

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Blaž ANDLOVIC

**KLONIRANJE IN IZRAŽANJE GENA ZA PROTEIN  
RANKL TER NJEGOV VPLIV NA IZLOČANJE  
LIZOSOMSKIH KATEPSINOV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ STRUKTURNJE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Blaž ANDLOVIC

**KLONIRANJE IN IZRAŽANJE GENA ZA PROTEIN RANKL TER  
NJEGOV VPLIV NA IZLOČANJE LIZOSOMSKIH KATEPSINOV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

**CLONING AND EXPRESSION OF THE PROTEIN RANKL GENE  
AND ITS EFFECT ON THE SECRETION OF LYSOSOMAL  
CATHEPSINS**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študija Strukturne in funkcionalne biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju raziskovalnega odseka B1 Biokemija, molekularna in strukturalna biologija na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije za študij 1. in 2. stopnje in na osnovi Pravilnika o magistrskem delu je bil za mentorja magistrskega dela imenovan prof. ddr. Boris Turk in za recenzenta prof. dr. Gregor Anderluh.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Kristina SEPČIĆ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. ddr. Boris TURK  
Inštitut Jožef Stefan, odsek B1 Biokemija, molekularna in strukturalna biologija

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH  
Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo

Datum zagovora: 27. 8. 2015

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Blaž Andlovic

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 577:6(043.2)=163.6
KG	RANKL/kloniranje/izražanje/osteoklasti/katepsini/merjenje aktivnosti
AV	ANDLOVIC, Blaž, diplomirani biolog (UN)
SA	TURK Boris (mentor)/ANDERLUH, Gregor (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2015
IN	KLONIRANJE IN IZRAŽANJE GENA ZA PROTEIN RANKL TER NJEGOV VPLIV NA IZLOČANJE LIZOSOMSKIH KATEPSINOV
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	XIV, 72 str., 12 pregl., 23 sl., 79 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Protein RANKL (ligand receptorja za aktivator jedrnega dejavnika kappa-β) je glavni mediator diferenciacije osteoklastov. Osteoklasti so večjedne celice, ki so skupaj z osteoblasti ključni za remodelacijo kosti. Kosti se tekom življenja obnavljajo. To je pomembno za vzdževanje strukturne integritete skeleta kot tudi za metabolno funkcijo, ker so kosti skladišče kalcija in fosforja. Porušeno ravnotežje med tvorbo in resorpcijo kosti vodi v razna kostna obolenja. Osteoklasti so z izločanjem katepsinov in klorovodikove kisline odgovorni za resorpcijo tako anorganskega kot tudi organskega dela kosti, osteoblasti pa tvorijo novo kostnino. Naš namen je bil spoznati spremembe, ki se zgodijo med samo diferenciacijo celic RAW264.7 v osteoklaste z vidika sektretoma. S kloniranjem in optimizacijo pogojev izražanja topnega dela mišjega RANKL-a, smo dobili zadostne količine proteina za diferenciacijo celic v osteoklaste. Primerjali smo aktivnost lizosomskih katepsinov na fluorogeni substrat pri diferenciranih in nediferenciranih celicah. Z merjenjem aktivnosti na fluorogeni substrat smo dokazali, da se izločanje izbranih katepsinov razlikuje med diferenciranimi in nediferenciranimi celicami.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	UDK 577:6(043.2)=163.6
CX	RANKL/cloning/expression/osteoclast/cathepsins/measurement of activity
AU	ANDLOVIC, Blaž, diplomirani biolog (UN)
AA	TURK, Boris (supervisor)/ANDERLUH, Gregor (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of biology
PY	2015
TI	CLONING AND EXPRESSION OF THE PROTEIN RANKL GENE AND ITS EFFECT ON THE SECRETION OF LYSOSOMAL CATHEPSINS
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO	XIV, 72 p., 12 tab., 23 fig., 79 ref
LA	sl
AL	sl/en
AB	The RANKL protein (receptor activator of nuclear factor kappa-β ligand) is the main mediator in the osteoclast differentiation. Osteoclasts are multinucleated cells, and together with osteoblasts, they represent the key factor in bone remodulation. The bones are regenerating throughout the course of one's life, which is important for the maintenance of the skeletal structural integrity, as well as for the metabolic function; namely, calcium and phosphorus are stored in bones. Imbalance between bone formation and bone resorption leads to various bone diseases. By releasing cathepsins and hydrochloric acid, the osteoclasts are responsible for resorption of inorganic and organic parts of bones, whereupon the osteoblasts form new bone tissue. Our objective was to observe changes that happen in the RAW264.7 cell differentiation into osteoclasts from the viewpoint of secretome. By cloning and optimization of the conditions of the expression of the soluble part of murine RANKL, we have gained a sufficient amount of protein for the differentiation of cells into osteoclasts. We have compared the activity of lysosomal cathepsins on the fluorogenic substrate in differentiated and undifferentiated cells. By measuring the activity on the fluorogenic substrate, we have proven that the release of the chosen cathepsins differs in differentiated and undifferentiated cells.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO SLIK .....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC .....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XI
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA .....</b>	<b>2</b>
<b>3 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
3.1 ZGRADBA IN FIZIOLOGIJA KOSTI.....	3
3.2 OSTEOKLASTI .....	6
<b>3.2.1 Remodelacija kosti.....</b>	<b>6</b>
3.3 CELIČNA LINIJA RAW264.7 .....	8
3.4 RANKL.....	9
<b>3.4.1 Funkcije proteina RANKL v drugih tkivih.....</b>	<b>11</b>
<b>3.4.2 Rekombinantni RANKL .....</b>	<b>12</b>
3.5 KATEPSINI.....	13
<b>3.5.1 Cisteinski katepsini.....</b>	<b>13</b>
3.5.1.1 Katepsin K .....	16
<b>4 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>19</b>
4.1 MATERIALI .....	19
<b>4.1.1 Kemikalije .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1.2 Pufri, raztopine .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.3 Gojišča in mediji .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.4 Encimi .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.5 Začetni oligonukleotidi .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.6 DNA in proteinski velikostni standardi .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.7 Protitelesa .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.8 Bakterijski sevi.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1.9 Celične kulture .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1.10 Vektorji.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.11 Fluorogeni substrat.....</b>	<b>28</b>
4.2 LABORATORIJSKA OPREMA .....	29

4.3	METODE.....	30
<b>4.3.1</b>	<b>Načrtovanje začetnih oligonukleotidov .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Sterilizacija steklovine, gojišč in raztopin .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Kloniranje cDNA za sRANKL .....</b>	<b>30</b>
4.3.3.1	Pomnoževanje cDNA za sRANKL .....	30
4.3.3.2	Agarozna gelska elektroforeza .....	31
4.3.3.3	Izolacija fragmentov DNA iz agarognega gela in čiščenje.....	32
4.3.3.4	Ligacija pomnožene DNA v vektor .....	32
4.3.3.5	Piprava kompetentnih bakterijskih celic.....	33
4.3.3.6	Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5α.....	34
4.3.3.7	Izolacija plazmidne DNA .....	34
<b>4.3.4</b>	<b>Preverjanje DNA zaporedja inserta.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Izražanje rekombinantnega sRANKL-a.....</b>	<b>35</b>
4.3.5.1	Izbira primernega bakterijskega seva za izražanje .....	35
4.3.5.1.1	Transformacija v različne seve <i>E. coli</i> .....	35
4.3.5.1.2	Razbitje celic z zamrzovanjem, lizocimom in ultrazvokom.....	36
4.3.5.1.3	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS.....	36
4.3.5.1.4	Barvanje gela z raztopino Coomassie modro .....	37
4.3.5.2	Optimizacija izražanja .....	37
4.3.5.2.1	Izbira klena .....	37
4.3.5.2.2	Optimizacija pogojev izražanja .....	37
4.3.5.2.3	Čiščenje sRANKL-a z Ni-NTA afinitetno kromatografijo .....	37
4.3.5.3	Prenos po Westernu .....	38
4.3.5.3.1	Detekcija proteina .....	39
4.3.5.4	Preverjanje aminokislinskega zaporedja proteina .....	39
<b>4.3.6</b>	<b>Gojenje celične kulture RAW264.7.....</b>	<b>40</b>
<b>4.3.7</b>	<b>Dodajanje rekombinantnega sRANKL-a celični kulturi.....</b>	<b>40</b>
4.3.7.1	Spremljanje morfoloških sprememb z mikroskopom.....	41
4.3.7.2	Barvanje za TRAP .....	41
<b>4.3.8</b>	<b>Merjenje aktivnosti s fluorogenim substratim.....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>43</b>
5.1	POMNOŽEVANJE CDNA ZA SRANKL.....	43
5.2	KLONIRANJE PCR PRODUKTOV V PLAZMID .....	43
5.3	PREVERJANJE ZAPOREDJA DNA VSTAVKA .....	44
5.4	IZRAŽANJE IN OPTIMIZACIJA POGOJEV .....	45
5.5	ČIŠČENJE PROTEINA .....	47
5.6	DETEKCIJA PROTEINA IN PREVERJANJE AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA .....	48

5.7	MORFOLOŠKE SPREMEMBE CELIC RAW264.7 PO DODATKU SRANKL-A .....	49
5.8	IDENTIFIKACIJA OSTEOKLASTOV .....	56
5.9	MERJENJE AKTIVNOSTI.....	58
<b>6</b>	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>ZAKLJUČKI .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>66</b>

## KAZALO SLIK

Sl. 1: Shematski prikaz zgradbe kosti ( <a href="https://www.studyblue.com/notes/n/integumentary-and-musculoskeletal-systems/deck/6650001">https://www.studyblue.com/notes/n/integumentary-and-musculoskeletal-systems/deck/6650001</a> ) .....	4
Sl. 2: Shematski prikaz kostne remodelacije. V prvi fazi pride do umika osteoblastov in aktivacije osteoklastov. Aktivirani osteoklasti resorbirajo kost in povečujejo resorpcijsko lakuno. Po resorpciji kosti se osteoklasti odmaknejo in preidejo v apoptozo. Sledi faza preobrata kjer makrofagi očistijo lakuno, ki jo nato zasedejo osteoblasti. Osteoblasti tvorijo osteoid, ki v zadnji fazi mineralizira (Raggatt in Partridge, 2010: 3) .....	8
Sl. 3: Shematski prikaz trimera mišjega RANKL-a. Puščice označujejo $\beta$ -trakove. Monomeri so prikazani z različno barvo (Ito in sod., 2002: 4) .....	10
Sl. 4: Tridimenzionalna struktura človeškega prokatepsina L. Rdeče je obarvan propeptid, zeleno pa zrel encim. Rumena barva prikazuje disulfidne mostičke. Aktivna ostanka (Cys25 in His164) predstavljata palčki (Brix in Stöcker, 2013: 133) .....	14
Sl. 5: Shematski prikaz organizacije in 3D strukture katepsina K. Celotna dolžina proteina je 329 aminokislin, kjer je proencim dolg 314, pro regija 99 in katalitično aktivna proteaza 215 aminokislin (Brömme, 2011: 3). .....	17
Sl. 6: Razgradnja kolagena tipa 1 s katepsinom K. Kompleks encima s hondroitin 4-sulfatom je popolnoma razgradil kolagen tipa 1, medtem ko je bila razgradnja v odsotnosti hondroitin 4-sulfata nepopolna (Brömme, 2011: 4). .....	18
Sl. 7: Shema vektorja pET-22b(+). ....	26
Sl. 8: Shema vektorja pMD18-T Simple z vstavljenim mišjim cDNA za RANKL .....	27
Sl. 9: Slika agaroznega gela po resktrikciji vektorja z vključkom. Slika prikazuje 2 ločeni lis, ki predstavljata vektor in vključek. ....	44
Sl. 10: Gel prikazuje izražanje različnih klonov seva BL21-CodonPlus (DE3)-RP. Izražanje je trajalo 4 ure pri 37 °C. Najvišje izražanje ima drugi klon. ....	45
Sl. 11: Poliakrilamidni gel po razbarvanju barvila Coomassie modro. Leva stran gela prikazuje izražanje pri 37 °C in 4 urah, desna stran pa čez noč pri 37 °C. S številkami so označene posamezne frakcije po Ni-NTA afinitetni kromatografiji. ....	47
Sl. 12: Poliakrilamidni gel po čiščenju. Izražanje je trajalo 6,5 ur pri 25 °C. Iz 2 L tekočega LBAC gojišča smo v zadnji frakciji pridobili najvišjo koncentracijo 1,2 mg/mL	

proteina. S številkami so označene posamezne frakcije po Ni-NTA afinitetni kromatografiji.....	48
Sl. 13: Imunodetekcija heksahistidinske oznake z DAB. Bakterijske celice so verjetno nekaj sRANKL-a razgradile, kar je vidno pri drugi in tretji frakciji, kjer sta 2 lisi. Izražanje proteina je trajalo 6,5 ur pri 25 °C.....	49
Sl. 14: Nediferencirane mišje celice RAW264.7. Pred dodatkom sRANKL-a so okrogle in so pritrjene na podlago po naključni razvrstitvi (avtor fotografije Blaž Andlovic) .....	50
Sl. 15: Diferenciacija mišjih celic RAW264.7. En dan po dodatku sRANKL-a, koncentracije 100 ng/ml v medij, so celice spremenile obliko ter začele migrirati in se združevati v skupine (avtor fotografije Blaž Andlovic) .....	51
Sl. 16: Migracija RAW264.7 celic en dan po dodatku rekombinantnega sRANKL-a v medij. Slike prikazujejo celice na vsake 4 minute. Označena so polja z največjo migracijo celic (avtor fotografije Blaž Andlovic).....	52
Sl. 17: Peti dan po dodatku sRANKL-a se večina celic ne diferencira, tvorijo pa celične aggregate (avtor fotografije Blaž Andlovic).....	53
Sl. 18: S puščico je označen osteoklast. Večji je od celic v njegovi bližini. Na sliki so vidni tudi celični agregati (avtor fotografije Blaž Andlovic) .....	54
Sl. 19: Osteoklast je približno 10× večji od sosednjih celic (avtor fotografije Blaž Andlovic) .....	55
Sl. 20: Peti dan brez dodanega sRANKL-a celice ohranijo morfologijo (avtor fotografije Blaž Andlovic).....	56
Sl. 21: S puščico je označen osteoklast, ki je obarvan rdečkasto. Barva je posledica prisotnosti encima TRAP (avtor fotografije Blaž Andlovic).....	57
Sl. 22: Slika prikazuje, da so se le redke celice diferencirale v osteoklaste (avtor fotografije Blaž Andlovic).....	58
Sl. 23: Merjenje aktivnosti na substrat Z-Phe-Arg-AMC. Naklon spremembe fluorescence s časom predstavlja aktivnost .....	59

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Uporabljena gojišča.....	22
Pregl. 2: Uporabljena restrikcijska encima.....	23
Pregl. 3: Uporabljeni bakterijski sevi .....	25
Pregl. 4: Uporabljeni nukleotidi namenjeni za pripravo rekombinantnega proteina sRANKL. Restrikcijska mesta so podprtana. ....	30
Pregl. 5: Sestava reakcijske zmesi za PCR.....	31
Pregl. 6: Temperaturni profil reakcije s PCR. ....	31
Pregl. 7: Zmes reagentov, ki smo jih uporabili pri rezanju pomnožene DNA in vektorja .	33
Pregl. 8: Mešanica reagentov za ligacijo PCR produkta v vektor. ....	33
Pregl. 9: Zmes reagentov, ki smo jih uporabili pri restrikciji. ....	35
Pregl. 10: Prikaz vpliva različnih temperatur in časov po sprožitvi izražanja na koncentracijo rekombinantnega proteina.....	46
Pregl. 11: Podatki naklonov aktivnosti nediferenciranih in diferenciranih celic ter njihovo povprečje in standardni odklon .....	59
Pregl. 12: Rezultati po Studentovem t-testu. Rezultat se je statistično signifikantno razlikoval ( $P < 0,05$ ) .....	59

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava ali simbol	Pomen
% (V/V)	volumski delež
% (m/V)	masno-volumski delež
A	adenin
A-MuLV	Abelsonov mišji levkemični virus
ADAM17	A dizintegrin in metaloproteinazna domena s proteinom 17
AP-1	aktivator protein 1
AP-3	aktivator protein 3
APS	amonijev persulfat
BSA	goveji serumski albumin
C	citozin
CD4	označevalec pripadnosti 4
CD11b	označevalec pripadnosti molekula 11B
CD14	označevalec pripadnosti 14
CD25	označevalec pripadnosti 25
cDNA	komplementarna DNA
DAB	3,3'-diaminobenzidin
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ERK	ekstracelularna signalno regulirana kinaza
ETS-1	protein C-ets-1
FBS	fetalni goveji serum
g	gram
G	gvanin
GAG	glikozaminoglikan

GST	glutation s-transferaza
H-APF-1	jedrni protein hepatocite 1
HCl	klorovodikova kislina
IKK	I $\kappa$ B kinaza
IL-1 $\alpha$	interleukin-1 alfa
IPTG	izopropil $\beta$ -D-1-tiogalaktosid
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
Kbp, bp	kilobazni par, bazni par
kDa, Da	kilodalton, dalton
M-CSF	makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik
Mitf	transkripcijski dejavnik mikroftalmije
MMP	metalo proteaza matriksa
NFAT-c1	jedrni dejavnik aktiviranih celic T, -c1
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
NF- $\kappa$ $\beta$	jedrni dejavnik kappa beta
Obr./min	obrati na minuto
OD	optična gostota
ODF	dejavnik diferenciacije osteoklastov
OPG	osteoprotegerin
OPGL	ligand osteoprotegerina
PBS	fosfatni pufer z NaCl
PCR	verižna reakcija s polimerazo
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije ionov H $3$ O $^+$
PI3K	fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaza
PTH	paratiroidni hormon
PVDF	poliviniliden fluorid
RANK	receptor za aktivator jedrnega dejavnika kappa beta

RANKL	ligand receptorja za aktivator jedrnega dejavnika kappa $\beta$
RGD	arginin-glicin-aspartatna kislina
T	tirozin
T3	trijodtironin
TAE	tris acetatni pufer
TEMED	tetrametiletilendiamin
TFE3	transkripcijski dejavnik E3
TNF	dejavnik nekroze tumorjev
TNF- $\alpha$	dejavnik nekroze tumorjev $\alpha$
TNF- $\beta$	dejavnik nekroze tumorjev $\beta$
TNFSF11	gen za ligand receptorja za aktivator jedrnega dejavnika kappa $\beta$
TRAF6	dejavnik 6 povezan z receptorjem za TNF
TRAP	tartrat rezistentna kisla fosfataza
TRANCE	citokin podoben TNF
Tricin	N-(2-hidroksi-1,1-bis(hidroksimetil)etyl)glicin
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
V-ATPaze	vaskularni tip H <sup>+</sup> ATPaze
VEGF	vaskularni endotelijski rastni dejavnik A

## 1 UVOD

Skelet je metabolno aktiven organ, ki se tekom življenja obnavlja v procesu kostne remodelacije. Remodelacija je nujno potrebna za vzdrževanje strukturne integritete skeleta in s svojo metabolno funkcijo služi kot rezervoar kalcija in fosforja (Raisz, 1999). Porušeno ravovesje med tvorbo in resorpcijo kosti vodi do obolenj kot so osteoporoz, osteopetroza in pagetova bolezen kosti (Anandarajah, 2009). Poznavanje biologije osteoklastov in komunikacije med celicami je ključno za načrtovanje novih zdravil za zdravljenje, in tudi za preprečevanje nastanka bolezni. Remodelacija poteka na kostnih remodelacijskih enotah, ki so sestavljene iz osteoblastov in osteoklastov. Osteoklasti s svojo aktivnostjo resorbirajo apeks kosti, osteoblasti pa nato tvorijo novo kostnino (Clarke, 2008). Remodelacija je odvisna od komunikacije med kostnimi celicami, komunikacije med kostnimi celicami in imunskim sistemom ter od lokalnih mediatorjev, kot so rastni dejavniki in citokini (Zupan in sod., 2013). Njihovo izražanje ter ravnotežje njihovega delovanja je ključnega pomena za pravilno funkcioniranje procesa remodelacije. Eden izmed najpomembnejših citokinov pri remodelaciji kosti je RANKL (ang. Receptor activator of nuclear factor kappa- $\beta$  ligand). Z vezavo na receptor RANK (ang. Receptor activator of nuclear factor kappa- $\beta$ ) sproži diferenciacijo hematopoetskih celic v osteoklaste in jih aktivira. Med procesom diferenciacije se spreminja izražanje določenih genov, posledica diferenciacije pa je specifičen sekretom osteoklastov. S svojo aktivnostjo razgrajujejo tako organski kot anorganski del kosti. S pritrditvijo na kost pod seboj ustvarijo posebno mikrookolje s kislim pH. V mikrookolje izločajo klorovodikovo kislino (HCl), ki raztopi anorganski del in proteaze, ki so odgovorne za razgradnjo organskega dela kosti. Proteaze, ki sodelujejo pri razgradnji so metalo proteaze matriksa (MMP), katepsini in druge (Bilezikian in sod., 2002). Med katepsini, ki jih izločajo osteoklasti je najpomembnejši katepsin K, za katerega se je izkazalo, da je ključnega pomena pri nekaterih boleznih (Lecaille in sod., 2008).

RANKL je pomemben mediator diferenciacije osteoklastov. Z nižanjem proračuna raziskovalnim ustanovam v Sloveniji in visoke cene RANKL-a ( $10 \mu\text{g}$  stane  $500 \text{ €}$ , SIGMA ALDRICH) smo za raziskovalne namene skoraj prisiljeni v pripravo

rekombinantnega proteina. Kloniranje in optimizacija pogojev izražanja rekombinantnega proteina sta postopka, ki nam omogočata njegovo pridobivanje.

## 2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Cilji, ki smo si jih zastavili v magistrski nalogi so bili:

- Kloniranje in izražanje aktivnega mišjega rekombinantnega proteina RANKL.
- Dokazati spremembe v izločanju izbranih katepsinov ob njegovi prisotnosti.

Hipotezo, ki smo jo postavili, je bila:

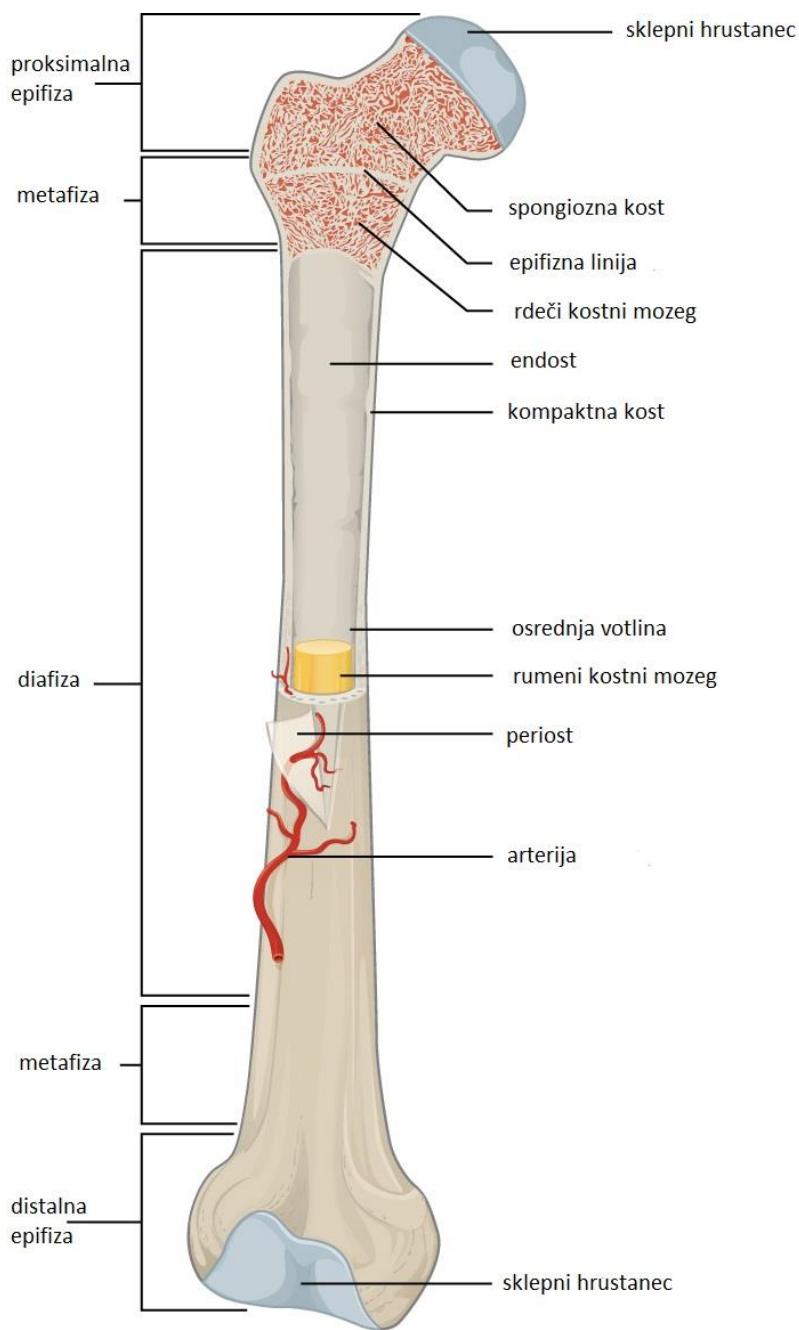
- Diferenciacijo in aktivacijo mišjih makrofagov, povzročeno z rekombinantnim proteinom RANKL, lahko spremljamo z merjenjem aktivnosti izločenih katepsinov.

