

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA KACIN

**VPLIV HIPOKSIJE IN ESTROGENOV NA
IZRAŽANJE GENOV, VPLETENIH V
EPIGENETSKE MEHANIZME, V HUMANIH
OSTEOSARKOMSKIH CELICAH**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA KACIN

**VPLIV HIPOKSIJE IN ESTROGENOV NA
IZRAŽANJE GENOV, VPLETENIH V
EPIGENETSKE MEHANIZME, V HUMANIH
OSTEOSARKOMSKIH CELICAH**

**THE INFLUENCE OF HYPOXIA AND ESTROGENS
ON EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN
EPIGENETIC MECHANISMS IN HUMAN
OSTEOSARCOMA CELLS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, spec. med. biokem.

Zahvala

V eksperimentalni del te magistrske naloge je bilo vpletenih veliko ljudi, predvsem s Katedre za klinično biokemijo, ki so me vpeljali v način dela v laboratoriju, pomagali pri upravljanju vse laboratorijske opreme, ki sem jo pri delu potrebovala, in ki jim nikoli ni bilo odveč deliti praktičnih nasvetov in razlag za lažje opravljanje eksperimentov. Prav vsem se zahvaljujem za prijetno vzdušje, zaradi katerega mi ni bilo nikoli težko preživeti kakšnega daljšega dneva na Fakulteti. Od vseh bi se še posebej rada zahvalila asist. dr. Vidu Mlakarju, ki me je sprejel povsem na začetku eksperimentalnega dela, ter dr. Petru Vrtačniku, čigar budno oko me je spremljalo prav do zaključka vseh planiranih poskusov. Čeprav Peter zaradi več ovir ni naveden kot somentor te magistrske naloge, pa si boljšega somentorja v praksi ne bi mogla želeli. Hvala za vse usmeritve, strokovne nasvete, prijazne spodbude, potrpežljivost in vso dobro voljo, ki si jo kljub kakšnim težavam vedno imel na pretek. Zahvaljujem se doc. dr. Barbari Ostanek, ki si je prijazno vzela čas za pregled magistrske naloge. Iskrena hvala tudi mentorici prof. dr. Janji Marc, spec. med. biokem., ki me je usmerjala med laboratorijskim delom in pri pisanju magistrske naloge. Hvala za odlične napotke v začetku pisanja naloge, vmesne preglede in konstruktivne predloge, ki so pripomogli, da je magistrska naloga takšna, kot je. Naj se na koncu zahvalim še mojim domačim in Jerneju, ki ste me spodbujali tekom študija in pri izdelavi magistrske naloge, mi vedno stali ob strani ter mi znali pozornost preusmeriti na lepe stvari. Iskrena hvala vsem.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, spec. med. biokem.

Vsebina

Vsebina	I
Kazalo slik	II
Kazalo preglednic	III
Povzetek	IV
Seznam okrajšav	VI
1. Uvod	1
1.1. Epigenetika	1
1.1.1. Epigenetski mehanizmi.....	1
1.1.2. Udeleženosť epigenetskih mehanizmov v kostni biologiji	5
1.2. Estrogensko signaliziranje	6
1.2.1. Estrogensko signaliziranje v kosteh	6
1.3. Hipoksija	8
1.3.1. Zaznavanje parcialnega tlaka kisika v celici	9
1.3.2. Hipoksija v kostnem tkivu	10
2. Namen dela	11
3. Materiali in metode.....	12
3.1. Delo s celičnimi kulturami.....	17
3.1.1. Gojenje in presajanje celic.....	17
3.1.2. Transfekcija celic.....	18
3.1.3. Tretiranje celic z mimetiki hipoksije in estrogenom	19
3.1.4. Določanje viabilnosti celic	20
3.2. Analiza izražanja genov	21
3.2.1. Priprava celičnih kultur	21
3.2.2. Izolacija in vrednotenje kakovosti RNA	22
3.2.3. Prepis RNA v cDNA	23
3.2.4. Merjenje izražanja genov.....	25
3.3. Analiza proteinov.....	28
3.3.1. Izolacija proteinov	28
3.3.2. Določanje koncentracije proteinov	29
3.3.3. Analiza proteinov s prenosom po Westernu.....	30
3.4. Statistična analiza	33
4. Rezultati in razprava.....	34
4.1. Vpliv na viabilnost celic	35

4.1.1.	17 β -estradiol	35
4.1.2.	CoCl ₂ in DFO	35
4.1.3.	Hipoksija v kombinaciji s 17 β -estradiolom.....	36
4.2.	Ocena uspešnosti transfekcije HOS celic s plazmidom z ER- α	38
4.3.	Vpliv na izražanje <i>HIF1A</i> in <i>VEGFA</i>	40
4.4.	Vpliv na izražanje genov, vpletenih v epigenetske mehanizme	43
4.4.1.	17 β -estradiol	43
4.4.2.	DFO	44
4.4.3.	DFO in 17 β -estradiol.....	47
4.5.	Vpliv na sistem RANK/RANKL/OPG	49
4.6.	Vpliv na signalno pot Wnt/ β -katenin.....	52
5.	Sklep	55
6.	Literatura	57

Kazalo slik

Slika 1: Metilacija citozina z encimom DNA metiltransferaza (DNMT) do 5-metilcitozina.	2
Slika 2: Acetilacija in deacetilacija histonov.....	4
Slika 3: Vpletenost estrogenov v sistem RANK/RANKL/OPG.	8
Slika 4: Zaznavanje parcialnega tlaka kisika v celici.	9
Slika 5: Viabilnost celic, tretiranih z E ₂	35
Slika 6: Vpliv različnih koncentracij CoCl ₂ in DFO na viabilnost celic.	36
Slika 7: Vpliv DFO v kombinaciji z E ₂ na viabilnost celic – 24 ur.....	37
Slika 8: Vpliv DFO v kombinaciji z E ₂ na viabilnost celic – 72 ur.....	37
Slika 9: Izražanje <i>ER-α</i> v kontrolni in tretiranih skupinah.....	39
Slika 10: <i>ER-α</i> : Prenos po Westernu, 2. biološka ponovitev, 24 ur tretiranja.....	40
Slika 11: <i>ER-α</i> : Prenos po Westernu, 2. biološka ponovitev, 72 ur tretiranja.....	40
Slika 12: Izražanje <i>HIF1A</i> in <i>VEGFA</i> v kontrolni in tretiranih skupinah – 24 ur.	42
Slika 13: Izražanje <i>HIF1A</i> in <i>VEGFA</i> v kontrolni in tretiranih skupinah – 72 ur.	42
Slika 14: Vpliv E ₂ na izražanje genov, vpletenih v epigenetske mehanizme – 24 ur.	43
Slika 15: Vpliv E ₂ na izražanje genov, vpletenih v epigenetske mehanizme – 72 ur.	44
Slika 16: Vpliv DFO na izražanje genov, ki sodelujejo pri acetilaciji in deacetilaciji histonov – 24 ur.	45
Slika 17: Vpliv DFO na izražanje genov, ki sodelujejo pri acetilaciji in deacetilaciji histonov – 72 ur.	45
Slika 18: Vpliv DFO na izražanje genov, ki sodelujejo pri metilaciji DNA ali se vežejo na metilirano DNA.	46

Slika 19: Vpliv DFO v kombinaciji z E ₂ na izražanje genov, ki sodelujejo pri acetilaciji in deacetilaciji histonov – 24 ur.....	48
Slika 20: Vpliv DFO v kombinaciji z E ₂ na izražanje genov, ki sodelujejo pri acetilaciji in deacetilaciji histonov – 72 ur.....	48
Slika 21: Vpliv DFO v kombinaciji z E ₂ na izražanje genov, ki sodelujejo pri metilaciji DNA ali se vežejo na metilirano DNA.....	49
Slika 22: Vpliv E ₂ na izražanje genov, vpletenih sistem RANK/RANKL/OPG in signalno pot Wnt/ β -katenin.....	50
Slika 23: Vpliv DFO na signalno pot RANK/RANKL/OPG.....	51
Slika 24: Vpliv DFO v kombinaciji z E ₂ na signalno pot RANK/RANKL/OPG.....	52
Slika 25: Vpliv DFO na signalno pot Wnt/ β -katenin.....	53
Slika 26: Vpliv DFO v kombinaciji z E ₂ na signalno pot Wnt/ β -katenin.....	54

Kazalo preglednic

Preglednica I: Plazmid pCMV-ESR1.....	18
Preglednica II: Priprava celičnih kultur za eksperiment.....	21
Preglednica III: Plazmid pcDNA3.....	22
Preglednica IV: Tretiranje celičnih kultur.....	22
Preglednica V: Reakcijska zmes za prepis RNA v cDNA.....	24
Preglednica VI: Pogoji reakcije prepisa RNA v cDNA.....	24
Preglednica VII: Program reakcije qPCR.....	26
Preglednica VIII: Podatki o oligonukleotidnih začetnikih I.....	26
Preglednica IX: Izbrani pogoji za analizo izražanja s qPCR.....	28
Preglednica X: Koncentracije raztopin proteinov.....	31
Preglednica XI: Raztopine protiteles.....	32
Preglednica XII: Normalizirana koncentracija ER- α v kontrolnih celicah in celicah, tretiranih z E ₂	39
Preglednica XIII: Primerjava rezultatov proučevanja OPG in RANKL pod vplivom E ₂ med našo raziskavo in še dvema raziskavama (49, 50) Rezultati v preglednici so izraženi kot relativne vrednosti glede na kontrolo.....	50

Povzetek

Kostno tkivo je kljub svoji kompaktnosti metabolno zelo aktivno ter se tekom življenjskega obdobja razvija, obnavlja in se prav tako kot druga tkiva odziva na spremembe v svojem mikro okolju. Za izgradnjo kosti so primarno odgovorne osteoblastne celice. Njihova dejavnost je močno odvisna tudi od njihovega epigenoma, ki nadzoruje, v kakšni meri in kdaj se bo določen gen izražal. Epigenom je v primerjavi z genomom manj stabilen in se pod vplivom različnih dejavnikov, ki jim je celica izpostavljena, spreminja. Spremembe v metilaciji DNA, posttranslacijske spremembe histonov ter nekodirajoče RNA vplivajo na proces transkripcije in translacije genov ter s tem usmerjajo aktivnost, v našem primeru osteoblastnih celic.

Namen našega dela je bil proučiti vpliv dveh pomembnih dejavnikov v kostni presnovi: estrogenov in hipoksije na epigenetske mehanizme v osteoblastnih celicah. Ovrednotili smo vpliv vsakega posebej in kombinacijo obeh. Učinke na epigenetske mehanizme smo proučevali v celični liniji HOS, v katero smo vnesli gen za estrogenski receptor α in jo tretirali s 17β -estradiolom, deferoksaminom, ki v celici vzpostavi stanje podobno hipoksiji, ter s kombinacijo obeh. Spremljali smo izražanje 10 genov, ki se vključujejo v epigenetske mehanizme (*KAT5*, *HAT1*, *MYST1*, *HDAC6*, *HDAC7*, *HDAC9*, *SIRT1*, *SIRT6*, *DNMT3A* in *MBD1*). Pod vplivom samega 17β -estradiola nismo uspeli zaznati sprememb v izražanju proučevanih genov. Dokazali pa smo vpliv hipoksije na epigenetske mehanizme, in sicer na podlagi zvišanega izražanja *KAT5*, *MYST1*, *HDAC9*, *MBD1* ter znižanega izražanja *HAT1*, *HDAC6*, *SIRT6*, *DNMT3A*. Proučili smo tudi sočasen vpliv 17β -estradiola in deferoksamina. Opazeni učinki so sovpadali z učinki, ki smo jih opazili pri uporabi samega deferoksamina. Dodatno smo v celičnem modelu spremljali vpliv na sistem RANK/RANKL/OPG (gena *OPG* in *RANKL*) in signalno pot Wnt/ β -katenin (*AXIN2*). Dokazali smo, da 17β -estradiol vpliva na izražanje mRNA za RANKL, druge spremembe pa niso bile signifikantne. V stanju hipoksije smo opazili znižano izražanje genov *RANKL*, *OPG* in *AXIN2*.

V eksperimentih smo dokazali vpliv hipoksije, ni pa nam uspelo dokazati vpliva estrogenov na proučevane epigenetske mehanizme, zato lahko zaključimo, da lahko hipoksija v kostnem tkivu preko epigenetskih mehanizmov pomembno vpliva na aktivnost osteoblastnih celic.

Ključne besede:

epigenetski mehanizmi, hipoksija, estrogen, celice HOS

Abstract

Even though the bone tissue seems to be static, it is in fact metabolically very active and it is constantly developing, remodelling, and responding to stimuli in its microenvironment. The cells responsible for synthesizing the bone matrix are called osteoblasts. Their activity depends on many factors, one of them being their epigenome. The epigenome controls when and to what extent genes are expressed. In comparison to the genome, the epigenome is less stable and is impacted by environmental factors. Changes in DNA methylation, histone modifications, and non-coding RNAs affect the transcription and translation process which is reflected in the altered activity of osteoblasts.

The aim of our experiment was to study two factors that could have impact on epigenetic mechanisms in osteoblasts: estrogen and hypoxia. The effects were studied in HOS cell line model transfected with estrogen receptor α . HOS cell line was exposed to 17β -estradiol, deferoxamine and combination of both. After exposure, we monitored the expression of 10 genes that are involved in epigenetic mechanisms: *KAT5*, *HAT1*, *MYST1*, *HDAC6*, *HDAC7*, *HDAC9*, *SIRT1*, *SIRT6*, *DNMT3A* and *MBD1*. No changes in gene expression were observed when the cells were treated with 17β -estradiol alone. However, when exposed to hypoxic conditions, we observed increase in expression of *KAT5*, *MYST1*, *HDAC9*, *MBD1* and decrease in expression of *HAT1*, *HDAC6*, *SIRT6*, *DNMT3A*. When the cells were exposed to both 17β -estradiol and deferoxamine, effects similar to effects of deferoxamine alone were detected. We have also observed the effects of treatment on Wnt/ β -catenin and RANK/RANKL/OPG signalling pathways. 17β -estradiol decreased the expression of *RANKL* whereas deferoxamine decreased the expression of *RANKL*, *OPG* and *AXIN2*.

No influence of estrogens on epigenetic mechanisms was observed in this experiment. However, hypoxia could significantly alter the activity of osteoblasts through epigenetic mechanisms.

Keywords:

epigenetic mechanisms, hypoxia, estrogen, HOS cell line

Seznam okrajšav

AOX1	aldehidna oksidaza 1
ATP	adenozintrifosfat
BSA	goveji serumski albumin
cDNA	komplementarna DNA
Cq	angl. quantification cycle
CpG	zaporedje nukleotidov s citozinom in gvaninom v DNA
DFO	deferoksamin
DMEM	angl. Dulbecco's modified Eagle's medium
DMEM L/A/F	DMEM z L-glutaminom, antibiotikom in antimikotikom ter FBS
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNMT	DNA metiltransferaza
E ₂	17β-estradiol
ER-α, ESR1	estrogenski receptor α
ER-β	estrogenski receptor β
HAT	histonska acetiltransferaza
HDAC	histonska deacetilaza
HIF	s hipoksijo induciran dejavnik
HOS	celična linija humanih osteosarkomskih celic
MBD	domena, ki se veže na metilirano DNA
miRNA	mikro RNA
mRNA	informacijska RNA
ncRNA	nekodirajoča RNA
OPG	osteoprotegrin
PBS	fosfatni pufer z NaCl
PCR	verižna reakcija s polimerazo
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κB
RANKL	ligand, ki se veže na receptor RANK
RNA	ribonukleinska kislina
RPLP0	angl. 60S acidic ribosomal protein P0 (ribosomski protein)

Runx2	transkripcijski dejavnik 2 z domeno Runt
SDS	natrijev dodecil sulfat
siRNA	mala interferenčna RNA
TBS	tris pufer z NaCl
TE	tris EDTA pufer
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze α
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
TTBS	tris pufer z NaCl in s Tweenom
VEGF	žilni endotelijski rastni dejavnik

1. Uvod

1.1. Epigenetika

Molekula DNA (deoksiribonukleinska kislina) je sestavljena iz zaporedja nukleotidov, ki nosijo kodirana navodila za sintezo proteinov in posredno za razvoj celotnega organizma. Kljub temu, da v splošnem vse celice v organizmu vsebujejo enako DNA, se celice razvijejo v različno organizirana in diferencirana tkiva. Podobno se tudi fenotipa enojajčnih dvojčkov, ki imata identičen genski zapis, razlikujeta. Izražanje genov namreč ni odvisno zgolj od zaporedja baznih parov, temveč tudi od mehanizmov, ki vplivajo na dostopnost DNA. Povezavo med genotipom in fenotipom razlaga epigenetika (1).

Epigenetika proučuje spremembe v izražanju genov, ki se prenašajo z materinske na hčerinske celice, vendar niso posledica sprememb v zaporedju nukleotidov v DNA. Mehanizmi, ki imajo sposobnost vpliva na epigenom, nadzorujejo, v kakšni meri, kdaj ter kje se bo določen gen izražal (2). Genom vsebuje informacije v obliki nukleotidnega zapisa, medtem ko v epigenomu uvrščamo kemijske modifikacije DNA ter posttranslacijske modifikacije histonov, ki vplivajo na strukturo in dostopnost dvojne vijačnice in s tem vplivajo na izražanje genov. Poleg teh pa lahko epigenomu priključimo tudi nekodirajoče RNA (ribonukleinske kisline), ki na izražanje genov vplivajo v kasnejši fazi, ko so le-ti že prepisani. Skupaj z genomom epigenom usmerja razvoj celice in omogoča vsaki celici, da deluje po unikatnem programu. Pomembna razlika med genomom in epigenomom je tudi ta, da se epigenom lahko spreminja v odvisnosti od zunanjih vplivov. S tem celici omogoča boljše in hitrejše prilagajanje spremembam ob nespremenjeni osnovni genski informaciji (3).

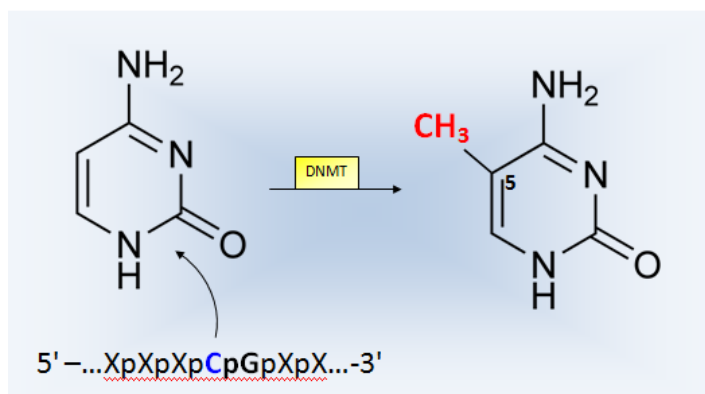
1.1.1. Epigenetski mehanizmi

Da se protein, ki je kodiran na določenem genu, izrazi, morajo poteči transkripcija DNA, posttranskripcijske modifikacije, translacija v zaporedje aminokislin in nazadnje proteinske modifikacije. Vsi mehanizmi, ki kontrolirajo katerokoli od navedenih stopenj, lahko vplivajo na izražanje in posledično na diferenciacijo ter razvoj celic. Vzorci izražanja genov se oblikujejo med razvojem celic in se prenašajo na hčerinske celice. Te tako ne podedujejo le zapisa DNA, temveč tudi epigenetske informacije. Epigenetske mehanizme,

ki lahko spreminjajo epigenom, delimo na metilacijo DNA, posttranslacijske modifikacije histonov in z njimi povezano remodelacijo kromatina ter mehanizme, povezane z nekodirajočimi RNA (2, 4).

1.1.1.1. Metilacija DNA

Okoli 3 % vseh citozinov v humani DNA je metiliranih. Metilacija poteče na mestu 5 na citozinu, tako da nastane 5-metilcitozin (slika 1). Za metilacijo pa ni dovzeten vsak citozin v DNA, metilirajo se lahko le citozini na nukleotidih, ki imajo na 3' koncu pripet nukleotid gvanin. Ta mesta na DNA označujemo s CpG, pri čemer »p« predstavlja fosfodiestrsko vez, ki povezuje oba nukleotida. Metilne skupine ne ovirajo vzpostavitve vodikovih vezi med vijačnicama, vendar pa vplivajo na sposobnost vezave določenih proteinov na DNA. V splošnem metilirani citozinski ostanki otežujejo interakcijo proteinov z DNA in zavirajo transkripcijo, zato hipermetilacija DNA povzroči utišanje genov (5). Kombinacijo CpG na DNA najdemo v manjšem obsegu glede na pričakovano verjetnost tega zaporedja. Obstajajo pa mesta, kjer se zaporedje CpG pojavlja precej pogosteje kot drugje po genomu. Tem mestom pravimo otočki CpG. Le-ti se pojavljajo predvsem na intergenskih delih, kjer naj bi označevali začetek prepisa nekodirajočih RNA (ncRNA), pa tudi znotraj promotorskih regij, kjer lahko metilacija v veliki meri vpliva na delovanje promotorja (4, 5).



Slika 1: Metilacija citozina z encimom DNA metiltransferaza (DNMT) do 5-metilcitozina.

Metilacijski vzorci DNA se lahko spreminjajo pod vplivom delovanja encimov. Encime, ki so sposobni metilirati DNA, uvrščamo v družino DNA metiltransferaz. Pri sesalcih so do sedaj odkrili pet tipov DNA metiltransferaz: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b in DNMT3L (2). DNMT1 je v celicah od vseh DNA metiltransferaz prisotna v največjem obsegu in je odgovorna za kopiranje metilacijskih vzorcev pri podvajanju DNA s

starševske verige na novo nastalo komplementarno verigo. DNMT2 niso povezali z metilacijo mest CpG na DNA, ampak naj bi bila vpletena v metilacijo RNA. DNMT3a in DNMT3b sta odgovorni za »de novo« metilacijo mest CpG, sodelujeta pa tudi z DNMT1 pri zagotavljanju prepisa metilacijskih vzorcev na novo kopijo DNA (3, 4). Struktura DNMT3L je podobna strukturi ostalih DNA metiltransferaz, vendar ne vsebuje dela, ki je pomemben za metilacijo. Sklepajo, da zato nima metiltransferazne aktivnosti, da pa je pomembna pri vezavi drugih DNA metiltransferaz na donor metilne skupine (S-adenozil-L-metionin), kar stimulira njihovo aktivnost (6).

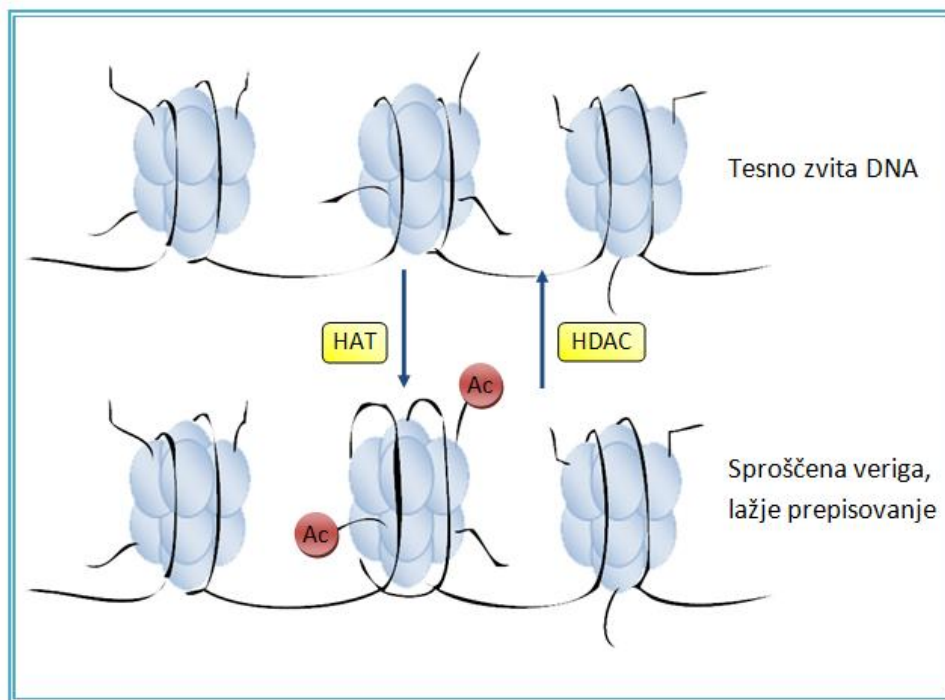
V celici obstajajo proteini, ki prepoznajo metilirane odseke DNA. Imenujemo jih metil CpG vezavni proteini (MBP). V to skupino spada tudi družina proteinov, ki jih družijo skupen strukturni element: MBD (domena, ki se veže na metilirano DNA). Proteini MBD1, MBD2 in MBD3 na DNA privabljajo korepresorje in histonske deacetilaze ter s tem zavirajo transkripcijo. V to družino spada tudi protein MECP2 (angl. methyl CpG binding protein 2), ki prav tako zavira transkripcijo. Njegova posebnost je, da lahko zaradi dodatne funkcionalne domene zavira transkripcijo tudi na mestih, ki so več sto baznih parov proč od mesta vezave proteina (4).

