

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Erika PRAŠNIKAR

**DOLOČANJE UČINKOVITOSTI STOPNJE
IZREZOVANJA GENA *Cyp51* PRI MIŠIH S
POGOJNO IZBITIM GENOM V JETRIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Erika PRAŠNIKAR

**DOLOČANJE UČINKOVITOSTI STOPNJE IZREZOVANJA GENA
Cyp51 PRI MIŠIH S POGOJNO IZBITIM GENOM V JETRIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF THE *Cyp51* GENE EXCISION RATE IN THE
LIVER OF CONDITIONAL KNOCK-OUT MICE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalen del naloge je bil opravljen na Oddelku za zootehniko na Biotehniški fakulteti in na Centru za funkcijsko genomiko in bio-čipe na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje biotehnologije je na seji dne 29.10.2012 za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Simona Horvata in za somentorja asist. dr. Roka Kebra.

Recenzent: prof. dr. Gregor Majdič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:	prof. dr. Branka JAVORNIK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
Član:	prof. dr. Simon HORVAT Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član:	asist. dr. Rok KEBER Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član:	prof. dr. Gregor MAJDIČ Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Center za genomiko živali

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Erika PRAŠNIKAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 575(043.2)=163.6
KG	molekularna genetika/pogojno gensko izbitje/mišji modeli/geni/ <i>Cyp51</i> /jetra/ holesterol/biosinteza
AV	PRAŠNIKAR, Erika
SA	HORVAT, Simon (mentor)/ KEBER, Rok (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2013
IN	DOLOČANJE UČINKOVITOSTI STOPNJE IZREZOVANJA GENA <i>Cyp51</i> PRI MIŠIH S POGOJNO IZBITIM GENOM V JETRIH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XVIII, 105 str., 35 pregl., 34 sl., 5 pril., 74 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Gen <i>Cyp51</i> je član naddružine CYP in je prisoten v vseh bioloških kraljestvih. Pri živalih in ljudeh kodira protein lanosterol-14 α -demetilazo, ki katalizira pomemben korak v biosintezi holesterola. Glavno mesto biosinteze holesterola so jetra, zato je preučevanje vloge <i>Cyp51</i> v tem organu pomembno za boljše razumevanje temeljnih mehanizmov tega procesa in razvoj aplikacij v biotehnologiji ter farmaciji, denimo novih pristopov za zniževanje vsebnosti holesterola preko učinkovanja na <i>Cyp51</i> . Ker so predhodne raziskave potrdile, da popolno izbitje gena <i>Cyp51</i> pri mišjem modelu vodi v smrt zarodka, je mogoče njegovo vlogo v jetrih odraslega organizma preučevati z metodo pogojnega ciljanja genov, ki ga omogoča sistem <i>Cre/lox</i> . Tak živalski model je bil predmet raziskovanja v tej diplomski nalogi, ki je imela namen določiti učinkovitost izrezovanja lokusa <i>Cyp51</i> v jetrih dvojno transgenih živali. Z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) smo vzorčnim DNA iz jeter določili stopnjo izbitja, ki je temeljila na zaznavi in merjenju fluorescence z uporabo kemije SYBR Green I. S prvim nizom začetnih oligonukleotidov smo poskušali določiti deleže posameznih alelov z optimizacijo koncentracije kalijevega klorida (KCl) in pogojev qPCR, vendar rezultati niso bili optimalni. Teste smo nato optimirali z novo načrtovanimi začetnimi oligonukleotidi in dobili specifično dolžino pomnožkov PCR, kar nam je omogočilo merjenje deleža izrezanega alela <i>Cyp51</i> ⁻ in preostalega neizrezanega alela <i>Cyp51</i> ^{lox} . Pokazali smo, da je delež izreza pri vzorcih jeter z genotipom <i>Cyp51</i> ^{lox/lox} ; Cre ⁺ okrog 40 %, pri vzorcih <i>Cyp51</i> ^{lox/-} ; Cre ⁺ pa med 70–80 %. Ti rezultati nakazujejo, da stopnja izreza v jetrih ni popolna, kar razlagamo z dejstvom, da jetra, poleg hepatocit, sestavljajo tudi neparenhimske celice, kjer rekombinaza Cre ni bila aktivna in torej ni sprožila izrezovanja. Glede na dejstvo, da jetra vsebujejo okrog 70 % hepatocit, pa naši rezultati nakazujejo, da je bila stopnja izreza v tarčnih celicah, hepatocitih, zelo visoka. Glede na visoko učinkovitost izreza sklepamo, da se pogojni transgeni model <i>Cyp51</i> ^{lox/-} ; Cre ⁺ lahko uporablja za nadaljnje fenotipske analize vloge gena <i>Cyp51</i> in biosinteze holesterola v jetrih in da se ugotovljeni učinki lahko interpretirajo kot posledica izgube funkcije <i>Cyp51</i> v hepatocitih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 575(043.2)=163.6
CX	molecular genetics/conditional gene knock-out/mouse models/genes/ <i>Cyp51</i> /liver/cholesterol/ biosynthesis
AU	PRAŠNIKAR, Erika
AA	HORVAT, Simon (supervisor)/ KEBER, Rok (co-supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY	2013
TY	DETERMINATION OF THE <i>Cyp51</i> GENE EXCISION IN THE LIVER OF CONDITIONAL KNOCK-OUT MICE
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XVIII, 105 p., 35 tab., 34 fig., 5 ann., 74 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<i>Cyp51</i> gene is a member of CYP superfamily and is present in all biological kingdoms. In animals and humans it codes for the protein lanosterol-14α-demethylase, which catalyses an important step in cholesterol biosynthesis. The majority of <i>de novo</i> cholesterol biosynthesis occurs in liver and therefore examining the role of the <i>Cyp51</i> in this organ is important for better understanding of basic mechanisms in this pathway. Additionally, such knowledge is essential for developing novel biotechnological and pharmacological applications, such as new approaches in lowering the cholesterol levels by targeting <i>Cyp51</i>. As previous studies of our group had shown that full knock-out of the <i>Cyp51</i> gene in a mouse model leads to the embryo lethality, its function in the liver of an adult organism can therefore be only studied by conditional transgenesis method such as the Cre/<i>lox</i>. Liver conditional animal knockout model was the subject of research in this diploma thesis, intended to determine the efficiency of the <i>Cyp51</i> locus excision in the liver of double transgenic animals. Using the quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) method we determined the excision rate in liver's DNA samples on the basis of fluorescence detection and measurement using the SYBR Green I chemistry. With the first set of oligonucleotide primers we tried to determine the rate of excision by optimizing the potassium chloride (KCl) concentration and qPCR conditions, but the results were not optimal. Afterwards we optimized the tests with newly designed primers and managed to obtain specific PCR amplicons with no background which allowed us to quantitatively assess the rate of <i>Cyp51</i> excision versus remaining <i>Cyp51</i>^{lox} allele that was not excised. We have demonstrated that the excision rate in liver samples with genotype <i>Cyp51</i>^{lox/lox}; Cre⁺ is about 40 % and in genotypes <i>Cyp51</i>^{lox/-}; Cre⁺ between 70–80 %. These results show that the excision rate in liver is not complete, and this can be explained by the fact that the liver is composed not only from hepatocytes but also from non-parenchymal cells, where Cre recombinase was not active and therefore it did not trigger the excision. Given that liver contains about 70 % hepatocytes, our results indicate that the excision rate in target cells, the hepatocytes, was very high. Because of this high efficiency of excision that we established, we conclude that the conditional transgenic model <i>Cyp51</i>^{lox/-}; Cre⁺ can be used for further phenotype analysis of <i>Cyp51</i> gene role and of cholesterol biosynthesis in liver and that any possible observable effects can be interpreted as being a consequence of the <i>Cyp51</i> loss of function in hepatocytes.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	XI
Kazalo prilog	XIII
Okrajšave in simboli	XIV
Slovarček	XVIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 HOLESTEROL	2
2.1.1 Lastnosti holesterola	2
2.1.2 Vloga holesterola	4
2.1.3 Viri celičnega holesterola	5
2.1.3.1 Privzem iz hrane	5
2.1.3.2 Sinteza de novo	5
2.1.4 Uravnavanje količine holesterola v telesu	8
2.1.4.1 Uravnavanje sinteze holesterola z negativno povratno zanko	8
2.1.4.1.1 Nadzorovanje prepisovanja genov	9
2.1.4.1.1.1 Proteini SREBP	9
2.1.4.1.1.2 Jeterni X receptor alfa (LXR α – angl.: liver X receptor alpha)	11
2.1.4.2 Regulacija s cikličnim adenzin monofosfatom (cAMP)	12
2.1.4.3 Uravnavanje s fosforilacijo in proteolizo	14
2.1.5 Zaviralci sinteze holesterola, statini	14
2.1.6 Vpliv mutacij na sintezo holesterola	15
2.1.7 Mišji modeli s ciljnim izbitjem holesterolnih biosinteznih genov	16
2.2 ZGRADBA IN FUNKCIJA JETER	17

2.2.1	Sestava jeter	17
2.2.2	Celična sestava jeter	18
2.2.3	Funkcije jeter	20
2.2.3.1	Vloga jeter v metabolizmu holesterola in žolčnih kislin	20
2.3	CYP51	21
2.3.1	Značilnosti CYP	22
2.3.2	Zgradba in izražanje gena <i>CYP51</i>	22
2.3.2.1	Reguliranje izražanja gena <i>CYP51</i>	24
2.3.3	Protein CYP51	24
2.3.4	Oviranje aktivnosti encima CYP51	26
2.4	CILJNO IZBITJE GENOV	28
2.4.1	Sistem Cre/lox	28
2.4.2	Manipulacija mišjega genoma	31
2.4.2.1	Tvorba miši z izbitim genom	31
2.5	DOLOČANJE STOPNJE IZREZA CILJNEGA GENA V TKIVU	34
2.5.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR – angl.: <i>polymerase chain reaction</i>)	34
2.5.2	Prenos po Southernu	35
2.5.3	Reakcija qPCR	36
2.5.3.1	Zaznavni sistemi za kvantifikacijo	37
2.5.3.1.1	Nespecifičen zaznavni sistem z barvilom SYBR Green	38
2.5.3.1.2	Specifični zaznavni sistemi	39
2.5.3.1.2.1	Kemija sonde TaqMan®	40
2.5.3.1.2.2	Dvojne hibridizacijske sonde	40
2.5.3.1.2.3	Molekularna svetila	41
2.5.3.2	Analiza podatkov	41
2.5.3.2.1	Relativna kvantifikacija	42
2.5.3.2.2	Absolutna kvantifikacija	43
3	MATERIALI IN METODE	44
3.1	MATERIALI	44
3.1.1	Terminologija	44
3.1.2	Laboratorijski pribor	44
3.1.3	Laboratorijska miš	45

3.2	METODE	47
3.2.1	Izolacija DNA	47
3.2.2	Merjenje koncentracij vzorčnih DNA s spektrofotometrom	48
3.2.3	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov	48
3.2.4	Reakcija PCR	50
3.2.5	Testiranje začetnih oligonukleotidov	51
3.2.6	Preverjanje genotipov izoliranih vzorcev DNA	52
3.2.7	Agarozna gelska elektroforeza	55
3.2.8	Reakcija qPCR z barvilom SYBR Green I	57
3.2.8.1	Optimizacija pogojev qPCR s spreminjanjem časa podaljševanja DNA in številom ciklov	59
3.2.8.2	Optimiziranje PCR pogojev pri različnih koncentracijah KCl	60
3.2.8.3	Rekcija qPCR z različnimi koncentracijami KCl	62
3.2.9	Načrtovanje novih začetnih oligonukleotidov	63
3.2.10	PCR testiranje novih začetnih oligonukleotidov	64
3.2.11	Končna reakcija qPCR z izoliranimi vzorci DNA	64
3.2.12	Končna analiza	65
4	REZULTATI	67
4.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN KVALITETE DNA	67
4.2	ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI	68
4.2.1	Načrtovani začetni oligonukleotidi	68
4.2.2	Testiranje začetnih oligonukleotidov	69
4.3	PONOVNO PREVERJANJE GENOTIPOV IZOLIRANIH VZORCEV DNA	70
4.4	OPTIMIZACIJA qPCR ZA DOLOČITEV DELEŽA IZREZA GENA <i>Cyp51</i>	73
4.4.1	Talilne temperature (T_m)	73
4.4.2	Optimizacija s KCl	77
4.4.2.1	Optimizacija reakcije PCR s spremenjenimi koncentracijami KCl, izvedena s parom Cyp01	77
4.4.2.2	Optimizacija PCR z različnimi koncentracijami KCl z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov	79
4.4.2.2.1	Rezultati reakcij qPCR pri spreminjajočih koncentracijah KCl	80
4.5	NOVI ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI	81

4.5.1	Zaporedje novih začetnih oligonukleotidov	81
4.5.1.1	Testiranje novih parov začetnih oligonukleotidov	82
4.5.1.2	Končna reakcija qPCR s pari začetnih oligonukleotidov <i>Cyp+1</i> , <i>Cyp01</i> (novi) in <i>Actb</i> za določanje stopnje izbitja v vzorčnih DNA	83
4.6	GRAFI KONČNE ANALIZE	84
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	89
5.1	RAZPRAVA	89
5.2	SKLEPI	95
6	POVZETEK	96
7	VIRI	99
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl.1: Dedne bolezni biosintezne poti holesterola (povzeto po: Herman, 2003; Waterham, 2006; Horvat in sod., 2011)	16
Pregl. 2: Celični tipi in njihove funkcije v odraslih jetrih (Si-Tayeb in sod., 2010: 177)	19
Pregl. 3: Uporabljene linije miši v križanjih za pogojno izbitje gena <i>Cyp51</i>	47
Pregl. 4: Pričakovane dolžine pomnožkov PCR pri različnih parih začetnih oligonukleotidov	50
Pregl. 5: Priprava reakcijskih mešanic za PCR	51
Pregl. 6: Razporeditev začetnih oligonukleotidov v reakcijskih mešanicah za PCR	52
Pregl. 7: Pogoji PCR pri testiranju začetnih oligonukleotidov	52
Pregl. 8: Začetni oligonukleotidi za genotipizacijo	53
Pregl. 9: Dolžine pričakovanih pomnožkov PCR pri preverjanju genotipov	54
Pregl. 10: Pogoji PCR pri preverjanju genotipov izoliranih DNA	54
Pregl. 11: Vzorci DNA za preverjanje genotipizacije	55
Pregl. 12: Reagenti za pripravo pufra 0,5X TBE	56
Pregl. 13: Sestava reakcijske mešanice za qPCR	58
Pregl. 14: Vzorčne DNA uporabljene v reakcijah qPCR	58
Pregl. 15: Standardni pogoji qPCR	59
Pregl. 16: Optimizacija qPCR z izpuščenim korakom podaljševanja pomnožkov pri 72 °C	60
Pregl. 17: Optimizacija qPCR z zmanjšanim številom ciklov in skrajšanim časom podaljševanja za tvorbo pomnožkov alela <i>Cyp51</i>	60
Pregl. 18: Optimizacija qPCR s skrajšanim naleganjem začetnih oligonukleotidov in podaljševanja nastajajočih pomnožkov	60
Pregl. 19: Vzorčne DNA pri optimizaciji KCl za par začetnih oligonukleotidov <i>Cyp01</i>	61
Pregl. 20: Pogoji PCR pri optimizaciji z različnimi koncentracijami KCl za par <i>Cyp01</i>	62
Pregl. 21: Pogoji PCR pri koncentracijah KCl 110, 130 in 150 mM za vse tri pare začetnih oligonukleotidov	62
Pregl. 22: Sestave reakcijskih mešanic za 7 vzorcev pri različnih konc. KCl za qPCR	63
Pregl. 23: Kombinacije novih parov začetnih oligonukleotidov v reakcijski mešanici PCR	64
Pregl. 24: Pogoji PCR pri testiranju novih parov začetnih oligonukleotidov	64
Pregl. 25: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za končno reakcijo qPCR	65
Pregl. 26: Pogoji za izvedbo končne reakcije qPCR	65
Pregl. 27: Koncentracije ter vrednosti A260/A280 in A260/A230 izoliranih vzorčnih DNA	67
Pregl. 28: Načrtovani pari začetnih oligonukleotidov in njihove pričakovane dolžine pomnožkov PCR pri različnih alelih <i>Cyp51</i>	69
Pregl. 29: Pričakovani rezultati pri parih začetnih oligonukleotidov <i>Cyp+</i> , <i>Cyp0</i> in <i>Actb</i>	74
Pregl. 30: Nezadovoljivi rezultati pri standardnih pogojih qPCR z dvema T_m pri vseh genotipih pomnoženih s paroma <i>Cyp0</i> ter pri genotipu <i>Cyp51^{-/-}</i> pomnoženim s paroma <i>Cyp+</i>	74
Pregl. 31: Vrednosti C_p in T_m po optimizaciji qPCR z izpuščenim korakom podaljševanja pri 72 °C	75
Pregl. 32: Vrednosti C_p in T_m po optimizaciji qPCR z zmanjšanim številom ciklov ter skrajšanim časom pomnoževanja s polimerazo	76

Pregl. 33: Vrednosti Cp in Tm po optimizaciji qPCR s skrajšanim časom naleganja začetnih oligonukleotidov in pomnoževanja s polimerazo	76
Pregl. 34: Zaporedja novih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje alela <i>Cyp51</i>	81
Pregl. 35: Vrednosti Cp in Tm po reakciji qPCR s pari Cyp+1, Cyp01(novi) in Actb	83

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Holesterol in njegovi derivati, oksisteroli (Accad in Farese Jr, 1998: R602)	2
Sl. 2: Lega holesterola v fosfolipidnem dvosloju (Pucadyil in Chattopadhyay, 2006: 297)	3
Sl. 3: Delovanje glavnih lipoproteinov v telesu (Chen in sod., 2011: 65)	4
Sl. 4: Shema biosintezne poti holesterola (Debeljak in sod., 2003: 168; Horvat in sod., 2011: 72)	7
Sl. 5: Uravnavanje biosinteze holesterola s prepisovalnim dejavnikom SREBP (Edwards, 2004: 453)	10
Sl. 6: Mehanizmi uravnavanja celičnega holesterola (Moore in sod., 2010: 700)	12
Sl. 7: Signalna pot cAMP (Foulkes in Sassone-Corsi, 1996: F102)	13
Sl. 8: Kemijska struktura HMG-CoA in treh statinov, ki zavirajo HMGCR (Liscum, 2008: 403)	15
Sl. 9: A) Celična sestava jetrne sinusoide (Iredale, 2007: 540) B) Celična struktura jetrne lobule (Grompe, 2009: 286)	18
Sl. 10: Tridimenzionalna struktura humanega proteina CYP51A1 z azolnim protiglivnim agentom (ketokonazol) nad ravnino hema (Strushkevich in sod., 2010: 1071)	25
Sl. 11: Shema pretvorbe lanosterola v FF-MAS z encimoma CYP51 in POR (Debeljak in sod., 2003: 161)	26
Sl. 12: Mestno-specifičen rekombinacijski sistem Cre/lox (Metzger in Feil, 1999: 470)	30
Sl. 13: Shema odstranitve pozitivne selekcijske kasete s sistemom Flp/FRT (Branda in Dymecki, 2004: 15)	32
Sl. 14: Cikel PCR (Brownstein, 2004: 209)	34
Sl. 15: Faze qPCR (VanGuilder in sod., 2008: 622)	37
Sl. 16: Različne kemije za zaznavo fluorescence pri qPCR (Bell in Ranford-Cartwright, 2002: 341)	38
Sl. 17: Shema konstrukcije alela <i>Cyp51⁻</i> v mišjem zarodku (povzeto po Keber in sod., 2011: 29088)	45
Sl. 18: Mesta naleganj različnih parov začetnih oligonukleotidov na zaporedje gena <i>Cyp51</i>	50
Sl. 19: Shema mest prileganja začetnih oligonukleotidov pri preverjanju genotipov vzorčnih DNA (povzeto po Keber in sod., 2011: 29088)	54
Sl. 20: Molekularni lestvici 100 bp (M1) in 1 kbp (M2), (GeneRuler ..., 2013)	57
Sl. 21: Primer mesta naleganja para začetnih oligonukleotidov Cyp01 pri izrezanem alelu <i>Cyp51⁻</i>	68
Sl. 22: Testiranje specifičnosti začetnih oligonukleotidov pri temperaturah prileganja 60 / 57 °C	70
Sl. 23: Preverjanje predhodne genotipizacije vzorčnih DNA z genotipi <i>Cyp51^{+/+}</i> (+/+), <i>Cyp51^{+/-}</i> (+/-), <i>Cyp51^{-/-}</i> (-/-), <i>Cyp51^{lox/lox}</i> ; Cre ⁺ (lox/lox; +) in <i>Cyp51^{lox/-}</i> ; Cre ⁺ (lox/-; +) ter zapisom za Cre (+ in -)	72
Sl. 24: Graf talilne krivulje z dvema vrhovoma (zeleno) po končani qPCR pri paru začetnih oligonukleotidov Cyp01	77
Sl. 25: Pomnožki para Cyp01 pri različnih koncentracijah KCl (30, 50, 70, 90, 100 in 110 mM)	78
Sl. 26: Pomnožki različnih genotipov <i>Cyp51</i> s parom Cyp+1 pri 110 mM KCl	79
Sl. 27: Pomnožki parov Cyp01 in Actb pri koncentraciji KCl 110 mM	80
Sl. 28: Pomnožki vzorcev DNA s paroma Cyp+1 in Cyp01 pri koncentraciji KCl 150 mM	80
Sl. 29: Testiranje novih parov začetnih oligonukleotidov za alel <i>Cyp51⁻</i>	82

Sl. 30: Talilne krivulje s po enim vrhom pri vsakem paru začetnih oligonukleotidov	84
Sl. 31: Deleži alela <i>Cyp51</i> ⁺ v kontrolnih DNA iz zarodkov pomnoženi s parom Cyp+1	85
Sl. 32: Deleži alela <i>Cyp51</i> ^{lox} v vzorčnih DNA iz repov in jeter pomnoženi s parom Cyp+1	86
Sl. 33: Deleži alela <i>Cyp51</i> ⁻ v kontrolnih DNA iz zarodkov pomnoženi s parom Cyp01(novi)	87
Sl. 34: Deleži alela <i>Cyp51</i> ⁻ v vzorčnih DNA iz repa in jeter pomnoženi s parom Cyp01(novi)	88

KAZALO PRILOG

- Pril. A: Podatki Cp in izračunane deviacije odklonov (SD), brez normalizacije, pri vzorčnih DNA pomnoženih s parom Cyp+1 in učinkovitosti reakcije 1,96
- Pril. B: Podatki Cp in izračunane SD, brez normalizacije, pri vzorčnih DNA pomnoženih s parom Cyp01(novi) in učinkovitosti reakcije 1,79
- Pril. C: Podatki Cp in izračunani SD pri vzorčnih DNA pomnoženih s parom Actb in učinkovitosti reakcije 1,88
- Pril. D: Združene vrednosti preračunane iz Cp in učinkovitosti reakcij posameznih parov začetnih oligonukleotidov pri vzorčnih DNA
- Pril. E: Normalizacija vrednosti vzorčnih DNA parov Cyp+1 in Cyp01(novi) s parom Actb ter preglednici z združenimi podatki vrednosti deležev (MEAN) in pripadajoče vrednosti SD in SEM alelov *Cyp51^{lox}* pri paru Cyp+1 in alelov *Cyp51⁻* pri paru Cyp01(novi), katere smo uporabili za risanje grafov posameznih deležev alelov za vsak specifičen par začetnih oligonukleotidov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

°C	stopinja Celzija
<i>ABCA1</i>	ATP-vezavna kaseta, poddružina A (ABC1), član 1
<i>ABCG1</i>	ATP-vezavna kaseta, podružina G (WHITE), član 1
<i>ABCG5</i>	ATP-vezavna kaseta poddružina G član 5
<i>ABCG8</i>	ATP-vezavna kaseta poddružina G član 8
ABS	sindrom Antley-Bixer
Actb	β -aktin
Alb	albumin
<i>APOE</i>	apolipoprotein E
ATP	adenozin trifosfat
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CDPX2	sindrom Conradi-Hunermann
CETP	plazemski prenašalni protein holesterolnih estrov
CHILD	sindrom kongenitalne hemidisplazije z ihtioziformnim eritrodermom in deformacijo udov
CoA	koencim A
Cp (Ct)	točka prehoda mejne linije fluorescence
CRE	cAMP odzivni element
Cre	rekombinaza sistema Cre/lox
CREB	dejavnik prepisovanja, ki se veže na cAMP odzivni element
CREM	modulator cAMP odzivnega elementa
CV	koeficient variance
CYP	citokrom P450
<i>Cyp51/CYP51</i>	citokrom P450, družina 51
CYP51/CYP51A1	lanosterol-14 α -demetilaza

<i>CYP51P1</i>	citokrom P450, družina 51, psevdogen 1
<i>CYP7A1</i>	citokrom P450, družina 7, poddružina A, polipeptid 1
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotif trifosfat
<i>DHCR7</i>	7-dehidroholesterol reduktaza
<i>DHCR24</i>	24-dehidroholesterol reduktaza
E	oznaka za starost zarodka v dnevih
<i>EBP</i>	emopamil vezavni protein (sterol izomeraza)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ER	endoplazemski retikulum
ES	matične celice
Farnezil-PP	farnezil-pirofosfat
<i>FDFT1</i>	farnezil-difosfat-farnezil-transferaza 1
FF-MAS	mejoza aktivirajoči sterol izoliran iz folikularne tekočine
<i>FGFR2</i>	receptor fibroblastenga dejavnika 2
FKI	fenol : kloroform : izoamilalkohol
Flp	rekombinaza sistema Flp/FRT
FRET	prenos fluorescenčne resonančne energije
FRT	prepoznavna in vezavna mesta rekombinaze Flp
g	relativna centrifugalna sila
GA	Golgijev aparat
GSD	Greenbergova skeletna displazija
HDL	lipoprotein visoke gostote
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA
HMGCR	3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA-reduktaza
<i>Hsd17b7</i>	hidroksisteroid (17-beta) dehidroksigenaza 7

ICER	inducibilni cAMP zgodnji represor
IDL	lipoproteini srednje gostote
INSIG1	protein z inzulinom induciranege gena 1
KCl	kalijev klorid
kDa	kilo Dalton
<i>LBR</i>	receptor za lamin B
LDL	lipoprotein nizke gostote
LDLR	receptor za LDL
<i>lox</i>	prepoznavno in vezavno zaporedje rekombinaze Cre
LPL	lipoprotein lipaza
LSS	lanosterol sintaza
LXR	jetni receptor X
LXRE	DNA odzivni element jetnega receptorja X
M	molekulska masa (mol/l)
μ l	mikroliter
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
<i>MVK</i>	mevalonat kinaza
n	število ponovitev
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
<i>neo</i>	neomicin
nm	nanometer
NPC1	protein Niemann-Pick C1
NPC2	epididimal sekretorni protein E1
<i>NSDHL</i>	podoben NAD(P) odvisni steroid dehidrogenazi
PBS	fosfatni pufer z NaCl
PCR	verižna reakcija s polimerazo

<i>PGK</i>	fosfoglicerat kinaza
<i>PLTP</i>	protein fosfolipidnega prenosa
<i>POR</i>	citokrom P450 oksidoreduktaza
qPCR	kvantitativni PCR v realnem času
RXR	retinoidni X receptor
SCAP	protein za spodbujanje razcepa proteina SREBP
SCARB1	odstranjevalni receptor razreda B, skupine 1
<i>SC5D</i>	sterol-C5-desaturaza
SD	standardna deviacija
SEM	standardna napaka povprečja
SRE	sterolni element uravnavanja
SREBP	protein, ki se veže na sterolni element uravnavanja
SLOS	sindrom Smith-Lemli-Opitz
TBE	elektroforezni pufer tris/borat/EDTA
TK	timidin kinaza
T _m	talilna temperatura
<i>TM7SF2</i>	naddružina transmembranov-7, član-2
T-MAS	mejozo aktivirajoči sterol, izoliran iz mod
UV	spekter ultravijolične svetlobe
V	volt
VLDL	lipoproteini zelo nizke gostote

SLOVARČEK

Gen <i>CYP51</i>	Gospodinjski tip gena <i>CYP51</i> , ki kodira lanosterol-14 α -demetilazo, encim biosintezne poti holesterola (Rozman in sod., 1996).
<i>Cyp51^{lox/lox}</i> ; Cre ⁺	Homozigoten genotip gensko spremenjene miši, ki ima na lokusu gena <i>Cyp51</i> vstavljeni zaporedji mest <i>lox</i> (alel <i>Cyp51^{lox}</i>) in vsebuje transgeni zapis, ki pod nadzorom albuminskega promotorja specifično izraža rekombinazo Cre v hepatocitah.
<i>Cyp51^{lox/-}</i> ; Cre ⁺	Heterozigoten genotip gensko spremenjene miši, ki vsebuje po en alel <i>Cyp51^{lox}</i> in en podedovan izbit alel <i>Cyp51⁻</i> ter transgeni zapis, ki pod nadzorom albuminskega promotorja specifično izraža rekombinazo Cre v hepatocitah.
Cyp+1	Par začetnih oligonukleotidov, ki pomnožuje odsek gena <i>Cyp51</i> in tvori pri alelu divjega tipa <i>Cyp51⁺</i> in alelu <i>Cyp51^{lox}</i> pomnožke PCR dolžine 143 bp. Pri izbitem alelu <i>Cyp51⁻</i> ne tvori pomnožkov zaradi izreza vezavnega mesta začetnih oligonukleotidov. V vzorčnih DNA iz jeter je par omogočil določiti delež preostalih alelov <i>Cyp51^{lox}</i> , ki jih rekombinaza Cre ni izrezala iz zaporedja gena <i>Cyp51</i> .
Cyp01(novi)	Par začetnih oligonukleotidov, ki pri pogojih qPCR pomnožuje le izrezan krajši odsek alel <i>Cyp51⁻</i> dolžine 249 bp, preostalega neizrezanega daljšega odseka alela <i>Cyp51^{lox}</i> dolžine 1963 bp pa ne. Par je omogočil določiti deleže izbitih alelov <i>Cyp51⁻</i> v vzorčnih DNA iz jeter.
Holesterol	Velika hidrofobna molekula s polarno 3–beta-hidroksilno skupino (Pucadyil in Chattopadhyay, 2006), ki je pomembna komponenta celičnih membran in mielina ter prekursor oksisterolov, steroidnih hormonov in žolčnih kislin. Sesalci ga lahko pridobijo s hrano ali sintetizirajo <i>de novo</i> (Edwards, 2004).
qPCR	Nadgradnja navadnega PCR, saj združuje pomnoževanje izbranega odseka DNA in istočasno zaznavo pomnožkov s specifičnimi ali z nespecifičnim zaznavnimi sistemi, ki temeljijo na merjenju fluorescence (Bell in Ranford-Cartwright, 2002).
Sistem Cre/ <i>lox</i>	Izvira iz bakteriofaga P1 in omogoča pogojno izbitje genov v vsakem genomu, ki vsebuje prepoznavna mesta <i>lox</i> , kamor se veže rekombinaza Cre in izzove izrez vmesnega zaporedja med dvema mesti <i>lox</i> (Sauer in Henderson, 1988).

1 UVOD

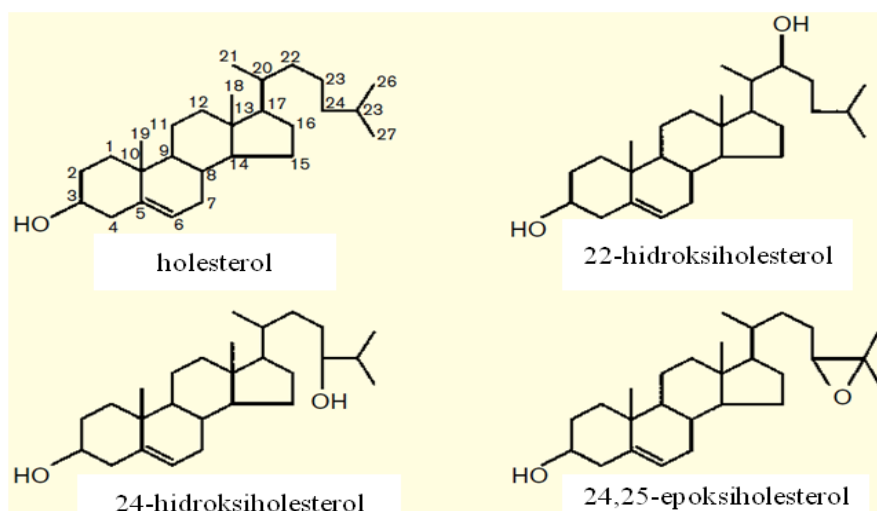
Gen citokrom P450, družina 51 (*Cyp51* ali *CYP51* angl.: – *cytochrome P450, family 51*) je zastopan v vseh bioloških kraljestvih in kodira encim lanosterol-14 α -demetilazo (*CYP51*), člana naddružine citokromov P450 (*CYP* – angl.: *cytochrome P450*). Pri sesalcih *CYP51* oksidativno odstranjuje 14 α -metilno skupino iz lanosterola in tvori mejozo–aktivirajoči sterol izoliran iz folikularne tekočine (FF–MAS – angl.: *follicular fluid meiosis–activating sterols*), ki je v somatskih celicah intermediat biosintezne poti holesterola, v spolnih celicah pa se nalaga in domnevno skrbi za njihovo zorenje (Debeljak in sod., 2003). Zaradi sodelovanja v postskvalenskem delu biosintezne poti holesterola je *CYP51* zanimiva tarča za zaviralce sinteze holesterola, saj njegovo oviranje ne prizadene biosinteze izoprenoidov, ki se tvorijo v začetni fazi biosinteze holesterola in so nujni za preživetje celic. Za preučevanje vloge encima *CYP51* v biosintezi holesterola je potrebno tvoriti miš, ki ima v genomu izbit gen *Cyp51*. Endogena sinteza holesterola večinoma poteka v hepatocitah (Cramp, 2003), ki sestavljajo približno 70 % jetrnega tkiva (Si-Tayeb in sod., 2010; Underhill in sod., 2007). *Cyp51* je gospodinjski gen, zato njegovo popolno izbitje povzroči smrt zarodkov v zgodnjih stopnjah razvoja (Keber in sod., 2011). Tkivno, in/ali časovno-specifičen sistem *Cre/lox*, omogoča pogojen izrez preiskovanega gena le v želenem tkivu ali celični liniji in/ali ob določenem času (Nagy, 2000). Z medsebojnim križanjem dveh linij miši, kjer je prva prispevala z mestoma *lox* obdana eksona 3 in 4 na lokusu gena *Cyp51* (Keber in sod., 2011), druga pa transgeni zapis jetrno-specifičnega albuminskega promotorja za izražanje rekombinaze *Cre* (Postic in sod., 1999), smo dobili dvojno transgene miši s pogojnim izbitjem gena *Cyp51* v hepatocitah. Izrezovanje ciljnega gena s *Cre* nikoli ni 100–odstotno (Müller in sod., 2009), zato je potrebno pred nadaljnjimi analizami ovrednotiti učinkovitost izreza gena *Cyp51* v jetrih, kar je najenostavneje z uporabo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR). Velika prednost metode qPCR je merjenje signala fluorescence v logaritemsko-linearni fazi, medtem ko se zaznava pomnožkov pri običajnem PCR izvede po končani reakciji, s čimer faza platoja onemogoča kvantificiranje pomnožka (Pfaffl, 2004). Namen diplomskega dela je bil z uporabo metode qPCR določiti učinkovitost pogojnega izbitja lokusa *Cyp51* v jetrih dvojno transgenih živali genotipa *Cyp51^{lox/lox}; Cre⁺* ter *Cyp51^{lox/-}; Cre⁺*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HOLESTEROL

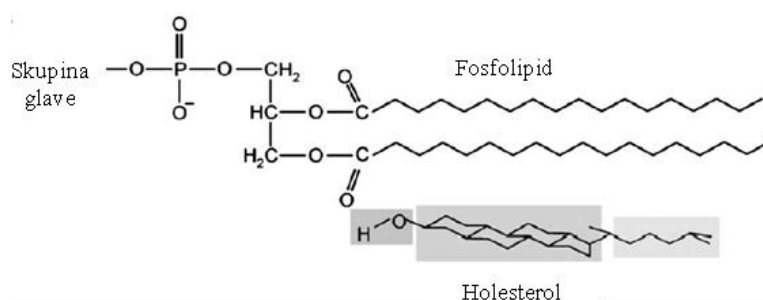
2.1.1 Lastnosti holesterola

Strukturo holesterola in nekaterih njegovih oksidiranih derivatov, oksisterolov, prikazuje slika 1. Povprečno se v kilogramu telesne teže nahaja 1,5 g holesterola. Nekatera tkiva, kot so maščoba, možgani in jetra pa ga vsebujejo še več (jetra 4,5 g/kg), (Arnold in Kwiterovich, 2003).



Slika 1: Holesterol in njegovi derivati, oksisteroli (Accad in Farese Jr, 1998: R602)

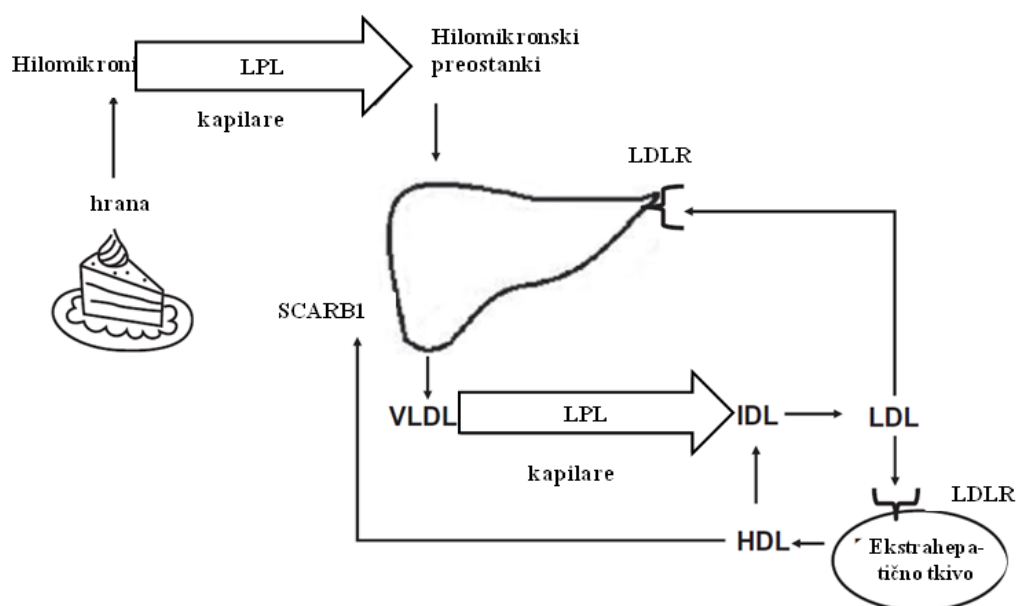
Holesterol je velika hidrofobna molekula s polarno 3β -hidroksilno skupino, ki mu v fosfolipidnem dvosloju omogoča pravokotno lego na membrano (slika 2). Hidrofobni del sestavljata steroidni obroč iz štirih spojenih ravninskih obročev in fleksibilen izooktilni ogljikovodikov rep. Rigidni steroidni obroč holesterola s sosednjimi acilnimi fosfolipidnimi maščobnimi verigami omeji gibanje membrane in s tem pripomore k ureditvi fosfolipidnega dvosloja. Fleksibilna alkilna veriga se razteza v hidrofobni del membrane (Pucadyil in Chattopadhyay, 2006).



Slika 2: Lega holesterola v fosfolipidnem dvosloju (Pucadyil in Chattopadhyay, 2006: 297)

Holesterol je v krvi prisoten v obliki estrov maščobnih kislin, ki skupaj z apolipoproteini in s trigliceridi tvorijo lipoproteinske delce, kar omogoča prenos holesterola po telesu (prikaz na sliki 3). Poznanih je pet tipov lipoproteinskih delcev: hilomikroni, lipoproteini zelo nizke gostote (VLDL – angl.: *very low density lipoprotein*), lipoproteini srednje gostote (IDL – angl.: *intermediate density lipoproteins*), lipoproteini nizke gostote (LDL – angl.: *low density lipoproteins*) in lipoproteini visoke gostote (HDL – angl.: *high density lipoproteins*). Razlikujejo se po velikosti, tipu apolipoproteinov in po razmerju proteinov ter lipidov. V črevesju poteka absorpcija maščob iz hrane, ki se pakirajo v hilomikrone in preko limfe potujejo v kri. Na površini endotelskih celic se nahajajo lipoproteinske lipaze (LPL), ki za potrebe perifernih tkiv hidrolizirajo pridobljene triacilglicerole v proste maščobne kisline in 2-monoacil-glicerol. Hilomikronske preostanke privzamejo jetra z receptorji za hilomikrone in v njih zapakirajo holesterol, holesterolne estre in trigliceride ter tako oblikujejo delce VLDL, ki se sprostijo v kri in prenesejo trigliceride do maščobnega tkiva ter mišic. Encimi LPL v kapilarah iz delcev VLDL odstranjujejo trigliceride, kar vodi v tvorbo manjših in gostejših delcev IDL, ki so bogati s holesterolnimi estri. Jetra privzamejo nekaj delcev IDL, ostali pa so podvrženi nadaljnji hidrolizi trigliceridov in se pretvorijo do delcev LDL, ki vsebuje največ holesterolnih estrov ter malo apolipoproteinov. Delci LDL potujejo do perifernih tkiv ali jeter, kjer jih prepoznajo in vežejo receptorji za LDL (LDLR), (sliki 3 in 6). V kompleks vezana LDLR in delec LDL z endocitozo, vstopita v celico (slika 6) ter potujeta do endosomov in lizosomov, kjer lizosomalne LPL hidrolizirajo holesterolne estre v holesterol. Transporterja epididimal sekretorni protein E1 (NPC2 – angl.: *epididymal secretory protein E1*) in protein Niemann-Pick C1 (NPC1 – angl.: *Niemann-Pick C1 protein*) sprostita holesterol iz endosomov ter lizosomov v plazmo celice. Delci HDL s procesom reverznega holesterolnega transporta vodijo odvečni holesterol iz perifernih tkiv nazaj do jeter, kjer se

vežejo na odstranjevalne receptorje razreda B, skupine 1 (SCARB1 – angl.: *Scavenger receptor class B member 1*). Delci HDL se lahko s prenašalnim proteinom za holesterolne estre (CETP – angl.: *cholesterol ester transfer protein*) pretvorijo tudi v LDL, ki nato potujejo do jeter in se vežejo na LDLR. Prispeli holesterol se v jetrih pretvori do žolčnih kislin in zliva v črevesje, kjer pa se večina žolčnega holesterola (~ 95 %) reabsorbira, ostalo pa zapusti telo (Moore in sod., 2010; McLaren in sod., 2011).



Slika 3: Delovanje glavnih lipoproteinov v telesu (Chen in sod., 2011: 65)

2.1.2 Vloga holesterola

V membranah živalskih celic ima holesterol esencialno strukturno vlogo pri vzdrževanju fluidnosti membrane (slika 2), saj rigidni steroidni obroč holesterola omeji gibanje fosfolipidnega dvosloja (Pucadyil in Chattopadhyay, 2006). Holesterol ni enakomerno porazdeljen po vseh membranah. V membranah mitohondrijev, peroksisomov in endoplazemskega retikuluma (ER) ga je malo, medtem ko je celična membrana zelo bogata s steroli (približno 90 % vsega celičnega holesterola). Največ holesterola se nahaja v specializiranih področjih, imenovanih lipidni rafti in kaveole, kjer je prisotnih veliko receptorjev (Edwards, 2004), kar je pomembno pri membranskem transportu in signalizaciji (Pucadyil in Chattopadhyay, 2006). Holesterol je tudi izhodna spojina (slika

4) žolčnih kislin, steroidnih hormonov, vitamina D₃ in oksisterolov. Metaboliti holesterola aktivirajo specifične jedrne receptorje, ki nadzorujejo številne metabolne in razvojne procese. Tudi sami intermediati holesterolne biosintezne poti so prekursorji drugih biosinteznih poti: 7-dehidroholesterol je prekursor vitamina D, farnezil pirofosfat (farnezil-PP) je prekursor geranil-geranil difosfataze, ubikinona, hema A in doliholov (Edwards, 2004).

2.1.3 Viri celičnega holesterola

Živali in ljudje lahko holesterol privzamejo iz hrane ali pa ga tvorijo *de novo* iz začetnega acetata. Holesterol je v telesu podvržen različnim oblikam transporta, shranjevanja in metabolizma (McLaren in sod., 2011). Insekti so avksotrofi za holesterol, zato vsega pridobijo s hrano (Edwards, 2004).