### 3 PREGLED OBJAV

#### 3.1 ZGRADBA IN FIZIOLOGIJA KOSTI

Kost je dinamično vezivno tkivo, ki ima funkcijo mehanske integritete in varovanja organov. Udeležena je v metabolnih poteh, ki so povezane s homeostazo mineralov, služi pa tudi kot primarni hematopoetski organ (Kini in Nandeesh, 2012).

Skelet je sestavljen iz dveh delov: aksialnega skeleta, ki vključuje kosti glave in trupa ter apendikularnega skeleta, ki vključuje vse kosti okončin in medenico (Bilezikian in sod., 2002). Osnovni model za predstavitev zgradbe so dolge kosti, kot so tibia, femur in humerus. Razdeljene so na tri dele: epifiza, metafiza in diafiza (slika 1). Membrane na zunanjih in notranjih površinah imajo pomembno vlogo pri modelaciji in remodelaciji kosti. Periost se nahaja na zunanjih površinah. Sestavljen je iz zunanjih fibroznih plasti in notranjih kambijskih plasti. Notranja površina kosti pa predstavlja endost. V kambijskih plasti in endostu se nahajajo osteoprogenitorne celice. Kostnino lahko razdelimo na kompaktno in spongiosno. Kompaktna kostnina ima urejeno strukturo iz koncentričnih lamel, ki tvorijo osteon. Kompaktna kostnina obdaja spongiosno, ki ima enako zgradbo, nima pa urejene strukture. Kost je sestavljena iz organskega in anorganskega dela. Po masi predstavlja 60 % tkiva anorganska snov, 8-10 % voda, ostalo pa je organska snov. Anorganski del je pretežno iz hidroskiapatita ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ), organski del pa je iz več kot 90 % kolagena tipa 1. Poleg hidroskiapatita najdemo tudi druge minerale magnezij, stroncij, natrij, kalij, klor in fluorid (Marcus in sod., 2010)



Slika 1: Shematski prikaz zgradbe kosti (<https://www.studyblue.com/notes/n/integumentary-and-musculoskeletal-systems/deck/6650001>)

Molekula kolagena tipa 1 je sestavljenica iz treh polipeptidnih verig. Vsaka veriga pa je sestavljena iz približno 1000 aminokislin. Verige imajo obliko trojne vijačnice iz dveh alfa1 verig in ene alfa2 verige. Nastanek vijačnice omogoča velik delež aminokislin proline, hidroskiprolina in glicina. Pojavljajo se v zaporedjih Gly-X-Hyp in Gly-Pro-X,

kjer je X katerakoli aminokislina. Urejajo se v kolagenske fibirile, ki nato tvorijo kolagensko vlakno (Brömmme, 2011).

Za normalno funkcijo kosti so pomembni tudi drugi proteini, kot so osteopontin, kostni sialoprotein, kostni kisli glikoprotein, trombospondin in fibronektin. Imajo zaporedje RGD (arginin-glicin-aspartatna kislina). To zaporedje prepozna integrini, ki omogočajo povezavo med citoskeletom celic in ekstracelularnim matriksom. Integrini na osteoblastih, osteoklastih in fibroblastih so ključni za vsidranje celic na ekstracelularni matriks (Mundy, 1999).

Celice, ki jih najdemo v kosti izhajajo iz hematopoetskih in mezenhimskih matičnih celic. Iz mezenhimskih matičnih celic nastanejo osteoblasti in osteocite, iz hematopoetskih pa osteoklasti (Pino in sod., 2012).

### 3.2 OSTEOKLASTI

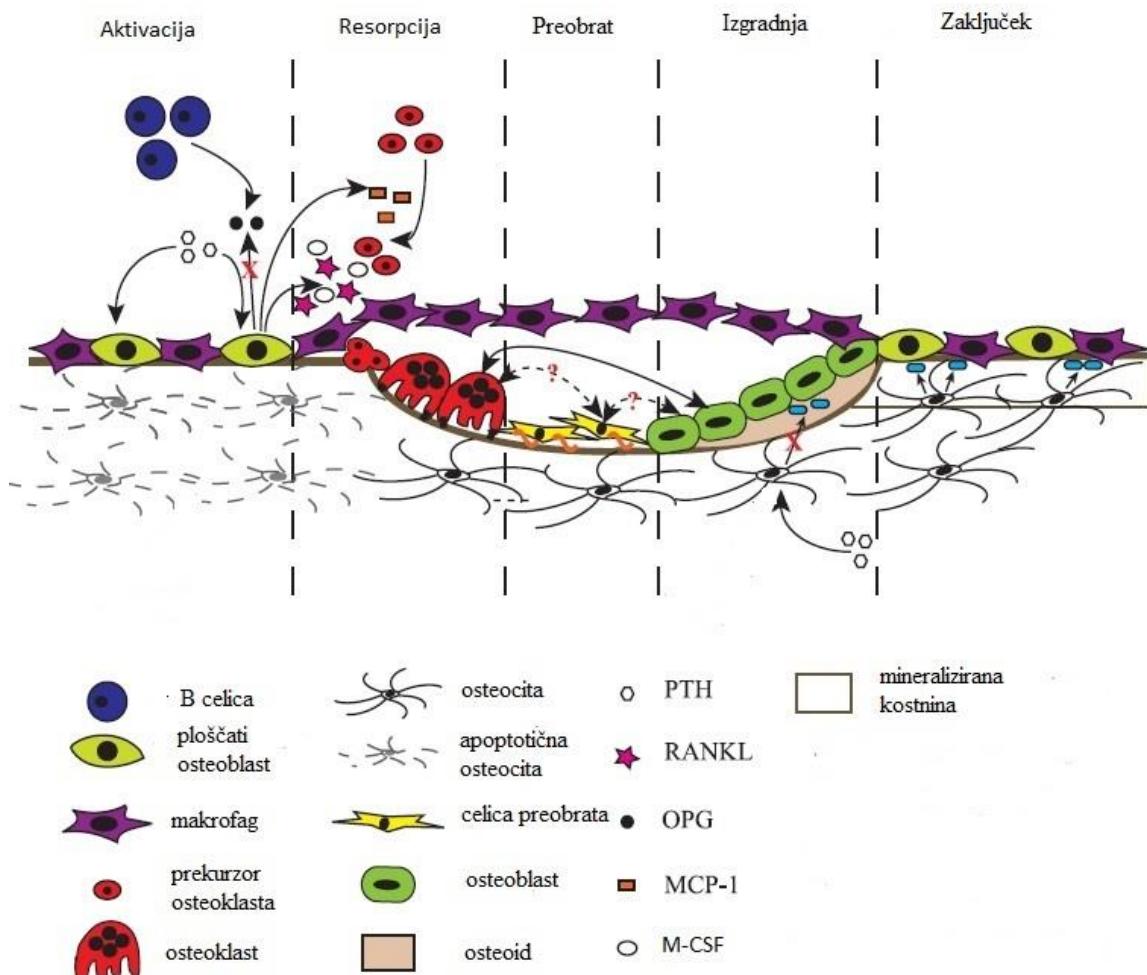
Osteoklasti so večjedrne celice, ki so odgovorne za resorpcijo kosti. Poimenoval in karektiriziral jih je Kolliker v pozmem devetnajstem stoletju (Zaidi in sod., 1993). Nastanejo iz hematopoetskih matičnih celic, iz CD14 in CD11b prekurzorjev. Njihova diferenciacijska pot je podobna kot pri makrofagih in dentritičnih celicah. Začetna nespecifična diferenciacija do osteoklastov je odvisna od transkripcijskih dejavnikov PU.1 in M-CSF (ang. macrophage colony-stimulating factor). Najprej nastanejo prekurzorske celice osteoklastov, ki po vezavi citokina RANKL na RANK združijo in se nato diferencirajo v osteoklaste (Duque in Kiel., 2009). Osteoklasti, ki razgrajujejo kostnino, se od nedejavnih razlikujejo po tem, da so polarizirani. Poleg cone za vsidranje imajo še tri specializirane membranske domene: nagubano membrano, funkcionalno sekretorno domeno in bazolateralno membrano. Ko se osteoklast pripravi za resorpcijo kosti, se s cono za vsidranje pritrdi na kostni matriks in pod seboj tvori nagubano membrano. Nagubana membrana je resorbcijski organel, ki ga skupaj s plazemsko membrano tvorijo intracelularni vezikli. Razgrajeni produkti iz resorpcijske lakune s transcitozo potujejo iz nagubane membrane do funkcionalne sekretorne domene, kjer se izločijo v ekstracelularni prostor (Teitelbaum in Ross, 2003; Väänänen in sod., 2000; Blair in Zaidi, 2006).

Osteoklasti imajo edinstven sekretom. S pomočjo V-ATPaze (ang. Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase) zakisajo prostor pod seboj v katerega izločajo različne proteaze in kolagenaze. Ključni encimi za razgradnjo organskega matriksa so katepsini K, L, B in S, med katerimi se v največji meri izloča katepsin K. Izločajo tudi razne metaloproteaze (MMP), na tartrat rezistento fosfatazo (TRAP) in druge proteaze (Brömme, 2011).

#### 3.2.1 Remodelacija kosti

Remodelacija kosti je regulirana tako sistemsko, kot tudi lokalno. Najpomembnejši sistem za regulacijo remodelacije je RANKL/RANK/OPG (Khosla, 2001). RANKL inducira resorpcijo preko aktivacije in diferenciacije osteoklastov, OPG (osteoprotegerin) pa jo z vezavo na RANKL zavira. Poleg sistema RANKL/RANK/OPG je potrebno izpostaviti tudi druge mediatorje diferenciacije in aktivacije osteoklastov, ki lahko delujejo sinergistično z RANKL-om ali pa sami aktivirajo signalno pot diferenciacije. Sem uvrščamo H<sup>+</sup> ione,

interlevkine, peptide RBD, kolagen, TNF- $\alpha$  in druge. Poleg mediatorjev diferenciacije je pomembna tudi komunikacija z imunskim in hormonskim sistemom. Regulacija remodelacije na hormonskem nivoju poteka preko aktivne oblike vitamina D<sub>3</sub> (1,25-dihidroksivitamin D), paratiroidnega hormona (PTH), estrogena, kalcitonina, trijodtironina (T3), glukokortikoidov, insulina, rastnega hormona in prolaktina. Proces remodelacije kosti poteka na kostnih remodelacijskih enotah (slika 2). Prva faza vključuje odmik osteoblastov in pritrditev osteoklastov, ki se v stiku s površino in ob prisotnosti citokina RANKL aktivirajo. Z izločanjem klorovodikove kislinske pod seboj ustvarijo kisel medij v katerega izločajo kolagenaze, proteze in druge encime za razgradnjo organskega matriksa. Klorovodikova kislina raztopi anorganski del kosti in tako izpostavi organski matriks, ki je substrat za izločene encime. Osteoklasti s svojo aktivnostjo povečujejo resorpcijsko lakuno in se potem iz še neznanih razlogov odmaknejo. Nekateri postanejo neaktivni, drugi pa preidejo v apoptozo. Sledi čiščenje lakune z makrofagi in monociti, nato pa jo zasedejo osteoblasti. Osteoblasti sintetizirajo strukturne proteine in tvorijo osteoid. Končna faza remodelacije je mineralizacija osteoida (Okajima, 2013; Takayanagi, 2005; Katagiri in Takahashi, 2002; Roodman, 2006; Arnett, 2003; Blair in sod., 2002; Kobayashi in sod., 2000; Pereverzev in sod., 2007).



Slika 2: Shematski prikaz kostne remodelacije. V prvi fazi pride do umika osteoblastov in aktivacije osteoklastov. Aktivirani osteoklasti resorbirajo kost in povečujejo resorpcjsko lakuno. Po resorpciji kosti se osteoklasti odmaknejo in preidejo v apoptozo. Sledi faza preobrata kjer makrofagi očistijo lakuno, ki jo nato zasedejo osteoblasti. Osteoblasti tvorijo osteoid, ki v zadnji fazi mineralizira (Raggatt in Partridge, 2010: 3)

### 3.3 CELIČNA LINIJA RAW264.7

Celična linija RAW264.7 je mišja, makrofagom podobna celična linija. Pridobljena je bila pred skoraj 40 leti iz ascitesa tumorja BALB/c miši, ki ga je sprožil Abelsonov mišji levkemični virus (A-MuLV) (Raschke in sod., 1978). Imajo veliko lastnosti makrofagov, kot so produkcija NO, fagocitoza, občutljivost na TLR agoniste in mobilnost. Danes je celična linija RAW264.7 najbolj razširjena linija makrofagov, saj se zelo pogosto uporablja v medicinskih raziskavah (Hartley in sod., 2008). Za razliko od večine drugih iz miši

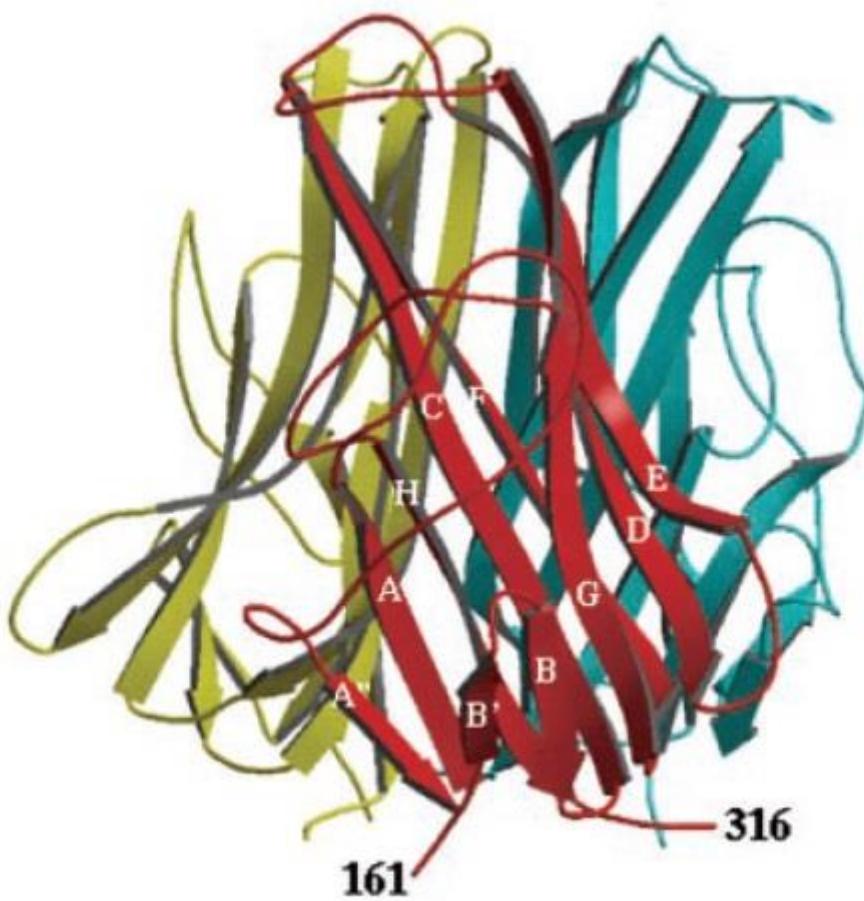
pridobljenih celičnih kultur, podpira replikacijo mišjih norovirusev (Wobus in sod., 2004). Raziskovalci so pri študijah mišjega modela bolezni dihal ugotovili, da je celična linija RAW264.7 edina učinkovita za širjenje povzročitelja virus mišje pljučnice, in za merjenje z okužbo povezanih vnetnih mediatorjev (Dyer in sod., 2007). Celična linija je bila zaradi enostavnosti razmnoževanja celic, visoke učinkovitosti za transfekcijo DNA, občutljivosti na interferenčno RNA (Shin in sod., 2006), in prisotnost receptorjev za mnoge ustrezne ligande ter številnih drugih lastnosti, izbrana kot osnovni eksperimentalni sistem za raziskovanje signalnih poti celične signalizacije pri makrofagih (dostop na spletnem naslovu <http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/table.cgi?cellabbr=RW>). Primerna je tudi kot model raziskav delovanja makrofagov in osteoklastov pri različnih bolezenskih stanjih skeleta, kot so npr. osteoporoz ali osteoartritis.

Uporaba celične linije RAW264.7 lahko vsaj deloma nadomesti živalske modele in poskuse na živalih. Celice so primerne za študije celične diferenciacije v osteoklaste in primerjave izražanja ter karakterizacijo proteinov pred in po diferenciaciji. Ta linija makrofagov je zelo primerna za diferenciacijo z RANKL-om.

### 3.4 RANKL

RANKL, znan tudi kot ODF, OPGL in TRANCE, je homotrimerni transmembranski protein tipa 2, ki spada v družino TNF (ang. tumor necrosis factor). Kodira ga gen TNFSF11, ki se nahaja na lokusu 13q14 kromosoma (mišji na kromosomu 14). Zgrajen je iz 317 aminokislin (316 aminokislin pri miših), kjer topno obliko predstavlja veriga aminokislin 140 – 317 (pri miših aminokisline 139 – 316). Aminokislinsko zaporedje med mišjim in človeškim RANKL-om je v 83 % identično. N-vezana glikozilacija je na mestih 171 in 198 (pri miših 197 in 262). Sestavlja ga kratka N-terminalna citoplazemska domena in ohranjena C-terminalna ekstracelularna domena, ki je iz treh beta trakov s topologijo rulade. Topna ekstracelularna domena se od membranske cevi s proteolitičnimi encimi, ali pa je posledica alternativnega izrezovanja. Encim, ki je udeležen pri cepitvi topnega dela od membranskega, je ADAM17 (ang. A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17). RANKL monomer je sestavljen iz dveh β-ravnin. β-trakovi A'', A,

H, C in F tvorijo notranjo  $\beta$ -ravnin,  $\beta$ -trakovi B', B, G, D in E pa tvorijo zunanjou  $\beta$ -ravnino (slika 3). Struktura je kljub nizki podobnosti v zaporedju aminokiselin drugih proteinov iz družine TNF, podobna. Ekstracelularna domena ima s TNF $\beta$  23 % in s TRAIL 33 % podobnost v zaporedju aminokiselin. Največje razlike so v AA'' zanki. Aminokislinski ostanki, ki so ključni za vezavo RANKL-RANK so Ile-249 (Ile-248 pri miših) v DE zanki, Lys-181 (Lys-180 pri miših) v AA'' zanki za specifično interakcijo in Gln-237 (Gln-236 pri miših) v N-terminalnem delu D traka (Douni in sod., 2011; Anandarajah, 2009; Liu in sod., 2010; Ito in sod., 2002).



Slika 3: Shematski prikaz trimera mišjega RANKL-a. Puščice označujejo  $\beta$ -trakove. Monomeri so prikazani z različno barvo (Ito in sod., 2002: 4)

RANKL se v veliki meri izraža v perifernih limfnih vozlih, kostnem mozgu, timusu, vranici, Peyerjevi plošči, možganih, srcu, koži, skeletnih mišicah, ledvicah, jetrih in pljučih. Celice, ki ga izražajo, so celice osteoblastov, stromalne celice kostnega mozga, sinovialne celice, aktivirane T celice, B celice, fibroblasti, endotelijske celice in hondrocyti.

Na izražanje RANKL-a vplivajo številni hormoni, rastni dejavniki, peptidi in citokini (Sandrine in sod., 2004).

Za aktivacijo signalne poti diferenciacije je ključni korak vezava RANKL-RANK. Vezava sproži nadaljnjo kaskado preko TRAF6 (ang. TNF receptor-associated factor 6), ki deluje kot sekundarni obveščevalec za aktivacijo drugih spodnjih signalnih poti. Ena izmed signalnih poti vključuje aktivacijo transkripcijskega dejavnika NF- $\kappa$ B (ang. Nuclear factor kappa  $\beta$ ) in c-Jun. Aktivirani NF- $\kappa$ B poveča izražanje c-fos, ki interagira z NFAT-c1 (ang. Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1). NFAT-c1 je glavni mediator transkripcije genov za osteoklastogenezo. Druge signalne poti pa posredujejo signal za aktivacijo in preživetje osteoklastov. V te signalne poti so vključeni proteini Src, ERK, JNK, p38 in IKK (Asagiri in Takayanagi, 2007; Hirotani in sod., 2004).

### 3.4.1 Funkcije proteina RANKL v drugih tkivih

RANKL ima poleg vloge pri remodelaciji kosti tudi druge funkcije. Njegova pomembna vloga je sodelovanje pri embrionalnem razvoju limfnega tkiva in njegovi homeostazi. Odsotnost RANKL-a je pri živalih povzročila odsotnost limfnih vozlov, nepravilnosti v Peyerjevi plošči in v vranici. Tvorba sekundarnih limfnih organov se prične okrog 15 dneva embrionalnega razvoja z rekrutacijo hematopoetskih limfoidnega tkiva inducirajočih celic. Komunikacija med celicami, ki inducirajo limfno tkivo, limfnim tkivom ter prekurzorji organizatorja limfnega tkiva privede do procesa, kjer začnejo celice organizatorja limfnega tkiva izražati RANKL in kemokine. Njihovo izražanje privabi veliko število inducirajočih celic limfnega tkiva, ki skupaj z organizatorjem limfnega tkiva pričnejo tvoriti limjni vozeli (Mueller in Hess, 2012).

Prav tako je RANKL pomemben pri embrionalnem razvoju srčnih zaklopk. Regulacija izražanja RANKL-a in VEGF-ja (ang. Vascular endothelial growth factor A) je ključna za normalen razvoj srčnih zaklopk. VEGF inducira proliferacijo endokardialnih blazinic preko NFATc1. Ko endokardialne blazinice dozorijo, endotelijalne celice endokardialne blazinice izražajo RANKL in s tem zaustavijo proliferacijo (Combs in Yutzey, 2009). Vplival naj bi tudi na preživetje endotelijalnih celic preko PI3K/Akt signalne poti (Kim H.-H. in sod., 2003).

Epidermalni RANKL kotrolira število regulatornih T celic z aktivacijo dentritičnih celic. Regulatorne CD4+ CD25+ T celice so pomembne pri zaviranju imunskega odziva. Keratinocite v vneti koži izražajo RANKL kar povzroči spremembe v funkciji epidermalnih dentritičnih celic in v regulatornih CD4+ CD25+ T celicah. Izražanje RANKL-a v epidermisu zmanjša odzive na alergijsko hipersenzitivnost in razvoj sistemске avtoimunosti (Loser in sod., 2006).

Raziskave na možganih samic podgan in miši so pokazale potencialno vlogo RANKL-a pri uravnavanju telesne temperature. RANKL naj bi deloval na center za termoregulacijo. Povišano izražanje je povzročilo povišano telesno temperaturo (Hanada in sod., 2009).