1.1.1.2. Posttranslacijske modifikacije histonov

DNA veriga ni prosta, ampak skupaj s proteinskimi kompleksi tvori kromatin. Osnovna strukturna enota kromatina je nukleosom, ki je sestavljen iz 146 baznih parov, navitih okrog oktamera histonov. Oktamer sestavljajo štirje histoni: H2A, H2B, H3 in H4, od katerih je vsak zastopan po dvakrat. Histoni omogočajo, da se DNA v jedru učinkovito organizira v bolj kompaktno strukturo. Struktura histonov močno vpliva na to, na kakšen način se DNA ovija okrog proteinskega ogrodja ter kako blizu skupaj so lahko posamezni nukleosomi. Od tega je odvisno, s kakšno lahkoto se transkripcijski aparat pripenja na iskana zaporedja DNA, zato lahko posttranslacijske modifikacije histonov pomembno vplivajo na prepisovanje genov. Na histonih lahko pride do metilacije, acetilacije, fosforilacije, ubikvitinacije, sumoilacije in ADP-ribozilacije. Od vseh naštetih je najbolj raziskana acetilacija (2, 3).

Acetilacija poteče na lizinskih ostankih, ki se nahajajo na repih histonov. Donor acetilne skupine je acetil koencim A, reakcijo pa katalizirajo encimi, ki spadajo v družino histonskih acetiltransferaz (HAT). Okrog acetiliranih histonov se DNA ne more več tesno zviti, kar vpliva na kromatinsko strukturo, ki preide v bolj sproščeno stanje. Takšna DNA

je bolj dostopna, zato se izbrani geni intenzivneje prepisujejo. Obstajajo tudi encimi, ki odstranjujejo acetilne skupine s histonov – uvrščamo jih v družino histonskih deacetilaz (HDAC). Zaradi delovanja HDAC se kromatin bolj kondenzira (slika 2). Takšna struktura otežuje dostop transkripcijskih dejavnikov, zato se intenziteta prepisovanja izbranih genov zmanjša (7).



Slika 2: Acetilacija in deacetilacija histonov.

1.1.1.3. Mehanizmi, povezani z nekodirajočimi RNA (ncRNA)

Izraz ncRNA označuje molekule RNA, ki ne nosijo zapisa za proteine. Njihova vloga dolgo ni bila pojasnjena, danes pa je znano, da so vpletene v mehanizme uravnavanja izražanja genov, proliferacijo in diferenciacijo. ncRNA razvrščamo glede na njihovo velikost na kratke – krajše od 200 nukleotidov, in dolge – daljše od 200 nukleotidov. Ena od pomembnih skupin kratkih ncRNA so mikro RNA (miRNA). Sestavljene so iz zaporedja 18–23 nukleotidov in nastanejo iz nepopolnih lasnic, ki so prisotne v dolgih ncRNA. Gre za enoverižne RNA. miRNA se vključijo v kompleks, ki inducira utišanje RNA – kompleks RISC (angl. RNA induced silencing complex). Če je njihovo zaporedje baz popolnoma komplementarno zaporedju baz na mRNA (informacijska RNA), kompleks RISC razgradi mRNA. Če zaporedje ni popolnoma komplementarno, RISC ovira premikanje ribosomskega aparata po mRNA, kar privede do utišanja gena (4, 8, 9).

1.1.2. Udeleženos epigenetskih mehanizmov v kostni biologiji

Kostno tkivo je sestavljeno pretežno iz mineralnega ekstracelularnega matriksa, kolagena in celic. V kosti najdemo predvsem celice, ki jih uvrščamo v osteoplastno linijo, in celice osteoklastne linije. Za ohranjanje ustrezne strukture kostnega tkiva je pomembno, da so diferenciacija, proliferacija in aktivnosti vseh celic usklajene. Na vse te procese vplivajo spremembe v izražanju genov, zato imajo epigenetski mehanizmi pomembno vlogo pri ohranjanju kostne homeostaze.

Pri diferenciaciji mezenhimskih matičnih celic v osteoplaste se promotorji genov, ki so vključeni v pluripotentnih celicah, postopoma metilirajo. Spremeni se tudi metilacijski status genov, ki so vpleteni v signaliziranje preko ER- α . V osteosarkomskih celicah so z inhibicijo DNMT zmanjšali metiliranost DNA in povečali izražanje osteoplastnih genov (IL-6 – interlevkin 6, BMP7 – kostni morfogeni protein 7, WNT1 – protein iz družine Wnt, ALPL – alkalna fosfataza). Spet v drugih študijah so opazili, da inhibicija DNMT1 v mezenhimskih matičnih celicah preprečuje diferenciacijo v osteoplaste, adipocite ali hondrocite. Mehanizmi, ki nadzorujejo metilacijo, imajo tako osrednjo vlogo pri razvoju usmerjene celične linije (10).

Od kovalentnih modifikacij histonov sta najbolj raziskani metilacija in acetilacija. Delovanje metilaz so povezali z nastajanjem kosti iz hrustanca, razvojem kosti, vplivom na staranje kosti, inhibicijo osteogeneze in adipogeneze, medtem ko demetilaze spodbujajo osteogeno diferenciacijo, a zavirajo osteogenezo. Aktivnost acetiltransferaz vpliva na izgradnjo in razvoj kosti, interagirajo tudi z Runx2 (transkripcijski dejavnik 2 z domeno Runt), ki je transkripcijski dejavnik, povezan z diferenciacijo osteoplastov. Histonske deacetilaze so tudi vključene v regulacijo Runx2, poleg tega pa so jih povezali z negativno regulacijo osteoplastno specifičnih genov. Če so te encime zavirali z inhibitorji histonskih deacetilaz, so opazili upad trabekularne kostnine (10).

Izražanje številnih miRNA se ob diferenciaciji mezenhimskih matičnih celic v osteoplaste spremeni, kar priča o pomembnem vplivu miRNA na razvoj kostnine. Identificirali so že miRNA, ki zavirajo Runx2 ter proteine Smad. Proteini Smad prenašajo informacije z receptorjev na celični membrani v celico. Poleg teh so odkrili tudi miRNA, ki sodelujejo pri inhibiciji signalne poti Wnt in zavirajo izražanje osteonektina – proteina, ki je pomemben za mineralizacijo ekstracelularnega matriksa. Preko teh mehanizmov miRNA zavirajo osteogenezo (9).

1.2. Estrogensko signaliziranje

Estrogene uvrščamo med steroidne hormone. Zaradi lipofilne strukture lahko prosto prehajajo preko celične membrane. Njihova primarna funkcija je uravnavanje rasti in razvoja reproduktivnih tkiv, poleg tega pa estrogeni učinkujejo tudi v drugih tkivih, na primer v kosteh, možganih, imunskem in krvnožilnem sistemu (11). Estrogeni svoje učinke sprožajo z aktivacijo estrogenskih receptorjev. Do sedaj so odkrili, da obstajajo vsaj trije tipi estrogenskih receptorjev, od katerih sta najbolj raziskana estrogenski receptor α (ER- α) in estrogenski receptor β (ER- β). Poleg teh dveh so identificirali še membranski receptor GPER (z G-proteinom sklopljen estrogenski receptor), ki naj bi bil odgovoren za negenomsko signaliziranje (12).

ER- α je sestavljen iz šestih funkcionalnih domen: domen A in B, ki sta odgovorni za aktivacijo genov, tudi če na receptorju ni vezanega liganda, domene C, ki jo sestavljata dva cinkova prsta, preko katerih se receptor veže na DNA, domene D, ki omogoča dimerizacijo receptorja in prenos v celično jedro, domene E, na katero se veže ligand (estrogeni) in omogoča aktivacijo genov, ko je na receptorju vezan ligand, ter domene F, za katero sklepajo, da vpliva na stopnjo aktivacije receptorja glede na to, kateri ligand je vezan na domeni E. ER- β je strukturno podoben ER- α . Največjo homologijo izkazuje v domeni C, medtem ko je podobnost drugih domen manjša. ER- β je v tkivih drugače porazdeljen kot ER- α , poleg tega ima drugačno afiniteto do ligandov ter drugače vpliva na od ligandov neodvisno izražanje genov (12).

Ko se kateri od estrogenov veže na ER- α , le-ta dimerizira, zaradi česar lažje prehaja v jedro, kjer se z domeno C veže na mesta ERE (estrogensko odzivne elemente). Na teh mestih skupaj s koaktivatorji in transkripcijskimi kofaktorji stimulira prepis novih mRNA. Poleg tega mehanizma lahko ER- α vpliva na izražanje tudi tako, da se vpleta v druge signalne poti v jedru ali v citoplazmi (11).

1.2.1. Estrogensko signaliziranje v kosteh

Učinek estrogenov v kostnem tkivu je odvisen od vrste celic: estrogeni zavirajo diferenciacijo in spodbujajo apoptozo osteoklastov, mezenhimske matične celice usmerjajo v osteoblastno celično linijo, kar poveča število osteoblastov v kostnem tkivu, prav tako pa je povečano število osteoblastov povezano tudi s tem, da estrogeni zavirajo njihovo

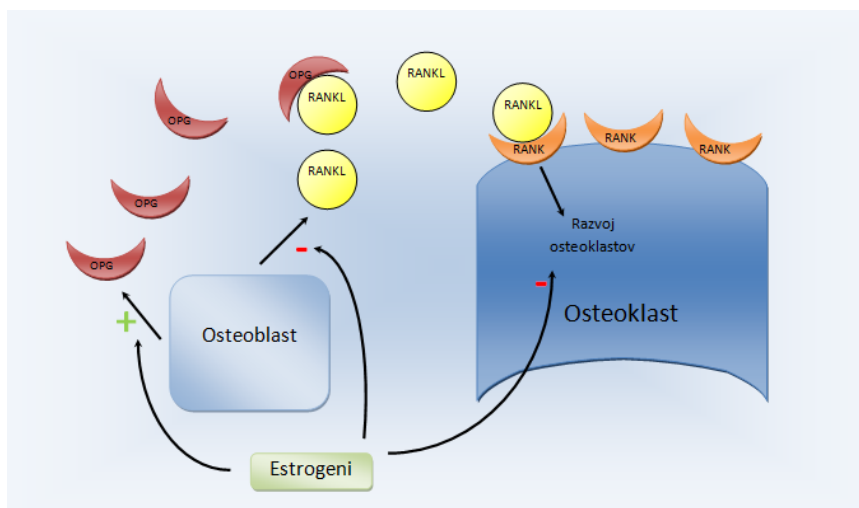
apoptozo. Podobno kot pri osteoblastih je tudi apoptoza osteocitov v prisotnosti estrogenov manj izrazita. Vsi ti učinki se v kosteh odražajo z zmanjšano kostno prenovo in manj intenzivno kostno razgradnjo (13).

Vpliv estrogenov na signalno pot Wnt/ β -katenin

Wnt so glikoproteini in imajo pomembno vlogo pri razvoju in obnovi tkiv. Proteini Wnt lahko aktivirajo več signalnih poti Wnt, ki prevajajo signal iz zunanosti celice v jedro. Od vseh je najbolj raziskana signalna pot Wnt/ β -katenin. Aktivacija te poti povzroči stabilizacijo β -katenina, ki vpliva na več transkripcijskih dejavnikov in s tem usmerja izražanje tarčnih genov. V prisotnosti estrogenov se količina sklerostina, inhibitorja signalne poti Wnt/ β -katenin, ki ga izločajo osteociti, zmanjša. Ker je aktivnost signalne poti Wnt/ β -katenin pomembna za odziv osteocitov na mehanske obremenitve ter za obnovo kostnega tkiva po zlomih, imajo estrogeni pomembno vlogo pri uravnavanju nastajanja nove kostnine (13, 14).

Vpliv estrogenov na kostno resorpcijo

Estrogeni na kostno resorpcijo v veliki meri vplivajo z uravnavanjem sistema RANK/RANKL/OPG (slika 3). Razvoj osteoklastov, ki so odgovorni za resorpcijo kosti, je povezan s tesnimi interakcijami z osteoblasti, ki kostnino izgrajujejo. Za pravilen razvoj osteoklastov je nujna aktivnost receptorja RANK (receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B). Ta je prisoten na membrani osteoklastov in po aktivaciji deluje na transkripcijske dejavnike, ki usmerjajo razvoj osteoklastov. Aktivira ga vezava liganda RANKL (ligand, ki se veže na receptor RANK), ki ga izločajo osteoblasti. Poleg RANKL pa osteoblasti izločajo tudi osteoprotegrin (OPG), na katerega se prav tako lahko veže RANKL. OPG deluje kot »lažni receptor«, zaradi česar se zmanjša vezava liganda RANKL na receptor RANK (15). Estrogeni povečajo osteoblastno izločanje OPG in zmanjšajo izločanje RANKL. Prav tako prisotnost estrogenov zmanjša nastajanje dejavnika tumorske nekroze α (TNF- α), kar vse vodi do zmanjšane osteoklastogeneze. Zaradi manjšega števila osteoklastov (tudi zaradi povečane apoptoze) se obseg kostne resorpcije zmanjša (13, 15).



Slika 3: Vpletenost estrogenov v sistem RANK/RANKL/OPG.

Estrogenski receptorji v kostnem tkivu

ER- α je v večji meri prisoten v kompaktni kostnini, medtem ko v spongiozni kostnini najdemo tako ER- α kot ER- β . Ob pomanjkanju estrogenov sta procesa izgradnje in razgradnje kosti intenzivnejša, vendar se razgradnja bolj poveča, kar privede do upadanja kostne mase. Poleg tega so v eksperimentih na mišjih modelih dokazali tudi, da odsotnost ER- α v kosteh zmanjša kostno premeno, poveča spongiozno kostno maso, zmanjša pa kompaktno kostno maso. Odsotnost ER- β se odraži v večji longitudinalni rasti kosti, večji debelini kortikalnega dela kosti ter večji kostni masi, hkrati pa odsotnost ER- β spremlja povečano izražanje ER- α . Če v kosteh ni prisoten nobeden od omenjenih estrogenskih receptorjev, je kostna masa zmanjšana. Učinki estrogenskega signaliziranja so torej kompleksni, saj gre za preplet velikega števila signalnih poti, končno stanje pa je odvisno od tega, kateri učinek prevlada (12).

1.3. Hipoksija

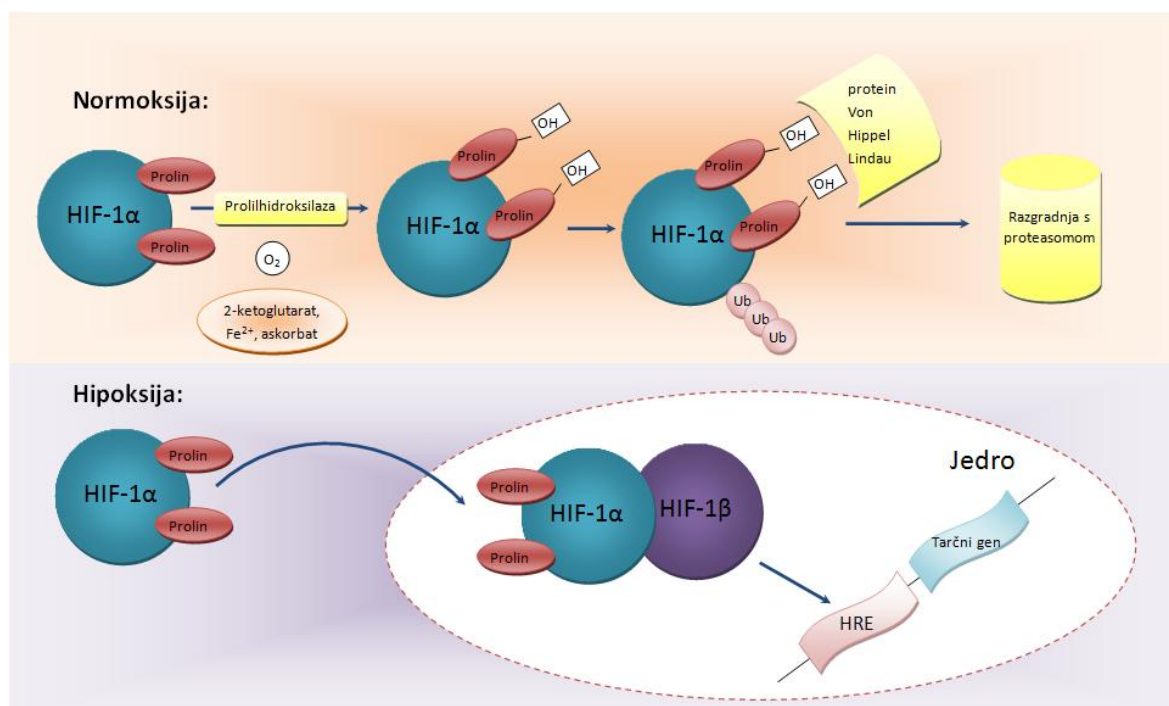
Hipoksija označuje stanje nezadostne preskrbe tkiv s kisikom. V ekstracelularni tekočini je parcialni tlak kisika odvisen od metabolne aktivnosti celic, ki so porabniki kisika, in od dotoka svežega kisika s krvjo, kar je odvisno predvsem od razvejanosti krvožilnega sistema v okolici in znotraj tkiv. Če pride do zmanjšane oskrbe kisika glede na njegovo porabo, v tkivih parcialni tlak kisika pade. V tkivih znaša parcialni tlak kisika 3–9 %. Za slabšo oskrbo tkiv s kisikom je največkrat odgovorna slabša perfuzija tkiv, ki je lahko

posledica staranja, vnetja, okužb, zlomov, tumorjev in drugih bolezenskih stanj (npr. diabetesa) (16).

1.3.1. Zaznavanje parcialnega tlaka kisika v celici

Parcialni tlak kisika v intracelularni tekočini je strogo vzdrževan znotraj ozkega fiziološkega intervala. Pomanjkanje kisika lahko vodi v nezmožnost vzdrževanja primerne nivoja ATP (adenozintrifosfata) za osnovne celične funkcije, medtem ko previsok nivo kisika pospeši nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti, ki poškodujejo celične strukture.

Zaznavanje parcialnega tlaka kisika v celicah poteka preko transkripcijskih dejavnikov, ki jih inducira hipoksija – HIF. HIF je heterodimer, ki ga sestavljata podenoti α in β . V prisotnosti kisika se HIF-1 α in HIF-2 α hidroksilirata, nato se nanju s pomočjo tumor supresorskega proteina Von Hippel Lindau pripne ubikvitin, kar ju označi za razgradnjo v proteasomu. Če kisika ni dovolj, sta HIF-1 α in HIF-2 α stabilizirana, zato se lahko povežeta s HIF-1 β . Heterodimer se v celičnem jedru veže na hipoksijsko odzivne elemente (hypoxia response elements) na promotorjih tarčnih genov in sproži njihovo prepisovanje (slika 4). Gre predvsem za gene, ki spodbujajo angiogenezo (poveča se na primer izražanje žilnega endotelijskega rastnega dejavnika – VEGF), gene povezane z metabolizmom, celično proliferacijo in preživetjem (16).



Slika 4: Zaznavanje parcialnega tlaka kisika v celici.

1.3.2. Hipoksija v kostnem tkivu

Bolezni, kot na primer obstruktivne pljučne bolezni in anemije, pri katerih je v arterijski krvi stalno zmanjšana raven kisika, so v veliki meri povezane z zmanjšano kostno maso, kar priča o vplivu hipoksije na kostni metabolizem. Znano je, da zmanjšan parcialni tlak kisika stimulira razvoj celic, ki izhajajo iz monocitnih matičnih celic. V zmernih hipoksičnih razmerah se število in velikost osteoklastov povečata, zaradi česar se poveča razgradnja kostnine. V hipoksičnih pogojih se namreč poveča izražanje VEGF in interlevkina 6, ki spodbujata osteoklastogenezo. V osteoblastih, ki so bili izpostavljeni hipoksiji, so opazili povečano sintezo VEGF, inzulinu podobnega rastnega dejavnika II (IGF-II), in transformirajočega rastnega dejavnika $\beta 1$, a zmanjšano izražanje Runx2. V hipoksičnih pogojih so opazili skoraj popolno ustavitev kostne izgradnje zaradi zmanjšane rasti in diferenciacije osteoblastov. V osteoblastih se zmanjša produkcija kolagena, ker se zaradi pomanjkanja kisika zmanjša aktivnost prolil-hidroksilaze in lizil-oksidaze, ki sta odgovorni za posttranslacijske modifikacije kolagena. Zmanjša se tudi izražanje alkalne fosfataze, ki je pomembna za proces mineralizacije (16).

2. Namen dela

Za zdravo kostno tkivo je pomembno, da je vzpostavljeno ravnovesje med razgradnjo in izgradnjo kostnine. Zato je ključno, da so razvoj, diferenciacija in delovanje vseh celic v kostnem tkivu uravnoreženi, kar omogočajo različni regulatorni mehanizmi, katerih delovanje pa je odvisno tudi od epigenetskih sprememb, ki vplivajo predvsem na »vključevanje in izključevanje« genov. Če pride do odklonov od normalnega epigenetskega stanja, npr. metilacije DNA, se to lahko odrazi v porušenem ravnovesju kostnega metabolizma ter motnjah rasti, razvoja in obnove kostnega tkiva. Estrogeni so že dolgo poznani kot eden poglobitnejših dejavnikov, ki spodbujajo rast in razvoj osteoblastov ter zavirajo razvoj osteoklastov. Prav tako je znano, da hipoksija vpliva tako na osteoblaste kot na osteoklaste, kar se odrazi z zmanjšano kostno maso. V raziskavi bomo na modelu osteoblastnih celic proučili, ali estrogeni in hipoksija vplivajo na epigenetske mehanizme, ter s tem skušali osvetliti vlogo teh dveh dejavnikov na do sedaj še slabo raziskanem področju epigenetike v osteoblastih. Celice bomo izpostavili 17β -estradiolu, mimetiku hipoksije ali kombinaciji obeh dejavnikov. V dveh časovnih točkah bomo proučevali njihov vpliv na gene za encime, ki sodelujejo pri acetilaciji histonov, deacetilaciji histonov in metilaciji DNA, ter proteine, ki se vežejo na metilirano DNA. Poleg vpliva na epigenetske mehanizme bomo spremljali tudi vpliv hipoksije in 17β -estradiola na signalni poti Wnt in RANK/RANKL/OPG.

V okviru magistrske naloge bomo poskusili potrditi ali ovreči sledeče hipoteze:

- hipoksija vpliva na izražanje genov, ki kodirajo proteine, udeležene v epigenetskih mehanizmih, kot so: acetilacija in deacetilacija histonov, metilacija DNA ter vezava proteinov na metilirano DNA,
- estrogeni vplivajo na izražanje genov, ki kodirajo proteine, udeležene v epigenetskih mehanizmih (našteti zgoraj),
- estrogeni preprečijo učinke hipoksije na izražanje genov za proteine, udeležene v epigenetskih mehanizmih (našteti zgoraj),
- hipoksija vpliva neposredno na sistem RANK/RANKL/OPG in signalno pot Wnt/ β -katenin, vendar estrogeni izničijo njene učinke.