2.1.3.1 Privzem iz hrane

Dnevni privzem holesterola iz hrane, ki ga večinoma vsebujejo mlečni izdelki, jajca in meso, je med 600–800 mg. Holesterol iz hrane in del iz žolča v črevesni steni privzamejo mukozne celice (Cramp, 2003), kjer iz lumna potuje v enterocite. V enterocitah poteka pretvorba holesterola v holesterolne estre, ki se pakirajo v hilomikronske delce in po limfnem sistemu potujejo v kri. Neabsorbiran holesterol se z aktivnim transportom, ki ga narekujeta proteina ATP-vezavna kasetna poddružina G član 5 (ABCG5 – angl: *ATP-binding cassette sub-family G member 5*) in ATP-vezavna kasetna poddružina G član 8 (ABCG8), vrne iz enterocit v lumen in se izloči. Fitosteroli so strukturno podobni holesterolu in so njegovi kompetitorji, saj zmanjšajo privzem holesterola v črevesju (Chen in sod, 2011).

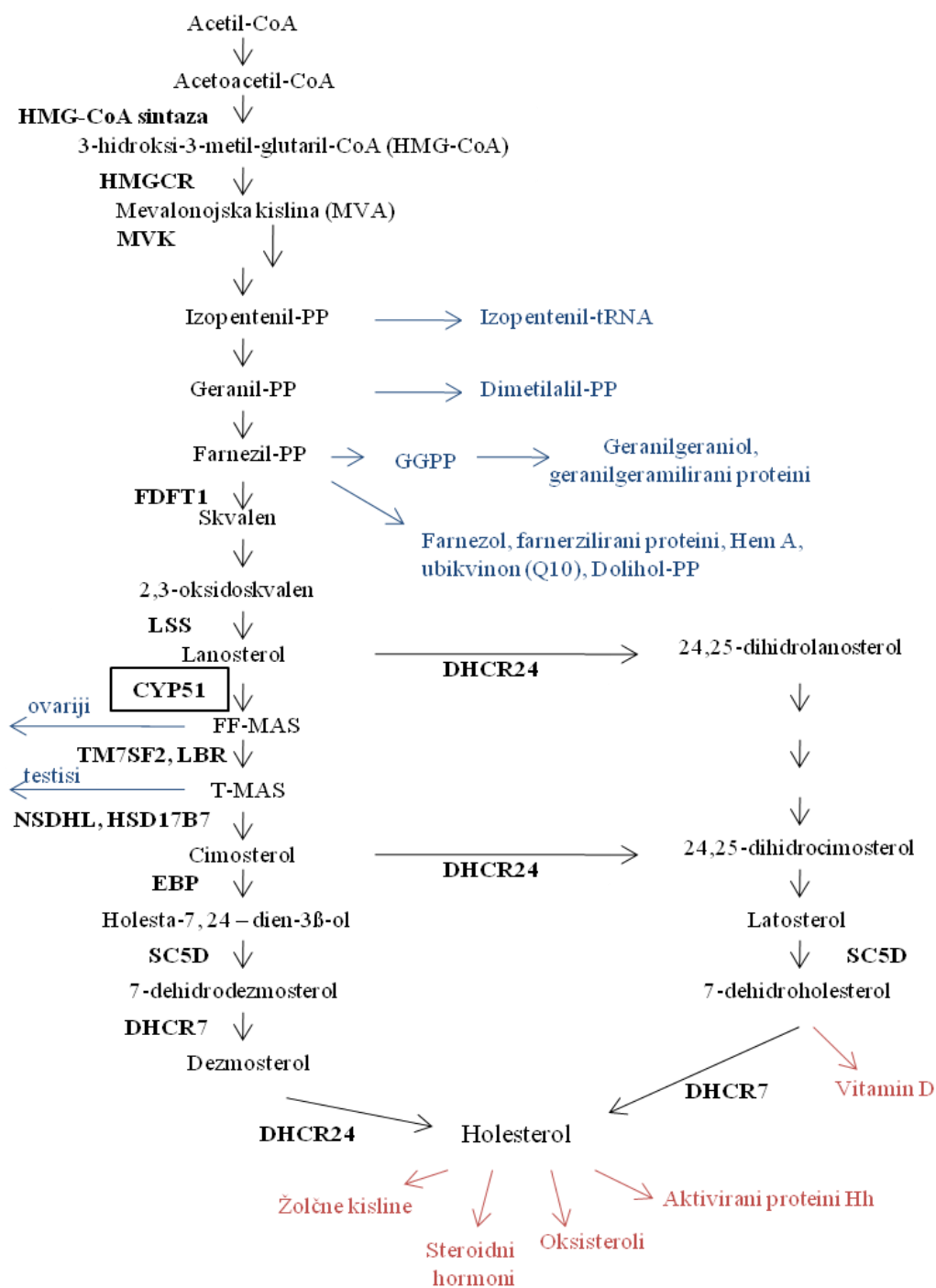
2.1.3.2 Sinteza *de novo*

Človek tvori dnevno povprečno 9 mg holesterola na kilogram telesne teže. Najbolj intenzivna endogena sinteza holesterola poteka v jetrih, manjše količine pa se tvorijo še v

nadledvični žlezi in ostalih endokrinih organih (jajčniki in moda), (Arnold in Kwiterovich, 2003). Pri biosintezi sodeluje več encimov (slika 4), ki preko vmesnih izoprenoidov pretvarjajo začetni acetat z dvema ogljikovima atomoma do končnega holesterola s 27–imi ogljikovimi atomi. Hitrost biosintezne poti holesterola je v veliki meri odvisna od encima 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A reduktaze (HMGCR), ki sodeluje v zgodnjih stopnjah sintezne (Edwards, 2004), in encima CYP51, ki sodeluje v osrednjem delu sintezne poti holesterola (Debeljak in sod., 2003). Vsi encimi, z izjemo HMGCR, ki so vključeni v pretvorbo acetyl-CoA do farnezil-PP se nahajajo v citosolu. Nadaljnji biosintezni encimi in HMGCR pa se nahajajo na membranah ER. Nekaj holesterogenih encimov se nahaja tudi, ali izključno, na membrani jedra (Waterham, 2006).

Sintetiziran holesterol lahko potuje v periferna tkiva ali jetra ali pa se nalaga v celicah, kjer se pretvori v holesterolne estre (McLaren in sod., 2011). Možganom možgansko-krvna pregrada preprečuje privzem holesterola iz lipoproteinskih delcev, zato si vsega sintetizirajo *de novo*. Sinteza holesterola v možganih je najintenzivnejša med zgodnjim postnatalnim obdobjem in z leti upada (Pfrieger in Ungerer, 2011).

Slika 4 predstavlja shemo biosintezne poti holesterola. Reakcija encima CYP51, ki pretvarja lanosterol v FF-MAS, je okvirjena s črno barvo. Spojine označene z modro barvo predstavljajo intermediate biosintezne poti holesterola, ki se nalagajo v različnih tkivih in nimajo fizioloških vplivov na holesterol. Z rdečo barvo so označene spojine derivatov, ki nastanejo iz holesterola. Simboli encimov biosintezne poti holesterola, ki so omenjeni v diplomu, so napisani s črnimi velikimi tiskanimi črkami (Debeljak in sod., 2003; Horvat in sod., 2011).



Slika 4: Shema biosintezne poti holesterola (Debeljak in sod., 2003: 168; Horvat in sod., 2011: 72)

2.1.4 Uravnavanje količine holesterola v telesu

Normalne sesalske celice natančno uravnavajo sintezo holesterola *de novo* in privzem iz hrane, s čimer vzdržujejo optimalno vsebnost celičnega holesterola za metabolne potrebe. Regulacije encimov, ki sodelujejo v biosintezi holesterola, potekajo na stopnji genskega prepisovanja, stabilnosti mRNA, prevajanja in encimske fosforilacije in degradacije encima (Liscum, 2008). Nepravilno delovanje mehanizmov lahko vodi v kopičenje holesterola v ožilju in nastanku ateroskleroze (Edwards, 2004), kopičenje v žolču pa do žolčnih kamnov (Chiang, 2004). Napake homeostaze holesterola v možganih lahko povzročijo neurodegeneracijske bolezni, kot je npr. Alzheimerjeva bolezen (Pfrieger in Ungerer, 2011). Fiziološki dejavniki, ki vplivajo na sintezo holesterola, so vsakodnevni ritem, inzulin in glukagon, hormoni ščitnice, glukokortikoidi, estrogeni ter žolčne kisline. Raven celičnega holesterola se uravnava tudi s ciklom holesterolne esterifikacije, kjer se z estersko vezjo povežeta hidroksilna skupina holesterola in maščobna kislina. Preostali mehanizmi, ki uravnavajo nivo holesterola so: hidroliza holesterilnih estrov, pretvorba holesterola v žolčne kisline in oksisterole ter odstranjevanje holesterola iz celic s specializiranimi transporterji (Liscum, 2008). Eden izmed najboljše preučenih mehanizmov uravnavanja količine holesterola v telesu je uravnavanje sinteze holesterola z negativno povratno zanko.

2.1.4.1 Uravnavanje sinteze holesterola z negativno povratno zanko

Regulacija genov, ki kodirajo encime biosinteze in privzema holesterola, običajno poteka z negativno holesterolno povratno zanko in s prepisovalnim dejavnikom, ki se veže na sterolni element uravnavanja (SREBP – angl.: *sterol regulatory element binding protein*), (Fink, 2005).

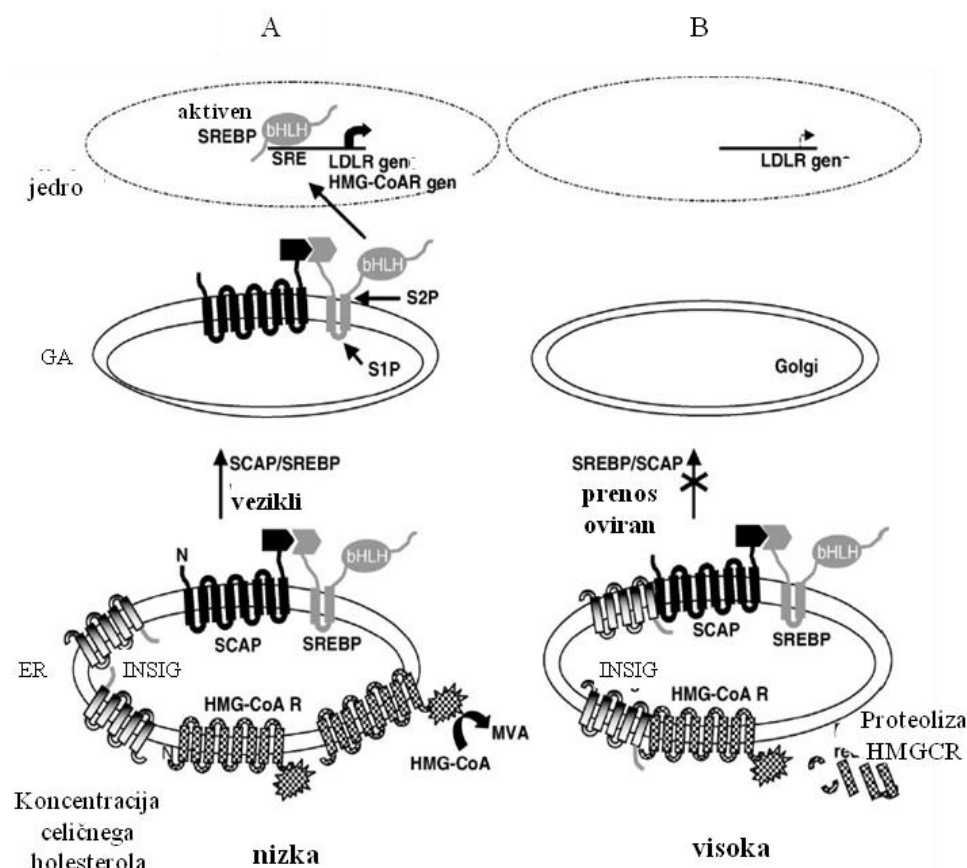
2.1.4.1.1 Nadzorovanje prepisovanja genov

2.1.4.1.1.1 Proteini SREBP

Vpliv holesterola na uravnavanje prepisovanja ciljnih genov je prikazan na sliki 5. V promotorjih genov za sintezo holesterola in LDLR se nahaja zaporedje sterolnega elementa uravnavanja (SRE – angl.: *sterol regulatory element*), kamor se veže aktiven prepisovalni dejavnik SREBP. Elemente SRE so identificirali v genih HMG-CoA sintaze, *HMGCR*, farnezil-difosfat-farneziltransferaze1 (*FDFT1*), (Liscum, 2008) in *Cyp51* (Debeljak in sod., 2003). Obstajata dva gena *SREBP*, ki proizvajata tri različne proteine. Iz gena *SREBP1* z dvema promotorja izhajata proteina SREBP1a in SREBP1c. SREBP1a je močan aktivator sinteze holesterola in maščobnih kislin ter je pomemben pri hitro delečih se celicah, ki potrebujejo lipide za proizvodnjo membran. SREBP1c sodeluje pri uravnavanju sinteze maščobnih kislin. Iz gena *SREBP2* pa se tvori protein SREBP2, ki je najmočnejši aktivator genov biosinteze holesterola in LDLR ter se prvi odzove na zahtevo jeter po povišanju holesterola (Liscum, 2008).

Novo sintetizirani protein SREBP vsebuje dve transmembranski domeni, ki oblikujeta lasnično strukturo in ga usidrata v ER kot neaktivno izhodno spojino prepisovalnega dejavnika (slika 5). Protein SREBP vsebuje še N-terminalno domeno in C-regulatorno terminalno domeno.

Pri nizki koncentraciji celičnega holesterola (slika 5 A) se regulatorna domena izhodne spojine SREBP poveže s proteinom za spodbujanje razcepa SREBP (SCAP – angl.: *SREBP cleavage-activating protein*). Nastali kompleks se v veziklu odcepi iz ER in potuje do Golgijevega aparata (GA), kjer proteaza mesta 1 (S1P na sliki 5) in proteaza mesta 2 (S2P na sliki 5) dvojno cepita protein SREBP. Izloči se aktiven in funkcionalen prepisovalni dejavnik SREBP, ki potuje v celično jedro ter se v promotorjih ciljnih genov veže na zaporedja SRE, s čimer spodbudi njihovo prepisovanje.



Slika 5: Uravnavanje biosinteze holesterola s prepisovalnim dejavnikom SREBP (Edwards, 2004: 453)

Zaradi poenostavljenosti sta na shemi slike 5 prikazana le gena *LDLR* in *HMGCR*. Bazična vijačnica–zanka–vijačnica (bHLH - angl.: *basic helix–loop–helix*) je aktivna oblika prepisovalnega dejavnika SREBP. Encim HMGCR katalizira redukcijo HMG-CoA v mevalonojsko kislino (MVA), (Edwards, 2004).

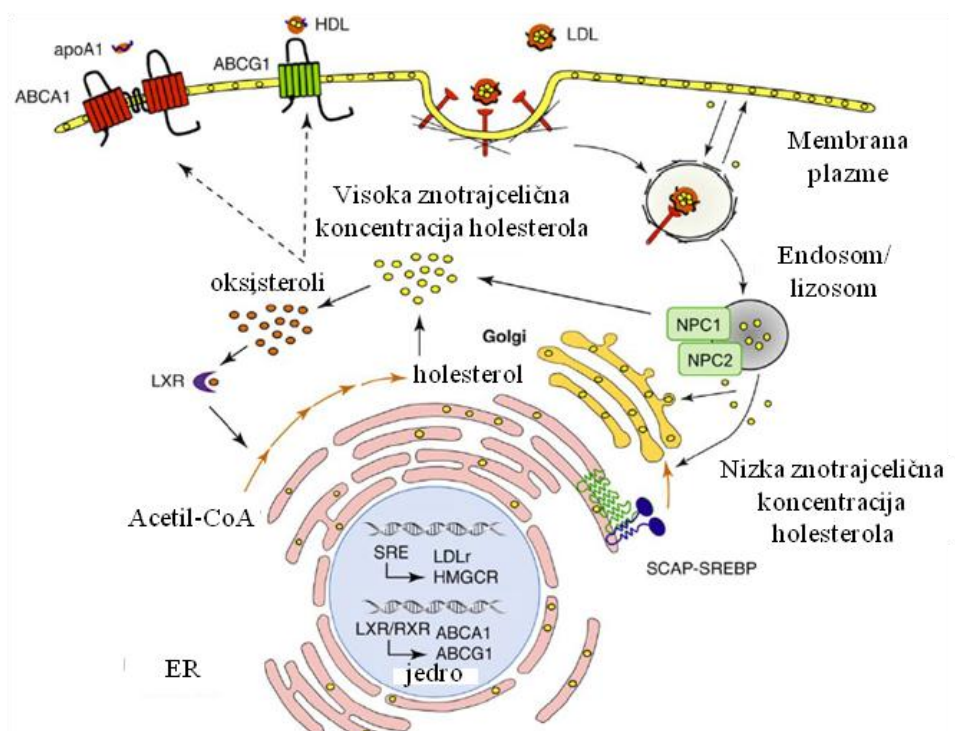
Pri povišani koncentraciji holesterola (slika 5 B) pa se holesterol veže na protein SCAP. Sledi vezava kompleksa SCAP/SREBP s proteinom inzulinom inducirane gena 1 (INSIG1 – angl.: *Insulin-induced gene 1 protein*), ki je stalni protein membrane ER. Odcepljanje in potovanje kompleksa SCAP/SREBP do GA je tako ustavljeno. Zaradi odsotnosti proteolize izhodne spojine SREBP tudi aktivnega prepisovalnega dejavnika ni. Posledično upade prepisovanje holesterogenih genov in holesterol se povrne na normalne vrednosti. Holesterol se specifično veže na protein SCAP, njegovi različni oksidirani derivati, oksisteroli pa na protein INSIG1. Oba, INSIG1 in SCAP, služita kot senzorja sterola in vplivata na potek prepisovanja proteina SREBP (Liscum, 2008).

2.1.4.1.1.2 Jeterni X receptor alfa (LXR α – angl.: *liver X receptor alpha*)

V jetrni homeostazi holesterola sodeluje tudi prepisovalni dejavnik LXR iz naddružine jedrnih hormonskih receptorjev (angl.: *nuclear hormone receptor*). Obstajata dve izoobliki LXR, α in β . Za aktivacijo prepisovalnega dejavnika LXR α je potrebna vezava oksisterolov (slika 6), (Oram, 2002). S procesom reverznega holesterolnega prenosa, ki ga vzbudi tvorba heterodimera LXR z retinoidnim X receptorjem (RXR), potuje presežni holesterol iz periferije v jetra, od koder se izloči iz telesa. Kompleks LXR/RXR se aktivira z vezavo oksisterola in se nato veže na zaporedje DNA, ki se imenuje odzivni element jetrnega receptorja X (LXRE – angl.: *liver X receptor DNA response element*), ter s tem poviša izražanje genov, vključenih v reverzni holesterolni transport: ATP-vezavna kaseta, poddružina A (ABC1), član 1 (*ABCA1* – angl.: *ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1*); ATP-vezavna kaseta, podružina G (WHITE), član 1 (*ABCG1* – angl.: *ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1*); apolipoprotein E (*APOE* – angl.: *apolipoprotein E*); *CETP*; protein fosfolipidnega prenosa (*PLTP* – angl.: *phospholipid transfer protein*); *SCARB1* in citokrom P450, družina 7, poddružina A, polipeptid 1 (*CYP7A1* – angl.: *cytochrome P450, family 7, subfamily A1, polypeptide 1*). Namen sintetiziranih proteinov je prenesti odvečni holesterol iz periferije do jeter, ki se lahko pretvori v holesterolne estre ali vgradi v sekrecijske lipoproteine ali pa se pretvori do žolčnih kislin, kar omogočajo njegov iztok iz telesa (Accad in Farese Jr, 1998; Liscum, 2008; Moore in sod., 2010).

Privzem holesterola z vezavo LDL na LDLR in uravnavanje vsebnosti ter biosinteze holesterola z negativno povratno zanko, ki zajema delovanje SREBP in LXR α , so povzeti in prikazani na sliki 6. Živalska celica si lahko holesterol sintetizira iz acetil-CoA ali pa ga pridobi iz krožečih lipoproteinov, predvsem LDL, ki so bogati s holesterolom in z njegovimi estri. Kompleks LDL/LDLR po vstopu v celico potuje v endosom, iz tam pa v pozne endosome in lizosome. LDLR se povrne na celično membrano, proteina NPC1 in NPC2 pa sprostita prosti holesterol. Pri nizki koncentraciji holesterola potuje kompleks SCAP/SREBP do GA, kjer se SREBP procesira v aktivni prepisovalni dejavnik in v jedru aktivira gene, ki so vključeni v biosintezo holesterola (npr. *HMGCR*) in privzem

holesterola (LDLR). Ob presežkih holesterola pa se tvorijo oksisteroli, ki z vezavo na LXR aktivirajo tvorbo kompleksa LXR/RXR, ki v jedru zviša izražanje ABCA1 in ABCG1. ATP prenašalca omogočita odvajanje znojtrajceličnega holesterola preko apoA1 in HDL (Moore in sod., 2010).

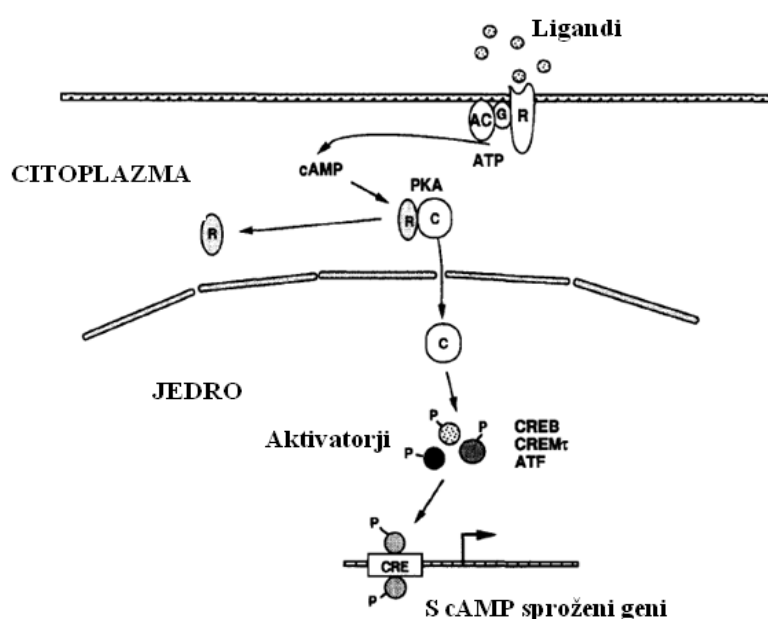


Slika 6: Mehanizmi uravnavanja celičnega holesterola (Moore in sod., 2010: 700)

2.1.4.2 Regulacija s cikličnim adenozin monofosfatom (cAMP)

Na holesterogene encime vpliva tudi od cAMP odvisna pot (slika 7), ki pa je neodvisna od holesterola. Sprožitev poti cAMP povzroči fosforilacijo od cAMP odvisnega prepisovalnega dejavnika, ki se veže na cAMP odzivni element (CREB – angl.: *cAMP-response element binding protein*) in modulatorja cAMP odzivnega elementa (CREM – angl.: *cAMP-response element modulator*). Komplex CREB/CREM se v promotorskih in regulatornih regijah veže na cAMP odzivni element (CRE – angl.: *cAMP-responsive element*) cAMP odgovarjajočih genov in poviša njihovo izražanje. Sprožitev prepisovanja je lahko takojšna (nekaj minut do ur) ali zakasnjena (dolgotrajna, nekaj ur). Hitri geni, ki se imenujejo takojšni zgodnji odzivni geni (IEG – angl.: *immediate early responsive genes*), se sprožijo občasno v odgovor na znotrajcelične signalne kaskade. Do sprožitve genov IEG

pride, ko ni *de novo* proteinske sinteze, da jih zaviralci sinteze proteinov ne morejo blokirati. Geni IEG kodirajo sekretorne proteine, citoplazmatske encime in prepisovalne dejavnike. Prepisovanje genov, ki se odzovejo na aktivacijo s cAMP odvisnimi signali, se kasneje zaustavi. Na zaustavitev poti cAMP vpliva inducibilni cAMP zgodnji represor (ICER – angl.: *inducible cAMP early repressor*). Tudi na samo sintezo ICER vpliva cAMP (Fink in sod., 2005).



Slika 7: Signalna pot cAMP (Foulkes in Sassone-Corsi, 1996: F102)

Slika 7 prikazuje površino celice, kjer vezava ligandov aktivira membranski receptor (R na membrani celice) in parna proteina G (G), ki izmenoma stimulirata aktivnost membransko vezane adenilil ciklaze (AC). AC pretvarja ATP v cAMP, ki se veže na neaktiven tetramerni kompleks proteina kinaze A (PKA) in povzroči cepitev dveh aktivnih katalitičnih (C) ter dveh regulatornih podenot (R v citoplazmi celice). Podenoti C potujeta v celično jedro, kjer fosforilirata (P) in aktivirata dejavnika prepisovanja, CREB in CREM, ki se v promotorjih genov odzivnih na cAMP vežeta na zaporedje CRE ter aktivirata njihovo prepisovanje. CREB in CREM aktivirata tudi prepisovanje prepisovalnega dejavnika ICER, ki pa zavre s cAMP sproženo prepisovanje, tudi lastno. Upadanje ICER sprosti zaviranje poti cAMP, kar lahko sproži ponoven cikel aktivacije prepisovanja (Foulkes in Sassone-Corsi, 1996).

2.1.4.3 Uravnavanje s fosforilacijo in proteolizo

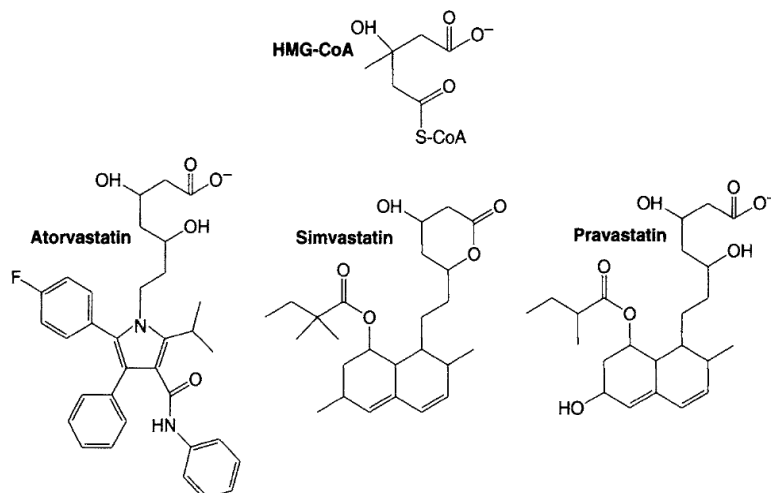
Fosforilacija in defosforilacija uravnavata aktivnost mnogih metabolnih encimov. Fosforilacija zavira katalitično aktivnost HMGCR in acetil-CoA karboksilaze. V pogojih, ko nivo celičnega ATP upade in se poviša AMP, naj bi aktivacija kinaze povzročila zaviranje biosintezne poti holesterola in maščobnih kislin, s čimer se prihrani energija. Fosforilacija HMGCR naj bi bila tako pomembnejša pri ohranjanju zaloga celične energije, kot pa pri povratni regulaciji s holesterolom. Višanje vsebnosti celičnega holesterola ne ovira samo prepisovanje holesterogenih genov, ampak tudi pospeši razgradnjo encima HMGCR, ki vpliva na hitrost biosinteze holesterola. V pogojih pomanjkanja holesterola je HMGCR stabilna in se počasi proteolizira. Pri presežkih holesterola (slika 5) pa se njeno prepisovanje ustavi, kar privede do slabljenja encimske aktivnosti in hitre proteolize (Liscum, 2008).

2.1.5 Zaviralci sinteze holesterola, statini

Hiperholesterolemija je pojav povišane vsebnosti holesterola LDL, ki velja za »slab holesterol« in vpliva na razvoj ateroskleroze, koronarne srčne bolezni in miokardinalnega infarkta, ki povzročajo visoko smrtnost v razvitem svetu. Za zniževanje plazemskih vrednosti LDL in zaviranje ateroskleroze se uporabljajo statini (slika 8), ki ovirajo HMGCR ter sintezo holesterola. Statini so lahko naravne ali sintetične komponente (Edwards, 2004), ki imajo molekularno strukturo, podobno HMG, z dodatno veliko hidrofobno skupino. Statini okupirajo aktivno mesto encima HMGCR, ki veže HMG in preprečijo vezavo njegovega naravnega substrata HMG-CoA. Velika hidrofobna skupina povzroča dodatne motnje v katalitičnih preostankih encima (Liscum, 2008).

S statini obravnavane jetrne celice »zaznajo« ovirano delovanje encima HMGCR in upadanje sinteze holesterola, zato pospešeno cepijo protein SREBP2 (sliki 5 in 6), s čimer se poviša prepisovanje genov *LDLR* in *HMGCR*. Povišane vsebnosti *LDLR* na površini hepatocit omogočijo povečan prenos delcev LDL iz plazme v jetra, ki nato pridobljeni holesterol pretvorijo do žolčnih kislin in jih izločijo v črevesje (Edwards, 2004).

Atorvastatin, simvastatin in pravastatin so zdravila za zniževanje holesterola (Liscum, 2008).



Slika 8: Kemijska struktura HMG-CoA in treh statinov, ki zavirajo HMGCR (Liscum, 2008: 403)

Popolna blokada aktivnosti encima HMGCR bi kljub eksogenemu holesterolu vodila v celično smrt, saj bi bili celici odvzeti tudi esencialni nesteroidni izoprenoidi, ki izhajajo iz mevalonata in kjer sodeluje tudi HMGCR. S statini tretirane celice morajo zato sintetizirati manjšo količino mevalonata, ki pa ga prednostno uporabijo v afinitetnejši sintezi nesteroidnih izoprenoidov (Liscum, 2008). Kljub temu pa poročajo o stranskih učinkih uporabe statinov na mišice, hepatotoksičnosti in odpornosti, zato se razvijajo nova zdravila za zniževanje holesterola, ki bi ovirala encime v kasnejših stopnjah biosinteze holesterola. Kandidati za blokado so: FDFT1, lanosterol sintaza (LSS – angl.: *lanosterol synthase*) in CYP51 (Korošec in sod., 2008).

2.1.6 Vpliv mutacij na sintezo holesterola

Mutacije v sintezni poti holesterola so redke, saj so običajno nezdružljive z življenjem in vodijo v smrt zarodkov. Znanih je osem dednih bolezni (navedene v preglednici 1) z mutacijami različnih genov, ki kodirajo encime biosintezne poti holesterola (slika 4). Okvare različnih encimov povzročajo kopičenje različnih intermediatov v tkivih in telesnih tekočinah. Za paciente so značilne različne morfogene in prirojene anomalije, ki se kažejo v nepravilnosti notranjih organov, skeleta in/ali kože. Možen pa je tudi zaostanek v psihomotornem razvoju (Waterham, 2006).

Preglednica1: Dedne bolezni biosintezne poti holesterola (povzeto po: Herman, 2003; Waterham, 2006; Horvat in sod., 2011)

Dedna bolezen	Mutacija gena
Mevalonska acidurija	Mevalonat kinaza (<i>MVK</i>)
Sindrom SLOS (angl.: <i>Smith-Lemli-Opitz syndrome</i>)	7-dehidroholesterol reduktaza (<i>DHCR7</i>)
Dezmosteroloza	24-dehidroholesterol reduktaza (<i>DHCR24</i>)
Sindroma CDPX2 (angl.: <i>Conradi-Hunermann-Happle syndrome</i>)	Emopamil vezavni protein (sterol izomeraza), (<i>EBP</i>)
Sindrom CHILD (angl.: <i>Congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects</i>)	Podoben NAD(P) odvisni steroid dehidrogenazi (<i>NSDHL</i>)
Sindrom GSD (angl.: <i>Greenberg skeletal dysplasia</i>)	Receptor lamina B (<i>LBR</i>) ali naddružina transmembranov-7, član-2 (<i>TM7SF2</i>)
Sindrom ABS (angl.: <i>Antley - Bixler syndrome</i>)	Citokrom P450 oksidoreduktaza (<i>POR</i>) ali receptor fibroblastnega dejavnika 2 (<i>FGFR2</i>)
Lanosteroloza	Sterol-C5-desaturaza (<i>SC5D</i>)

2.1.7 Mišji modeli s ciljnim izbitjem holesterolnih biosinteznih genov

Mišji modeli s ciljnim izbitjem genov *de novo* sinteze holesterola omogočajo preučevanje vplivov posameznih genov na biosintezo holesterola. Uporabni pa so tudi pri razvoju novih zdravil (npr. statini), saj pogojno izbitje ciljnega gena v gospodinjskih poteh (npr. sinteza holesterola) oponaša efekt utišanja pripadajočega encima, na katerega naj bi delovalo preiskovano zdravilo. Tako je mogoče ugotavljati vpliv in uspešnost zdravila na biosintezo v ciljnem tkivu ali organu. Sintaza holesterola je ubikvitarna (povsod navzoča) in esencialna pot, zato je smrt mišjih modelov pričakovana že v embrionalni dobi, kar pa onemogoča preučevanje vpliva izbitega gena na odraslo žival. Izbitje genov pri mišjih modelih poteka z različnimi genetskimi tehnikami.

Izbitje gena *Hmgcr*, ki tvori mevalonat, je za miš letalna že pred implantacijo, medtem ko heterozigotne mutante preživijo. Encim *MVK* ima več funkcij, saj omogoča sintezo tudi nesterolnih izoprenoidov (farnezil, dolihol, hem A, ubikinon) in samega izoprena. Izbitje gena *Mvk* povzroči smrt zgodnjih zarodkov. Homozigotni mišji zarodki z izbitim genom *Fdft1* ne proizvajajo skvalena, zato propadejo med 9,5 in 12,5 dnevom embrionalnega razvoja (E9,5–E12,5), (Horvat in sod., 2011). Homozigotni mišji zarodki z izbitim genom

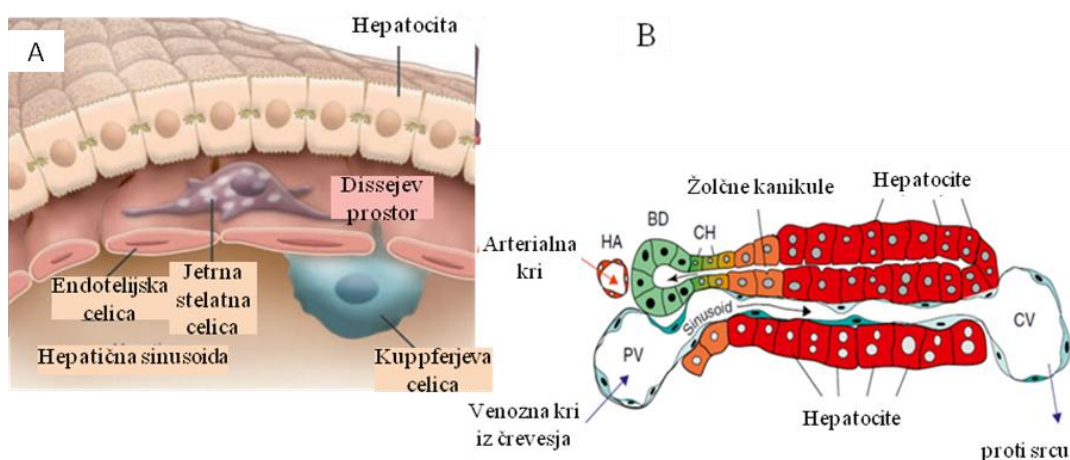
Cyp51 propadejo v E15,0, vendar so aleli *Cyp51* mišjega modela oblikovani tako (Keber in sod., 2011), da dopuščajo poskuse s pogojnim izbitjem, kar omogoča preučevanje vloge encima CYP51 v biosintezi holesterola v jetrih in spermatogenezi v testisih tudi pri odraslih živalih. Na aktivnost CYP51 vpliva tudi encim POR, ki mu služi kot donor elektronov. Zarodki *Por*^{-/-} propadejo do E13,5. Mutacije gena *Nsdhl* in *Ebp* na kromosomu X povzročijo smrt moških zarodkov in homozigotnih samic, medtem ko heterozigotne samice preživijo, a vseeno kažejo bolezenski fenotip. Mutante gena hidroksisteroid (17-beta) dehidroksigenaze 7 (*Hsd17b7*) kažejo na velik vpliv HSD17B7 pri uravnavanju nivojev estrogenov v nosečnosti, vendar pa homozigotne mutante propadejo v E10,5, zaradi napak v razvoju možganov in srca. Heterozigotne živali so pri obeh spolih normalne. Miši z izbitim genom *Dhcr7* ali *Dhcr24* poginejo kmalu po rojstvu, medtem ko ljudje preživijo in trpijo za sindromom SLOS oz. dezmosterolozo. Utišanje kasnejših genov biosintezne poti holesterola povzroči kasnejšo smrt zarodkov ali že rojenih mladičev. Mutante *Sc5d* se rodijo žive s spremembami obrazno-lobanjskega dela in udov ter imajo veliko skupnih fenotipov s humanim sindromom SLOS (Horvat in sod., 2011).

2.2 ZGRADBA IN FUNKCIJA JETER

2.2.1 Sestava jeter

Jetra so človeški največji trdni organ z maso 1200–1500 gramov. Nahajajo se pod diafragmo v zgornjem, desnem delu trebušne votline. Srpasti ligament jih deli na večji desni in manjši levi lobus (Cramp, 2003), ki ju sestavljajo ponavljajoče funkcionalne enote, lobule, s centralno veno v središču (slika 9 B). Na vsaki strani lobule se nahaja jetrna trojica iz jetrne vene (PV na sliki 9 B), jetrne arterije (HA na sliki 9 B) in žolčevoda (BD na sliki 9 B). Jetrne trojice in centralno veno (CV na sliki 9 B) povezujejo majhne in vijugaste žile, imenovane sinusoide, ki jih obdajajo luknjičaste endotelne celice, katere tvorijo tanko regijo ekstracelularnega matriksa (sestavljene iz kolagena tipov I–IV, laminine, fibronektina in heparin sulfat proteoglikanov), imenovan Dissejev prostor, kjer poteka direkten stik med krvjo in površino hepatocit (slika 9 A). Hepatocite so urejene v enocelične plasti vzdolž sinusoid in filtrirajo kri (Underhill in sod., 2007; Cramp, 2003).

Kri, bogata s hranili in s hormoni, vstopi v jetra z jetrno veno, kri, bogata s kisikom, pa z jetrno arterijo (Grompe, 2009). Žili tečeta med jetrnimi sinusoidami proti centralni veni, od tam pa kri nadaljuje pot v sistemsko krvožilje (slika 9 B). Ob hepatocitah poteka dodaten zbiralni sistem žolčnih kanalikul oz. kapilar, v katere se izloča žolč, ki ga proizvajajo hepatocite. Kanalikule se stekajo v kanal, ki potuje proti žolčnemu vodu jetrne triade (Lagasse, 2007). V žolčniku se zbira, shranjuje in koncentrira žolč, ki nato potuje v dvanajsternik (Cramp, 2003; Grompe, 2009).



Slika 9: A) Celična sestava jetrne sinusoida (Iredale, 2007: 540) B) Celična struktura jetrne lobule (Grompe, 2009: 286)

2.2.2 Celična sestava jeter

Prevladujoči celični tip v jetrih so hepatocite in jih je pri odraslih miših približno 5×10^7 , pri človeku pa 80×10^9 (Grompe, 2009), kar predstavlja približno 70 % jetrne mase (Si-Tayeb in sod., 2010; Underhill in sod., 2007). Jetra, poleg prevladujočih hepatocit, sestavljajo tudi različne neparenhimske celice (Lagasse, 2007), ki so navedene v preglednici 2 in prikazane na sliki 9. Življenjska doba odrasle sesalske hepatocite je med 200 in 300 dni. Za jetra je značilna visoka stopnja regeneracije, ki jo spodbujajo odrasle hepatocite s proliferacijo (Grompe, 2009). Hepatocite in celice žolčevoda nastanejo iz izhodnih ovalnih celic (Underhill in sod., 2007). Zaradi mnogih sinteznih in metabolnih funkcij so hepatocite heterogena populacija, sestavljena iz majhnih in velikih, diploidnih in poliploidnih, enojedrnih in dvojedrnih hepatocit. Med rastjo in razvojem so sesalske hepatocite podvržene postopni poliploidizaciji, iz katerih se razvijejo tetraploidne in

oktoploidne celice z enim ali dvema jedri. Poliploidija je način celične rasti, s katero celica zviša metabolno produkcijo in je alternativa celični delitvi (Lagasse, 2007).

Preglednica 2: Celični tipi in njihove funkcije v odraslih jetrih (Si-Tayeb in sod., 2010: 177)

Celični tip	Lega v jetrih	Funkcija
Hepatocite	Parenhim	~ 70 % celične populacije jeter Izločajo proteine in žolč Metabolizem holesterola Detoksifikacija Metabolizem sečnine Metabolizem glukoze/glikogena Strjevanje krvi
Holangiocite/ celice žolčevoda	Epitelij voda	~ 3 % celične populacije jeter Oblikujejo žolčevod za prenos žolča Nadzorujejo pretok žolča Izločajo vodo in bikarbonate Nadzorujejo pH žolča
Endotelijske celice	Vaskulatura (povezovalne žile)	Oblikujejo vene, arterije, venule in arteriole Nadzorujejo pretok krvi Sodelujejo pri parenhimski conaciji
Jetrne sinusoidalne endotelijske celice	Sinusoide	~ 2,5 % lobulnega parenhima Oblikujejo sinusoidalni pleksus za olajšano kroženje krvi Visoko specializirane Omogočajo prenos molekul in proteinov med serumom in hepatocitami Odstranjevalci makromolekularnih odpadkov Izločanje citokinov Predstavitev antigenov in strjevanje krvi
Celice Pit	Naravne celice ubijalke jeter	Redke Citotoksična aktivnost
Kupfferjeve celice	Sinusoide	~ 2 % jeter Pritrjeni jetrni makrofagi, ki s fagocitozno aktivnostjo odstranjujejo tuje molekule Izločajo citokine in proteaze
Jetrne stelatne celice	Perisinusoidalni oz. Dissejev prostor	~ 1,4 % jetrnih celic Vzdržujejo ekstracelularni matriks, shranjujejo vitamin A in retinol Vzdržujejo mikrovaskularni tonus Aktivirane postanejo miofibroblasti Sodelujejo pri regeneraciji jeter Izločajo citokine

2.2.3 Funkcije jeter

Jetra imajo endokrino in eksokrino funkcijo. Endokrina funkcija je izločanje hormonov, kot so inzulinu podobni rastni faktorji, angiotensinogen in trombopoietin. Glavna eksokrina funkcija pa je tvorba in izločanje žolča (Si-Tayeb in sod., 2010). Kri iz črevesja v jetra dovaja snovi, ki jih nadalje procesirajo in shranjujejo. Z odzivom na hormonske in živčne stimule sprostijo snovi ali njihove metabolite nazaj v obtok. Jetra s sodelovanjem v metabolizmu ogljikovih hidratov, proteinov in lipidov uravnavajo zaloge in koriščenje energijskega substrata. Z odzivom na hormona trebušne slinavke, inzulin in glukagon jetra pomagajo vzdrževati nivo krvnega sladkorja, saj je glukoza vir celične energije in mora biti stalno prisotna v krvi. Energijsko bogati substrat skladiščijo v obliki glikogena, odvečnega pa pretvorijo v trigliceride, ki se prenesejo in uskladiščijo v maščobno tkivo. Jetra so mesto katabolizma aminokislin in sinteze sečnine. V njih poteka tudi sinteza plazemskih proteinov (albumin, α - in β - globulin, faktorji strjevanja krvi) in prenašalnih proteinov, ki sodelujejo v homeostatskih procesih (regulacija strjevanja krvi in hemostaza, transport ter uravnavanje koncentracije kalcijevih in magnezijevih ionov, bilirubina, maščobnih kislin ter hormonov), (Cramp, 2003). Hepatocite lahko sintetizirajo *de novo* holesterol iz acetata ali pa ga privzamejo preko plazemskih lipoproteinov iz hrane ali perifernih tkiv (Accad in Farese, 1998). Iz holesterola sintetizirajo žolčne kisline, ki jih izločajo v črevesje, kjer razbijajo maščobe na manjše kapljice in tako omogočijo njihovo absorpcijo. V jetrih poteka tudi metabolna transformacija in detoksifikacija endogenih (bilirubin, amoniak in tiroidni, steroidni ter drugi hormoni) ter tujih eksogenih (zdravila, okoljske komponente) snovi (Cramp, 2003; Underhill in sod., 2007).