Med nosečnostjo je RANKL zadolžen za razvoj mlečnih žlez in za laktacijo. Miši brez RANKL-a so imele med nosečnostjo nepravilni lobuloaveolarni razvoj, nepravilnosti v proliferaciji, preživetju in diferenciaciji mamarnih epitelijskih celic (Kim S.-N. in sod., 2006).

### 3.4.2 Rekombinantni RANKL

Proteini so pomemben predmet v strurnih, biomedicinskih in biotehnoloških raziskav. Pridobivanje visoko kvalitetnih rekombinantnih proteinov je ključno za uspešen razvoj terapevtskih inhibitorskih molekul. V zadnjih nekaj letih so razvili nove tehnologije, ki omogočajo povečanje pridobivanja rekombinantnih proteinov za terapevtske raziskave, še vedno pa predstavlja izviro izvirnosti in stabilnosti proteinov.

*Escherichia coli* je najpogosteje uporabljan sistem za pridobivanje rekombinantnih proteinov, ki jih uporabljajo za strurne in funkcionalne raziskave. Visoko izražanje rekombinantnih proteinov v *E. coli* pogosto vodi v kopičenje le-teh v inkluzijskih telescih. V osnovi lahko izražanje in izvirnost optimiziramo s spremenjanjem pogojev izražanja, kot so temperatura, tip gojišča in različni sevi *E. coli*. Alternativno orodje je uporaba fuzijskih označevalcev, ki lahko povečajo izvirnost izraženih proteinov. Označevalce se pogosto uporablja za izražanje rekombinantnih proteinov z namenom povečanja izvirnosti in za čiščenje z afiniteto. Zaradi heterogenosti proteinov, kljub optimiziranim metodam, vseh ne moremo pridobiti v izvirni obliki (Sørensen in Mortensen, 2005; Weickert in sod., 1996).

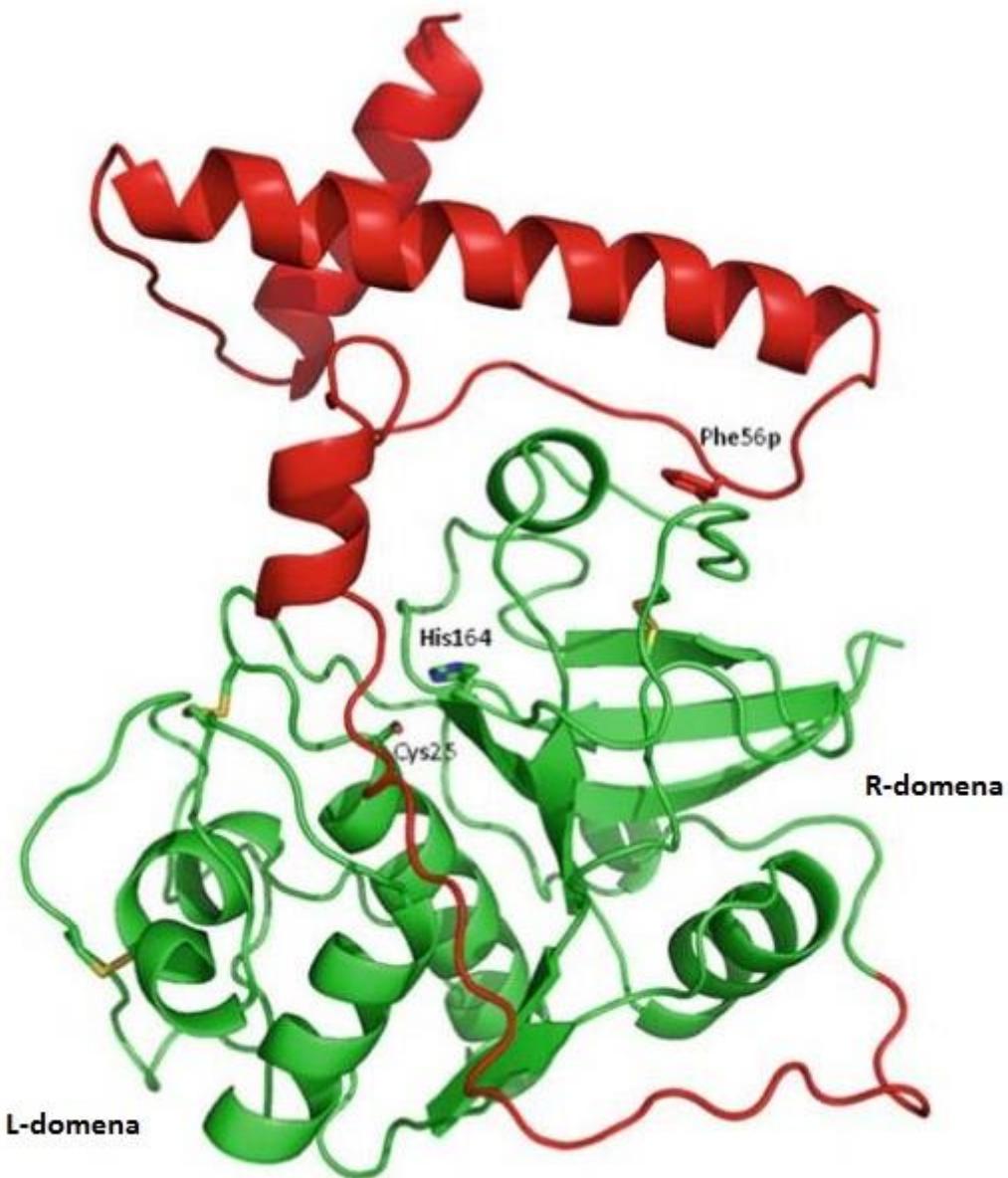
Papaneophytou in sodelavci (2013) so s sistematskim pristopom optimizirali izražanje ekstraceularne domene proteina RANKL v *E. coli*. Del gena, ki kodira topni del RANKL-a, so vstavili v vektor pGEX-6P-1, ki je imel GST (glutation s-transferaza) označevalec.

### 3.5 KATEPSINI

Lizosomske kisle proteaze, ki jih poznamo pod imenom katepsini, so bile odkrite v začetku dvajsetega stoletja. Ime katepsin izhaja iz grške besede kathepsein, kar v dobesednem prevodu pomeni razgraditi. Besedo sta predlagala Wilstatter in Bamann kot poimenovanje proteaz levkocitov in tkiv, ki so aktivne v kislem okolju (Goto in sod., 2003). So raznolika skupina proteaz, ki jih sestavlajo različni katalitični tipi. Poznamo serinske katepsine (catepsin A), aspartatne katepsine (catepsin D in E) in cisteinske katepsine, ki jih je največ.

#### 3.5.1 Cisteinski katepsini

Cisteinski katepsini spadajo v družino C1 (papainu podobna družina) CA klana cisteinskih proteaz. Z zaporedjem človeškega genoma objavljenega leta 2003 so potrdili obstoj 11 cisteinskih katepsinov (catepsini B, C, F, H, K, L, O, S, V, X in W), medtem ko je mišijih katepsinov več (Rossi in sod., 2004). So monomerni proteini z molekulsko maso med 20 do 35 kDa, le katepsin C se razlikuje. Ta je tetrameren protein z molekulsko maso okrog 200 kDa. Katepsini (F, K, L, O, S in V) so večinoma endopeptidaze, medtem ko so katepsini C, H, B in X eksopeptidaze. Katepsin C in katepsin H sta aminopeptidazi, X pa je karboksipeptidaza. Katepsin B ima tako eksopeptidazno kot endopeptidazno aktivnost, kar pa je odvisno od pH okolja, kjer se nahaja. Kot model za prikaz strukture cisteinskih katepsinov se največkrat uporablja strukturo katepsina L (slika 4). Cisteinski katepsini imajo papainu podobno zvitje iz dveh domen, leve, ki je sestavljena iz treh  $\alpha$ -vijačnic in desne, ki ima strukturo  $\beta$ -sodčka. Domeni skupaj tvorita režo z aktivnim mestom, kjer se nahajata dva aktivna aminokislinska ostanka (Cys25 in His164, številčenje po katepsinu L). Aminokislinska ostanka tvorita tiolat-imidazolni ionski par, ki je ključen za proteolitično aktivnost. Vezavna mesta za substrat se nahajajo na obeh domenah. Substrat se veže vzdolž aktivnega mesta s svojimi stranskimi verigami, izmenično orientiranimi proti L in R domenam (Turk V. in sod. 2012).



Slika 4: Tridimenzionalna struktura človeškega prokatepsina L. Rdeče je obarvan propeptid, zeleno pa zrel encim. Rumena barva prikazuje disulfidne mostičke. Aktivna ostanka (Cys25 in His164) predstavljalata palčki (Brix in Stöcker, 2013: 133)

Večino katepsinov najdemo v vseh tkivih telesa, medtem ko so katepsini K, S, V in W bolj ali manj tkivno specifični. Takšna tkivna specifičnost kaže, da katepsini niso udeležni samo pri obnavljanju proteinov, ampak sodelujejo tudi pri imunskemu odzivu, remodelaciji kosti in procesiranju prohormonov. Katepsini se v endoplazemskem retikulumu, kamor jih usmeri signalno zaporedje, izražajo kot preproencimi. Med transportom skozi lumen grobega endoplazemskega retikuluma se pravilno zvijejo in N-glikozilirajo, po transportu

v Golgijev aparat pa se N-glikozilacija prokatepsinov nadaljuje. V trans Golgijevem omrežju se glikozilirani prokatepsini označijo z manozo-6-fosfatom, ki omogoča razvrščanje v endosomsко-lizosomske kompartmente. Razvrščanje v lizosome je lahko tudi neodvisno od poti manoze-6-fosfata, kar velja za katepsin D in katepsin H, ki ju usmerja sortilin (Canuel in sod., 2008). V nakisnih veziklih se s proteolitsko odstranitvijo prodomene prokatepsini aktivirajo. Aktivacija je lahko avtokatalitična ali pa jo katalizirajo druge proteaze. Za razliko od endopeptidaz se katepsina C in X ne moreta avtokatalitično aktivirati (Dahl in sod., 2001; Sivaraman in sod., 2000). Za aktivacijo potrebujeta prisotnost endopeptidaz, kot sta katepsin L ali S. Glikozaminoglikani (GAG) in druge molekule z negativno nabito površino pospešujejo avtokatalitično aktivacijo (Turk B. in sod., 2000). Z vezavo GAG pride do konformacijske spremembe preprokatepsina, kjer se zmanjša povezava med propeptidom in zrelim delom encima. Konformacijska sprememba omogoča lažje procesiranje. Vezava GAG naj bi bila pomembna tudi pri stabilizaciji katepsinov pred od pH odvisno inaktivacijo. Za optimalno aktivnost katepsini potrebujejo reducirajoče kislo okolje, kot je na primer v lizosomih. Dolgo časa so katepsine povezovali zgolj s procesi v lizosomih, novejše raziskave pa dokazujejo, da katepsini delujejo tudi v citosolu in zunaj celic. Sodelujejo pri apoptizi, pritrjanju celic, kostni remodelaciji, celjenju ran in procesiranju prohormonov. Epitelijске celice ščitnice izločajo katepsine B, L in K, ki sodelujejo pri sproščanju ščitničnih hormonov iz ekstracelularnega tiroglobulina, katepsin B pa je vključen tudi v migracijo keratinocitov med celjenjem ran. Prekomerno izločanje katepsinov je pogosto povezano z vnetnimi stanji v telesu (Turk V. in sod, 2012; Fonović in Turk B., 2014; Brömme in Wilson, 2003).

Za razliko od katepsina S, drugi katepsini pri nevtralnem pH niso stabilni, ampak vseeno dovolj dolgo, da razgradijo substrat, njuna interakcija pa stabilizira encim (Turk B. in sod., 1993). Delovanje zunaj lizosomov jim omogoča tudi njihova odpornost proti oksidativnemu stresu in izločanje v obliki zimogenov.

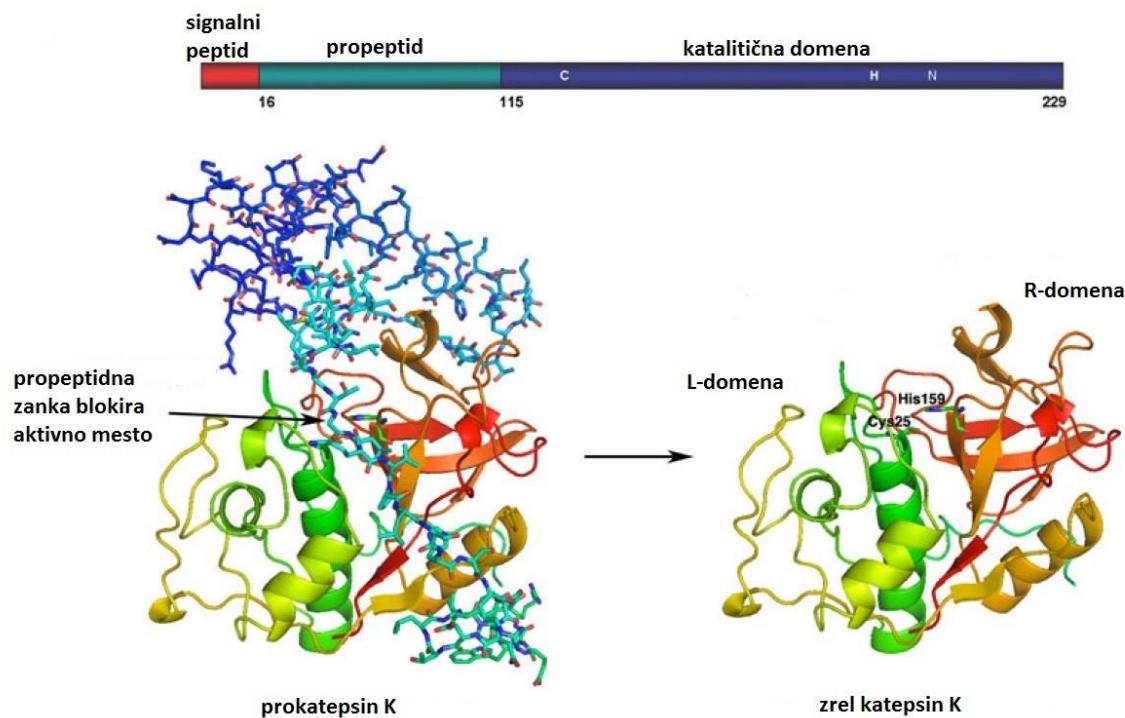
V nadaljevanju bom podrobno predstavil le katepsin K, ki je najpomembnejši za razgradnjo kosti.

### 3.5.1.1 Katepsin K

Mehanizem razgradnje kostnega kolagena in drugih organskih komponent z osteoklasti je bil nejasen vse do osemdesetih let prejšnjega stoletja. Predpostavljeni so, da so za razgradnjo zadolžene nevtralne kolagenaze, ampak teh encimov niso našli ne v osteoklastih kot tudi ne v resorpcijski coni. Blair in sodelavci (1986) so predlagali, da osteoklasti izločajo kisle proteaze, ker so bili osteoklasti aktivni pri kislem pH, ne pa pri nevtralnem. Inaoka in sod. so katepsin K odkrili leta 1995 z izolacijo zajčjega cDNA klena OC-2. Različne raziskovalne skupine so encim poimenovale drugače. Opisan je bil kot katepsin OC-2, katepsin O človeških makrofagov, katepsin K v tkivih, kot katepsin X v osteoklastih in kot katepsin O2 v osteoklastomih in ovarijih (Goto in sod., 2003).

Človeški katepsin K kodira približno 12,1 kb genomske DNA in je mapiran na kromosomu 1q21. Začetek transkripcije se lahko poveča s transkripcijskimi regulatornimi elementi kot so AP1, AP3, H-APF-1, PU.1, ETS-1, PEA3, Mitf, TFE3 in NF- $\kappa$ B. IL-1 $\alpha$  skupaj z RANKL-om ali RANKL + M-CSF stimulirajo izražanje gena za katepsin K preko NF- $\kappa$ B poti. Prav tako imajo provnetni citokini, kot je na primer TNF- $\alpha$ , pozitiven učinek na izražanje katepsina K pri revmatoidnem artritisu (Lecaille in sod., 2008).

Zrel katepsin K je monomerni protein z molekulsko maso 24 kDa. Preproencim je sestavljen iz 329 aminokislinskih ostankov, kjer 15 ostankov predstavlja signalno zaporedje, 99 ostankov pa propeptid (slika 5). S katepsinom B ima 24 %, katepsinom F 40 %, s katepsini L, S, V pa 60 % podobnost v zaporedju aminokislin. Veliko katepsinov je negativno nabitih, katepsin K pa ima visoko gostoto pozitivno nabitih ostankov (Lys in Arg ostanki), ki so locirani nasproti reže z aktivnim mestom. Pozitivni naboji omogočajo elektrostatske interakcije z negativno nabitimi glikozaminoglikani, ki prispevajo k tvorbi kolagenolitičnega aktivnega kompleksa. Katalitična triada katepsina K (Cys25, His159, Asn175, štetje po papainu) se nahaja v reži. Cys25 je v N-terminalni  $\alpha$ -vijačnici leve domene, His159 pa se nahaja v desni domeni. Skupaj nastopata kot tiolat-imidazolni ionski par, ki ga stabilizira Asn175 z vodikovimi vezmi s His159. Specifičnost substrata za katepsin K se kaže s preferenco do alifatičnih aminokislin levcina, izolevcina in valina. Cepi tudi substrate s prolinom na P2 mestu in glicinom na P3 mestu (Lecaille in sod., 2008; Brömme, 2011).



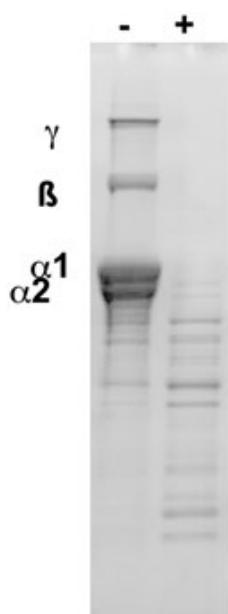
Slika 5: Shematski prikaz organizacije in 3D strukture katepsina K. Celotna dolžina proteina je 329 aminokislin, kjer je proencim dolg 314, pro regija 99 in katalitično aktivna proteaza 215 aminokislin (Brömmme, 2011: 3).

Z imunolokalizacijo in raziskavami s flurescenčno mikroskopijo so pokazali, da je katepsina K v osteoklastih veliko več kot pa katepsinov B, L in S (Kamiya in sod., 1998). Njegovo mRNA so našli tudi v drugih tkivih. Nahaja se v jajčnikih, srcu, placenti, pljučih, skeletnih mišicah, debelem črevesju in tankem črevesju. Izločajo ga sinovialni fibroblasti, epitelne celice pljuč in ščitnice, gladke mišice aorte in makrofagi, najdemo pa ga tudi v patoloških stanjih kot na primer v revmatoidno artritičnih sklepih (Zhao in sod., 2009).

Katepsin K predstavlja 98 % aktivnosti pri razgradnji organskega matriksa kosti (Drake in sod., 1996). Na več mestih cepi trojno vijačnico kolagena na manjše peptide. Značilnost teh mest je pogostost prolinskih ostankov na P2 poziciji, v ponavljajočem se Gly-Pro-X

zaporedu alfa1 verige, kjer je X večinoma prolin in/ali 4-trans-l-hidroksiprolin (Behrendt, 2012).

Aktivnost katepsina K je regulirna na več načinov. Pri nevtralnem pH ni dolgo stabilen. Že po 30 minutah pada aktivnost na 59 % in po 120 minutah na 8 %. Optimum delovanja se giblje okrog pH 6.0 (Brömme in sod., 1996). Proregija propeptida deluje kot selektivni inhibitor, ki inhibira katepsina S in L, kot tudi svojo zrelo obliko (Guay in sod., 2001). Negativno nabiti hondroitin 4-sulfat, ki predstavlja 90 % vseh glikozaminoglikanov v kosti, stabilizira katepsin K in skupaj tvorita aktivni proteolitični kompleks. Kompleks pospešuje kolagenolitično aktivnost za razgradnjo kolagena tipa 1 in 2 (slika 6), medtem ko jo kompleks s katepsinoma L ali S zmanjšuje (Li in sod., 2002; Sage in sod., 2013).



Slika 6: Razgradnja kolagena tipa 1 s katepsinom K. Kompleks encima s hondroitin 4-sulfatom je popolnoma razgradil kolagen tipa 1, medtem ko je bila razgradnja v odsotnosti hondroitin 4-sulfata nepopolna (Brömme, 2011: 4).

## 4 MATERIALI IN METODE

### 4.1 MATERIALI

#### 4.1.1 Kemikalije

- 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol (Tris) (Merck, Nemčija)
- 3-(fosfonooksi)-N-(2,4-ksilil)naftalen-2-karboksamid (Naftol AS-MX fosfat) (Sigma, ZDA)
- 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (Sigma, ZDA)
- 30 % vodikov peroksid (Sigma, ZDA)
- Agaroza (Sigma, ZDA)
- Akrilamid/bisakrilamid (Merck, Nemčija)
- Amonijev persulfat (APS) (Serva, Nemčija)
- Ampicilin (Sigma, ZDA)
- CaCl<sub>2</sub> (Sigma, ZDA)
- Dimetilsulfoksid (DMSO) (Merck, Nemčija)
- Ditiotreitol (DTT) (Thermo Scientific, ZDA)
- Etanol (Merck, Nemčija)
- Etilendiamintetraocetna kislina (EDTA) (Serva, Nemčija)
- Fast red Violet LB sol (Sigma, ZDA)
- Fetalni goveji serum (FBS) (Invitrogen, ZDA)
- Glicerol (Polichimica S. R. L., Italija)
- Glutamin (PAA, GE Healthcare, ZDA)
- Goveji serumski albumin (BSA) (Sigma, ZDA)
- Imidazol (Sigma, ZDA)
- Izopropil β-D-1-tiogalaktoperanozid (IPTG) (Sigma, ZDA)
- Kazein hidrolizat (Sigma, ZDA)
- KCl (merck, Nemčija)
- Kemikalije za PCR (dNTP, MgCl<sub>2</sub>; Fermentas)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, ZDA)
- Kloramfenikol (Sigma, ZDA)

- Kolona z Ni-NTA His60 Ni superflow resin (Clontech, ZDA)
- Komplet kemikalij za čiščenje DNA Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, ZDA)
- Komplet kemikalij za čiščenje gelov in PCR produktov Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA)
- Ksilencianol (Sigma, ZDA)
- Kvasni ekstrakt (Sigma, ZDA)
- Mešanica antibiotikov streptomycin in penicilin (Invitrogen, ZDA)
- Metanol (Merck, Nemčija)
- MgCl<sub>2</sub> (Merck, Nemčija)
- Midori zeleno
- N-(2-hidroksi-1,1-bis(hidroksimetil)ethyl)glicin (Tricin) (Sigma, ZDA)
- Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Nemčija)
- NaCl (Carlo Erba, Italija)
- Natrijev acetat (Sigma, ZDA)
- Natrijev dodecilsulfat (NaDS) (Thermo Scientific, ZDA)
- Natrijev kalijev tartrat (Merck, Nemčija)
- Nitrocelulozna membrana (Merck, Nemčija)
- Ocetna kislina (Sigma, ZDA)
- PBS (PAA, GE Healthcare, ZDA)
- Poliviniliden fluorid membrana (PVDF) (Biorad, ZDA)
- Posneto mleko v prahu (Pomurske mlekarne, Slovenija)
- tetrametiletilendiamin (TEMED) (Serva, Nemčija)
- Tris/HCl (Merck, Nemčija)
- Triton X-100 (Sigma, ZDA)
- Triton X-114 (Sigma, ZDA)
- Tween20 (Sigma, ZDA)