3. Materiali in metode

Material	Opis
0,25 % Tripsin/EDTA (etilendiamintetraocetna kislina)	Proizvajalec: Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, ZDA (št. proizvoda: 25200-056)
0,3 M gvanidinijev klorid v 95 % etanolu	Pripravljen v laboratoriju
1 M Tris HCl (tris(hidroksimetil)aminometan HCl)	Pripravljen v laboratoriju
1 x PBS (fosfatni pufer z NaCl)	Pripravljen v laboratoriju
1 x tris-glicinski pufer	Pripravljen v laboratoriju
1 x TTBS (tris pufer z NaCl in s Tweenom)	Pripravljen v laboratoriju
1 % SDS (natrijev dodecilsulfat)	Pripravljen v laboratoriju
10 % SDS	Pripravljen v laboratoriju
10 x TBS (tris pufer z NaCl)	Pripravljen v laboratoriju
100 % etanol	Za analize, Ph Eur
17β-estradiol - E₂	$\geq 98 \%$, BioReagent, primeren za celične kulture
2-merkaptoetanol	$\geq 99,0 \%$ (14,3 M)
3 % hipoklorit	Pripravljen v laboratoriju
Natrijev hipoklorit	13 %, kemijsko čist
3 x SLB (\ggsample loading buffer)	Pripravljen v laboratoriju
5 % koncentracijski gel	Pripravljen v laboratoriju
5 % mleko	Pripravljen v laboratoriju
70 % etanol	Pripravljen v laboratoriju
8 % ločevalni gel	Pripravljen v laboratoriju
Akrilamid:N,N'-metilenbisakrilamid	37,5:1, za elektroforezo, 40 % v H ₂ O
Amonijev persulfat	BioUltra, $\geq 98,0 \%$
Antibiotik/antimikotik	Kombinacija penicilina, streptomocina in amfotericina B. Proizvajalec: Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija (št. proizvoda: A5955)
Bromfenolno modrilo	Reag. Ph. Eur., indikator
Celice HOS (celična linija humanih osteosarkomskih celic)	Proizvajalec: American type culture collection (ATCC), Manassas, VA, ZDA (št. proizvoda: CRL-1543)
CellTiter 96[®] AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	Proizvajalec: Promega, Madison, WI, ZDA (št. proizvoda: G5421)
Centrifugirke (15 in 50 mL)	Proizvajalec: Techno Plastic Products, Trasadingen, Švica
Deferoksamin mezilat – DFO	$\geq 92,5 \%$
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)	Proizvajalec: Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija (št. proizvoda: D5546)
Glicerol	Brezvodni, za sintezo
Glicin	Za elektroforezo, $\geq 99 \%$
Goveji serum – FBS (Fetal Bovine Serum)	Proizvajalec: Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, ZDA (št. proizvoda: 10270-106)
Goveji serumski albumin (BSA)	Liofilizat, $\geq 96 \%$, za agarozno gelsko elektroforezo
Gvanidinijev hidroklorid	Za molekularno biologijo, $\geq 99,5 \%$
HCl	Koncentrirana raztopina, reag. Ph. Eur., $\geq 37 \%$
iBlot[®] Transfer Stack, nitrocellulose, regular size	Proizvajalec: Life Technologies, Carlsbad, CA, ZDA (št. proizvoda: IB3010-31)
Istosmerni in obratnosmerni oligonukleotidni začetniki	Proizvajalec: Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija
Izopropanol (2-propanol)	Za analize, Ph Eur
KCl	$\geq 98,5 \%$
KH₂PO₄	$\geq 98 \%$

Kloroform	Za analize, Ph. Eur.
Kobaltov (II) klorid heksahidrat - CoCl₂	≥ 98,0 %, BioReagent, primeren za celične kulture
Komplet reagentov DC Protein Assay	Proizvajalec Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ZDA (št. proizvoda: 500-0112)
Komplet reagentov SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Proizvajalec: Thermo Fisher Scientific, Life Science Research, Rockford, IL, ZDA (št. proizvoda: 34095)
Komplet za vakuumsko filtracijo Filtermax	Proizvajalec: Techno Plastic Products, Trasadingen, Švica (št. proizvoda: 99500)
Kozja poliklonska protitelesa proti mišjim protitelesom (označena s hrenovo peroksidazo)	Proizvajalec: Merck Milipore, Darmstadt, Nemčija (št. proizvoda: 12-349). Koncentracija: 1 mg/mL.
Kozja poliklonska protitelesa proti zajčjim protitelesom (označena s hrenovo peroksidazo)	Proizvajalec: Merck Milipore, Darmstadt, Nemčija (št. proizvoda: 12-348). Koncentracija: 1 mg/mL.
L-glutamin	200 mM raztopina, sterilno filtriran, BioXtra, primeren za celične kulture
Mikrocentrifugirke (200, 500, 1500, 2000 µL)	Proizvajalec: Eppendorf, Hamburg, Nemčija
miRNeasy Mini Kit	Proizvajalec: Qiagen, Hilden, Germany (št. proizvoda: 217004)
Mišja monoklonska protitelesa proti ER-α	200 µg IgG v 1,0 mL PBS, proizvajalec: Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, ZDA (št. proizvoda: sc-8005)
Mišja monoklonska protitelesa proti β-aktinu	hibridom AC-74, ascites, proizvajalec: Sigma, Saint Louis, Missouri, ZDA (št. proizvoda: A 5316)
Mleko v prahu	Proizvajalec: Pomurske mlekarnе, Murska Sobota, Slovenija (naziv proizvoda: posneto mleko v prahu)
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin	BioReagent, za molekularno biologijo, ≥ 99 %
Na₂HPO₄·12H₂O	BioXtra, ≥ 99,0 %
NaCl	Za molekularno biologijo, ≥ 98 %
Nanašalni pufer	Pripravljen v laboratoriju
Parafilm M®	Proizvajalec: Bemis Flexible Packaging, Oshkosh, WI, ZDA (št. proizvoda: PM996)
Pipetni nastavki (10, 200, 1000 µL)	Proizvajalca: -Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija -Star Lab, Hamburg, Nemčija
Plastenke za gojenje celičnih kultur (25, 75 in 125 cm²)	Proizvajalec: Techno Plastic Products, Trasadingen, Švica
Plazmid pcDNA3	Proizvajalec: Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
Plazmid pCMV-ESR1	Proizvajalec: Sino Biological Inc., Peking, Kitajska (št. proizvoda: HG13179-G-N)
Ploščice s 384 vdolbinicami LightCycler® 480 Multiwell Plate 384	Proizvajalec: Roche Diagnostics, Mannheim; Nemčija (št. proizvoda: 04729749001)
Proteini iz celične linije MCF7	Izolirani v laboratoriju pri predhodnih eksperimentih.
Pufer za koncentracijski gel	Pripravljen v laboratoriju
Pufer za ločevalni gel	Pripravljen v laboratoriju
Pufer za odstranjevanje vezanih protiteles (»stripping buffer«)	Pripravljen v laboratoriju
QIAzol Lysis Reagent	Proizvajalec: Qiagen, Hilden, Germany (št. proizvoda: 79306)
RNA 6000 Nano Lab Chip Kit	Proizvajalec: Agilent Technologies, Inc., New Castle, Delaware, ZDA (št. proizvoda: 5067-1511)
RNaseZap	Proizvajalec: Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, ZDA (št. proizvoda: AM9780)
SDS (natrijev dodecil sulfat)	Za molekularno biologijo, ≥ 99,5 %
SeeBlue Plus2	Proizvajalec: Life Technologies, Carlsbad, CA, ZDA (št.

	proizvoda: LC5925)
Serološke pipete (5, 10, 20 in 50 mL)	Proizvajalec: Techno Plastic Products, Trasadingen, Švica
SYBR Select Master Mix	Proizvajalec: Life Technologies, Carlsbad, CA, ZDA (št. proizvoda: 4472908)
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Proizvajalec: Roche Diagnostics, Mannheim; Nemčija (št. proizvoda: 04896866001)
Tripansko modrilo	0,4 %, sterilno filtrirano, primerno za celične kulture
Tris baza	BioUltra, za molekularno biologijo, $\geq 99,8\%$
Tween 20®	Viskoznost 250-450 mPa*s (25 °C)
Ultra čista voda	Pripravljena v laboratoriju z aparatom Elga Purelab Classic.
Voda brez nukleaz	Za molekularno biologijo. Brez DNaz, RNaz, Proteaz. Filtrirana skozi filter s porami 0,1 μm .
X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent	Proizvajalec: Roche Diagnostics, Mannheim; Nemčija (št. proizvoda: 06366236001)
Zajčja poliklonska protitelesa proti HIF1α	200 μg IgG v 1,0 mL PBS, proizvajalec: Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, ZDA (št. proizvoda: sc-10790)

Reagenti, pripravljene v laboratoriju	Priprava
0,1 % SDS	<ul style="list-style-type: none"> •0,1 g SDS •ultra čista voda do 100 mL
0,3 M gvanidinijev klorid v 95 % etanolu	<ul style="list-style-type: none"> • 7,165 g gvanidinijevega hidroklorida (za molekularno biologijo, $\geq 99,5\%$) •12,5 mL ultra čiste vode •237,5 mL 100 % etanola
1 % SDS (natrijev dodecil sulfat)	<ul style="list-style-type: none"> •0,5 g SDS •ultra čista voda do 50 mL
1 M tris HCl	<ul style="list-style-type: none"> •60,55 g tris baze •ultra čista voda do 500 mL (pH uravnamo na 7,4 s koncentrirano HCl)
1 x PBS	<ul style="list-style-type: none"> •80 g NaCl •2 g KCl •36,3 g Na₂HPO₄·12H₂O •2,4 g KH₂PO₄ <p>Reagente raztopimo v ultračisti vodi in dopolnimo do 1 L. Redčimo v razmerju 1:10 z ultračisto vodo in filtriramo, da odstranimo nečistote in mikroorganizme. Shranjujemo na sobni temperaturi.</p>
1 x tris-glicinski pufer	<p>Najprej smo pripravili 5 x tris-glicinski pufer:</p> <ul style="list-style-type: none"> •15,1 g tris baze •94 g glicina •50 mL 0,1 % SDS •ultra čista voda do 1000 mL <p>1 x tris-glicinski pufer smo pripravili:</p> <ul style="list-style-type: none"> •100 mL 5 x tris-glicinskega pufra •ultra čista voda do 500 mL
1 x TTBS	<ul style="list-style-type: none"> •50 mL 10 x TBS •ultra čista voda do 500 mL <p>Nato dodamo še 500 μL Tweena 20.</p>
10 % SDS	<ul style="list-style-type: none"> •5 g SDS •ultra čista voda do 50 mL
10 x TBS	<ul style="list-style-type: none"> •30 g tris baze •80 g NaCl

	<ul style="list-style-type: none"> •2 g KCl •ultra čista voda do 1000 mL (pH s koncentrirano HCl uravnamo na 7,4)
3 x SLB (»sample loading buffer«)	<ul style="list-style-type: none"> •15 mL glicerola •0,015 g bromfenolnega modrila •4,5 g SDS •9,75 mL 1 M Tris HCl •ultra čista voda do 50 mL
3 % hipoklorit	<ul style="list-style-type: none"> •23 mL 13 % raztopine natrijevega hipoklorita •ultra čista voda do 100 mL
5 % koncentracijski gel	<ul style="list-style-type: none"> •6,8 mL ultra čiste vode (iz aparata Elga) •1,7 mL raztopine akrilamida:N,N'-metilenbisakrilamida 37,5:1, za elektroforezo, 40% v H₂O •1,25 mL pufra za koncentracijski gel – pripravljen v laboratoriju •0,1 mL 10 % SDS •0,1 mL amonijevega persulfata, BioUltra, ≥ 98,0 % (RT) •0,01 ml N,N,N',N'-tetrametiletildiamin, BioReagent, za molekularno biologijo, ≥ 99 % (GC)
5 % mleko	<ul style="list-style-type: none"> •2,5 g mleka v prahu •ultra čista voda do 50 mL
70 % etanol	<ul style="list-style-type: none"> •700 mL 100 % etanola •ultra čista voda do 1000 mL
8 % ločevalni gel	<ul style="list-style-type: none"> •9,3 mL ultra čiste vode •5,3 mL raztopine akrilamida:N,N'-metilenbisakrilamida 37,5:1 •5 mL pufra za ločevalni gel •0,2 mL 10 % SDS •0,2 mL amonijevega persulfata •0,012 ml N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Nanašalni puffer	<ul style="list-style-type: none"> •13,33 µL 3 x SLB •1,6 µL bromfenolnega modrila •2,4 µL 2-merkaptetanola
Pufer za koncentracijski gel	<ul style="list-style-type: none"> •6,1 g tris baze •ultra čista voda do 100 mL (pH umerjen na 6,8) Raztopino avtoklaviramo in nato dodamo še 0,4 g SDS. Hranimo v hladilniku.
Pufer za ločevalni gel	<ul style="list-style-type: none"> •18,2 g tris baze •ultra čista voda do 100 mL (pH umerjen na 8,8) Raztopino avtoklaviramo in nato dodamo še 0,4 g SDS. Hranimo v hladilniku.
Pufer za odstranjevanje vezanih protiteles (»stripping buffer«)	<ul style="list-style-type: none"> •31,25 mL 1 M tris HCl •3,496 mL 14,3 M 2-merkaptetanola •10 g SDS •ultra čista voda do 500 mL

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Inc., New Castle, Delaware, ZDA
2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, ZDA
Aparat za vertikalno elektroforezo	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ZDA
Brezprašna celična komora MC 15-3	Iskra PIO, Šentjernej, Slovenija
Centrifuga 5430 R	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Centrifuga CENTRIC 322A, Tehtnica	Domel, Železniki, Slovenija
Centrifuga Megafuge 16R	Thermo Scientific, Waltham, MA, ZDA
CO₂ inkubator	Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japonska

Digestorij FAZ 1	Waldner, Wangen, Nemčija
G:BOX s programsko opremo GeneSnap	Syngene, Cambridge, Velika Britanija
Hemocitometer: Blaubrand, Neubauer improved	Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija
Hladna soba (4 °C)	
iBlot Dry Blotting System	Life Technologies, Carlsbad, CA, ZDA
komora za izolacijo DNA UVC/T-M-AR	Grant Instruments, Cambridge, Velika Britanija
komora za izolacijo RNA UVC/T-M-AR	Grant Instruments, Cambridge, Velika Britanija
Kuhalnik	
Ledena kopel	
Light Cycler® 480 II	Roche Diagnostics, Mannheim; Nemčija
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, MA, ZDA
Ogrevan stresalnik Apollo HP50 Shaker Oven	CLP Tools, San Diego, CA, ZDA
Petrijevke	
Pipete, različni volumni in modeli	Eppendorf, Hamburg, Nemčija Biohit, Helsinki, Finska
Pipetor Midi Plus	Biohit, Helsinki, Finska
Plastične kadičke za spiranje membran	
Purelab Classic	Elga Lab Water, Buckinghamshire, Velika Britanija
Safire 2 Plate Reader	Tecan, Männedorf, Švica
Stresalnik:	
- GyroTwister™	-Labnet International, Edison, NJ, ZDA
-Vibromix 314 EVT, Tehnica	-Domel, Železniki, Slovenija
Invertni mikroskop Olympus CK40	Olympus Optical Co. (Europa) GmbH, Hamburg, Nemčija
Vibracijski mešalnik Vortex 3	IKA, Staufen, Nemčija
Vodna kopel Water Bath WB-4MS	Biosan, Riga, Latvija

3.1. Delo s celičnimi kulturami

3.1.1. Gojenje in presajanje celic

Kot model za osteoblaste smo izbrali celično linijo HOS. Gre za nesmrtno celično linijo, ki je bila izolirana iz humanega osteosarkomskega tkiva. Celice HOS v gojišču rastejo v monosloju, pritrjene na podlago (17). Gojili smo jih v plastenkah za gojenje celičnih kultur s površino 25, 75 oziroma 125 cm² v gojišču DMEM L/A/F, ki smo ga pripravili iz 500 ml DMEM, 50 mL FBS, 5,5 mL L-glutamina in 5,5 mL antibiotika/antimikotika. Plastenke s celicami smo shranjevali v inkubatorju pri 37 °C, 5 % CO₂ in visoki relativni vlažnosti. Ko so dosegle približno 90-odstotno konfluenco, smo jih precepili v novo plastenko ali ploščo (navedeni volumni reagentov ustrezajo presajanju v plastenko s površino 25 cm²):

- brezprašno celično komoro in vse pripomočke smo pred uporabo prebrisali s 70-odstotnim etanolom. Komoro smo za 30 minut izpostavili UV svetlobi.
- V brezprašni celični komori smo odstranili staro gojišče in celice sprali z 2,5 mL 1 x PBS.
- Celicam smo dodali 1,5 mL 0,25 % Trypsin/EDTA, segretega na 37 °C, in jih 3 minute inkubirali pri 37 °C.
- Ko so se celice odpustile od plastenke, smo dodali 3,5 mL gojišča DMEM L/A/F, segretega na 37 °C, in suspenzijo celic s serološko pipeto prenesli v 15 mL centrifugirko.
- Suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 1200 RPM na sobni temperaturi.
- Supernatant smo zavrgli, celice resuspendirali v 1 mL DMEM L/A/F, segretim na 37 °C, in suspenzijo prestavili v 1,5 mL mikrocentrifugirko.
- Štetje celic: 20 µL celične suspenzije smo zmešali z 20 µL tripanskega modrila. Nato smo 10 µL mešanice napipetirali na hemocitometer in s pomočjo mikroskopa prešteli celice (posebej smo šteli žive in mrtve celice) v štirih kvadrantih. Izračunali smo:
 - o število celic v 1,5 mL mikrocentrifugirki = (število živih celic)/4 x 2 (faktor redčenja) x 10⁴,
 - o viabilnost celic = (število živih celic)/(število vseh celic).
- V novo plastenko smo dali 5 mL gojišča, segretega na 37 °C, in primerno število celic iz suspenzije (če smo želeli približno 90-odstotno konfluenco celic čez štiri dni, smo jih

v platenko s površino 25 cm² dodali 100.000). Z mešanjem smo celice čim bolj enakomerno razporedili po dnu platenke in jo nato dali v inkubator. Platenki smo odvili ventil, da je lahko prišlo do izmenjave plinov.

Celice smo začeli presajati pri pasaži 4, poskuse pa smo izvajali na pasaži 7 in pasaži 9. Za gojenje celic smo uporabili gostoto nacepljanja 4000 celic/cm².

3.1.2. Transfekcija celic

Kljub temu, da nekateri viri navajajo, da celična linija HOS izraža estrogenski receptor alfa (18, 19), ga v celični liniji, ki smo jo uporabljali pri eksperimentu, nismo detektirali ne s prenosom po Westernu ne na nivoju RNA. Njegovo izražanje smo sprožili z vnosom plazmida pCMV-ESR1 (preglednica I), ki vsebuje zapis za ER- α (20).

Preglednica I: Plazmid pCMV-ESR1.

Plazmid pCMV-ESR1	
Velikost cDNA	1788 bp
Velikost vektorja	5657 bp
c [mg/ μ L] v TE pufri, pH=8	2,1
A _{260 nm} / A _{280 nm}	1,91
A _{260 nm} / A _{230 nm}	2,33

Za transfekcijo smo uporabili reagent X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (21):

- Celice smo precepili v platenko ali ploščo vsaj 5 ur pred transfekcijo in jih do transfekcije shranili v inkubatorju.
- Pred uporabo smo transfekcijski reagent in DMEM pol ure pustili na sobni temperaturi.
- V brezprašni celični komori smo plazmid tik pred uporabo odmrznili in ga nato z DMEM-om razredčili do koncentracije 0,01 μ g/ μ L.
- Raztopini smo za vsak μ g plazmida v raztopini dodali 3 μ L transfekcijskega reagenta X-tremeGENE HP DNA (reagent smo dodajali neposredno v raztopino tako, da se s pipetnim nastavkom nismo dotikali sten mikrocentrigurke).
- Mešanico smo narahlo premešali in pustili 30 minut na sobni temperaturi, da so nastali kompleksi plazmidne DNA s transfekcijskimi reagenti.

- Ustrezen volumen raztopine kompleksov smo nakapali v medij s celičnimi kulturami, rahlo premešali in celice vrnili v inkubator s temperaturo 37 °C, 5 % CO₂ ter visoko relativno vlažnostjo.

Za transfekcijo celic v plastenkah s površino 25 cm² smo v vsako plastenko dodali 50 µL raztopine kompleksov. Za transfekcijo celic, ki so bile precepljene na ploščo s 96 vdolbinami, smo pripravljeno raztopino kompleksov 2,5-krat redčili z DMEM-om. V vsako vdolbinico smo nato dodali 5 µL razredčene raztopine kompleksov, kar je enakovredno 2 µL raztopine nerazredčenih kompleksov.

3.1.3. Tretiranje celic z mimetiki hipoksije in estrogenom

Stanje, podobno hipoksiji, smo v celicah ustvarili tako, da smo gojišču dodali mimetik hipoksije deferoksamin mezilat (DFO) ali kobaltov klorid (CoCl₂).

Priprava raztopin:

- DFO smo raztopili v ultračisti vodi, da smo dobili raztopino s koncentracijo 50 mM.
- CoCl₂ smo raztopili v ultračisti vodi in redčili do koncentracije 100 mM.
- 17β-estradiol (E₂) smo raztopili v absolutnem etanolu, da smo dobili raztopino s koncentracijo 10 mM.
 - Pri nadaljnjih redčenjih vseh treh raztopin smo uporabljali DMEM L/A/F.
- Kontrolna raztopina pri E₂: absolutni etanol smo tolikokrat redčili z DMEM L/A/F, da smo dobili raztopino, ki je vsebovala enak delež etanola kot raztopina E₂.
- Kontrolna raztopina pri DFO/CoCl₂: 42 µL ultračiste vode smo zmešali z 958 µL DMEM L/A/F.

Pri testiranju viabilnosti celic smo gojišču dodali:

- raztopino E₂, da je bila končna koncentracija E₂ v vdolbini (v 105 µL) 10 nM,
- ali kontrolno raztopino, ki je vsebovala enak delež etanola kot raztopina E₂,
- raztopine DFO, da je znašala njegova koncentracija v gojišču 20, 50 ali 100 µM,
- raztopine CoCl₂, da je znašala njegova koncentracija v gojišču 50, 100 ali 200 µM,
- ali kontrolno raztopino, ki smo jo pripravili iz 42 µL ultračiste vode in 958 µL DMEM L/A/F.

Pri tretiranju celic za analizo izražanja genov smo gojišču dodali:

- raztopino E₂, da smo dosegli koncentracijo 10 nM,
- kontrolno raztopino pri E₂, ki vsebuje enako etanola kot raztopina E₂,
- raztopino DFO, da smo dosegli 20 μM,
- ali kontrolno raztopino pri DFO, ki smo jo pripravili iz 42 μL ultračiste vode in 958 μL DMEM L/A/F.

3.1.4. Določanje viabilnosti celic

Viabilnost celic smo preverjali 24 ur in 72 ur po tretiranju. Merili smo jo kolorimetrično s pomočjo reagenta CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Reagent vsebuje tetrazolijevo spojino – MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol), ki jo metabolično aktivne celice reducirajo v derivat formazana. Le-ta je topen v gojišču in absorbira svetlobo valovne dolžine 490 nm (22). Postopek merjenja:

- Celice 5. pasaže smo precepili na ploščo s 96 vdolbinami, da je gostota nacepljanja znašala 12.000 celic/cm² (pri merjenju viabilnosti po 24 h od tretiranja) oziroma 8.000 celic/cm² (pri merjenju viabilnosti po 72 h od tretiranja). Volumen suspenzije celic v gojišču je znašal 90 μL. V 8 vdolbin smo napipetirali samo 90 μL DMEM L/A/F.
- Po 5 h v inkubatorju smo jih transficirali s 5 μL raztopine razredčenih kompleksov in v polovico vdolbin dodali še 5 μL raztopine E₂, v drugo polovico pa 5 μL kontrolne raztopine pri E₂.
- Sledila je 24-urna inkubacija in nato 5 μL dodatki DFO, CoCl₂ ali kontrolne raztopine pri DFO in CoCl₂. Za vsako kombinacijo reagentov smo izvedli dve reakciji (duplikat).
- Plošče smo vrnili v inkubator.
- 22 oziroma 70 ur po dodatkih DFO, CoCl₂ ali kontrolne raztopine pri DFO smo v vdolbinice dodali 10 μL reagenta z MTS in inkubirali še 3-4 h.
- Na čitalcu mikrotitrskih plošč Safire 2 Plate Reader (Tecan) smo izmerili absorbanco svetlobe z valovno dolžino 490 nm.