2.2.3.1 Vloga jeter v metabolizmu holesterola in žolčnih kislin

Jetra imajo pomembno vlogo pri metabolizmu holesterola v telesu. So glavno mesto endogene sinteze holesterola, preko lipoproteinskih delcev pa sprejemajo tudi eksogeni holesterol, pridobljen iz hrane in ekstrahepatičnih tkiv. Jetra so edini organ, ki lahko holesterol, preko žolčnih kislin, izločijo iz telesa in ga z reabsorpcijo v črevesju ponovno sprejmejo v telo.

Negativna povratna zanka sintezne poti holesterola in nadzor deleža receptorjev na membrani preprečujeta nalaganje odvečnega holesterola v celici. Nekaj holesterola se iz jetrnih celic izloči z delci VLDL, ki prenesejo trigliceride do maščobnega tkiva. Po odstranitvi trigliceridov se pretvorijo v delce LDL, ki jih na hepatocitah prepoznavajo in vežejo LDLR (slika 3). V jetrih se iz holesterola sintetizirajo primarne žolčne in holinske kisline, ki z dodatkom aminokislin taurina ali glicina tvorijo žolčne soli ter se izločajo v žolčne kanikule in v dvanajsternik (Cramp, 2003).

Ni še povsem znano, zakaj poteka sinteza holesterola s kroženjem intermediatov med peroksisomi, citosolom in ER (Liscum, 2008). Ker so jetra pomembna za uravnavanje holesterola, pa specifična vloga vseh encimov (npr. SC5D) biosinteze holesterola (Horvat in sod., 2011) in vloge nekaterih posameznih encimov (npr. NPC1) z elementi SRE, ki sodelujejo pri homeostazi holesterola (Liscum, 2008), še niso natančno definirane. Za razvoj novih zdravil, ki bi zniževala raven povišanega holesterola brez stranskih učinkov, je potrebno najprej ugotoviti vlogo biosinteze holesterola in kopičenje intermediatov, ki nastanejo z blokado določenega encima na odraslo osebo. Holesterolne gene pri odraslih miših je možno preučevati z metodo pogojnega izbitja, ki zarodku omogočijo normalen razvoj (Horvat in sod., 2011).

2.3 CYP51

Družina CYP51 spada v naddružino CYP in jo je mogoče zaslediti pri prokariontih in evkariontih (Rozman in sod., 1996; Debeljak in sod., 2000). Prisotna je pri živalih, rastlinah, kvasovkah/glivah in pri nekaterih protozoah in bakterijah (Debeljak in sod., 2003), insekti in črvi pa je nimajo (Lepesheva in Waterman, 2011). Posamezni geni, ki kodirajo proteine CYP označuje nomenklatura: splošna oznaka CYP, številka družine, črka poddružine in številka proteina. Humani gen s simbolom *CYP51A1* se imenuje »citokrom P450, družina 51, poddružina A, polipeptid 1«, njegov produkt CYP51A1 pa lanosterol-14 α -demetilaza (Hugo Gene ..., 2013).

2.3.1 Značilnosti CYP

Naddružino CYP sestavljajo monooksigenaze s prostetično skupino hem (tetrapirolov obroč z vezanim železovim ionom). Encimi CYP s hemom in s pomočjo NADPH ter kisika katalizirajo oksidativne transformacije različnih kemijskih komponent. Humani CYP sodelujejo v metabolizmu zdravil, detoksifikaciji in odstranjevanju okoljskih onesnaževalcev ter drugih ksenobiotikov, biosintezi steroidnih hormonov, oksidaciji nenasičenih maščobnih kislin in v metabolizmu, v maščobi topnih vitaminov. Pri ljudeh se CYP nahajajo v večini organov (jetra, ledvice, pljuča, nadledvična žleza, spolne žleze, možgani itd.), vendar je izražanje tipa družine tkivno specifično in odvisno od fizioloških funkcij. Celično izražanje mnogih CYP je regulirano s prepisovalnimi dejavniki, ki jih aktivirajo različne spojine. Sesalski encimi CYP se, vezani na membrano, nahajajo v različnih celičnih predelih. Večina so mikrosomalni encimi ER ali pa se nahajajo v notranji membrani mitohondrija. Zaznali pa so jih tudi na zunanji strani jedrne membrane, v različnih predelih GA, peroksisomih in celični membrani (Seliskar in Rozman, 2007; Hasler in sod., 1999).

Preko 10000 poznanih proteinov CYP je, glede na ohranjenost zaporedja aminokislin, razvrščenih v družine in poddružine. Znotraj posamezne družine je ujemanje zaporedij aminokislin najmanj 40 %, znotraj poddružine pa najmanj 55 % (Lepesheva in Waterman, 2011). Število CYP se med različnimi vrstami razlikuje. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* jih vsebuje 3, gliva *Neurospora crassa* 38, *Caenorhabditis elegans* 74, človek 57, miš 102, mnoge rastlinske vrste pa nekaj 100 (Seliskar in Rozman, 2007).

2.3.2 Zgradba in izražanje gena *CYP51*

Gen *CYP51* so prvič opisali v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*, od koder je dobil tudi svoje ime (Debeljak in sod., 2003). Geni *CYP51* so dobro opisani v petih sesalskih vrstah: človek (simbol gena *CYP51A1*), miš (simbol *Cyp51*), podgana (simbol *Cyp51*), prašič in govedo (simbol *CYP51A1*), (Seliskar in Rozman, 2007).

Osnovna struktura genov (organizacija intronov in eksonov) družin CYP je dobro ohranjena, kar pa ne velja za družino CYP51, čeprav je razširjena med različnimi biološkimi kraljestvi. Vse funkcionalne sesalske gene *CYP51* sestavlja 10 eksonov in 9 intronov. Kvasovke in bakterije v genih *CYP51* ne vsebujejo intronov, medtem ko jih imajo filamentozne glive do tri. Gen *CYP51 Arabidopsis thaliana* vsebuje en intron. Funkcionalen humani gen *CYP51A1* leži na kromosomu 7 (natančneje na 7q21-22) z dolžino zaporedja 22 kb in 1527 bp dolgim odprtim bralnim okvirjem. Do prevajanja zaporedja lahko pride na dveh različnih mestih, kar tvori proteina CYP51 s 503 ali 509 aminokislinami. V somatskih celicah je prepis (mRNA) CYP51 dolg 3,8 kb, v testisih pa 2,0 kb. Na humanih kromosomih 3 in 13 ležita še nekodirajoča brezintronska pseudogena, citokrom P450, družina 51, psevdogen 1 (*CYP51P1* – angl.: *cytochrome P450, family 51, pseudogene 1*) in citokrom P450, družina 51, psevdogen 2 (*CYP51P2*), do katerih lahko pride, če je gen gospodinjske narave ali če se močno izraža v zarodnih celicah. Mišji gen *Cyp51* leži na kromosomu 5 blizu centromere v regiji A2. Gen *Cyp51* obsega 23 kb in je razdeljen v 10 eksonov. V somatskih celicah sta prisotna dva prepisa (mRNA) *Cyp51*, v modih samcev pa vsaj eden krajši. Genom miši nima pseudgenov gena *Cyp51* (Debeljak in sod., 2003).

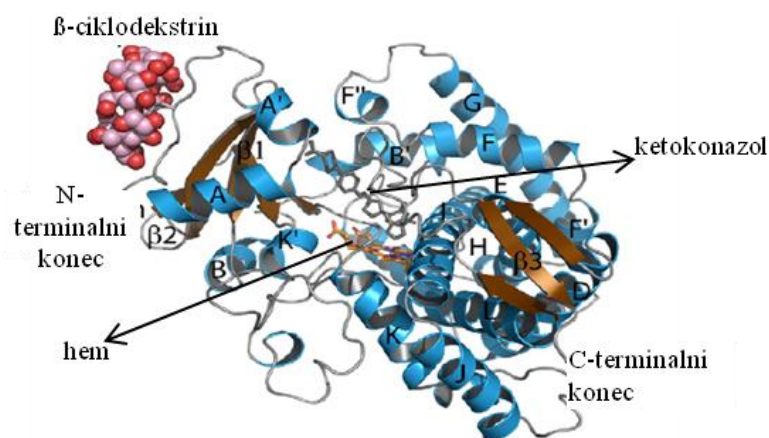
Promotor sesalskega gena *CYP51* vsebuje visok delež baznih parov GC, ki so zgoščeni v otočke CpG. Na tem mestu je olajšana vezava prepisovalnih dejavnikov na promotor, ker citozini v otočkih CpG niso metilirani. Promotor ne vsebuje zaporedij TATA in CAAT, zato so začetna mesta prepisovanja na različnih mestih otočka CpG. Vse to dokazuje na gospodinjski tip promotorja gena *CYP51*, saj se njegova začetna mesta prepisovanja med tkivi razlikujejo, s čimer en promotor v različnih tkivih nadzoruje različno prepisovanje gena. V 5'-koncu sesalskih genov *CYP51* se nahaja več ohranjenih vezavnih mest za različne prepisovalne dejavnike: škatla GC, zaporedje CRE, zaporedje SRE (Rozman in sod., 1996; Debeljak in sod., 2003) in zaporedje LXRE (Wang in sod., 2008).

2.3.2.1 Reguliranje izražanja gena *CYP51*

Zaradi različnih vlog encima CYP51 v somatskih in spolnih celicah je njegovo uravnavanje aktivnosti tkivno specifično (Seliskar in Rozman, 2007). Prepisovanje gena *Cyp51* v somatskih celicah se uravnava predvsem z negativno holesterolno povratno zanko, v katero so vključeni proteini SREBP2 (sliki 5 in 6). Njihova vezava na zaporedja SRE vodi v prepisovanje vseh znanih genov, ki kodirajo encime biosintezne poti holesterola. V razmerah s povišano vsebnostjo holesterola ni vezave SREBP na mesta SRE zato nivo (mRNA) *Cyp51* upade (Debeljak in sod., 2003). Oksisteroli se vežejo in aktivirajo LXR, ki z vezavo na zaporedja LXRE (slika 6) v promotorjih genov *Cyp51* in *Fdft1* zavirajo njihovo prepisovanje (Wang in sod., 2008). S celičnimi kulturami je bilo ugotovljeno, da se lahko gen *Cyp51* odzove tudi na nesterolne signale. Dodatek forskolina je sprožil cAMP signalno pot (slika 7), kar je vodilo v hiter odziv gena *Cyp51*, saj se je raven (mRNA) CYP51 v dveh urah zvišala za 4-kratno vrednost. Zabeležili so padec vsebnosti lanosterola, substrata encima CYP51. To je bil prvi opisan gen za tvorbo holesterola z lastnostjo gena IEG (Fink in sod., 2005). V spolnih celicah se prepisovanje gena *Cyp51* uravnava predvsem s CREM τ , ki se v promotorju veže na zaporedja CRE (Debeljak in sod., 2000).

2.3.3 Protein CYP51

Med več kot 180 poznanimi sterol 14 α -demetilazami je enakost primarnega zaporedja aminokislin med različnimi kraljestvi med 22–30 %. Znotraj kraljestev je podobnost višja in je odvisna od evolucijske oddaljenosti primerjalnih skupin (Lepesheva in Waterman, 2011). Enakost amionokislinska zaporedja proteina CYP51 med mišjo in podgano znaša 96 %, med mišjo in človekom pa 91 % (Debeljak in sod., 2000). Kljub nizki enakosti primarnih zaporedij aminokislin članov družine CYP51 med različnimi biološkimi kraljestvi pa imajo višjo stopnjo ohranjenosti na sekundarnih in terciarnih strukturnih stopnjah proteinov (Lepesheva in Waterman, 2011).



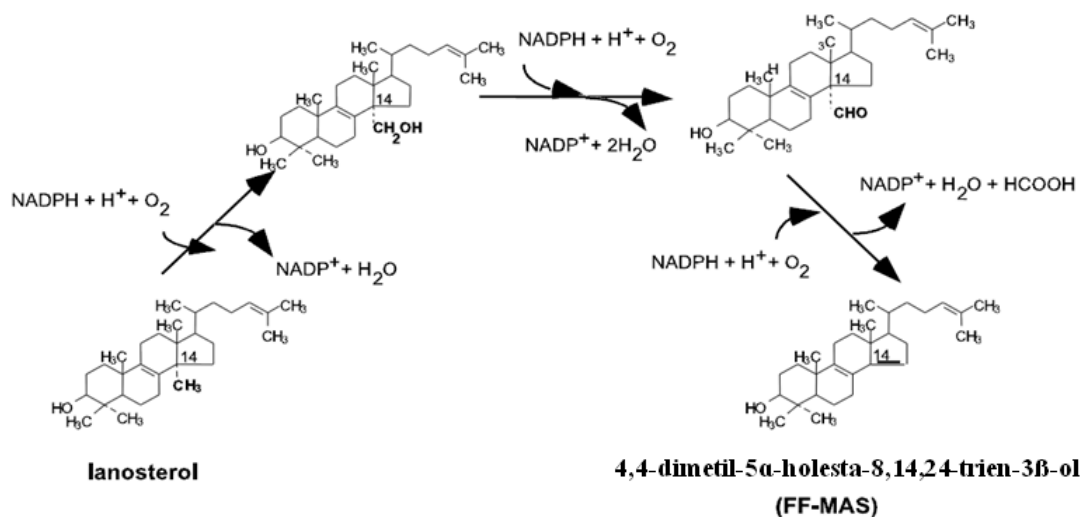
Slika 10: Tridimenzionalna struktura humanega proteina CYP51A1 z azolnim protiglivnim agentom (ketokonazol) nad ravnino hema (Strushkevich in sod., 2010: 1071)

Slika 10 prikazuje tridimenzionalno zvitje humanega CYP51A1, ki je tipično za proteine CYP z dobro ohranjeno strukturo jedra, kjer alfa vijačnice E, I, J, K in L obdajajo hem. Krogličast β -ciklodekstrin iz ogljika in kisika (roza in rdeča barva) posnema vezavo CYP na membrano. Alfa vijačnice in beta ravnine so označene z modro in rjavo, hem pa z oranžno barvo. Obročast azol (ketokonazol) je označen s sivo (Strushkevich in sod., 2010).

CYP51 katalizira oksidativno odstranitev 14α -metilne skupine (C32) iz lanosterola in 24-metilen-24,25-dihidrolanosterola pri kvasovkah in glivah, iz obtusifoliola pri rastlinah ter iz lanosterola in 24,25-dihidrolanosterola pri sesalcih, kar omogoča nadaljnjo biosintezo sterolov. Steroli, ki nastanejo po odstranitvi 14α -metilne skupine, so ergosterol pri glivah, fitosterol pri rastlinah in holesterol pri živalih (Debeljak in sod., 2003). Vse tri komponente so pomembne pri tvorbi celičnih membran, pri ljudeh in živalih pa je holesterol nujen tudi pri sintezi glukokortikoidov, mineralokortikoidov, spolnih hormonov, žolčnih kislin in tvorbi oksisterolov (Lepesheva in Waterman, 2011).

Pri sesalcih se encim CYP51 izraža z najvišjo stopnjo v testisih, jajčnikih, nadledvični žlezi, prostati, jetrih, ledvicah in pljuči (Hasler in sod., 1999; Seliskar in Rozman, 2007). CYP51 ima dve fiziološki vlogi. Pri prvi sodeluje v postskvalenskem delu *de novo* biosinteze holesterola, kjer pretvarja lanosterol in 24,25-dihidrolanosterol v 4,4-dimetil-5 α -holesta-8,14,24-trien-3 β -ol ali krajše FF-MAS, ki se dalje pretvori do holesterola. CYP51 pri prenosu elektronov potrebuje redoks partnerja in sicer encim POR. Vsak korak monooksigenacije zahteva molekulo kisika in molekulo reduciranega nikotinamid-adenin-

dinukleotid-fosfata (NADPH), od koder izhajajo elektroni. Demetilacija substrata poteka v treh zaporednih monooksigenacijskih korakih (slika 11) brez sprostitve vmesnih intermediatov. V prvem koraku se C32-metilna skupina pretvori v alkoholno skupino, v drugem koraku v aldehydno, v tretjem pa se odcepi kot metanojska kislina (Debeljak in sod., 2003).



Oksidativni intermedianti na C14 so označeni s poudarjeno črno

Slika 11: Shema pretvorbe lanosterola v FF-MAS z encimoma CYP51 in POR (Debeljak in sod., 2003: 161)

Druga vloga encima CYP51 pri sesalcih pa je povezana z zorenjem spolnih celic. V moških spolnih celicah encim CYP51 ni pripet na ER, ampak potuje preko GA do akrosomov, kjer ostane več tednov. Tudi POR se izraža na membranah akrosomov. V spolnih celicah vloga sintetiziranih FF-MAS in T-MAS (angl.: *testis meiosis-activating sterol*) ni povezana z biosintezo holesterola. V somatskih celicah sta FF-MAS in T-MAS kratko živeča intermedianti, ki se pretvorita do holesterola, medtem ko se v spolnih celicah nalagata in domnevno sodelujeta v spermatogenezi ter pri zorenju oocit (Debeljak in sod., 2003; Seliskar in Rozman, 2007).

2.3.4 Oviranje aktivnosti encima CYP51

Oviranje aktivnosti encima CYP51 s specifičnimi zaviralci pri sesalcih povzroči upad *de novo* biosinteze holesterola. Pri glivah pa oviranje encima CYP51 vodi v upad *de novo* biosinteze ergosterola, kar vodi v kopičenje metiliranih sterolnih prekurzorjev ergosterola

in posledične poškodbe membrane glive, s čimer je ovirana njena rast (Rozman in sod., 1996). Za zdravljenje glivnih infekcij rastlin, živali in ljudi se uporabljajo azolna zdravila, ki so učinkovita tudi pri oviranju biosinteze sterolov nekaterih patogenih protozoj (Strushkevich in sod., 2010). Za oviranje aktivnosti encima CYP51 se pri različnih vrstah gliv uporabljajo različni azoli in so ena od glavnih antimikotnih skupin zdravil na trgu (Horvat in sod., 2011). Azoli se s heterocikličnim dušikom vežejo na železov atom v hemu (slika 10) in tako ovirajo aktivnost encima CYP51, ki posledično slabše veže in metabolizira substrat (Lepesheva in Waterman, 2007). Dolgotrajna uporaba azolov lahko vodi v razvoj odpornosti patogena na zdravilo ali pa zavira delovanje tudi humanega encima CYP51A1 in drugih encimov naddružine CYP (Strushkevich in sod., 2010). Na nivoju aminokislinskega zaporedja encima CYP51 znaša enakost med sesalcem in glivo 38–42 % (Rozman in sod., 1996). Zaradi višje afinitete azolov po vezavi na glivni encim CYP51 so stranski učinki na biosintezo in metabolizem holesterola pri pacientih s sistemsko kandidozo redki.

Zaradi vloge v biosintezi holesterola je humani encim CYP51A1 tudi tarča razvoja novih hipolipidemičnih zdravil (Horvat in sod., 2011). Trenutno zniževanje vsebnosti holesterola poteka z zaviranjem aktivnosti encima HMGCR, ki ga narekujejo statini, kar pa lahko povzroči pomanjkanje ubikinona v krvi. Prizadeta je lahko tudi sinteza izoprenoidov, ki nastanejo iz farnezil-PP v mevalonatni poti, ki je del biosintezne poti holesterola (Korošec in sod., 2008). Oviranje CYP51A1 vodi v nalaganje dveh sterolnih prekurzorjev, lanosterola in 24,25-dihidrolanosterola, ki na mestu C4 sterolnega obroča vsebujeta dve metilni skupini. Ni še znano, ali se lahko oba sterolna prekurzorja pretvorita do žolčnih kislin in izločita iz telesa (Horvat in sod., 2011). Zaviralci humanega CYP51A1 so: azalanstat; derivati lanosterola; dvojni zaviralci, ki ovirajo glikogen fosforilazo in CYP51A1 (Strushkevich in sod., 2010); ter derivati piridiletanol-(feniletil)-aminov, ki z vezavo piridina na hem zavirajo biosintezo holesterola v post-lanosterolnem delu poti (Korošec in sod., 2008).

2.4 CILJNO IZBITJE GENOV

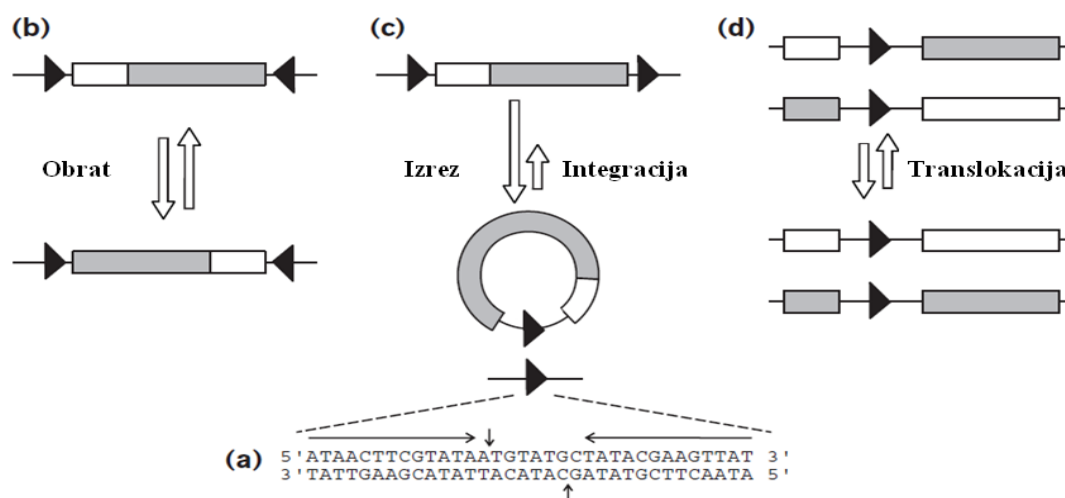
Gensko ciljanje je metoda vstavljanja specifičnega zaporedja DNA s homologno rekombinacijo v embrionalne matične (ES – angl.: *embryonic stem*) celice, kar omogoča tvorbo mišjih modelov z izbitimi geni (angl.: *knockout mice*), (Branda in Dymecki, 2004). ES celice izhajajo iz notranje celične mase blastociste, iz katere se razvije zarodek. V ustreznih pogojih gojenja *in vitro* ES celice obdržijo svojo pluripotentnost in nediferencirano stanje ter po ponovnem injiciranju v blastocisto in prenosu zarodkov v nadomestno mater zopet naselijo zarodek ter tvorijo himerno miš. Preko himerne zarodne linije se genetske spremembe prenesejo na potomce (Koentgen in sod., 2010). Tehnologija genskega izbitja (angl.: *gene knockout technology*) omogoča tvorbo mišjih modelov in posledično preučevanje vloge genskega produkta v *in vivo* pogojih pri normalnem razvoju organizma ali pri bolezenskih stanjih, ki jih izzovejo mutacije ali okvare ciljnih genov. Tehnologija se rutinsko uporablja za izbitje genov v genomu miši (*Mus musculus*), kjer so na voljo pluripotentne ES celice in se po prenosu v blastocisto ponovno vgradijo v notranjo celično maso. Miši so ustrezne tudi zaradi kratkega generacijskega časa, imajo veliko potomcev, zmanjšane genetske variabilnosti (inbridirane linije) ter visoke homologije z večino humanih bioloških procesov (Galli-Taliadoros in sod., 1995). Zaradi esencialnih funkcij mnogih genov lahko njihovo celotno utišanje povzroči smrt že v zgodnjem embrionalnem razvoju, kar onemogoča preučevanje njihovih funkcij v kasnejših stopnjah razvoja živali. Za preučevanje vloge gena le v specifičnih tkivih ali celičnem tipu in/ali ob določenem času življenja živali je tako potrebno tvoriti miši s pogojnim ciljnim izbitjem gena, kar se doseže z uporabo mestno in/ali časovno specifičnega rekombinaznega sistema Cre/lox ter Flp/FRT (Koentgen in sod., 2010).

2.4.1 Sistem Cre/lox

Sistem Cre/lox izvira iz bakteriofaga P1, ki mu omogoča vgraditev in izrez lastnega genoma v genom gostiteljske bakterije (Abremski in Hoess, 1984). Cre (angl.: *Cyclization recombination*) je 38 kDa mestno specifična rekombinaza, ki spada v družino integras, kamor spada tudi rekombinaza Flp *Saccharomyces cerevisiae* (Gibb in sod., 2010).

Rekombinazi imata podobno tridimenzionalno strukturo in ohranjene katalitične regije (Gorman in Bullock, 2000). Cre za svoje delovanje potrebuje prepoznavna mesta zaporedij *lox* (angl.: *locus of crossingover*). Zaporedje mesta *lox* je dolgo 34 bp in ga sestavlja zaporedji dveh obrnjenih 13 bp dolgih ponovitev ter osrednje 8 bp dolgo zaporedje, katero narekuje usmerjenost mesta *lox* (vodoravni puščici na sliki 12 a). Cre prepozna in se veže na mesta *lox* ter katalizira specifično rekombinacijo med dvema mestoma *lox* (Abremski in Hoess, 1984; Nagy, 2000).

Rekombinaza Cre lahko izvede izmenjavo verig v vsakem zaporedju DNA, tudi v evkariontski celici, če ima predhodno vnesena prepoznavna mesta *lox* (Sauer in Henderson, 1988). Za svoje delovanje ne potrebuje dodatnih proteinov, kofaktorjev ali substratov. Sistem Cre/*lox* je pomembno orodje pri spreminjanju genoma miši in preučevanju izražanja genov v pogojih *in vivo* (Gibb in sod., 2010; Ghosh in Van Duyne, 2002). Za naključno tvorbo specifičnega 34 bp dolgega zaporedja je potrebne 10^{18} bp DNA. Celotni sesalski genom je velik 3×10^9 bp, zato lahko zaporedje *lox* v genom sesalcev pride le z umetno vstavitvijo. Rezultat rekombinacije z rekombinazo Cre je odvisen od kombinacije usmeritve in lokalizacije mest *lox* (črni trikotniki na sliki 12). Dvosmerno cepitev, ki jo povzroča Cre nakazujejo navpične bele puščice na sliki 12. Če se na isti molekuli DNA mesti *lox* nahajata v nasprotni smeri (slika 12 b), bo delovanje rekombinaze Cre povzročilo obrat vmesnega odseka DNA, medtem ko bo pri istosmerni legi mest *lox* (slika 12 c) prišlo do izreza odseka (krožni produkt). Po končani reakciji ostane v zaporedju enojno mesto *lox*. Če se mesta *lox* nahajajo na različnih molekulah DNA, lahko pride do (slika 12 c) vgraditve ene DNA v drugo ali do translokacije (slika 12 d) med dvema kromosomoma. Po istem sistemu deluje tudi rekombinazni sistem Flp/FRT. Rekombinaza Flp izreže vmesno zaporedje med dvema 34 bp dolgima prepoznavnima mestoma FRT (Nagy, 2000).



Slika 12: Mestno-specifičen rekombinacijski sistem Cre/lox (Metzger in Feil, 1999: 470)

Uporaba sistemov Cre/lox in/ali Flp/FRT prepreči smrt mišjih zarodkov, saj sistem omogoča pogojno izbitje ciljnega gena le v specifičnem tkivu ali celičnem tipu in/ali ob specifičnem časovno-razvojnem obdobju, drugod pa je gen funkcionalen. Za tvorbo mišjega modela s pogojno izbitim genom je potrebno ustvariti dve mišji liniji. Prva linija ima preiskovani odsek gena, obdan s parom enako usmerjenih mest lox, druga linija pa ima vstavljen transgeni zapis s promotorjem, ki se izraža v specifičnem tkivu ali celičnem tipu in/ali ob določenem časovno-razvojnem obdobju, kateremu sledi zapis za rekombinazo Cre. S serijo križanj obeh linij se tvorijo potomci, ki vsebujejo transgeni zapis rekombinaze Cre in mesta lox, ki obdajajo preiskovani odsek ciljnega gena v celotnem genomu. Le v celicah, kjer poteka sinteza mestno specifične rekombinaze Cre, pride do prepoznavanja in vezave rekombinaze Cre na mesta lox, kar vodi v izrez osrednjega zaporedja iz genoma ter posledično izbitje gena. Celično ali tkivno in/ali časovno izbitje gena je odvisno od promotorja, ki uravnava prepisovanje rekombinaze Cre. V preostalih celicah, kjer ne pride do prepisovanja rekombinaze Cre, je delovanje ciljnega gena neovirano (Galli-Taliadoros in sod., 1995; Nagy, 2000).

Veliko humanih bolezni (npr. rak) se razvije iz genetskih dogodkov, ki se zgodijo v določenem tkivu na določeni stopnji razvoja ali kasneje v življenju. Modeliranje takšnih pogojev poteka s kombinacijo pogojnega genskega ciljanja in tkivno-specifičnega izražanja Cre, čigar aktivnost nadzoruje dodajanje netoksične spojine (Koentgen in sod., 2010). Uravnavanje časovne aktivnosti Cre lahko poteka z ustreznimi inducibilnimi

promotorji ali pa s kompleksi, kjer sta vezana ligand in Cre (Metzger in Feil, 1999). Inducibilni promotorji omogočijo izražanje rekombinaze Cre, tako da se odzovejo na dodajanje različnih spojin (npr. tetraciklin ali interferon), kompleks Cre/ligand pa se sprosti ob dodatku sintetične spojine (npr. tamoksifen), ki povrne rekombinazi Cre aktivnost. Za tvorbo mutacije v določenem času lahko rekombinazo Cre v celico dostavijo tudi virusi (Tronche in sod., 2002). Mesto in čas izražanja Cre je nadzorovano z mestom in s časom injiciranja virusov (Nagy, 2000).

Dvojne linije miši imajo več možnosti uporabe. Lahko se križa ena linija miši s specifično vstavljenimi mesti *lox* z linijami miši, ki nosijo zapis rekombinaze Cre pod različnimi promotorji, kar omogoča preučevanje funkcije gena v različnih celičnih tipih (Galli-Taliadoros in sod., 1995). Lahko pa se križa linija miši s specifičnim izražanjem rekombinaze Cre z linijami miši, ki imajo vstavljena mesta *lox* v različne odseke DNA, s čimer je možno preučevati funkcije različnih genov v specifičnem tipu celic (Branda in Dymecki, 2004).

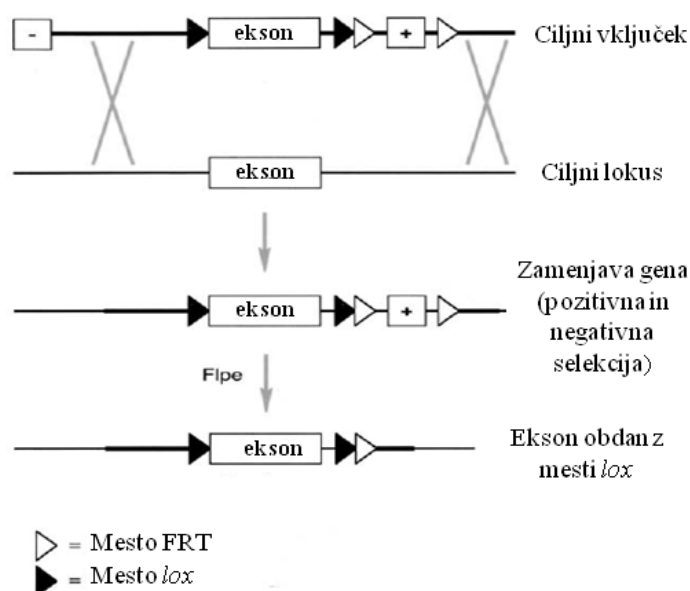
2.4.2 Manipulacija mišjega genoma

Za diplomsko nalogo smo preverjali učinkovitost izreza gena *Cyp51*, ki ga je v jetrih narekovala rekombinaza Cre. Za pogojno izbitje mišjega gena *Cyp51* v jetrih sta se uporabili kombinaciji dveh strategij. Prva je bila mikroinjiciranje transgenega zapisa rekombinaze Cre v pronukleus za pripravo mišje linije albumin-Cre. V genomu pridobljenih miši je prepisovanje zapisa rekombinaze Cre narekoval albuminski promotor z visoko stopnjo izražanja v hepatocitah (Postic in sod., 1999). Druga strategija pa je bila gensko ciljanje mest *lox* v gen *Cyp51* za pripravo miši *Cyp51^{lox}* (Keber in sod., 2011).

2.4.2.1 Tvorba miši z izbitim genom

Vsako ciljanje genov se začne z načrtovanjem in razvojem ciljnega vključka (slika 13), ki je sestavljen iz dveh homolognih ročic, pozitivne in negativne selekcijske kasete ter iz dveh prepoznavnih mest *lox* in FRT za rekombinazo Cre in Flp (Koentgen in sod., 2010).

Na sliki 13 poudarjene črne črte v ciljnem vključku predstavljajo homologne ročice, ki se ujemajo s ciljnim lokusom v ES celicah. Simbol + označuje pozitivno (npr. neomicinska, *neo*), simbol - pa negativno (npr. timidin kinaza, TK) selekcijsko kaseto. Simbola X predstavljata mesti homologne rekombinacije. Homologni ročici sta identični ciljni regiji v mišji DNA. Mesti FRT obdajata pozitivno selekcijsko kaseto, ki se nahaja v intronu homologne regije vključka. Negativna selekcijska kaseto se nahaja izven homologne regije. Obe selekcijski kaseti vsebujeta še vsaka svoj promotor, ki sta aktivna v ES celicah in poliadenilacijski signal. Mesti *lox* se nahajata v intronih in obdajata ciljni ekson/-e. Ciljanje gena običajno poteka z elektroporacijo vključka v pluripotentne ES celice linije 129Sv (Galli-Taliadoros in sod., 1995).



Slika 13: Shema odstranitve pozitivne selekcijske kasete s sistemom Flp/FRT (Branda in Dymecki, 2004: 15)

Homologni ročici, po transfekciji, vodita vključek do mesta ujemanja v genomu mišjih ES celic, kjer izvedeta homologno rekombinacijo, s čimer se zaporedje homologne regije vključka, skupaj s pozitivno selekcijsko kaseto, vstavi v endogeni gen ES celic. Negativna selekcijska kaseto leži izven homologne regije vključka, zato se s homologno rekombinacijo ne vstavi v genom (Koentgen in sod., 2010). Po vgraditvi vključka sledi dvojna selekcija, pozitivna in negativna. Pozitivna selekcijska kaseto kodira odpornost na genotocin pri *neo* kaseti, negativna selekcijska kaseto pa ob dodatku ganciklovirja pri TK kaseti tvori toksične intermediate in povzroči smrt celice. ES celice, ki so vključek sprejele s homologno rekombinacijo, vsebujejo le pozitivno selekcijsko kaseto *neo* in jim dodatek

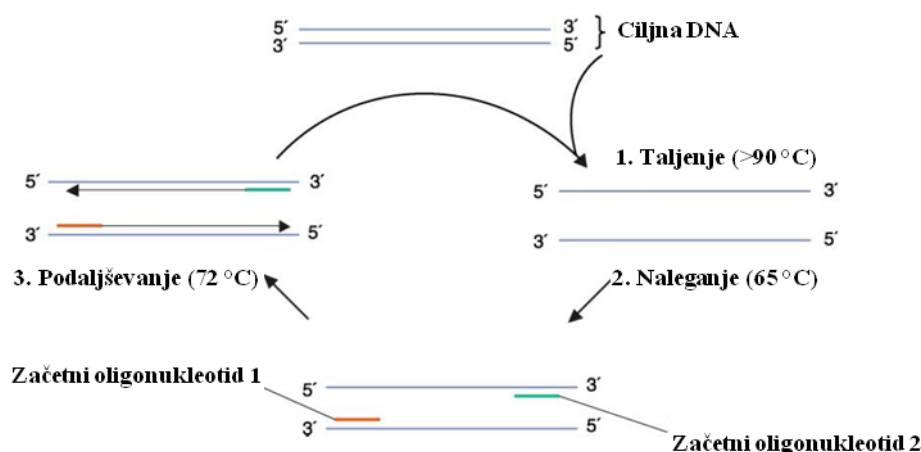
geneticina in ganciklovirja ne škodi. ES celice z naključno vgrajenim vključkom pa, kljub odpornosti na geneticin, propadejo zaradi preobčutljivosti na ganciklovir (Galli-Taliadoros in sod., 1995).

Po opravljeni selekciji ES celic je potrebno pozitivno selekcijsko kaseto odstraniti iz genoma, saj lahko njeni močni regulatorni prepisovalni elementi utišajo ali motijo izražanje sosednjih genov, kar lahko vpliva na interpetacijo fenotipa (Koentgen in sod., 2010). V ta namen se uporablja strategija z dodatnim sistemom Flp/FRT (Nagy, 2000). Rekombinaza Flp katalizira izrez pozitivne selekcijske kasete, ki se nahaja med mestoma FRT. Reakcija lahko poteka v pogojih *in vitro* ali *in vivo* in tvori pogojni alel z dvema mestoma *lox* in enojnim mestom FRT v intronih ciljnega gena, s čimer se ohrani njegova funkcionalnost (Branda in Dymecki, 2004; Koentgen in sod., 2010). Selekcionirane celice se injicirajo v nadomestne blastociste, iz katerih se razvijejo himerne miši. Postopek je tehnično zahteven zaradi uporabe mikromanipulatorja, kjer mikropipeta fiksira prejemno blastocisto, injekcijska pipeta pa predre njeno zunanjo plast in spusti ES celice v blastocel, ki se vgradijo v notranjo celično maso blastociste. Drugi način priprave gensko spremenjenih živali iz matičnih celic je priprava agregacijskih himer, ki vključuje: zbiranje osemceličnih zarodkov; odstranitev glikoproteinske ovojnice (*zona pelucida*), ki obdaja zarodek; agregacija pridobljenih »goli«^h zarodkov z ES celicami (sokultura) ali vgnezditev skupka ES celic z »golim«^h zarodkom v mikrojamicah; gojenje do stopnje blastociste; in končen prenos zarodkov v psevdobreje nadomestne samice. Pridobljene himerne miši z mesti *lox*, ki obdajajo ciljni ekson gena, se gojijo do homozigotnih potomcev s popolnoma funkcionalnim ciljnim genom. Nadaljnjo križanje z mišmi, ki pod želenim promotorjem izražajo zapis rekombinaze Cre, pa tvori potomce s ciljnim izbitjem gena (Galli-Taliadoros in sod., 1995) v specifičnem tkivu ali celični liniji ali/in ob določenem časovno-razvojnem obdobju (Zhu in sod., 2006). Čeprav večanje vmesnega zaporedja med mesti *lox* manjša učinkovitost Cre rekombinacije, se lahko *in vivo* izreže odsek DNA velikosti več kot 4 Mb (Tronche in sod., 2002).

2.5 DOLOČANJE STOPNJE IZREZA CILJNEGA GENA V TKIVU

2.5.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR – angl.: *polymerase chain reaction*)

PCR je metoda, ki jo leta 1983 odkril Kary Mullis in omogoča *in vitro* sintezo nukleinskih kislin, s katero je možno pomnožiti milijone kopij določenega odseka zaporedja DNA. Za izvedbo reakcije PCR so potrebni sintetični začetni oligonukleotidi, DNA polimeraza, nukleotidne baze, magnezijevi ioni (Mg^{2+}), reakcijski pufer in ciklični termostat (aparatura, ki spreminja in nadzoruje temperaturo reakcijske mešanice, v kateri se izvaja PCR). Za podaljševanje verige DNA se običajno uporablja termo stabilna polimeraza *Taq*, ki izvira iz bakterije *Thermus aquaticus*. Reakcija pomnoževanja poteka ciklično, vsak cikel pa je sestavljen iz treh korakov (slika 14). V prvem koraku se izvede vročinska denaturacija DNA pri temperaturi $\sim 90^\circ C$. V drugem koraku se zniža temperatura na $\sim 65^\circ C$, kjer poteka naleganje kratkih enoverižnih začetnih oligonukleotidov na enoverižne matrične DNA in vezava polimeraze na njihove 3'-konce. V tretjem koraku se s povišanjem temperature na $\sim 75^\circ C$ aktivira polimeraza, ki pomnoži komplementarne verige od začetka začetnih oligonukleotidov do konca matrice in tako tvori dvoverižno DNA. Dolžino pomnožka PCR določa specifičen par začetnih oligonukleotidov.



Slika 14: Cikel PCR (Brownstein, 2004: 209)

Za zagon reakcije PCR mora reakcijska mešanica vsebovati dovolj reagentov, z izjemo matrične DNA, ki omogočijo vezavo začetnih oligonukleotidov na matrično DNA. Običajno poteka reakcija v 20– do 40-ih ciklih. V začetnih ciklih poteka pomnoževanje

eksponentno, kjer se teoretično število kopij odseka DNA z vsakim ciklom podvoji. V kasnejših ciklih prične primanjkovati reagentov in upade učinkovitost polimeraze, zato je reakcija pomnoževanja linearna, dokler ne doseže platoja ter se ustavi. Zaznavanje nastalih pomnožkov poteka po končanem PCR, običajno z elektroforetsko ločbo na agaroznem gelu z dodatkom etidijevega bromida (Brownstein, 2004). Dobljeni ločeni segmenti ne podajo kvantitativnih rezultatov, saj reakcija ni ves čas eksponentna, zato predpostavka, da se z vsakim ciklom količina kopij podvoji, ni veljavna (Your one-stop-shop ..., 2004).

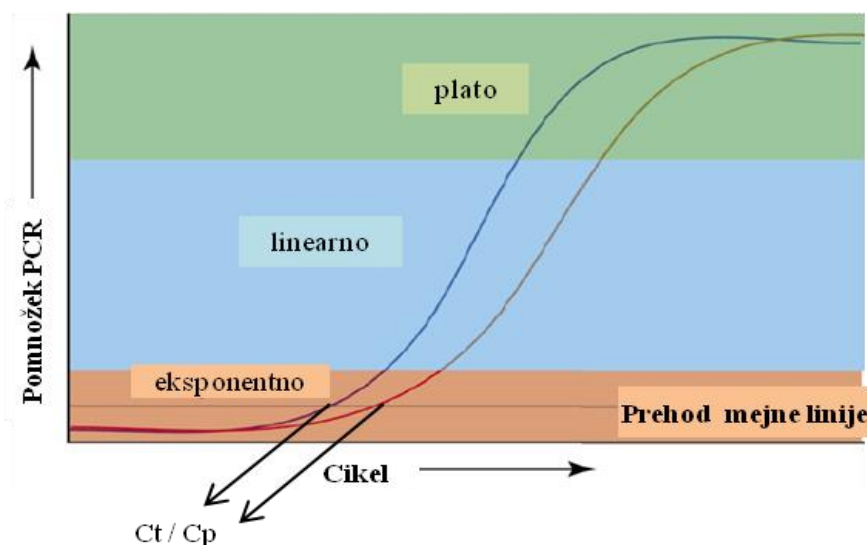
Reakcija PCR je uporabna pri genotipizaciji miši z izbitim genom iz repne DNA. PCR je lahko le metoda presejalnega testa za identifikacijo mladičev z ustreznim genotipom, kjer zaznava prisotnosti mest *lox* in zapisa rekombinaze Cre nakazuje na potencialnega mutanta, ni pa primerna metoda za določanje obsega genskega izbitja, ki ga tvori tkivno specifično izražanje rekombinaze Cre. Prisotnost transgenega zapisa rekombinaze Cre še ne pomeni izreza ciljnega gena v celotnem ciljnem tkivu. Tudi utišanje izražanja ali zmanjšanja aktivnosti rekombinaze Cre lahko vodi v nepopoln izrez (Schulz in sod., 2007).

2.5.2 Prenos po Southernu

Za ugotavljanje stopnje genskega izbitja v ciljanem tkivu se lahko uporablja metoda prenosa po Southernu (Ekstrand in Larsoon, 2002), ki pa je le pol kvantitativna in zahteva veliko količino svežega tkiva. Pogosto pa je pri študijah mišjih mutant za histokemijske analize potrebno izvesti perfuzijsko fiksacijo cele živali ali tkivnih vzorcev v paraformaldehidu, kar povzroča navzkrižno povezovanje nukleinskih kislin in visoko fragmentiranost DNA dolžine 100–1500 bp. Dolžine matric vplivajo na uspešnost hibridizacije po Southernu (Müller in sod., 2009). Za pravilno določene kvantitativne podatke je pomemben razrez genomske DNA, saj nepopoln razrez povzroči vezavo specifične sonde na različno dolge fragmente DNA, kar onemogoči pravilno kvantifikacijo. Tehnično zahtevni koraki (elektroforezna ločitev fragmentov, prenos na najlonsko membrano, navzkrižno povezovanje, označevanje sonde s P^{32} , učinkovita hibridizacija, zadostno spiranje ...) lahko ob nepravilni izvedbi uničijo poskus (Chain in sod., 2005).