#### 4.1.2 Pufri, raztopine

- 10 % APS (m/V): APS, dH<sub>2</sub>O
- 10× anodni pufer (pH 8,9): 2 M Tris
- 10× katodni pufer (pH 8,25): 1 M Tris, 1 M Tricin, 0,1 % (m/V) NaDS
- 15 % ločevalni gel za Tricinski NaDS-PAGE: 3,75 mL 40 % akrilamid/bisakrilamid, 6,25 mL spodnja raztopina, 15 µL TEMED, 30 µL 10 % APS
- 5 % zbiralni gel za Tricinski NaDS-PAGE: 0,714 mL 40 % akrilamid/bisakrilamid, 5 mL zgornja raztopina, 15 µL TEMED, 30 µL 10 % APS
- 6× NaDS-PAGE nanašalni pufer (pH 8): 0,363 g Tris/Hcl, 0,3 g NaDS, 0,116 g EDTA, 1,83 g DTT, 6 mL glicerol, 30 mg bromfenol modro, do 10 mL dH<sub>2</sub>O
- 6× nanašalni pufer za agarozno gelsko elektroforezo: 0,09 % (m/V) bromfenol modro, 0,09 % (m/V) ksilencianol FF, 60 % (m/V) glicerol, 60 mM EDTA
- BSA (New England Biolabs, Anglija)
- Elucijski pufer (pH 7,4): 50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol
- Fetalni goveji serum (Atlanta Biologicals, ZDA)
- Fosfatni pufer (pH 7,4): 50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl
- Ligacijski pufer za T4 ligazo (New England Biolabs, Anglija)
- Pufer PBS (pH 7,4): 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl
- Pufer PBS/Tween20: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,1 % Tween20
- Pufer TAE (pH 8): 40 mM Tris/acetat, 1 mM EDTA
- Pufer za prenos po Westernu (1 L): 2,93 g Tris, 5,81 g glicin, 3,75 mL 10 % (m/V) NaDS/dH<sub>2</sub>O, 200 mL metanol, do 1 L dH<sub>2</sub>O
- Pufer za spiranje kolone (pH 7,4): 50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 50 mM imidazol
- Pufer za spiranje kolone/Triton X-114 (pH 7,4): 50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol 0,1 % Triton X-114
- Pufer za uravnoteženje kolone (pH 7,4): 50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol

- Razbarvalna raztopina: 300 mL 96 % etanol, 100 mL ocetna kislina, 600 mL dH<sub>2</sub>O
- Raztopina B (pH 8,9): 3 M Tris, 0,3 % (m/V) NaDS
- Raztopina 5 % mleka: 5 % (m/V) posneto mleko v raztopnini pufra PBS/Tween20
- Raztopina za barvanje poliakrilamidnih gelov: Coomassie modrilo in 20 % (V/V) ocetna kislina v razmerju 1:1
- Restriktionski pufer 4 (New England Biolabs, Anglija)
- Shranjevalna raztopina: 100 mL ocetna kislina, 100 mL glicerol, 800 mL dH<sub>2</sub>O
- Spodnja raztopina: 50 mL raztopina B, 25 mL glicerol, 75 mL dH<sub>2</sub>O
- Zgornja raztopina: 50 mL raztopina B, 75 mL H<sub>2</sub>O

#### 4.1.3 Gojišča in mediji

Preglednica 1: Uporabljena gojišča

Bakterijska gojišča	Sestava
Tekoče LB gojišče	10 g/L kazein hidrolizat, 5 g/L kvasni ekstrakt, 10 g/L NaCl, dH <sub>2</sub> O
Tekoče LBA gojišče	10 g/L kazein hidrolizat, 5 g/L kvasni ekstrakt, 10 g/L NaCl, dH <sub>2</sub> O, 50 µg/mL ampicilin
Tekoče LBAC gojišče	10 g/L kazein hidrolizat, 5 g/L kvasni ekstrakt, 10 g/L NaCl, dH <sub>2</sub> O, 50 µg/mL ampicilin, 50 µg/mL kloramfenikol
Trdo LBA gojišče	10 g/L kazein hidrolizat, 5 g/L kvasni ekstrakt, 10 g/L NaCl, dH <sub>2</sub> O, 50 µg/mL ampicilin, 15 g/L agar
Trdo LBAC gojišče	10 g/L kazein hidrolizat, 5 g/L kvasni ekstrakt, 10 g/L NaCl, dH <sub>2</sub> O, 50 µg/mL ampicilin, 50 µg/mL kloramfenikol, 15 g/L agar

### Medija celične kulture

- DMEM: 10 % FBS, 2 mM glutamin, 1 % (V/V) raztopina streptomicin/penicilin v DMEM (Invitrogen, ZDA).
- Brezbarvni MEM: 10 % FBS, 2 mM glutamin, 1 % (V/V) raztopina streptomicin/penicilin v MEM (Gibco, ZDA).

### 4.1.4 Encimi

- T4 DNA ligaza (New England Biolabs, Anglija)
- Pfu DNA polimeraza (Fermentas, ZDA)
- Lizocim

Preglednica 2: Uporabljeni restrikcijski encimi

Restrikcijski encimi	Mesta cepitve	Proizvajalec		
XbaI	5'...CTCGAG...3' 3'...GAGCTC...5'	New	England	Biolabs, Anglija
NdeI	5'...CATATG...3' 3'...GTATAC...5'	New	England	Biolabs, Anglija

### 4.1.5 Začetni oligonukleotidi

RANKL6: CATCATATGGCTCCAGCTATGATGGAAG (Tm= 60, 9 °C)

RANKL8: GTACTCGAGGTCTATGTCCTGAACTTG (Tm= 58, 9 °C)

### 4.1.6 DNA in proteinski velikostni standardi

- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas, ZDA)
- GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas, ZDA)

#### 4.1.7 Protitelesa

- Mišja protitelesa proti heksahistidinski oznaki (vir IJS), redčitev 1:3000
- Zajčja protimišja konjugirana protitelesa s hrenovo peroksidazo (vir IJS), redčitev 1:5000.

#### 4.1.8 Bakterijski sevi

Preglednica 3: Uporabljeni bakterijski sevi

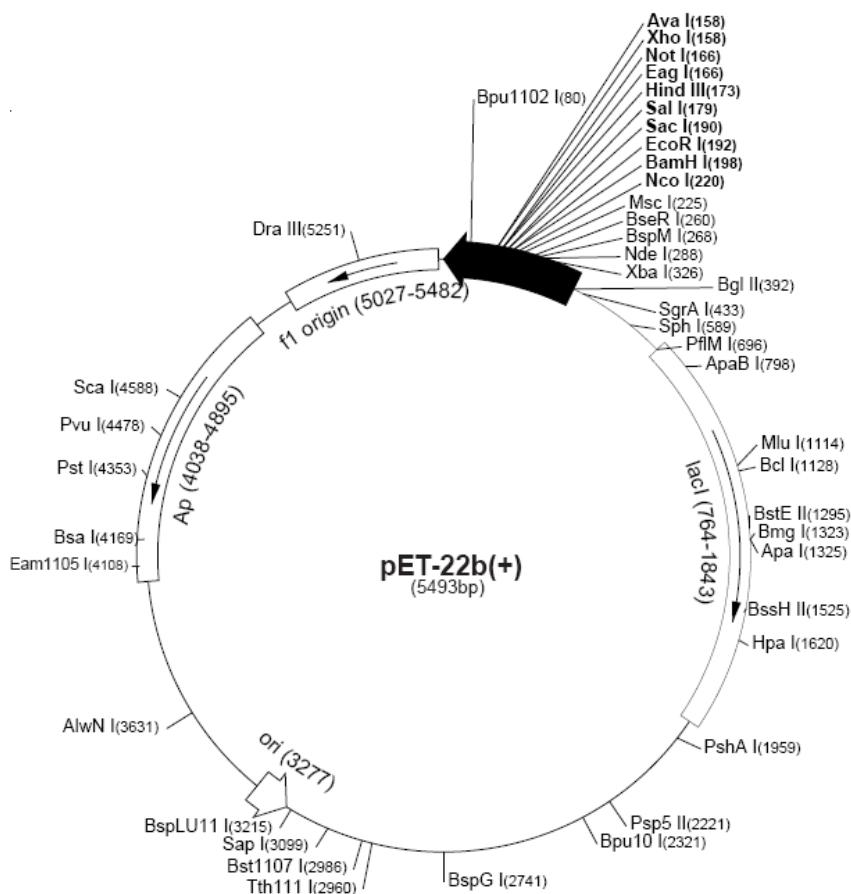
Sev <i>E. coli</i>	Genotip	Vir
BL21(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> IJS λ(DE3) pLysS (Cam <sup>r</sup> ) ( λ(DE3): <i>lacI lacUV5-T7 gene 1, indI, sam7, nin5</i> )	IJS
Rosetta <sup>TM</sup> (DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> IJS (DE3) pLysSRARE (Cam <sup>R</sup> )	IJS
BL21-CodonPlus (DE3)-RP	B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup></i> IJS Tet <sup>r</sup> <i>gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Cam<sup>r</sup>]</i>	IJS
DH5α	F <sup>-</sup> Φ80lacZΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	IJS

#### 4.1.9 Celične kulture

Celična linija mišjih makrofagov/monocitov RAW264.7 (vir IJS). Pasaže 10 – 12.

#### 4.1.10 Vektorji

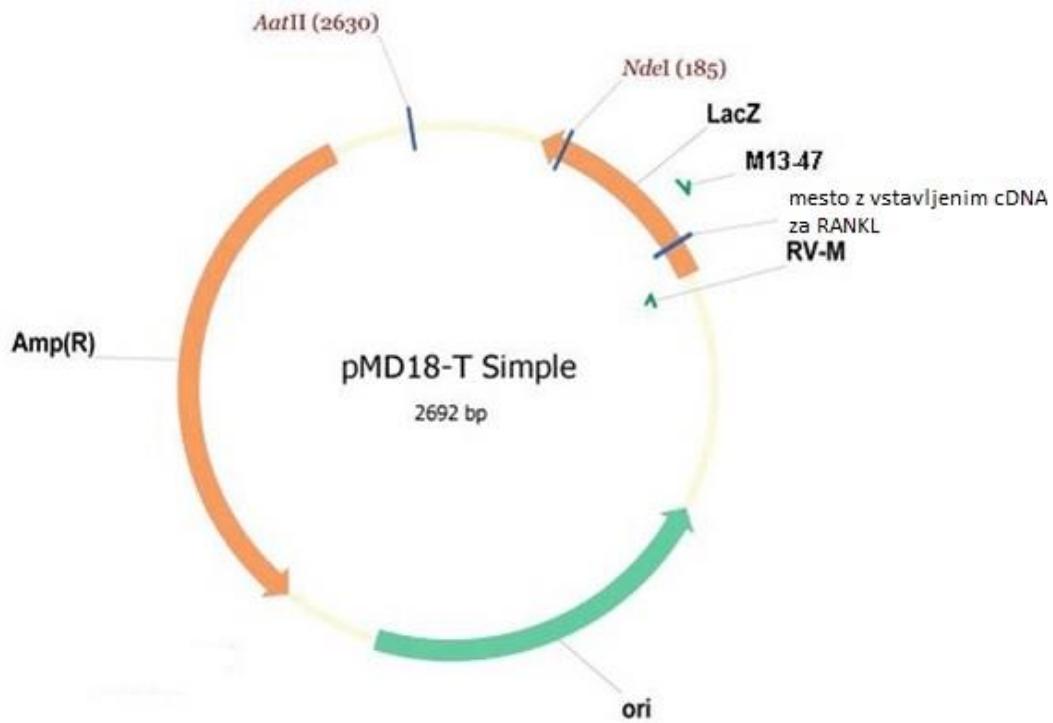
- pET-22b(+)



Slika 7: Shema vektorja pET-22b(+)

Vektor pET-22b(+) je vektor primeren za bakterijsko izražanje proteinov. Ima N-terminalno *pelB* signalno zaporedje za potencialno periplazmatsko lokalizacijo in C-terminalno zaporedje za heksahistidinsko oznako ter T7 promotor. Vektor nosi rezistenco na ampicilin.

- pMD18-T Simple z vstavljenim mišjim cDNA za RANKL (Sino Biological Inc., ZDA). Vektor pMD18-T Simple je TA-klonirni vektor, pripravljen iz vektorja pUC18, ki so mu odstranili poliklonsko mesto. Mišji cDNA za RANKL je vstavljen v mesto 425.



Slika 8: Shema vektorja pMD18-T Simple z vstavljenim mišjim cDNA za RANKL

1 atgcgccgagcccgagactacggcaagtacctgcgcagctg  
M R R A S R D Y G K Y L R S S  
46 gaggagatggcagcggccccggcgtcccacacgggggtccgctg  
E E M G S G P G V P H E G P L  
91 caccggcgccctctgcacccggctccggcgcggccacccggcc  
H P A P S A P A P A P P A A  
136 tcccgctccatgttcctggccctctggggctgggactggccag  
S R S M F L A L L G L G L G Q  
181 gtggctgcagcatgcctgtttctgtactttcgagcgcagatg  
V V C S I A L F L Y F R A Q M  
226 gatcctaacaatatacagaagacagcactcactgctttataga  
D P N R I S E D S T H C F Y R  
271 atcctgagactccatgaaaacgcaggttgcaggactcgactctg  
I L R L H E N A G L Q D S T L  
316 gagagtgaagacacactacactgactcatgcaggaggatgaaacaa  
E S E D T L P D S C R R M K Q  
361 gccttcagggggccgtgcagaaggaactgcaacacattgtgggg  
A F Q G A V Q K E L Q H I V G  
406 ccacagcgcttctcaggagctccagcttatgatggaaaggctcatgg  
P Q R F S G A P A M M E G S W  
451 ttggatgtggcccagcaggcaagcctgaggccagccatttgca  
L D V A Q R G K P E A Q P F A  
496 cacctcaccatcaatgctgccagcatccatgggtttccataaaa  
H L T I N A A S I P S G S H K  
541 gtcactctgtccttgcgttaccacgatcgaggctggccaagatc  
V T L S S W Y H D R G W A K I  
586 tctaacatgacgttaagcaacggaaaactaagggttaaccaagat  
S N M T L S N G K L R V N Q D  
631 ggcttctattacctgtacgccaacatttgcatttcggcatcatgaa  
G F Y Y L Y A N I C F R H H E  
676 acatcgaaaaacgtacccatcagactatcttcagcttatgggttat  
T S G S V P T D Y L Q L M V Y  
721 gtcgttaaaaaccagcatcaaattccaagttctcataacctgtatg  
V V K T S I K I P S S H N L M  
766 aaaggagggagcacgaaaaactggcgcaattctgaattccac  
K G G S T K N W S G N S E F H  
811 ttttattccataaaatgttggggatttcaagctccgagcttgtt  
F Y S I N V G G F F K L R A G  
856 gaagaaatttagcattcagggttccaaacctccctgctggatccg  
E E I S I Q V S N P S L L D P  
901 gatcaagatgcgacgtacttgggcttcaaagttcaggacata  
D Q D A T Y F G A F K V Q D I  
946 gactga 951  
D \*

Zaporedje cDNA in aminokislinsko zaporedje za mišji RANKL. Z rumeno barvo je poudarjeno DNA zaporedje za topni del RANKL-a (sRANKL).

#### 4.1.11 Fluorogeni substrat

- Z-Phe-Arg-AMC, 20 mM (BACHEM, Švica)

## 4.2 Laboratorijska oprema

- 1,5 mL in 0,5 mL centrifugirke (Costar, ZDA)
- 15 mL in 50 mL centrifugirke (BD Falcon, ZDA)
- Avtomatske pipete 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl (Eppendorf, Nemčija)
- Aparatura za prenos po Westernu (Biometra, Nemčija)
- Bralnik mikrotitrskih plošč TECAN Saphire (Tecan, Švica)
- Centrifuga 5417C (Eppendorf, Nemčija)
- Centrifuga SORVALL RCG+ (Thermo Scientific, Velika Britanija)
- Detektor za slikanje gelov GelDoc-IT™ TS Imaging System (UVP, ZDA)
- Grelna plošča Hotplate (Thermo Scientific, Velika Britanija)
- Kadička za agarozno elektroforezo Easy Cast Electrophoresis System Model #81A (Owl Scientific Inc., ZDA)
- Kadička za poliakrilamidno gelsko elektroforezo BioRad (Biorad, ZDA)
- Laminarij za celične kulture BSB 4A (Gelaire Flow Laboratories, Italija)
- Magnetna mešala (Tehnica Železniki, Slovenija)
- Mikroskop IX81 s CCD kamero (Olympus, Japonska)
- Mikrotiterska plošča s 96 luknjicami (Costar, ZDA)
- Mikrovalovna pečica (Gorenje, Slovenija)
- Model za pripravo 1,5 mm gelov za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (BioRad, ZDA)
- Spektrofotometer Nanodrop ND-1000 (Babtech International, Velika Britanija)
- Napajalnik za elektroforezo in prenos Western Lightning Volt™ Power Supply OSP-300 (Thermo Scientific, Velika Britanija)
- pH-meter MP 220 (Mettler Toledo, ZDA)
- Polistirenske petrijevke premora 10 cm (TPP® Tissue Culture Dish, Švica)
- Polistirenske plošče s 6 in 12 luknjami (TPP® Tissue Culture Dish, Švica)
- Programsко orodje Cell-F (Olympus, Japonska)
- Sonifikator Branson Digital sonifier (Emerson Industrial Automation, ZDA)
- Stresalnik Certomat BS-1 (Sartorius, Nemčija)

- Stresalnik Certomat HK/R (Sartorius, Nemčija)
- Temperaturni blok 2720 Thermalcycler (Applied Biosystems, ZDA)
- UV-transiluminator (Cole Parmer, ZDA)

#### 4.3 Metode

##### 4.3.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Na osnovi znanega nukleotidnega zaporedja smo načrtovali smerna in protismerna oligonukleotida, ki se prilegata začetnemu 5' oziroma 3' koncu topnega RANKL-a. Začetni oligonukleotid je bil sestavljen iz štrlečega konca, restriktivskega mesta za *Xho*I oziroma *Nde*I (preglednica 4). Oligonukleotide so sintetizirali pri Sigma (Nemčija).

Preglednica 4: Uporabljeni nukleotidi namenjeni za pripravo rekombinantnega proteina sRANKL. Restriktivska mesta so podprtana.

namen	nukleotidno zaporedje (od 5' proti 3' koncu)	restriktaza
5' oligonukleotid	CAT <u>CATATGGCTCCAGCTATGATGGAAG</u>	<i>Nde</i> I
3' oligonukleotid	<u>GTACTCGAGGTCTATGTCCTGAACTTG</u>	<i>Xho</i> I

##### 4.3.2 Sterilizacija steklovine, gojišč in raztopin

Bakterijska gojišča in nekatere na temperaturo neobčutljive raztopine smo avtoklavirali 20 minut pri 121,58 kPa, 121 °C. Druge raztopine smo filtrirali preko filtra, ki je imel 0,2 µm pore. Laboratorijsko steklovino smo sterilizirali 2 uri pri 160 °C.

##### 4.3.3 Kloniranje cDNA za sRANKL

###### 4.3.3.1 Pomnoževanje cDNA za sRANKL

S pomočjo metode PCR (verižna reakcija s polimerazo) smo pomnožili cDNA za sRANKL. Za matrično DNA smo uporabili kupljeni vektor pMD18-T Simple z vstavljenim mišjim cDNA za RANKL. Za začetne oligonukleotide smo uporabili

načrtovana nukleotidna zaporedja. V 0,5 mL centrifugirkah smo pripravili 25 µL reakcijske zmesi (preglednica 5). Verižna reakcija s polimerazo se je izvajala v temperaturnem bloku 2720 Thermalcycler (preglednica 6).

Preglednica 5: Sestava reakcijske zmesi za PCR.

reagent	V [µl]
matrična DNA (50 pg/µl)	1
10× Pfu pufer	2,5
5' oligonukleotid (10 µM)	1
3' oligonukleotid (10 µM)	1
dNTP (2,5 mM vsakega)	1
dH <sub>2</sub> O	18
Pfu polimeraza	0,6
	Σ 25

DNA smo pomnoževali pri naslednjih pogojih:

Preglednica 6: Temperaturni profil reakcije s PCR.

T [°C]	t [min]	št. ciklov
95	5	1
95	1	
59	1	30
72	3	
72	10	1

#### 4.3.3.2 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je metoda s katero ločimo DNA različnih velikosti. Krajši fragmetni DNA potujejo hitreje kot daljši. DNA detektiramo z dodatkom interkalirajočih snovi, ki fluorescirajo pri UV svetlobi. V vzorce pomnožene DNA s PCR smo dodali 5 µL 6 × nanašalnega pufra, da smo dobili končni volumen 30 µL. Za elektroforezo smo uporabili 1,5 % gel. Pripravili smo ga iz 0,9 g agaroze in 60 mL 0,01 % (V/V) raztopine Midori zeleno v TAE. Agarozni gel smo segrevali v mikrovalovni pečici dokler ni postala suspenzija bistra. Počakali smo, da se gel ohladi na približno 50 °C in ga vlili v model v kadički ter v gel vstavili glavnice. Ko se je gel strdil smo v kadičko natočili pufer TAE in odstranili glavnice. V nastale žepke smo nanesli po 30 µL pripravljenih vzorcev in v

enega izmed žepkov nanesli tudi standard. Elektroforezo smo izvajali pri stalni napetosti 110 V. Spremljali smo potovanje barvila bromfenol modro in ko je prepotovalo  $\frac{3}{4}$  gela smo kadičko izključili iz napajalnika.

#### 4.3.3.3 Izolacija fragmentov DNA iz agaroznega gela in čiščenje

DNA v gelu smo detektirali z UV-transiluminatorjem. Fragmente, ki so ustrezali velikosti DNA zapisu za sRANKL smo previdno izrezali iz gela. Pri rezanju smo morali biti hitri, da ne bi prišlo do mutacij v DNA zaporedju, ki lahko nastanejo zaradi UV svetlobe. Izrezane dele gela z DNA smo po navodilih proizvajalca očistili s komercialnim kompletem kemikalij za čiščenje gelov in PCR produktov Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA). Očiščenim vzorcem smo s sprektofotometrom Nanodrop pri 240 nm izmerili koncentracije DNA.

#### 4.3.3.4 Ligacija pomnožene DNA v vektor

Očiščeno pomnoženo DNA in vektor pET-22b(+) smo rezali z enakima encimoma (*Xho*I in *Nde*I). Reakcijska zmes je prikazana v preglednici 7. Reakcija je potekala čez noč pri 37 °C.

Preglednica 7: Zmes reagentov, ki smo jih uporabili pri rezanju pomnožene DNA in vektorja.

sestavina	sestavina	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
vektor pET-22b(+)	pomnožena DNA	30
pufer 4	pufer 4	3,5
<i>NdeI</i>	<i>NdeI</i>	1
<i>XhoI</i>	<i>XhoI</i>	1
BSA	BSA	0,3
		$\sum 35,8$

Razrezano DNA smo z ligacijo vstavili v odprt vektor v razmerju 1 : 3 (vektor : vključek), glede na njuno molarno razmerje. Reakcijska zmes je prikazana v preglednici 8. Reakcija je potekala preko noči pri 16 °C.

Preglednica 8: Mešanica reagentov za ligacijo PCR produkta v vektor.

reagent	V [ $\mu\text{l}$ ]
pET-22b(+)	2
ligacijski pufer 10X	1
PCR produkt	5
T4 DNA ligaza	0,3
dH <sub>2</sub> O	1,7
	$\sum 10$

#### 4.3.3.5 Piprava kompetentnih bakterijskih celic

- Sev DH5α

Bakterijski sev *E. coli* smo z ezo prenesli na ploščo s trdim LB gojiščem in ploščo inkubirali preko noči na 37 °C. Naslednji dan smo previdno izbrali eno izmed kolonij in z njo inokulirali 5 mL tekočega LB gojišča ter inkubirali preko noči pri 37 °C in 200 obr./min. Prekonočno kulturo smo redčili v razmerju 1:100 v 200 mL tekočega LB medija ter inkubirali pri enakih pogojih do OD<sub>600 nm</sub> ~ 0,5. Sledilo je 10 sekund centrifugiranja pri 4 °C. Usedlino smo resuspendirali s 35 mL ledenohladnega 0,1 M MgCl<sub>2</sub>. Ponovno smo centrifugirali pri 4 °C in tokrat usedlino resuspendirali z 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Sledila je 45 minutna inkubacija na ledu in ponovno centrifugiranje pri 4 °C. Usedlino smo tokrat resuspendirali v 12 mL raztopine z 0,1 M CaCl<sub>2</sub> in 30 % glicerola (V/V). Resuspendirane

celice smo razporedili, po 100 µl v vsako centrifugirko, in jih zamrznili v tekočem dušiku. Nadaljnno smo jih shranjevali v zamrzovalniku na -80 °C.