3.2. Analiza izražanja genov

3.2.1. Priprava celičnih kultur

Celice smo precepili v plastenke s površino 25 cm² (kot je prikazano v preglednici II) in jih dali za približno 5 ur v inkubator, da so se pritrdile. Nato smo v plastenke dodali 50 µL raztopine kompleksov s plazmidom pCMV-ESR1, 50 µL raztopine kompleksov s plazmidom pcDNA3 (preglednica III), ki smo jo pripravili na enak način kot raztopino kompleksov s plazmidom pCMV-ESR1, ali 50 µL DMEM. Celicam smo nato dodali raztopino E₂ ali eno od kontrolnih raztopin, kot je razvidno iz preglednice IV (tretiranje 1), in jih inkubirali približno 16 ur, da se je estrogenski receptor α pričel izražati. Nato smo celicam dodali raztopino DFO, raztopino E₂ ali kontrolno raztopino pri DFO, kot je zapisano v preglednici IV (tretiranje 2). Po 24-urni ali 72-urni inkubaciji smo celice lizirali s QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN):

- Iz plastenke smo odstranili medij in celice sprali z 2,5 mL 1x PBS.
- Na celice smo pipetirali 1 ml reagenta QIAzol Lysis in nagibali platenko, da se je reagent porazdelil po celotni površini.
- Po 5-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo lizat prestavili v 1,5 ml mikrocentrifugirko.
- Lizat smo shranili v zamrzovalniku (-70 °C).

Vzorci smo označevali z imenom, sestavljenim iz številke 1, 2 ali 3 (kar označuje biološko ponovitev), časovnega intervala 24 ali 72 ter oznake tretiranja 0, pl, K, E, D ali DE (primeri: 272E, 124D, 372pl).

Preglednica II: Priprava celičnih kultur za eksperiment.

Biološka ponovitev	1		2		3	
Pasaža	7.		7.		9.	
Št. plastenk	6	6	6	6	6	8*
Gostota nacepljanja	12.000 celic/cm ²	8.000 celic/cm ²	12.000 celic/cm ²	8.000 celic/cm ²	12.000 celic/cm ²	8.000 celic/cm ²
Čas liziranja	24 ur po tretiranju	72 ur po tretiranju	24 ur po tretiranju	72 ur po tretiranju	24 ur po tretiranju	72 ur po tretiranju

Preglednica III: Plazmid pcDNA3.

Plazmid pcDNA3	
Velikost vektorja	5,4 kbp
c [mg/ μ L]	0,7

Preglednica IV: Tretiranje celičnih kultur.

Plastenka	Oznaka	Transfekcija	Tretiranje 1	Tretiranje 2
1	0	DMEM	50 μ L kontrolne raztopine pri E ₂	47,6 μ L kontrolne raztopine pri DFO
2	Pl	pcDNA3	50 μ L kontrolne raztopine pri E ₂	47,6 μ L kontrolne raztopine pri DFO
3	K	pCMV-ESR1	50 μ L kontrolne raztopine pri E ₂	47,6 μ L kontrolne raztopine pri DFO
4	E	pCMV-ESR1	47,6 μ L kontrolne raztopine pri DFO	50 μ L raztopine E ₂
5	D	pCMV-ESR1	50 μ L kontrolne raztopine pri E ₂	47,6 raztopine DFO
6	DE	pCMV-ESR1	50 μ L raztopine E ₂	47,6 raztopine DFO
7*	D ₂	pCMV-ESR1	50 μ L kontrolne raztopine pri E ₂	47,6 raztopine DFO
8*	DE ₂	pCMV-ESR1	50 μ L raztopine E ₂	47,6 raztopine DFO

* pri tretji biološki ponovitvi smo za 72-urni eksperiment pripravili po dve platenki za vzorec D in dve platenki za vzorec DE, ker je pri predhodnih bioloških ponovitvah zaradi delovanja DFO tretiranje preživelo vidno manj celic kot ostala tretiranja in smo želeli pridobiti dovolj vzorca za analize.

3.2.2. Izolacija in vrednotenje kakovosti RNA

Komoro za izolacijo RNA, pripomočke in reagente smo očistili z RNaseZap in komoro 15 minut izpostavili UV svetlobi. Celične lizate smo odmrznili na sobni temperaturi, jim v digestoriju dodali 200 μ L kloroforma, vsebino premešali s stesanjem in počakali 3 minute, da je prišlo do ločitve faz. Po ponovnem stesanju in 3-minutnem čakanju smo mikrocentrifugirke centrifugirali 15 minut s pospeškom 12.000 g pri temperaturi 4 °C. Delo smo nadaljevali v komori za izolacijo RNA. 400 μ L zgornje, vodne faze smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in izolacijo nadaljevali s kompletom miRNeasy Mini Kit po navodilu proizvajalca (23). Z omenjenim kompletom reagentov lahko iz biološkega materiala izoliramo celokupno RNA, kar vključuje mRNA, rRNA (ribosomska RNA) in manjše RNA. Vzorce RNA iz platenk 0, pl, k in E smo eluirali s 45 μ L vode brez RNaz, medtem ko smo vzorce iz platenk D in DE, kjer smo pričakovali manjše količine RNA,

eluirali v 30 μ L vode brez RNAz. Pri tretji biološki ponovitvi smo celična lizata D in D₂ ter DE in DE₂ združili na isti koloni ter ju eluirali s 30 μ L vode brez RNAz. Organski fazi, ki je ostala pri izolaciji RNA in vsebuje proteine, smo dodali 300 μ L 100 % etanola, vsebino premešali in počakali 3 minute. Po 5-minutnem centrifugiranju s pospeškom 2000 g pri 4 °C smo supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko in ga shranili pri -70 °C. Vzorcem RNA smo na spektrofotometru NanoDrop ND 1000 z merjenjem absorbanc določili koncentracijo in razmerje absorbanc svetlobe z valovno dolžino 260 nm in 280 nm (A_{260}/A_{280}) ter 260 nm in 230 nm (A_{260}/A_{230}). Koncentracija je izračunana po Beer-Lambert-ovi enačbi:

$$c = (A * \epsilon) / b;$$

pri čemer je A absorbanca pri 260 nm, ϵ molarni absorpcijski koeficient, ki znaša za RNA 40 ng*cm/ μ L, ter b dolžina poti v centimetrih (1 cm). Čeprav spektrofotometer izmeri absorbanco na poti 1 mm, je podatek normaliziran na 1 cm. Iz razmerja A_{260}/A_{280} lahko sklepamo na čistost raztopine: pri čisti raztopini RNA znaša A_{260}/A_{280} približno 2,0; nižje vrednosti lahko pomenijo prisotnost DNA, proteinov ali organskih topil. Drugo merilo za čistost raztopine je razmerje A_{260}/A_{230} . Pri čisti RNA je razmerje med 1,8 in 2,2, nižje vrednosti običajno pomenijo prisotnost organskih topil (24).

Razgrajenost RNA smo ovrednotili s pomočjo aparata 2100 Bioanalyzer (Agilent) po protokolu za komplet reagentov RNA 6000 Nano Lab Chip Kit. Na čipu se nahaja preplet mikrokanalov, v katerih je gel z barvilom, kjer poteka elektroforetska ločba fragmentov RNA. Reagenti RNA denaturirajo, zato se fragmenti ločujejo le na podlagi velikosti. Po koncu ločbe aparat zazna fluorescenco, ki jo oddajajo obarvani vzorci. Rezultat analize je elektroferogram, na podlagi katerega programska oprema s posebnim algoritmom izračuna vrednost RIN (RNA integrity number), ki omogoča lažjo interpretacijo rezultatov. RIN lahko zavzame vrednosti od 1 do 10, pri čemer 1 označuje popolnoma razgrajen, 10 pa najbolj ohranjen vzorec (25, 26).

3.2.3. Prepis RNA v cDNA

Da bi lahko izmerili količino RNA za posamezen gen v vzorcu, smo molekule RNA prepisali v bolj stabilne enoverižne cDNA (komplementarne DNA), ki smo jih lahko analizirali z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Uporabljali smo komplet reagentov Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) (27). Ta vsebuje rekombinantno

reverzno transkriptazo, ki izvede prepis in po prepisu RNA razgradi. V reakcijsko zmes smo dodali dve vrsti oligonukleotidnih začetnikov: naključne oligonukleotidne začetnike (heksamere), ki omogočajo prepisovanje vzdolž celotne RNA molekule, in sidrane oligo-T začetnike, ki se vežejo na poli-A repke RNA molekule. Reakcijsko zmes so sestavljali še reakcijski pufer z magnezijevimi ioni, inhibitor proteaz in zmes deoksinukleotidov, kot je prikazano v preglednici V.

Preglednica V: Reakcijska zmes za prepis RNA v cDNA.

Sestavina	Volumen
raztopina RNA (c=200 ng/ μ L)	10 μ L
sidrani oligo-T začetniki (50 μ M)	1 μ L
naključni oligonukleotidni začetniki (heksameri) (600 μ M)	2 μ L
reakcijski pufer - 5x (250mM Tris/HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl ₂ , pH=8,5)	4 μ L
inhibitor proteaz (40 U/ μ L)	0,5 μ L
zmes deoksinukleotidov (10 mM vsakega od dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2 μ L
reverzna transkriptaza (20 U/ μ L)	0,5 μ L

Preglednica VI: Pogoji reakcije prepisa RNA v cDNA.

	Čas	Temperatura
Prileganje	10 min	25 °C
Prepisovanje	60 min	50 °C
inaktivacija transkriptaze	5 min	85 °C
Ohlajanje		4 °C

Vzorci smo pripravljali v komori za delo z vzorci RNA, ki smo jo očistili, kot je opisano pri poglavju izolacija RNA. Reagente smo pred uporabo odmrznili in jih do uporabe shranili na ledu. Raztopine RNA smo redčili z vodo brez nukleaz do koncentracije 200 ng/ μ L, jim dodali sidrane in naključne oligonukleotidne začetnike, zmes 10 minut segrevali na 65 °C in nato ohladili na ledu. Dodali smo še zmes reakcijskega pufra, inhibitorja proteaz, deoksinukleotidov in reverzne transkriptaze. Ko smo vse sestavine premešali, smo na aparatu 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) izvedli prepis pod pogoji, ki so navedeni v preglednici VI. Prepis smo izvedli za vse izolirane vzorce.

Priprava vzorca –RT (vzorec brez reverzne transkriptaze): Za kontrolo v naslednjih stopnjah smo potrebovali tudi vzorec –RT. Pripravili smo ga tako, da smo v reakcijsko

zmes namesto 0,5 μL reverzne transkriptaze dodali 0,5 μL vode brez nukleaz. Ta postopek smo izvedli za dva vzorca: 2720 in 272E.

3.2.4. Merjenje izražanja genov

Izražanje genov smo merili z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR, tudi verižna reakcija s polimerazo v realnem času), ki omogoča detekcijo DNA že med potekom reakcije. V ta namen je v reakcijski zmesi barvilo, ki fluorescira po vezavi na dvoverižno DNA. Fluorescenca je sorazmerna s količino DNA, zato lahko z merjenjem intenzitete fluorescence sprti spremljamo nastajanje produkta. Iz grafa intenzitete fluorescence v odvisnosti od cikla določimo cikel, ko je fluorescenca značilno višja od ozadja – C_q (quantification cycle). Višji kot je C_q, manjše je izražanje merjenega gena v vzorcu.

Pred merjenjem izražanja genov v vzorcih smo preverili, če verižna reakcija s polimerazo z izbranimi oligonukleotidni začetniki uspešno poteče, in določili optimalno koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov in cDNA v reakcijski zmesi, s katerima bomo dosegli najbolj ustrezen potek reakcije. Ugotavljali smo, ali začetniki prepisujejo DNA, ali med reakcijo nastajajo nespecifični produkti in kakšna je učinkovitost podvajanja tarčnega odseka cDNA.

Najprej smo komoro za delo z vzorci DNA in pripomočke očistili s 3 % hipokloritom ter komoro pol ure obsevali z UV svetlobo. Vse vsebnike reagentov smo pred vnosom v komoro prebrisali s 3 % hipokloritom. Vzorec mešane cDNA smo pripravili iz 20 μL cDNA 1720, 172pl 172K, 172E in 272K s koncentracijo 100 ng/ μL . Redčili smo jo, da smo dobili raztopine za umeritveno krivuljo s koncentracijami 16, 8, 4, 2 in 1 ng/ μL . Vzorec –RT_k smo pripravili iz 20 μL –RT 2720 in 272E s koncentracijo 100 ng/ μL in ga redčili do 8 ng/ μL . Raztopino DNA smo pripravili iz vzorca DNA iz laboratorija tako, da smo jo redčili do koncentracije 8 ng/ μL . Z eksperimentom, pri katerem smo uporabili genomsko DNA, smo potrdili, da so nukleotidni začetniki zasnovani tako, da prepoznajo le gene z izrezanimi introni, kakršne najdemo na cDNA. Takšna zasnova zmanjšuje vpliv morebitne kontaminacije vzorcev z DNA. Za kontrolo brez matrice (NTC – no template control) in za vsa redčenja smo uporabili vodo brez nukleaz. Vse vzorce smo do uporabe

shranjevali na ledu. Reakcijsko zmes so sestavljali univerzalna zmes reagentov SYBR Select Master Mix (28), istosmerni in obratnosmerni oligonukleotidni začetnik, voda brez nukleaz in vzorec. Ustrezno razredčeno univerzalno zmes reagentov z oligonukleotidnimi začetniki smo premešali s pipeto in jo nanесли na ploščico s 384 vdolbinicami – v vsako vdolbinico po 10 μ L. Nato smo dodali 5 μ L ustreznega vzorca, tako da je bila vsaka reakcija ponovljena trikrat. Ploščico smo prekrili z lepljivo folijo in jo centrifugirali 5 minut s hitrostjo 2300 RPM pri sobni temperaturi. Po končanem centrifugiranju smo jo vstavili v aparat LightCycler in zagnali nastavljen program (preglednica VII). Postopek smo ponovili za vsak par oligonukleotidnih začetnikov (preglednica VIII). Za nadaljnjo analizo smo izbrali začetnike, ki so imeli učinkovitost umeritvene krivulje blizu 2, niso prepisovali DNA in pri katerih v talilni krivulji nismo opazili nespecifičnih produktov.

Preglednica VII: Program reakcije qPCR.

Korak	Temperatura	Čas	Število ciklov
Aktivacija UDG (uracil-DNA glikozilaza)	50 °C	2 min	/
Aktivacija DNA polimeraze	95 °C	2 min	/
Pomnoževanje	95 °C	5 s	50
	60 °C	1 min	
Talilna krivulja	95 °C	5 s	/
	65 °C	1 min	
	0d 65 °C do 97 °C	(hitrost segrevanja 0,11 °C/s)	
Ohlajanje	40 °C	30 s	/

Preglednica VIII: Podatki o oligonukleotidnih začetnikih I.

Gen	Ime začetnika	Zaporedje (5' → 3')	T _m	Načrtovanje
<i>KAT5</i>	KAT5-F	GGGAGGTGGGTAGAGCCC	60,0	Načrtovali sami
	KAT5-R	GCCAGGGGCCACTCAT	58,2	Načrtovali sami
<i>HAT1</i>	HAT1-F	CGGAAATGGCGGGATTGGT	58,5	Načrtovali sami
	HAT1-R	AGTTTCTTCTCCACTGCACTCT	55,9	Načrtovali sami
<i>MYST1</i>	MYST1-F	CGGATAGCACCTGGCATTCT	57,2	Načrtovali sami
	MYST1-R	CCGGTTAAAGCCCACGTAGT	57,3	Načrtovali sami
<i>HDAC6</i>	HDAC6-F	GATCTGGCGGAGTGGGAAGAACC	59,8	Načrtovali sami
	HDAC6-R	TTCTTCGCTGCCTGGTTGTG	58,2	Načrtovali sami
<i>HDAC7</i>	HDAC7-77-F	ACCTGGCTGCTTTCAGGATA	56,1	Načrtovali sami
	HDAC7-77-R	TCCAGCAGACACCAGGACTA	57,5	Načrtovali sami
	HDAC7-F	CTCTCGCCGTCTCACAGTC	57,5	Načrtovali sami
	HDAC7-R	CTCACCTGGGTCCCATCAGC	60,1	Načrtovali sami

Gen	Ime začetnika	Zaporedje (5' → 3')	Tm	Načrtovanje
	HDAC7-120-F	AGCCTCCGGCGACTGG	60,9	Načrtovali sami
	HDAC7-120-R	ACCTGGGTCCCATCAGCG	60,1	Načrtovali sami
<i>HDAC9</i>	HDAC9-F	TGTAGCTGGTGGAGTTCCT	57,9	Načrtovali sami
	HDAC9-R	CTCTGAGGCCAAAGGTGCAGA	57,3	Načrtovali sami
<i>SIRT1</i>	SIRT1-F	TCTAACTGGAGCTGGGGTGT	57,9	Načrtovali sami
	SIRT1-R	TCTACAGCAAGGCGAGCATAA	56,2	Načrtovali sami
<i>SIRT6</i>	SIRT6-F	TTCCCCAGGGACAAACTGGC	60,1	Načrtovali sami
	SIRT6-R	GCGTCTTACACTTGGCACATTC	56,6	Načrtovali sami
<i>DNMT3A</i>	DNMT3A-F	GAAGGACTTGGGCATTTCAG	53,4	Načrtovali sami
	DNMT3A-R	CCGACGTACATGATCTTCCC	55,0	Načrtovali sami
<i>MBD1</i>	MBD1-F	ACCATGAATCCGCTCCCAAG	57,5	Načrtovali sami
	MBD1-R	TCCATGGTCTTCAGCTTTGC	55,6	Načrtovali sami
<i>MYST4</i>	MYST4-70-F	CGTTTGAAGTTCCAATTCTGGTCT	55,6	Načrtovali sami
	MYST4-70-R	AGGAAAGACTGCATTTCGGGT	56,6	Načrtovali sami
	MYST4-F	AAATGGCGGGCGGCTTAG	56,2	Načrtovali sami
	MYST4-R	CAGGCAAATCTGGCTGCG	57,3	Načrtovali sami
	MYST4-117-F	ATGAGAAAGACCAGCCCCGT	58,7	Načrtovali sami
	MYST4-117-R	TGCCACAATCTGCACAAGAGA	57,0	Načrtovali sami
<i>RPLP0</i>	RPLP0-F	TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT	56,1	Načrtovali sami
	RPLP0-R	CAATCTGCAGACAGACTGG	55,7	Načrtovali sami
<i>HIF1α</i>	HIF1A-F	CGAAGTAGTGCTGACCCTGC	58,0	Načrtovali sami
	HIF1A-R	GGACTATTAGGCTCAGGTGAACT	55,9	Načrtovali sami
<i>VEGFA</i>	VEGFA-F	AGCCTTGCCCTTGCTGCTTACC	62,0	(29)
	VEGFA-R	GTGATGATTCTGCCCTCCTCCTC	59,2	(29)
<i>AXIN2</i>	2AXIN2-F	AGTGTGAGGTCCACGGAAAC	57,2	(30)
	2AXIN2-R	TGGCTGGTGCAAAGACATAG	55,3	30)
<i>OPG</i>	OPG-F	GAAGGGCGCTACCTTGAGAT	56,9	Načrtovali sami
	OPG-R	GCAAACCTGATTTTCGCTCTGG	54,3	Načrtovali sami
<i>ESR1</i>	2ESR1-F	GAATCTGCCAAGGAGACTCGC	58,0	(31)
	2ESR1-R	ACTGGTTGGTGGCTGGACAC	60,2	(31)
<i>RANKL</i>	RANKL-F	TGATTCATGTAGGAGAATTAACAGG	53,0	Načrtovali sami
	RANKL-R	GATGTGCTGTGATCCAACGA	55,2	Načrtovali sami

Oligonukleotidne začetnike smo naročili pri podjetju Sigma-Aldrich. Tm smo določili s pomočjo programske opreme OligoAnalyzer (32).

Po izboru primernih oligonukleotidnih začetnikov, njihove koncentracije in koncentracije dodane cDNA (izbor je povzet v preglednici IX) smo za vsak vzorec izvedli reakcijo qPCR na enak način kot pri optimizaciji. Za umeritveno krivuljo smo uporabili vzorec mešane cDNA, ki smo jo pripravili iz 20 μ L vsake od sledečih raztopin cDNA: 324K, 324E, 324P, 324D, 372K, 372E, 372P in 372D s koncentracijo 100 ng/ μ L. S pomočjo umeritvene krivulje, določene za vsak gen posebej, smo kvantificirali cDNA proučevanega gena. Iz koncentracij hišnih genov (*RPLP0* – gen za 60S acidic ribosomal protein P0 (angl.) in *MYST4*) smo izračunali geometrično sredino za vsak vzorec. Koncentracije ostalih genov smo delili z ustrezno geometrično sredino, da smo dobili popravljeno koncentracijo, s čimer smo delno izločili slučajne razlike v izražanju, ki so posledica napak pri redčenju.

Preglednica IX: Izbrani pogoji za analizo izražanja s qPCR.

Gen	Oligonukleotidni začetnik	Koncentracija posameznega oligonukleotidnega začetnika v končni reakcijski zmesi (v 15 μL)	Koncentracija dodane cDNA
<i>KAT5</i>	KAT5	300 nM	4 ng / μL
<i>HAT1</i>	HAT1	300 nM	4 ng / μL
<i>MYST1</i>	MYST1	300 nM	4 ng / μL
<i>HDAC6</i>	HDAC6	300 nM	4 ng / μL
<i>HDAC7</i>	HDAC7-77	300 nM	4 ng / μL
<i>HDAC9</i>	HDAC9	300 nM	4 ng / μL
<i>SIRT1</i>	SIRT1	300 nM	4 ng / μL
<i>SIRT6</i>	SIRT6	300 nM	4 ng / μL
<i>DNMT3A</i>	DNMT3A	300 nM	4 ng / μL
<i>MBD1</i>	MBD1	300 nM	4 ng / μL
<i>MYST4</i>	MYST4-70	300 nM	4 ng / μL
<i>RPLP0</i>	RPLP0	100 nM	4 ng / μL
<i>HIF1α</i>	HIF1A	300 nM	4 ng / μL
<i>VEGFA</i>	VEGFA	300 nM	4 ng / μL
<i>AXIN2</i>	2AXIN2	300 nM	4 ng / μL
<i>OPG</i>	OPG	600 nM	4 ng / μL
<i>ESR1</i>	2ESR1	300 nM	4 ng / μL
<i>RANKL</i>	RANKL	600 nM	8 ng / μL
<i>MYST4</i>	MYST4-70	300 nM	8 ng / μL
<i>RPLP0</i>	RPLP0	100 nM	8 ng / μL

3.3. Analiza proteinov

3.3.1. Izolacija proteinov

Iz organske faze, ki je ostala pri izolaciji RNA, smo izolirali proteine, da bi preverili, če je bila transfekcija uspešna in če se estrogenski receptor α izraža. Sledili smo protokolu za izolacijo proteinov po lizi celic z reagentom TRIzol (33):

- Supernatant smo odmrznili na sobni temperaturi.
- 700 μL supernatanta smo prenesli v novo 2 mL mikrocentrifugirko in dodali 1300 μL izopropanola.
- Vsebinsko smo premešali z obračanjem in pustili 10 minut na sobni temperaturi, da so se proteini oborili.

- Vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 12.000 x g. Supernatant smo zavrgli.
- Peletkam smo dodali 1,8 ml 0,3 M gvanidinijevega klorida v 95 % etanolu, pustili 20 minut na sobni temperaturi in vmes večkrat premešali, da smo vzorec čim bolj sprali. Nato smo vzorce centrifugirali 5 minut pri 4 °C in 7.500 x g. Supernatant smo zavrgli in spiranje še 2 x ponovili.
- V mikrocentrifugirke smo dodali 1,8 ml 100 % etanola, vsebino 30 sekund mešali z vibracijskim mešalnikom in pustili na sobni temperaturi 20 minut.
- Po 5-minutnem centrifugiranju pri 4 °C in 7.500 x g smo supernatant zavrgli ter mikrocentrifugirke odprli, da se je peletka posušila na zraku.
- V mikrocentrifugirke smo dodali 100 µL 1 % SDS, premešali in pustili čez noč na sobni temperaturi. Vzorcem smo dodali še 100 µL 1 % SDS in inkubirali 3 ure na vodni kopeli (50 °C), da so se proteini raztopili.
- Bistvo raztopino smo centrifugirali 10 minut pri sobni temperaturi s pospeškom 10.000 x g.
- Supernatant smo prenesli v nove mikrocentrifugirke in ga shranili pri -20 °C.