2.5.3 Reakcija qPCR

Reakcija qPCR predstavlja nadgradnjo navadnega PCR, saj, poleg pomnoževanja, omogoča tudi sprotno merjenje količine pomnožka, ki temelji na merjenju in beleženju fluorescence (slika 16). Ciklični termostat z vgrajenim svetlobnim virom vzbudi fluorescentno barvilo, fotozaznavne diode pa zaznajo oddano svetlobo (Bell in Ranford-Cartwright, 2002). Pri vsaki reakciji se določi prazna linija fluorescence (slika 15), ki presega fluorescenco ozadja. Na prazni meji imajo vsi vzorci enako število kopij DNA. Cikel, v katerem vzorec doseže mejo, se imenuje točka prehoda Cp (angl.: *crossing point*) ali Ct (angl.: *crossing threshold*), (Ginzinger, 2002; Your one-stop-shop ..., 2004). V eksponentni fazi reakcije (slika 15) je učinkovitost pomnoževanja blizu 100 %, vendar se fluorescenca vsote pomnožka sprva nahaja pod fluorescenco ozadja. Z nadaljnjim pomnoževanjem nastane dovolj pomnožka, da doseže Cp, kjer se mu pomeri fluorescenca (Pfaffl, 2004; VanGuilder in sod., 2008). Z večanjem količine pomnožka se sorazmerno večja signal fluorescence (Ginzinger, 2002; Your one-stop-shop ..., 2004). V linearni fazi še vedno poteka nalaganje pomnožka in naraščanje fluorescence, vendar učinkovitost pomnoževanja počasi upada zaradi izrabljenih reagentov in zmanjšane aktivnosti polimeraze. V poznih ciklih reakcija preide v fazo platoja, kjer se pomnoževanje zaradi porabe reagentov in/ali upada aktivnosti polimeraze konča in reakcija se ustavi (Pfaffl, 2004; VanGuilder in sod., 2008). Aparature vsebujejo tudi programsko opremo za analizo pridobljenih podatkov, zato po končani reakciji ni potrebo nadaljnjo rokovanje z vzorci, s čimer so odpravljenije eksperimentalne napake (Bell in Ranford-Cartwright, 2002).



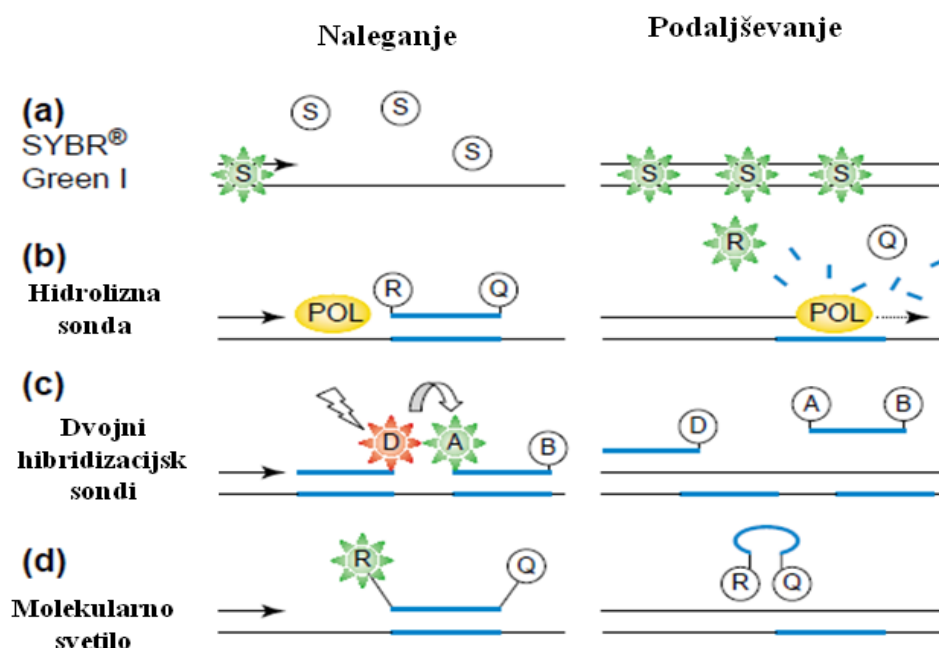
Slika 15: Faze qPCR (VanGuilder in sod., 2008: 622)

Chain in sod. (2005) so ugotovili, da je za določanje stopnje genskega preurejanja T–celičnega receptorja v redki populaciji celic timocit primernejša metoda qPCR, kot pa prenos po Southernu, ki je tehnično zahteven za izvedbo ter zahteva velike količine začetne DNA (15 µg). Za izvedbo qPCR pa so potrebovali 5–15 ng začetne DNA, ki jim je brez tehnično zahtevnega dela podala kvantitativne rezultate.

Določanje deleža DNA z izrezanim ciljnim genom, ki ga narekuje Cre, pri metodi qPCR, temelji na uporabi kemije barvil SYBR Green (Müller in sod., 2009) ali DNA sonde (Weis in sod., 2010). Metoda qPCR se lahko uporablja tudi pri analiziranju kratkih DNA fragmentov, ki so nastali zaradi fiksacije tkiva (Müller in sod., 2009).

2.5.3.1 Zaznavni sistemi za kvantifikacijo

Metoda qPCR za zaznavo zaporedij nukleinskih kislin uporablja merjenje fluorescence, ki lahko poteka na specifičen ali nespecifičen način (slika 16). Specifičen tip zaznave loči želene pomnožke od nespecifičnih pomnožkov ali dimerov začetnih oligonukleotidov. Nespecifičen tip pa zazna vse dvoverižne pomnožke, ki nastanejo med reakcijo pomnoževanja.



Slika 16: Različne kemije za zaznavo fluorescence pri qPCR (Bell in Ranford-Cartwright, 2002: 341)

2.5.3.1.1 Nespecifičen zaznavni sistem z barvilom SYBR Green

Barvilo SYBR Green je interkalarno barvilo (beli S na sliki 16 a), ki se med fazo pomnoževanja qPCR veže v nastajajoče dvoverižne pomnožke DNA in oddaja močno fluorescence (zeleni S na sliki 16 a). Najpogostejše uporabljeno barvilo je SYBR[®] green I, ki se vzbudi pri 497 nm, fluorescira pa pri 520 nm (Your one-stop-shop ..., 2004). Molekule SYBR Green tvorijo močno fluorescence zaradi nespecifične vezave v vse nastale dvoverižne pomnožke DNA (specifični in nespecifični pomnožki ter dimeri začetnih oligonukleotidov). Interkalarna barvila so zaradi nespecifičnosti vezanja cenejša in enostavnejša za uporabo od sond ter svetil, kar pa lahko vodi v napačno interpretacijo zaznane fluorescence. Vsota signala je odvisna od pomnožene količine dvoverižne DNA in se med reakcijo večja, vendar, pri enaki učinkovitosti pomnoževanja, daljši pomnožki tvorijo več signala fluorescence kot pa krajši (VanGuilder in sod., 2008). Po končani reakciji s kemijo SYBR Green je tako potrebno izvesti analizo talilne krivulje (angl.: *melting curve analysis*), s katero je mogoče zaznati različne dolžine pomnožkov. Med počasnim segrevanjem reakcijske mešanice s pomnožki iz 40 °C do 95 °C poteka beleženje fluorescence. Pri temperaturi, kjer se dvoverižna DNA stali (talilna temperatura, T_m), pride do sprostitve barvila SYBR Green in upad fluorescence, kar označuje vrh (angl:

melting peak) na talilni krivulji. Različno dolgi pomnožki imajo različne T_m , kar se na grafu talilne krivulje izriše kot posamezen vrh vsakega pomnožka. Pri popolnoma optimizirani reakciji qPCR vsebuje talilna krivulja le en vrh, saj načrtovani par začetnih oligonukleotidov tvori pomožek specifične dolžine.

Barvilo se lahko uporablja tudi pri optimizaciji reakcije PCR in pri preverjanju specifičnosti izbranega para začetnih oligonukleotidov. Z barvilom SYBR Green je možno istočasno preverjati različne ciljne gene brez dragih dvojno označenih sond. Pogoji za točno kvantifikacijo s kemijo SYBRGreen so dobro načrtovani začetni oligonukleotidi, ki tvorijo le specifičen pomnožek. Obstaja tudi barvilo SYBR[®] Gold z vzbuditvijo pri 495 nm in oddajanjem pri 537 nm, ki je obstojnejše od SYBR[®] Green I, saj le-ta hitro razpada.

2.5.3.1.2 Specifični zaznavni sistemi

Obstaja več specifičnih zaznavnih sistemov, ki temeljijo na uporabi kemij enoverižnih sond. Sonde so lahko označene z barvili, katere se razlikujejo po različnih spektrih vzbuditve in oddajanja. Običajno se na eni strani sonde nahaja molekula fluorofora, na drugi pa molekula dušilca. Izbira tehnike zaznave in molekul fluorofora ter dušilca je odvisna od poskusa.

Molekula fluorofora po vzbuditvi s svetlobo specifične valovne dolžine preide iz osnovnega v višje vzbujeno stanje in oddaja svetlobo določene višje valovne dolžine. Energijo fluorofora, v obliki svetlobe, sprejme molekula dušilca, ki jo nato z mehanizmom proksimalnega dušenja ali z mehanizmom fluorescentnega resonančnega prenosa energije (FRET – angl.: *fluorescence resonance energy transfer*) razprši v obliki toplote oz. svetlobe. V odsotnosti dušilca pa fluorofor pri vračanju v osnovno stanje, odvečno energijo sprosti kot fluorescenco (Your one-stop-shop ..., 2004).

2.5.3.1.2.1 Kemija sonde TaqMan[®]

Sonda TaqMan[®] je enoverižno oligonukleotidno zaporedje, komplementarno eni od verig DNA, ki se pomnožuje. Na 5'-koncu ima pripeto fluorescentno reportersko molekulo (beli R na sliki 16 b), na 3'-koncu pa molekulo dušilca (Q na sliki 16 b). Reporter oddaja fluorescenco, ki pa jo dušilec, preko mehanizma FRET, duši. Med prileganjem začetnih oligonukleotidov na ciljno zaporedje DNA se sonda TaqMan prilega v regijo med obema začetnikoma. Kemija TaqMan izrablja 5'-3' eksonukleazno aktivnost polimeraze *Taq*, ki v koraku podaljševanja matrične DNA razgradi neobstoječo hibridizirano sondo, kar povzroči sprostitvev reporterja in posledično porast fluorescence (zeleni R na sliki 16 b), ki je sorazmerna s količino pomnožka. Če v reakciji ne nastaja pomnožek, ne pride do vezave in razpada sonde, zato ostane fluorescenca zadušena. Kemija TaqMan zviša natančnost in specifičnost zaznave pomnožkov, vendar zahteva natančno, gensko-specifično ujemanje treh neodvisnih oligonukleotidnih zaporedij. Zaradi možnosti uporabe večih sond z različnimi fluorofori, kjer je vsaka specifična za en gen, se lahko metoda uporablja pri kvantifikaciji večih genov v eni reakciji (Your one-stop-shop ..., 2004; VanGuilder in sod., 2008).

2.5.3.1.2.2 Dvojne hibridizacijske sonde

Tehnologija dvojnih hibridizacijskih sond temelji na uporabi dveh različnih fluorescentnih oligonukleotidnih sond (slika 16 c), (VanGuilder in sod., 2008). Prva sonda nosi na 3'-koncu fluorescentni reporter (rdeči D na sliki 16 c), druga pa na 5'-koncu neko drugo fluorescentno barvilo (zeleni A na sliki 16 c). Na prostih koncih imata fosforilacijski modifikaciji, ki preprečujeta njuni podaljševanji (beli B na sliki 16 c). Na ciljno zaporedje DNA hibridizirata tako, da sta fluorofora obeh sond v neposredni bližini obrnjena drug proti drugemu. Prvo barvilo po vzbuditvi oddaja fluorescentno svetlobo višje valovne dolžine in, zaradi neposredne bližine, vzbudi fluorescentno molekulo na sosednji hibridizacijski sondi, ki oddaja fluorescentno svetlobo še višje valovne dolžine. Ta fluorescenca se zaznava (Mocellin in sod., 2003). Prenos energije med barviloma poteka preko mehanizma FRET (VanGuilder in sod., 2008). Odstranitev sond iz matrice povzroči

oddaljitev D in A, s čimer se preneha FRET, fluorescenca pa upade. Sistem je visoko specifičen, saj je za tvorbo signala potrebna vezava obeh sond (Bell in Ranford-Cartwright, 2002).

2.5.3.1.2.3 Molekularna svetila

Molekularno svetilo je sonda s strukturo stebila in zanke (slika 16 d). Zaporedji ročic sta si komplementarni in tvorita steblo, zaporedje zanke pa je komplementarno ciljni matrici DNA. Konca stebila sta označena s fluoroforom (zeleni R na sliki 16 d) in z dušilcem (beli Q na sliki 16 d). Nevezano molekularno svetilo zaradi strukture stebila drži fluorofor in dušilec v neposredni bližini, kar zaduši fluorescenco. Po hibridizaciji na ciljno zaporedje pa se zanka odpre, s čimer se fluorofor in dušilec oddaljita, dušenje pa se preneha. To vodi v oddajanje fluorescence (zeleni R na sliki 16 d). Z višanjem temperature pri podaljševanju verige se molekularno svetilo sprosti od šablone in ponovno tvori strukturo zanke in stebila ter tako zaduši fluorescenco (beli R na sliki 16 d). Po končani reakciji qPCR je potrebno izvesti analizo talilne krivulje (Bell in Ranford-Cartwright, 2002; VanGuilder in sod., 2008).

2.5.3.2 Analiza podatkov

Merjenje vrednosti fluorescence, ki odraža kopičenje pomnožkov, poteka v vsakem ciklu reakcije qPCR. Računalniška oprema med reakcijo izrisuje graf v odvisnosti pomerjene vrednosti fluorescence od cikla reakcije. V začetnih ciklih se fluorescenca pomnožkov nahaja pod fluorescenco ozadja plastike in reagentov, vendar se z nadaljnjimi cikli nakopiči dovolj pomnožka, da njegova fluorescenca preseže ozadje. Merjenje fluorescence poteka v eksponentni fazi, v kateri še ne primanjkuje reagentov in aktivnost polimeraze še ni ovirana, zato je učinkovitost podvojevanje pomnožkov blizu 100 %. Ker večina eksponentnega pomnoževanja poteka v območju fluorescence ozadja, je potrebo avtomatsko ali ročno določiti prazno vrednost, kjer je zaznan signal fluorescence višji od ozadja. Točka prehoda, C_p ali C_t , je število potrebnih ciklov pomnoževanja, v katerem fluorescenca preiskovanega vzorca doseže linijo prazne vrednosti fluorescence. Vrednost

Cp je obratnosorazmerna z začetnim številom kopij DNA, saj je pri manjši začetni količini vzorca potrebnih več ciklov, da reakcija doseže linijo prazne vrednosti fluorescence. Vsak preiskovani vzorec doseže prag fluorescence pri različnem Cp, zato se na osnovi vrednosti Cp preračuna količina kopij nukleinskih kislin vsakega vzorca (Čikoš in Koppel, 2009). Kvantifikacija pomnožkov reakcije qPCR lahko poteka absolutno ali relativno.

2.5.3.2.1 Relativna kvantifikacija

Relativna kvantifikacija določa spremembe v stopnji izražanja preiskovanega gena med različnimi vzorci in jih izraža relativno glede na stopnjo notranjega kontrolnega referenčnega gena. Referenčni gen je pogosto gospodinjski gen, ki se prav tako podvaja v reakciji qPCR. Poznanih je več matematičnih modelov za analizo podatkov.

Pogosto uporabljena metoda za relativno kvantifikacijo je metoda $2^{-\Delta\Delta C_T}$ z dvema predpostavkama. Prva predpostavka je, da je učinkovitost reakcije 100 %, kjer se z vsakim ciklom vsota pomnožka podvoji, zato poteka kvantifikacija v eksponentni fazi reakcije, v kateri še ne primanjkuje reagentov in ni razgradnje pomnožka. V tej fazi se določi linija prazne fluorescence, ki jo reakcija doseže v točki Cp (Ct) in tako preseže fluorescenco ozadja. Druga predpostavka pa je, da se med vzorci nahaja endogeni kontrolni gen, ki se ves čas izraža v enaki stopnji in tako popravlja razlike med vzorci. V reakciji qPCR se meri fluorescenca preiskovanega in kontrolnega gena. Vsak vzorec doseže linijo prazne fluorescence pri različnih Ct (ΔC_p). Odštetje ΔC_p kontrolnih razmer in ΔC_p eksperimentalnih razmer poda negativno vrednost $-\Delta\Delta C_p$, ki je eksponent števila 2. Vrednost relativne kvantifikacije poda delež izražanja preiskovanega vzorca v primerjavi s kontrolnim vzorcem (VanGuilder in sod., 2008).

S Pfafflovem matematičnem modelom se relativna kvantifikacija izračuna s programsko opremo aparature LightCycler podjetja Roche Applied Science iz učinkovitosti reakcije qPCR in deviacije vrednosti Cp neznanega vzorca v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Pri tej metodi ni potrebe po standardni krivulji. Programska oprema aparature poda učinkovitost eksponentne faze reakcije iz vrednosti Cp in logaritemskih vrednosti začetnih

molekul. Nivo relativnega izražanja preiskovanega gena se normalizira z izražanjem endogenega neuravnavanega referenčnega gena, ki uravnava notranje razlike med reakcijami qPCR (Pfaffl, 2001).

Normalizacija je potrebna zaradi razlik v količini in kvaliteti začetnega genetskega materiala vzorcev v vsaki jamici plošče za qPCR in zaradi odstopanj med biološkimi ter tehničnimi ponovitvami vzorcev, ki motijo analize podatkov. Istočasna kvantifikacija endogenega referenčnega gena, ki je običajno nek gospodinjski gen, odpravi razlike med vzorci. Pravilno izbran referenčni gen normalizira razlike v vsoti in kakovosti začetnega materiala, kot tudi v učinkovitosti reakcije. Endogeni gospodinjski ali referenčni gen, uporabljen za normalizacijo, mora imeti podobno izražanje kot preiskovani vzorci, pogoji poskusa ne smejo vplivati na njegov nivo izražanja in mora imeti podobno kinetiko v vseh korakih pomnoževanja kot preiskovani vzorci. Najpogosteje uporabljeni gospodinjski geni so tisti, ki so nujni za preživetje celice in se zato stalno izražajo. Ti geni so: aktini, GADPH, ciklofilin, albumin, mikroglobulini, 18S rRNA ali 28S rRNA in tubulin. Najbolj ustrezne referenčne gene je potrebno določiti pri vsakem poskusu posebej (Pfaffl, 2004) .

2.5.3.2.2 Absolutna kvantifikacija

Z absolutno kvantifikacijo se določi točno število molekul specifičnega ciljnega zaporedja (DNA ali RNA) v preiskovanem vzorcu na celico, celotno DNA/RNA ali na maso tkiva. Absolutna kvantifikacija zahteva izdelavo standardne krivulje z znanimi vrednostmi (število kopij ali masa DNA/RNA) preiskovanega zaporedja. Metoda predvideva, da je pomnoževanje standardne DNA in neznane DNA enako učinkovito (Čikoš in Koppel, 2009). Standardna krivulja odraža linearno razmerje med vrednostmi Cp in logaritemskimi vrednostmi števila kopij standardne DNA/RNA, iz katere se nato, glede na vrednost Cp, odčita število kopij DNA/RNA preiskovanega vzorca (Bell in Ranford-Cartwright, 2002; Mocellin in sod., 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Terminologija

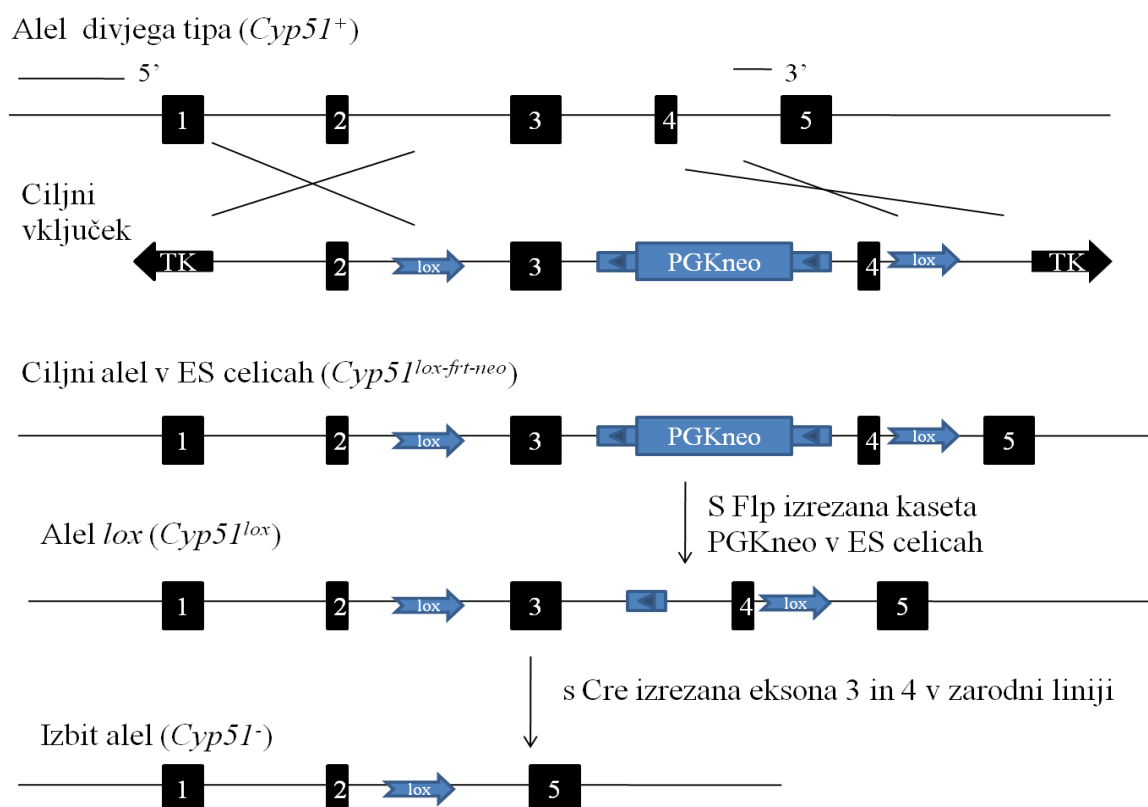
V diplomski nalogi so bila imena humanih genov poenotena v skladu z veljavno nomenklaturu, ki jo predpisuje Hugo Gene Nomenclature Committe (Hugo Gene ..., 2013), imena mišjih genov pa z nomenklaturu, ki jo predpisuje Mouse Genome Informatics (Mouse Genome ..., 2013). Poenotenje je bilo potrebno, ker so se v objavah pogosto uporabljala različna starejša imena.

3.1.2 Laboratorijski pribor

Avtomatske pipete	Gilson, Francija
Večkanalna pipeta	Eppendorf, Nemčija
Reagenčne posodice	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga 5417C	Eppendorf, Nemčija
Kadičke za elektroforezo	Pharmacia, Švedska
Pipetni nastavki brez filtra	Brand, Nemčija
Mikrovalovna pečica	Orion, Madžarska
Elektroforeza	Pharmacia, Švedska
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, ZDA
Tehtnica	Sartorius, Nemčija
Sealin folija 480	Roche Applied Science, Nemčija
Light Cyclor 480 II	Roche Applied Science, Nemčija
NanoVue™	GE Healthcare Life Sciences, ZDA
Naprava za slikanje gelov (U:GENIUS)	Syngene, ZDA

3.1.3 Laboratorijska miš

Linija miši *Cyp51^{lox}* z uradnim imenom B6.129SV-*Cyp51tm1Bfro*, ki smo jo uporabili v diplomski nalogi, je bila vzgojena na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete v Ljubljani (Keber in sod., 2011). Postopek priprave mišjega modela je prikazan na sliki 17. Uporabljene mišje linije za vzgojo miši s pogojno izbitim genom *Cyp51* so navedene v preglednici 3.



Slika 17: Shema konstrukcije alela *Cyp51⁻* v mišjem zarodku (povzeto po Keber in sod., 2011: 29088)

Za pripravo ciljnega vključka je bilo zaporedje gena *Cyp51* izolirano iz umetnega bakterijskega kromosoma, klon 519E21, ki je bil pridobljen iz knjižnice umetnih bakterijskih in mišjih kromosomov 129/Sv (Research Genetics, Huntsville, AL). V ciljni vključek so bile z metodo rekombinantne DNA dodane kaseta TK za negativno selekcijo (črni puščici na sliki 17), z mesti FRT (modri pravokotniki s trikotniki na sliki 17) obdana neomicinska kaseta PGKneo za pozitivno selekcijo in dve mesti lox (modri puščici na sliki 17). Neomicinska kaseta z mesti FRT je bila vstavljena v intron 3 (mesto med eksonoma 3 in 4). Zaporedji lox pa sta bili vstavljeni v intron 2 (mesto med eksonoma 2 in 3) in 4

(mesto med eksonoma 4 in 5), tako da sta obdajali eksona 3 in 4 (črni kvadrati na sliki 19), da ju je kasneje lahko rekombinaza Cre izrezala. Kaseta z genom za TK je služila za negativno selekcijo klonov, ki so vgradili vključek v genom z naključno vstavitvijo. Prekrižane črte na sliki 17 nakazujejo mesta homolognih rekombinacij. Linearizirane ciljne vključke so z elektroporacijo vnesli v ES celice iz linije 129Sv. Po dvojni selekciji celic z genetinom in ganciklovirjem so pridobili rekombinantne klone, ki so imeli vključke vstavljene s homologno rekombinacijo. Z vnosom rekombinaze Flp se je najprej izrezalo zaporedje neomicinske kasete, kar je tvorilo pogojni alel *Cyp51^{lox}*. Sledilo je injiciranje dveh neodvisnih *Cyp51^{lox}* ES klonov v mišje blastociste C57BL/6JOlaHsd (C57BL/6; Harlan, Italy) in oblikovanje mišjih himer. Heterozigotni potomci *Cyp51^{+/-lox}* so se vsaj štiri generacije povratno križali z mišmi C57BL/6 in tako tvorili transgeno linijo B6.129SV-*Cyp51tm1Bfro*, ki je z uporabo tehnologije Cre/lox omogočala nadaljnjo pogojno izbitje gena *Cyp51* (Keber in sod., 2011).

Za pridobitev mišjih modelov s popolnoma izbitim genom *Cyp51* (genotip *Cyp51^{-/-}*) so bile homozigotne živali *Cyp51^{lox/lox}* križane s transgeno linijo B6.FVB-Tg(*EIIa-cre*)C5379Lmgd/J (The Jackson Laboratories) ali krajše miš *EIIa-Cre*, ki je vsebovala rekombinazo Cre pod kontrolo promotorja *EIIa*, ki narekuje izbitje gena že v zigoti (Lakso in sod., 1996). S križanjem so pridobili genotip *Cyp51^{lox/+}; EIIa-Cre⁺*, ki mu je Cre na stopnji zigote izbil gen *Cyp51*, kar je tvorilo potomce genotipa *Cyp51^{+/-}*. Linijo miši z izbitim alelom *Cyp51⁻* so uradno poimenovali B6.129SV-*Cyp51tm1.1Bfro*. Z medsebojnim križanjem odbranih miši *Cyp51^{+/-}* so bili pridobljeni zarodki genotipa *Cyp51^{-/-}* s popolnoma okvarjeno funkcijo gena *Cyp51*. Takšni zarodki so se zbirali na različnih stopnjah embrionalnega razvoja, s čimer je bilo omogočeno preučevanje vpliva izbitja gena *Cyp51* na njihov fenotip. Znak uspešnega parjenja miši je bila tvorba vaginalnega čepa pri breji samici. Poldnevna brejost se je označila z E0,5, enodnevna z E1,0 ... Samice so bile žrtvovane v različnih stopnjah brejosti, njihovi zarodki pa izolirani v PBS. Ugotovljeno je bilo, da zarodki s popolnoma izbitim genom *Cyp51* propadejo pri E15,0 (Keber in sod., 2011).

Za preučevanje vloge gena *Cyp51* v jetrih odraslih živali pa so bile homozigotne miši *Cyp51^{lox/lox}* križane z linijo miši B6.Cg-Tg(*Alb-cre*)21Mgn/J (The Jackson Laboratories) ali

krajše miš *Alb-Cre*, ki so jo vzredili Postic in sod. (1999), s čimer so pridobili živali genotipa *Cyp51^{lox/lox}; Alb-Cre⁺*. Transgeni zapis *Alb-Cre* je vseboval mišji albuminski promotor/ojačevalce, modificirano zaporedje za rekombinazo Cre in odsek zaporedja gena za humani rastni hormon. Transgeni zapis je z albuminskim promotorjem omogočil specifično izražanje in delovanje rekombinaze Cre v jetrnih hepatocitah (Postic in sod., 1999). Potomci so se nato medsebojno križali. Za zvišanje stopnje izbitja gena *Cyp51* v jetrih potomcev so bile miši *Cyp51^{lox/lox}; Alb-Cre⁺* križane z mišmi genotipa *Cyp51^{lox/-}; Alb-Cre⁻*, ki so jih vzgojili s serijami križanj z mišjo B6.129SV-*Cyp51tm1.1Bfro*. Tako so pridobili živali genotipa *Cyp51^{lox/-}; Alb-Cre⁺* z že enim podedovanim izbitim alelom *Cyp51⁺*. Pridobljene živali genotipov *Cyp51^{lox/lox}; Alb-Cre⁺* (nadalje *Cyp51^{lox/lox}; Cre⁺*) in *Cyp51^{lox/-}; Alb-Cre⁺* (nadalje *Cyp51^{lox/-}; Cre⁺*) smo uporabili v poskusih določevanja stopnje izrezovanja *Cyp51* z rekombinazo Cre v jetrih.

Preglednica 3: Uporabljene linije miši v križanjih za pogojno izbitje gena *Cyp51*

Uradno ime linije	Alel <i>Cyp51</i> (genotip)	Transgen Cre
B6.129SV- <i>Cyp51tm1Bfro</i>	<i>Cyp51^{lox}</i>	/
B6.FVB-Tg(<i>Elia</i> -cre)C5379Lmgd/J	<i>Cyp51⁺</i>	<i>Elia</i> -Cre
B6.129SV- <i>Cyp51tm1.1Bfro</i>	<i>Cyp51⁻</i>	/
B6.Cg-Tg(<i>Alb</i> -cre)21Mgn/J	<i>Cyp51⁺</i>	<i>Alb</i> -Cre

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija DNA

Prvi korak našega poskusa je bila izolacija DNA iz mišjih repov, jeter in zarodkov z različnimi genotipi gena *Cyp51*. Zarodki so bili odbrani na stopnji E13,5, tkiva jeter in repa pa so izhajali iz osem tednov starih miši. Izolacijo DNA iz pridobljenih tkiv smo izvedli po standardnem postopku s fenolom, s kloroformom in z izoamilalkoholom (FKI=25:24:1). Fenol omogoči denaturacijo proteinov, kloroform topi maščobe, izoamilalkohol pa preprečuje penjenje.

Opis postopka FKI:

K 25 mg vzorcu tkiva smo dodali 500 μ l lizatnega pufru in 5 μ l proteinaze K (10 mg/ml). Razgradnja tkiva je potekala čez noč na 55 °C ob močnem stresanju. V digestoriju smo lizatnemu pufru dodali enako količino (500 μ l) FKI (fenol : kloroform : izoamilalkohol) v razmerju 25 : 24 : 1 in mešanico 10 sekund mešali na vibracijskem mešalniku. Sledilo je 12 minutno centrifugiranje pri 14000 x *g*. Zgornjo vodno fazo smo prenesli v novo, svežo mikrocentrifugirko. Pri tem smo se izogibali interfazi z denaturiranimi proteini, saj bi njihov prenos v novo mikrocentrifugirko zmanjšal čistost DNA. Po prenosu smo vodni fazi dodali enako količino kloroforma : izoamilalkohola (24 : 1) in mešali na vibracijskem mešalniku 10 sekund. Zopet je sledilo 12 minutno centrifugiranje pri 14000 x *g* in prenos vodne faze v novo mikrocentrifugirko. Za oboritev DNA smo vzorcem dodali enako količino izopropanola in jih postavili v zamrzovalno skrinjo za pol ure. Mikrocentrifugirke smo obračali v roki, da se je DNA oborila v belo kepo. Po obarjanju DNA je sledilo 15 minutno centrifugiranje pri 10000 x *g* na 4 °C. Previdno smo odlili izopropanol in pazili, da nismo izgubili usedline. Da bi iz izolata DNA odstranili soli, smo usedlini DNA dodali še 1 ml 75 % etanola, mešali na vibracijskem mešalniku in centrifugirali 5 min na 9000 x *g*. Odstranili smo supernatant in izvedli še kratko centrifugiranje. Preostali etanol smo odpipetirali, nato pa vzorce sušili na zraku 15 minut. Oborjene vzorčne DNA smo raztopili v 100 μ l vode in pomerili njihove koncentracije. Za nadaljnje poskuse smo jih hranili v zamrzovalni skrinji pri –20 °C.

3.2.2 Merjenje koncentracij vzorčnih DNA s spektrofotometrom

Za merjenje koncentracije DNA izoliranih vzorcev smo uporabili NanuVue spektrofotometer. Pred merjenjem koncentracij izoliranih DNA vzorcev smo zmerili absorbanco slepemu vzorcu (voda brez raztopljene DNA). Na mesto, ki ga presveti žarek, smo nanесли po 2 μ l vzorca in zabeležili koncentracijo ter razmerji A260/230 in A260/280.

3.2.3 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Da bi preverili učinkovitost izreza gena *Cyp51* v jetrih, smo najprej z računalniškim programom Primer3 (Rozen in Skaletsky, 1999), ki je prosto dostopen na svetovnem spletu

(<http://primer3.wi.mit.edu/>), oblikovali ustrezne pare začetnih oligonukleotidov. Uporabili smo metodologijo po članku Müller in sod. (2009), kjer so z uporabo qPCR merili uspešnost izreza gena *PEX13* v možganih. Tako kot v članku, smo tudi mi načrtovali pare različnih začetnih oligonukleotidov, s katerimi smo lahko določili uspešnost izreza gena s sistemom Cre/*lox*:

1. par, ki pomnoži alel *Cyp51*⁺ in alel *Cyp51*^{lox}, pri alelu *Cyp51*⁻ pa ni pomnožka; te začetne oligonukleotide smo poimenovali »Cyp+«
2. par, ki pomnoži *Cyp51*⁻, pri *Cyp51*⁺ in *Cyp51*^{lox} pa ni pomnožka; te začetne oligonukleotide smo poimenovali »Cyp0«
3. par začetnih oligonukleotidov za normalizacijo koncentracije DNA, ki prepisuje odsek gena za β -aktin in se krajše imenuje par »Actb« (Müller in sod., 2009).

Za potrebe načrtovanja začetnih oligonukleotidov je bilo nukleotidno zaporedje mišjega *Cyp51* pridobljeno iz baze Ensembl (Ensembl, 2013). Pri načrtovanju specifičnih začetnih oligonukleotidov Cyp+ smo izbrali del zaporedja, ki je bilo pri alelu *Cyp51*⁻ izrezano (slika 18, modre puščice Cyp+1 in Cyp+2). V program Primer3 smo vnesli del zaporedja gena *Cyp51* med mestoma *lox*, kar je zajemalo del introna 2, ekson 3, intron 3 z zaporedjem mesta FRT ter ekson 4. Alel divjega tipa *Cyp51*⁺ ni vseboval zaporedja FRT, medtem ko ga je alel *Cyp51*^{lox} vseboval. Izbrani par začetnih oligonukleotidov je moral pri obeh alelih (*Cyp51*⁺ in *Cyp51*^{lox}) pomnožiti enako dolžino pomnožka PCR, zato smo v programu Primer3 z možnostjo »Excluded Regions« (prevod: »izključene regije«) označili zaporedje FRT, s čimer nam ga program ni upošteval pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov. Ponujeni par začetnih oligonukleotidov pri alelu *Cyp51*^{lox} tako ni pomnoževal regije z zaporedjem FRT in so bili pomnožki PCR enakih dolžin pri obeh alelih.

Pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov Cyp0 pa smo potrebovali takšen par, ki bi se v reakciji PCR prilegal na šablono zaporedja DNA tako, da bi tvoril pomnožke samo pri izrezanem odseku alela (slika 18, modre puščice Cyp01 in Cyp02). Pri alelu *Cyp51*⁻ bi tako dobili zelo kratke pomnožke, pri divjem in *lox* tipu (*Cyp51*⁺ in *Cyp51*^{lox}) pa zelo dolge, ki pa se zaradi pogojev reakcije PCR ne bi mogli pomnoževati. V Primer3 smo vnesli zaporedje izrezanega alela in z možnostjo »Targets« (prevod: »tarče«) označili zaporedje *lox*, za katerega smo želeli, da ga program zajema ter izbere takšne začetne

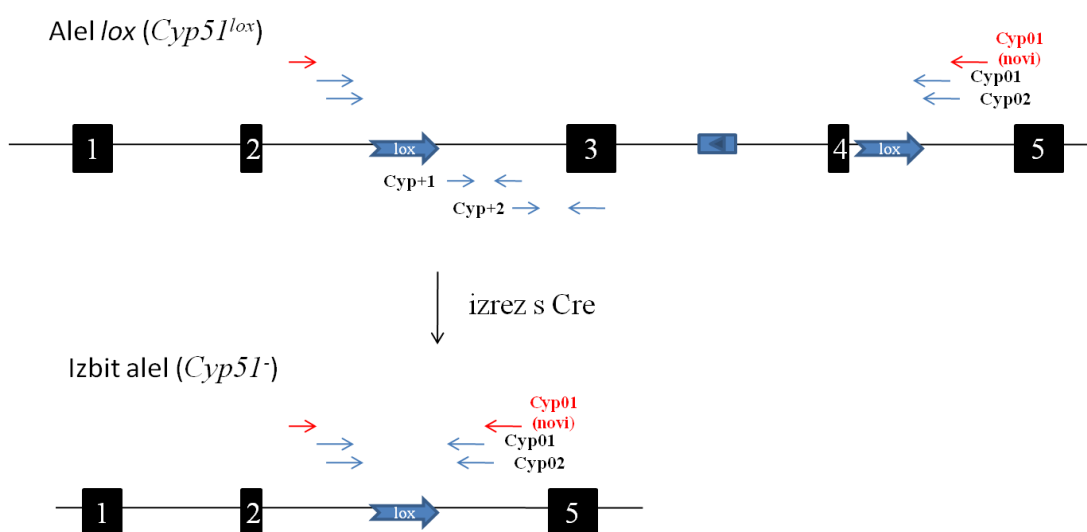
oligonukleotide, ki bodo v reakciji PCR pomnožili tudi zaporedje *lox*, ki ostane po izrezu s Cre.

Ostalih parametrov v programu Primer3, ki so potrebni za načrtovanje začetnih oligonukleotidov, nismo spreminjali. Za naše delo smo uporabili po dva para začetnikov za začetne oligonukleotide Cyp+ in Cyp0 (preglednica 4).

Preglednica 4: Pričakovane dolžine pomnožkov PCR pri različnih parih začetnih oligonukleotidov

Par začetnih oligonukleotidov	Alel <i>Cyp51^{lox}</i>	Alel <i>Cyp51⁻</i>	Alel <i>Cyp51⁺</i>
Cyp+1	143 bp	/	143bp
Cyp+2	163 bp	/	163 bp
Cyp01	1887 bp	193 bp	1713 bp
Cyp02	1878 bp	184 bp	1704 bP

Legenda: / par začetnih oligonukleotidov pri alelu ni tvoril pomnožka



Slika 18: Mesta naleganj različnih parov začetnih oligonukleotidov na zaporedje gena *Cyp51*

3.2.4 Reakcija PCR

Reakcijo PCR smo uporabili pri testiranju začetnih oligonukleotidov, preverjanju predhodne genotipizacije vzorčnih DNA in pri optimizaciji pogojev za reakcijo qPCR. Za izvedbo reakcije PCR smo uporabili lizate vzorcev ušes ali zarodkov z že znanimi genotipi

ali izolirano genomsko DNA iz mišjih jeter, repa in zarodkov. DNA, ki smo jo uporabili v PCR, smo razredčili do koncentracije približno 5 ng/μl.

Prvi korak reakcije PCR je priprava reakcijske mešanice (preglednica 5), ki jo sestavljajo voda, par začetnih oligonukleotidov, dNTP, Mg^{2+} , pufer za pomnoževanje in polimeraza (Applied Biosystems). Po odtajanju pufra II in raztopine $MgCl_2$ smo ju pred uporabo vedno premešali na vibracijskem mešalu in kratko centrifugirali. Mikrocentrifugirke z reakcijskimi mešanicami so se ves čas nahajale na hladni podlagi. Polimerazo smo dodali tik pred začetkom reakcije PCR. Količino reakcijske zmesi smo pri vsaki reakciji PCR prilagodili številu vzorcev.

Preglednica 5: Priprava reakcijskih mešanic za PCR

Komponenta	Končna konc. v reakcijski mešanici	Volumen 1-kratne reakcije (20 μl reakcija)	Št. reakcij (npr. 20x)
deionizirana voda		2,84 μl	56,8 μl
10X pufer II	1x	2 μl	40 μl
25mM $MgCl_2$	1,5 mM	2 μl	40 μl
2mM dNTP	200 μM	2 μl	40 μl
10 pm/μl zač. olig. 1	0,25 μM	0,5 μl	10 μl
10 pm/ μl zač. olig. 2	0,25 μM	0,5 μl	10 μl
5U/μl ampli ^{Taq} Gold	0,4 enote	0,16 μl	3,2
Σ		10 μl	200 μl

Znak Σ predstavlja vsoto posameznih komponent

V vsako luknjico plošče za PCR smo napipetirali po 10 μl reakcijske mešanice, kateri smo dodali še 10 μl razredčene 5 ng/μl DNA. Preden smo položili ploščo v aparaturo, smo na reakcijske mešanice nakapljali po 3 kapljice mineralnega olja (Sigma), s čimer smo preprečili izhlapevanje reagentov med reakcijo. Reakcijo PCR smo izvedli v aparaturi GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems) ob ustreznih pogojih.

3.2.5 Testiranje začetnih oligonukleotidov

Ker smo imeli pet različnih parov začetnih oligonukleotidov (Cyp+1, Cyp+2, Cyp01, Cyp02, Actb), (preglednica 6), smo naredili pet različnih reakcijskih mešanic za PCR. Imeli smo dve reakcijski mešanici s paroma Cyp+, dve reakcijski mešanici s paroma Cyp0

in reakcijsko mešanico s parom *Actb*, ki je pomnoževal standardni gen. Postopek reakcije PCR smo izvedli pri dveh različnih temperaturah prileganja (angl.: *annealing*) začetnih oligonukleotidov (57 °C in 60 °C). Pogoji reakcije PCR za testiranje začetnih oligonukleotidov so navedeni v preglednici 7. Po končani reakciji PCR smo vzorce nanесли na agarozni gel in izvedli elektroforezo.

Preglednica 6: Razporeditev začetnih oligonukleotidov v reakcijskih mešanicah za PCR

Oznaka para	Začetni oligonukleotid 1	Začetni oligonukleotid 2
Cyp+1	Cyp+ F1	Cyp+ R1
Cyp+2	Cyp+ F2	Cyp+ R2
Cyp01	Cyp0 F1	Cyp0 R1
Cyp02	Cyp0 F2	Cyp0 R2
Act b	Actin F	Actin R

Zaradi veliko različnih vzorcev DNA, ki smo jih uporabili pri laboratorijskem delu, smo se odločili, da vzorčne DNA na slikah gelov označimo z genotipi gena *Cyp51*, ker je bil naš namen testiranje specifičnosti začetnih oligonukleotidov in ne iskanje nekega določenega genotipa v vzorčnih DNA. Vzorčne DNA za testiranje specifičnosti parov začetnih oligonukleotidov so izhajale iz ušesnih lizatov genotipov *Cyp51^{lox/lox}* (oznaka na gelu *lox/lox*) in *Cyp51^{lox/-}* (oznaka na gelu *lox/-*).