- Sevi Rosetta™(DE3)pLysS, BL21-CodonPlus (DE3)-RP, BL21(DE3)pLysS

Kompetentne celice sevov smo pripravili na enak način kot je opisano za sev DH5α. Razlika je le v uporabi antibiotika kloramfenikola, ki smo ga dodali tekočemu gojišču LB, ko smo redčili prekonočno kulturo.

#### **4.3.3.6 Transformacija kompetentnih celic *E. coli* DH5α**

Vektor z vključkom smo transformirali v kompetentne celice sev DH5α. Kompetentne celice smo vzeli iz zamrzovalnika in jih odtalili v ledu. Celicam smo dodali 5 µL vektorja z vključkom in na ledu inkubirali 30 minut. Centrifugirko smo nato postavili za 30 sekund na 42 °C in za 2 minuti na led. V centrifugirko smo nato dodali 300 µL tekočega LB gojišča in inkubirali 30 minut na stresalniku pri 37 °C in 200 obr./min. Potem smo 50 µL gojišča odpipetirali in razmazali na ploščo s trdim LBA gojiščem ter čez noč inkubirali na 37 °C. Naslednji dan smo z ezo izolirali 10 posamičnih kolonij in pripravili prekonočne kulture v tekočem LBA gojišču.

#### **4.3.3.7 Izolacija plazmidne DNA**

Plazmidno DNA smo izolirali iz prekonočne kulture s pomočjo kompleta za izolacijo Wizard® SV (Promega, ZDA). Postopek izolacije je potekal po navodilih proizvajalca. Uspešnost ligacije smo preverili z izrezovanjem vključka iz vektorja, ki ji je sledila agarozna elektroforeza. DNA smo detektirali z UV-transiluminatorjem. Gel smo slikali na detektorju z vzbujanjem z UV svetlobo GelDoc-IT™ TS Imaging System. V preglednici 9 je prikazana reakcijska zmes.

Preglednica 9: Zmes reagentov, ki smo jih uporabili pri restrikciji.

<i>reagent</i>	V [ $\mu$ l]
Vektor	12
NEB pufer 4	1
<i>Xba</i> I	0,2
<i>Nde</i> I	0,2
dH <sub>2</sub> O	6,5
BSA	0,1
	$\Sigma 20$

#### 4.3.4 Preverjanje DNA zaporedja inserta

Nukleotidno zaporedje rekombinantnih izoliranih plazmidov so rutinsko določevali pri Macrogen (Amsterdam, Nizozemska). Vzorce smo pripravili po navodilih družbe.

#### 4.3.5 Izražanje rekombinantnega sRANKL-a

##### 4.3.5.1 Izbira primernega bakterijskega seva za izražanje

###### 4.3.5.1.1 Transformacija v različne seve *E. coli*

Transformacijo vektorja v seve *E. coli* Rosetta<sup>TM</sup>(DE3)pLysS, BL21-CodonPlus (DE3)-RP, BL21(DE3)pLysS smo izvedli enako kot v sev DH5 $\alpha$ . Razlika je bila le, da smo uporabili trdo gojišče LBAC in tekoče gojišče LBAC za prekonočno kulturo.

Prekonočne kulture različnih sevov smo redčili v razmerju 1:50 v 20 mL tekočega LBAC gojišča. Inkubirali smo na stresalniku pri 37 °C in 200 obr./min do OD<sub>600 nm</sub> ~ 0,5 in nato sprožili izražanje z IPTG končne koncentracije 0,3 mM. Gojenje celic je trajalo 4 ure, potem smo celice centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 4500 obr./min. Usedlino smo resuspendirali v 1 mL pufra za uravnoteženje kolone in vzorce zamrznili na -20 °C.

#### **4.3.5.1.2 Razbitje celic z zamrzovanjem, lizocimom in ultrazvokom**

Z zamrzovanjem celic so se tvorili kristali, ki so poškodovali celično steno bakterij. Seva Rosetta<sup>TM</sup>(DE3)pLysS in BL21(DE3)pLysS izražata lizocim, tako, da ga je nepotrebno dodajati za razbijanje celic. Lizocim smo dodali le vzorcu s sevom BL21-CodonPlus (DE3)-RP, končne koncentracije 0,1 mg/mL. Vzorce smo odtalili in nato celice dokončno razbili z ultrazvokom, kjer smo imeli 2 minuti intervale po 3 sekunde delovanja in 5 sekund mirovanja pri amplitudi 40 %. Vzorci so bili med delovanjem na ledu. Nato smo vzorce 30 minut centrifugirali pri 4 °C in 16000 obr./min ter supernatant shranili.

#### **4.3.5.1.3 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS**

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS je metoda s katero ločujemo proteine po njihovi molekulski masi. Proteini z manjšo molekulsko maso potujejo po gelu hitreje kot proteini z višjo.

Tricinski NaDS-PAGE je primeren za ločevanje proteinov manjših od 30 kDa (Schägger, 2006). V model smo najprej vlili raztopino ločevalnega gela do višine, ki je 1,5 cm od roba. Nato smo pazljivo dodali dH<sub>2</sub>O do vrha. Ločevalni gel se je strdil po približno 45 minutah. Vodo smo odlili in vrh gela osušili s filter papirjem. Nato smo dodali raztopino zbirальнega gela in glavniček. Po približno 30 minutah smo glavniček odstranili. Gel smo uporabili takoj ali pa smo ga shranili v navlaženi brisački na 4 °C za nadaljnjo uporabo.

Vzorce za NaDS-PAGE smo pripravili tako, da smo odpipetirali po 30 µL supernatanta iz vzorca posameznega seva in dodali 6 µL 6 × nanašalnega pufra. Vzorce smo nato 5 minut segrevali v vodni kopeli pri 95 °C, da so denaturirali. Sledilo je 5 minutno centrifugiranje pri 14000 obr./min..

Gele smo vpeli v elektrode in jih vstavili v kadičko. Znotraj elektrode smo nalili 1× katodni pufer, zunaj elektrode pa 1 × anodni pufer. V posamezen žepek smo nanesli po 35 µL vzorca. V enega izmed žepkov smo nanesli tudi 6 µL standarda. Elektroforeza je potekala 1 uro pri stalnem toku 35 mA.

#### **4.3.5.1.4 Barvanje gela z raztopino Coomassie modro**

Po končani elektroforezi smo gel odstranili iz modela in ga pri počasnem stresanju 30 minut barvali v raztopini Coomassie modro. Gel smo razbarvali s 30 % razbarvalno raztopino in ga potem shranili v shranjevalni raztopini. Izbrali smo sev, ki je imel najvišje izražanje rekombinantnega proteina.

#### 4.3.5.2 Optimizacija izražanja

##### **4.3.5.2.1 Izbira klena**

Izražanje sRANKL-a smo optimizirali v sevu *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP. Iz plošče s trdim LBAC gojiščem smo izolirali 3 različne kolonije in pripravili prekonočne kulture v 5 mL tekočega LBAC gojišča. Izražanje smo izvajali 4 ure v 20 mL tekočega LBAC gojišča pri 37 °C. Za sprožitev izražanja smo dodali IPTG končne koncentracije 0,3 mM, ko je bila OD<sub>600 nm</sub> ~ 0,5. Odcentrifugirane vzorce smo nanesli na Tricenski NaDS-PAGE in po razbarvanju barvila Coomassie modro, izbrali klon z najvišnjim izražanjem sRANKL-a.

##### 4.3.5.2.2 Optimizacija pogojev izražanja

Pri izbranem klonu smo ugotavliali stopnjo izražanja pri 3 različnih časih po sprožitvi (4 ure, 6,5 ur, čez noč) in 2 različnih temperaturah po sprožitvi izražanja (37 °C in 25 °C). Drugi pogoji so bili enaki kot pri izbiri ustreznegata seva za izražanje. Celice smo z ultrazvokom razbijali 10 minut pri enakih nastavitevah kot smo jih uporabili pri izbiri seva. Izražanje smo izvajali v 400 mL tekočega LBAC gojišča in usedlino resuspendirali v 20 mL pufra za uravnoteženje. Izražanje smo pri izbranih pogojih ponovili trikrat.

##### **4.3.5.2.3 Čiščenje sRANKL-a z Ni-NTA afinitetno kromatografijo**

Ni-NTA je kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija. Primerna je za čiščenje proteinov, ki imajo C- ali N-terminalno vezano heksahistidinsko oznako. Poleg Ni lahko za čiščenje uporabimo tudi druge ione: Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> in Fe<sup>3+</sup>. Uporabili smo kolono z Ni-

NTA His60 Ni Superflow Resin (Clontech, ZDA). Protein smo čistili v hladni sobi pri 4 °C. Vsi pufri so bili pred začetkom čiščenja ohlajeni na 4 °C.

Kolono smo uravnotežili z 10 mL pufra za uravnoteženje kolone. Sledilo je nanašanje vzorca. Ko smo nanesli ves vzorec smo kolono spirali s 50 mL pufra za spiranje kolone/Triton X-114. Triton X-114 je neionski detergent, ki se uporablja za odstranjevanje endotoksinov bakterij iz očiščenih proteinov. Pomembno je da je pufer s Triton X-114 ohlajen na 4 °C, ker se drugače tvorijo veliki miceli in je tako neučinkovit pri odstranjevanju endotoksinov (Reichelt in sod., 2006). Sledilo je spiranje z 20 mL pufra za spiranje kolone. Rekombinantni protein smo eluirali z elucijskem pufrom. Zbirali smo 1 mL frakcije. Med eluiranjem smo s sprektofotometrom Nanodrop pri 280 nm, spremljali koncentracije v posamezni frakciji. Eluirali smo toliko časa dokler ni bila koncentracija v frakciji 0 mg/mL. Koncentracije posameznih frakcij smo določali v kiveti sprektofotometrično pri 280 nm in izbrali frakcije z najvišjo koncentracijo. Pri izbranih pogojih izražanja, ki smo jih ponovili trikrat, smo izmerjene koncentracije frakcij z najvišjo koncentracijo povprečili.

Za vsak vzorec smo ponovno regenerirali kolono. Regeneracijo kolone smo izvajali pri sobni temperaturi. Ni ione smo sprali z 10 mL 0,2 M EDTA (pH 7). Sledilo je spiranje z 10 mL dH<sub>2</sub>O in ponovna vezava ionov z 2 mL 100 mM NiSO<sub>4</sub>. Odvečne Ni ione smo sprali z 7 mL vode, sledilo je spiranje s 3 mL 300 mM NaCl in 3 mL dH<sub>2</sub>O. Regenerirano kolono smo potem znova uravnotežili in uporabili za naslednji vzorec.

Posamezne frakcije vzorcev smo nanesli na Tricinski NaDS-PAGE in po razbarvanju barvila Coomassie modro primerjali količino izraženega sRANKL-a pri različnih pogojih.

#### 4.3.5.3 Prenos po Westernu

Prenos po Westernu nam omogoča prenos proteinov na nitrocelulozno membrano ali PVDF membrano, ki jo lahko potem uporabimo za imunodetekcijo želenega proteina.

Irezali smo 6 filter papirjev in nitrocelulozno membrano v velikosti poliakrilamidnega gela ter jih za 5 minut namočili v pufru za prenos po Westernu. Na aparatu za prenos po Westernu smo položili 3 filter papirje, nato nitrocelulozno membrano, gel in še 3 filter

papirje. S pomočjo epruvete smo se znebili mehurčkov. Prenos je potekal 1,5 h pri konstantnem toku. Primeren tok smo izračunali kot višina membrane  $\times$  dolžina membrane  $\times$  0,8 (mA).

#### 4.3.5.3.1 Detekcija proteina

Po končanem prenosu po Westernu smo 30 minut nitrocelulozno membrano inkubirali v 5 % raztopini s posnetim mlekom pri rahlem stresanju. Preko noči smo dodali mišja primarna protitelesa proti heksahistidinski oznaki, ki smo jih razredčili v 5 % raztopini s posnetim mlekom. Inkubirali smo jih v hladni sobi pri 4 °C in šibkem stresanju. Naslednji dan smo pri sobni temperaturi 60 minut spirali membrano s pufrom PBS/Tween20. Pufer smo večkrat zamenjali. Nato smo dodali sekundarna zajčja protimišja protitelesa konjugirana s hrenovo peroksidazo razredčena v enaki raztopini kot primarna protitelesa. Membrano smo inkubirali 1,5 ure pri sobni temperaturi in šibkem stresanju. Ponovno je sledilo 60 minutno spiranje s pufrom PBS/Tween20.

Za detekcijo smo v centrifugirki pripravili 10 mL raztopine za barvanje z DAB. V 10 mL pufra PBS smo raztopili 5 mg DAB in 10 µL 30 % vodikovega peroksida. Raztopino smo polili preko membrane in inkubirali tako dolgo, da so se lise obarvale. Membrano smo nato spirali z dH<sub>2</sub>O.

#### 4.3.5.4 Preverjanje aminokislinskega zaporedja proteina

Proteine smo ločili na Tricinskem NaDS-PAGE in jih z metodo prenos po Westernu prenesli na PVDF membrano. Membrano smo preko noči spirali z dH<sub>2</sub>O pri 4 °C. Naslednji dan smo membrano obarvali z raztopino (0,1 % Brilliant blue, 1 % ocetne kisline, 40 % metanola). Membrano smo nato razbarvali s 50 % metanolom do vidnosti lis. Iz membrane smo izrezali ustrezne lise in jih dali dr. Adrijani Leonardi (IJS, oddelek B2) na določanje aminokislinskega zaporedja.

#### 4.3.6 Gojenje celične kulture RAW264.7

Prejeli smo viale z zamrznjeno že večkrat precepljeno celično kulturo RAW264.7. Celice smo odmrznili v 9 mL že prej segretega DMEM medija na 37 °C. Resuspendirane celice smo centrifugirali 5 minut pri 1580 obr./min in nato odsesali medij. Celice smo potem resuspendirali v 1 mL segretega DMEM medija in jih dodali v polistirensko 10 cm ploščo z 9 mL medija. Celice smo precepili na vsake 3 dni, ko so dosegle 75 – 85 % konfluentnost. Od podlage smo jih odlepili s 5 mL mrzle 5 mM raztopine EDTA v PBS-ju proizvajalca PAA. Po dodatku raztopine smo celice 15 minut inkubirali na 37 °C pri 5 % CO<sub>2</sub>. Ko so se odlepile smo dodali 5 mL segretega DMEM medija in centrifugirali 5 minut pri 1580 obr./min. Medij smo odsesali in celice resuspendirali v 1 mL DMEM medija. V 9,7 mL medija smo dodali 300 µL celic. Celice smo gojili pri 37 °C, v prisotnosti 5 % CO<sub>2</sub> in 95 % vlažnosti. Precepljanje je služilo za ohranjenje stalnega števila celic, ki smo jih uporabili za diferenciacijo v osteoklaste.

Celice smo zamrzovali v 100 µL DMSO, 400 µL FBS in 500 µL medija v katerem so bile resuspendirane. Število celic po odlepljanju smo ocenili s števno komoro po Neubauerju. V 20 µL resuspendiranih celic smo dodali 20 µL tripanskega modrila, ki obarva mrtve celice. Celice smo pod mikroskopom prešteli in izračunali njihovo število v 10 mL. Celice smo ustrezno redčili do koncentracije  $3 \times 10^6$  celic v 0,5 mL. Vialo z celicami smo prenesli za 2 uri na -20 °C in nato na -80 °C.

Celice smo gojili tudi v polistirenskih ploščah s 6 ali 12 luknjami, katerim smo dodali krovna stekelca. Uporabili smo brezbarvni medij MEM, ki ne moti merjenja aktivnosti na fluorogen substrat. Pri ploščah s 6 luknjami smo v vsako luknjo dali 2 – 3 mL medija, v ploščo z 12 luknjami pa po 1 mL medija.

#### 4.3.7 Dodajanje rekombinantnega sRANKL-a celični kulturi

V polistirenske plošče s 6 in 12 luknjami smo dodali  $5 \times 10^3$  celic/cm<sup>2</sup>. Celice smo gojili v MEM mediju. Prvi dan po precepljanju smo v polovico lukenj z medijem dodali 100 ng/mL rekombinantnega sRANKL-a, druga polovica pa je služila kot kontrola. Celicam smo menjali medij, z ali brez sRANKL-a, vsak drugi dan. Po 5 dneh smo celicam

odpipetirali medij za merjenje aktivnosti in celice uporabili za barvanje specifičnega encima TRAP, ki je značilen za osteoklaste.

#### **4.3.7.1 Spremljanje morfoloških sprememb z mikroskopom**

Z invertnim mikroskopom smo vsak dan spremljali aktivnost in morfološke spremembe celic. Za zajem slik smo uporabili program Cell-F.

#### **4.3.7.2 Barvanje za TRAP**

Peti dan po dodatku sRANKL-a celicam smo odsesali medij in celice sprali s PAA PBS. Sledila je 10 minutna fiksacija s 4 % (m/V) paraformaldehidom v fosfatnem pufru (pH 7,4). Po fiksaciji smo dodali raztopino 0,5 % (m/V) Triton X-100 v pufru PBS za 15 minut. Fiksiranim celicam smo nato dodali 0,01 % (m/V) naftol AS-MX fosfata in 0,05 % (m/V) Fast Red Violet LB soli v prisotnosti 50 mM natrijevega kalijevega tartrata in 90 mM natrijevega acetata (pH 5). Celice smo inkubirali 10 minut in jih nato sprali s pufrom PBS. Z invertnim mikroskopom smo opazovali rdečkasto obarvane celice, ki so pozitivne za TRAP.

#### **4.3.8 Merjenje aktivnosti s fluorogenim substratim**

Celicam smo 5 dan odpipetirali MEM medij, tako celicam z dodanim sRANKL-om kot tudi kontrolni skupini. Merili smo aktivnost lizosomskih katepsinov v mediju, na substrat Z-Phe-Arg-AMC. V mikrotitrski plošče smo odpipetirali 100 µL medija in 200 µL 90 mM Na-acetatnega pufra (pH 5,5). V 1 mL Na-acetatnega pufra smo prej raztopili 4 µL substrata. Katepsine smo aktivirali z dodatkom 3 µL 1 M raztopine DTT. Aktivnost smo merili na bralniku mikrotitrskih plošč TECAN Saphire. Valovna dolžina vzbujanja je bila 370 nm, emisije pa 460 nm. Aktivnost smo merili s 40 cikli in 15 sekundnimi intervali. S pomočjo Excela 2010 (Microsoft, ZDA) smo določili naklone aktivnosti za substrat pri celicah z dodanim sRANKL-om in celicah, ki so služile kot kontrola. Podatke smo obdelali pomočjo Excela 2010 z uporabo statističnega orodja Studentov t-test, kjer smo uporabili dvosmerni, neparni t-test. Primerjali smo naklone aktivnosti pri diferenciranih in

nediferenciranih celicah. Razliko smo smatrali kot statistično signifikantno, če je bila p-vrednost nižja od 0,05.

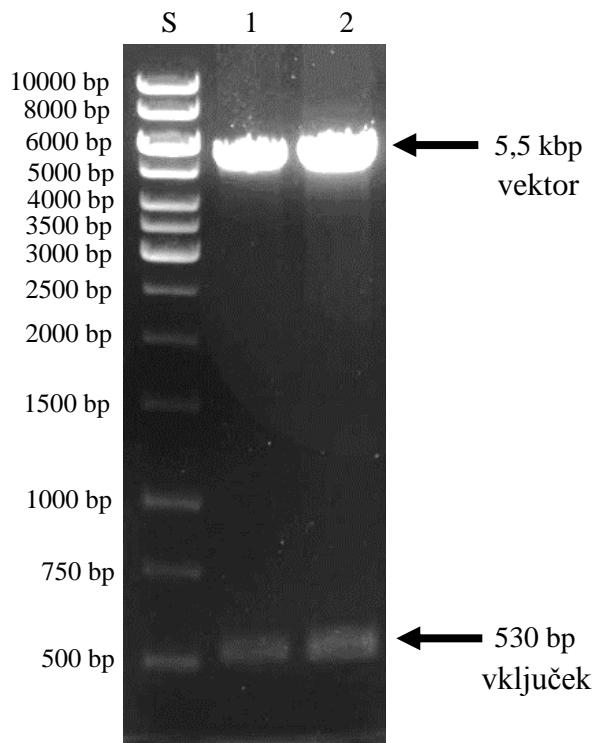
## 5 REZULTATI

### 5.1 Pomnoževanje cDNA za sRANKL

Z metodo PCR smo z ustreznimi začetnimi oligonukletidnimi pari pomnožili del cDNA, ki predstavlja topni del proteina RANKL (sRANKL). Velikost tega dela gena je bila 530 bp. Začetni oligonukleotidi so vsebovali mesti z zaporedji za restrikcijska encima (*Xho*I in *Nde*I), ki sta primerna za vstavitev v plazmid pET-22b(+) namenjenemu bakterijskemu sistemu za izražanje.

### 5.2 Kloniranje PCR produktov v plazmid

Z restrikcijskima encimoma *Xho*I in *Nde*I smo razrezali plazmid pET22b(+) in pomnoženo DNA. Izrezani produkt smo s pomočjo T4 DNA ligaze vstavili v odprt plazmid pET-22b(+). Z uporabo transformacije smo ligiran produkt vnesli v bakterijo. Po namnožitvi v *E. coli* seva DH5 $\alpha$ , ki je vseboval plazmid, smo celice lizirali, namnožen plazmid pa izolirali s pomočjo kompleta za izolacijo. Uspešnost ligacije smo po restrikciji konstrukta z istima encimoma preverili z agarozno elektroforezo. Pri 2 vzorcih sta ločeni lisi ustrezali velikosti vključka in vektorja (slika 9). Delo smo nadaljevali s plazmidom, ki je imel vstavljen gen za sRANKL.