3.3.2. Določanje koncentracije proteinov

Raztopinam proteinov smo izmerili koncentracijo s kompletom reagentov DC Protein Assay (BIO RAD) (34). Komplet vsebuje bazično raztopino bakrovega tartrata in Folin-Ciocalteu-ov reagent. V bazičnem okolju proteini reagirajo z bakrom, nato pa reducirajo Folin-Ciocalteu-ov reagent. Po 15 minutah se razvije modro obarvanje, ki absorbira svetlobo valovne dolžine 750 nm. Gre za izboljšano Lowry-evo metodo, pri kateri je obarvanje stabilno še 1 uro po dodatku reagentov.

Reakcijo smo izvedli po protokolu za mikrotitrsko ploščo in izmerili absorbanco na čitalcu mikrotitrskih plošč Safire 2 Plate Reader (Tecan). Za slepo raztopino smo uporabili 1 % SDS. Koncentracijo proteinov smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki so jo sestavljale raztopine govejega serumskega albumina (BSA) s koncentracijami: 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1,0 mg/mL ter 1,5 mg/mL. Ustrezne redčitve smo pripravljali z 1 % raztopino SDS.

3.3.3. Analiza proteinov s prenosom po Westernu

Proteine smo ločili z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS). SDS je anionski detergent, ki proteinom poruši terciarno strukturo. Na proteine se veže v stalnem razmerju približno 1 molekula SDS na dve aminokislini, prekrije naboj proteinov in jim da negativen naboj, ki je sorazmeren z njihovo velikostjo. S tem dosežemo, da se proteini v gelu ločujejo le na podlagi velikosti (35).

Za ločevanje proteinov smo pripravili poliakrilamidni gel: v 1,5 mm režo med stekelci smo vlili mešanico za 8 % ločevalni gel in nanj nakapali izopropanol, ki je poravnal gladino gela. Ko se je gel strdil (po približno 15 minutah), smo izopropanol odlili, površino sprali z ultra čisto vodo in na ločevalni gel vlili še mešanico za 5 % koncentracijski gel. V mešanico smo vstavili glavniček, da se je med strjevanjem gela na vrhu oblikovalo 10 žepkov. Ko se je tudi koncentracijski gel strdil, smo iz gela odstranili glavniček in gel prenesli v kadičko za elektroforezo, v kateri je bil 1 x tris-glicinski pufer. Raztopine proteinov smo z 1 % SDS-om razredčili do koncentracije, kot je prikazano v preglednici X. Različne koncentracije smo uporabili, ker so bile osnovne raztopine proteinov nekaterih vzorcev nizke, kar nam ni omogočalo, da bi lahko vse raztopine razredčili na enako in dovolj visoko koncentracijo. Koncentracije smo izbirali tako, da so bile čim višje, a hkrati čim bolj primerljive znotraj ene biološke ponovitve. Za pozitivno kontrolo smo pripravili vzorec proteinov izoliran iz celične linije MCF7. 45 μ L vsake od raztopin proteinov smo dodali 15 μ L nanašalnega pufra in zmes 5 minut kuhali v vreli vodi, da so se proteini denaturirali. Nato smo vzorce do nanosa hranili na ledu. V prvi žepki smo nanесли 5 μ L označevalca velikosti SeeBlue Plus2, v ostale žepke pa smo nanесли 50 μ L pripravljenih vzorcev. V zadnji žepki smo nanесли raztopino proteinov iz celic MCF7. Kadičko smo za 110 minut priklopili na napetost 100 V in tok 400 mA, da je na gelu prišlo do ločbe proteinov.

Preglednica X: Koncentracije raztopin proteinov.

Vzorec	Koncentracija raztopine proteinov
124 0, pl, K, E, D, DE	1,2 mg/mL
MCF7 (za 124)	1,2 mg/mL
172 0, pl, K, E, DE	0,8 mg/mL
172D	0,7 mg/mL (brez redčenja)
MCF7 (za 172)	0,8 mg/mL
224 K, D, DE	0,8 mg/mL
2240	0,7 mg/mL (brez redčenja)
224pl	0,4 mg/mL (brez redčenja)
224E	0,6 mg/mL (brez redčenja)
MCF7 (za 224)	0,8 mg/mL
272 0, pl, K, E, D	0,8 mg/mL
272DE	0,2 mg/mL (brez redčenja)
MCF7 (za 272)	0,8 mg/mL
324 0, pl K, E, DE	0,6 mg/mL
324D	0,5 mg/mL (brez redčenja)
MCF7 (za 324)	0,6 mg/mL
372 0, pl, K, E	0,8 mg/mL
372D	0,4 mg/mL (brez redčenja)
372 DE	0,5 mg/mL (brez redčenja)
MCF7 (za 372)	0,8 mg/mL

Po elektroforezi smo proteine prenesli na nitrocelulozno membrano iBlot® Transfer Stack z aparatom iBlot Dry Blotting System po navodilu proizvajalca.

Po koncu prenosa smo na membrani ugotavljali prisotnost HIF1 α , estrogenskega receptorja α in β -aktina:

- Membrano smo prenesli v petrijevko, jo prelili s 25 mL 5 % mleka v 1 x TTBS in jo stresali (hitrost približno 20 obratov na minuto) 1 h na sobni temperaturi. Proteini iz mleka blokirajo prosta vezavna mesta na membrani in tako zmanjšajo nespecifično vezavo protiteles na membrano.
- Nato smo membrano sprali z 1 x TTBS, jo prelili z raztopino primarnih protiteles in dali na stresalnik (približno 20 obratov na minuto) čez noč na 4 °C.
- Zjutraj smo membrano na sobni temperaturi spirali 3 x po 5 minut z 1 x TTBS, da smo odstranili nevezana protitelesa.
- Membrano smo nato prenesli v petrijevko z raztopino sekundarnih protiteles – proti protitelesom, ki prepoznavajo preiskovani protein. Petrijevko smo 1 h stresali (20 obratov na minuto) na sobni temperaturi.

- Sledilo je 6-kratno spiranje membrane z 1 x TTBS (vsako spiranje je trajalo 5 minut).
 - V mikrocentrifugirki smo zmešali 500 μ L raztopine peroksida in 500 μ L raztopine luminola iz kompleta reagentov SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat (36). Na stekleno površino smo napeli parafilm in nanj prenesli mešanico reagentov. Membrano smo položili na kapljo mešanice tako, da se je mešanica reagentov razporedila pod celotno membrano. Sekundarna protitelesa so označena s hrenovo peroksidazo, ki v prisotnosti peroksida oksidira luminol v reagentu. Med reakcijo se razvije svetloba.
 - Po 5 minutah (3 minutah pri detekciji β -aktina) smo membrano vložili med dva lista prozorne folije in jo vstavili v temno komoro G:BOX, kjer smo s pomočjo programa GeneSnap posneli kemiluminiscenco (brez filtrov, zajemanje slike je trajalo 30 s, posneli smo 6 posnetkov).
 - Membrano smo dvakrat sprali z 1 x TTBS (2 x 5 minut) in jo nato prenesli v kadičko s pufrom za odstranjevanje vezanih protiteles («stripping buffer»). Kadičko smo dali na ogrevan stresalnik in jo 1 h stresali s hitrostjo 30 RPM pri 60 °C v digestoriju.
 - Po 1 h smo membrano prenesli v kadičko z 1 x TTBS in jo dvakrat po 5 minut in enkrat po 20 minut stresali na stresalniku (30 obratov na minuto) na sobni temperaturi, da smo z membrane sprali ves pufer za odstranjevanje protiteles. Za detekcijo drugega proteina smo postopek ponovili.
- Uporabljene raztopine protiteles so navedene v preglednici XI.

Preglednica XI: Raztopine protiteles.

Protein	Primarna protitelesa	Raztopina primarnih protiteles	Sekundarna protitelesa	Raztopina sekundarnih protiteles
HIF1α	Zajčja poliklonska anti HIF1 α	1: 800 s 3 % BSA v 1x TTBS (končna koncentracija: 0,25 μ g/mL)	Kozja, anti zajčja HRP protitelesa	1:5000 z raztopino 5 % mleka v 1x TTBS (končna koncentracija: 0,2 ng/mL)
ER-α	Mišja monoklonska anti ER- α	1: 800 s 3 % BSA v 1x TTBS (končna koncentracija: 0,25 μ g/mL)	Kozja, anti mišja HRP protitelesa	1:5000 z raztopino 5 % mleka v 1x TTBS (končna koncentracija: 0,2 ng/mL)
B-aktin	Mišja monoklonska anti B-aktin	1: 10.000 s 3 % BSA v 1x TTBS (1 del raztopine redčimo v 10.000 delih pufra – ni podatka o koncentraciji osnovne raztopine)	Kozja, anti mišja HRP protitelesa	1:15.000 z raztopino 5 % mleka v 1x TTBS (končna koncentracija: 0,07 ng/mL)

3.4. Statistična analiza

Za statistično analizo smo uporabili programski paket IBM SPSS Statistics, Version 20. Primerjavo rezultatov viabilnosti smo izvedli z ANOVO ter Tukeyevim post-hoc testom. Primerjavo skupin pri analizi izražanja genov smo izvedli s t-testom: kontrolno skupino (K) smo primerjali s skupinami E, D in DE. Pri t-testu smo upoštevali, da sta varianci primerjanih skupin enaki, razen v primerih, ko je bil rezultat Levenovega testa enakosti varianc manjši od 0,05; v tem primeru smo izbrali t-test, ki ne predpostavlja enakosti varianc. Na grafih so rezultati prikazani kot povprečje \pm SD (standardna deviacija) treh neodvisnih bioloških ponovitev. Za statistično signifikantne razlike med skupinami smo izbrali mejo $p < 0,05$. Vsi rezultati izražanja genov so normalizirani z geometrično sredino izražanja referenčnih genov *RPLP0* in *MYST4*.

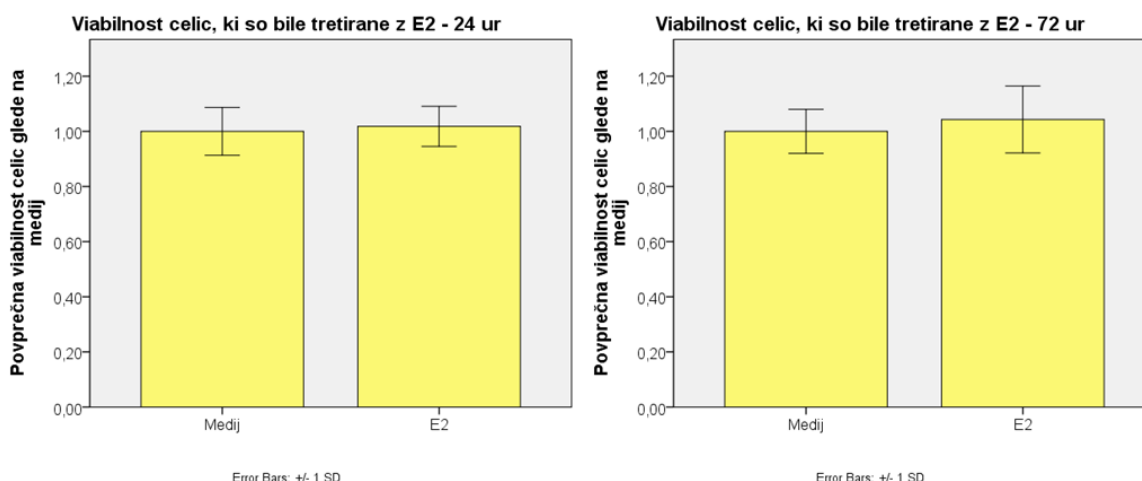
4. Rezultati in razprava

Z eksperimenti smo želeli ovrednotiti vpliv estrogenov in hipoksije kot tudi vpliv hipoksije ob sočasni izpostavljenosti estrogenom na izražanje izbranih genov, vpletenih v epigenetske mehanizme. Za modelne učinkovine smo izbrali 17β -estradiol – model za estrogene, ter deferoksamin – DFO in CoCl_2 , ki sta v celicah simulirala stanje, podobno hipoksiji. Pretirana izpostavljenost celic HOS omenjenim substancam lahko vodi do odmrta celic, zato smo pri vseh treh najprej preverili vpliv na viabilnost celic. Na podlagi teh rezultatov smo izbrali primerni modelni učinkovini in koncentraciji, s katerima smo zagotovili, da je do zadnje proučevane časovne točke v modelu preživel dovolj celic za kasnejšo analizo celičnega materiala. Ker se v osnovnem celičnem modelu tarča za estrogen – ER- α ni izražal, smo ga v celice HOS vnesli s transfekcijo. Ustreznost celičnega modela in s tem uspešnost transfekcije smo spremljali preko izražanja ER- α , medtem ko smo učinkovitost tretiranja z mimetikom hipoksije preverjali preko izražanja *HIF1A* in *VEGFA*. V postavljenem celičnem modelu smo z izbranim tretiranjem pridobili celični material, na katerem smo lahko proučili učinke estrogenov, hipoksije in kombinacije obeh dejavnikov na epigenetske mehanizme. Analizirali smo izražanje mRNA 10 različnih genov, vpletenih v epigenetske mehanizme, in sicer tri histonske acetiltransferaze (*KAT5*, *HAT1* in *MYST1*), pet histonskih deacetilaz (*HDAC6*, *HDAC7*, *HDAC9*, *SIRT1* in *SIRT6*) ter mRNA za dva proteina, povezana z metilacijo DNA (*DNMT3A* in *MBD1*). Z izborom navedenih genov smo se osredotočili na dva epigenetska mehanizma: acetilacijo histonov in metilacijo DNA. Dodatno smo poleg vpliva na epigenetske mehanizme preko gena *AXIN2* v celicah spremljali tudi vpliv na aktivnost signalne poti Wnt/ β -katenin, ki je vpletena v procese izgradnje kostnine. Spremljali smo tudi izražanje genov *RANKL* in *OPG*. Njuno razmerje je pomembno za aktivacijo osteoklastov, kar vpliva na intenziteto resorpcije kostnine.

4.1. Vpliv na viabilnost celic

4.1.1. 17β -estradiol

Celice smo izpostavili 10 nM koncentraciji E_2 . S testom viabilnosti smo preverili, če koncentracija vpliva na preživetje celic v primerjavi z netretiranimi celicami. Med skupinama ni bilo signifikantnih razlik ($p(24)=1,000$; $p(72)=0,996$), zato zaključujemo, da izbrana koncentracija E_2 ne vpliva na preživetje celic po 24 oziroma 72 urah (slika 5). Primerljive koncentracije E_2 so uporabili tudi v virih (37–39), kjer so dokazali, da je takšna koncentracija estradiola dovolj velika, da povzroči učinke v celicah. V organizmu so sicer povprečne serumske koncentracije estradiola med 8–13 pg/ml pri moških in 3–17 pg/ml pri ženskah (kar znaša 29–48 pM za moške oziroma 11–62 pM za ženske, za starostne skupine od 20 let do starejših od 60 let) (40). Bolj relevantni bi bili podatki o tkivnih koncentracijah, vendar žal niso na voljo.

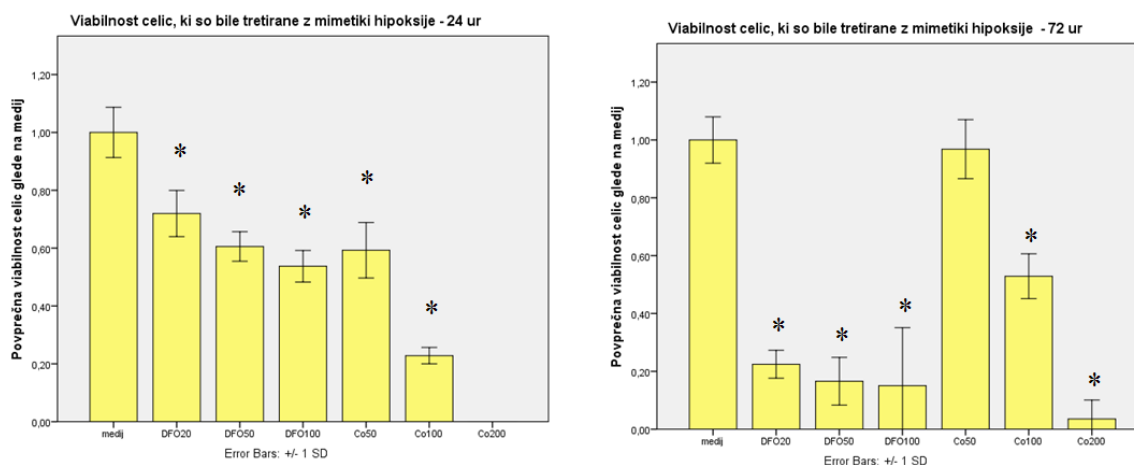


Slika 5: Viabilnost celic, tretiranih z E_2 .

4.1.2. $CoCl_2$ in DFO

V večini skupin smo zaznali znižanje viabilnosti v primerjavi z medijem. Po 24 urah se je v skupinah, ki so bile tretirane z 20, 50 oziroma 100 μ M DFO, število metabolno aktivnih celic zmanjšalo za 30, 40 oziroma 50 %. $CoCl_2$ je še bolj vplival na viabilnost: 50, 100 oziroma 200 μ M $CoCl_2$ je število metabolno aktivnih celic zmanjšalo za 40, 80 oziroma 100 %. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da za eksperiment izberemo najmanjšo koncentracijo DFO, saj že izkazuje učinke, hkrati pa najmanj vpliva na preživetje celic po

24 urah. Učinek DFO je prisoten tudi po 72 urah, ko ga pri 50 μM CoCl_2 ne zaznamo več (slika 6).

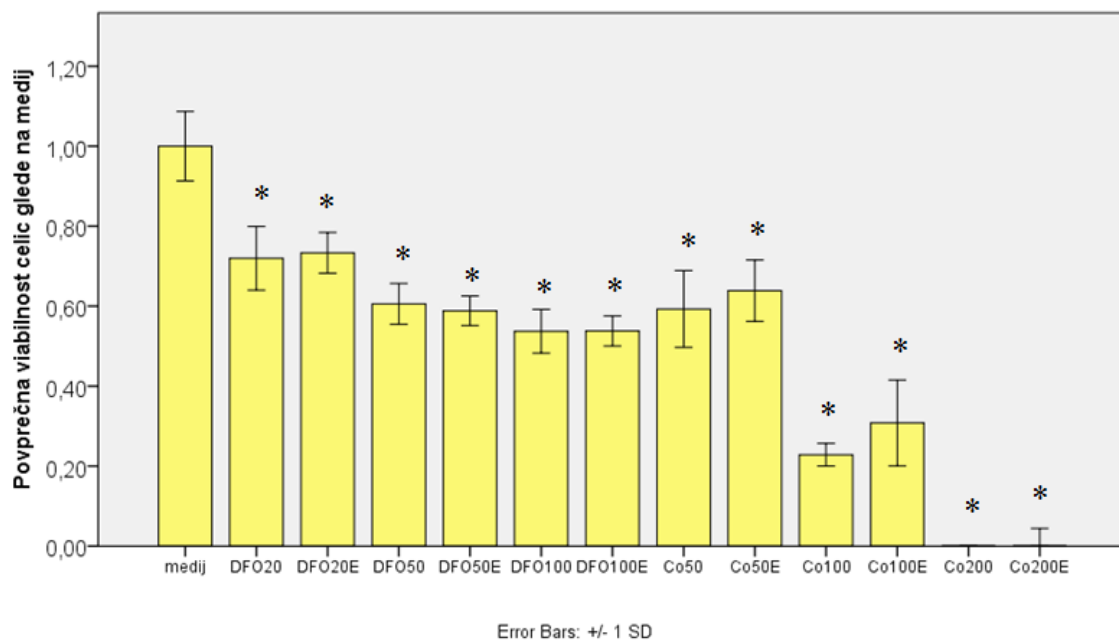


Slika 6: Vpliv različnih koncentracij CoCl_2 in DFO na viabilnost celic.

4.1.3. Hipoksija v kombinaciji s 17β -estradiolom

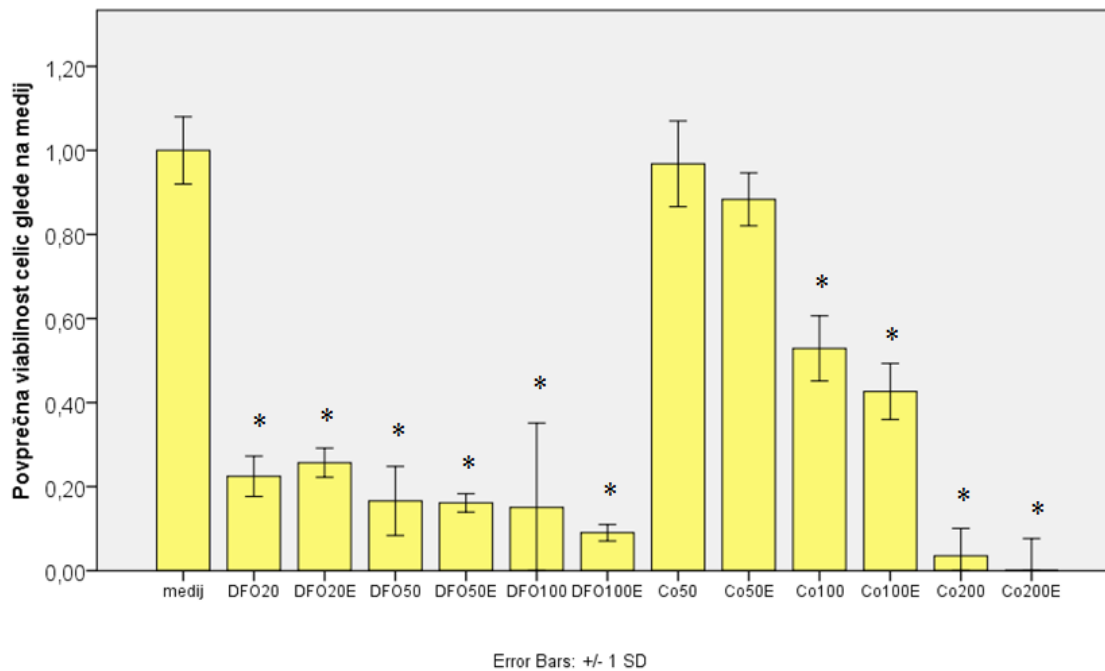
V primerjavi z medijem je bila viabilnost celic, ki so bile izpostavljene DFO in 17β -estradiolu, nižja, vendar pa je bila pri vseh skupinah primerljiva z viabilnostjo celic, ki so bile izpostavljene samo DFO. Podatki tako ne kažejo, da bi 17β -estradiol ščitil celice pred vplivom hipoksije, saj bi v tem primeru pričakovali, da bi se metabolna aktivnost celic, ki smo jim poleg DFO dodali tudi 17β -estradiol, značilno povežala. 20 μM DFO v kombinaciji s 17β -estradiolom je po 24 urah znižal metabolno aktivnost celic za približno 30 %, po 72 urah pa za 75 % (sliki 7 in 8). Učinek DFO je v obeh časovnih točkah opazen, kljub temu pa so bile celice še vedno dovolj metabolno aktivne, da bi morebitne učinke tretiranja na celice lahko zaznali preko meritev izražanja genov. Izbor koncentracije DFO za tretiranje celic je enak kot pri ocenjevanju vpliva samega DFO na celice, zato da smo rezultate lahko primerjali.

Viabilnost celic, ki so bile tretirane z mimitiki hipoksije in E₂ - 24 ur



Slika 7: Vpliv DFO v kombinaciji z E₂ na viabilnost celic – 24 ur.

Viabilnost celic, ki so bile tretirane z mimitiki hipoksije in E₂ - 72 ur



Slika 8: Vpliv DFO v kombinaciji z E₂ na viabilnost celic – 72 ur.

