRY	16,22	

Poskus 2	Pozicija	Vzorec	Cp	povp.Cp	Poskus 2	Pozicija	Vzorec	Cp	povp.Cp
ACTB	A10	NIČ	17,66	17,68	UBC	A7	NIČ	23,28	23,35
ACTB	A11	NIČ	17,69		UBC	A8	NIČ	23,36	
ACTB	A12	NIČ	17,95		UBC	A9	NIČ	23,42	
ACTB	F10	NIČ	18,65	18,39	UBC	F7	NIČ	23,48	23,55
ACTB	F11	NIČ	18,36		UBC	F8	NIČ	23,57	
ACTB	F12	NIČ	18,41		UBC	F9	NIČ	23,6	
ACTB	H10	NIČ	18,08	18,13	UBC	H7	NIČ	23,56	23,57
ACTB	H11	NIČ	18,18		UBC	H8	NIČ	23,5	
ACTB	H12	NIČ	18,32		UBC	H9	NIČ	23,66	
ACTB	E10	pcDNA3	18,4	18,41	UBC	E7	pcDNA3	23,68	23,65
ACTB	E11	pcDNA3	18,35		UBC	E8	pcDNA3	23,61	
ACTB	E12	pcDNA3	18,49		UBC	E9	pcDNA3	23,89	
ACTB	G10	pcDNA3	18,51	18,56	UBC	G7	pcDNA3	23,59	23,66
ACTB	G11	pcDNA3	18,36		UBC	G8	pcDNA3	23,62	
ACTB	G12	pcDNA3	18,61		UBC	G9	pcDNA3	23,76	
ACTB	C10	pcDNA3	18,11	18,11	UBC	C7	pcDNA3	23,62	23,64
ACTB	C11	pcDNA3	18		UBC	C8	pcDNA3	23,57	
ACTB	C12	pcDNA3	18,22		UBC	C9	pcDNA3	23,73	
ACTB	D10	pcDNA3/SRY	17,85	17,99	UBC	D7	pcDNA3/SRY	23,2	23,22
ACTB	D11	pcDNA3/SRY	17,97		UBC	D8	pcDNA3/SRY	23,24	
ACTB	D12	pcDNA3/SRY	18,01		UBC	D9	pcDNA3/SRY	23,49	
ACTB	B10	pcDNA3/SRY	18,16	18,26	UBC	B7	pcDNA3/SRY	23,28	23,31
ACTB	B11	pcDNA3/SRY	18,15		UBC	B8	pcDNA3/SRY	23,33	
ACTB	B12	pcDNA3/SRY	18,48		UBC	B9	pcDNA3/SRY	23,54	

Poskus 3	Pozicija	Vzorec	Cp	povp.Cp	Poskus 3	Pozicija	Vzorec	Cp	povp.Cp
RANKL	B1	NIČ	32,78	32,89	ACTB	B10	NIČ	18,63	19,23
RANKL	B2	NIČ	32,61		ACTB	B11	NIČ	19,93	
RANKL	B3	NIČ	33,28		ACTB	B12	NIČ	19,12	
RANKL	E1	NIČ	32,79	33,09	ACTB	E10	NIČ	18,49	18,66
RANKL	E2	NIČ	32,93		ACTB	E11	NIČ	18,68	
RANKL	E3	NIČ	33,54		ACTB	E12	NIČ	18,82	
RANKL	H1	NIČ	33,3	33,45	ACTB	H10	NIČ	18,99	19,10
RANKL	H2	NIČ	33,86		ACTB	H11	NIČ	19,04	
RANKL	H3	NIČ	33,19		ACTB	H12	NIČ	19,26	
RANKL	K1	NIČ	32,81	33,24	ACTB	K10	NIČ	19,07	19,25
RANKL	K2	NIČ	33,16		ACTB	K11	NIČ	19,17	
RANKL	K3	NIČ	33,74		ACTB	K12	NIČ	19,52	
RANKL	D1	pcDNA3	32,61	32,86	ACTB	D10	pcDNA3	18,71	18,89