Preglednica 7: Pogoji PCR pri testiranju začetnih oligonukleotidov

Korak	Temperatura	Čas	Število ciklov
Aktivacija polimeraze	94 °C	5:00 min	1x
Denaturacija DNA	94 °C	30 s	35x
Prileganje začetnih oligonukleotidov	60 °C / 57 °C	30 s	
Podaljšanje matrične DNA	72 °C	20 s	
Končno podaljšanje	72 °C	5:00 min	1x
Hlajenje reakcije	4 °C	∞	

3.2.6 Preverjanje genotipov izoliranih vzorcev DNA

Pred preverjanjem učinkovitosti stopnje izrezovanja lokusa *Cyp51* v jetrih z metodo qPCR smo z navadnim PCR ponovno preverili genotipe alela *Cyp51* vzorčnih DNA (preglednica

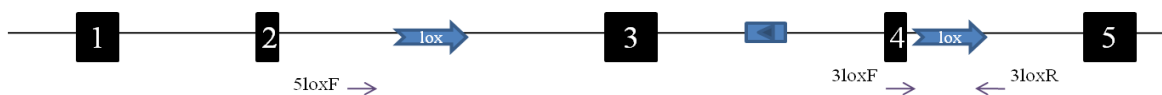
11), da smo se prepričali o pravilnosti predhodne genotipizacije. Genotip *Cyp51*^{+/+} (na slikah gelov simbol +/+) je označeval divji tip gena, genotip *Cyp51*^{-/-} (simbol -/-) popolno izbitje gena *Cyp51*, genotip *Cyp51*^{+/-} (simbol +/-) heterozigota, genotip *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺ (simbol lox/lox;+) je vseboval oba alela z zaporedji *lox* v intronu 2 in 4, genotip *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ (simbol lox/-;+) pa je vseboval en alel z zaporedji *lox* v intronu 2 in 4 ter en podedovan izbit alel *Cyp51*⁻.

S parom začetnih oligonukleotidov 3loxF/3loxR (mesto prileganja na sliki 19) smo vzorčnim DNA preverili prisotnost mest *lox* v intronu 4. S kombinacijo začetnih oligonukleotidov 5loxF/3loxR (mesto prileganja na sliki 19) pa smo preverili, v katerih vzorčnih DNA je prišlo do izreza s Cre, kar je nakazoval pomnožek izbitega odseka alela *Cyp51*⁻, in v katerih ne, kar so nakazovali pomnožki daljšega odseka alela *Cyp51*^{lox} oz. *Cyp51*⁺. S parom TK139/TK141 smo preverili, ali vzorčna DNA v svojem zaporedju vsebuje zapis za protein rekombinaze Cre (simbol +) ali ne (-). Mesto prileganja para TK139/TK141 ni bilo znano, saj točen položaj transgena za Cre v zaporedju DNA ni poznan. Uporabili smo standardne začetne oligonukleotide (preglednica 8), ki so se uporabljali za genotipizacijo med križanjem miši (Keber in sod., 2011). Dolžine pričakovanih pomnožkov posameznih parov začetnih oligonukleotidov so navedene v preglednici 9. Pogoji reakcije PCR pri preverjanju genotipizacije pa v preglednici 10.

Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi za genotipizacijo

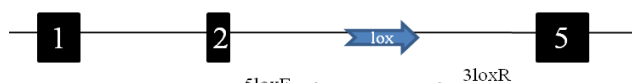
Začetni oligonukleotidi	Bazno zaporedje 5'-3'
3LoxF	AACATAGCCCACTTTAAGCA
3LoxR	TTCCGCACCTACTGTATTTT
5LoxF	CAGACTTGATGGCAAGAGAT
TK139	ATTTGCCTGCATTACCGGTC
TK141	ATCAACGTTTTGTTTTTCGGA

Alel *lox* (*Cyp51^{lox}*)



Izrez s Cre

Izbit alel (*Cyp51⁻*)



Slika 19: Shema mest prileganja začetnih oligonukleotidov pri preverjanju genotipov vzorčnih DNA (povzeto po Keber in sod., 2011: 29088)

Preglednica 9: Dolžine pričakovanih pomnožkov PCR pri preverjanju genotipov

Par zač. olig.	Alel <i>Cyp51⁺</i>	Alel <i>Cyp51^{lox}</i>	Alel <i>Cyp51⁻</i>	Pozitiven za Cre	Negativen za Cre
3loxF/3loxR	159 bp	210 bp	/	/	/
5loxF/3loxR	1707 bp	1881 bp	187 bp	/	/
TK139/TK141	/	/	/	349 bp	/

Legenda: / par začetnih oligonukleotidov pri alelu ni tvoril pomnožkov

Preglednica 10: Pogoji PCR pri preverjanju genotipov izoliranih DNA

Pogoji parov 3loxR/3loxF in 5loxR/3loxF

T (°C)	Čas	Št. ciklov
94	5:00 min	1x
94	1:00 min	35x
58	1:00 min	
72	30 s	
72	5:00 min	1x
4	∞	

Pogoji para TK139/TK141

T (°C)	Čas	Št. ciklov
94	5:00min	1x
94	30 s	35x
55	30 s	
72	1:00 min	
72	5:00 min	1x
4	∞	

Preglednica 11: Vzorci DNA za preverjanje genotipizacije

Ime vzorca	Predhodno določen genotip <i>Cyp51</i> ; Cre
LKO 50	<i>lox/lox</i> ; +
LKO 64	<i>lox/lox</i> ; +
LKO 60	<i>lox/lox</i> ; +
LKO 53	-/ <i>lox</i> ; +
LKO 66	-/ <i>lox</i> ; +
LKO 65	-/ <i>lox</i> ; +
102.1	+/+
102.4	+/-
96.3	-/-
<i>lox</i> /+; -	<i>lox</i> /+; -
<i>lox</i> /-; +	<i>lox</i> /-; +
voda	/

Vzorčne DNA za preverjanje genotipov gena *Cyp51* so izhajale iz mišjih repov in jeter (vzorci LKO) starih osem tednov. Na gel smo nanesti še pozitivne kontrolne vzorčne DNA iz mišjih zarodkov (102.1, 102.4, 96.3), odbranih na stopnji E13,5 in kontrolni vzorčni DNA, pozitivno (*lox*/+; +) in negativno (*lox*/-; -), za rekombinazo Cre ter negativno kontrolo, vodo, s katero smo se prepričali, da reagenti ne vsebujejo pomnožkov PCR. Genotipi posameznih vzorcev DNA so navedeni v preglednici 11.

3.2.7 Agarozna gelska elektroforeza

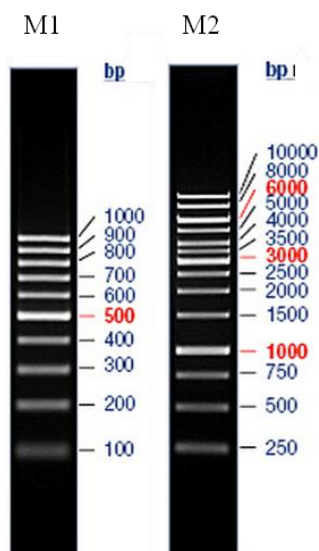
Nabite molekule, ki so izpostavljene električnemu polju, se začnejo premikati v smeri elektrode z nasprotnim nabojem. Za ločitev bioloških makromolekul, kot so proteini in nukleinske kisline, se uporablja predvsem gelska elektroforeza (poliakrilamidna oz. agarozna). Gel, v katerem poteka ločitev, deluje kot molekulska sito, saj majhnim molekulam omogoča hitrejše, velikim pa počasnejše gibanje. Molekule, ki so večje od por v gelu, pa ne morejo potovati. Poliakrilamidna in agarozna gelska elektroforeza se razlikujeta po velikosti por in zamreženosti gela. Poliakrilamidni gel je bolj zamrežen in ima pore manjše velikosti, medtem ko je agarozni gel manj zamrežen in ima večje pore. Prva metoda je tako primerna za ločevanje proteinov, druga pa za ločevanje nukleinskih

kislin (DNA in RNA). Zaradi električnega polja pri agarozni gelski elektroforezi potujejo negativno nabiti odseki DNA proti pozitivno nabiti anodi. Molekule se tako ločijo na osnovi velikosti. Agarosa je linearni polimer, zgrajen iz D- in L-galaktoze, ki sta med seboj povezani z α -1,3- in β -1,4- glikozidnimi vezmi. Verige agaroze so oblikovane v vijačne strukture, ki se povezujejo v velike agregate s premerom 20 do 30 nm. Zaznava nukleinskih kislin najpogosteje poteka s fluorescentnim barvilom, z etidijevim bromidom, ki se nespecifično veže med bazne pare dvoverižne DNA. Vezani etidijevi ioni se vzbudijo pri svetlobi z valovno dolžino 310 nm in oddajajo intenzivno rdeče-oranžno barvo pri 590 nm (Kočevar in sod., 2007: 143-147).

Agarozni gel smo pripravili iz 0,5X TBE (Tris, Borna kislina, EDTA) pufra in agaroze (SeaKem LE), ki smo jo odtehtali na tehtnici (Sartorius). Priprava 0,5X TBE pufra je predstavljena v spodnji preglednici 12. Pomnoške reakcije PCR smo analizirali na 3–odstotnem agaroznem gelu. V 250 ml 0,5X TBE pufra z etidijevim bromidom smo stresli 7,5 g agaroze in zmes segrevali v mikrovalovni pečici približno 10 min, da je postala homogena. Nato smo jo ob stalnem mešanju rahlo shladili in vlili v elektroforezno posodo, v kateri so se nahajali glavnički. Ko se je gel povsem strdil, smo odstranili glavničke, ki so v gelu pustili žepke, kamor smo lahko nanašali vzorčne DNA in raztopino fragmentov DNA znanih dolžin, ki se imenujejo molekularna lestvica. Pri reakcijah smo uporabljali po 5 μ l molekularne lestvice 100 bp in 1000 bp (1kbp), (Fermentas, #SM0243 in #SM0314) s koncentracijo 0,1 μ g/ μ l. Med elektroforezo se fragmenti lestvic ločijo po dolžinah, ki so prikazani na sliki 20.

Preglednica 12: Reagenti za pripravo pufra 0,5X TBE

Reagent	Volumen
10X TBE (<i>Maniatis</i>)	100 ml
Etidijev bromid 10 mg/ml	40 μ l
Deionizirana voda	1,9 l



Slika 20: Molekularni lestvici 100 bp (M1) in 1 kbp (M2), (GeneRuler ..., 2013)

Pomnožkom reakcije PCR smo pred nanosom na agarozni gel dodali še po 2 μ l 6X nanašalnega pufra (angl.: *loading dye solution*), sestavljenega iz glicerola, bromfenol modrega in ksilen cianola (Fermentas), ki nam je omogočil, da smo lahko s prostim očesom sledili potovanju DNA po gelu. Glicerol je omogočil, da se je mešanica PCR zaradi večje gostote usedla na dno žepka. Elektroforeza je potekala približno eno uro pri napetosti 150 V. Po končani elektroforezi smo ločene fragmente DNA fotografirali pod UV svetlobo z napravo U:GENIUS.

3.2.8 Reakcija qPCR z barvilom SYBR Green I

Pri poskusih določevanja stopnje izreza smo za zaznavo pomnožkov reakcije qPCR uporabljali interkalarno barvilo SYBR Green I[®], ki se nespecifično veže v nastajajočo dvovijačnico in z nalaganjem pomnožkov zvišuje signal fluorescence (VanGuilder in sod., 2008). Pred pripravo mešanice za reakcijo qPCR (preglednica 13) smo kemikalije SYBR Green I proizvajalca Roche in začetne oligonukleotide proizvajalca Sigma-Aldrich dobro premešali na vibracijskem mešalniku in jih nato zmešali v ustreznih količinah. Reakcijske mešanice so se med seboj razlikovale po parih začetnih oligonukleotidov. Po 12,5 μ l založne raztopine vsakega začetnega oligonukleotida uporabljenih parov s koncentracijo 100 μ M smo redčili s 475 μ l vode ter tako pripravili mešanico začetnih oligonukleotidov s koncentracijo 2,5 μ M, ki smo jo uporabili pri nadaljnji pripravi reakcijske mešanice za

qPCR. Koncentracije izoliranih DNA iz jeter, zarodkov in repa, ki smo jih pomerili s NanoVueTM, smo najprej zaradi natančnejšega in enostavnejšega pipetiranja razredčili do koncentracije 160 ng/μl. Sledilo je 10-kratno redčenje do delovne koncentracije 16 ng/μl. Pri vsakem vzorcu DNA (preglednica 14) smo izvedli tri neodvisne biološke in tri tehnične ponovitve. Pri eni biološki ponovitvi smo količinsko potrebovali reakcijske mešanice za štiri reakcije (3 tehnične ponovitve vzorca DNA plus ena rezerva).

Preglednica 13: Sestava reakcijske mešanice za qPCR

Komponente reakcijske mešanice z začetnimi koncentracijami	1 vdolbinica na plošči qPCR - 1 tehnična ponovitev	1 vzorec (1x) - 4 reakcije
Deionizirana voda	1,15 μl	4,6 μl
SYBR [®] Green I mešanica (2X)	2,5 μl	10,0 μl
mešanica zač. olig (2,5 μM)	0,6 μl	2,4 μl
DNA (16 ng/μl)	0,75 μl	3,0 μl
Σ	5,0 μl	20,0 μl

Preglednica 14: Vzorčne DNA uporabljene v reakcijah qPCR

Vzorec DNA		Genotip
Izvor	Oznaka	<i>Cyp51</i> ; Cre
jetra	LKO 50	<i>lox/lox</i> ; +
	LKO 53	<i>lox/-</i> ; +
	LKO 60	<i>lox/lox</i> ; +
	LKO 64	<i>lox/lox</i> ; +
	LKO 65	<i>lox/-</i> ; +
	LKO 66	<i>lox/-</i> ; +
zarodki	96.3	-/-
	102.1	+/+
	102.4	+/-
rep	LKO 50	<i>lox/lox</i> ; +
	LKO 53	<i>lox/-</i> ; +

Mikrocentrifugirke, v katere smo za en vzorec DNA namešali 17 μl reakcijske mešanice z ustreznimi pari začetnih oligonukleotidov, smo dobro premešali na vibracijskem mešalu in izvedli kratko centrifugiranje. Zaradi lažjega in natančnejšega pipetiranja smo reakcijske

mešanice iz mikrocentrifugirk prepipetirali v nize mikrotiterskih ploščic, kamor smo predhodno nanесли 3 μ l ustrezne DNA. Od tam pa smo z multikanalno pipeto nanесли po 5 μ l mešanice v posamezno vdolbinico na plošči qPCR s 384 vdolbinicami. Na ploščo smo, kot negativno kontrolo, nanесли tudi vodo. Po končanem nanosu vzorcev smo ploščo qPCR zatesnili s folijo Sealin 480 (Roche) in kratko centrifugirali ter jo vstavili v aparaturu Light Cycler® 480 II (Roche), ki je izvedla reakcijo qPCR. Po končani reakciji je sledila analiza talilne krivulje s hitrostjo segrevanja 0,5 °C/5 s iz 60 °C na 95 °C, ki nam je omogočila določiti specifičnost začetnih oligonukleotidov.

3.2.8.1 Optimizacija pogojev qPCR s spreminjanjem časa podaljševanja DNA in številom ciklov

Pri parih začetnih oligonukleotidov *Cyp0* smo imeli težave z nezaželenimi daljšimi nespecifičnimi pomnožki, ki pa smo se jih skušali znebiti s spreminjanjem pogojev qPCR. S tem, ko smo izpustili korak podaljšanja pri 72 °C (preglednica 16), smo polimerazi pri vzorčnih DNA genotipov *Cyp51*^{+/-}, *Cyp51*^{lox/-}; *Cre*⁺ in *Cyp51*^{lox/lox}; *Cre*⁺ skušali onemogočiti, da bi s paroma *Cyp0*, poleg krajšega odseka alela *Cyp51*⁻, sintetizirala še daljše nespecifične pomnožke. Da smo se prepričali, če je prišlo do tvorbe nespecifičnih pomnožkov pri spremenjenih pogojih qPCR, smo izvedli reakcijo pri 50-ih ciklih. Opazili smo, da se pri izpuščenem koraku podaljševanja nove verige DNA nespecifični pomnožki tvorijo počasneje, saj smo specifične pomnožke zaznali pri mnogo nižjem številu ciklov kot nespecifične. Slednjih smo se zato poskušali znebiti z zmanjševanjem števila ciklov (preglednica 17) in s skrajševanjem časa prileganja začetnih oligonukleotidov in podaljševanja nove verige DNA pri 60 °C (preglednica 18).

Preglednica 15: Standardni pogoji qPCR

Korak	Temperatura	Čas	Št. ciklov
Aktivacija polimeraze	95 °C	10:00 min	1x
Denaturacija DNA	95 °C	10 s	50x
Prilaganje zač. olig.	60 °C	30 s	
Podaljševanje nove verige	72 °C	1 s	

Preglednica 16: Optimizacija qPCR z izpuščenim korakom podaljševanja pomnožkov pri 72 °C

Korak	Temperatura	Čas	Št. ciklov
Aktivacija polimeraze	95 °C	10:00 min	1x
Denaturacija DNA	95 °C	10 s	50x
Prilagajanje zač. olig. + podaljševanje	60 °C	30 s	

Koraki, ki smo jih optimizirali pri posameznih reakcijah so v tabelah označeni s poudarjeno črno

Preglednica 17: Optimizacija qPCR z zmanjšanim številom ciklov in skrajšanim časom podaljševanja za tvorbo pomnožkov alela *Cyp51*

Korak	Temperatura	Čas	Št. ciklov
Aktivacija polimeraze	95 °C	10:00 min	1x
Denaturacija DNA	95 °C	10 s	30x
Prilagajanje zač. olig. + podaljševanje	60 °C	27 s	

Preglednica 18: Optimizacija qPCR s skrajšanim naleganjem začetnih oligonukleotidov in podaljševanja nastajajočih pomnožkov

Korak	Temperatura	Čas	Št. ciklov
Aktivacija polimeraze	95 °C	10:00 min	1x
Denaturacija DNA	95 °C	10 s	30x
Prilagajanje zač. olig. + podaljševanje	60 °C	12 s	

Pri vseh poskusih optimizacije reakcije qPCR smo po analizi talilne krivulje pri paru začetnih oligonukleotidov Cyp01 še vedno zaznali nespecifične pomnožke. Odločili smo se, da bomo poskušali optimizirati qPCR s spreminjanjem reakcijske mešanice, tako da bi povišali koncentracijo kalijevega klorida (KCl).

3.2.8.2 Optimiziranje PCR pogojev pri različnih koncentracijah KCl

Henegariu in sod. (1997) poročajo, da višja koncentracija KCl prioritetno vpliva na sintezo krajših fragmentov DNA. V splošnem naj bi veljalo, da pari začetnih oligonukleotidov z daljšimi produkti pomnoževanja delujejo bolje pri nižjih koncentracijah soli, medtem ko pari začetnih oligonukleotidov s krajšimi produkti pomnoževanja delujejo bolje pri višjih

koncentracijah soli. Povišana koncentracija soli naj bi v koraku denaturacije otežkočila razprtje verig DNA daljših pomnožkov (Henegariu in sod., 1997).

Ker nam je par začetnih oligonukleotidov Cyp01 poleg izrezanega krajšega odseka alela *Cyp51*⁻ pomnoževal tudi daljše nespecifične pomnožke, smo najprej optimizirali koncentracijo soli in pogoje PCR le za ta par. Napipetirali smo šest reakcijskih mešanic PCR, ki so se razlikovale v koncentraciji KCl (30 mM, 50 mM, 70 mM, 90 mM, 100 mM in 110 mM). Koncentracija KCl v priloženem 10x pufru II je znašala 500 mM (končna koncentracija 50 mM), (Protocol ..., 2000). Reakcijske mešanice z različnimi koncentracijami KCl smo pripravili z dodajanjem ustrezne količine 4 M KCl k standardnim reakcijam, ob tem pa smo zmanjšali količino vode.

Za optimizacijo koncentracije KCl smo uporabili vzorčne DNA iz lizatov zarodkov miši, saj smo le pri njih imeli genotip *Cyp51*^{-/-}, ki nam je omogočil preverjanje specifičnosti pomnoževanja krajšega odseka alela *Cyp51*⁻ s parom začetnih oligonukleotidov Cyp01. Uporabljeni genotipi *Cyp51* vzorčnih DNA iz mišjih zarodkov so navedeni v preglednici 19. Želeli smo koncentracijo KCl, kjer par začetnih oligonukleotidov Cyp01 pri genotipu *Cyp51*^{+/-} ne bi podaljševal daljših nespecifičnih pomnožkov, ampak samo krajši odsek alela *Cyp51*⁻. V posamezno vdolbinico plošče PCR smo napipetirali po 15 µl reakcijske mešanice in 15 µl vzorca DNA s koncentracijo 20 ng/µl, s čimer smo želeli doseči boljšo vidnost ločenih pomnožkov na agaroznem gelu. Najprej smo pri standardnih pogojih PCR, ki so navedeni v preglednici 20 določili primerno koncentracijo KCl.

Preglednica 19: Vzorčne DNA pri optimizaciji KCl za par začetnih oligonukleotidov Cyp01

Vzorec DNA	Genotip <i>Cyp51</i>
102.1	+/+
102.2	+/+
102.3	+/-
102.4	+/-
102.5	-/-
102.7	-/-

Preglednica 20: Pogoji PCR pri optimizaciji z različnimi koncentracijami KCl za par Cyp01

Korak	Temperatura	Čas	Št. ciklov
Aktivacija polimeraze	94 °C	5:00 min	1x
Denaturacija DNA	94 °C	30 s	35x
Prileganje zač. olig.	60 °C	30 s	
Podaljšanje nove verige	72 °C	10 s	
Končno podaljšanje	72 °C	5:00 min	1x
Hlajenje	4 °C	∞	

Po analizi pomnožkov z gelsko elektroforezo smo določili, da začetni oligonukleotidi Cyp01 optimalno pomnožujejo pri koncentraciji KCl 110 mM. Reakcije PCR smo ponovno izvedli pri koncentraciji KCl 110 mM, tokrat za vse tri različne pare začetnih oligonukleotidov (Cyp+1, Cyp01 in Actb) in pri pogojih iz preglednice 21, ki so bolj podobni pogojem qPCR (cikel podaljševanja smo izpustili). Pri koncentraciji KCl 110 mM je par začetnih oligonukleotidov Actb pomnoževal nespecifične produkte, zato smo še zvišali koncentracijo KCl na 130 in 150 mM ter ponovno izvedli PCR pri pogojih iz preglednice 21. Pri koncentraciji KCl 150 mM so vsi trije pari tvorili specifične pomnožke.

Preglednica 21: Pogoji PCR pri koncentracijah KCl 110, 130 in 150 mM za vse tri pare začetnih oligonukleotidov

Korak	Temperatura	Čas	Št. ciklov
Aktivacija polimeraze	95 °C	5:00 min	1x
Denaturacija DNA	95 °C	30 s	35x
Prileganje zač. olig.	60 °C	30 s	

3.2.8.3 Reakcija qPCR z različnimi koncentracijami KCl

Po PCR optimizaciji koncentracije KCl, ki bi DNA polimerazi v reakciji qPCR onemogočila pomnoževanje daljših nespecifičnih pomnožkov pri heterozigotih in pri genotipih pogojnega izbitja gena *Cyp51*, smo določili kot optimalno koncentracijo KCl 150mM. Ker sestava komercialnih reagentov, ki se uporabljajo pri qPCR, ni znana, smo privzeli, da tako kot pufer navadnega PCR, tudi pufer SYBR vsebuje 50 mM KCl. Iz izhodiščne mešanice s 4 M KCl smo pripravili 100 mM KCl in tako teoretično dosegli, da je koncentracija KCl v reakcijski mešanici znašala 150 mM. Za 20 µl končnega volumna

reakcije s 100 mM KCl smo napipetirali 0,5 µl 4 M založnega KCl in dodali še 4,1 µl vode, 10 µl SYBR, 2,4 µl začetnih oligonukleotidov in 3 µl 16 ng/µl DNA. S preračunavanjem koncentracij KCl in vode smo pripravili še reakcijske mešanice s koncentracijama KCl 90 mM in 130 mM. V preglednici 22 so navedene količinske vrednosti reagentov reakcijske mešanice za 7 vzorcev (6 vzorcev DNA in voda) za izvedbo reakcije qPCR.

Preglednica 22: Sestave reakcijskih mešanic za 7 vzorcev pri različnih konc. KCl za qPCR

Komponente reakcijske mešanice z začetnimi konc.	90 mM KCl (7x)	130 mM KCl (7x)	150 mM KCl (7x)
Deionizirana voda	30,1 µl	29,4 µl	28,7 µl
KCl (4 M)	1,4 µl	2,8 µl	3,5 µl
SYBR® Green I mešanica (2X)	70 µl	70 µl	70 µl
Mešanica zač. olig. (2,5 µM)	16,8 µl	16,8 µl	16,8 µl
DNA (16 ng/µl)	21 µl	21 µl	21 µl

Reakcijo qPCR s spremenjenimi vrednostmi koncentracije KCl smo izvedli z genotipi vzorčnih DNA iz preglednice 19, pri pogojih iz preglednice 18. Ker po poskusih optimizacije reakcije qPCR s temperaturo podaljševanja nove DNA, številom ciklov in koncentracijo KCl še vedno nismo dobili zelenih rezultatov (specifični pomnožki krajšega odseka alela *Cyp51* pri paru začetnih oligonukleotidov Cyp01), smo opustili optimizacijo poskusa in naročili nove začetne oligonukleotide. Neuspešni rezultati optimizacije qPCR so prikazani v poglavju Rezultati, podpoglavje 4.4

3.2.9 Načrtovanje novih začetnih oligonukleotidov

Ponovno smo s programom Primer3 načrtovali nove začetne oligonukleotide. Osredotočili smo se na iskanje novega para začetnih oligonukleotidov, ki bi pri heterozigotih in pri genotipih pogojnega izbitja gena *Cyp51* pomnoževal le alel *Cyp51*, daljših nespecifičnih pomnožkov pa ne. V programu Primer3 smo zopet s funkcijo »Targets« označili neizrezano mesto *lox*, ki nam ga je program upošteval pri načrtovanju novih začetnih oligonukleotidov. Shema prileganja izbranega novega para je prikazana z rdečima puščicama na sliki 18 in je označen kot »Cyp01 (novi)«.

3.2.10 PCR testiranje novih začetnih oligonukleotidov

Po navodilih dobavitelja (Sigma-Aldrich, Nemčija) smo iz vsakega novega liofiliziranega začetnega oligonukleotida pripravili založno raztopino s koncentracijo 100 μ M, ki smo jih nato 10-krat redčili, da smo dobili delovne redčine začetnih oligonukleotidov (10 μ M) za pripravo reakcijske mešanice za PCR iz preglednice 5. Na genotipih *Cyp51^{lox/-}* in *Cyp51^{lox/lox}* smo testirali različne kombinacije začetnih oligonukleotidov (preglednica 23) in tako izbrali par, ki je pri *Cyp51^{lox/-}*; Cre⁺ pomnoževal le krajši odsek alela *Cyp51*⁻. Ostale reagentne reakcije PCR smo namešali enako kot običajno in jo izvedli pri pogojih iz preglednice 24.

Preglednica 23: Kombinacije novih parov začetnih oligonukleotidov v reakcijski mešanici PCR

Oznaka para zač. olig.	Par zač. olig.	Pričakovane dolžine pomnožkov pri različnih alelih <i>Cyp51</i> (bp)
Cyp01(novi)	5loxF_1/3loxR_2	249 (<i>Cyp51</i> ⁻); 1789 (<i>Cyp51</i> ⁺); 1963 (<i>Cyp51^{lox}</i>)
Cyp02(novi)	3loxR_1/5loxF_1	255 (<i>Cyp51</i> ⁻); 1775 (<i>Cyp51</i> ⁺); 1949 (<i>Cyp51^{lox}</i>)
Cyp03(novi)	5loxF_2/3loxR_1	259 (<i>Cyp51</i> ⁻); 1779 (<i>Cyp51</i> ⁺); 1953 (<i>Cyp51^{lox}</i>)
Cyp04(novi)	3loxR_2/5loxF_2	253 (<i>Cyp51</i> ⁻); 1773 (<i>Cyp51</i> ⁺); 1947 (<i>Cyp51^{lox}</i>)
Cyp05(novi)	3loxR_3/5loxF_3	263 (<i>Cyp51</i> ⁻); 1783 (<i>Cyp51</i> ⁺); 1957 (<i>Cyp51^{lox}</i>)

Preglednica 24: Pogoji PCR pri testiranju novih parov začetnih oligonukleotidov

T (°C)	Čas	Št. ciklov
94	5:00 min	1x
94	30 s	35x
58	30 s	
72	30 s	
72	7:00 min	1x
4	∞	

3.2.11 Končna reakcija qPCR z izoliranimi vzorci DNA

Z izbranimi pari začetnih oligonukleotidov Cyp01(novi), Cyp+1 in Actb (preglednica 25) smo z vzorčnimi DNA iz repov, zarodkov in jeter, ki so navedeni v preglednici 14, izvedli reakcijo qPCR pri pogojih iz preglednice 26. Količine posameznih reagentov za en

biološki vzorec so navedene v preglednici 13. Količinsko smo napipetirali reagentov za 35 bioloških vzorcev, saj smo vseh 11 vzorčnih DNA na ploščo qPCR s 384 vdolbinicami nanesli s tremi tehničnimi ponovitvami. Preostala količina reagentov pa je predstavljala dve rezervi.

Preglednica 25: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za končno reakcijo qPCR

Oznaka para zač. olig.	Par zač. olig.	Zaporedje zač. olig.	Pričakovane dolžine pomnož. alelov <i>Cyp51</i> (bp)
Cyp+1	Cyp+F1/Cyp+R1	AATGCTGAGAGCAACGGACT x TCCCACCTCCTGTCTTCATC	0 (<i>Cyp51</i> ⁻); 143 (<i>Cyp51</i> ⁺); 143 (<i>Cyp51</i> ^{lox})
Cyp01(novi)	5loxF_1/3loxR_2	CGTGGATTCTGCTGATCAAA x TCAGCACCCCTTCTCATTA	249 (<i>Cyp51</i> ⁻); 1789 (<i>Cyp51</i> ⁺); 1963 (<i>Cyp51</i> ^{lox})
Actb	Actin-F/Actin-R	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC x CAATAGTGATGACCTGGCCGT	138 (vsi trije aleli)

Preglednica 26: Pogoji za izvedbo končne reakcije qPCR

Korak	Temperatura	Čas	Št. ciklov
Aktivacija polimeraze	95 °C	10:00 min	1x
Denaturacija DNA	95 °C	10 s	30x
Prilagajanje zač. olig.	58 °C	30 s	
Podaljševanje nove verige	72 °C	1 s	

3.2.12 Končna analiza

Programska oprema aparature za reakcijo qPCR sama določi linijo mejne vrednosti fluorescence, ki je višja od fluorescence ozadja in jo morajo doseči preiskovani vzorci. Fluorescenca je sorazmerna s številom kopij DNA v reakciji. V mejni vrednosti fluorescence, imajo vsi vzorci enako število kopij DNA, vendar jo vsak doseže pri različnem ciklu (točka Cp), ki je odvisna od količine izhodne DNA v vzorcu. Iz vrednosti Cp se lahko preračuna izhodna količina DNA v vzorcu (Ginzinger, 2002; Your one-stop-shop ..., 2004). Iz pridobljenih vrednosti Cp smo s pomočjo programa *Microsoft Office Excel 2007* preračunali podatke in nato izrisali grafe, ki prikazujejo deleže alelov *Cyp51*⁻ in alelov *Cyp51*^{lox} v vzorčnih DNA. V prvem koraku smo iz triplikatov (tri tehnične

ponovitve enega biološkega vzorca) vrednosti Cp izračunali koeficiente variance (CV) in posamezne vrednosti tehničnih ponovitev, ki so povzročila odstopanja za več kot 5 % izločili iz nadaljnje analize. Do odstopanj (> 5 %) je prišlo le izjemoma in so bile posledice napak v pipetiranju. Izločili smo tisto tehnično ponovitev, ki je najbolj odstopala od vrednosti povprečja triplikatov ter CV pri takšnih bioloških vzorcih izračunali iz duplikatov (dve tehnični ponovitvi enega biološkega vzorca). Vrednosti Cp posameznega para začetnih oligonukleotidov smo nato korigirali glede na koeficient učinkovitosti reakcije. V nadaljevanju smo izvedli normalizacijo na referenčni gen *Actb*. Pri vseh vzorcih smo nato iz normaliziranih vrednosti izračunali povprečje tehničnih ponovitev vsakega vzorca. Iz podatkov učinkovitosti smo za para *Cyp+1* in *Cyp01*(novi) izrisali grafe, ki so vsebovali deleže posameznih alelov pri kontrolnih DNA iz zarodkov in vzorčnih DNA iz repa in jeter. Pridobljene vrednosti Cp in preračunane vrednosti deležev posameznih alelov *Cyp51* v preiskovanih vzorčnih DNA so podane v Prilogi.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN KVALITETE DNA

Za naše kasnejše delo z reakcijo qPCR je bilo pomembno, da smo iz vzorcev izolirali ustrezno kvaliteto DNA in ji določili koncentracijo. Zato smo uporabili spektrofotometrično metodo, ki določa koncentracijo na podlagi absorbcije pri A260 in oceni kvaliteto DNA z izračuni razmerji A260/A280 in A260/A230. Razmerje A260/A280 nam je lahko odkrilo onesnaženje izolirane DNA s proteini, razmerje A260/A230 pa z organskimi spojinami (fenol, trizol in drugi aromati). Idealno razmerje v obeh primerih je med 1,8–2,2. Kot prikazujejo vrednosti podane v preglednici 27, naši izolirani vzorci DNA niso vsebovali onesnaževalcev, ki bi lahko motili qPCR. Lahko sklepamo, da smo izolirali DNA ustrezne koncentracije, količine in kvalitete.

Preglednica 27: Koncentracije ter vrednosti A260/A280 in A260/A230 izoliranih vzorčnih DNA

Vzorec DNA		Genotip <i>Cyp51</i> in prisotnost Cre (+)	Konc. vzorčne DNA (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
Izvor	Oznaka				
jetra	LKO 50	<i>lox/lox</i> ; +	1314,53	1,99	2,09
	LKO 64	<i>lox/lox</i> ; +	952,96	1,94	1,94
	LKO 60	<i>lox/lox</i> ; +	1408,24	1,97	2,13
	LKO 53	<i>lox/-</i> ; +	1800,88	1,96	2,15
	LKO 66	<i>lox/-</i> ; +	1212,01	1,98	2,13
	LKO 65	<i>lox/-</i> ; +	1001,92	1,96	2,11
zarodki	96.3	-/-	1024,91	2,04	2,22
	102.1	+/+	1152,37	1,99	2,19
	102.4	+/-	933,97	2,04	2,2
rep	LKO 50	<i>lox/lox</i> ; +	752,31	1,97	2,11
	LKO 53	<i>lox/-</i> ; +	914,82	1,97	2,14

4.2.1 Načrtovani začetni oligonukleotidi

```

1 AGTCTATTCTTGACACTGAAGGAAAAAAAAAAGATACAGTTTAAATTTGTATAAAAAGTCT
61 TTGTGTCTCTATTAGTATGTGCACCTAAATGCAGTTGCTTGCCAAGGCCAGAAGAGGGCA
121 CTGTATCCCCTAGAGATAAAGCTATAATCAGATGTGAGCTGACCAGTATGGGTTCTGGGA
181 ACCAAACTCAGATCCTCTGCAAGAAAAGAGCCATACACCAGTTGTTATACCACACTCCTT
241 CTGATATACTTGTGCAAATACTTAATGGTAGTGATTCTTTGATGTTATTTGGTTCGTGGA
301 TTCTGCTGATCAAATTCAGGTCACCAGACTTGATGGCAAGAGATTTTTACCTACCTGGCC
>>>>>>>>>>>>>>>>

361 ATCCCACCAGCCCCGTAAATTAATTTTTACAAGAGGGAAAAAATATTTATATTCTTAT
421 AGATGTTGATTAAAGAATTAAGCTTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATA
*****

481 ATGTACAGAACAAAATACAGTAGGTGCGGAAGGGCCACGTCTCTAATGAGAAGGGGGTGC
***** <<<<<<<<<<<<<<<<<<

541 TGACTIONGTGCAGTGGTAATGGCCAACCCTGCCTTTACAGAGCACTTCTAAGTATTGTC
601 TTCAGAGAGCAATTGGCATGTCTGTACCAGCAGCAGTATCTGCTTCTAGGCCAGTACGAT
661 CTCAGGCAGCAGGTTGCCACCTTCCCAGGCTGGCCATCAGCCCCTGTAGAAGGTGTAGAC
721 AAACACCCACAGCTGATGTAACATAATGTGTTTACTAGTCTCAAAGAAGCTGATGCATGC
781 ATTAGCACACCTAGTAATTAACCTTACTTGTGAAGGGCTTGCCGAGTAGTTAGGGAACTTC
841 CTGCATCCTGGGCTTACAGGCATGATCTTACCT

```

Slika 21: Primer mesta naleganja para začetnih oligonukleotidov Cyp01 pri izrezanem alelu *Cyp51*

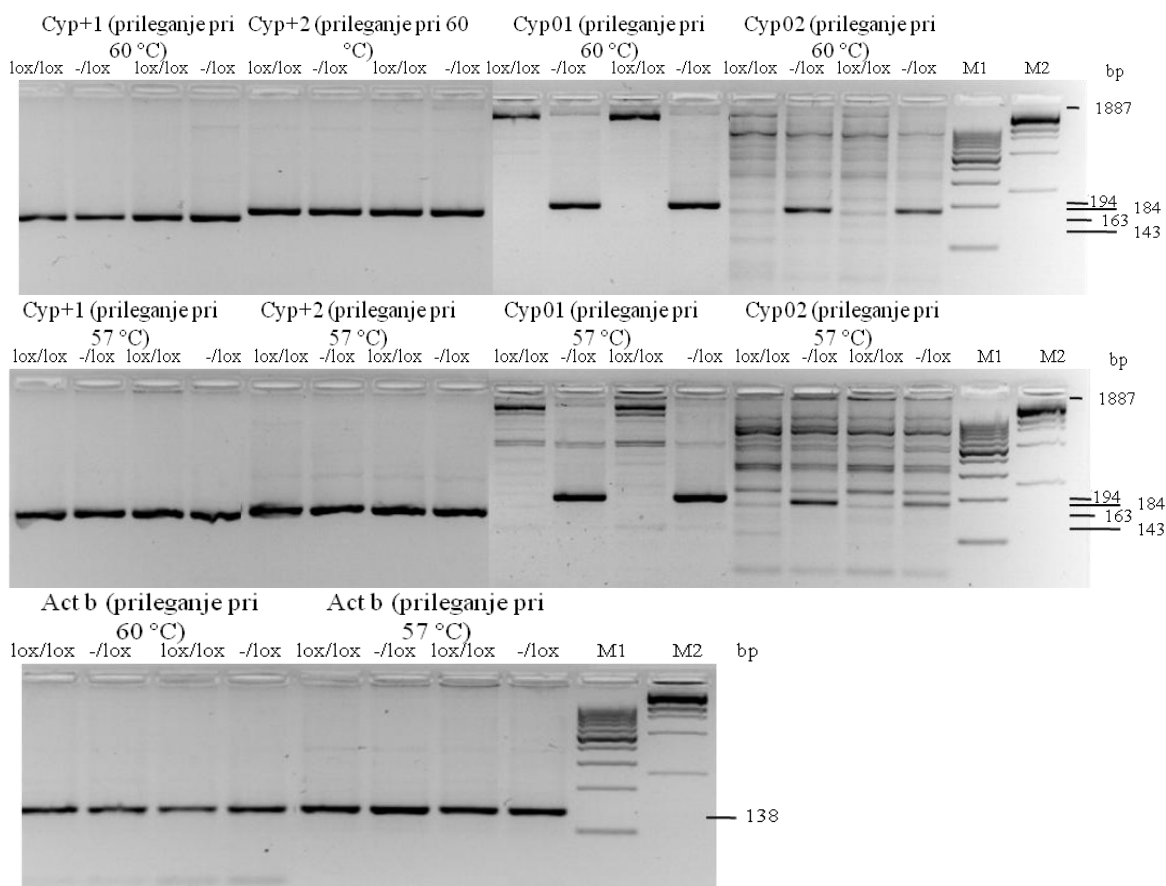
Ponujena začetna oligonukleotida para Cyp01 in njuni legi v zaporedju alela *Cyp51*⁻ sta označeni z rumeno barvo in obdajata neizrezano zaporedje *lox*, ki je označeno z zvezdicami (tarča), s čimer je bilo zagotovljeno njegovo pomnoževanje. Par Cyp01 pri alelu *Cyp51*⁻, zaradi izreza s Cre, tvori krajše pomnožke kot pa pri alelu *Cyp51*⁺ oz. *Cyp51*^{lox}, kjer do izreza ni prišlo. Načrtovali smo po dva para začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje alelov *Cyp51*⁻ in *Cyp51*^{lox} oz. *Cyp51*⁺. Zaporedja začetnih oligonukleotidov in pričakovane dolžine njihovih pomnožkov podaja preglednica 28.

Preglednica 28: Načrtovani pari začetnih oligonukleotidov in njihove pričakovane dolžine pomnožkov PCR pri različnih alelih *Cyp51*

Par zač. olig.	Par zač. olig.	Zaporedje zač. olig.	Pričakovane dolžine pomnožkov alelov <i>Cyp51</i> (bp)
Cyp+1	Cyp+F/Cyp+R1	AATGCTGAGAGCAACGGACT x TCCCACCTCCTGTCTTCATC	143 (<i>Cyp51</i> ⁺); 0 (<i>Cyp51</i> ⁻); 143 (<i>Cyp51</i> ^{lox})
Cyp+2	Cyp+F2/Cyp+R2	GGAGGTGGGATATGACCAGA x GCCCACCATGGTAAAGCTAA	163 (<i>Cyp51</i> ⁺); 0 (<i>Cyp51</i> ⁻); 163 (<i>Cyp51</i> ^{lox})
Cyp01	Cyp0F1/Cyp0R1	CACCAGACTTGATGGCAAGA x CCCTTCCGCACCTACTGTAT	1713 (<i>Cyp51</i> ⁺); 194 (<i>Cyp51</i> ⁻); 1887 (<i>Cyp51</i> ^{lox})
Cyp02	Cyp0F2/Cyp0R2	TTTTTACCTACCTGGCCATCC x ATTAGAGACGTGGCCCTTCC	1704 (<i>Cyp51</i> ⁺); 184 (<i>Cyp51</i> ⁻); 1878 (<i>Cyp51</i> ^{lox})

4.2.2 Testiranje začetnih oligonukleotidov

Slika 22 prikazuje elektroforezno ločbo pomnožkov PCR vseh petih parov začetnih oligonukleotidov pri temperaturah prileganja na matrično DNA 57 oz. 60 °C. Izmed obeh parov za preverjanje vsakega alela smo želeli dobiti tisti par Cyp0 oz. Cyp+, ki je specifično pomnoževal le alel *Cyp51*⁻ oz. alel *Cyp51*⁺ in *Cyp51*^{lox}. Nanesli smo vzorce DNA genotipov *Cyp51*^{lox/lox} (na gelu oznaka lox/lox) in *Cyp51*^{+/lox} (oznaka -/lox), ki smo jih pomnoževali s pari začetnih oligonukleotidov Cry+1, Cyp+2, Cyp01, Cyp02 ter Actb. Za določevanje dolžin posameznih odsekov pomnožkov smo uporabili 100 bp (M1) in 1000 bp (M2) molekularni lestvici. Dolžine fragmentov molekularne lestvice so podane na sliki 20. Na desni strani slike 22 in tudi pri vseh nadaljnjih slikah agaroznih gelov so podane vrednosti dolžin pomnožkov posameznih parov začetnih oligonukleotidov. Analiza agaroznega gela je pri temperaturi prileganja 60 °C pokazala pomnožke pričakovanih dolžin pri vseh parih začetnih oligonukleotidov, zato smo jih lahko uporabili pri qPCR.