4.2. Ocena uspešnosti transfekcije HOS celic s plazmidom z ER- α

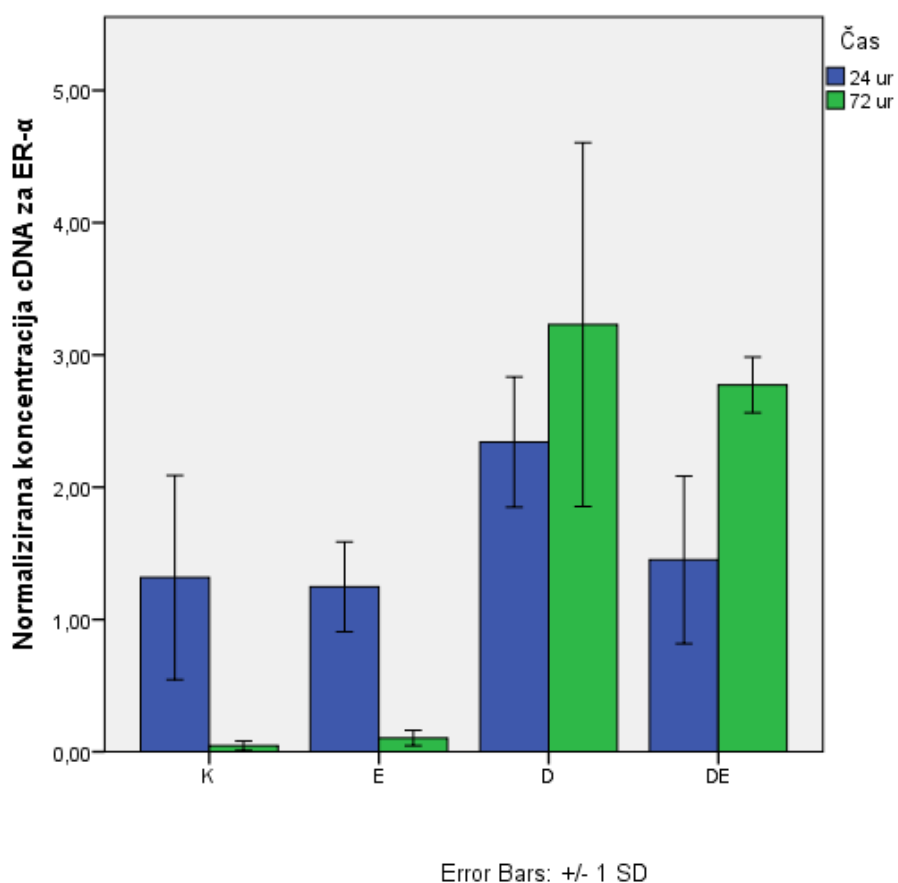
Predpogoj za delovanje E₂ je prisotnost njegovih receptorjev v celicah. Kljub literaturnim podatkom, da celična linija HOS izraža ER- α (18, 19), ga v proučevani celični liniji pri predhodnih eksperimentih nismo detektirali ne s prenosom po Westernu ne na nivoju RNA. Celice HOS smo zato pred začetkom tretiranja transficirali s plazmidom pCMV-ESR1, ki nosi zapis za ER- α . Za kontrolo transfekcije enega seta celic nismo transficirali (oznaka 0), en set pa smo transficirali s »praznim« plazmidom pcDNA3 (oznaka pl). Uspešnost transfekcije smo preverjali na nivoju mRNA in na proteinskem nivoju.

Analiza izražanja genov je pokazala prisotnost zapisa za ER- α v celicah, ki smo jih transficirali s plazmidom pCMV-ESR1. V celicah, ki jih nismo transficirali, in v celicah, ki smo jih transficirali s plazmidom pcDNA3, zapisa za ER- α nismo zaznali (preglednica XII). Ti podatki potrjujejo, da je bila transfekcija uspešna. Iz rezultatov lahko razberemo, da je bil ER- α v celicah izražen tekom celotnega eksperimenta. Poleg tega smo spremljali tudi, kako se koncentracija ER- α spreminja s časom in v odvisnosti od tretiranja celic. Koncentracija cDNA za ER- α v celicah, izpostavljenih E₂, je v posamezni časovni točki primerljiva s koncentracijo v kontrolnih celicah, saj je odvisna predvsem od obsega transfekcije s plazmidom, ki nosi zapis za ER- α . Obe skupini smo transficirali z enako količino plazmida, zato smo pričakovali tak rezultat (slika 9). Opazimo lahko tudi, da je izražanje cDNA po 72 urah nižje, kar je posledica prehodne transfekcije, pri kateri koncentracija plazmida v celicah sčasoma pada. V celicah, ki so bile izpostavljene DFO, po 24 in 72 urah od tretiranja nismo zaznali sprememb v izražanju ER- α med kontrolno skupino in skupino, ki je bila izpostavljena DFO. Po 72 urah lahko na grafu opazimo višje izražanje ER- α v skupini, ki je bila izpostavljena mimetiku hipoksije, v primerjavi s kontrolnimi celicami. Zaradi velike variabilnosti v rezultatih razlika sicer ni statistično signifikantna ($p = 0,057$), vendar pa rezultati vseeno kažejo na to, da hipoksijo v večji meri preživijo celice, v katerih je ER- α bolj izražen (slika 9). To nakazuje na morebiten pozitiven vpliv ER- α na preživetje celic v stresnih – hipoksičnih pogojih. Pri celicah, ki so bile izpostavljene tako E₂ kot DFO, se izražanje ER- α po 24 urah ni razlikovalo pri tretiranih celicah v primerjavi s kontrolnimi, kar pa po 72 urah ne drži več. V tej časovni

točki lahko opazimo povišano izražanje *ER-α* v celicah, ki so bile izpostavljene DFO in E_2 ($p = 0,002$). Podoben učinek smo opazili pri tretiranju z DFO, a tam ni bil signifikanten zaradi prevelike variabilnosti v rezultatih. Višje količine *ER-α* v celicah torej prispevajo k preživetju celic v hipoksičnih pogojih.

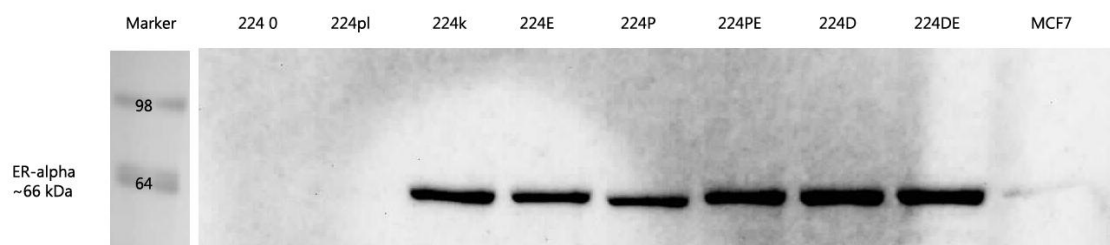
Preglednica XII: Normalizirana koncentracija *ER-α* v kontrolnih celicah in celicah, tretiranih z E_2 .

	24 ur	72 ur
0	0,00	0,00
pl	0,00	0,00
K	1,32	0,05
E	1,25	0,10
D	2,34	3,23
DE	1,45	2,77

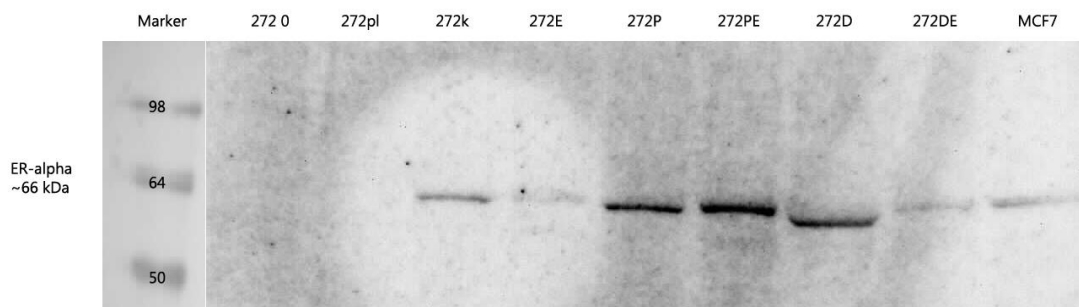


Slika 9: Izražanje *ER-α* v kontrolni in tretiranih skupinah.

Na membrani prenosa Western smo zaznali izražanje ER- α pri vseh celicah, transficiranih s plazmidom, ki nosi zapisa za ER- α . Izražanje je bilo po 24 urah od transfekcije višje od pozitivne kontrole (proteinski izolat celične linije MCF7) – slika 10, po 72 urah od transfekcije pa nižje od pozitivne kontrole – slika 11, vendar še vedno značilno višje od negativne kontrole, ki sta jo predstavljala proteinski izolat iz celic, ki jim nismo dodali plazmida in proteinski izolat iz celic, transficiranih s plazmidom, ki ne nosi zapisa za ER- α . S tem smo potrdili, da je bila transfekcija uspešna ter da je protein dejansko nastal – vnesena DNA se je prevedla v ER- α . Nižje izražanje proteina po 72 urah od transfekcije je pričakovano, saj je bila transfekcija prehodna (vnesena DNA se pri prehodni transfekciji ne vgradi v jedrno DNA, zato se med delitvijo celic počasi izgublja). Kljub temu smo s transfekcijo zagotovili, da je ER- α v celicah prisoten med celotnim eksperimentom.



Slika 10: ER- α : Prenos po Westernu, 2. biološka ponovitev, 24 ur tretiranja.



Slika 11: ER- α : Prenos po Westernu, 2. biološka ponovitev, 72 ur tretiranja.

4.3. Vpliv na izražanje *HIF1A* in *VEGFA*

V normoksiji je v celicah dovolj kisika za normalno delovanje HIF-proлил-hidroksilaze, ki sproti hidroksilira splošno prisoten HIF1 α in tako izpolni pogoje za njegovo razgradnjo v proteasomu. Ob pomanjkanju kisika HIF-proлил-hidroksilaza deluje slabše, zato v celici

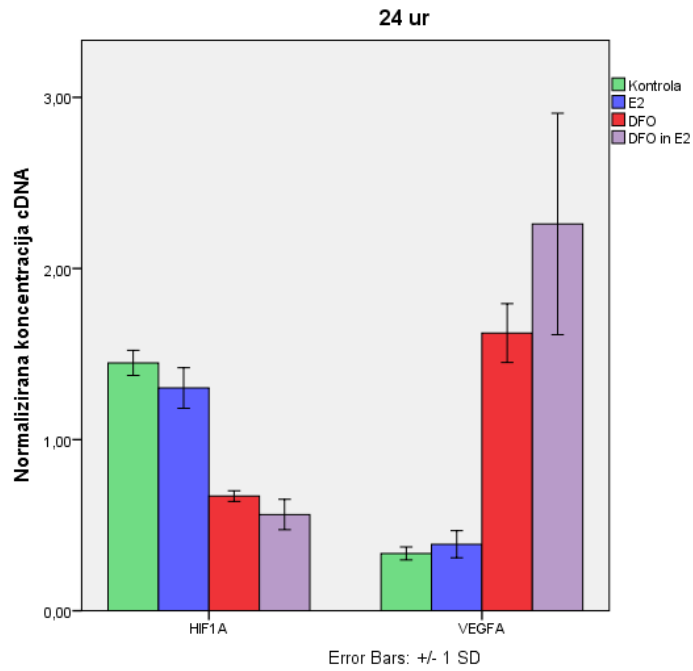
naraste količina HIF1 α . HIF1 α je transkripcijski dejavnik in deluje na prepis odsekov DNA, ki omogočajo celici boljše prenašanje hipoksičnih pogojev.

Optimalen model za hipoksijo predstavlja komora z majhno vsebnostjo kisika. Takšna oprema nam ni bila na voljo, zato smo stanje hipoksije simulirali z dvema znanima mimetikoma hipoksije: DFO in CoCl₂. HIF-prolil-hidroksilaza za svoje delovanje poleg kisika potrebuje tudi železo (slika 4). DFO kelira železo in s tem zavre delovanje HIF-prolil-hidroksilaze. Delovanje CoCl₂ še ni dobro razjasnjeno; tudi ta naj bi zaviral hidroksilacijo HIF1 α , poleg tega pa naj bi zaviral tudi interakcijo hidroksilirane HIF1 α s proteini, ki sodelujejo pri razgradnji s proteasomom. Oba DFO in CoCl₂ v celicah povzročita podoben odziv kot hipoksija: v celicah naraste HIF1 α in sproži prepis svojih tarčnih genov (41, 42).

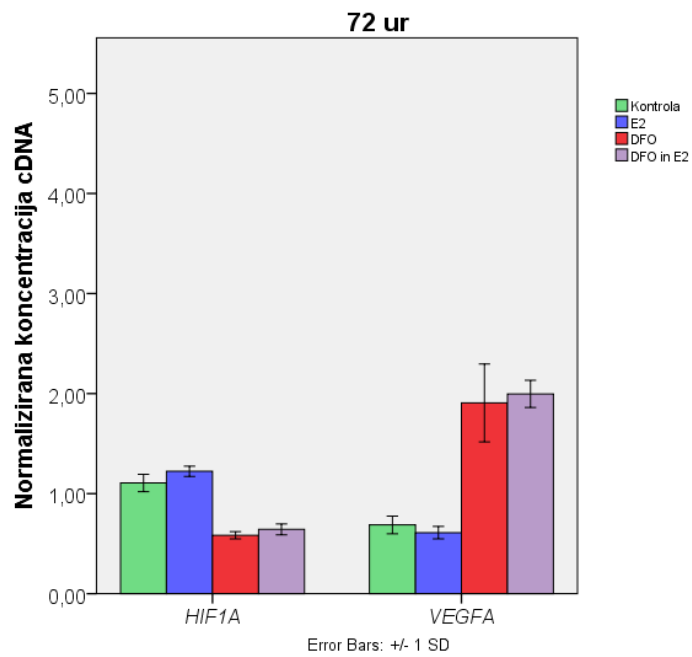
Če celice nimajo dovolj kisika, se izražanje genov *HIF1A* in *VEGFA* spremeni (43). Prav zato smo s pomočjo izražanja teh dveh genov lahko spremljali, ali smo v celičnem modelu uspešno simulirali hipoksične pogoje. Za estrogen ni znano, da bi vplival na možnost izrabe kisika, zato pričakovano ne izkazuje vpliva na izražanje teh dveh genov (sliki 12 in 13).

Že po 24 urah se je v celicah, ki so bile izpostavljene DFO, izražanje *HIF1A* znižalo ($p = 0,000$), izražanje *VEGFA* pa povišalo ($p = 0,000$). Enake učinke smo opazili tudi po 72 urah ($p = 0,001$; $p = 0,006$), kar pomeni, da so bile celice izpostavljene hipoksiji ves čas eksperimenta (sliki 12 in 13). Povečano izražanje *VEGFA* je značilno za hipoksične pogoje, saj gen kodira protein, ki spodbuja rast in razvoj žilja, s čimer tkiva dosežejo boljšo prekrvavitev, kar zmanjšuje hipoksijo. Eden od obrambnih mehanizmov pred hipoksijo je tudi stabilizacija proteinov HIF, ki kot transkripcijski dejavniki zagotovijo, da se v izrednih razmerah aktivirajo ustrezni geni. Prav zato je zmanjšanje izražanja mRNA za *HIF1A*, ki smo ga opazili v celicah, ki so bile izpostavljene DFO, nekoliko presenetljivo. Vendar so o takšnih rezultatih že poročali; kljub nižjemu izražanju mRNA pa translacija nemoteno poteka, novonastali proteini se počasneje razgrajujejo, zato se v celicah poveča koncentracija proteina HIF1- α (43, 44).

V celicah, ki smo jih tretirali s kombinacijo E₂ in DFO, smo po 24 in 72 urah zaznali znižano izražanje *HIF1A* ($p = 0,000$; $p = 0,001$) in povišano izražanje *VEGFA* ($p = 0,035$; $p = 0,000$) – sliki 12 in 13. Rezultati tretiranja z DFO in E₂ so popolnoma primerljivi z rezultati tretiranja z DFO.



Slika 12: Izražanje *HIF1A* in *VEGFA* v kontrolni in tretiranih skupinah – 24 ur.

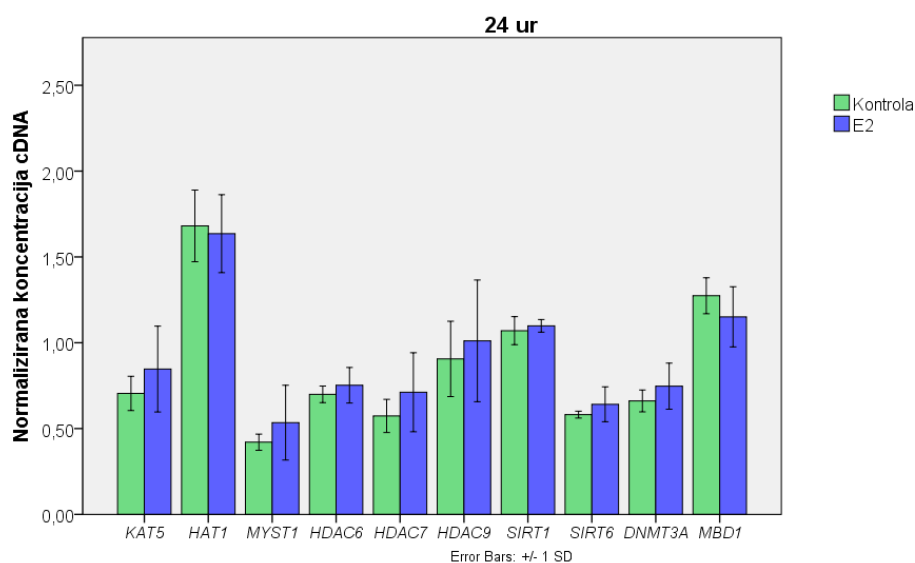


Slika 13: Izražanje *HIF1A* in *VEGFA* v kontrolni in tretiranih skupinah – 72 ur.

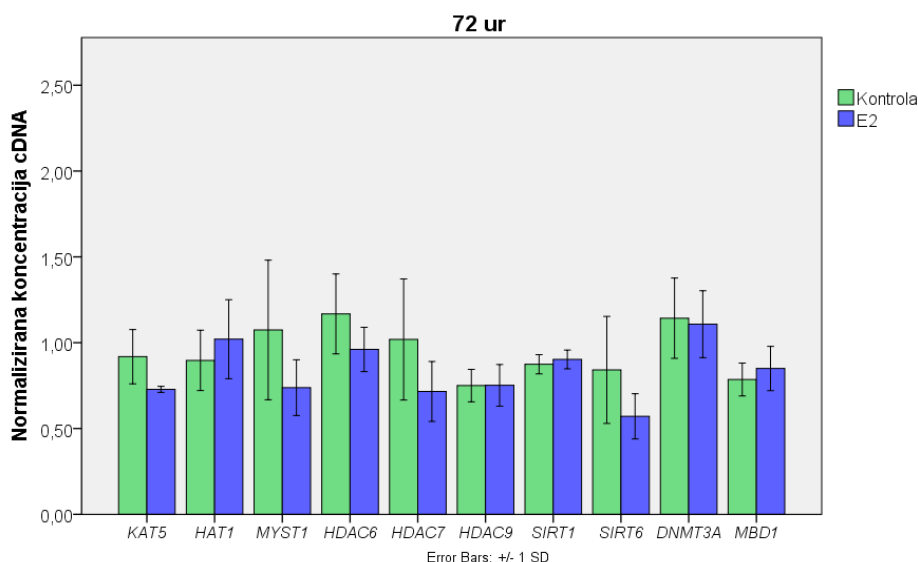
4.4. Vpliv na izražanje genov, vpletenih v epigenetske mehanizme

4.4.1. 17 β -estradiol

V nobeni od časovnih točk, ko smo odvzeli vzorce celic, nismo detektirali signifikantnih razlik v izražanju proučevanih genov: *KAT5*, *HAT1*, *MYST1*, *HDAC6*, *HDAC7*, *HDAC9*, *SIRT1*, *SIRT6*, *DNMT3A* in *MBD1* v celicah, izpostavljenih estrogenu, v primerjavi s kontrolnimi celicami (sliki 14 in 15). Z eksperimentom nismo uspeli potrditi, da bi E₂ sam vplival na epigenetske mehanizme preko uravnavanja proučevanih genov. Na portalu GEO profiles smo naše rezultate primerjali z rezultati 6 raziskav, v katerih so proučevali vpliv estrogena na izražanje genov (31, 45–50). V štirih so proučevali vpliv na celice raka dojke, v eni vpliv na celice kostnega mozga in na celice vezivnega tkiva ter v zadnji vpliv na osteosarkomske celice U2OS. V večini so naši rezultati primerljivi s predhodnimi raziskavami, le pri genu *HAT1* so v štirih raziskavah zaznali povišano izražanje pod vplivom E₂. Naš celični model se je razlikoval od celičnih modelov, ki so jih proučevali v navedenih raziskavah in prav to je lahko razlog za različna opažanja. Da bi lahko pojasnili razloge za razlike v rezultatih in bolj ovrednotili morebitno vpletenost E₂ pri izražanju *HAT1* v osteoblastih, bi bile smiselne nadaljnje raziskave na dodatnih celičnih modelih, npr. na primarnih osteoblastih.



Slika 14: Vpliv E₂ na izražanje genov, vpletenih v epigenetske mehanizme – 24 ur.



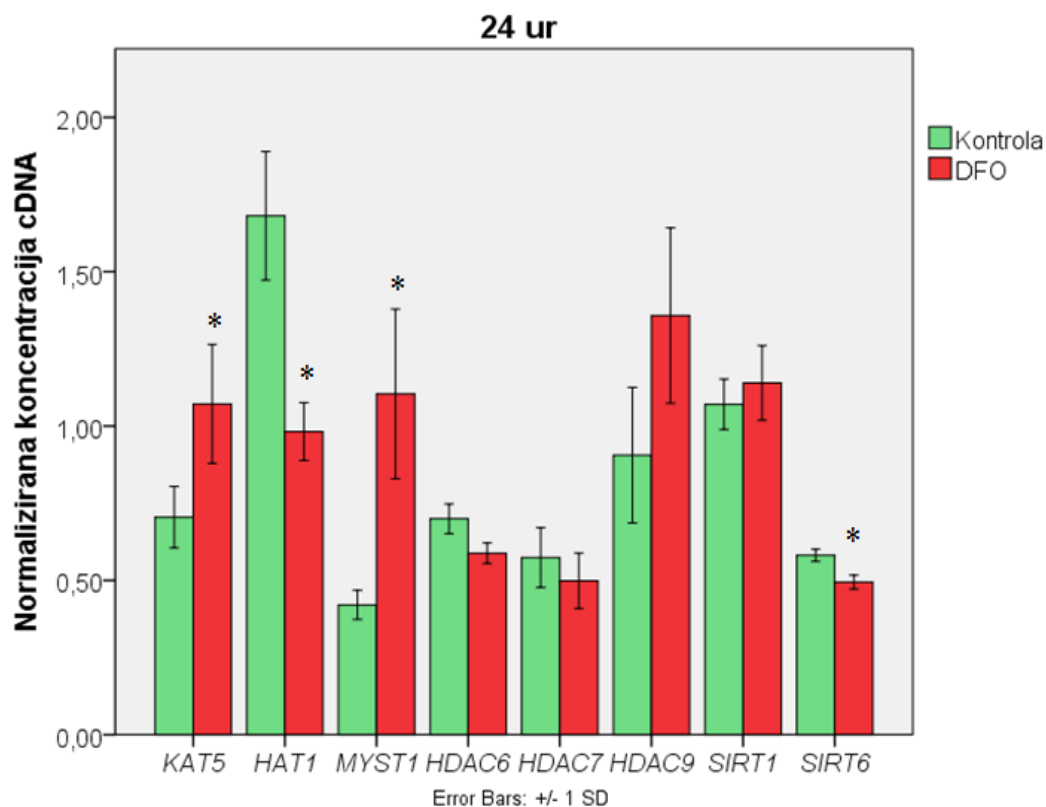
Slika 15: Vpliv E₂ na izražanje genov, vpletenih v epigenetske mehanizme – 72 ur.