RANKL	D2	pcDNA3	32,92		ACTB	D11	pcDNA3	18,87	
RANKL	D3	pcDNA3	33,06		ACTB	D12	pcDNA3	19,08	
RANKL	G1	pcDNA3	32,95	33,09	ACTB	G10	pcDNA3	18,83	19,04
RANKL	G2	pcDNA3	33,37		ACTB	G11	pcDNA3	19,02	
RANKL	G3	pcDNA3	32,95		ACTB	G12	pcDNA3	19,26	
RANKL	J1	pcDNA3	33,3	33,83	ACTB	J10	pcDNA3	19,31	19,51
RANKL	J2	pcDNA3	33,21		ACTB	J11	pcDNA3	19,48	
RANKL	J3	pcDNA3	34,98		ACTB	J12	pcDNA3	19,73	
RANKL	A1	pcDNA3/SRY	32,36	32,58	ACTB	A10	pcDNA3/SRY	18,19	18,46
RANKL	A2	pcDNA3/SRY	32,62		ACTB	A11	pcDNA3/SRY	18,52	
RANKL	A3	pcDNA3/SRY	32,75		ACTB	A12	pcDNA3/SRY	18,67	
RANKL	C1	pcDNA3/SRY	32,7	33,20	ACTB	C10	pcDNA3/SRY	18,78	18,97
RANKL	C2	pcDNA3/SRY	33,57		ACTB	C11	pcDNA3/SRY	18,99	
RANKL	C3	pcDNA3/SRY	33,33		ACTB	C12	pcDNA3/SRY	19,14	
RANKL	F1	pcDNA3/SRY	32,51	32,86	ACTB	F10	pcDNA3/SRY	19,06	19,14
RANKL	F2	pcDNA3/SRY	33,16		ACTB	F11	pcDNA3/SRY	19,11	
RANKL	F3	pcDNA3/SRY	32,91		ACTB	F12	pcDNA3/SRY	19,26	
RANKL	I1	pcDNA3/SRY	33,26	33,08	ACTB	I10	pcDNA3/SRY	19,31	19,59
RANKL	I2	pcDNA3/SRY	33,01		ACTB	I11	pcDNA3/SRY	19,67	
RANKL	I3	pcDNA3/SRY	32,97		ACTB	I12	pcDNA3/SRY	19,78	



Poskus 3	Pozicija	Vzorec	Cp	povp.Cp	Poskus 3	Pozicija	Vzorec	Cp	povp.Cp
UBC	B7	NIČ	23,95	24,11	RPLPO	B4	NIČ	16,86	17,24
UBC	B8	NIČ	24,11		RPLPO	B5	NIČ	18,04	
UBC	B9	NIČ	24,28		RPLPO	B6	NIČ	16,82	
UBC	E7	NIČ	23,71	23,80	RPLPO	E4	NIČ	16,72	16,91
UBC	E8	NIČ	23,75		RPLPO	E5	NIČ	16,91	
UBC	E9	NIČ	23,93		RPLPO	E6	NIČ	17,09	
UBC	H7	NIČ	24,24	24,39	RPLPO	H4	NIČ	17,2	17,39
UBC	H8	NIČ	24,34		RPLPO	H5	NIČ	17,34	
UBC	H9	NIČ	24,58		RPLPO	H6	NIČ	17,62	
UBC	K7	NIČ	24,32	24,51	RPLPO	K4	NIČ	17,45	17,62
UBC	K8	NIČ	24,52		RPLPO	K5	NIČ	17,57	
UBC	K9	NIČ	24,69		RPLPO	K6	NIČ	17,84	
UBC	D7	pcDNA3	24,11	24,46	RPLPO	D4	pcDNA3	16,79	16,96
UBC	D8	pcDNA3	24,56		RPLPO	D5	pcDNA3	16,96	
UBC	D9	pcDNA3	24,7		RPLPO	D6	pcDNA3	17,13	
UBC	G7	pcDNA3	23,92	24,13	RPLPO	G4	pcDNA3	16,99	17,20
UBC	G8	pcDNA3	24,15		RPLPO	G5	pcDNA3	17,09	