Slika 9: Slika agaroznega gela po resktrikciji vektorja z vključkom. Slika prikazuje 2 ločeni lis, ki predstavljata vektor in vključek. Črka S prikazuje DNA standard. Številki 1 in 2 prikazujeta dva vzorca, ki sta ustrezala velikosti vektorja in vključka

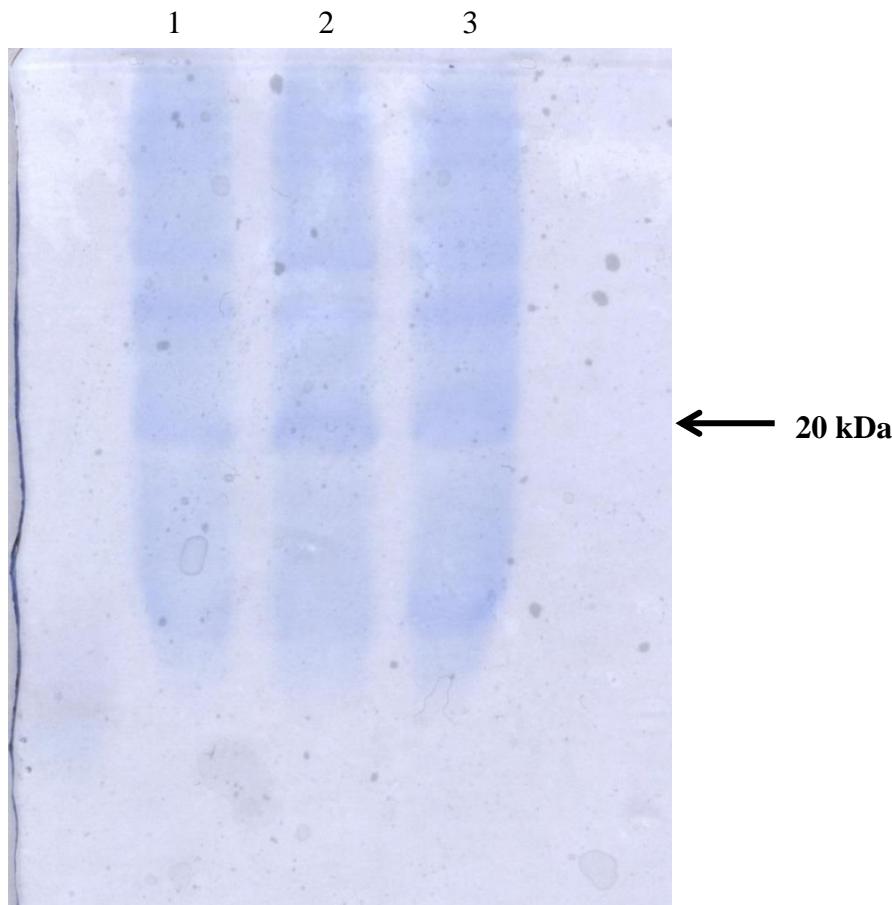
### 5.3 Preverjanje zaporedja DNA vstavka

Nukleotidno zaporedje zapisa za sRANKL v izoliranem plazmidu so rutinsko določevali pri Macrogen (Amsterdam, Nizozemska). Dobijeno zaporedje smo primerjali z ujemanjem v zaporedju DNA topnega dela RANKL-a. Dobijeno zaporedje DNA se je v 100 % ujemalo z zaporedjem za mišji sRANKL. Za poravnavo zaporedij smo uporabili spletno orodje BLAST (ang. Basic Local Alignment Search Tool), dosegljivo na internetnem naslovu:

[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

#### 5.4 Izražanje in optimizacija pogojev

Različne seve *E. coli* (BL21(DE3)pLysS, Rosetta<sup>TM</sup>, (DE3)pLysS, BL21-CodonPlus (DE3)-RP) primerne za izražanje, smo transformirali s plazmidom, ki je vseboval gen za sRANKL. S prekonočno kulturo različnih sevov *E. coli* smo inokulirali LBAC gojišče in inkubirali pri močnem stresanju do  $OD_{600\text{nm}} \sim 0,5$ . Izražanje rekombinantnega proteina smo sprožili z dodatkom IPTG-ja do končne koncentracije 0,3 mM. Temperatura po sprožitvi je bila 37°C, izražanje pa je trajalo 4 ure. Izražanje je potekalo ob močnem stresanju v reagenčnih steklenicah z vdelanimi šikanami za večje raztopljanje kisika v gojišču. Začetno izražanje je bila namenjena izbiri primernega seva *E. coli*. Kot najprimernejši sev za izražanje se je izkazal BL21-CodonPlus (DE3)-RP (podatki niso prikazani). Sledila je izbira bakterijska klona z najvišjim izražanjem proteina sRANKL (slika 10). Kot najprimernejši smo izbrali drugi klon.



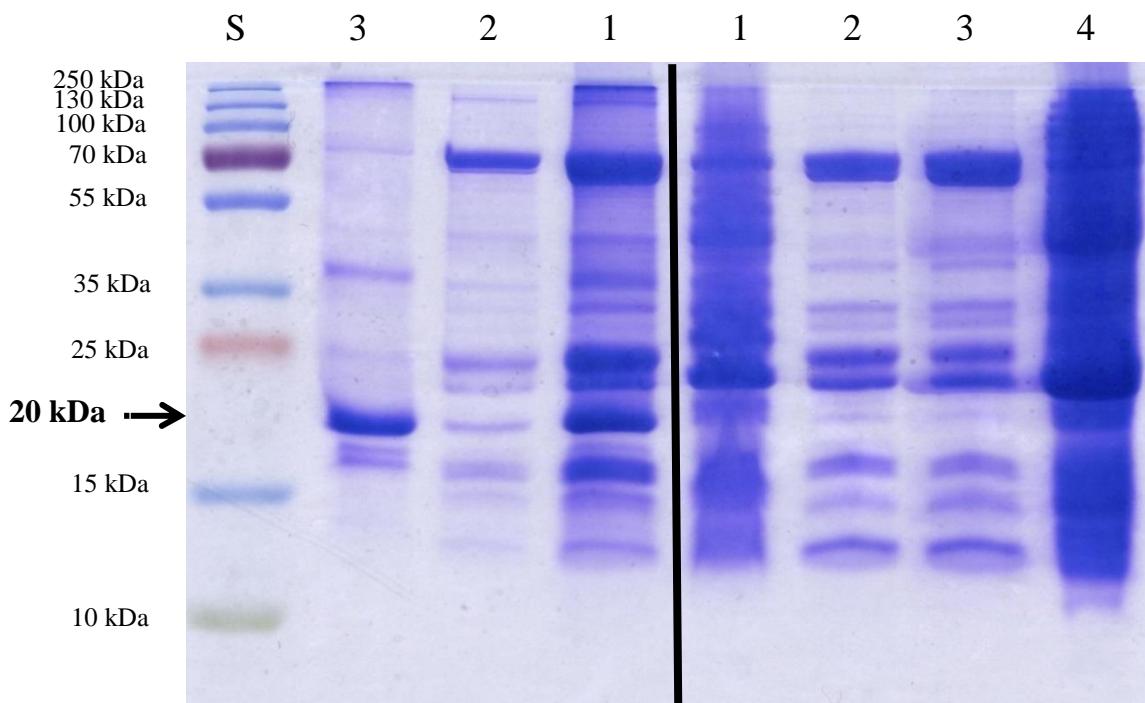
Slika 10: Gel prikazuje izražanje različnih klonov seva BL21-CodonPlus (DE3)-RP. Izražanje je trajalo 4 ure pri 37 °C. Številke prikazujejo različne klone. Najvišje izražanje ima drugi klon

Pogoje izražanja za pridobivanje večjih količin rekombinantnega proteina sRANKL smo spremenjali z različnimi temperaturami in časi po sprožitvi izražanja, pri  $OD_{600\text{nm}} \sim 0,5$  in končni koncentraciji IPTG-ja 0,3 mM (preglednica 10). Temperatura in čas izražanja sta imela velik vpliv na količino pridobljenega proteina (slika 11).

Preglednica 10: Prikaz vpliva različnih temperatur in časov po sprožitvi izražanja na koncentracijo rekombinantnega proteina.

Pogoji						
temperatura	37 °C	37 °C	37 °C	25 °C	25 °C	25 °C
čas	4 h	6,5 h	čez noč	4 h	6,5 h	čez noč
Povprečna koncentracija (mg/mL)	0,35	0,16	0,08	0,48	0,76	0,23

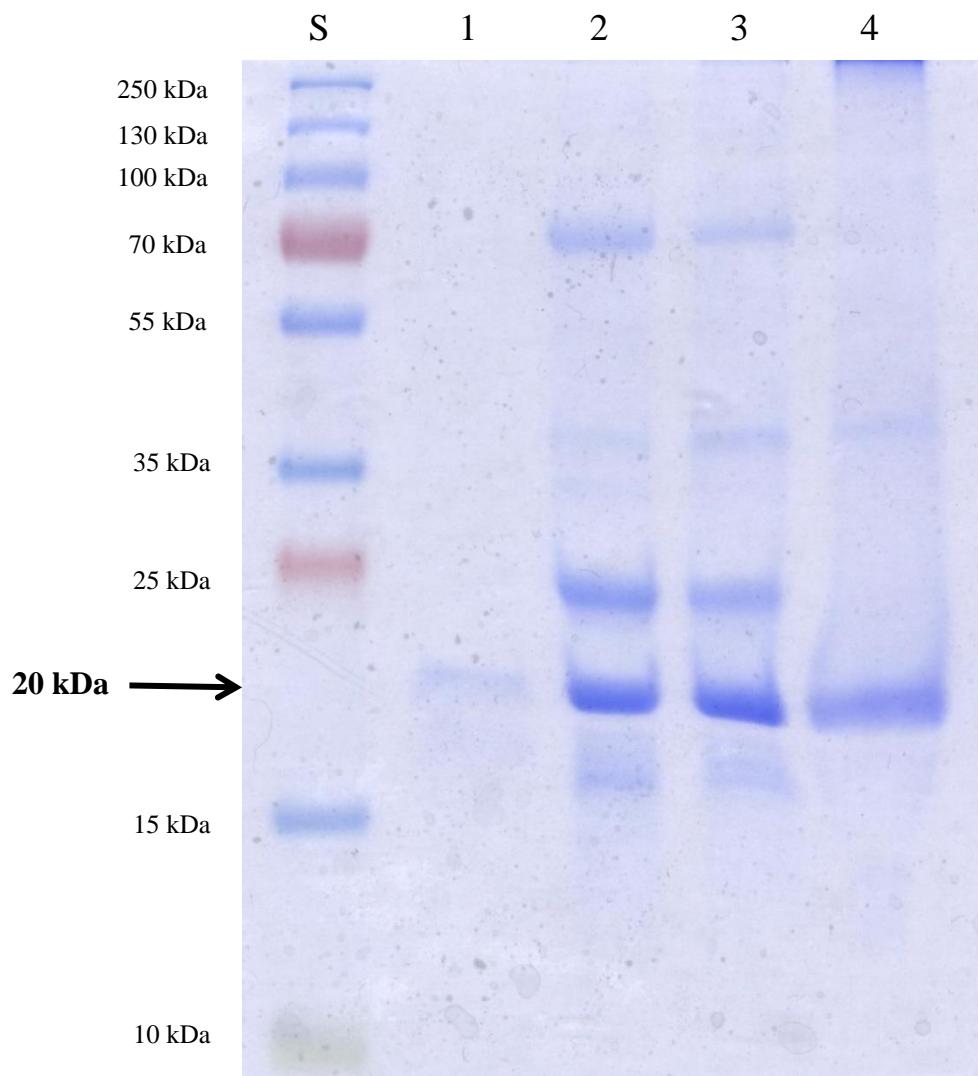
Rekombinantni protein se je izražal v topni obliki. Najvišje količine proteina sRANKL smo pridobili pri temperaturi 25 °C in času 6,5 h. V eni izmed frakcij smo iz 2 L LBAC gojišča pridobili koncentracijo 1,2 mg/mL rekombinantnega sRANKL-a, ki je bil ~95 % čist.



Slika 11: Poliakrilamidni gel po razbarvanju barvila Coomassie modro. Leva stran gela prikazuje izražanje pri 37 °C in 4 urah, desna stran pa čez noč pri 37 °C. Črka S označuje proteinski standard. S številkami so označene posamezne frakcije po Ni-NTA afinitetni kromatografiji

## 5.5 Čiščenje proteina

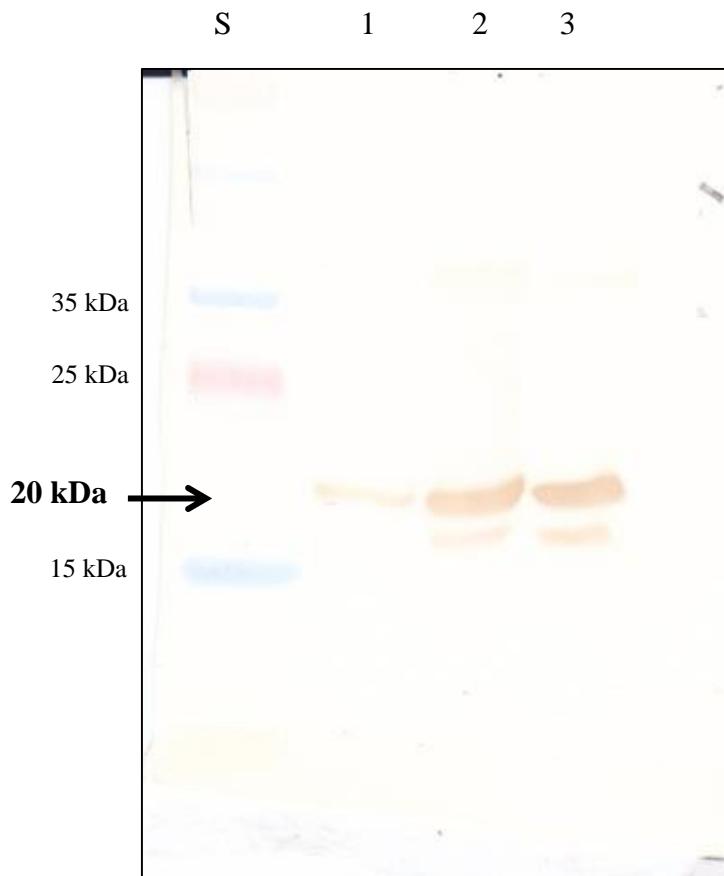
Izraženi rekombinantni protein sRANKL smo očistili z Ni-NTA afinitetno kromatografijo kot je opisano v metodah. Čistost proteina smo preverili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS (slika 12). Koncentracije proteinov pridobljene pri različnih pogojih izražanja so prikazane v preglednici 10.



Slika 12: Poliakrilamidni gel po čiščenju. Izražanje je trajalo 6,5 ur pri 25 °C. Iz 2 L tekočega LBAC gojišča smo v zadnji frakciji pridobili najvišjo koncentracijo 1,2 mg/mL proteina. Črka S prikazuje proteinski standard. S številkami so označene posamezne frakcije po Ni-NTA afinitetni kromatografiji.

## 5.6 Detekcija proteina in preverjanje aminokislinskega zaporedja

Z optimiziranimi pogoji ekspresije in po čiščenju z Ni-NTA afinitetno kromatografijo smo pridobili več frakcij eluiranih proteinov. Proteine v različnih frakcijah smo ločili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS. Sledil je prenos po Westernu na nitrocelulozno in PVDF membrano. Na nitrocelulozni membrani smo detektirali proteine s heksahistidinskim repom (slika 13), iz PVDF membrane pa smo izrezali obarvane lise (20 kDa) za določanje aminokislinskega zaporedja. Aminokislinsko zaporedje smo določili z Edmanovo degradacijo. Aminokislinsko zaporedje se je ujemalo z aminokislinskim zaporedjem za mišji sRANKL.

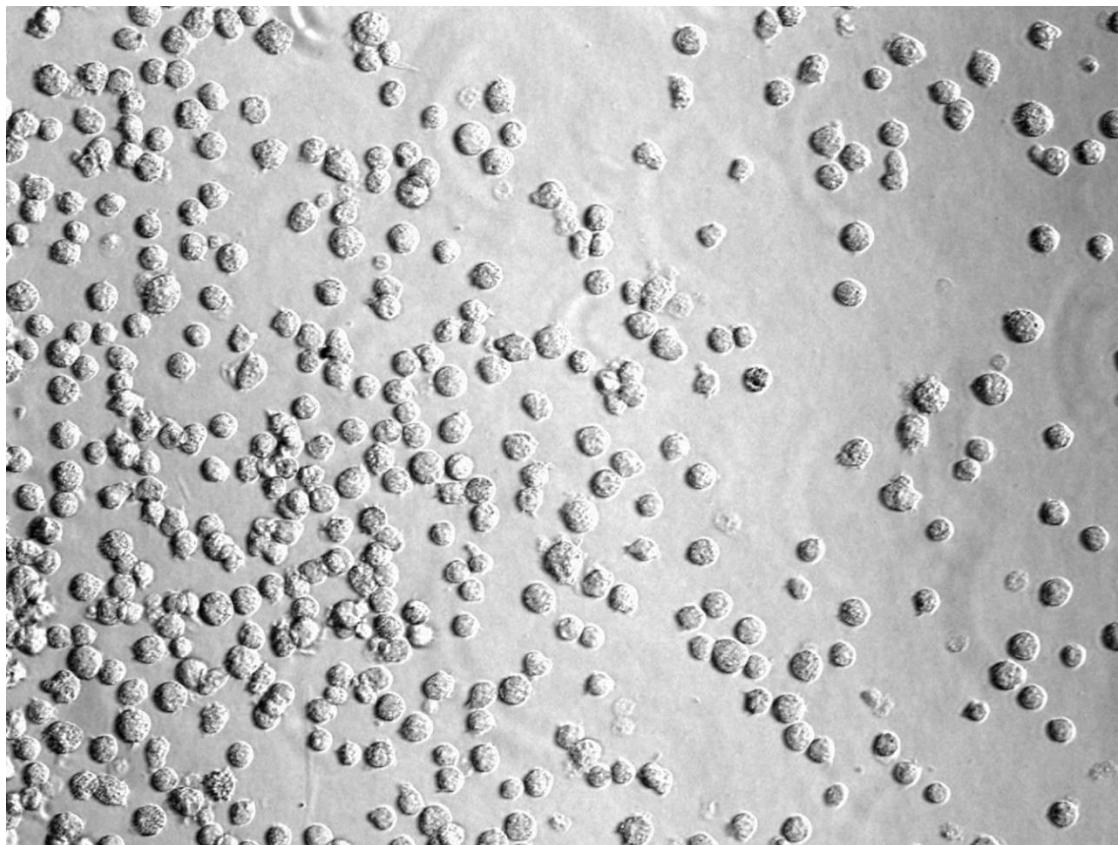


Slika 13: Imunodetekcija heksahistidinske oznake z DAB. Bakterijske celice so verjetno nekaj sRANKL-a razgradile, kar je vidno pri drugi in tretji frakciji, kjer sta 2 lis. Izražanje proteina je trajalo 6,5 ur pri 25 °C. Črka S prikazuje proteinski standard. Številke prikazujejo različne frakcije po Ni-NTA afinitetni kromatografiji

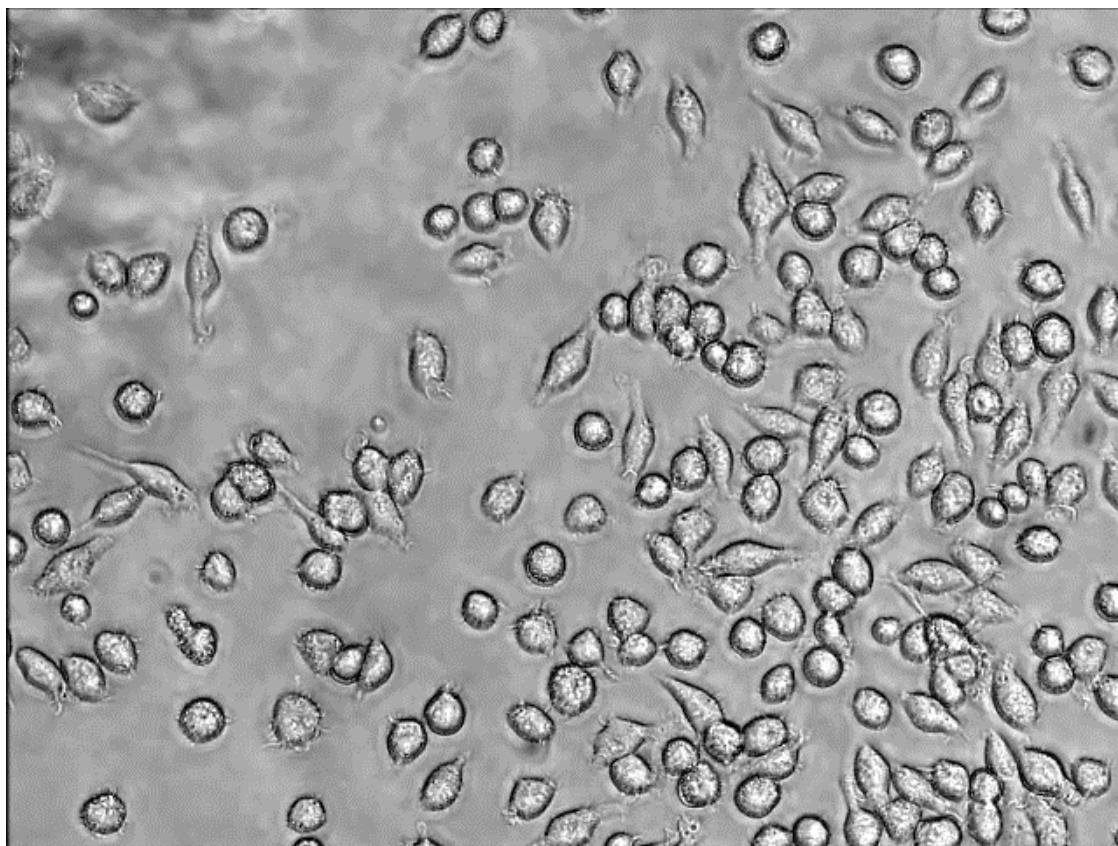
## 5.7 Morfološke spremembe celic RAW264.7 po dodatku sRANKL-a

Za diferenciacijo smo gojili celično linijo RAW264.7 in uporabljali pasaže 10 - 12. Pred dodatkom sRANKL-a so celice okrogle in pritrjene na podlago (slika 14). Topni rekombinantni RANKL (končna koncentracija 100 ng/ml) smo dodali prvi dan po precepljanju. Že drugi dan po dodatku sRANKL-a smo opazili morfološke spremembe celic RAW264.7 (slika 15). Celice so spremenile obliko, največja razlika pa je bila v njihovi sposobnosti migracije (slika 16). Vsak drugi dan smo celicam zamenjali medij z dodatkom sRANKL-a in z invertnim mikroskopom 5 dni opazovali morfološke spremembe celic in njihovo aktivnost. Peti dan so se nekatere celice združile v aggregate (slika 17), okrog 10 % pa se jih je diferenciralo v osteoklaste (slika 18), ki so bili večji od ostalih celic (slika 19). Večina celic pa se po petih dneh ni diferencirala. Za kontrolo smo pet dni gojili

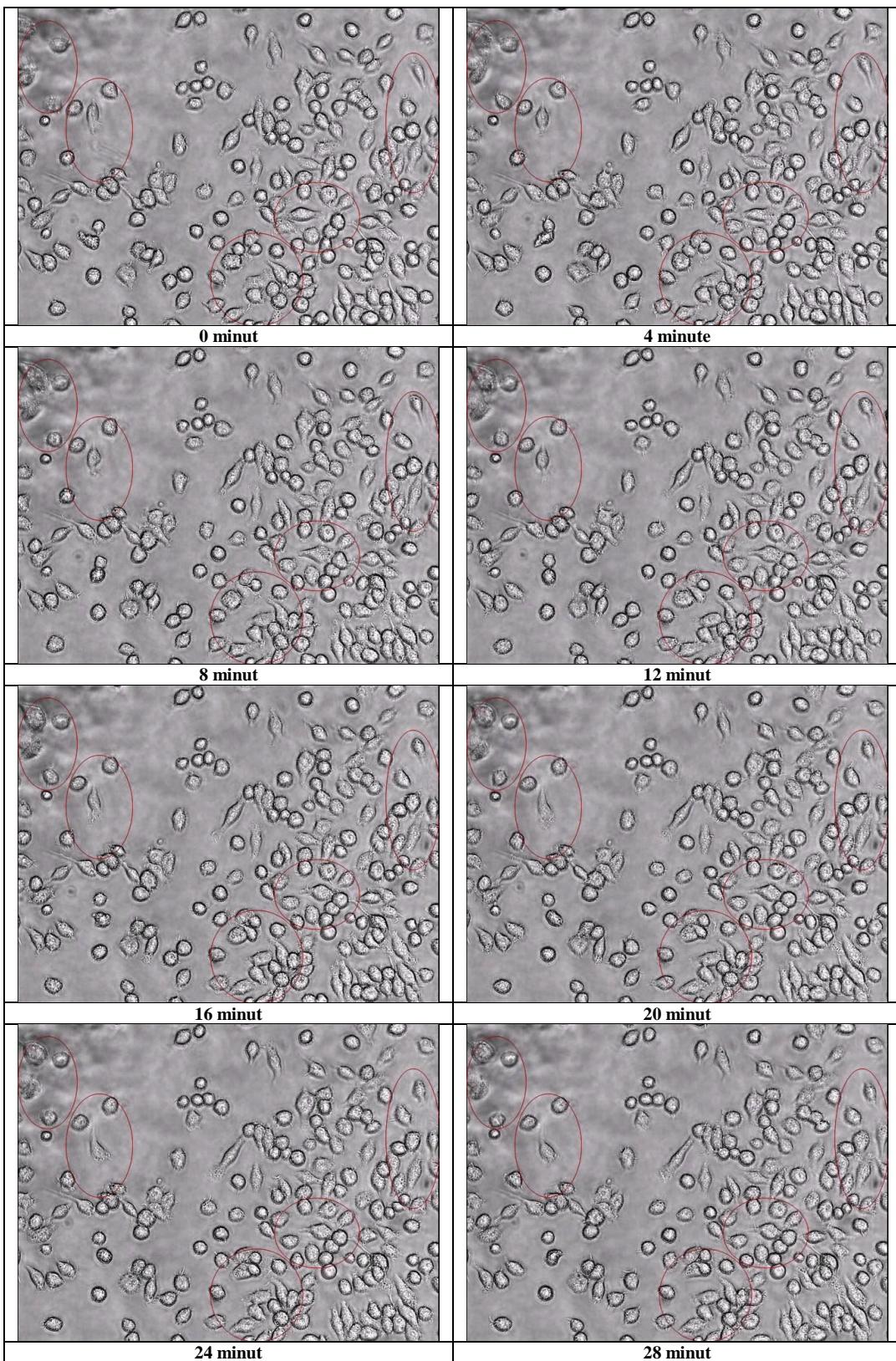
celice pri enakih pogojih brez dodanega sRANKL-a. Celice niso spremenile morfologije (slika 20).