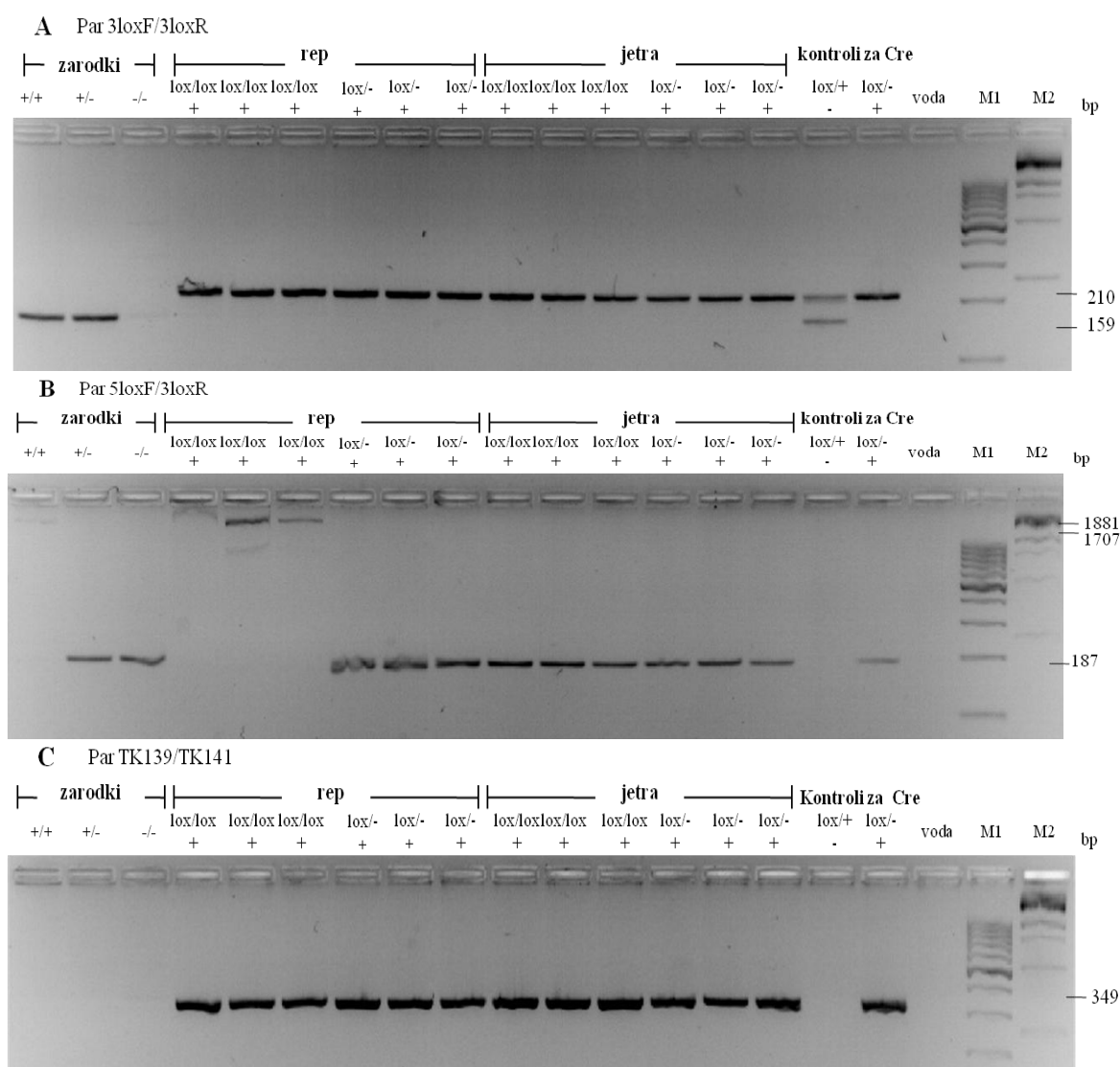
Slika 22: Testiranje specifičnosti začetnih oligonuleotidov pri temperaturah prileganja 60 / 57 °C

4.3 PONOVRNO PREVERJANJE GENOTIPOV IZOLIRANIH VZORCEV DNA

Na podlagi predhodne genotipizacije miši iz ušesnih lizatov smo po izolaciji DNA iz repov in jeter istih živali še enkrat preverili njihov genotip, kar prikazuje elektroforezna ločba na sliki 23. Pravilno določeni genotipi vzorčnih DNA so bili pogoj za kasnejšo reakcijo qPCR. Prve tri nanesene vzorčne DNA so izhajale iz mišjih zarodkov odbranih na stopnji E13,5 (pozitivne kontrole za vse genotipe gena *Cyp51*), sledijo vzorčne DNA, LKO, iz repov in jeter osem tednov starih miši z genotipoma *Cyp51^{lox/lox}; Cre⁺* in *Cyp51^{lox/-}; Cre⁺*, nato pa še vzorčni kontroli za Cre (nanesene vzorčne DNA so navedene v preglednici 11). V en žepček agaroznega gela smo nanesli tudi vodo (negativna kontrola), s čimer smo se prepričali, da reagenti v reakciji PCR niso bili onesnaženi z DNA. V zadnja dva žepka smo nanesli še raztopini 100 bp (M1) in 1 kbp (M2) molekularnih lestvic.

S parom začetnih oligonuklotidov 3LoxF/3LoxR (slika 23 A) smo preverjali prisotnost mesta *lox* (alel *Cyp51^{lox}*) na 3'-koncu vzorčnih DNA. Ciljni mesti naleganja začetnih oligonukleotidov para 3LoxF/3LoxR sta se nahajali v eksonu 4 in intronu 5 (slika 19), zato sta pri alelu *Cyp51^{lox}* pomnožila odsek DNA z zaporedjem mesta *lox* in tako tvorila pomnožke dolžine 210 bp. Zaradi odsotnosti mesta *lox* pri alelu *Cyp51⁺* je par tvoril pomnožke dolžine 159 bp, ki so tako v gelu prepotovali najdaljšo razdaljo (genotipa *Cyp51^{+/-}* in *Cyp51^{+/+}*). Pri alelu *Cyp51⁻* ni bilo pomnožkov, saj je bilo vezavno mesto začetnega oligonukleotida 3LoxF izrezano zaradi delovanja Cre. Pri genotipu *Cyp51^{-/-}* tako nismo dobili pomnožkov. Vzorčne DNA z genotipoma *Cyp51^{lox/-}*; Cre⁺ in *Cyp51^{lox/lox}*; Cre⁺ so v jetrih specifično izražale rekombinazo Cre, ki je z izrezovanjem tvorila alel *Cyp51⁻*, vendar pa izbitje ni bilo popolno, zato smo zaznali tudi pomnožke alela *Cyp51^{lox}*. V tkivu repa je mesto *lox* ostalo neizrezano zaradi neizražanja Cre. Pri pomnoževanju s parom 3LoxF/3LoxR smo pri vseh vzorcih DNA zaznali pomnožke dolžine 210 bp, saj so vse vzorčne DNA (izjemoma DNA zarodkov in voda) vsebovale zaporedja *lox*.

S parom 5LoxR/3LoxF (slika 23 B) smo preverjali prisotnost krajšega alela *Cyp51⁻* v vzorcih DNA, ki se je tvoril z izrezom eksona 3 in 4 na lokusu *Cyp51* z rekombinazo Cre. Pri izrezanem alelu *Cyp51⁻* sta si bili mesti prileganja začetnih oligonukleotidov para 5LoxR/3LoxF bližji, kot pri neizrezanem alelu *Cyp51^{lox}*, zato sta tvorila pomnožke dolžine 187 bp. Mesti prileganja začetnih oligonukleotidov pri neizrezanih alelih *Cyp51⁺* in *Cyp51^{lox}* pa sta si bili medsebojno bolj oddaljeni, zato sta tvorila pomnožke dolžine 1707 oz. 1881 bp. Par 5LoF/3LoxR je tvoril pomnožke alela *Cyp51⁺* dolžine 1707 bp pri vzorčnih DNA iz zarodkov zaradi odsotnosti mest *lox*. Zaradi delovanja rekombinaze Cre v jetrih, smo krajše pomnožke alela *Cyp51⁻* (187 bp) zaznali pri vseh vzorčnih DNA iz jeter, nismo pa jih zaznali pri vzorčnih DNA iz repa, kljub temu, da so vsebovale zapis za Cre in da je znano, da se albumin izraža tudi v mišjih skeletnih mišicah (Wagatsuma in sod., 2002). Pri repnih vzorcih z genotipom *Cyp51^{lox/lox}*; Cre⁺ (LKO 50, LKO 64 in LKO 60) smo zaznali le pomnožke dolžine 1881 bp. Pri repnih vzorcih (LKO 53, LKO 65 in LKO 66) z genotipom *Cyp51^{lox/-}*; Cre⁺ je bila zaznava krajšega fragmenta 187 bp posledica podedovanega alela *Cyp51⁻*, s čimer je bila dosežena višja stopnja izbitja gena *Cyp51*.



Slika 23: Preverjanje predhodne genotipizacije vzorčnih DNA z genotipi *Cyp51*^{+/+} (+/+), *Cyp51*^{+/-} (+/-), *Cyp51*^{-/-} (-/-), *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺ (lox/lox; +) in *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ (lox/-; +) ter zapisom za Cre (+ in -)

Par začetnih oligonukleotidov TK139/TK141 nam je omogočil zaznavo prisotnosti transgenega zapisa za rekombinazo Cre v vzorčnih DNA (slika 23 C). Dolžina pomnožka para je znašala 349 bp. Vzorec je bil pozitiven za Cre (Cre⁺), če je v svojem genomu vseboval zapis za rekombinazo Cre in negativen (Cre⁻), če ga ni vseboval. Vse vzorčne DNA iz repa in jeter so vsebovale zapis za Cre, negativna kontrolna vzorčna DNA za Cre ter vzorčne DNA iz mišjih zarodkov pa ga niso vsebovale.

Mišji zarodek s popolnoma izbitim genom *Cyp51* (genotip *Cyp51*^{-/-}) propade v obdobju E15 (Keber in sod., 2011), zato lahko posledice izbitja gena *Cyp51* pri živem organizmu

preučujejo le s pomočjo heterozigotov ali s pogojnim izbitjem gena v posameznih tkivih. Znano nam je bilo, da delovanje rekombinaze Cre v ciljnem tkivu ni popolno, zato smo morali najprej določiti delež izreza, s katerim bi v prihodnje povezali vpliv gena *Cyp51* na fenotip živali. Z navadnim PCR smo lahko preiskovanemu vzorcu DNA določili le genotip, deleža med izrezanim alelom *Cyp51*⁻ in neizrezanim alelom *Cyp51*^{lox} pa nam ta metoda ni mogla podati. Delež posameznih alelov smo lahko določili z reakcijo qPCR, kjer pa nam pari začetnih oligonukleotidov niso tvorili specifičnih pomnožkov, zato smo jo optimizirali na različne načine.

4.4 OPTIMIZACIJA qPCR ZA DOLOČITEV DELEŽA IZREZA GENA *Cyp51*

4.4.1 Talilne temperature (*T_m*)

Po končani reakciji qPCR smo izvedli analizo talilne krivulje, s katero smo preverili specifičnost začetnih oligonukleotidov. Para začetnih oligonukleotidov Cyp01 in Cyp02 (dalje Cyp0) sta nam v qPCR pri vzorčnih DNA genotipov *Cyp51*^{+/-}, *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ in *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺, poleg krajšega alela *Cyp51*⁻, pomnoževala tudi daljše nespecifične pomnožke. Posledično smo dobili pomnožke različnih dolžin, kar pa je bil neželjen rezultat. Pri *T_m*, kjer pomnožek razpade, barvilo SYBR Green disociira od dvovijačnice in preneha svetiti. Na talilni krivulji se s prenehanjem svetjenja barvila izriše značilen vrh, ki nato začne padati zaradi upadanja signala fluorescence. Različno dolgi pomnožki razpadejo pri različnih *T_m*. Pri vzorčnih DNA smo zaradi nespecifičnega pomnoževanja parov Cyp0 dobili po dve *T_m* za vsak vzorec. Iz vrednosti *C_p* pri vzorcih z dvema *T_m* pa ni bilo možno določiti uspešnosti izreza, ki ga je narekovala Cre, zato smo izvedli več različnih reakcij qPCR, kjer smo spreminjali čas prileganja začetnih oligonukleotidov in podaljševanja nove verige ter število ciklov qPCR. Naš cilj so bili pogoji, pri katerih bi par Cyp01 ali Cyp02 pri kontrolnih DNA genotipa *Cyp51*^{+/-} in pri vzorčnih DNA s pogojno izbitim genom genotipov *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ in *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺ specifično pomnoževal le izrezan krajši odsek alela *Cyp51*⁻. Preglednica 29 prikazuje pričakovane rezultate različnih parov začetnih oligonukleotidov pri različnih genotipih gena *Cyp51* vzorčnih DNA.

Preglednica 29: Pričakovani rezultati pri parih začetnih oligonukleotidov Cyp+, Cyp0 in Actb

Vzorec	Genotip	Par	Par	Par
DNA	<i>Cyp51; Cre</i>	Cyp+	Cyp0	Actb
102.1.	+/+	da	ne	da
102.3	+/-	da	da	da
96.3.	-/-	ne	da	da
LKO 50	<i>lox/lox</i> ;	da	da	da
LKO 53	<i>lox/-</i> ;	da	da	da

Legenda: Da: par začetnih oligonukleotidov bi moral pomnožiti izbran odsek DNA
Ne: par ne bi smel pomnožiti določenega odseka DNA

Rezultati podani v preglednicah 30–33 podajajo vrednosti Tm in Cp pri različnih vzorčnih DNA, ki smo jih pomnoževali z različno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, navedeni v preglednici 4, v različnih reakcijah qPCR. Iz podatkov je razvidno, da nekateri pari pri vseh ali določenih genotipih niso tvorili specifičnih pomnožkov. Zabeleženi dve Tm pri eni vzorčni DNA sta nakazovali na nespecifične pomnožke različnih dolžin, kar pomeni, da določen par začetnih oligonukleotidov ni pomnoževal optimalno. Težave smo imeli predvsem pri obeh parih Cyp0, ki bi morala pomnoževati le izrezan krajši odsek alela *Cyp51*⁻ in pri obeh parih Cyp+1 in Cyp+2 (dalje Cyp+), ki pa alela *Cyp51*⁻ ne bi smela pomnoževati. Z optimizacijo pogojev qPCR smo se želeli znebiti dveh Tm. Vse temperature so podane v °C. Rezultat, kjer je Cp večji od 30, ni bil zadovoljiv. Neželeni rezultati pri vzorčnih DNA z dvema Tm so obarvani sivo.

Preglednica 30: Nezadovoljivi rezultati pri standardnih pogojih qPCR z dvema Tm pri vseh genotipih pomnoženih s paroma Cyp0 ter pri genotipu *Cyp51*^{-/-} pomnoženim s paroma Cyp+

Vzorec	Genotip	Par Cyp+1			Par Cyp+2			Par Cyp01			Par Cyp02			Par Actb		
		Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2
102.1.	+/+	23	76		23	76		45	73	80	29	79	84	22	84	
102.3	+/-	24	76		24	76		26	72	77	25	76	84	22	84	
96.3.	-/-	45	79	83	45	78	82	26	72	77	25	75	84	24	84	
LKO50	<i>lox/lox</i> ;	24	76		23	76		24	72	77	24	75	84	21	84	
LKO53	<i>lox/-</i> ;	25	76		25	76		24	72	77	24	76	84	22	84	

Neželeni rezultati, kjer je par začetnih oligonukleotidov tvoril različna pomnožka, so obarvani sivo

Vrednosti Tm in Cp reakcije qPCR pri pogojih iz preglednice 15 so podane v preglednici 30. Oba para začetnih oligonukleotidov Cyp0 sta nam pri vseh genotipih vzorčnih DNA

podala vsak po dve Tm, kar je onemogočilo določevanje obsežnosti izreza. Oba para Cyp+ sta tvorila pomnožke pri genotipu *Cyp51*^{-/-}, čeprav so prišli do izraza šele pri velikem številu ciklov.

Ker sta nam oba para začetnih oligonukleotidov Cyp0 pri vseh genotipih gena *Cyp51* tvorila nespecifične pomnožke, smo se s spreminjanjem pogojev za novo reakcijo qPCR poskušali znebiti dveh Tm. Ker DNA polimeraza tvori dvovijačnico že v fazi prileganja začetnih oligonukleotidov na matrično DNA pri 60 °C, smo izpustili korak tvorbe dvovijačnice pri temperaturi 72 °C (preglednica 16). S tem smo želeli omogočiti DNA polimerazi, da bi s paroma Cyp0 pomnožila le alel *Cyp51*⁻. Vrednosti Tm in Cp reakcije qPCR pri pogojih iz preglednice 16 so navedene v preglednici 31. Kljub temu, da so bile vrednosti Cp pri večini vzorcev pod 30 cikli, pa smo še vedno imeli dve Tm pri parih Cyp0. Ker je par Cyp02 tvoril pomnožke tudi pri genotipu *Cyp51*^{+/+}, smo se odločili, da ga izključimo iz nadaljnjih laboratorijskih poskusov. Tudi para Cyp+ nam pri genotipu *Cyp51*^{-/-} nista dala zelenih rezultatov, saj je Cyp+1 pomnoževal dva različna pomnožka, Cyp+2 pa je imel vrednost Cp 33. Potrebna je bila še nadaljnja optimizacija qPCR.

Preglednica 31: Vrednosti Cp in Tm po optimizaciji qPCR z izpuščenim korakom podaljševanja pri 72 °C

Vzorec DNA	Genotip <i>Cyp51</i> ;Cre	Par Cyp+1			Par Cyp+2			Par Cyp01			Par Cyp02			Par Actb		
		Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2
102.1.	+/+	23	76		23	76		44	80		26	80	84	22	84	
102.3	+/-	24	76		24	76		26	72	78	24	75	84	22	84	
96.3.	-/-	33	75	82	33	82		25	72	78	24	75	84	24	84	
LKO50	<i>lox/lox</i> ;+	24	76		23	76		24	72	78	25	75	84	21	84	
LKO53	<i>lox/-</i> ;+	25	76		25	76		24	72	78	23	76	84	22	84	

Z nadaljnjo optimizacijo qPCR, kjer smo zmanjšali število ciklov in skrajšali čas pomnoževanja DNA polimeraze (preglednica 17), smo želeli omogočiti paru Cyp01, da bi tvoril le pomnožke alela *Cyp51*⁻. Obenem pa smo se želeli znebiti pomnoževanja genotipa *Cyp51*^{-/-} s paroma Cyp+. Optimizacija qPCR nam je pri pogojih iz preglednice 17 že skoraj uspela, saj para Cyp+ nista več pomnoževala alela *Cyp51*⁻. Še vedno pa sta bili problematični po dve Tm pri paru Cyp01, ki sta bili posledica nespecifičnega pomnoževanja. Vrednosti Cp in Tm s pogoji iz preglednice 17 so podane v preglednici 32.

Preglednica 32: Vrednosti Cp in Tm po optimizaciji qPCR z zmanjšanim številom ciklov ter skrajšanim časom pomnoževanja s polimerazo

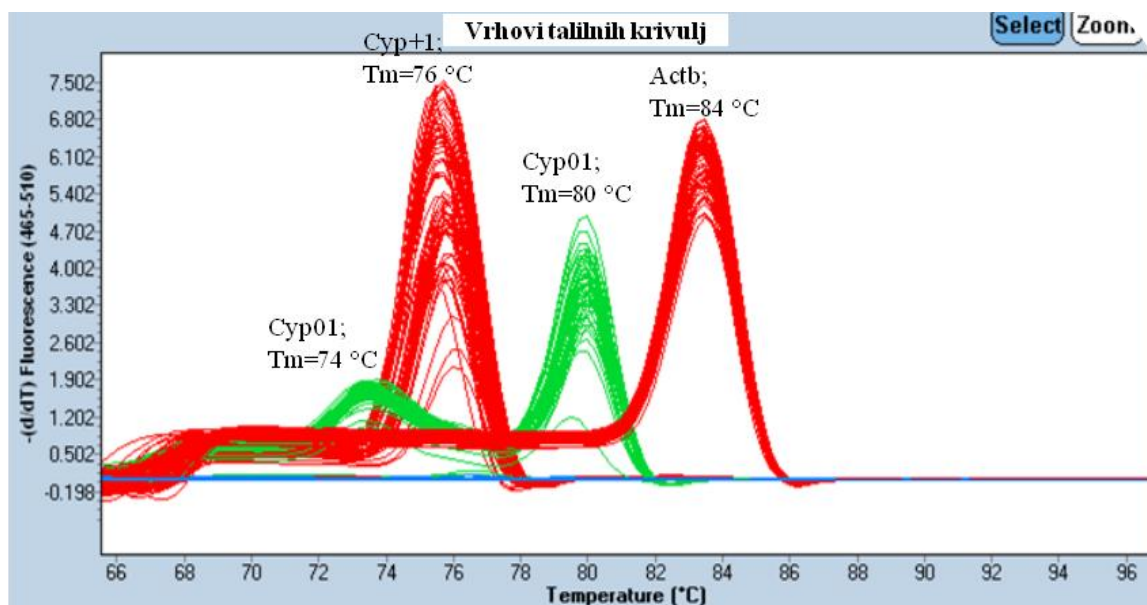
Vzorec DNA	Genotip <i>Cyp51</i> ;Cre	Par Cyp+1			Par Cyp+2			Par Cyp01			Par Actb		
		Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2
102.1.	+/+	23	76		23	76					22	84	
102.3	+/-	24	76		24	76		26	74	80	22	84	
96.3.	-/-							25	74	80	24	84	
LKO50	<i>lox/lox</i> ;	25	76		23	76		24	74	80	21	84	
LKO53	<i>lox/-</i> ;	25	76		25	76		24	74	80	22	84	

Naš cilj je bil še vedno z optimizacijo pogojev qPCR, kjer smo skrajšali čas naleganja začetnih oligonukleotidov in podaljševanja nove verige iz 27 na 12 s (preglednica 18), omogočiti paru Cyp01, da pri genotipih *Cyp51*^{+/+}, *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ in *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺ tvoril samo pomnožke krajšega odseka *Cyp51*⁻, daljših nespecifičnih pomnožkov pa ne. Med paroma Cyp+ smo za nadaljnje delo izbrali par Cyp+1. Vrednosti Cp in Tm reakcije qPCR pri pogojih iz preglednice 18 so navedene v preglednici 33.

Preglednica 33: Vrednosti Cp in Tm po optimizaciji qPCR s skrajšanim časom naleganja začetnih oligonukleotidov in pomnoževanja s polimerazo

Vzorec DNA	Genotip <i>Cyp51</i> ;Cre	Par Cyp+1			Par Cyp01			par Actb		
		Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2
102.1.	+/+	25	76					23	84	
102.3	+/-	25	76		25	74	80	24	84	
96.3.	-/-				25	74	80	25	84	
LKO50	<i>lox/lox</i> ;	25	76		25	74	80	22	84	
LKO53	<i>lox/-</i> ;	25	76		25	74	80	23	84	

Talilna krivulja pomnožkov qPCR je predstavljena kot izpeljanka merjenih vrednosti fluorescence. Pomnožki se ločijo glede na svojo Tm. Po en vrh na vsaki krivulji predstavlja pomnožke iste dolžine, kar dokazuje specifičnost izbranih parov začetnih oligonukleotidov. Odsotnost dimerov parov in nespecifičnih pomnožkov kaže bazna linija iz vode, ki ni vsebovala DNA. Pri pogojih qPCR iz preglednice 18 smo pri paru Cyp01 zaradi nespecifičnega pomnoževanja dobili dve Tm (74 in 80 °C), kar je vodilo do tvorbe dveh vrhov na talilni krivulji (slika 24, zelena krivulja).



Slika 24: Graf talilne krivulje z dvema vrhovoma (zeleno) po končani qPCR pri paru začetnih oligonukleotidov Cyp01

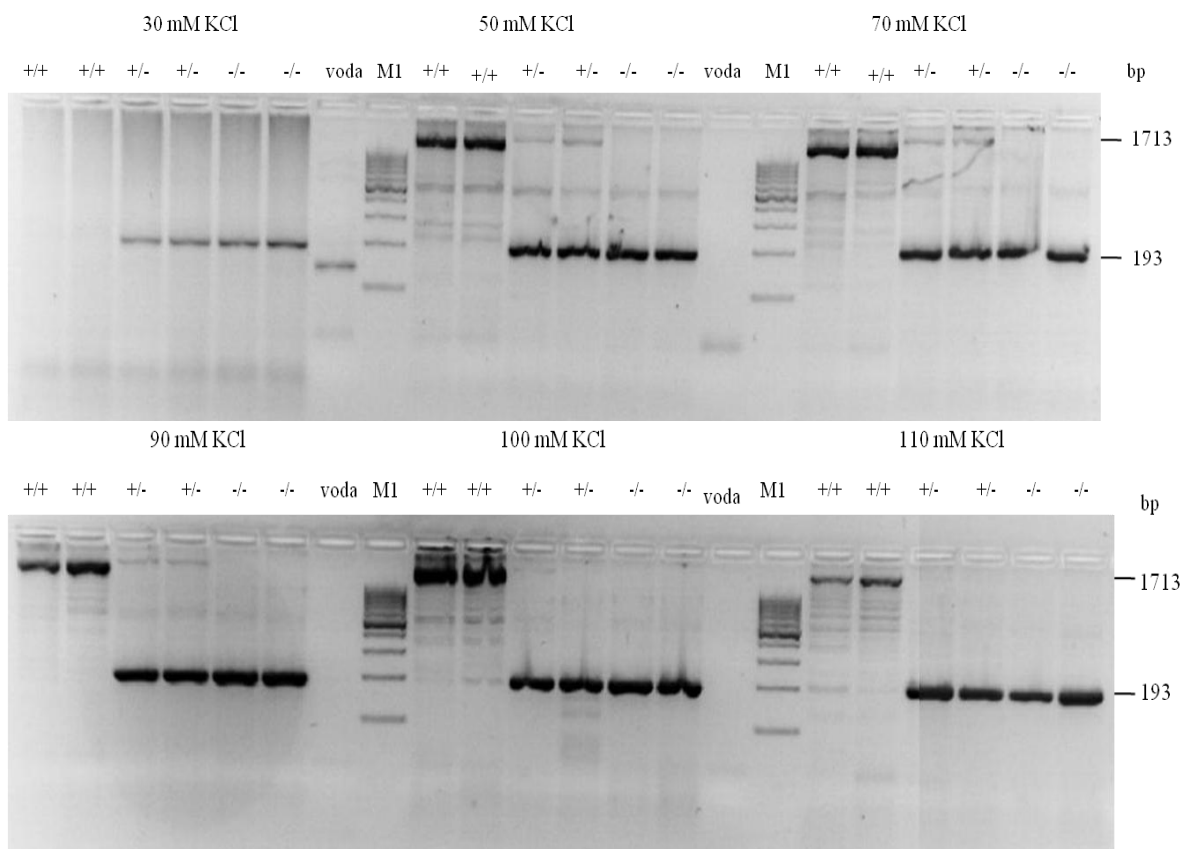
V končnih pogojih qPCR iz preglednice 18 smo močno skrčili čas podvojevanja DNA na 12 sekund, saj smo želeli, da bi DNA polimeraza s parom Cyp01 pomnoževala le alel *Cyp51*. Po analizi talilne krivulje smo pri paru Cyp+1 in Actb dobili po en vrh (slika 24, rdeči krivulji) za vsak par, kar je pomenilo, da so nam začetni oligonukleotidi specifično pomnoževali le točno določen odsek DNA. Talilna krivulja z dvema vrhovoma pri paru Cyp01 pa je nakazovala na nespecifično pomnoževanje para, zato iz takšne krivulje nismo mogli določiti nivoja izbitja gena *Cyp51*, ki ga je narekovala rekombinaza Cre. Ker nismo uspeli optimizirati delovanja para Cyp01 s pogoji qPCR, smo se odločili za optimizacijo KCl v reakcijski mešanici za qPCR.

4.4.2 Optimizacija s KCl

4.4.2.1 Optimizacija reakcije PCR s spremenjenimi koncentracijami KCl, izvedena s parom Cyp01

Par Cyp01 je kljub spreminjanju pogojev reakcije qPCR, poleg izrezanega alela *Cyp51* pomnoževal tudi nespecifične pomnožke. Zato smo z navadnim PCR optimizirali koncentracijo KCl, pri kateri bi par Cyp01 prednostno pomnoževal le krajši odsek alela *Cyp51*. Agarozni gel z ločenimi pomnožki para Cyp01 pri različnih koncentracijah soli

(30, 50, 70, 90, 100 in 110 mM) prikazuje slika 25. Nanašeni vzorci DNA so bili genotipov *Cyp51*^{+/+} (oznaka *+/+* na gelu), *Cyp51*^{+/-} (oznaka *+/-*) in *Cyp51*^{-/-} (oznaka *-/-*). Voda je predstavljala negativno kontrolo, M1 pa 100 bp molekularno lestvico. Par Cyp01 je pri alelu *Cyp51*⁻ tvoril pomnožke dolžine 193 bp, pri alelu *Cyp51*⁺ pa 1713 bp.

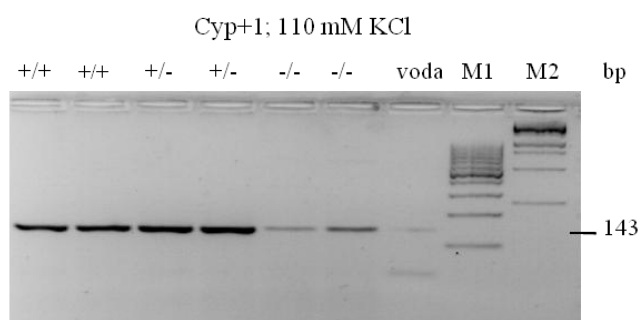


Slika 25: Pomnožki para Cyp01 pri različnih koncentracijah KCl (30, 50, 70, 90, 100 in 110 mM)

Iz rezultatov na sliki 25 smo določili, da je par Cyp01 prednostno podaljševal alel *Cyp51*⁻ (193 bp) pri koncentraciji KCl 110 mM, saj je pri ostalih koncentracijah KCl pomnoževal tudi nespecifične pomnožke. Nato smo še preverili, ali povišana koncentracija KCl v reakcijski mešanici vpliva na pravilno delovanje parov Cyp+1 in Actb.

4.4.2.2 Optimizacija PCR z različnimi koncentracijami KCl z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov

Z optimizacijo koncentracije KCl v reakciji PCR smo želeli preprečiti polimerazi pomnoževanje nespecifičnih pomnožkov pri vzorčnih DNA. Pri različnih koncentracijah KCl v reakcijskih mešanicah za PCR smo izvedli pomnoževanje DNA različnih genotipov gena *Cyp51* z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov (Cyp01, Cyp+1 in Actb). Vzorčna DNA je izhajala iz mišjih zarodkov, saj smo le pri njih imeli genotip *Cyp51*^{-/-}, kjer smo lahko preverjali specifično pomnoževanje para začetnih oligonukleotidov Cyp01. Vodo smo uporabili za negativno kontrolo. Za določanje dolžin ločenih pomnožkov pa smo uporabili 100 bp (M1) in 1 kbp (M2) molekularni lestvici.

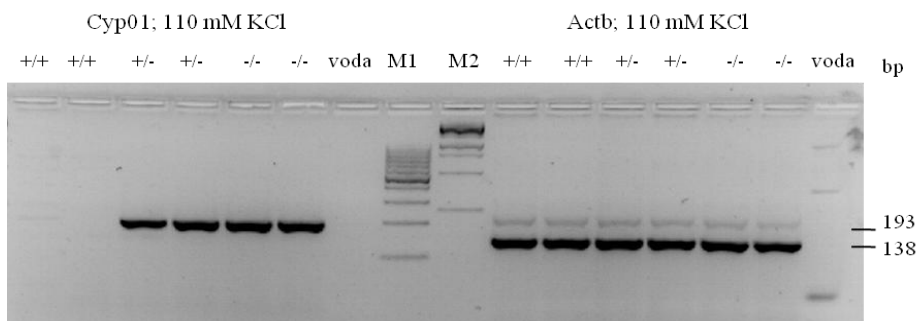


Slika 26: Pomnožki različnih genotipov *Cyp51* s parom Cyp+1 pri 110 mM KCl

Iz slike 26 je razvidno, da je par Cyp+1 pri genotipu *Cyp51*^{-/-} še vedno tvoril pomnožke, kar pa bi lahko bila posledica onesnaženja zarodkov s krvjo heterozigotne *Cyp51*^{+/-} matere. Pomnožki pri negativni kontroli (voda) so lahko posledica kontaminacije s prenosom reagentov med pipetiranjem ali tvorbe dimerov začetnih oligonukleotidov zaradi spremenjene koncentracije KCl.

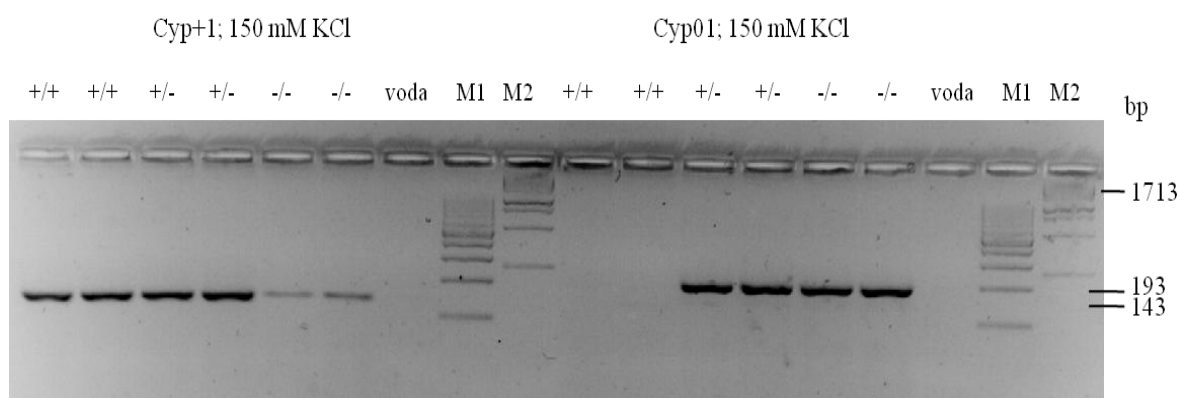
Slika 27 prikazuje, da smo se s povišano koncentracijo KCl znebili pomnoževanja daljših nespecifičnih pomnožkov s parom Cyp01, saj je pri heterozigotih *Cyp51*^{+/-} pomnožil le krajši alel *Cyp51*⁻ dolžine 193 bp. Pri paru Actb pa smo dobili dva različna pomnožka, kar pa ni bilo optimalno, saj bi moral par tvoriti le pomnožke, dolžine 138 bp. Nato smo testirali pare začetnih oligonukleotidov še pri višjih koncentracijah KCl. Po reakciji PCR s parom Cyp01 s povišano koncentracijo KCl na 130 mM so bili pri genotipu *Cyp51*^{+/-} še

vedno vidni nespecifični pomnožki. Pri genotipu *Cyp51*^{+/-} pa smo se znebili pomnoževanja daljših nespecifičnih pomnožkov.



Slika 27: Pomnožki parov Cyp01 in Actb pri koncentraciji KCl 110 mM

Tudi pri nadaljnjem povišanju koncentracije KCl na 150 mM je par Cyp+1 pri genotipu *Cyp51*^{-/-} še vedno tvoril pomnožke alela *Cyp51*⁻ (slika 28), čeprav je bil načrtovan tako, da je pomnoževal le alel *Cyp51*⁺ dolžine 143 bp. Sklepali smo, da so bili zarodki onesnaženi s krvjo heterozigotne matere. Po reakciji PCR s 150 mM KCl so nespecifični pomnožki para Cyp01 pri genotipu *Cyp51*^{+/-} popolnoma izginili. Tudi pri genotipu *Cyp51*^{+/-} par Cyp01 ni več tvoril nespecifičnih daljših pomnožkov, ampak samo pomnožke krajšega alela *Cyp51*⁻, dolžine 193 bp. Zvišanje koncentracij KCl ni vplivalo na pravilno delovanje para Actb, saj je pri vseh vzorcih DNA tvoril pomnožke dolžine 138 bp.



Slika 28: Pomnožki vzorcev DNA s paroma Cyp+1 in Cyp01 pri koncentraciji KCl 150 mM

4.4.2.2.1 Rezultati reakcij qPCR pri spreminjajočih koncentracijah KCl

Tudi s spreminjanjem koncentracij KCl (90 mM, 130 mM in 150 mM) v reakcijskih mešanicah za qPCR še vedno nismo dobili zadovoljivih rezultatov. Ker je sestava pufra

SYBR komercialna skrivnost, smo predpostavili, da vsebuje enako koncentracijo KCl kot pufr za navadni PCR, to je 50 mM (Protocol ..., 2000). V poskusih s spremenjenimi koncentracijami KCl (preglednica 22) in pogoji reakcije qPCR (preglednica 18) nam pari začetnih oligonukleotidov niso tvorili pomnožkov in posledično nismo dobili talilnih krivulj.

Nespecifično pomnoževanje para Cyp01 in posledične tvorbe talilne krivulje z dvema vrhovoma je vodilo v optimizacijo časov posameznih korakov reakcije qPCR in števila ciklov qPCR ter v optimizacijo koncentracije KCl v reakcijski mešanici za qPCR. Posledica optimizacije so bili povsem spremenjeni in nedefinirani pogoji qPCR, ki niso dali želenih rezultatov. Optimizacijo reakcije qPCR smo zato opustili in za določevanje deleža alela *Cyp51⁻* naročili nove začetne oligonukleotide.

4.5 NOVI ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI

S ponovnim načrtovanjem začetnih oligonukleotidov smo želeli pridobiti par Cyp0, ki bi pri pogojih qPCR specifično pomnoževal le izrezane krajše odseke alela *Cyp51⁻*, preostalih neizrezanih odsekov alela *Cyp51^{lox}* pa ne.

4.5.1 Zaporedje novih začetnih oligonukleotidov

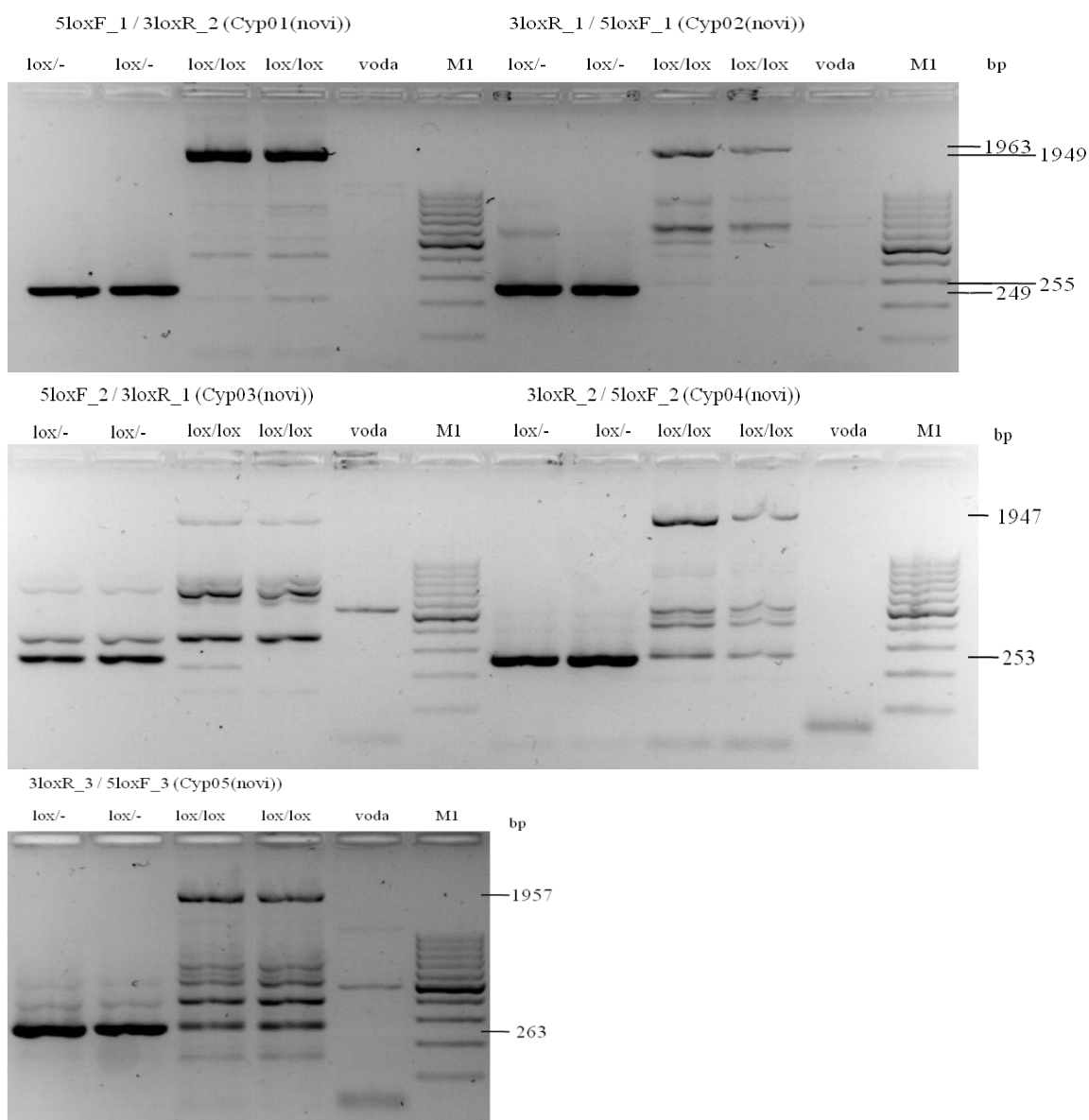
S programom *Primer3* smo načrtovali nove začetne oligonukleotide za določevanje stopnje izreza. Mesto naleganja novega para Cyp01(novi) je z rdečima puščicama prikazano na sliki 18. Izbrana zaporedja novih začetnih oligonukleotidov so podana v preglednici 34.

Preglednica 34: Zaporedja novih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje alela *Cyp51⁻*

Začetni oligonukleotid	Zaporedje začetnega oligonukleotida 5'-3'
5loxF_1	CGTGGATTCTGCTGATCAAA
5loxF_2	GGTTCGTGGATTCTGCTGAT
5loxF_3	CACCAGACTTGATGGCAAGA
3loxR_1	CAGTAGTCAGCACCCCCTTC
3loxR_2	TCAGCACCCCCTTCTCATTA
3loxR_3	GCTCTGTAAAGGCAGGGTTG

4.5.1.1 Testiranje novih parov začetnih oligonukleotidov

Ker nam je par Cyp01 pri genotipih *Cyp51*^{+/-}, *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ in *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺ poleg alela *Cyp51*⁻ podaljševal tudi daljše nespecifične pomnožke, smo želeli z novimi začetnimi oligonukleotidi dobiti tak par, ki bi pomnoževal le izrezan alel *Cyp51*⁻, saj bi le tako lahko določili stopnjo izbitja gena *Cyp51* v mišjih jetrih. Dolžine posameznih pomnožkov različnih genotipov gena *Cyp51* z novimi pari začetnih oligonukleotidov so navedeni v preglednici 23. Slika 29 prikazuje elektroforezno ločbo pomnožkov različnih parov začetnih oligonukleotidov v reakciji PCR, ki smo jo izvedli pri pogojih iz preglednice 24.



Slika 29: Testiranje novih parov začetnih oligonukleotidov za alel *Cyp51*⁻

Na agarozni gel na sliki 29 so bili nanešeni vzorci genotipov *Cyp51*^{lox/-} (oznaka lox/- na gelu) in *Cyp51*^{lox/lox} (oznaka lox/lox). Voda je služila za negativno kontrolo. Za odčitavanje ločenih odsekov pomnožkov pa smo uporabili 100 bp (M1) molekularno lestvico. Iz slike 29 smo razbrali, da je par Cyp01(novi) pri genotipu *Cyp51*^{lox/-} tvoril le pomnožke krajšega odseka alela *Cyp51*⁻, dolžine 249 bp, zato smo ga uporabili pri nadaljnjem določanju stopnje izbitja gena *Cyp51* s qPCR. Iz agaroznega gela je razvidno, da so preostali pari začetnih oligonukleotidov tvorili nespecifične pomnožke.