4.4.2. DFO

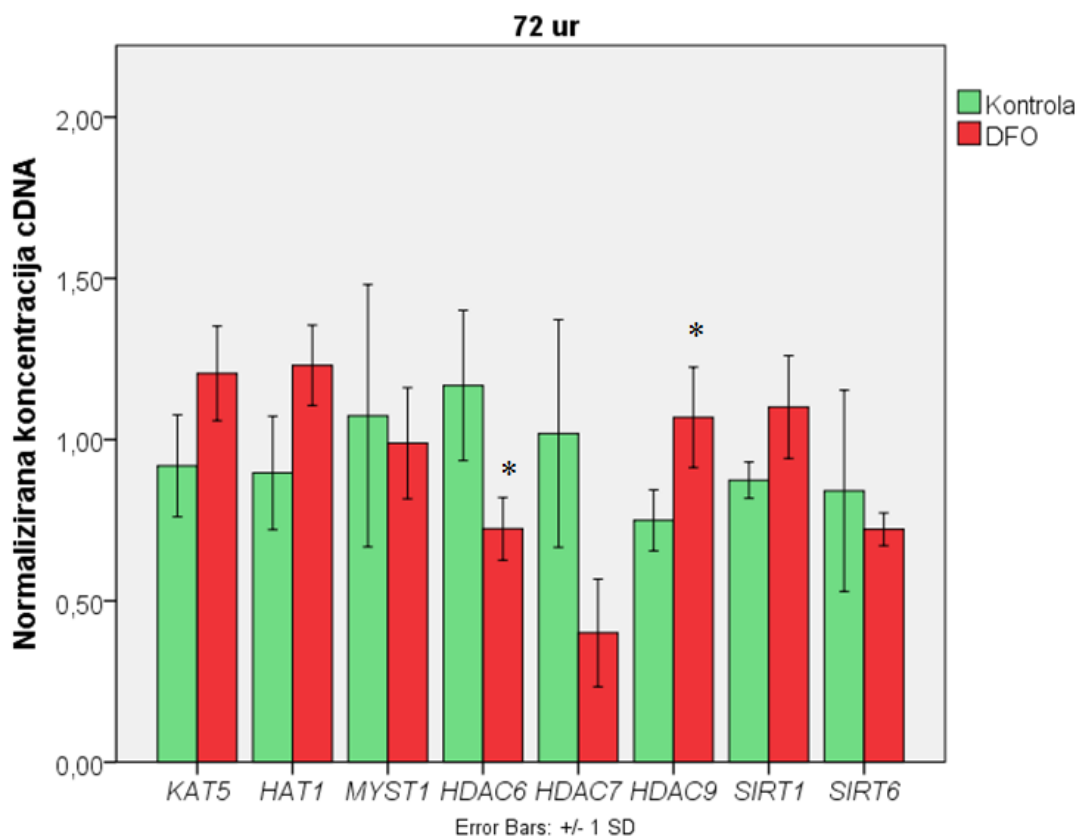
Po 24 urah tretiranja smo zaznali signifikantno povišanje izražanja histonskih acetiltransferaz *KAT5* ($p = 0,043$) in *MYST1* ($p = 0,046$) ter signifikantno nižje izražanje *HAT1* ($p = 0,006$). Po 72 urah nobeden od učinkov, opaženih po 24 urah tretiranja, ni bil več statistično značilen.

V celicah, ki so bile 24 ur izpostavljene mimetiku hipoksije, smo razlike v izražanju opazili pri *HDAC6* ($p = 0,030$) in *SIRT6* ($p = 0,007$). Izražanje obeh histonskih deacetilaz je bilo v tretiranih celicah nižje kot v kontrolnih celicah. Po 72 urah razlika v izražanju pri *SIRT6* ni bila več statistično signifikantna, poleg nižjega izražanja *HDAC6* ($p = 0,038$) pa smo opazili še statistično signifikantno povišano izražanje *HDAC9* ($p = 0,039$) – sliki 16 in 17.

V splošnem je povišano izražanje histonskih acetiltransferaz in nižje izražanje histonskih deacetilaz – oboje pripomore k višji stopnji acetilacije histonov, povezano z aktivnejšim prepisovanjem DNA. V eksperimentu smo opazili tako pozitivne kot negativne vplive na izražanje histonskih acetiltransferaz in deacetilaz, zato na podlagi naših rezultatov ni moč sklepati, ali se bodo te spremembe odražale v večji ali manjši acetilaciji histonov, saj ni jasno, kateri učinek prevlada. Povzamemo pa lahko, da hipoksija posredno lahko spreminja acetilacijski profil histonskih proteinov v kromatinu in bi lahko pomembno vplivala tudi na izražanje genov, ki so pomembni za uravnotežen kostni metabolizem.

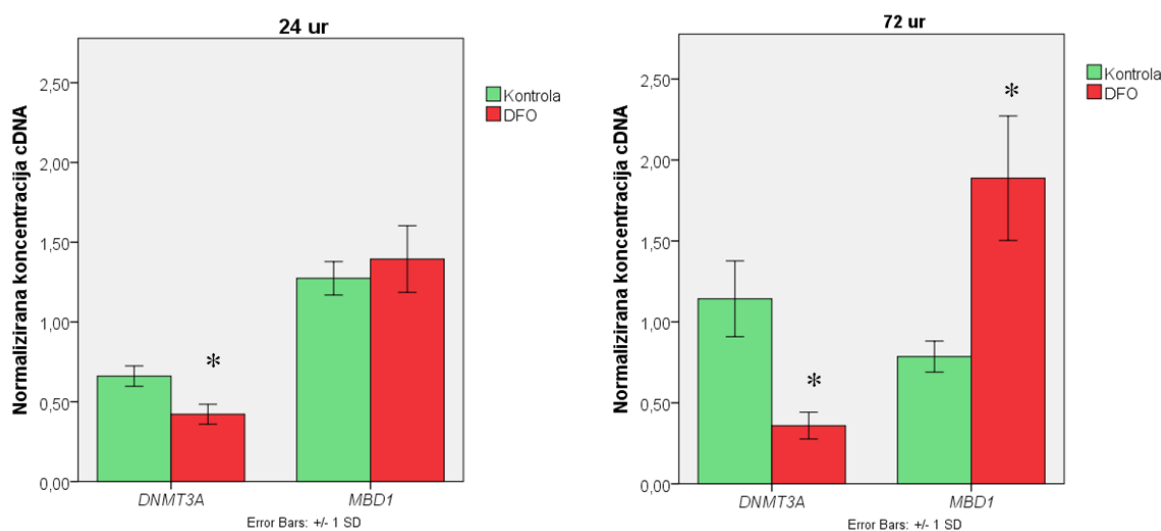


Slika 16: Vpliv DFO na izražanje genov, ki sodelujejo pri acetilaciji in deacetilaciji histonov – 24 ur.



Slika 17: Vpliv DFO na izražanje genov, ki sodelujejo pri acetilaciji in deacetilaciji histonov – 72 ur.

Po 24 urah od začetka tretiranja nismo zaznali značilne spremembe v izražanju *MBD1*, opazili pa smo znižano izražanje *DNMT3A* ($p = 0,010$). Po 72 urah smo poleg nižjega izražanja *DNMT3A* ($p = 0,005$) opazili tudi značilno višje izražanje *MBD1* ($p = 0,009$) v hipoksičnih celicah v primerjavi s kontrolnimi celicami (slika 18). Glede na to, da je protein *DNMT3A* odgovoren za metiliranje DNA, lahko pričakujemo, da je stopnja metilacije DNA v stanju hipoksije nižja, kar omogoča lažje prepisovanje genov. Splošno zmanjšanje metilirane DNA, povezano z zmanjšanim izražanjem DNA metiltransferaz, so opazili tudi v študiji na kolorektalnih rakavih celicah, ki so bile izpostavljene hipoksičnim pogojem (51). *MBD1* se veže na metilirane odseke DNA in na ta mesta usmerja še korepresorje in histonske deacetilaze. Posledično pride do remodelacije kromatina in zmanjšanja intenzivnosti prepisovanja tarčnih odsekov DNA. V celicah s povišanim izražanjem *MBD1* je prepisovanje DNA zavrto v primerjavi s celicami z nižjim izražanjem *MBD1*. Nižje izražanje *DNMT3A* in višje izražanje *MBD1* ima na intenzivnost prepisovanja DNA torej nasprotno učinke. V stanju hipoksije je za celice smiselno, da stimulirajo prepisovanje ključnih genov, ki so vključeni v obrambne mehanizme pred hipoksijo. Ti celicam omogočajo, da se učinkovito odzovejo na negativni vpliv in ga skušajo v kar največji meri zamejiti. Možno je, da prav razlika v izražanju teh dveh proučevanih genov celicam omogoča stimulacijo prepisovanja enih genov in zavira prepisovanje drugih, ki v takem okolju niso tako ključni za preživetje celic.

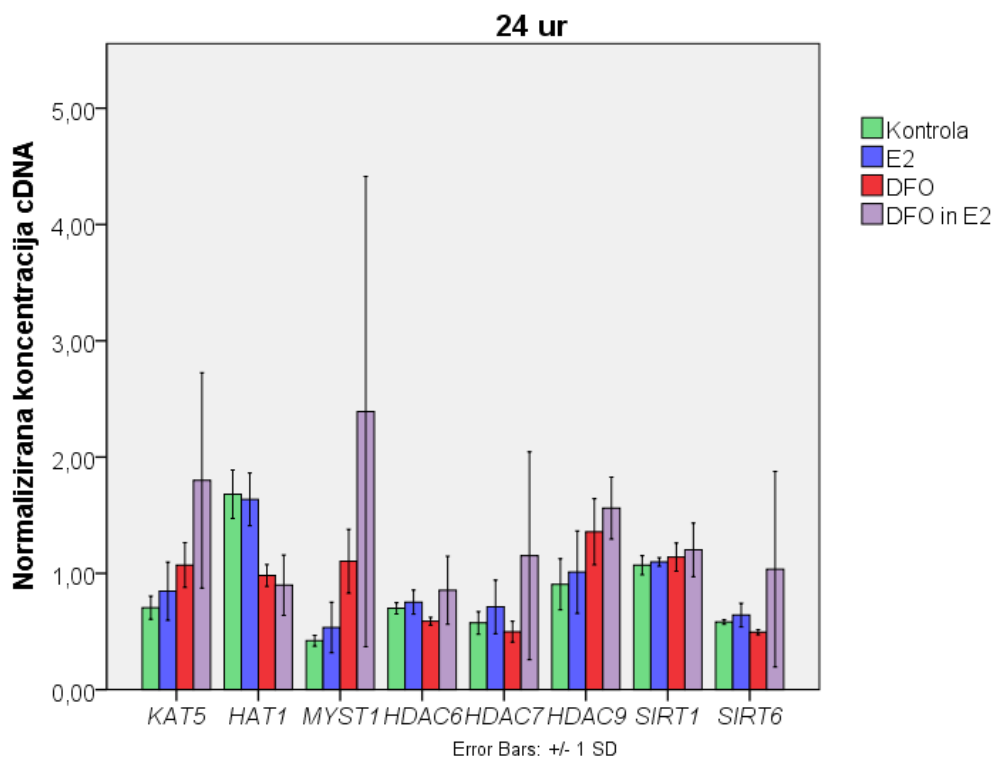


Slika 18: Vpliv DFO na izražanje genov, ki sodelujejo pri metilaciji DNA ali se vežejo na metilirano DNA.

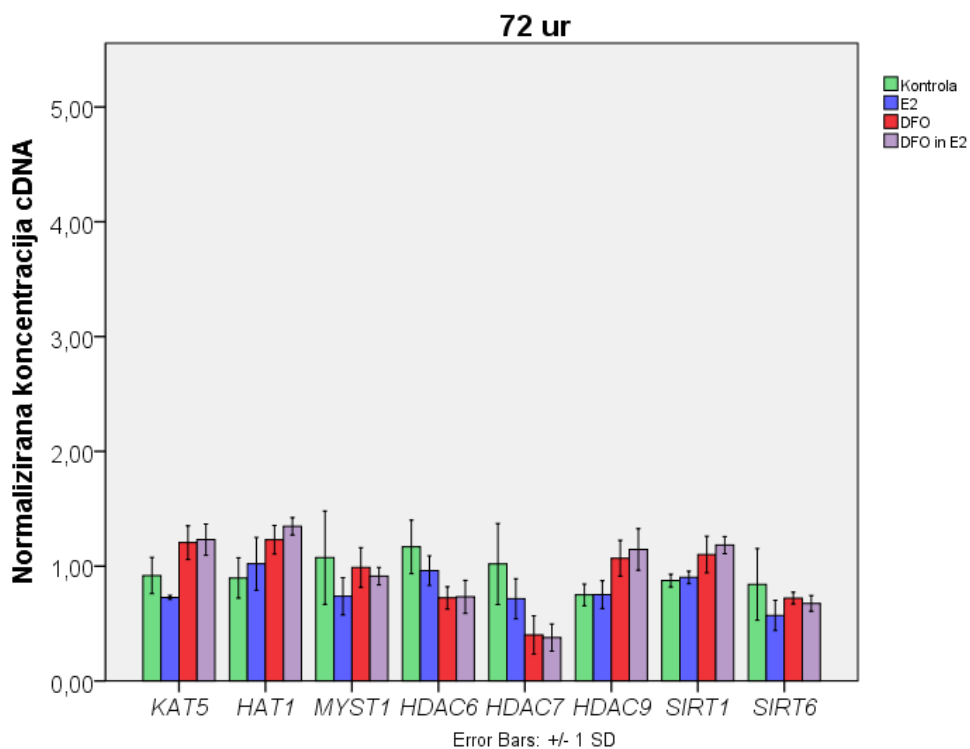
4.4.3. DFO in 17 β -estradiol

Po 24 urah se je v celicah, ki so bile tretirane z DFO in E₂, znižalo izražanje *HAT1* ($p = 0,015$). Presenetljivo je, da smo po 72 urah zaznali statistično značilno povišano izražanje *HAT1* v primerjavi z netretiranimi celicami ($p = 0,015$). Ti rezultati potrjujejo rezultate, ki smo jih dobili pri tretiranju z DFO, in nakazujejo, da je izražanje *HAT1* pod vplivom hipoksije odvisno tudi od časa, ko so celice izpostavljene hipoksiji. Za razliko od eksperimenta s samim DFO tu zaradi velikih variabilnosti v rezultatih nismo uspeli potrditi učinka tretiranja na izražanje *KAT5* in *MYST1* 24 ur po tretiranju. V primerjavi skupine D in DE pri nobenem od naštetih genov nismo dokazali signifikantnih razlik v izražanju, zato na podlagi naših rezultatov izključujemo, da bi E₂ vplival na izražanje histonskih acetiltransferaz, ki je spremenjeno zaradi posledic delovanja DFO (sliki 19 in 20).

Pri histonskih deacetilazah smo po 24 urah zaznali le spremembo v izražanju *HDAC9* – izražanje je bilo višje pri tretirani skupini ($p = 0,030$) – slika 19. Po 72 urah smo zaznali znižanje izražanja *HDAC7* ($p = 0,041$) ter povišano izražanje *HDAC9* ($p = 0,029$) in *SIRT1* ($p = 0,005$) – slika 20. V primerjavi skupine D in DE pri nobeni od histonskih deacetilaz nismo dokazali signifikantnih razlik v izražanju v tretiranih celicah v primerjavi s kontrolnimi. Rezultati potrjujejo, da se med hipoksijo izražanje histonskih deacetilaz različno regulira, izključujejo pa, da bi bil E₂ kakorkoli vpleten v spremenjeno izražanje proučevanih genov, ki ga orkestrira DFO.



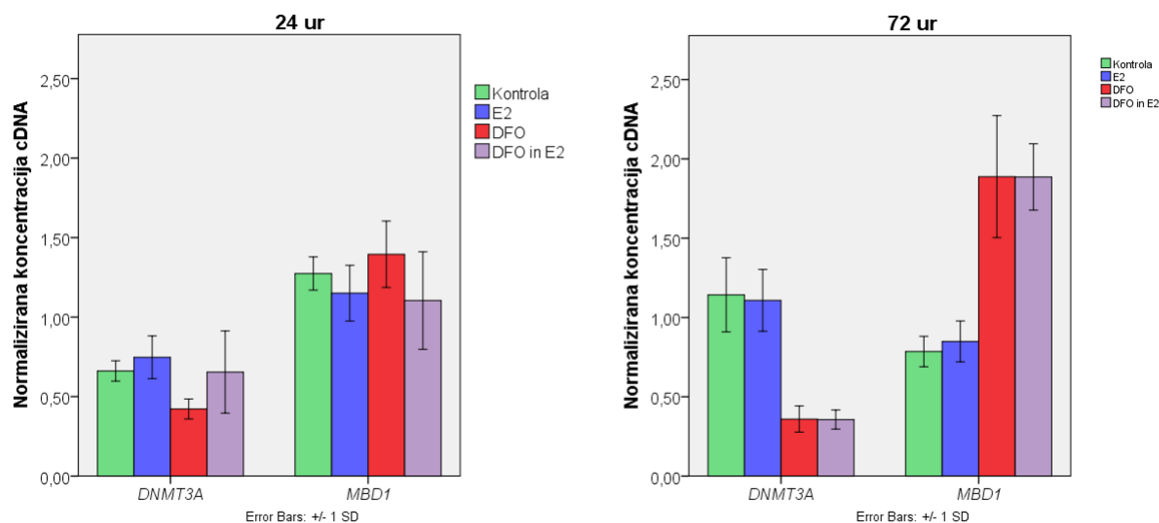
Slika 19: Vpliv DFO v kombinaciji z E₂ na izražanje genov, ki sodelujejo pri acetilaciji in deacetilaciji histonov – 24 ur.



Slika 20: Vpliv DFO v kombinaciji z E₂ na izražanje genov, ki sodelujejo pri acetilaciji in deacetilaciji histonov – 72 ur.

Vpliv tretiranja na izražanje *DNMT3A* in *MBD1* je bil izrazit po 72 urah: izražanje *DNMT3A* se je znižalo ($p = 0,005$), izražanje *MBD1* pa povišalo ($0,001$) – slika 21. Tak

učinek smo zaznali tudi pri tretiranju s samim DFO, kar kaže, da dodatek E₂ nima vpliva na izražanje proučevanih genov.



Slika 21: Vpliv DFO v kombinaciji z E₂ na izražanje genov, ki sodelujejo pri metilaciji DNA ali se vežejo na metilirano DNA.

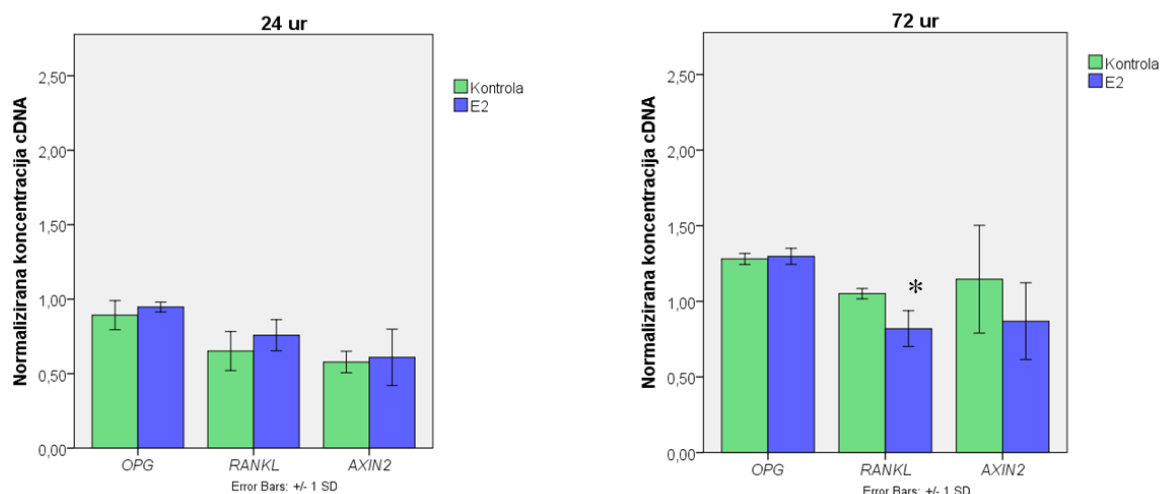
4.5. Vpliv na sistem RANK/RANKL/OPG

V našem modelu z izbrano koncentracijo E₂ v proučevanem časovnem oknu nismo zaznali sprememb v izražanju mRNA za *OPG*. Pri genu *RANKL* po 24 urah ni bilo signifikantnih razlik med skupinama, po 72 urah pa je opazno zmanjšanje izražanja ($p = 0,031$) (slika 22). V raziskavi, kjer so za modelne celice izbrali hFOB/ER-9 (gre za humane osteoblastne celice s stabilno transficiranim ER- α) so odkrili, da je učinek E₂ na izražanje gena *OPG* odvisen od časa (maksimum po 12 urah od tretiranja) in koncentracije E₂ (najbolj je izražanje *OPG* inducirala koncentracija E₂ = 100 nM) (52). V naši raziskavi presenetljivo nismo zaznali povišanega izražanja *OPG* v celicah, ki so bile izpostavljene estrogenu. Vendar pa so do podobnih rezultatov prišli tudi v raziskavi, kjer so za modelne celice izbrali humane osteoblaste in jih izpostavili 100 nM in 0,1 nM koncentraciji E₂. Po 24 urah od tretiranja niso zaznali razlik v izražanju gena *OPG*, opazili pa so signifikantno znižanje izražanja gena *RANKL*, a le pri 0,1 nM koncentraciji E₂ (53). Dodatno so v tej raziskavi izmerili tudi izražanje proteinov OPG in RANKL. Po 24 urah so opazili povečano izražanje obeh pod vplivom E₂ (preglednica XIII). Takšni sprva na videz kontradiktorni rezultati so lahko posledica tega, da je stanje proteinov po 24 urah odvisno od koncentracije mRNA v zgodnejših fazah po tretiranju. Prav tako je mogoče, da je povečano izražanje proteinov OPG in RANKL posledica katerega od mehanizmov, ki niso povezani s povečanim izražanjem mRNA. Glede na dokazano odvisnost sprememb v

izražanju *OPG* in *RANKL* od koncentracije in časa, bi za boljše razumevanje regulacije izražanja proučevanih genov morali izvesti raziskavo pri več različnih koncentracijah E_2 in spremljati izražanje tudi v zgodnejših časovnih točkah.

Preglednica XIII: Primerjava rezultatov proučevanja *OPG* in *RANKL* pod vplivom E_2 med našo raziskavo in še dvema raziskavama (49, 50) Rezultati v preglednici so izraženi kot relativne vrednosti glede na kontrolo.

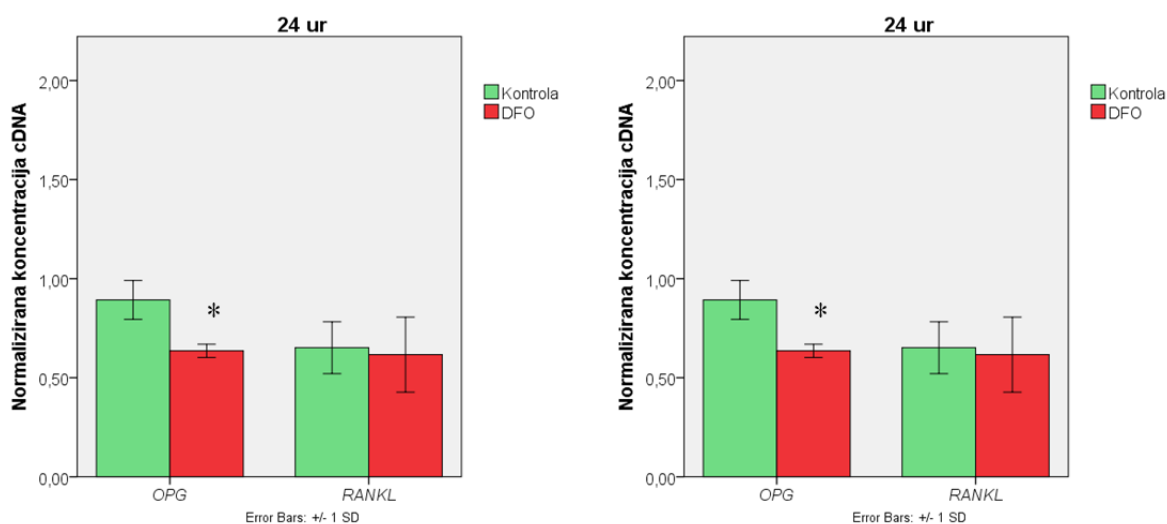
Model	Celice HOS		Celice hFOB/ER-9 (49)										Humani osteoblasti (50)			
	24	72	24					6	12	24	48	72	24		48	
Koncentracija E_2	10 nM		0,01 nM	0,1 nM	100 nM	10 nM	100 nM	100 nM					0,1 nM	100 nM	0,1 nM	100 nM
mRNA <i>OPG</i>	/	/	↑	↑	↑	↑	↑	/	↑	↑	↑	↑	/	/		
	1,4	1,0	1,4	1,8	2,0	1,7	2,5	0,8	2,5	3,7	2,2	1,6	1,4	1,1		
mRNA <i>RANKL</i>	/	↓											↓	/		
	1,2	0,8											0,5	1,3		
Protein <i>OPG</i>													↑	↑	↑	↑
													3,0	6,9	1,2	1,3
Protein <i>RANKL</i>													↑	↑	/	/
													2,4	2,1	0,8	0,8



Slika 22: Vpliv E_2 na izražanje genov, vpletenih sistem RANK/RANKL/OPG in signalno pot Wnt/ β -katenin.