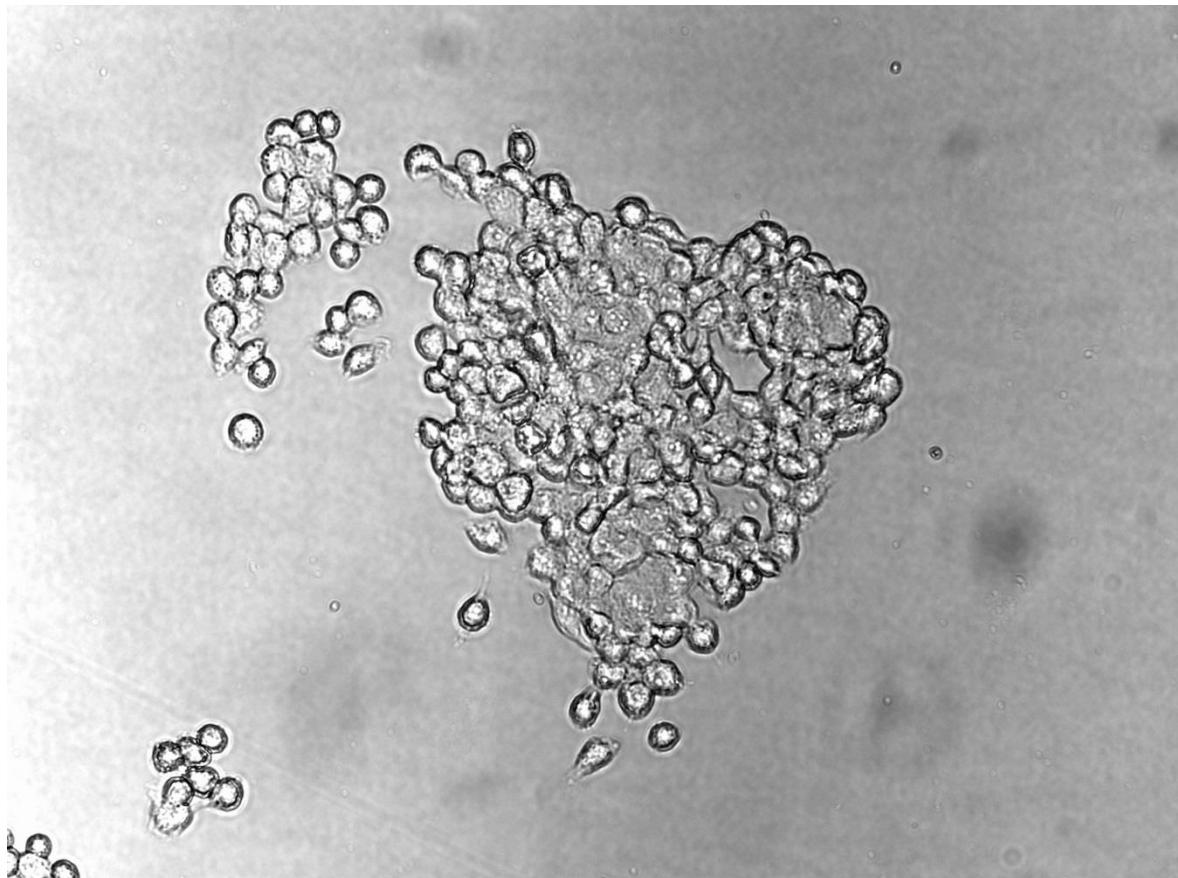
Slika 14: Nediferencirane mišje celice RAW264.7. Pred dodatkom sRANKL-a so okrogle in so pritrjene na podlago po naključni razvrstitvi (avtor fotografije Blaž Andlovic)



Slika 15: Diferenciacija mišjih celic RAW264.7. En dan po dodatku sRANKL-a, koncentracije 100 ng/ml v medij, so celice spremenile obliko ter začele migrirati in se združevati v skupine (avtor fotografije Blaž Andlovic)



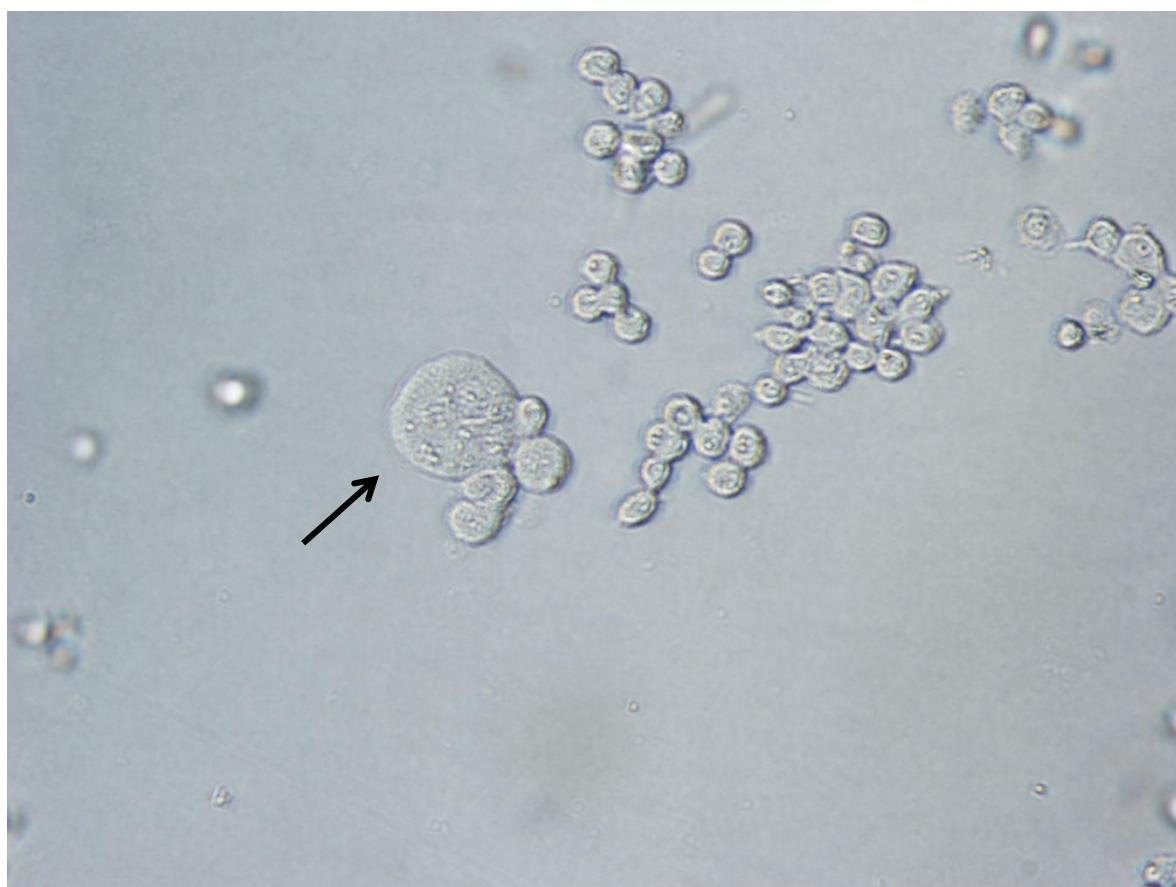
Slika 16: Migracija RAW264.7 celic en dan po dodatku rekombinantnega sRANKL-a v medij. Slike prikazujejo celice na vsake 4 minute. Označena so polja z največjo migracijo celic (avtor fotografije Blaž Andlovic)



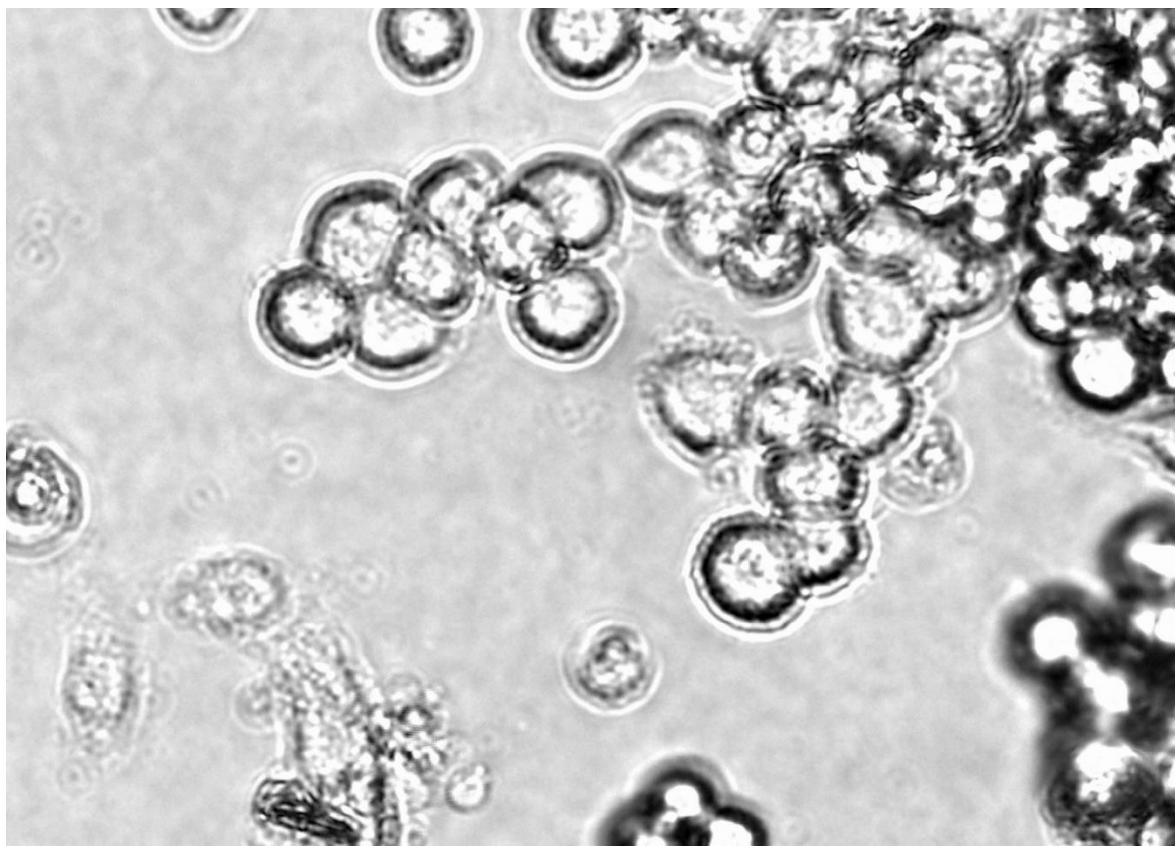
Slika 17: Peti dan po dodatku sRANKL-a se večina celic ne diferencira, tvorijo pa celične agregate (avtor fotografije Blaž Andlovic)



Slika 18: S puščico je označen osteoklast. Večji je od celic v njegovi bližini. Na sliki so vidni tudi celični agregati (avtor fotografije Blaž Andlovic)



Slika 19: Osteoklast je približno 10× večji od sosednjih celic (avtor fotografije Blaž Andlovic)



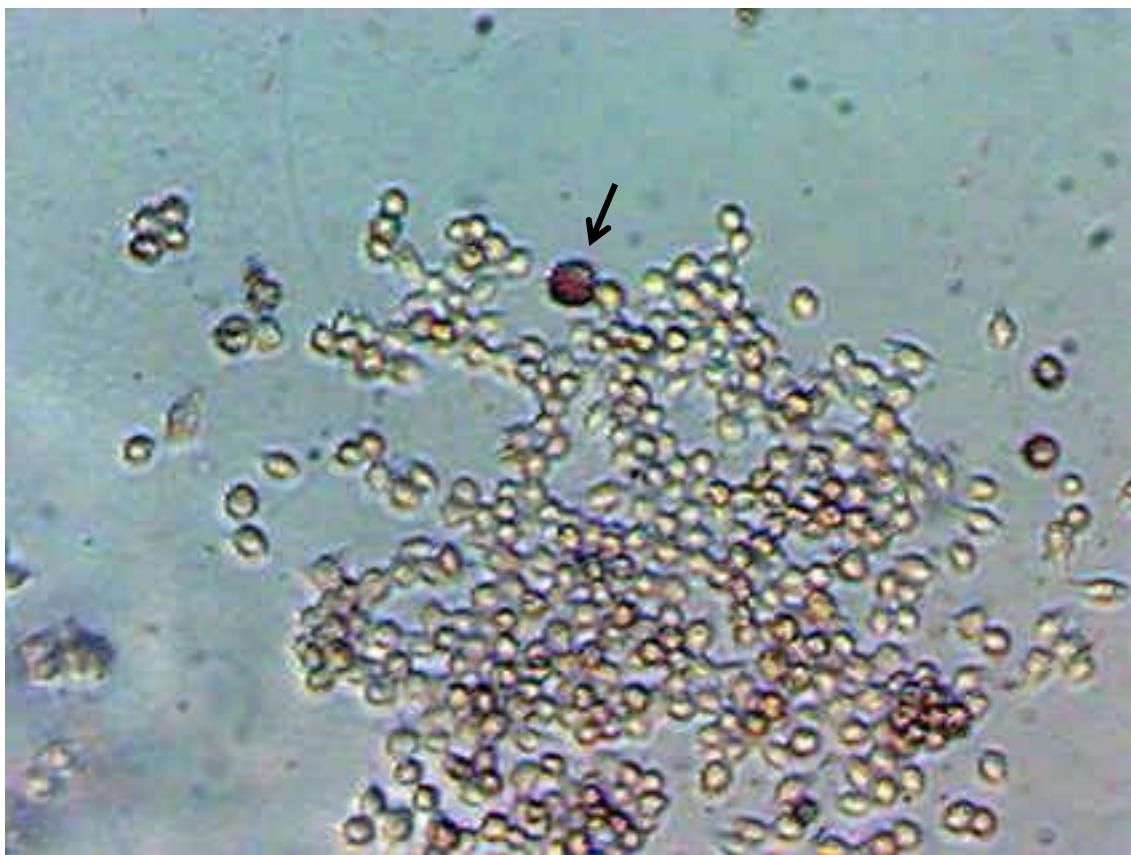
Slika 20: Peti dan brez dodanega sRANKL-a celice ohranijo morfologijo (avtor fotografije Blaž Andlovic)

### 5.8 Identifikacija osteoklastov

Osteoklaste smo identificirali peti dan po dodatku sRANKL-a. Barvali smo jih s pomočjo substrata za tartrat rezistentno kislo fosfatazo in barvila, ki obarva produkt cepitve. Encim TRAP je značilen za osteoklaste, ne izraža pa se v celični liniji RAW264.7. Diferencirane osteoklaste smo pod mikroskopom identificirali kot rdečkasto obarvane celice (slika 21 in 22)



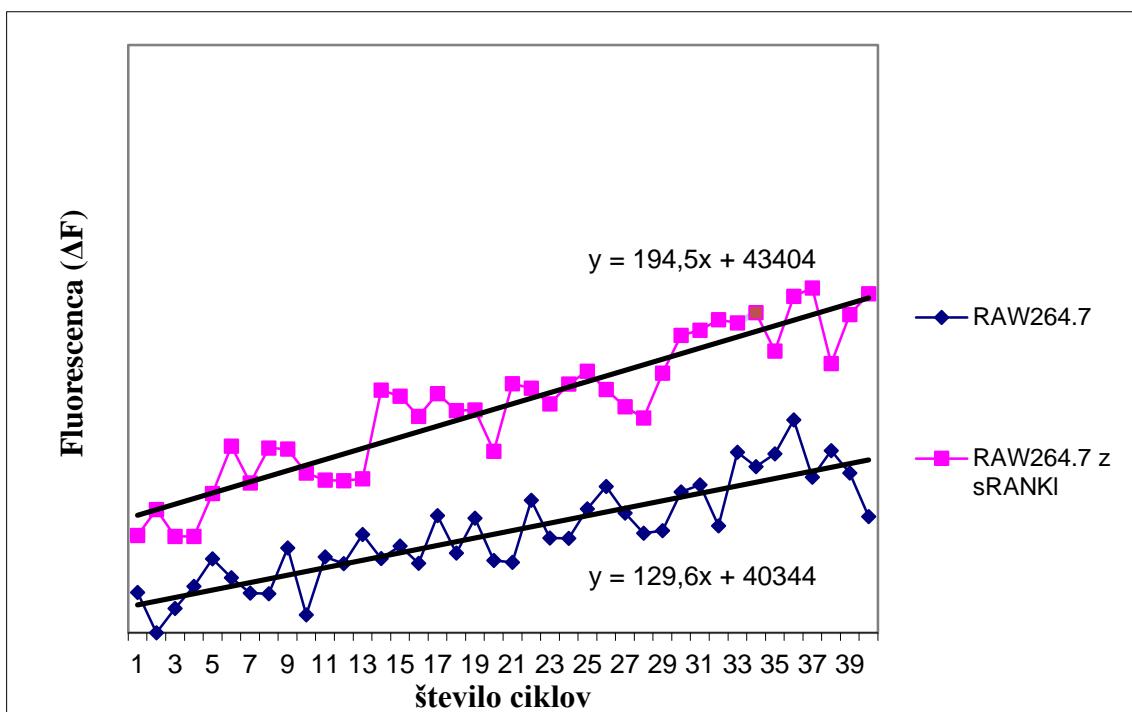
Slika 21: S puščico je označen osteoklast, ki je obarvan rdečkasto. Barva je posledica prisotnosti encima TRAP (avtor fotografije Blaž Andlovic)



Slika 22: Slika prikazuje, da so le redke celice diferencirale v osteoklaste (avtor fotografije Blaž Andlovic)

## 5.9 Merjenje aktivnosti

Za merjenje aktivnosti katepsinov smo uporabili fluorogen substrat Z-Phe-Arg-AMC (nespecifičen substrat, ki pa se predvsem uporablja za merjenje aktivnosti katepsinov L, B, S, X in K). Po petih dneh smo pri celični liniji RAW264.7 in RAW264.7 z dodanim proteinom sRANKL izmerili aktivnost izločenih katepsinov na substrat. Slika 23 prikazuje izmerjeno fluorescenco, ki je posledica razgradnje substrata. Razlike v naklonih grafov so posledica različne aktivnosti katepsinov na substrat. Aktivnost izločenih katepsinov pri celični liniji RAW264.7 je bila pri 2 meritvah 8,6 in 7,6  $\Delta F/s$ . Z dodatkom rekombinantnega sRANKL-a pa se je aktivnost pri 2 meritvah povišala na 13 oziroma 11,7  $\Delta F/s$ . Celice z dodanim sRANKL-om so imele višjo aktivnost na substrat kot celice brez dodanega sRANKL-a. Zaradi diferenciacije celic se je zvišala aktivnost izločenih katepsinov za približno  $1,5\times$ . Podatki naklonov aktivnosti so prikazani v preglednici 11. Naklone aktivnosti smo statistično obdelali s Studentovim t-testom (preglednica 12).



Slika 23: Merjenje aktivnosti na substrat Z-Phe-Arg-AMC. Naklon spremembe fluorescence s časom predstavlja aktivnost

Preglednica 11: Podatki naklonov aktivnosti nediferenciranih in diferenciranih celic ter njihovo povprečje in standardni odklon

	RAW264.7	RAW264.7 s sRANKL-om
Naklon aktivnosti	129,6	194,5
	113,83	175,42
$\bar{x}$	121,715	184,96
S.D.	11,15107	13,4916

Preglednica 12: Rezultati po Studentovem t-testu. Rezultat se je statistično signifikantno razlikoval ( $P < 0,05$ )

Izračun Studentovega t-testa med  
 nakloni aktivnosti celične linije  
 RAW264.7 in RAW264.7 s  
 sRANKL-om

p-vrednost	0,0395 *
------------	----------

## 6 RAZPRAVA

Kloniranje in izražanje sta ključna procesa za pridobivanje rekombinantnih proteinov. Poznamo več sistemov izražanja, kjer izberemo primeren vektor za vstavitev v organizem za izražanje. Med organizme primerne za izražanje uvrščamo bakterije, kvasovke, insektne celice, živalske celice, transgene živali in rastline. Za pridobivanje proteinov v raziskovalne namene se največkrat uporablajo različni bakterijski sevi. Za doseganje zadostnih koncentracij rekombinantnih proteinov je velikokrat potrebna optimizacija pogojev izražanja in izbira različnih fizijskih označevalcev, ki lahko pripomorejo pri povečani topnosti proteina.

Pripravili smo vektor za izražanje z genom za mišji sRANKL. RANKL je ključni mediator pri diferenciaciji osteoklastov. Z vezavo na RANK aktivira kaskado signalnih poti. Te sprožijo transkripcijo genov, ki uravnavajo diferenciacijo, aktivirajo osteoklaste in zavirajo njihovo apoptozo. Poznavanje biologije osteoklastov in mehanizmov diferenciacije je pomembno za načrtovanje zdravil povezanih z nepravilno modelacijo in remodelacijo kosti.

Z metodo PCR smo pomnožili DNA za sRANKL. Kot matrično DNA smo uporabili kupljen vektor z vključkom cDNA za RANKL. Z uporabo visoko kvalitetne polimeraze smo vzorce uspešno namnožili. Pomnoženo DNA smo nato ligirali v vektor pET-22b(+), ki je imel na C-terminalnem delu heksahistidinsko oznako. Uspešnost ligacije smo preverili z agarozno elektroforezo po restrikciji z encimoma *Xho*I in *Nde*I. Dobili smo dve lisi, ki sta ustrezali velikosti vektorja in vključka. Velikosti 530 bp sta ustrezala le dva vzorca. Vzrok je verjetno v T4 DNA ligazi, ki je delovala nespecifično. Zaradi možnih napak med pomnoževanjem s PCR, smo plazmid poslali na analizo DNA zaporedja. Najpogosteje napake pri pomnoževanju s PCR so v mononukleotidnih in dinukleotidnih ponovitvah (Clarke L. A. in sod., 2001). Dobljeno zaporedje po določanju zaporedja se je v 100 % ujemalo z zaporedjem za gen mišjega sRANKL-a. Za vektor s heksahistidinsko oznako smo se odločili iz več razlogov. Heksahistidinska oznaka je krajsa v primerjavi z GST in največkrat je proteazna cepitev repa nepotrebna za funkcionalne teste rekombinantnih proteinov, kar nam zmanjša izgube pridobljenega proteina (Hoffmann in Roeder, 1991).