UBC	G9	pcDNA3	24,33		RPLPO	G6	pcDNA3	17,51	
UBC	J7	pcDNA3	24,72	24,88	RPLPO	J4	pcDNA3	17,81	17,92
UBC	J8	pcDNA3	24,83		RPLPO	J5	pcDNA3	17,84	
UBC	J9	pcDNA3	25,09		RPLPO	J6	pcDNA3	18,11	
UBC	A7	pcDNA3/SRY	23,47	23,59	RPLPO	A4	pcDNA3/SRY	16,74	16,94
UBC	A8	pcDNA3/SRY	23,6		RPLPO	A5	pcDNA3/SRY	16,92	
UBC	A9	pcDNA3/SRY	23,7		RPLPO	A6	pcDNA3/SRY	17,15	
UBC	C7	pcDNA3/SRY	23,65	23,80	RPLPO	C4	pcDNA3/SRY	16,93	17,07
UBC	C8	pcDNA3/SRY	23,88		RPLPO	C5	pcDNA3/SRY	17,09	
UBC	C9	pcDNA3/SRY	23,87		RPLPO	C6	pcDNA3/SRY	17,19	
UBC	F7	pcDNA3/SRY	23,98	24,15	RPLPO	F4	pcDNA3/SRY	16,8	17,08
UBC	F8	pcDNA3/SRY	24,15		RPLPO	F5	pcDNA3/SRY	17,22	
UBC	F9	pcDNA3/SRY	24,33		RPLPO	F6	pcDNA3/SRY	17,22	
UBC	I7	pcDNA3/SRY	24,6	24,71	RPLPO	I4	pcDNA3/SRY	17,63	17,71
UBC	I8	pcDNA3/SRY	24,72		RPLPO	I5	pcDNA3/SRY	17,69	
UBC	I9	pcDNA3/SRY	24,81		RPLPO	I6	pcDNA3/SRY	17,82	

	SRY		RPLP0		RANKL	
	povp.konc.	povp.Cp	povp.konc.	povp.Cp	povp.konc.	povp.Cp
1	1,37	30,77	0,14	23,15	0,01	31,36
7	3,69	29,19	6,55	19,94	0,00	33,11
8	2,32	29,93	0,07	23,72	0,02	30,83
25	0,70	31,85	0,14	23,12	0,00	32,54
26	3,39	29,34	0,04	24,25	0,00	34,73
30	2,06	30,11	0,14	23,12	0,00	35,00
33	0,96	31,35	0,05	23,97	0,00	34,80
35	1,16	31,03	1,38	21,22	0,04	30,27
37	0,40	32,80	0,11	23,32	0,00	32,27
38	2,40	29,87	0,20	22,83	0,03	30,48
39	1,82	30,31	0,21	22,77	0,00	32,09
40	4,37	28,92	0,80	21,67	0,00	33,38
117	1,58	30,54	3,95	20,37	0,80	27,75
136	0,67	31,94	26,50	18,78	9,63	25,72
145	0,46	32,51	3,14	20,54	8,60	25,81
154	0,12	34,75	0,94	21,54	1,49	27,24
188	0,20	33,89	2,29	20,80	0,67	27,90
302	9,65	27,64	0,33	22,41	0,06	29,86
311	12,23	27,26	0,32	22,42	0,04	30,19
315	10,82	27,46	0,39	22,30	0,12	29,32
318	31,03	25,76	0,22	22,75	0,01	31,39
324	6,29	28,33	1,04	21,47	0,06	29,89
325	14,63	26,97	0,98	21,52	0,04	30,12
336	11,50	27,36	2,05	20,92	0,00	33,38
339	3,40	29,31	2,51	20,73	0,00	31,80