4.5.1.2 Končna reakcija qPCR s pari začetnih oligonukleotidov Cyp+1, Cyp01(novi) in Actb za določanje stopnje izbitja v vzorčnih DNA

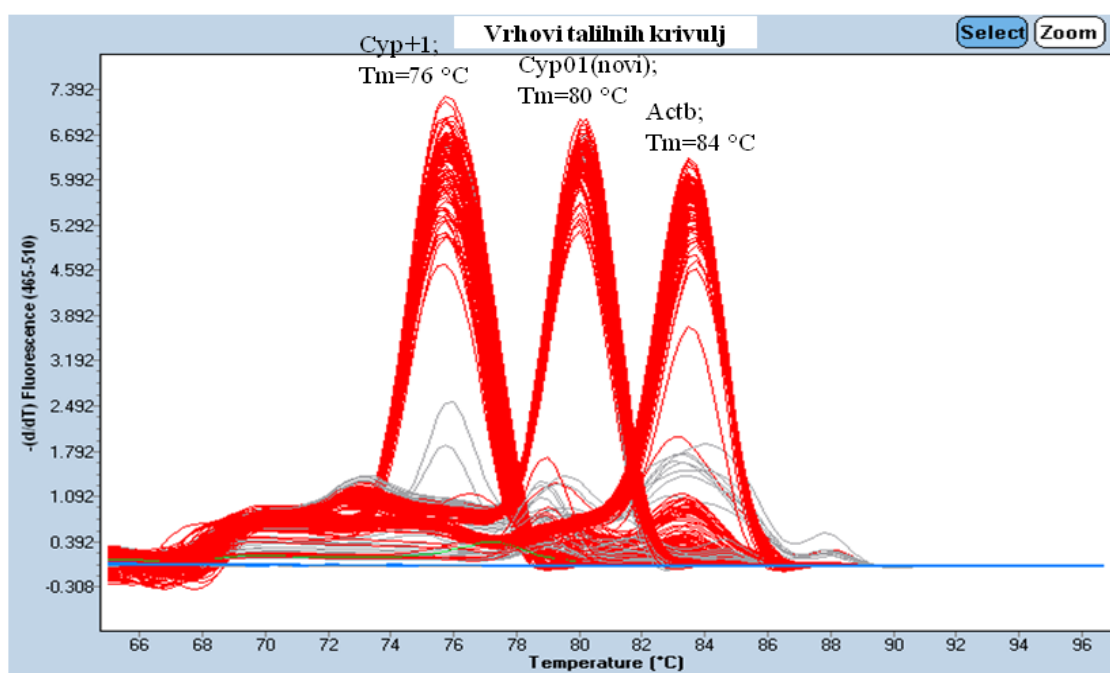
Po PCR testiranju različnih kombinacij novo načrtovanih začetnih oligonukleotidov za specifično pomnoževanje krajšega odseka alela *Cyp51*⁻ smo izbrali par 5loxF_1/3loxR_2, ki smo ga poimenovali »Cyp01(novi)«. Novi par nam je pri vzorčnih DNA genotipa *Cyp51*^{lox/-} pomnoževal le alel *Cyp51*⁻, daljših nespecifičnih pomnožkov pa ne. Sledila je uporaba parov Cyp+1, Cyp01(novi) in Actb v reakciji qPCR, s katero smo želeli določiti stopnjo uspešnosti izrezovanja eksonov 3 in 4 iz lokusa gena *Cyp51*, ki ga je narekovala rekombinaza Cre. Po izvedbi reakcije qPCR s pogoji iz preglednice 26 smo pridobili vrednosti Cp in Tm (preglednica 35), s katerimi smo lahko opravili analize, ki so nam podale stopnjo uspešnosti izrezovanja pri vzorčnih DNA iz jeter.

Preglednica 35: Vrednosti Cp in Tm po reakciji qPCR s pari Cyp+1, Cyp01(novi) in Actb

Vzorec DNA	Genotip <i>Cyp51</i> ; Cre	Par Cyp+1			Par Cyp01(novi)			Par Actb		
		Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2	Cp	Tm1	Tm2
102.1.	+/+	23	76		30			22	84	
102.3	+/-	25	76		25	80		23	84	
96.3.	-/-	30			26	80		24	84	
LKO50	<i>lox/lox</i> ;	23	76		24	80		22	84	
LKO53	<i>lox/-</i> ;	25	76		24	80		23	84	

Zamenjava para začetnih oligonukleotidov Cyp01 s Cyp01(novi) nam je podala uspešen rezultat, kar dokazujejo enojne vrednosti Tm in vrednosti Cp pod 30 cikli, ki so navedene v

preglednici 35, in enojni vrh talilne krivulje pri posameznem paru začetnih oligonukleotidov na sliki 30. Par *Cyp01*(novi) je pri genotipih *Cyp51*^{+/-}, *Cyp51*^{lox/-}; *Cre*⁺ in *Cyp51*^{lox/lox}; *Cre*⁺ tvoril pomnožke le krajšega odseka alela *Cyp51*⁻, ki so bili rezultat izrezovanja *Cyp51* z rekombinazo *Cre*. Po analizi talilne krivulje se je pri vsakem uporabljenem paru začetnih oligonukleotidov izrisal graf z enojnim vrhom, kar je nakazovalo na specifično pomnoževanje vseh treh uporabljenih parov v qPCR (slika 30).



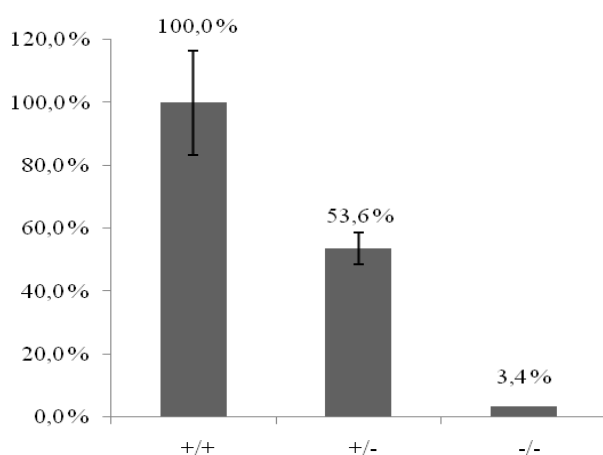
Slika 30: Talilne krivulje s po enim vrhom pri vsakem paru začetnih oligonukleotidov

4.6 GRAFI KONČNE ANALIZE

S pomočjo računalniškega programa *Microsoft Office Excel 2007* smo preračunali podatke vrednosti *Cp* po postopku opisanem v poglavju 3.2.13 in nato izrisali grafe s prikazi deležev alelov *Cyp51*⁺, *Cyp51*⁻ in *Cyp51*^{lox} pri posameznih genotipih kontrolnih in preiskovalnih vzorčnih DNA. Grafi z deleži posameznih alelov so prikazani na slikah 31–34. Pridobljeni deleži alelov *Cyp51*⁺ in *Cyp51*⁻ na grafih 31 in 33 so izhajali iz kontrolnih DNA genotipov *Cyp51*^{+/+} (simbol +/+), *Cyp51*^{+/-}(+/-) in *Cyp51*^{-/-} (-/-) izoliranih iz mišjih zarodkov, ki so se pridobili s parjenjem heterozigotnih staršev. Kontrolne DNA so nam podale učinkovitost določanja stopnje izrezovanja z metodo qPCR. Pridobljeni deleži alelov *Cyp51*^{lox} in *Cyp51*⁻ na grafih 32 in 34 pa so izhajali iz vzorčnih DNA genotipov

Cyp51^{lox/lox}; *Cre*⁺ (simbol lox/lox; +) in *Cyp51^{lox/-}*; *Cre*⁺ (lox/-; +) izoliranih iz mišjih jeter in repov.

Par začetnih oligonukleotidov Cyp+1 je imel mesti prileganja znotraj zaporedja DNA, ki sta ga obdajali mesti *lox*, zato pri izrezanih alelih *Cyp51* ni tvoril pomnožkov (slika 18). Iz grafa na sliki 31 je razvidno, da je pri divjem tipu *Cyp51^{+/+}* znašal delež alela *Cyp51⁺* $100 \pm 16,6$ % (povprečje (MEAN) $\pm$ standardna napaka povprečja (SEM); $n = 3$ biološke ponovitve enega DNA vzorca), ki je lahko posledica dinamike PCR, nenatančnega pipetiranja ..., kar vpliva na natančnost metode.

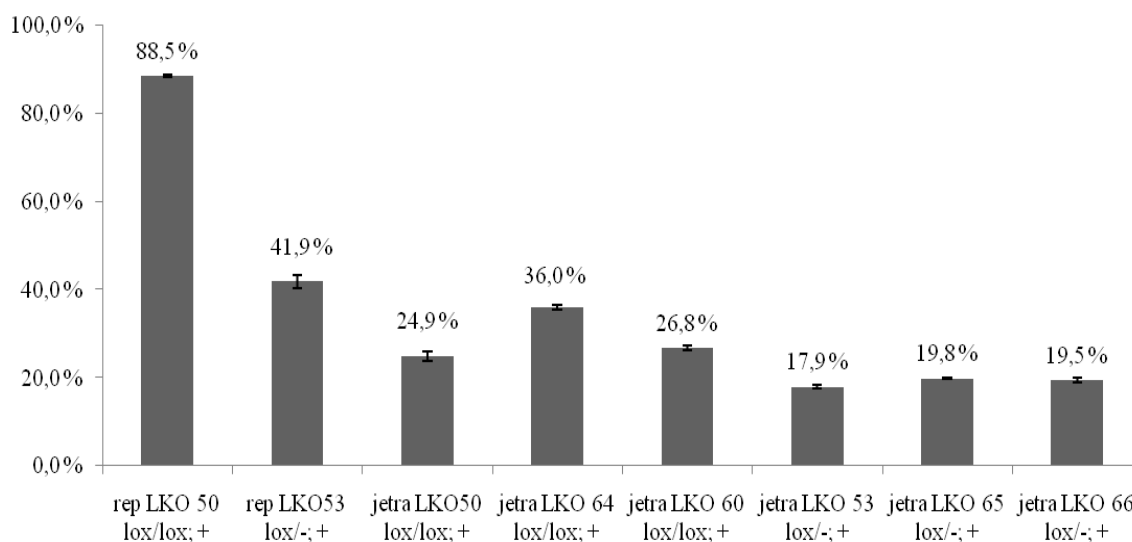


Slika 31: Deleži alela *Cyp51⁺* v kontrolnih DNA iz zarodkov pomnoženi s parom Cyp+1

Pri kontrolni DNA iz mišjega zarodka z genotipom *Cyp51^{+/+}* smo pričakovali 50 % delež alela *Cyp51⁻* in 50 % delež alela *Cyp51⁺*. Slika 31 prikazuje, da je znašal delež alela *Cyp51⁺* 53,6 %. Pri kontrolnem vzorcu s popolnoma izbitim genom (genotip *Cyp51^{-/-}*) par Cyp+1 ne bi smel tvoriti pomnožkov. Zaznani 3,4 % delež alela *Cyp51⁺* bi lahko bil posledica onesnaženja zarodka s krvjo heterozigotne matere, kar je vodilo v pomnoževanje alela *Cyp51⁺*. Možnost onesnaženja zarodka smo opazili že med testiranjem delovanja para Cyp+1 pri različnih koncentracijah KCl pri navadnem PCR (sliki 26 in 28). Pozitivne kontrolne DNA iz mišjih zarodkov so nam pokazale, da je izbrani par Cyp+1 tvoril pomnožke alela *Cyp51⁺*.

S parom Cyp+1 smo vzorčnim DNA genotipov *Cyp51^{lox/lox}*; *Cre*⁺ (oznaka na sliki 32 lox/lox;+) in *Cyp51^{lox/-}*; *Cre*⁺ (oznaka lox/-;+), ki so izhajale iz repa in jeter, preverjali deleže neizrezanega alela *Cyp51^{lox}* na lokusu gena *Cyp51*. Do izražanja in delovanja

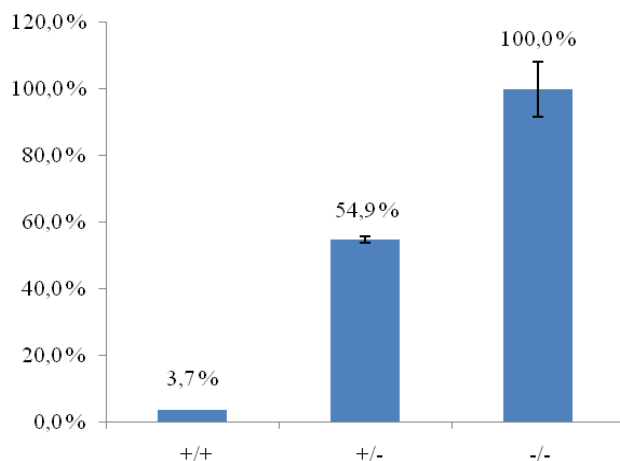
rekombinaze Cre zaradi jetrno–specifičnega albuminskega promotorja ne bi smelo prihajati v repu miši. Z navadnim PCR smo preverili, da par začetnih oligonukleotidov 5loxF/3loxR pri vzorčnih DNA iz repa z genotipom *Cyp51^{lox/lox}; Cre⁺* ni tvoril pomnožkov krajšega odseka alela *Cyp51⁻*, dolžine 187 bp (slika 23 B), do katerega bi prišlo v primeru delovanja rekombinaze Cre. Pomnožki alela *Cyp51⁻* para 5loxF/3loxR pri vzorčnih DNA iz repa genotipa *Cyp51^{lox/-}; Cre⁺* so bili posledica podedovanega enega alela *Cyp51⁻*. Preračunani 88,5 % delež alela *Cyp51^{lox}* pri vzorčni DNA iz repa LKO 50 z genotipom *Cyp51^{lox/lox}; Cre⁺* bi lahko bil tako posledica ocene tehnične variabilnosti (postopki dela, specifičnost začetnih oligonukleotidov, ponovljivost), kar pomeni, da 88,5 % pri neki SEM morda ni statistično značilno različno od 100 %. Druga razlaga 88,5 % deleža neizrezanega alela *Cyp51^{lox}* pa je, da se je rekombinaza Cre vseeno v nizki stopnji izražala v repu in v nekem določenem deležu celic izrezala lokus gena *Cyp51*, kar potrjuje tudi preračunani 4,4 % delež izrezanega alela *Cyp51⁻* (slika 34) določen s parom Cyp01(novi) pri istem vzorcu.



Slika 32: Deleži alela *Cyp51^{lox}* v vzorčnih DNA iz repov in jeter pomnoženi s parom Cyp+1

Zarodek s popolnoma izbitim genom *Cyp51* ne preživi embrionalnega razvoja, heterozigot pa ga. S podedovano heterozigotnostjo je bila v vseh celicah dosežena približna 50 % stopnja izbitja gena *Cyp51*. Graf na sliki 32 prikazuje, da je znašal delež alela *Cyp51^{lox}* iz repa vzorca LKO 53 z genotipom *Cyp51^{lox/-}; Cre⁺* 41,9 %. Tkivno specifično delovanje rekombinaze Cre pa je stopnjo izbitja gena *Cyp51* v jetrih še dodatno zvišalo, kar bi omogočilo nadaljnjim raziskavam določiti vpliv izbitja gena *Cyp51* na biosintezo holesterola in fenotip živali. Graf iz slike 32 prikazuje, da so pri jetrnih vzorcih LKO 50,

LKO 64 in LKO 60 z genotipom *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺ znašali deleži preostalega neizrezanega alela *Cyp51*^{lox} 24,9 %, 36,0 % in 26,8 %. Pri jetrnih vzorcih LKO 53, LKO 65 in LKO 66 z genotipom *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ pa je bilo izbitje gena še uspešnejše, saj so bili deleži preostalega neizrezanega alela *Cyp51*^{lox}, na račun že enega podedovanega alela *Cyp51*⁻, še nižji, in sicer 17,9 %, 19,8 % in 19,5 %.

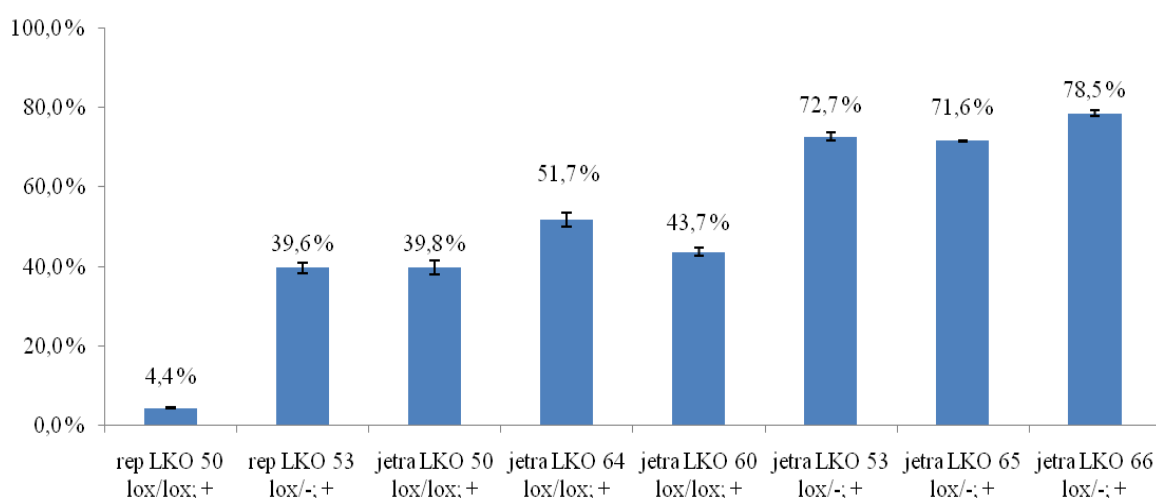


Slika 33: Deleži alela *Cyp51*⁻ v kontrolnih DNA iz zarodkov pomnoženi s parom Cyp01(novi)

Izbrani par Cyp01(novi) je imel mesto prileganja začetnih oligonukleotidov izven vmesnega zaporedja obdanega z mesti *lox* (slika 18). Pri vzorcih DNA, kjer ni prišlo do izrezovanja s Cre, je par tvoril daljše pomnožke dolžine 1963 bp, v primeru izrezovanja pa sta si bili mesti prileganja bližji, zato je par tvoril pomnožke dolžine 249 bp. Izbran par Cyp01(novi) je pri pogojih qPCR prednostno pomnoževal krajši odsek alela *Cyp51*⁻, kar smo dokazali s talilno krivuljo (slika 30), zato je podal samo deleže izrezanega krajšega alela *Cyp51*⁻. Iz grafa na sliki 33 je razvidno, da je znašal delež alela *Cyp51*⁻ pri kontrolnem vzorcu iz mišjega zarodka s popolnoma izbitim genom *Cyp51* (genotip *Cyp51*^{-/-}) 100 ± 8,3 %. Delež alela *Cyp51*⁻ je pri heterozigotu *Cyp51*^{+/-} znašal pričakovanih 54,9 %. Par je tvoril pomnožke tudi pri genotipu *Cyp51*^{+/+}, kar bi lahko bila posledica onesnaženosti zarodka s krvjo heterozigotne matere. Delež alela *Cyp51*⁺ pri genotipu *Cyp51*^{+/+} je znašal 3,7 %. Zaključimo lahko, da nam je izbrani par Cyp01(novi) pri pozitivnih kontrolnih DNA iz mišjih zarodkov tvoril pomnožke krajšega odseka alela *Cyp51*⁻.

S parom Cyp01(novi) smo vzorčnim DNA ugotavljali deleže izrezanega krajšega alela *Cyp51*⁻, ki ga je v jetrih pod delovanjem transgenega zapisa za albuminski promotor

povzročala rekombinaza Cre. Zaradi pogojev reakcije qPCR, par Cyp01(novi) pri kontrolnih DNA genotipa *Cyp51*^{+/+} in pri preiskovanih DNA genotipov *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺ in *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ ni pomnoževal daljših nespecifičnih pomnožkov. Iz grafa na sliki 34 je razvidno, da je par Cyp01(novi) tvoril pomnožke tudi pri vzorcu LKO 50 iz repa z genotipom *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺, in sicer je bil dežel 4,4 %, kar lahko nakazuje na nizko aktivnost rekombinaze Cre izven ciljnega tkiva ali pa na posledico ocene SEM. Pri istem vzorcu LKO 50 iz jeter je znašal delež alela *Cyp51*⁻ 39,8 %, kar nakazuje na tkivno specifično, vendar nepopolno delovanje Cre pri izbitju *Cyp51*.



Slika 34: Deleži alela *Cyp51*⁻ v vzorčnih DNA iz repa in jeter pomnoženi s parom Cyp01(novi)

Jetrne vzorčne DNA LKO 50, LKO 64 in LKO 60 z genotipom *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺ so imele nižje deleže alela *Cyp51*⁻ (39,8 %, 51,7 % in 43,7 %), kot pa vzorčne DNA LKO 53, LKO 65 in LKO 66 z genotipom *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ (72,7 %, 71,6 % in 78,5 %), kjer jim je podedovani izbit alel *Cyp51*⁻ zvišal končno stopnjo izreza *Cyp51* v jetrih. Vzorčne DNA iz jeter so zajemale genomsko DNA vseh jetrnih celic. Transgeni zapis mišjega albuminskega promotorja je omogočal specifično izražanje rekombinaze Cre v hepatocitah (Postic in sod., 1999), ki predstavljajo ~ 70 % celične populacije jeter (Underhill in sod., 2007; Si-Tayeb in sod., 2010) in v katerih poteka tudi glavna biosinteza albumina (Fanali in sod., 2012). Jetra pa sestavljajo tudi neparenhimske celice (Si-Tayeb in sod., 2010), za katere pa ne poročajo o izražanju albumina. V njih se tako Cre ne bi smela prepisovati in izbijati *Cyp51*. Lahko zaključimo, da je bilo izrezovanje tkivno specifično, saj smo pri vzorčnih DNA iz jeter zaznali bistveno višje deleže alela *Cyp51*⁻ kot pa pri vzorčnih DNA iz repa.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Mišji modeli se uporabljajo pri preučevanju vplivov določenih genov na potek endogenih biosinteznih poti in/ali na vpliv njihovega izbitja na fenotip živali. Za pridobitev takšnih miši je potrebno najprej z metodami genskega izbitja izbiti cilje gene, kar posledično izzove efekt mutantnega stanja. Večkratno medsebojno križanje miši z izbitim ciljnim genom privede do tvorbe mišje linije s specifično mutacijo (Koentgen in sod., 2010). Podedovane mutacije, ki vodijo v popolno izbitje gena v celotnem telesu, pogosto povzročijo smrt zarodkov in s tem onemogočijo preučevanje mišjega modela po rojstvu. Sistem *Cre/lox*, zaradi specifičnega izražanja rekombinaze Cre, ki izreže le zaporedje DNA med dvema prepoznavnima mestoma *lox*, omogoča pogojno izbitje gena/-ov ob določenem času (po rojstvu ali v kasnejši dobi življenja miši) in/ali v določenem tkivu ali celičnem tipu. Specifičnost izražanja narekuje promotor, za katerim se nahaja zapis gena za rekombinazo Cre. Ciljni gen/-i ali samo nekateri njihovi eksoni se izrežejo le v celičnih tipih ali tkivih, kjer je aktiven promotor, drugod pa ostane gen neizbit in posledično funkcionalen, kar za razvijajoči zarodek ali odraslo žival ni letalno (Nagy, 2000). Slabost sistema *Cre/lox* pa je nepopolno izrezovanje ciljne regije DNA z rekombinazo Cre, ki je lahko posledica utišanja izražanja vnesenega zapisa rekombinaze Cre, nizke aktivnosti rekombinaze Cre ali sestave ciljnega tkiva tudi iz celičnih tipov, kjer se rekombinaza Cre ne izraža in posledično ne izbije gena v celotnem tkivu (Schulz in sod., 2007). Predhodno smo vedeli, da se nivo izrezovanja specifičnega odseka DNA z rekombinazo Cre med mišjimi modeli razlikuje in da je nepopolno. Različna uspešnost izrezovanja pri različnih osebkih tvori različne stopnje izražanja fenotipa, ki so posledica izbitja gena. Zato je za določitev vpliva izbitega gena potrebno predhodno oceniti nivo uspešnosti izreza, ki poda povezavo med stopnjo izreza ciljnega gena in posledicami njegovega izbitja na fenotip (Müller in sod., 2009). Uporabna metoda za določevanje stopnje izreza v ciljnim tkivu je qPCR, saj zahteva majhno količino vzorca DNA (~ 20 ng/μl), kar je uporabno predvsem pri vzorcih z malo začetne DNA (Pfaffl, 2001; Müller in sod., 2009). V eni reakciji qPCR lahko izvedemo poskus z različnimi vzorci in s po večimi biološkimi ter tehničnimi

ponovitvami posameznega vzorca. Aparatura za izvedbo qPCR (v našem poskusu Light Cycler® 480 II) meri fluorescenco v vsakem ciklu reakcije, kar omogoča uporabniku sprotno spremljanje poteka reakcije. Programska oprema aparature avtomatizirano določi mejno vrednost fluorescence, na kateri odčita vrednosti Cp posameznih pomnožkov vzorčnih DNA in učinkovitost reakcije, ki so pomembne vrednosti pri končni analizi (Pfaffl, 2001) določanja deležev izrezanega in neizrezanega alela. Pri metodi qPCR je pomembna pravilna izbira parov začetnih oligonukleotidov, ki v danih pogojih pomnožujejo le specifičen odsek DNA, saj je le tako možno pravilno določiti stopnjo izbitja ciljnega gena. Pri uporabi nespecifičnega barvila SYBR Green I za zaznavo nastalih pomnožkov je potrebno po končani qPCR izvesti analizo talilne krivulje, ki z enim vrhom na talilni krivulji potrdi specifičnost para začetnih oligonukleotidov (slika 30), z dvema vrhovoma pa nakazuje na nespecifično pomnoževanje začetnih oligonukleotidov, ker se je v našem primeru zgodilo pri paru *Cyp01* (slika 24). Naš poskus je temeljil po članku Müller in sod. (2009), kjer so predstavili metodo qPCR za določevanje nivoja izbitja gena *Pex13* v možganih miši. Popolno izbitje gena *Pex13* povzroči smrt zarodka, vendar jim je sistem *Cre/lox* omogočil tvorbo pogojnih mutant in s tem njihovo preučevanje po rojstvu. Mutante so pod kontrolo promotorja *Nestin* izražale zapis za rekombinazo Cre, ki je v možganih izrezovala z mesti *lox* označen ekson 2 v genu *Pex13* in ga tako izbila.

V tej diplomski nalogi smo želeli z metodo qPCR, ki je temeljila na kemiji SYBR Green I, določiti stopnjo izrezovanja gena *Cyp51* v jetrih dvojno transgenih živali z genotipoma *Cyp51^{lox/lox}; Cre⁺* in *Cyp51^{lox/-}; Cre⁺*. Gen *Cyp51* sodeluje v biosintezi holesterola (Debeljak in sod., 2003), ki večinoma poteka v jetrih (Arnold in Kwiterovich, 2003). Njegovo popolno izbitje povzroči smrt zarodka v E15 razvoja (Keber in sod., 2011), zato je sistem *Cre/lox* pod transgenim zapisom mišjega albuminskega promotorja s specifičnim izražanjem rekombinaze Cre omogočil izrez z mesti *lox* označenega dela zaporedja eksonov 3 in 4 gena *Cyp51* v hepatocitih in s tem preživetje miši. Čeprav se večina albumina tvori v jetrih, pa je znano, da ga v manjših količinah tvorijo tudi druga tkiva (Fanali in sod., 2012). Izražanje albumina so tako zaznali npr. v goveji mlečni žlezi (Shamay in sod., 2005), mišjih skeletnih mišicah (Wagatsuma in sod., 2002), mišji očesni mrežnici (Dodson in sod., 2001). Nahon in sod. (1988) so ugotovili, da se v ledvicah, trebušni slinavki, pljučih in srcu zarodkov ter novorojenih podgan tvori več albumina, kot

pa v istih tkivih odraslih živali. Postic in sod. (1999), ki so vzgojili *Alb-Cre* miš, so pokazali, da se je transgeni zapis za rekombinazo Cre izražal le v jetrih. V trebušni slinavki, vranici, ledvicah, srcu, skeletnih mišicah in možganih pa do izražanja rekombinaze Cre ni prišlo. Jetrno–specifično izražanje rekombinaze Cre, ki ga narekuje albuminski promotor smo preverili tudi na spletni strani The Jackson Laboratory (B6.Cg-Tg(*Alb-cre*) ..., 2013), kjer je bila *Alb-Cre* miš kupljena. Specifično izražanje rekombinaze Cre v jetrih smo potrdili s parom začetnih oligonukleotidov 5loxF/3loxR, ki je z naleganjem na matrično DNA (slika 19) pri neizrezanih odsekih alelov *Cyp51^{lox}* oz. *Cyp51⁺* tvoril pomnožke velikosti 1881 oz. 1707 bp, pri izrezanih krajših odsekih alela *Cyp51⁻* pa 187 bp (preglednica 9). S PCR smo preverili, da v vzorčni DNA iz repa z genotipom *Cyp51^{lox/lox}*; *Cre⁺* do izbitja gena *Cyp51* z delovanjem rekombinaze Cre ni prišlo, saj par 5loxF/3loxR ni tvoril pomnožkov krajšega alela *Cyp51⁻*, ampak samo pomnožke daljšega neizrezanega alela *Cyp51^{lox}* (slika 23 B), kljub temu, da je vzorčna DNA vsebovala transgeni zapis za rekombinazo Cre, kar smo preverili s parom TK139/TK141 (slika 23 C). Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov za določanje stopnje izreza gena *Cyp51* v jetrih smo opravili v programu Primer3 (Rozen in Skaletsky, 1999). Izbrana para *Cyp⁺* oz. *Cyp0* sta bila načrtovana tako, da sta v vzorčnih DNA podala deleže alela *Cyp51^{lox}* oz. deleže alela *Cyp51⁻*. Z navadnim PCR smo testirali oba para *Cyp0* in para *Cyp⁺*, kjer smo uporabili predhodno genotipizirane vzorčne DNA, da smo se prepričali o specifičnem pomnoževanju začetnih oligonukleotidov. Pri navadnem PCR poteka zaznava pomnožkov po končani reakciji, zato smo stopnje izbitja gena *Cyp51* v vzorčnih DNA iz jeter določili z uporabo qPCR. Za normalizacijo izražanja gena *Cyp51* smo, tako kot v članku Müller in sod. (2009), uporabili par *Actb*. Pri reakciji qPCR pa so se pojavile težave, saj so pari začetnih oligonukleotidov *Cyp0* in *Cyp⁺* tvorili nespecifične pomnožke in tako dosegli Cp pri drugačnih ciklih, kot bi jih s specifičnim pomnoževanjem. Težave smo imeli predvsem pri paru *Cyp01*, kjer sta bili zaradi tvorbe nespecifičnih pomnožkov zabeleženi po dve *T_m* pri vsakem genotipu vzorčnih DNA (preglednice 30–33), kar je onemogočalo pravilno določitev deležev alelov *Cyp51⁻* in *Cyp^{lox}* v preiskovanih vzorcih DNA. Po končani qPCR pri pogojih iz preglednice 18, ki ji je sledila analiza talilne krivulje pomnožkov posameznih parov začetnih oligonukleotidov, smo pri paru *Cyp01* zaznali dva vrhova (slika 24), kar je pomenilo, da je par, poleg pomnožkov krajšega alela *Cyp51⁻* dolžine 193 bp, tvoril tudi daljše nespecifične

pomnožke. Težave smo imeli tudi pri nespecifičnem pomnoževanju para Cyp+1, ki pa smo jih odpravili (preglednica 32) z optimizacijo zmanjšanja števila ciklov qPCR in skrajšanim časom pomnoževanja s polimerazo (preglednica 17). Müller in sod. (2009) težav z nespecifičnem pomnoževanjem niso imeli. Njihov analog našemu paru Cyp01, par *PEX13^Δ*, je pri izrezanem alelu tvoril pomnožke dolžine 146 bp, pri neizrezanem alelu s prisotnima mestoma *lox* pa 3634 bp. Pri njihovih pogojih qPCR: začetna inkubacija 50 °C, 2 minuti; začetna denaturacija 95 °C, 15 minut; in 35 ciklov pri 94 °C, 15 sekund in 60 °C, 60 sekund, je par *PEX13^Δ* pri heterozigotih pogojnega izbitja tvoril pomnožke le pri izrezanem alelu *PEX13^Δ*, dolžine 146 bp. Daljšega alela z mesti *lox* dolžine 3634 bp pa ni pomnoževal. Razlika v dolžini zaporedja med izrezanim in neizrezanim alelom je v članku znašala 3488 bp, med našima aleloma *Cyp51⁻* in *Cyp51^{lox}* pa le 1694 bp (dolžina alela *Cyp51⁻* je znašala 193 bp, dolžina alela *Cyp51^{lox}* pa 1887 bp), kar je omogočilo polimerazi, da je s parom Cyp01 lahko pomnoževala tudi daljše nespecifične pomnožke. Kljub spreminjanju pogojev reakcije qPCR s krajšanjem časa prileganja začetnih oligonukleotidov in podaljševanja novo nastajajoče DNA iz 31 na 12 sekund (preglednice 16–18) ter z zmanjšanjem števila ciklov reakcije iz 50 na 30 ciklov (preglednici 17 in 18) je par Cyp01 še vedno tvoril daljše nespecifične pomnožke (preglednice 30–33). Tudi poskus optimizacije koncentracije KCl v reakcijski mešanici za qPCR (preglednica 22), ki bi pri paru Cyp01 omogočil prednostno pomnoževanje krajšega alela, je bil neuspešen, saj reakcija qPCR sploh ni potekla. Najverjetnejši razlog za neuspešne rezultate, je bila premajhna razlika v nukleotidnem zaporedju med krajšim odsekom alela *Cyp51⁻* in neizrezanim alelom *Cyp51^{lox}*, kar je vodilo v nespecifično pomnoževanje s parom Cyp01. Po neuspešnem spreminjanju pogojev qPCR in koncentracij KCl v reakcijski mešanici za qPCR, smo se odločali med načrtovanjem novih začetnih oligonukleotidov Cyp0 za pomnoževanje alela *Cyp51⁻* in uporabo specifične metode za zaznavo pomnožkov s sondo TaqMan. Odločili smo se za načrtovanje novega par začetnih oligonukleotidov, saj bi bilo potrebno pri metodi TaqMan načrtovati še dodatno, tretje mesto prileganja sonde na matrično DNA. Želeli smo pridobiti tak par začetnih oligonukleotidov, ki bi pri kontrolnem genotipu *Cyp51^{+/-}* ter pri genotipih pogojnega izbitja *Cyp51^{lox/-}*; *Cre⁺* in *Cyp51^{lox/lox}*; *Cre⁺* prednostno pomnoževal le krajši odsek alela *Cyp51⁻*. Specifičnost pomnoževanja smo kandidatnim začetnim oligonukleotidom preverjali z navadnim PCR (slika 29) in izbrano kombinacijo začetnih oligonukleotidov poimenovali par Cyp01(novi). Novi par je pri

genotipih *Cyp51*^{+/-}, *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ in *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺ prednostno pomnoževal le alel *Cyp51*⁻, daljših nespecifičnih pomnožkov pa ni tvoril, kar je pokazala talilna krivulja z enim vrhom pri T_m 80 °C (slika 30). Par Cyp01(novi) je pri pogojih qPCR iz preglednice 26 tvoril le specifične pomnožke alela *Cyp51*⁻, dolžine 249 bp, kljub temu, da je bila razlika med aleloma *Cyp51*⁻ in *Cyp51*^{lox} samo 1714 bp. Ne vemo, zakaj je novi par Cyp01(novi) specifično pomnoževal le alel *Cyp51*⁻, par Cyp01 pa ne, saj je potek same reakcije qPCR pogosto neznan, poleg tega pa je tudi sama sestava in delovanje reagentov komercialna skrivnost. Para Cyp+1 nismo spreminjali, saj je v vzorčnih DNA pri končnih pogojih qPCR (preglednica 26) tvoril specifične pomnožke neizrezanih odsekov alelov *Cyp51*^{lox} in *Cyp51*⁺ dolžine 143 bp.

Uspešno izvedena reakcija qPCR nam je podala vrednosti Cp vzorčnih DNA iz katerih smo lahko preračunali deleže izrezanih alelov *Cyp51*⁻ in preostalih neizrezanih alelov *Cyp51*^{lox}. Nivo izbitja gena *Cyp51* v vzorčni DNA je nakazoval delež odseka alela *Cyp51*⁻, višji kot je bil, uspešnejše je bilo izbitje. Graf na sliki 34 prikazuje, da so bili deleži alela *Cyp51*⁻ v vzorčnih DNA LKO 53, LOK 65 in LKO 66 genotipa *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ zaradi že enega podedovanega alela *Cyp51*⁻ višji (71,6–78,5 %) kot pa pri vzorčnih DNA LKO 50, LKO 64 in LKO 60 genotipa *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺ (39,8–51,7 %). Vzorčne DNA iz jeter so zajemale DNA hepatocit, ki sestavljajo okrog 70 % jeter in tudi DNA jetrnih celic (holangiocyte, endotelijske celice, jetrne sinusoidalne endotelne celice, celice Pit, Kupfferjeve celice in jetrne stelatne celice) za katere pa v literaturi ne poročajo o izražanju albumina (Si-Tayeb in sod., 2010; Underhill in sod., 2007; Fanali in sod., 2012). V njih tako ne bi smelo prihajati do prepisovanja Cre in posledičnega izbitja gena *Cyp51*. Verjetno je DNA neparenhimske celice prispevala k višjemu deležu alela *Cyp51*^{lox} v vzorčnih DNA, saj so tudi te celice vsebovale mesta *lox*. Pri vzorčnih DNA genotipa *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ pa bi lahko, na račun enega podedovanega izbitega alela, neparenhimske celice tudi zvišale določen delež alela *Cyp51*⁻. V reakciji qPCR smo uporabili tudi vzorčne DNA iz repa, saj smo se želeli prepričati o specifičnem delovanju rekombinaza Cre, omejeno le na jetra. Zaporedji mest *lox* sta obdajali eksona 3 in 4 gena *Cyp51* tudi v repu miši, kjer pa, zaradi nedelovanja rekombinaze Cre, v večji meri ni prišlo do izrezovanja in izbitja *Cyp51*. Izrezovanje gena *Cyp51* z rekombinazo Cre je bilo tkivno specifično, saj smo pri vzorčnih DNA iz jeter zaznali bistveno višje deleže alela *Cyp51*⁻ kot pa pri

vzorčnih DNA iz repa. Manjšega izražanja albuminskega promotorja, ki je pod mejo občutljivosti zaznavnih metod, v drugih tkivih ne moremo popolnoma ovreči. Če se je rekombinaza Cre vseeno prepisovala v manjši meri tudi v drugih tkivih, je možno, da je v nekaterih neciljanih celicah (v našem primeru celice repa) prišlo do izrezovanja s Cre, s čimer bi lahko tudi pojasnili 4,4 % delež alela *Cyp51*⁻ pri vzorcu LKO 50 iz repa z genotipom *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺. Pri vzorcu LKO 53 iz repa z genotipom *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ smo krajši odsek alela *Cyp51*⁻ zaznali zaradi podedovanega enega izbitega alela. Manjši deleži neizrezanega odseka alela *Cyp51*^{lox} (slika 32) pri vzorčnih DNA iz jeter (LKO 50, LKO 64, LKO 60, LKO 53, LKO 65 in LKO 66) ter posledično višji deleži izrezanega odseka alela *Cyp51*⁻ (slika 34) pri istih vzorcih dokazujejo, da je izrezovanje alela *Cyp51*^{lox}, ki ga je narekovala rekombinaza Cre, z visoko stopnjo potekalo v jetrih. Najuspešnejše izbitje gena *Cyp51* v jetrih je bilo pri vzorcu LKO 66, saj je delež alela *Cyp51*⁻ znašal 78,5 %.

5.2 SKLEPI

- Za potrebe našega poskusa je bil s sistemom Cre/lox izbit gen *Cyp51* v jetrih, kjer je transgeni zapis jetrno–specifičnega albuminskega promotorja nadzoroval izražanje rekombinaze Cre.
- V mišjih modelih izrezovanje gena *Cyp51* z rekombinazo Cre ni bilo popolno, zato je bilo potrebno določiti učinkovitost stopnje izbitja, kar bi nadalje omogočilo določitev povezave izbitega gena na žival ter vpliv CYP51 na biosintezo holesterola. Stopnjo izrezovanja gena *Cyp51* v vzorčnih DNA iz jeter smo določili z deleži izrezanega krajšega odseka alela *Cyp51*⁻ in z deleži preostalega neizrezanega odseka alela *Cyp51*^{lox}.
- Po opravljeni qPCR je sledila analiza talilne krivulje, ki je z enim vrhom nakazovala na specifično pomnoževanje para začetnih oligonukleotidov, z večimi vrhovi pa na nespecifično pomnoževanje para. Z analizo talilne krivulje smo dokazali, da je par Cyp01(novi) specifično pomnoževal izrezan odsek alela *Cyp51*⁻ (249 bp), par Cyp+1 pa neizrezan odsek alela *Cyp51*^{lox} (143 bp).
- Po določeni stopnji izbitja gena *Cyp51* smo med vzorci DNA iz jeter opazili razlike v deležih izrezanega odseka alela *Cyp51*⁻, s čimer smo potrdili trditev, da je predhodna določitev stopnje izbitja nujna za nadaljnje analize povezave vpliva izbitega gena na biosintezo holesterola in fenotip miši.
- Zaradi visoke učinkovitosti izreza se pogojni transgeni model *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ lahko uporablja za nadaljnje fenotipske analize vloge gena *Cyp51* in biosinteze holesterola v jetrih.

6 POVZETEK

Gen *Cyp51* kodira encim CYP51 (miš) oz. CYP51A1 (človek), ki v živalskih celicah katalizira oksidativno odstranitev 14 α -metilne skupine iz lanosterola, s čimer se tvori FF-MAS, ki je v somatskih celicah intermediat biosintezne poti holesterola, v spolnih celicah pa se nalaga in domnevno skrbi za njihovo zorenje (Debeljak in sod., 2003). Večina endogene sinteze holesterola poteka v hepatocitih (Arnold in Kwiterovich, 2003; Cramp, 2003), ki sestavljajo približno 70 % jetrnega tkiva (Si-Tayeb in sod., 2010; Underhill in sod., 2007). Za nadaljnja preučevanja vpliva izbitega gena *Cyp51* na biosintezo holesterola in fenotip živali je bilo potrebno tvoriti linijo miši s pogojno izbitim genom *Cyp51* v jetrih, saj njegovo popolno izbitje (genotip *Cyp51*^{-/-}) povzroči smrt zarodka (Keber in sod., 2011) in onemogoči preučevanje vpliva izbitja na žival po rojstvu. Sistem Cre/lox, ki izhaja iz bakteriofaga P1 in mu služi za prenos DNA v gostiteljsko bakterijo, pa omogoča tudi pogojno tkivno in/ali časovno specifično izbitje ciljnega gen v mišjem modelu. Za delovanje sistema Cre/lox pri miših s pogojnim izbitjem ciljnega gena je potrebno tvoriti dve liniji miši. Pri prvi liniji mesti lox obdajata zaporedje DNA ciljnega gena, ki ga želimo izbiti. Druga linija pa nosi transgeni zapis za tkivno in/ali časovno specifično izražanje rekombinaze Cre. Rekombinaza Cre prepozna in se veže na mesta lox ter izreže vmesno zaporedje, ki ga obdajata mesti lox. S križanjem obeh linij se pridobijo potomci, ki imajo v specifičnem tkivu ali celičnem tipu ali/in ob določenem času razvoja izbit ciljni gen (Nagy, 2000; Koentgen in sod., 2010). Za pogojno izbitje gena *Cyp51* so križali linijo miši *Cyp51*^{lox} (Keber in sod., 20011), ki je v vseh celicah vsebovala mesta lox, katera so se nahajala v intronih in so obdajala eksona 3 in 4 v zaporedju gena *Cyp51* z linijo miši Alb-Cre (Postic in sod., 1999), ki je imela vstavljen transgeni zapis za izražanje rekombinaze Cre pod nadzorom albuminskega promotorja, ki je visoko aktiven v hepatocitih. V pridobljenih potomcih genotipov *Cyp51*^{lox/-}; Cre⁺ in *Cyp51*^{lox/lox}; Cre⁺ naj bi izrez in izbitje gena *Cyp51* potekalo specifično v jetrih, v ostalih tkivih pa ne. V jetrih izbitje gena *Cyp51* z rekombinazo Cre ni bilo popolno, zato je bilo potrebno vzorčnim DNA iz jeter določiti stopnjo izrezovanja gena, kar bi omogočilo nadaljnje analize njegove funkcije na biosintezo holesterola ter določitev povezav med različnimi stopnjami izbitja in posledicami na fenotipe mišjih modelov.