Med sevi *E. coli* BL21(DE3)pLysS, Rosetta<sup>TM</sup>, (DE3)pLysS in BL21-CodonPlus (DE3)-RP, smo izbrali tisti sev, ki je imel pri pogojih 4 ure in temperaturi 37 °C po sprožitvi izražanja, najvišje količine sRANKL-a. Glede na obarvane lise (20 kDa) poliakrilamidnega gela, smo se odločili, da je naprimernejši sev BL21-CodonPlus (DE3)-RP. Sev je pripravljen tako, da je vsebnost redkih kodonov za arginin in prolin v rekombinantnem proteinu mišjega izvora primerna za izražanje v bakteriji. Sledila je izbira klena z najvišjim izražanjem sRANKL-a z namenom pridobivanja čimvečjih količin rekombinantnega proteina. Slika 10 poliakrilamidnega gela prikazuje, da je imel najvišje izražanje drugi klon bakterijskega seva BL21-CodonPlus (DE3)-RP. Izbera ustreznegata za izražanje je drugačna pri Papaneophytou in sodelavcih (2013), ki so s sistematskim pristopom optimizirali izražanje ekstraceularne domene proteina RANKL v *E. coli*. Kot vektor za izražanje so uporabili pGEX-6P-1, ki je imel GST označevalec. Med sevi *E. coli* BL21(DE3)pLysS in Rosetta so kot najprimernejšega izbrali BL21(DE3)pLysS. Označevalec GST je najverjetneje imel pozitiven unčinek na donos, topnost in zvijanje rekombinantnega proteina (Waugh, 2005). Pri izražanju rekombinantnega proteina v našem primeru je bil izkoristek občutno nižji v sevih, ki vsebujejo pLysS. Z optimizacijo pogojev izražanja so povečali proizvodnjo topnega proteina za 80 %. Ugotovili so, da je pred sprožitvijo izražanja najprimernejša OD<sub>600nm</sub> 0,55, koncentracija IPTG-ja 0,3 mM, temperatura po sprožitvi 25 °C in čas izražanja 6,5 ur. Sestava gojišča ni imela bistvenega vpliva na proizvodnjo topnega RANKL-a. Z izbiro drugačnega bakterijskega seva in vektorja za izražanje smo pričakovali drugačne optimalne pogoje za izražanje. Izražanje smo izvajali pri različnih temperaturah in različnih časih, kot je prikazano v preglednici 10. Višja temperatura (37 °C) in daljši čas izražanja (čez noč) sta vodila do nižje koncentracije rekombinantnega sRANKL-a. Najvišje izražanje smo opazili pri temperaturi 25 °C in času 6,5 h po sprožitvi, enako kot so jo Papaneophytou in sodelavci (2013).

Rekombinantni sRANKL smo čistili z Ni-NTA afinitetno kromatografijo, ki je primerna za čiščenje proteinov s heksahistidinsko oznako. Eluirane proteine smo zbirali v frakcijah po 1 mL. Kot je prikazano na sliki 12 poliakrilamidnega gela je bila čistost sRANKL v različnih frakcijah drugačna. V eni izmed frakcij smo dobili ~95% čistost proteina s koncentracijo 1,2 mg/mL (2 L LBAC gojišča), ki smo ga nato uporabili za diferenciacijo v osteoklaste. Za spiranje smo uporabili fosfatni pufer s 50 mM imidazolom, katerega

koncentracija je višja kot jo je priporočil proizvajalec kolone Ni-NTA. Z višjo koncentracijo smo dosegli večjo čistost proteina, kljub možnim izgubam. Pogosto se namesto  $\text{Ni}^{2+}$  ionov uporablajo  $\text{Co}^{2+}$  ioni za nalaganje afinitetne kromatografije (Mathur in Balasubramanian, 1984), pride do šibkejših nespecifičnih interakcij v primerjavi z uporabo  $\text{Ni}^{2+}$  ionov. Kljub optimizaciji pogojev vezave in elucije, čistosti vezanega rekombinantnega proteina nismo povišali.

Prisotnost endotoksinov v uporabljenem rekombinantnem sRANKL-u vpliva na nadaljnje delo pri celični biologiji. Na prvi pogled bi bilo odstranjevanje endotoksinov nepotrebno, saj lipopolisaharidi inducirajo diferenciacijo osteoklastov in delujejo skupaj z sRANKL-om sinergistično (Hou in sod., 2013), vendar dobimo na ta način sistem, ki nima definiranih pogojev in se lahko spreminja v odvisnosti od vzorca. Zato smo se odločili, da je endotoksine potrebno odstraniti. Čiščenje je v primeru uporabe afinitetne kromatografije enostavno, saj s spiranjem kolone s fosfatnim pufrom, ki je vseboval 0,1 % deteragenta Triton X-114 v hladnem, odstranimo endotoksine (Reichelt in sod., 2006).

Z optimizacijo pogojev nismo pridobili enakih količin sRANKL kot Papaneophytou in sodelavci (2013) (iz 2 L 11,4 mg/mL), ampak še vseeno dovolj za dolgoročno uporabo z namenom diferenciacije osteoklastov, saj je za diferenciacijo priporočena koncentracija le 100 ng/mL. Nižjo količino izoliranega rekombinantnega proteina sRANKL lahko pripišemo dejству, da smo kot rezultat uporabili le frakcije brez primesi. Z uporabo afinitetne rekromatografije, ali uporabo različnih tekočinskih kromatografij, kot ionsko izmenjevalne ali gelska kromatografija, bi izkoristek lahko povečali. Vendar bi bil postopek po nepotrebnem daljši, saj, kot je že omenjeno, za diferenciacijo osteoklastov potrebujemo nizke koncentracije RANKL-a. Uporaba bakterijskega sistema v kombinaciji s čiščenjem na afinitetni kromatografiji, kjer uporabimo le začetne frakcije je idealna kombinacija za hitro sprotno pripravljanje rekombinantnega proteina.

Prisotnost izraženega sRANKL smo potrdili z imunodetekcijo heksahistidinskega označevalca in z določanjem zaporedja aminokislin. Slika 13 nitrocelulozne membrane prikazuje, da so nekatere frakcije vsebovale več obarvanih lis. Vzrok je najverjetneje razgradnja na N-terminalnem delu rekombinantnega proteina s strani proteaz bakterijskega seva (Schumann in Ferreira, 2004). Tudi ko smo izbrali pogoje čiščenja rekombinantnega

proteina na metalo-kelatni afinitetni kromatografiji tako, da smo dobili na NaDS-PAGE le eno liso, smo dobili protein z nehomogenim amino koncem. Kljub izrezani le eni lisi (20 kDa), v nekaterih zaporedjih manjkalo od 1-3 aminokislinskih ostankov na N-terminalnem delu. V delu Papaneophytou in sodelavci (2013) ne poročajo o heterogenem amino koncu očiščenega proteina, vendar domnevamo, da N-terminalnega aminokislinskega zaporedja niso določili.

Pridobljeni rekombinant sRANKL (100 ng/mL) smo uporabili za diferenciacijo celične linije RAW264.7 v osteoklaste. Po prebrani literaturi smo se odločili, da je dodajanje M-CSF za diferenciacijo RAW264.7 nepotrebno, saj ga celice ob prisotnosti RANKL-a proizvajajo same (Islam in sod., 2008). Diferenciacija je trajala 5 dni. Že 1 dan po dodatku sRANKL-a celični kulturi RAW264.7 so bile vidne spremembe v morfologiji in aktivnosti celic. Celice aktivno migrirajo in iščejo fuzijskega partnerja. Celice brez dodanega sRANKL-a niso bile aktivne in niso spremenile morfologije. Dokazali smo, da je pridobljeni sRANKL biološko aktiven in lahko diferencira celice v osteoklaste. Peti dan diferenciacije smo celice barvali s pomočjo substrata za tartrat rezistentno kislo fosfatazo in barvila, ki obarva produkt cepitve. Diferenciarni osteoklasti so bili večji kot celice RAW264.7 in so se obarvali rdečkasto. Lehenkari in sodelavci (1998) so na TRAP pozitivne osteoklaste označili tiste, ki so se obarvali in vsebovali več kot 3 jedra. Sami smo kot diferencirane osteoklaste smatrali le rdečkasto obarvane celice, saj je bilo delo usmerjeno v merjenje sprememb v aktivnostih izločenih katepsinov. Obarvanih je bilo le 10 % celic, kar je najverjetneje posledica poznih pasaž in nizke dovzetnosti določenih klonov celic za diferenciacijo v osteoklaste. Za boljšo diferenciacijo v večjederne osteoklaste bomo v prihodnje morali uporabiti RAW264.7 celice nižjih pasaž. Ker pa celice hitro rastejo, bo potrebno eksperimente natančno načrtovati, saj so primerne le celice do desete pasaže (Cuetara in sod., 2006).

Uspešnost delovanja rekombinantnega proteina sRANKL na mišje monocite/makrofage RAW264.7 smo predpostavili s povišanim izločanjem katepsinov v medij. Uporabili smo substrat Z-Phe-Arg-AMC, ki ga cepi več katepsinov (catepsini L, B, S, X in K). Aktivnost izločenih katepsinov na substrat smo pri celični liniji RAW264.7 brez in z dodanim sRANKL-om, izmerili peti dan. Podatke smo statistično obdelali z Excel 2010 (Microsoft, ZDA). Aktivnost na substrat Z-Phe-Arg-AMC je bila pri celicah z dodanim sRANKL višja

kot pri celicah brez sRANKL, kar je bilo pričakovano. Aktivnost se je statistično značilno razlikovala.

Postavljeno hipotezo smo tako potrdili. Pridobljeni rekombinanten sRANKL je bil aktivен in celično linijo diferenciral v osteoklaste. Z merjenjem aktivnosti lizosomskih katepsinov pa smo potrdili, da se sekretom diferenciranih celic razlikuje od sekretoma nediferenciranih celic.

## 7 ZAKLJUČKI

- S kloniranjem in optimizacijo pogojev izražanja, kot tudi z izbiro primerenega bakterijskega seva, smo pridobili biološko aktiven mišji sRANKL.
- Kot najbolj primeren sev za izražanje se je izkazal sev *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP.
- Najvišje izražanje proteina smo opazili pri času 6,5 ur in temperaturi 25 °C.
- Rekombinantni protein je celično linijo RAW264.7 uspešno diferenciral v TRAP pozitivne osteoklaste.
- Celice celične linije RAW264.7 so po dodatku sRANKL-a spremenile morfologijo in pridobile sposobnost migracije, medtem ko so celice brez dodatka sRANKL-a ohranile morfologijo.
- Aktivnost izbranih katepsinov na fluorogeni substrat se je med kontrolnimi celicami in celicami z dodanim sRANKL-om statistično signifikantno razlikovala.

## 8 VIRI

Anandarajah P. A. 2009. Role of RANKL in bone diseases. Trends in Endocrinology & Metabolism, 20, 2: 88-94

Arnett T. 2003. Regulation of bone cell function by acid-base balance. Proceedings of the Nutrition Society, 62: 511-520

Asagiri M. in Takayanagi H. 2007. The molecular understanding of osteoclast differentiation. Bone, 40: 251-264

Behrendt N. 2012. Matrix Proteases in Health and Disease. Weinheim, Wiley-VCH: 416 str.

Bilezikian P. J., Raisz G. L., Rodan A. G. 2002. Principles of Bone Biology. 2 nd ed., Volume 1. Kalifornija, Academic Press: 882 str.

Blair C. H. in Zaidi M. 2006. Osteoclastic differentiation and function regulated by old and new pathway. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 7: 23-32

Blair C. H., Zaidi M., Schlesinger H. P. 2002. Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degredation. Biochemical Journal, 364: 329-341

Blair H. C., Kahn A. J., Crouch E. C., Jeffrey J. J., Teitelbaum S. L. 1986. Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. Journal of Cell Biology, 102: 1146–1172

Brix K. In Stöcker W. 2013. Proteases: Structure and Function. Dunaj, Springer: 265 str.

Brömmе D. 2011. Cysteine Cathepsins and the Skeleton. Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism, 9: 83-93

Brömmе D. in Wilson S. 2003. Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis.V: Biology of Extracellular Matrix 2. Parks C. W. in Mecham P. R. (eds.). Berlin, Springer: 23-42

Brömmе D., Okamoto K., Bruce B. 1996. Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts, Functional expression of human cathepsin O2 in Spodoptera frugiperda and characterization of the enzyme. The journal of Biological Chemistry, 271: 2126-2132

- Canuel M., Korkidakis A., Konnyu K., Morales R. C. 2008. Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsin D and H. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373, 2: 292-297
- Clarke B. 2008. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3: 131-139
- Clarke L. A., Rebelo C. S., Jordan P. 2001. PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *Molecular pathology*, 54, 5: 351-353
- Combs D. M. In Yutzey E. K. 2008. VEGF and RANKL Regulation of NFATc1 in Heart Valve Development. *Circulation Research*, 105: 565-574
- Cuetara V. L. B, Crotti N. T., O'Donoghue J. A., Mchugh P. K. 2006. Cloning and characterization of osteoclast precursors from the raw264.7 cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 42, 7: 182-188
- Dahl SW., Halkier T., Lauritzen C., Dolenc I., Pedersen J., Turk V., Turk B. 2001. Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry*, 40, 6: 1671-1678
- Douni E., Vagelis R., Eleni M., Jochen Z., Josef M. P., Elias E., Georg S., George K. 2011. A RANKL G278R mutation causing osteopetrosis identifies a functional amino acid essential for trimer assembly in RANKL and TNF. *Human Molecular Genetics*, 21, 4: 784-798
- Drake FH, Dodds RA., James IE., Connor JR., Debouck C., Richardson S., Lee-Rykaczewski E., Coleman L., Rieman D., Barthiow R., Hastings G., Gowen M. 1996. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 21: 12511-12516
- Duque G. In Kiel P. D. 2009. *Osteoporosis in Older Persons: Pathophysiology and Therapeutic Approach*. London, Springer: 192 str.
- Dyer KD, Schellens IMM, Bonville CA, Martin BV, Domachowske JB, Rosenberg HF. 2007. Efficient replication of pneumonia virus of mice (PVM) in a mouse macrophage cell line. *Viral Journal*, 4: 48-51
- Fonović M. in Turk B. 2014. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 8: 2560-2570
- Goto T., Yamaza T., Tanaka T. 2003. Cathepsins in the osteoclast. *Journal of Electron Microscopy*, 52, 6: 551-558

Guay J., Falgueyret P.-J., Ducret A., Percival D. M., Mancini A. J. 2001. Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides. European Journal of Biochemistry, 267, 20: 6311-6318

Hanada R., Leibbradnt A., Hanada T., Shiho K., Furuyashiki T., Gujihara H., Trichereau J., Paolino M., Qadri F., Plehm R., Klaere S., Komnenovic V., Mimata H., Yoshimatsu H., Takahasi N., Haeseler bon A., Bader M., Kilic S. S., Ueta Y., Pifi C., Narumiya S., Penninger M. J. 2009. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. Nature, 462: 505-508

Hartley W. Janet, Leonard H. Evans, Kim Y. Green, Zohreh Naghashfar, Alfonso R. Macias, Patricia M. Zerfas and Jerrold M. Ward. 2008. Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. Retrovirology, 5: 1

Hirotani H., Tuohy A. N., Woo J.-T., Stern H. P., Clipstone A. N. 2004. The Calcineurin/Nuclear factor of Activated T cells Signaling Pathway Regulates Osteoclastogenesis in RAW264.7 Cells. The Journal of Biological Chemistry, 279: 13984-13992

Hoffmann A., in Roeder G. R. 1991. Purification of his-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies. Nucleic Acids Research, 19, 22: 6337-6338

Hou GQ, Guo C., Song GH, Fang N., Fan WJ., Chen XD, Yuan L., Wang ZQ. 2013. Lipopolysaccharide (LPS) promotes osteoclast differentiation and activation by enhancing the MAPK pathway and COX-2 expression in RAW264.7 cells. International Journal of Molecular Medicine, 32, 2: 503-510

Internetna stran »AfCS-Nature Signaling Gateway«  
<http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/table.cgi?cellabbr=RW> (15. jun. 2014)

Internetna stran »Studyblue«  
<https://www.studyblue.com/notes/note/n/integumentary-and-musculoskeletal-systems/deck/6650001> (20 jul. 2015)

Islam S., Hassan F., Tumurkhuu G., Daqvadori J., koide N., Naiki Y., Yoshida T., Yokochi T. 2008. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells via augmented production of macrophage-colony-stimulating factor. Microbiology and Immunology, 52, 12: 585-590

Ito S. Kenji W., Osamu U. Shinko H., Fumihiro O., Tadashi H. 2002. Crystal Structure of Extracellular Domain of Mouse RANK Ligand at 2.2-Å Resolution. The Journal of Biological Chemistry, 277, 8: 6631-6636

- Kamiya T., Kobayashi Y., Kanaoka K., Nakashima T., Kato Y., Mizuno A., Sakai H. 1998. Fluorescence Microscopic Demonstration of Cathepsin K Activity as the Major Lysosomal Cysteine Proteinase in Osteoclasts. *The Journal of Biochemistry*, 123, 4: 752-759
- Katagiri T. In Takahashi N. 2002. Regulation mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases*, 8: 147-159
- Khosla S. 2001. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 142, 12: 5050-5055
- Kim H.-H., Shin S. H., Kwak J. H., Ahn Y. K., Kim H.-J., Lee J. H., Lee S.-M., Lee H. Z., Koh Y. G. 2003. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, FASEB Journal*, 16, 14: 2163-2165
- Kim S.-N., Kim J.-H., Koo K.-B., Kwon C.-M., Kim W.-Y., Cho Y., Yokota Y., Penninger J., Kong Y.-Y. 2006. Receptor Activator of NF-κB Ligand Regulates the Proliferation of Mammary Epithelial Cells via Id2. *Molecular Cell Biology*, 26, 3: 1002-1013
- Kini U. in Nandeesh B. N. 2012. *Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism, Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Berlin, Springer: 1046 str.
- Kobayashi K., Takahashi N., Jimi E., Udagawa N., Takami M., Kotake S., Nakagawa N., Kinosaki M., Yamaguchi K., Shima N., Yasuda H., Morinaga T., Higashio K., Martin TJ, Suda T., 2000. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *The Journal of Experimental Medicine*, 19, 2: 275-286
- Lecaille F., Brömme D., Lalmanach G. 2008. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie*, 90: 208-226
- Lehenkari P., Hentunen A. T., Laitala-Leinonen T., Tuukkanen J., Väänänen K. H.. 1998. Carbonic Anhydrase II Plays a Major Role in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by Effecting the Steady State Intracellular pH and Ca<sup>2+</sup>. *Experimental Cell Research*, 242, 1: 128-137
- Li Z., Hou S.-W., Escalante-Torres R. C., Gelb D. B., Brömme D. 2002. Collagenase Activity of Cathepsin K Depends on Complex Formation with Chondroitin Sulfate. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 28669-28676
- Liu C., Thomas S. W., Huang P., Shiqian Z., Xuekai Z., Ying W., Lucy R. W., Peifu T., Raymond J. O., David I. S., Jingshan R., Bin G. 2010. Structural and functional insights

of RANKL-RANK interaction and signaling. *The journal of Immunology*, 184, 12: 6910-6919

Loser K., Mehling A., Loser S., Apelt J., Kuhn A., Grabbe S., Shwarz T., Penninger M. J., Beisser S. 2006. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nature Medicine*, 12: 1372 – 1379

Marcus R., Feldman D., Nelson A. D., Rosen J. C. 2010. Fundamentals of Osteoporosis. 1 st ed. San Diego, Academic Press: 550 str.

Mathur R. in Balasubramanian S. A. 1984. Cobalt-ion chelate affinity chromatography for the purification of brain neutral alpha-D-mannosidase and its separation from acid alpha-D-mannosidase. *Biochemical Journal*, 222, 1: 261-264

Mueller G. C. in Hess E. 2012. Emerging functions of RANKL in lymphoid tissues. *Frontiers in Immunology*, 3: 261

Mundy R. G. 1999. Bone Remodelling and its Disorders. Anglija, Martin Dunitz Ltd: 202 str.

Okajima F. 2013. Regulation of inflammation by extracellular acidification and proton-sensin GPCRs. *Cellular Signalling*, 25: 2263-2271

Papaneophytou P. C., Rinotas V., Douni E., Kontopidis G.. 2013. A statistical approach for optimization of RANKL overexpression in Escherichia coli: Purification and characterization of the protein. *Protein Expression and Purification*, 90: 9-19

Pereverzev A., Komarova V. S., Korčok J., Armstrong S., Tremblay B. G., Dixon J. S., Sims M. S. 2007. Extracellular acidification enhances osteoclast survival through an NFAT-independent, protein kinase C-dependent pathway. *Bone*, 42: 150-161

Pino M. A., Rosen J. C, Rodriguez P. J. 2012. In Osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis. *Biological research*, 45, 3: 279-287

Raggatt J. L. In Partridge C. N. 2010. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 33: 25103-25108

Raisz G. L. 1999. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clinical Chemistry*, 45, (8b): 1353-1358

Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, 15: 261-267

Reichelt P., Schwarz C., Donzeau M. 2006. Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents. *Protein Expressions and Purifications*, 46: 483-488

- Roodman D. G. 2006. Regulation of osteoclast differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068: 100-109
- Rossi A., Deveraux Q., Turk B., Sali A. 2004. Comprehensive search for cysteine cathepsins in human genome. *Biological Chemistry*, 385: 363-372
- Sage J., Mallevre F., Barbarin-Costes F., Samsonov SA, Gehrcke JP, Pisabarro MT, Perrier E., Schnebert S., Roget A., Livache T., Mizard C., Lalmanach G., Lecaille F. 2013. Binding of chondroitin 4-sulfate to cathepsin S regulates its enzymatic activity. *Biochemistry*, 52, 37: 6487-6498
- Sandrine T., Yohann W., Steeve K. T., Yannick F., Redini F., Heymann D. 2004. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 15, 6: 457-475
- Schägger H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols*, Nature Publishing Group. 1, 1: 16-22
- Schumann W. In Ferriera S. C. L. 2004. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 3: 442-453
- Shin J-J, Wall EA, Zavzavadjian JR, Santat LA, Liu J, Hwang J-I, Rebres R, Roach T, Seaman W, Simon MI, Fraser IDC. 2006. A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 13759-13764
- Sivaraman J., Nägler DK., Zhang R., Ménard R., Cygler M. 2000. Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *Journal of Molecular Biology*, 295, 4: 939-951
- Sørensen P. H. In Mortensen K. K. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 4: 1
- Takayanagi H. 2005. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *Journal of Molecular Medicine*, 83: 170-179
- Teitelbaum SL in Ross FP. 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Reviews Genetics*, 4, 8: 638-649
- Turk B., Dolenc I., Turk V., Joseph G. 1993. Kinetics of pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry*, 32, 1: 375-380
- Turk B., Turk D., Turk V. 2000. Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477: 98-111

- Turk V., Stoka V., Vaslijeva O., Renko M., Sun T., Turk B., Turk D. 2012. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824: 68-88
- Väänänen K. H., Zhao H., Mulari M., Halleen M. J. 2000. The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science*, 113, 3: 377-381
- Waugh S. D. 2005. Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology*, 23, 6: 316-320
- Weickert J. M., Doherty H. D., Best A. E., Olins O. P. 1996. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 7: 494-499
- Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang K-O, Sosnovtsev SV, Belliot G, Krug JM, Green KY, Virgin HWIV. 2004. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PloS Biology*, 2: 2076-2084
- Zaidi M., Pazianas M., Shankar S. V., Bax E. B., Bax R. M. C., Bevis R. J. P., Stevens C., Huang H.-L. C., Blake R. D., Moonga S. B., Alam T. M. S. A. 1993. Osteoclast function and its control. *Experimental Physiology*, 78: 721-739
- Zhao Q., jia Y., Xiao Y. 2009. Cathepsin K: a therapeutic target for bone diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380, 4: 721-723
- Zupan J., Jeras M., Marc J. 2013. Osteoimmunology and influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochemical Medicine*, 23, 1: 43-63

## ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. ddr. Borisu Turku, ker mi je omogočil nabiranje izkušenj v laboratoriju Inštituta Jožef Stefan in opravljanje magistrkega dela pod njegovim mentorstvom.

Zahvaljujem se prof. dr. Gregorju Anderluhu za temeljit pregled magistrskega dela.

Zahvaljujem se dr. Iztoku Dolencu, dr. Dejanu Subanu in dr. Tajani Zajc, ki so me uvajali v laboratorijsko delo in me spoznali z metodami v molekularni biologiji. Z delom v laboratoriju sem pridobil neprecenljive izkušnje. Izpostavil bi dr. Iztoka Dolenca, ki me je usmerjal in zalagal z napotki pri opravljanju magistrkega dela. Zahvalil bi se tudi drugim iz laboratorija, ki so mi dajali napotke in mi bili v pomoč.