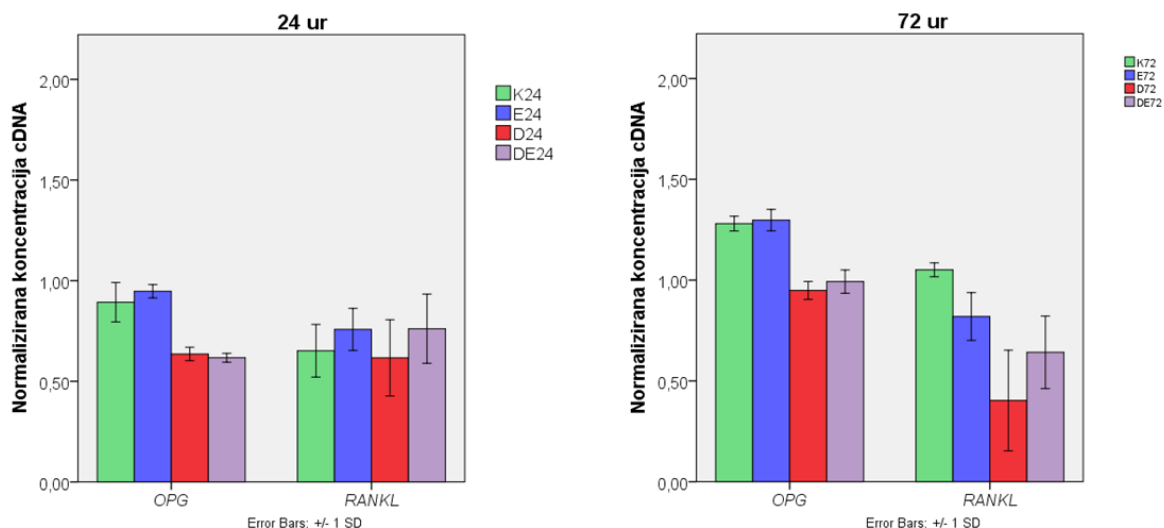
V celicah, ki so bile izpostavljene DFO smo opazili sledeče: Od dveh genov, ki sta vključena v sistem RANK/RANKL/OPG in sta bila predmet našega eksperimenta, smo po 24 urah zaznali razliko v izražanju le pri *OPG* ($p = 0,013$): izražanje *OPG* je bilo nižje v celicah, izpostavljenih hipoksičnim pogojem, v primerjavi s kontrolnimi celicami. Po 72 urah smo pri obeh genih opazili nižje izražanje v celicah, ki so bile izpostavljene mimetiku hipoksije ($p(OPG) = 0,001$ in $p(RANKL) = 0,011$) – slika 23. Hipoksija torej vpliva na delovanje proučevane signalne poti: po 24 urah, ko se zniža le izražanje *OPG*, lahko

pričakujemo intenzivnejše signaliziranje preko RANKL/RANK, saj je pri manjših koncentracijah OPG več prostega RANKL, ki je sposoben aktivirati receptor RANK in sprožiti kaskado dogodkov. Po 72 urah, ko se zniža tudi izražanje RANKL, pa pričakujemo, da se signaliziranje po tej signalni poti zmanjša. V nasprotju z našimi rezultati so na modelih živčnih celic in kulturi mišjih osteoblastov skupaj z osteoklasti poročali o povečanem izražanju *OPG*, ko so bili modeli izpostavljeni hipoksičnim pogojem (54, 55). Uporabljeni modeli se precej razlikujejo, kar je lahko razlog za neskladje v rezultatih. Razlike pričajo tudi o tem, da poleg hipoksije sistem RANK/RANKL/OPG usmerjajo tudi drugi, vplivnejši dejavniki, kot na primer citokini, in poleg estrogena še drugi hormoni, ki jih v našem celičnem modelu nismo upoštevali.



Slika 23: Vpliv DFO na signalno pot RANK/RANKL/OPG.

Po 24 urah tretiranja z DFO in E_2 se je izražanje *OPG* znižalo ($p = 0,034$), koncentracija *RANKL* pa je ostala na primerljivem nivoju kot pri kontrolnih celicah. Po 72 urah smo poleg padca koncentracije *OPG* ($p = 0,002$) zaznali še znižano koncentracijo *RANKL* ($p = 0,018$) – slika 24. Rezultati so povsem primerljivi z rezultati, ki smo jih dobili pri tretiranju z DFO, kar izključuje, da bi imel E_2 vpliv na spremembe v izražanju, ki jih je induciral DFO.



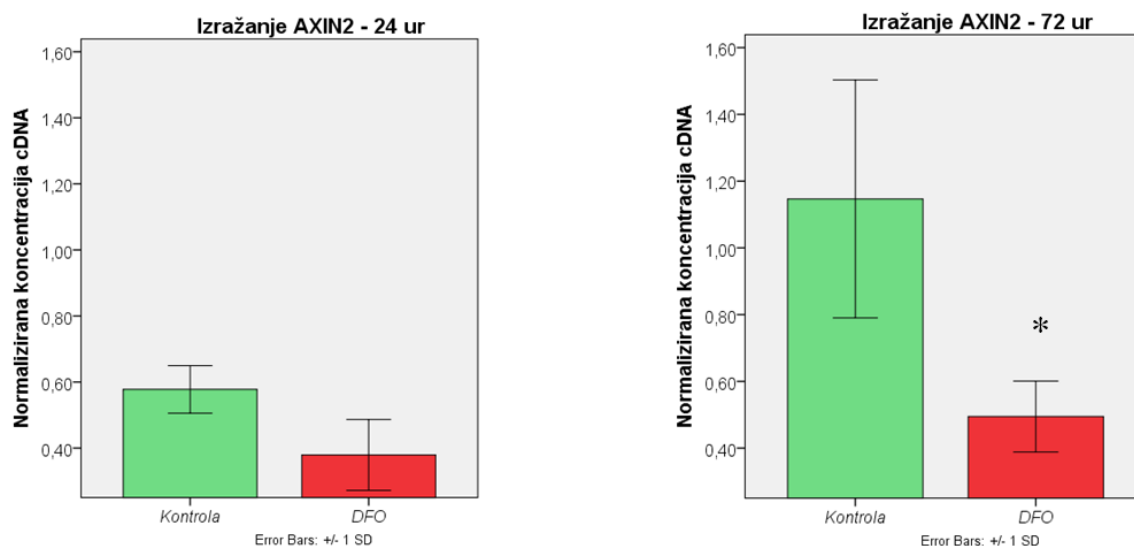
Slika 24: Vpliv DFO v kombinaciji z E₂ na signalno pot RANK/RANKL/OPG.

4.6. Vpliv na signalno pot Wnt/ β -katenin

Signalna pot Wnt/ β -katenin je vpletena v procese izgradnje kostnine: osteoprogenitorne celice usmerja v osteoblaste, stimulira proliferacijo osteoblastov in povečuje preživetje osteoblastov in osteocitov (14). V tej signalni poti ima protein AXIN2 pomembno vlogo: vključen je v proteinski kompleks, ki razgrajuje β -katenin (označi ga za ubikvitinacijo, nakar ga proteasom razgradi), tako da le-ta ne more vstopiti v jedro in vplivati na svoje tarčne gene. V prisotnosti Wnt se proteinski kompleks z AXIN2 razstavi, zato lahko β -katenin prosto prehaja v jedro in sproža učinke signalne poti Wnt/ β -katenin.

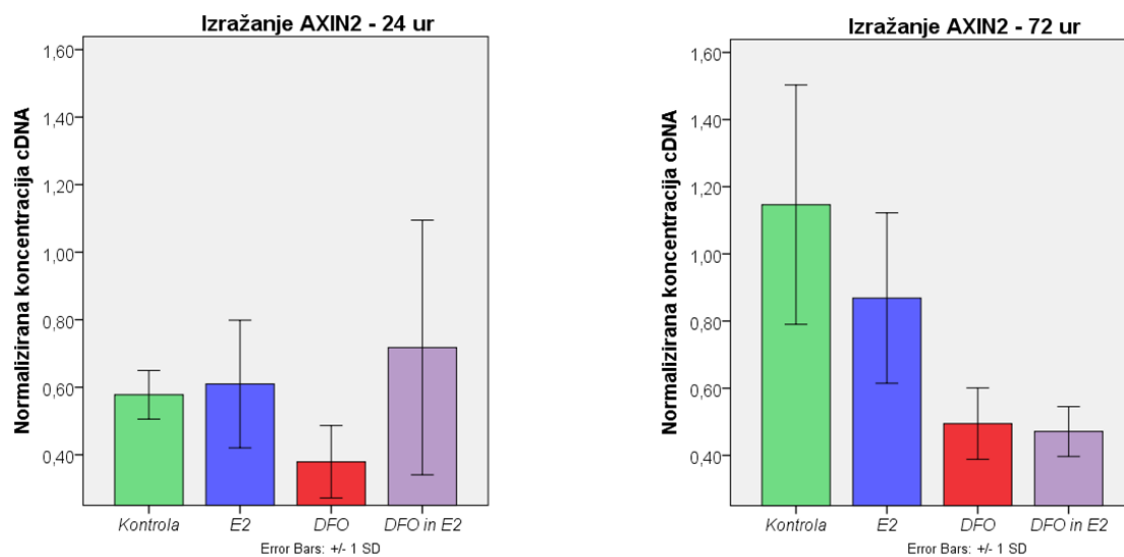
E₂ ni vplival na izražanje gena za AXIN2; po 72 urah je bilo izražanje rahlo nižje kot pri kontrolni skupini, a razlika ni statistično signifikantna (slika 22). V mišjih preosteoblastih so prav tako proučevali izražanje AXIN2 v odvisnosti od 100 nM E₂. Po 24 urah niso zaznali razlik v izražanju, po 48 urah pa so opazili statistično signifikantno povišanje izražanja AXIN2 (56). Iz podatkov s portala GEO profiles v treh raziskavah, omenjenih v predhodnem poglavju, v katerih so merili tudi izražanje gena AXIN2, v nekaterih eksperimentih lahko zasledimo rahlo znižanje v izražanju pod vplivom E₂, vendar ta učinek ni konstanten (45, 46, 49). Možno je torej, da E₂ lahko vpliva na signalno pot Wnt/ β -katenin, katere tarča je tudi AXIN2, vendar nam direktnega vpliva v naši raziskavi ni uspelo potrditi.

24 ur po tretiranju celic z mimetikom hipoksije nismo opazili znatnega učinka na izražanje *AXIN2*, po 72 urah pa je bilo izražanje signifikantno nižje kot v kontrolnih celicah ($p = 0,039$) – slika 25. Iz manjše koncentracije cDNA za *AXIN2* iz vzorcev celic, ki so bile izpostavljene hipoksičnim pogojem, lahko sklepamo, da je bila v tem primeru signalna pot Wnt/ β -katenin manj aktivna kot v kontrolnih celicah. Utišanje signalne poti pod vplivom hipoksije kaže na to, da ima hipoksija posreden vpliv na izgradnjo kostnine in razvoj kostnih bolezni, kar so dokazali že v več raziskavah (16, 57). V eni od raziskav so potrdili vpliv hipoksije na kostni metabolizem, vendar so pod vplivom hipoksije zaznali povečano aktivnost signalne poti Wnt/ β -katenin (58), kar je v nasprotju z našimi rezultati. Za natančnejše ovrednotenje vpliva bodo potrebne še nadaljnje raziskave.



Slika 25: Vpliv DFO na signalno pot Wnt/ β -katenin.

Izražanje gena *AXIN2* v celicah, izpostavljenih DFO in E_2 , je bilo po 24 urah primerljivo z izražanjem v kontrolnih celicah. Do opaznih razlik je prišlo šele po 72 urah: tretirane celice so proučevani gen izražale v manjši meri kot kontrolne celice ($p = 0,032$). Iz nižjega izražanja *AXIN2* lahko sklepamo, da je bila signalna pot Wnt/ β -katenin v stanju hipoksije in ob sočasnem dodatku E_2 utišana. Enake učinke smo zaznali tudi, ko smo celice izpostavili samo delovanju DFO, zato zaključujemo, da v stanju hipoksije dodatek E_2 nima vpliva na spremenjeno delovanje signalne poti Wnt/ β -katenin – slika 26.



Slika 26: Vpliv DFO v kombinaciji z E₂ na signalno pot Wnt/ β -katenin.

5. Sklep

V eksperimentu smo uspešno razvili osteoblastni celični model, ki izraža estrogenski receptor α . Na celičnem modelu osteosarkomskih celic smo preverili, kako 17β -estradiol in mimetik hipoksije vplivata na izražanje genov, ki so vpleteni v proučevane epigenetske mehanizme: acetilacijo histonov, deacetilacijo histonov, metilacijo DNA ter en gen za protein, ki se veže na metilirano DNA.

Rezultati kažejo, da 17β -estradiol:

- nima vpliva na proučevane epigenetske mehanizme,
- v celicah ni povzročil stanja hipoksije ali vplival na signalno pot Wnt/ β -katenin.
- na sistem RANK/RANKL/OPG vpliva z zmanjšanjem izražanja *RANKL* po 72 urah.

Mimetik hipoksije deferoksamin je v celičnem modelu:

- uspešno simuliral stanje hipoksije, kar smo zaznali z znižanim izražanjem *HIF1A* in zvišanim izražanjem *VEGFA*.
- Potrdili smo hipotezo, da hipoksija sodeluje pri uravnavanju epigenetskih mehanizmov: deferoksamin je povzročil povišano izražanje *KAT5*, *MYST1*, *HDAC9*, *MBD1* ter znižano izražanje *HAT1*, *HDAC6*, *SIRT6*, *DNMT3A*. Hipoksija torej lahko vpliva na vse tri od proučevanih mehanizmov: acetilacijo histonov, deacetilacijo histonov ter metilacijo DNA.
- V stanju hipoksije smo opazili tudi znižano izražanje genov *RANKL* in *OPG*.
- Znižano izražanje *AXIN2* pod vplivom hipoksije kaže na zmanjšano aktivnost signalne poti Wnt/ β -katenin, ki je pomembna za razvoj in izgradnjo kostnega tkiva.

V eksperimentu, kjer smo poleg deferoksamina celicam dodali tudi 17β -estradiol, smo opazili praktično identične rezultate kot pri eksperimentu, v katerem smo za tretiranje uporabili le deferoksamin. Hipotezo, da estrogeni preprečijo učinke hipoksije na izražanje genov, ki so udeleženi v proučevanih epigenetskih mehanizmih, torej zavračamo. Prav tako

je vpliv obeh tretiranj na sistem RANK/RANKL/OPG in signalno pot Wnt/ β -katenin enak, zato tudi hipotezo, da estrogeni izničijo učinke hipoksije na ta dva sistema, zavračamo.

Dokazali smo, da hipoksija vpliva na epigenetske mehanizme v osteosarkomskih celicah. Že manjše spremembe v teh mehanizmih lahko močno spremenijo profil izražanja genov v kostnem tkivu, zato je opažen vpliv na kar osem od desetih proučevanih genov zelo zanimiv za nadaljnje raziskovanje.

6. Literatura

1. Bheda P, Schneider R. Epigenetics reloaded: the single-cell revolution. *Trends Cell Biol.* 2014;24(11):712-23.
2. Pulido Fontes L, Quesada Jimenez P, Mendioroz Iriarte M. Epigenetics and epilepsy. *Neurologia.* 2015;30(2):111-8.
3. Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Csoka AB. Epigenetics across the human lifespan. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:49.
4. Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb).* 2010;105(1):4-13.
5. Raftopoulos L, Katsi V, Makris T, Tousoulis D, Stefanadis C, Kallikazaros I. Epigenetics, the missing link in hypertension. *Life Sci.* 2015;129:22-6.
6. Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol.* 2014;4:80.
7. Harb H, Renz H. Update on epigenetics in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(1):15-24.
8. Miceli-Richard C. Epigenetics and lupus. *Joint Bone Spine.* 2015;82(2):90-3.
9. Delgado-Calle J, Garmilla P, Riancho JA. Do epigenetic marks govern bone mass and homeostasis? *Curr Genomics.* 2012;13(3):252-63.
10. Gordon JA, Stein JL, Westendorf JJ, van Wijnen AJ. Chromatin modifiers and histone modifications in bone formation, regeneration, and therapeutic intervention for bone-related disease. *Bone.* 2015.
11. Maggi A. Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(8):1054-60.
12. Centrella M, McCarthy TL. Estrogen receptor dependent gene expression by osteoblasts - direct, indirect, circumspect, and speculative effects. *Steroids.* 2012;77(3):174-84.
13. Khosla S, Melton LJ, Riggs BL. The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed? *J Bone Miner Res.* 2011;26(3):441-51.
14. Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J Clin Invest.* 2008;118(2):421-8.
15. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol.* 2014;5:511.
16. Arnett TR. Acidosis, hypoxia and bone. *Arch Biochem Biophys.* 2010;503(1):103-9.
17. HOS celična linija. Dostopno na: http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines/Human/Alphanumeric/CRL-1543.aspx#generalinformation. Datum dostopa: 10. 06. 2015.
18. Etienne MC, Fischel JL, Milano G, Formento P, Formento JL, Francoual M, et al. Steroid receptors in human osteoblast-like cells. *Eur J Cancer.* 1990;26(7):807-10.
19. Ikegami A, Inoue S, Hosoi T, Mizuno Y, Nakamura T, Ouchi Y, et al. Immunohistochemical detection and northern blot analysis of estrogen receptor in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res.* 1993;8(9):1103-9.

20. Plazmid pCMV ESR1. Dostopno na: <http://www.sinobiological.com/ESR1-cDNA-Clone-g-10236.html> Datum dostopa: 10. 06. 2015.
21. X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent. Dostopno na: <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/958a794d-97ed-e311-98a1-00215a9b0ba8>. Datum dostopa: 30. 07. 2015.
22. CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Dostopno na: <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%2096%20aqueous%20non-radioactive%20cell%20proliferation%20systems%20protocol.pdf>. Datum dostopa: 10. 06. 2015.
23. Reagenčni komplet za izolacijo RNA miRNeasy Mini Kit. Dostopno na: [http://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=632801fb-abc5-4e62-b954-ff51f126a34f\(=en](http://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=632801fb-abc5-4e62-b954-ff51f126a34f(=en). Datum dostopa: 10. 06. 2015.
24. NanoDrop. Dostopno na: <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>. Datum dostopa: 10. 06. 2015.
25. RIN Agilent. Dostopno na: <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-1165EN.pdf>. Datum dostopa: 10. 06. 2015.
26. Agilent RNA Quick Start Guide. Dostopno na: http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/G2938-90037_RNA6000Nano_QSG.pdf. Datum dostopa: 10. 06. 2015.
27. Transcriptor first strand cDNA synthesis kit. Dostopno na: <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/e5c17b5f-91ed-e311-98a1-00215a9b0ba8>. Datum dostopa: 30. 07. 2015.
28. SYBR Select Master Mix. Dostopno na: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/4472919_4473367_SYBR_Select_MasterMix_UG.pdf. Datum dostopa: 10. 06. 2015.
29. el Filali M, Missotten GS, Maat W, Ly LV, Luyten GP, van der Velden PA, et al. Regulation of VEGF-A in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(5):2329-37.
30. Obrador-Hevia A, Chin SF, González S, Rees J, Vilardell F, Greenson JK, et al. Oncogenic KRAS is not necessary for Wnt signalling activation in APC-associated FAP adenomas. *J Pathol.* 2010;221(1):57-67.
31. Stossi F, Barnett DH, Frasor J, Komm B, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor (ER) alpha or ERbeta in human osteosarcoma cells: distinct and common target genes for these receptors. *Endocrinology.* 2004;145(7):3473-86.
32. OligoAnalyzer 3.1. Dostopno na: <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>. Datum dostopa: 30. 07. 2015.
33. TRIzol Reagent. Dostopno na: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf. Datum dostopa: 30. 07. 2015.
34. DC Protein Assay Instruction Manual. Dostopno na: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf>. Datum dostopa: 10. 06. 2015.
35. A Guide to Polyacrilamide Gel Electrophoresis and Detection. Dostopno na: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf. Datum dostopa: 10. 06. 2015.

36. SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate. Dostopno na: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011345_SupSig_West_Femto_MaxSensi_Subs_UG.pdf. Datum dostopa: 30. 07. 2015.
37. Rao LG, Sutherland MK, Reddy GS, Siu-Caldera ML, Uskokovic MR, Murray TM. Effects of 1 α ,25-dihydroxy-16ene, 23yne-vitamin D3 on osteoblastic function in human osteosarcoma SaOS-2 cells: differentiation-stage dependence and modulation by 17-beta estradiol. *Bone*. 1996;19(6):621-7.
38. Kallio A, Guo T, Lamminen E, Seppänen J, Kangas L, Väänänen HK, et al. Estrogen and the selective estrogen receptor modulator (SERM) protection against cell death in estrogen receptor alpha and beta expressing U2OS cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;289(1-2):38-48.
39. Ikegami A, Inoue S, Hosoi T, Kaneki M, Mizuno Y, Akedo Y, et al. Cell cycle-dependent expression of estrogen receptor and effect of estrogen on proliferation of synchronized human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology*. 1994;135(2):782-9.
40. Cauley JA. Estrogen and bone health in men and women. *Steroids*. 2015;99(Pt A):11-5.
41. Jones SM, Novak AE, Elliott JP. The role of HIF in cobalt-induced ischemic tolerance. *Neuroscience*. 2013;252:420-30.
42. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem*. 2003;278(18):15911-6.
43. Hamidian A, von Stedingk K, Munksgaard Thorén M, Mohlin S, Pählman S. Differential regulation of HIF-1 α and HIF-2 α in neuroblastoma: Estrogen-related receptor alpha (ERR α) regulates HIF2A transcription and correlates to poor outcome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;461(3):560-7.
44. Lang KJ, Kappel A, Goodall GJ. Hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol Biol Cell*. 2002;13(5):1792-801.
45. Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoutte J, et al. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet*. 2006;38(11):1289-97.
46. Nelson ER, Wardell SE, Jasper JS, Park S, Suchindran S, Howe MK, et al. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science*. 2013;342(6162):1094-8.
47. Coser KR, Chesnes J, Hur J, Ray S, Isselbacher KJ, Shioda T. Global analysis of ligand sensitivity of estrogen inducible and suppressible genes in MCF7/BUS breast cancer cells by DNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):13994-9.
48. Moggs JG, Murphy TC, Lim FL, Moore DJ, Stuckey R, Antrobus K, et al. Anti-proliferative effect of estrogen in breast cancer cells that re-express ERalpha is mediated by aberrant regulation of cell cycle genes. *J Mol Endocrinol*. 2005;34(2):535-51.
49. Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Estrogen-induced gene expression in bone marrow c-kit+ stem cells and stromal cells: identification of specific biological processes involved in the functional organization of the stem cell niche. *Stem Cells Dev*. 2008;17(6):1153-63.
50. GEO profiles. Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles>. Datum dostopa: 10. 06. 2015.
51. Skowronski K, Skowronki K, Andrews J, Rodenhiser DI, Coomber BL. Genome-wide analysis in human colorectal cancer cells reveals ischemia-mediated expression of motility genes via DNA hypomethylation. *PLoS One*. 2014;9(7):e103243.

52. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*. 1999;140(9):4367-70.
53. Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone*. 2003;32(2):136-41.
54. Shao J, Zhang Y, Yang T, Qi J, Zhang L, Deng L. HIF-1 α disturbs osteoblasts and osteoclasts coupling in bone remodeling by up-regulating OPG expression. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2015.
55. Kichev A, Rousset CI, Baburamani AA, Levison SW, Wood TL, Gressens P, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) signaling and cell death in the immature central nervous system after hypoxia-ischemia and inflammation. *J Biol Chem*. 2014;289(13):9430-9.
56. Bhukhai K, Suksen K, Bhummaphan N, Janjorn K, Thongon N, Tantikanlayaporn D, et al. A phytoestrogen diarylheptanoid mediates estrogen receptor/Akt/glycogen synthase kinase 3 β protein-dependent activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Biol Chem*. 2012;287(43):36168-78.
57. Scholten DJ, Timmer CM, Peacock JD, Pelle DW, Williams BO, Steensma MR. Down regulation of Wnt signaling mitigates hypoxia-induced chemoresistance in human osteosarcoma cells. *PLoS One*. 2014;9(10):e111431.
58. Zuo GL, Zhang LF, Qi J, Kang H, Jia P, Chen H, et al. Activation of HIF α Pathway in Mature Osteoblasts Disrupts the Integrity of the Osteocyte/Canalicular Network. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121266.