Določitev stopnje izbitja gena v ciljnem tkivu omogoča metoda qPCR (Müller in sod., 2009), s katero smo v vzorčnih DNA iz jeter določili deleže izrezanega alela *Cyp51⁻* in deleže preostalega neizrezanega alela *Cyp51^{lox}*. Za ugotavljanje deležev posameznih alelov z metodo qPCR smo načrtovali specifične pare začetnih oligonukleotidov. Po testiranju smo izbrali dva para. Prvi par, Cyp01, je pri daljših neizrezanih odsekih alelov *Cyp51⁺* in *Cyp51^{lox}* tvoril pomnožke dolžin 1713 in 1887 bp, pri izrezanem krajšem odseku alela *Cyp51⁻* pa sta si bili mesti prileganja začetnih oligonukleotidov bližji, zato je pomnožek znašal 193 bp. Z izbranimi pogoji reakcije qPCR smo želeli, da bi par Cyp01 pri genotipih pogojnega izbitja *Cyp51^{lox/lox}*; *Cre⁺* in *Cyp51^{lox/-}*; *Cre⁺* pomnoževal le izrezan krajši odsek alela *Cyp51⁻*, kar bi nam omogočilo določiti stopnjo izbitja gena *Cyp51*. Drugi par, Cyp+1, pa je tvoril pomnožke pri neizrezanih odsekih alelov *Cyp51^{lox}* in *Cyp51⁺*, dolžine 143 bp. Pri izrezanih odsekih alela *Cyp51⁻* ni tvoril pomnožkov, saj je bilo vezavno mesto enega začetnega oligonukleotida izrezano zaradi delovanja rekombinaze Cre. S parom Cyp+1 smo vzorčnim DNA iz jeter želeli določiti deleže alela *Cyp51^{lox}*, ki jih rekombinaza Cre ni izrezala. Analiza talilne krivulje po končani qPCR nam je pri paru Cyp01 podala po dve T_m pri vsakem genotipu vzorčnih DNA, kar pa ni bilo optimalno. Sledila je optimizacija qPCR s spreminjanjem časa prileganja začetnih oligonukleotidov in pomnoževanja nove verige v reakciji qPCR, števila ciklov qPCR in koncentracij KCl v reakcijskih mešanica za qPCR, z namenom, da bi par Cyp01 prednostno pomnoževal le krajši odsek alela *Cyp51⁻*. Optimizacija je bila neuspešna, zato smo izvedli novo načrtovanje in testiranje začetnih oligonukleotidov, med katerimi smo izbrali novi par, in sicer Cyp01(novi), ki pa je v danih pogojih qPCR prednostno pomnoževal le alel *Cyp51⁻*, dolžine 249 bp. S pari Cyp+1, Cyp01(novi) in Actb, ki je služil za normalizacijo razlik v izražanju med vzorci DNA, smo izvedli ponovno reakcijo qPCR. Za zaznavo pomnožkov smo uporabili interkalarno fluorescentno barvilo SYBR Green I, ki z nespecifično vezavo v dvovijačno DNA oddaja fluorescenco. Aparatura qPCR določi prazno mejo fluorescence, ki jo preiskovani vzorci DNA dosežejo pri različnih vrednostih Cp, saj je obratno sorazmerna s številom začetnih kopij DNA. Iz preračunanih vrednosti Cp smo kontrolnim DNA iz zarodkov odbranih na stopnji E13,5 in preiskovanim vzorčnim DNA iz jeter ter repa osem tednov starih miši določili deleže izrezanega krajšega odseka alela *Cyp51⁻* in deleže preostalega neizrezanega daljšega odseka alela *Cyp51^{lox}*. Višji delež alelov *Cyp51⁻* je nakazoval na višjo stopnjo izbitja gena *Cyp51*. Rezultati so pokazali, da je bila raven

izbitja gena *Cyp51* v jetrih višja pri vzorčnih DNA z genotipom *Cyp51^{lox/-}; Cre⁺*, ki so imeli en izbit alel *Cyp51⁻* podedovan, kot pa pri vzorčnih DNA z genotipom *Cyp51^{lox/lox}; Cre⁺*, kjer je bilo izbitje gena odvisno le od uspešnosti izrezovanja z rekombinazo Cre. Deleži alela *Cyp51⁻* so v vzorčnih DNA iz jeter z genotipom *Cyp51^{lox/-}; Cre⁺* znašali 71,6–78,5 %, z genotipom *Cyp51^{lox/lox}; Cre⁺* pa 39,8–51,7 %, kar je nakazovalo na nepopolno delovanje rekombinaze Cre. Izolirane vzorčne DNA iz jeter so zajemale DNA hepatocit in DNA neparenhimskih celic, za katere pa ne poročajo o aktivnosti albuminskega promotorja (Si-Tayeb in sod., 2010; Fanali in sod., 2012) zato najverjetneje v njih ni prišlo do izbitja gena *Cyp51*. Verjetno je DNA neparenhimskih celic prispevala k višjemu deležu alela *Cyp51^{lox}*, pri genotipu *Cyp51^{lox/-}; Cre⁺* pa bi lahko, na račun podedovanega izbitega alela, tudi zvišala določen delež alela *Cyp51⁻*. Iz pridobljenih rezultatov lahko povzamemo, da je sistem Cre/lox uspešna metoda pri tvorbi mišjih modelov s pogojnim izbitjem ciljnih genov. Da smo se prepričali o specifičnem delovanju rekombinaze Cre v jetrih, smo določili tudi deleže alelov *Cyp51⁻* in *Cyp51^{lox}* v vzorčnih DNA iz repa. Določen 39,6 % delež alela *Cyp51⁻* pri vzorcu LKO 53 iz repa z genotipom *Cyp51^{lox/-}; Cre⁺* je bil v večini posledica dedovanja alela in ne delovanja rekombinaze Cre. Kljub temu, da s parom začetnih oligonukleotidov 5loxF/3loxR pri PCR preverjanju delovanja rekombinaze Cre v vzorcu LKO 50 iz repa z genotipom *Cyp51^{lox/lox}; Cre⁺* nismo zaznali krajših odsekov alela *Cyp51⁻*, ki bi nastali zaradi izrezovanja gena *Cyp51* z rekombinazo Cre, pa smo po končani qPCR pri istem vzorcu dobili 4,4 % delež alela *Cyp51⁻*, kar je nakazovalo na morebitno nizko raven izražanja rekombinaze Cre tudi v drugih tkivih. Vseeno lahko zaključimo, da je bilo izbitje gena *Cyp51* v jetrih z rekombinazo Cre tkivno specifično, saj smo pri vzorčnih DNA iz jeter zaznali bistveno višje deleže izbitega alela *Cyp51⁻* kot pa pri vzorčnih DNA iz repa (LKO 50 in LKO 53) istih živali. Glede na visoko učinkovitost izreza sklepamo, da se pogojni transgeni model *Cyp51^{lox/-}; Cre⁺* lahko uporablja za nadaljnje fenotipske analize vloge gena *Cyp51* in biosinteze holesterola v jetrih ter da se ugotovljeni učinki lahko interpretirajo kot posledica izgube funkcije *Cyp51* v hepatocitih. V prihodnjih raziskavah bi bilo potrebno raziskati vpliv različnih stopenj izbitja gena *Cyp51* na biosintezo holesterola v jetrih in na fenotip osebka, kar bi lahko v prihodnosti pomagalo pri razvoju novih zdravil za zniževanje holesterola, ki bi delovala na kasnejše korake biosinteze holesterola in s tem odpravila pomanjkljivosti statinov.

7 VIRI

- Abremski K., Hoess R. 1984. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 3: 1509-1514
- Accad M., Farese Jr R.V. 1998. Cholesterol homeostasis: A role for oxysterols. *Current Biology*, 8, 17: 601-604
- Arnold D.R., Kwiterovich P.O. 2003. Cholesterol. Absorption, function, and metabolism. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2nd edition. Vol 2. Caballero B., Trugi L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science Ltd: 1226-1237
- B6.Cg-Tg(Alb-cre)21Mgn/J. 2013. The Jackson Laboratory – Leading the search for tomorrow's cures.
<http://cre.jax.org/Alb/AlbNano.html> (20. apr. 2013)
- Bell B.S., Ranford-Cartwright L.C. 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. *TRENDS in Parasitology*, 18, 8: 337-342
- Branda C.S., Dymecki S.M. 2004. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Developmental Cell*, 6: 7-28
- Brownstein M.J. 2004. PCR (Polymerase Chain Reaction). V: *Encyclopedia of biological chemistry* Vol. 3. William J., Lennarz W.J., Lane M.D. (eds.). Amsterdam, Elsevier Inc: 208-210
- Chain J.L., Joachims M.L., Hooker S.W., Laurent A.B., Knott-Craig C.K., Thompson L.F. 2005. Real-time PCR method for the quantitative analysis of human T-cell receptor γ and β gene rearrangements. *Journal of Immunological Methods*, 300: 12-23
- Chen Z., Ma K.Y., Liang Y., Peng C. Zuo Y. 2011. Role and classification of cholesterol-lowering functional foods. *Journal of Functional Foods*, 3: 61-69
- Chiang J.Y.L. 2004. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *Journal of Hepatology*, 40: 539-551

- Cramp D.G. 2003. Liver. Structure and function. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. 2nd edition. Caballero B., Trugi L., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science Ltd: 3593-3596
- Čikoš Š., Koppel J. 2009. Transformation of real-time PCR fluorescence data to target gene quantity. *Analytical Biochemistry*, 384: 1-10
- Debeljak N., Fink M., Rozman D. 2003. Many facets of mammalian lanosterol 14 α -demethylase from the evolutionarily conserved cytochrome P450 family CYP51. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 409: 159-171
- Debeljak N., Horvat S., Vouk K., Lee M., Rozman D. 2000. Characterization of the mouse lanosterol 14 α -Demethylase (CYP51), a new member of the evolutionarily most conserved cytochrome P450 family. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379, 1: 37-45
- Dodson C.S., Rengarajan K., Gewant H.D., Stodulkova E., Nguyen H.T., Boatright J.H., Nickerson J.M. 2001. Extra-hepatic expression of serum albumin mRNA in mouse retina. *Current Eye Research*, 22, 3: 182-189
- Edwards P.A. 2004. Cholesterol synthesis V: Encyclopedia of biological chemistry Vol. 1. William J., Lennarz W.J., Lane M. D. (eds.). Amsterdam, Elsevier Inc.: 451-455
- Ekstrand M., Larsson N. G. 2002. Breeding and genotyping of Tfam conditional knockout mice. *Methods in Molecular Biology*, 197: 391-400
- Ensembl. Izdaja 72 (jun. 2013).
http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Sequence?db=core;g=ENSMUSG0000001467;r=5:4104084-4104796;t=ENSMUST000000001507 (16. jul. 2013)
- Fanali G., di Masi A., Trezza V., Marino M., Fasano M., Ascenti P. 2012. Human serum albumin: from bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine*, 33: 209-290
- Fink M., Ačimovič J., Režen T., Tanšek N., Rozman D. 2005. Cholesterogenic lanosterol 14 α -demethylase (*CYP51*) is an immediate early response gene. *Endocrinology*, 146, 12: 5321-5331
- Foulkes N.S., Sassone-Corsi P. 1996. Transcription factors coupled to the cAMP-signalling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1288: 101-121
- Galli-Taliadoros L.A., Sedgwick J.D., Wood S.A., Körner H. 1995. Gene knock-out technology: A methodological overview for the interested novice. *Journal of Immunological Methods*, 181: 1-15

- GeneRuler DNA Ladder, ready-to-use. 2013. Thermo SCIENTIFIC.
<http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-purification-and-electrophoresis/nucleic-acid-electrophoresis/dna-electrophoresis/generuler-dna-ladders> (3. feb. 2013)
- Ghosh K., Van Duyne G.D. 2002. Cre-*loxP* biochemistry. *Methods*, 28: 374-383
- Gibb B., Gupta K., Ghosh K., Sharp R., Chen J., Van Duyne G.D. 2010. Requirements for catalysis in the Cre recombinase active site. *Nucleic Acids Research*, 38, 17: 5817-5832
- Ginzinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30: 503-512
- Gorman C., Bullock C. 2000. Site – specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 455-460
- Grompe M. 2009. Adult liver stem cells. V: *Essentials of stem cell biology*. 2nd edition. Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomas E.D., Thomson J., Wilmut S.L. (eds.). Amsterdam, Elsevier Inc: 285-298
- Hasler J.A., Estabrook R., Murray M., Pikuleva I., Waterman M., Capdevila J., Holla V., Helvig C., Falck J.R., Farrell G., Kaminsky L.S., Spivac S.D., Boitier E., Beaune P. 1999. Human cytochromes P450. *Molecular Aspects of Medicine*, 20: 1-137
- Herman G.E. 2003. Disorders of cholesterol biosynthesis: Prototypic metabolic malformation syndromes. *Human Molecular Genetics*, 12: 75-88
- Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H., Vogt P.H. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, 23, 3: 504-511
- Horvat S., Mcwhir J., Rozman D. 2011. Defects in cholesterol synthesis genes in mouse and humans: Lessons for drug development and safer treatments. *Drug Metabolism Review*, 43, 1: 69-90
- HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute. 2013. <http://www.genenames.org/> (20. apr. 2013)
- Iredale J.P. 2007. Models of liver fibrosis: Exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 3: 539-548

- Keber R., Motaln H., Wagner K.D., Debeljak N., Rassoulzadegan M., Ačimovič J., Rozman D., Horvat S. 2011. Mouse knockout of the cholesterologenic cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (*CYP51*) resembles antley-bixler syndrome. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 33: 29086-29097
- Kočevar N., Kreft S., Obermajer N. 2007. Identifikacija in karekterizacija bioloških zdravil ter analiza bioloških vzorcev. V: *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*. Štrukelj B. in Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovesno farmacevtsko društvo: 136-184
- Koentgen F., Suess G., Naf D. 2010. Engineering the mouse genome to model human disease for drug discovery. V: *Mouse models for drug discovery. Methods and protocols*. Proetzel G., Wiles M. (eds.). New York, Humana Press: 55-77
- Korošec T., Ačimovič J., Seliškar M., Kocjan D., Tacer F.K., Rozman D., Urleb U. 2008. Novel cholesterol biosynthesis inhibitors targeting human lanosterol 14 α -demethylase (*CYP51*). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16: 209-221
- Lagasse E. 2007. Liver stem cells. V: *Principles of tissue engineering*. 3rd edition. Lanza R., Langer R. in Vacanti J. (eds.). Amsterdam, Elsevier Inc: 695-705
- Lakso M., Pichel J.G., gorman J. R., Sauer B., Okamoto Y., Lee E., Alt F.W., Westphal H. 1996. Efficient *in vivo* manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 5860-5865
- Lepesheva G.I., Waterman M.R. 2011. Structural basis for conservation in the *CYP51* family. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814, 1: 88-93
- Liscum L. 2008. Cholesterol biosynthesis. V: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 5th edition. Vance D.E., Vance J.E. (eds.). Amsterdam, Elsevier B.V.: 399-421
- McLaren J.E., Michael D.R., Ashlin T.G., Ramji D.P. 2011. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy. *Progress in Lipid Research*, 50: 331-347
- Metzger D., Feil R. 1999. Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curent Opinion in Biotechnology*, 10: 470-476
- Mocellin S., Rossi C. R., Pilati P., Nitti D., Marincola F.M. 2003. Quantitative real-time PCR: A powerful ally in cancer research. *TRENDS in Molecular Medicine*, 9, 5: 189-195

- Moore K.J., Rayner K.J., Suárez Y., Fernández-Hernando C. 2010. MicroRNAs and cholesterol metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21, 12: 699-706
- Mouse Genome Informatics – MGI. 2013. The Jackson Laboratory (23. jan. 2013)
<http://www.informatics.jax.org/> (20. apr. 2013)
- Müller C.C., Nourse J.P., Nguyen T.H., Crane D.I. 2009. Quantitative genotyping of mouse brain-specific PEX13 gene disruption by real-time PCR. *Journal of Neuroscience Methods*, 181: 73-81
- Nagy A. 2000. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 26: 99-109
- Nahon J.L., Tratner I., Poliard A., Presse F., Poiret M., Gal A., Sala-Trepat J.M. 1988. Albumin and α -fetoprotein gene expression in various nonhepatic rat tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 23: 11436-11442
- Oram J.F. 2002. Molecular basis of cholesterol homeostasis: Lessons from Tangier disease and ABCA1. *TRENDS in Molecular Medicine*, 8, 4: 168-173
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research*, 29, 9: 2002-2007
- Pfaffl M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. V: A-Z of quantitative PCR. 1st edition. Bustin S. A. (ed.). La Jolla, International University Line (IUL): 87-112
- Pfriege F.W., Ungerer N. 2011. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Progress in Lipid Research*, 50: 357-371
- Postic C., Shiota M., Niswender K.D., Jetton T.J., Chen Y., Moates J.M., Shelton K.D., Linder J., Cherrington A.D., Magnuson M.A. 1999. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic β cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 1: 305-315
- Protocol : AmpliTaq Gold with GeneAmp 10X PCR Buffer or GeneAmp 10X PCR Buffer II & MgCl₂ Solution or GeneAmp 10X PCR Gold Buffer & MgCl₂ Solution. 2000. Applied Biosystems: 16 str.
- Pucadyil T.J., Chattopadhyay A. 2006. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Progress in Lipid Research*, 45: 295-333

- Rozen S., Skaletsky H. 1999. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. V: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* Vol. 132. Krawetz S., Misener S. (eds.). Totowa, New Jersey, Humana Press: 365-386
- Rozman D., Strömstedt M., Tsui L., Scherer S.W., Waterman M.R. 1996. Structure and mapping of the human lanosterol 14 α -demethylase gene (CYP51) encoding the cytochrome P450 involved in cholesterol biosynthesis; Comparison of exon/intron organization with other mammalian and fungal CYP genes. *Genomics*, 38: 371-381
- Sauer B., Henderson N. 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 85: 5166-5170
- Seliskar M., Rozman D. 2007. Review mammalian cytochromes P450-importance of tissue specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770: 458-466
- Shamay A., Homans R., Fuerman Y., Levin I., Barash H., Silanikove N., Mabjeesh S.J. 2005. Expression of albumin in nonhepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 88: 569-576
- Schulz T.J., Glaubitz M., Kuhlrow D., Thierbach R., Birringer M., Steinberg P., Pfeiffer A.F., Ristow M. 2007. Variable expression of Cre recombinase transgenes precludes reliable prediction of tissue-specific gene disruption by tail-biopsy genotyping. *PLOS ONE*, 2, 10: e1013
- Si-Tayeb K., Lemaigre F.P., Duncan S.A. 2010. Organogenesis and development of the liver. *Development Cell*, 18: 175-189
- Strushkevich N., Usanov A.S., Park H.W. 2010. Structural basis of human CYP51 inhibition by antifungal azoles. *Journal of Molecular Biology*, 397: 1067-1078
- Tronche F., Casanova E., Turiault M., Sahly I., Kellendonk C. 2002. When reverse genetics meets physiology: The use of site-specific recombinases in mice. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 529: 116-121
- Underhill G.H., Khetani S.R., Chen A.A., Bhatia S.N. 2007. Liver. V: *Principles of tissue engineering*. 3rd edition. Lanza R., Langer R., Vacanti J. (eds.). Amsterdam, Elsevier Inc: 707-731
- VanGuilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44, 5: 619-626

- Wagatsuma A., Fujimoto K., Yamada S. 2002. Alteration in albumin level during modified muscular activity. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 12: 143-149
- Wang Y., Rogers P.M., Su C., Varga G., Stayrook K.R., Burris T.P. 2008. Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRA. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 39: 26332-26339
- Waterham R.H., 2006. Minireview defect of cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters*, 580: 5442-5449
- Weis B., Schmidt J., Lyko F., Linhart H.G. 2010. Analysis of conditional gene deletion using probe based real-time PCR. *BioMed Central Biotechnology*, 10: 75
- Your one-stop-shop real-time PCR supplier. Q&qPCR booklet-0304-V1. 2004. Eurogentec: 64 str.
<http://www.gene-quantification.de/eurogentec-RT-PCR-booklet.pdf> (12. nov. 2012)
- Zhu H.Z., Wang W., Feng D.M., Sai Y., Xue J.L. 2006. Conditional gene modification in mouse liver using hydrodynamic delivery of plasmid DNA encoding Cre recombinase. *FEBS Letters*, 580: 4346-4352

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Simonu Horvatu, da je prevzel mentorstvo in dr. Roku Kebru za somentorstvo ter za pomoč v laboratoriju in pri pisanju diplome. Zahvaljujem se tudi prof. dr. Gregorju Majdiču za pregled, popravke in nasvete pri diplomi.

Zahvaljujem se prijateljem, sošolcem in sostanovalcem študentskega doma Rožna Dolina za čudovita in nepozabna študentska leta.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in sorodnikom za moralno in finančno podporo tekom študija.

PRILOGE

Priloga A: Podatki Cp in izračunane deviacije odklonov (SD), brez normalizacije, pri vzorčnih DNA pomnoženih s parom Cyp+1 in učinkovitosti reakcije 1,96

vzorec	namen	genotype	Cp	Eff Cor	Corr AV	SD	CV
102.1.	wt kontrola	+/+	23,59	1,28E-07	1,26E-07	3,98E-09	3%
102.1.		+/+	23,57	1,29E-07			
102.1.		+/+	23,66	1,22E-07			
102.1.		+/+	23,51	1,35E-07	1,34E-07	5,21E-10	0%
102.1.		+/+	23,52	1,34E-07			
102.1.		+/+	23,52	1,34E-07			
102.1.		+/+	22,91	2,02E-07	2,02E-07	4,78E-09	2%
102.1.	hz kontrola	+/+	22,87	2,07E-07			
102.1.		+/+	22,94	1,98E-07			
102.4.		+/-	25,02	4,87E-08	4,80E-08	1,03E-09	2%
102.4.		+/-	25,08	4,68E-08			
102.4.		+/-	25,03	4,84E-08			
102.4.		+/-	24,48		6,29E-08	2,40E-09	4%
102.4.		+/-	24,6	6,46E-08			
102.4.	KO kontrola	+/-	24,68	6,13E-08			
102.4.		+/-	24,6	6,46E-08	6,54E-08	1,28E-09	2%
102.4.		+/-	24,55	6,69E-08			
102.4.		+/-	24,6	6,46E-08			
96.3.		-/-	30	1,71E-09	1,71E-09	0,00E+00	0%
96.3.		-/-	30	1,71E-09			
96.3.		-/-	30	1,71E-09			
96.3.	rep za LKO50	-/-	30	1,71E-09	1,71E-09	0,00E+00	0%
96.3.		-/-	30	1,71E-09			
96.3.		-/-	30	1,71E-09			
96.3.		-/-	30	1,71E-09	1,71E-09	0,00E+00	0%
96.3.		-/-	30	1,71E-09			
96.3.		-/-	30	1,71E-09			
96.3.		-/-	30	1,71E-09	1,71E-09	0,00E+00	0%
LKO50 rep	rep za LKO53	lox/lox; +	23,66	1,22E-07	1,17E-07	5,10E-09	4%
LKO50 rep		lox/lox; +	23,79	1,11E-07			
LKO50 rep		lox/lox; +	23,72	1,17E-07			
LKO50 rep		lox/lox; +	23,69	1,19E-07	1,17E-07	2,40E-09	2%
LKO50 rep		lox/lox; +	23,75	1,15E-07			
LKO50 rep		lox/lox; +	23,71	1,18E-07			
LKO50 rep		lox/lox; +	23,69	1,19E-07	1,18E-07	2,10E-09	2%
LKO50 rep	vzorci za izrez	lox/lox; +	23,68	1,20E-07			
LKO50 rep		lox/lox; +	23,73	1,16E-07			
LKO53 rep		lox/-; +	25,89	2,71E-08	2,71E-08	6,39E-10	2%
LKO53 rep		lox/-; +	25,93	2,64E-08			
LKO53 rep		lox/-; +	25,86	2,77E-08			
LKO53 rep		lox/-; +	25,94	2,62E-08	2,72E-08	1,26E-09	5%
LKO53 rep		lox/-; +	25,81	2,86E-08			
LKO53 rep	LKO50 vz1	lox/-; +	25,91	2,68E-08			
LKO53 rep		lox/-; +	25,95	2,61E-08	2,60E-08	1,14E-09	4%
LKO53 rep		lox/-; +	25,89	2,71E-08			
LKO53 rep		lox/-; +	26,02	2,49E-08			
LKO50 vz1		lox/lox; +	24,61	6,42E-08	6,64E-08	2,04E-09	3%
LKO50 vz1		lox/lox; +	24,55	6,69E-08			
LKO50 vz1		lox/lox; +	24,52	6,82E-08			
LKO50 vz1		lox/lox; +	24,66	6,21E-08	6,34E-08	2,62E-09	4%

se nadaljuje

nadaljevanje

LKO50 vz1	lox/lox; +	24,56	6,64E-08				
LKO50 vz1	lox/lox; +	24,67	6,17E-08				
LKO50 vz1	lox/lox; +	24,47	7,05E-08	7,06E-08	1,42E-09	2%	
LKO50 vz1	lox/lox; +	24,44	7,20E-08				
LKO50 vz1	lox/lox; +	24,5	6,91E-08				
LKO64 vz2	lox/lox; +	23,74	1,15E-07	1,16E-07	1,82E-09	2%	
LKO64 vz2	lox/lox; +	23,7	1,18E-07				
LKO64 vz2	lox/lox; +	23,74	1,15E-07				
LKO64 vz2	lox/lox; +	23,72	1,17E-07	1,16E-07	9,02E-10	1%	
LKO64 vz2	lox/lox; +	23,72	1,17E-07				
LKO64 vz2	lox/lox; +	23,74	1,15E-07				
LKO64 vz2	lox/lox; +	23,64	1,23E-07	1,22E-07	2,16E-09	2%	
LKO64 vz2	lox/lox; +	23,65	1,23E-07				
LKO64 vz2	lox/lox; +	23,69	1,19E-07				
LKO60 vz3	lox/lox; +	25	4,94E-08	5,08E-08	2,71E-09	5%	
LKO60 vz3	lox/lox; +	24,87	5,39E-08				
LKO60 vz3	lox/lox; +	25,01	4,91E-08				
LKO60 vz3	lox/lox; +	24,88	5,35E-08	5,17E-08	1,66E-09	3%	
LKO60 vz3	lox/lox; +	24,97	5,04E-08				
LKO60 vz3	lox/lox; +	24,95	5,11E-08				
LKO60 vz3	lox/lox; +	24,84	5,50E-08	5,37E-08	1,27E-09	2%	
LKO60 vz3	lox/lox; +	24,91	5,25E-08				
LKO60 vz3	lox/lox; +	24,88	5,35E-08				
LKO53 vz4	lox/-; +	25,82	2,84E-08	2,69E-08	1,54E-09	6%	
LKO53 vz4	lox/-; +	25,99	2,54E-08				
LKO53 vz4	lox/-; +	25,9	2,70E-08				
LKO53 vz4	lox/-; +	25,83	2,83E-08	2,78E-08	7,51E-10	3%	
LKO53 vz4	lox/-; +	25,9	2,70E-08				
LKO53 vz4	lox/-; +	25,83	2,83E-08				
LKO53 vz4	lox/-; +	25,82	2,84E-08	2,88E-08	2,95E-10	1%	
LKO53 vz4	lox/-; +	25,79	2,90E-08				
LKO53 vz4	lox/-; +	25,8	2,88E-08				
LKO65 vz5	lox/-; +	25,69	3,10E-08	3,13E-08	2,02E-09	6%	
LKO65 vz5	lox/-; +	25,58	3,34E-08				
LKO65 vz5	lox/-; +	25,77	2,94E-08				
LKO65 vz5	lox/-; +	25,68	3,13E-08	3,24E-08	1,09E-09	3%	
LKO65 vz5	lox/-; +	25,62	3,25E-08				
LKO65 vz5	lox/-; +	25,58	3,34E-08				
LKO65 vz5	lox/-; +	25,6	3,30E-08	3,16E-08	1,29E-09	4%	
LKO65 vz5	lox/-; +	25,72	3,04E-08				
LKO65 vz5	lox/-; +	25,67	3,15E-08				
LKO66 vz6	lox/-; +	25,76	2,96E-08	2,92E-08	1,32E-09	5%	
LKO66 vz6	lox/-; +	25,73	3,02E-08				
LKO66 vz6	lox/-; +	25,86	2,77E-08				
LKO66 vz6	lox/-; +	25,68	3,13E-08	2,94E-08	1,72E-09	6%	
LKO66 vz6	lox/-; +	25,85	2,79E-08				
LKO66 vz6	lox/-; +	25,79	2,90E-08				
LKO66 vz6	lox/-; +	25,77	2,94E-08	2,88E-08	1,27E-09	4%	
LKO66 vz6	lox/-; +	25,88	2,73E-08				
LKO66 vz6	lox/-; +	25,76	2,96E-08				

Priloga B: Podatki Cp in izračunane SD, brez normalizacije, pri vzorčnih DNA pomnoženih s parom Cyp01(novi) in učinkovitosti reakcije 1,79

vzorec	namen	genotype	Cp	Eff Cor	Corr AV	SD	CV
102.1.	wt kont	+/+	30	2,60E-08	2,60E-08	4,05E-24	0%
102.1.		+/+	30	2,60E-08			
102.1.		+/+	30	2,60E-08			
102.1.		+/+	30	2,60E-08	2,60E-08	4,05E-24	0%
102.1.		+/+	30	2,60E-08			
102.1.		+/+	30	2,60E-08			
102.1.		+/+	30	2,60E-08	2,60E-08	4,05E-24	0%
102.1.		+/+	30	2,60E-08			
102.1.		+/+	30	2,60E-08			
102.4.	hz kont	+/-	25,91	2,81E-07	2,70E-07	1,10E-08	4%
102.4.		+/-	25,97	2,71E-07			
102.4.		+/-	26,05	2,59E-07			
102.4.		+/-	25,92	2,79E-07	2,81E-07	3,80E-09	1%
102.4.		+/-	25,88	2,86E-07			
102.4.		+/-	25,92	2,79E-07			
102.4.		+/-	26,07	2,56E-07	2,60E-07	4,55E-09	2%
102.4.		+/-	26,01	2,65E-07			
102.4.		+/-	26,04	2,60E-07			
96.3.	KO kor	-/-	26,11	2,50E-07	2,44E-07	8,57E-09	4%
96.3.		-/-	26,22	2,35E-07			
96.3.		-/-	26,12	2,49E-07			
96.3.		-/-	26,11	2,50E-07	2,41E-07	9,90E-09	4%
96.3.		-/-	26,25	2,30E-07			
96.3.		-/-	26,16	2,43E-07			
96.3.		-/-	26,56	1,92E-07	1,92E-07	8,38E-09	4%
96.3.		-/-	26,49	2,00E-07			
96.3.		-/-	26,64	1,84E-07			
LKO50 rep	rep za	lox/lox; +	30	2,60E-08	2,60E-08	4,05E-24	0%
LKO50 rep		lox/lox; +	30	2,60E-08			
LKO50 rep		lox/lox; +	30	2,60E-08			
LKO50 rep		lox/lox; +	30	2,60E-08	2,60E-08	4,05E-24	0%
LKO50 rep		lox/lox; +	30	2,60E-08			
LKO50 rep		lox/lox; +	30	2,60E-08	2,60E-08	4,05E-24	0%
LKO50 rep		lox/lox; +	30	2,60E-08			
LKO50 rep		lox/lox; +	30	2,60E-08			
LKO53 rep	rep za	lox/-; +	27,6		1,20E-07	1,48E-09	1%
LKO53 rep		lox/-; +	27,36	1,21E-07			
LKO53 rep		lox/-; +	27,39	1,19E-07			
LKO53 rep		lox/-; +	27,6	1,05E-07	1,03E-07	5,68E-09	6%
LKO53 rep		lox/-; +	27,57	1,07E-07			
LKO53 rep		lox/-; +	27,75	9,62E-08			
LKO53 rep		lox/-; +	27,41	1,17E-07	1,20E-07	2,83E-09	2%
LKO53 rep		lox/-; +	27,33	1,23E-07			
LKO53 rep		lox/-; +	27,38	1,19E-07			
LKO50 vz1	vzorci	lox/lox; +	24,97	4,86E-07	4,65E-07	1,86E-08	4%
LKO50 vz1		lox/lox; +	25,07	4,58E-07			
LKO50 vz1		lox/lox; +	25,1	4,50E-07			
LKO50 vz1		lox/lox; +	25,1	4,50E-07	4,62E-07	1,39E-08	3%

se nadaljuje

nadaljevanje

LKO50 vz1	lox/lox; +	25	4,77E-07				
LKO50 vz1	lox/lox; +	25,07	4,58E-07				
LKO50 vz1	lox/lox; +	24,81	5,33E-07	5,13E-07	1,95E-08	4%	
LKO50 vz1	lox/lox; +	24,88	5,12E-07				
LKO50 vz1	lox/lox; +	24,94	4,94E-07				
LKO64 vz2	lox/lox; +	24,16	7,78E-07	7,81E-07	2,62E-09	0%	
LKO64 vz2	lox/lox; +	24,15	7,83E-07				
LKO64 vz2	lox/lox; +	24,15	7,83E-07				
LKO64 vz2	lox/lox; +	24,21	7,56E-07	7,50E-07	1,00E-08	1%	
LKO64 vz2	lox/lox; +	24,25	7,38E-07				
LKO64 vz2	lox/lox; +	24,21	7,56E-07				
LKO64 vz2	lox/lox; +	24,16	7,78E-07	7,58E-07	2,81E-08	4%	
LKO64 vz2	lox/lox; +	24,18	7,69E-07				
LKO64 vz2	lox/lox; +	24,28	7,26E-07				
LKO60 vz3	lox/lox; +	25,33	3,94E-07	3,74E-07	1,80E-08	5%	
LKO60 vz3	lox/lox; +	25,49	3,59E-07				
LKO60 vz3	lox/lox; +	25,44	3,69E-07				
LKO60 vz3	lox/lox; +	25,29	4,03E-07	4,00E-07	5,36E-09	1%	
LKO60 vz3	lox/lox; +	25,29	4,03E-07				
LKO60 vz3	lox/lox; +	25,33	3,94E-07				
LKO60 vz3	lox/lox; +	25,46	3,65E-07	3,68E-07	6,92E-09	2%	
LKO60 vz3	lox/lox; +	25,41	3,76E-07				
LKO60 vz3	lox/lox; +	25,47	3,63E-07				
LKO53 vz4	lox/-; +	24,92	5,00E-07	5,00E-07	0,00E+00	0%	
LKO53 vz4	lox/-; +	25,46					
LKO53 vz4	lox/-; +	24,92	5,00E-07				
LKO53 vz4	lox/-; +	24,92	5,00E-07	5,10E-07	9,04E-09	2%	
LKO53 vz4	lox/-; +	24,88	5,12E-07				
LKO53 vz4	lox/-; +	24,86	5,18E-07				
LKO53 vz4	lox/-; +	24,92	5,00E-07	5,11E-07	9,51E-09	2%	
LKO53 vz4	lox/-; +	24,87	5,15E-07				
LKO53 vz4	lox/-; +	24,86	5,18E-07				
LKO65 vz5	lox/-; +	24,8	5,36E-07	5,10E-07	2,67E-08	5%	
LKO65 vz5	lox/-; +	24,98	4,83E-07				
LKO65 vz5	lox/-; +	24,88	5,12E-07				
LKO65 vz5	lox/-; +	24,81	5,33E-07	5,28E-07	4,70E-09	1%	
LKO65 vz5	lox/-; +	24,83	5,27E-07				
LKO65 vz5	lox/-; +	24,84	5,24E-07				
LKO65 vz5	lox/-; +	24,87	5,15E-07	5,11E-07	4,54E-09	1%	
LKO65 vz5	lox/-; +	24,88	5,12E-07				
LKO65 vz5	lox/-; +	24,9	5,06E-07				
LKO66 vz6	lox/-; +	24,73	5,58E-07	5,34E-07	3,24E-08	6%	
LKO66 vz6	lox/-; +	24,77	5,46E-07				
LKO66 vz6	lox/-; +	24,93	4,97E-07				
LKO66 vz6	lox/-; +	24,83	5,27E-07	5,09E-07	2,51E-08	5%	
LKO66 vz6	lox/-; +	24,95	4,91E-07				
LKO66 vz6	lox/-; +	25,06					
LKO66 vz6	lox/-; +	24,85	5,21E-07	5,36E-07	1,35E-08	3%	
LKO66 vz6	lox/-; +	24,78	5,42E-07				
LKO66 vz6	lox/-; +	24,77	5,46E-07				

Priloga C: Podatki Cp in izračunani SD pri vzorčnih DNA pomnoženih s parom Actb in učinkovitosti reakcije 1,88

vzorec	namen	genotype	Cp	Eff Cor	Corr AV	SD	CV
102.1.	wt kont	+/+	22,87	5,37E-07	5,29E-07	1,63E-08	3%
102.1.		+/+	22,86	5,40E-07			
102.1.		+/+	22,95	5,11E-07			
102.1.		+/+	22,92	5,20E-07	5,02E-07	1,64E-08	3%
102.1.		+/+	22,99	4,98E-07			
102.1.		+/+	23,02	4,89E-07			
102.1.		+/+	23	4,95E-07	5,04E-07	8,39E-09	2%
102.1.		+/+	22,95	5,11E-07			
102.1.		+/+	22,96	5,07E-07			
102.4.	hz koni	+/-	23,48	3,65E-07	3,65E-07	1,33E-09	0%
102.4.		+/-	23,48	3,65E-07			
102.4.		+/-	23,49	3,63E-07			
102.4.		+/-	23,44	3,75E-07	3,66E-07	1,05E-08	3%
102.4.		+/-	23,53	3,54E-07			
102.4.		+/-	23,47	3,68E-07			
102.4.		+/-	23,5	3,61E-07	3,60E-07	1,31E-09	0%
102.4.		+/-	23,5	3,61E-07			
102.4.		+/-	23,51	3,59E-07			
96.3.	KO kor	-/-	24,73	1,66E-07	1,64E-07	3,56E-09	2%
96.3.		-/-	24,73	1,66E-07			
96.3.		-/-	24,79	1,60E-07			
96.3.		-/-	24,75	1,64E-07	1,67E-07	5,85E-09	4%
96.3.		-/-	24,76	1,63E-07			
96.3.		-/-	24,66	1,73E-07			
96.3.		-/-	24,68	1,71E-07	1,70E-07	3,07E-09	2%
96.3.		-/-	24,73	1,66E-07			
96.3.		-/-	24,68	1,71E-07			
LKO50 rep	rep za	lox/lox; +	23,24	4,25E-07	4,33E-07	7,21E-09	2%
LKO50 rep		lox/lox; +	23,2	4,36E-07			
LKO50 rep		lox/lox; +	23,19	4,39E-07			
LKO50 rep		lox/lox; +	23,23	4,28E-07	4,41E-07	1,81E-08	4%
LKO50 rep		lox/lox; +	23,21	4,33E-07			
LKO50 rep		lox/lox; +	23,11	4,62E-07			
LKO50 rep		lox/lox; +	23,11	4,62E-07	4,44E-07	1,82E-08	4%
LKO50 rep		lox/lox; +	23,17	4,44E-07			
LKO50 rep		lox/lox; +	23,24	4,25E-07			
LKO53 rep	rep za	lox/-; +	24,19	2,33E-07	2,24E-07	7,87E-09	4%
LKO53 rep		lox/-; +	24,28	2,21E-07			
LKO53 rep		lox/-; +	24,29	2,19E-07			
LKO53 rep		lox/-; +	24,41	2,03E-07	2,01E-07	1,47E-09	1%
LKO53 rep		lox/-; +	24,43	2,01E-07			
LKO53 rep		lox/-; +	24,43	2,01E-07			
LKO53 rep		lox/-; +	24,33	2,14E-07	2,10E-07	7,24E-09	3%
LKO53 rep		lox/-; +	24,42	2,02E-07			
LKO53 rep		lox/-; +	24,32	2,15E-07			
LKO50 vz1	vzorci	lox/lox; +	22,1	8,73E-07	8,59E-07	1,37E-08	2%
LKO50 vz1		lox/lox; +	22,13	8,57E-07			
LKO50 vz1		lox/lox; +	22,15	8,46E-07			
LKO50 vz1		lox/lox; +	22,01	9,24E-07	9,24E-07	1,75E-08	2%

se nadaljuje

nadaljevanje

LKO50 vz1	lox/lox; +	21,98	9,42E-07			
LKO50 vz1	lox/lox; +	22,04	9,07E-07			
LKO50 vz1	lox/lox; +	22,08	8,84E-07	8,88E-07	6,49E-09	1%
LKO50 vz1	lox/lox; +	22,06	8,96E-07			
LKO50 vz1	lox/lox; +	22,08	8,84E-07			
LKO64 vz2	lox/lox; +	21,77	1,08E-06	1,07E-06	1,78E-08	2%
LKO64 vz2	lox/lox; +	21,76	1,08E-06			
LKO64 vz2	lox/lox; +	21,81	1,05E-06			
LKO64 vz2	lox/lox; +	21,8	1,06E-06	1,04E-06	1,73E-08	2%
LKO64 vz2	lox/lox; +	21,85	1,02E-06			
LKO64 vz2	lox/lox; +	21,81	1,05E-06			
LKO64 vz2	lox/lox; +	21,66	1,15E-06	1,16E-06	4,75E-08	4%
LKO64 vz2	lox/lox; +	21,59	1,20E-06			
LKO64 vz2	lox/lox; +	21,72	1,11E-06			
LKO60 vz3	lox/lox; +	22,55	6,57E-07	6,46E-07	9,46E-09	1%
LKO60 vz3	lox/lox; +	22,59	6,41E-07			
LKO60 vz3	lox/lox; +	22,59	6,41E-07			
LKO60 vz3	lox/lox; +	22,51	6,74E-07	6,41E-07	2,87E-08	4%
LKO60 vz3	lox/lox; +	22,64	6,21E-07			
LKO60 vz3	lox/lox; +	22,62	6,29E-07			
LKO60 vz3	lox/lox; +	22,59	6,41E-07	6,40E-07	6,16E-09	1%
LKO60 vz3	lox/lox; +	22,61	6,33E-07			
LKO60 vz3	lox/lox; +	22,58	6,45E-07			
LKO53 vz4	lox/-;+	22,87	5,37E-07	5,20E-07	1,44E-08	3%
LKO53 vz4	lox/-;+	22,95	5,11E-07			
LKO53 vz4	lox/-;+	22,94	5,14E-07			
LKO53 vz4	lox/-;+	22,92	5,20E-07	5,14E-07	5,64E-09	1%
LKO53 vz4	lox/-;+	22,95	5,11E-07			
LKO53 vz4	lox/-;+	22,95	5,11E-07			
LKO53 vz4	lox/-;+	22,97	5,04E-07	5,07E-07	3,20E-09	1%
LKO53 vz4	lox/-;+	22,95	5,11E-07			
LKO53 vz4	lox/-;+	22,96	5,07E-07			
LKO65 vz5	lox/-;+	22,9	5,27E-07	5,24E-07	5,71E-09	1%
LKO65 vz5	lox/-;+	22,93	5,17E-07			
LKO65 vz5	lox/-;+	22,9	5,27E-07			
LKO65 vz5	lox/-;+	22,79	5,65E-07	5,46E-07	1,74E-08	3%
LKO65 vz5	lox/-;+	22,89	5,30E-07			
LKO65 vz5	lox/-;+	22,85	5,44E-07			
LKO65 vz5	lox/-;+	22,85	5,44E-07	5,24E-07	1,73E-08	3%
LKO65 vz5	lox/-;+	22,94	5,14E-07			
LKO65 vz5	lox/-;+	22,94	5,14E-07			
LKO66 vz6	lox/-;+	22,96	5,07E-07	4,93E-07	1,27E-08	3%
LKO66 vz6	lox/-;+	23,03	4,85E-07			
LKO66 vz6	lox/-;+	23,03	4,85E-07			
LKO66 vz6	lox/-;+	23,06	4,76E-07	4,79E-07	3,03E-09	1%
LKO66 vz6	lox/-;+	23,05	4,79E-07			
LKO66 vz6	lox/-;+	23,04	4,82E-07			
LKO66 vz6	lox/-;+	22,91	5,24E-07	5,11E-07	1,82E-08	4%
LKO66 vz6	lox/-;+	22,99	4,98E-07			
LKO66 vz6	lox/-;+	22,51				

Priloga D: Združene vrednosti preračunane iz Cp in učinkovitosti reakcij posameznih parov začetnih oligonukleotidov pri vzorčnih DNA

vzorec	namen	genotype	Cyp+1	Cyp01(novi)	actb
102.1.	wt kontrola	+/+	1,26169E-07	2,59662E-08	5,29362E-07
102.1.		+/+	1,34003E-07	2,59662E-08	5,02249E-07
102.1.		+/+	2,02055E-07	2,59662E-08	5,04237E-07
102.4.	hz kontrola	+/-	4,79735E-08	2,70373E-07	3,64638E-07
102.4.		+/-	6,29459E-08	2,81480E-07	3,65506E-07
102.4.		+/-	6,53772E-08	2,60466E-07	3,60063E-07
96.3.	KO kontrola	-/-	1,70733E-09	2,44384E-07	1,63931E-07
96.3.		-/-	1,70733E-09	2,41123E-07	1,66756E-07
96.3.		-/-	1,70733E-09	1,92157E-07	1,69536E-07
LKO50 rep	rep za LKO50	lox/lox; +	1,16678E-07	2,59662E-08	4,33348E-07
LKO50 rep		lox/lox; +	1,17144E-07	2,59662E-08	4,40907E-07
LKO50 rep		lox/lox; +	1,18461E-07	2,59662E-08	4,43703E-07
LKO53 rep	rep za LKO53	lox/-; +	2,70768E-08	1,19719E-07	2,24354E-07
LKO53 rep		lox/-; +	2,72126E-08	1,02706E-07	2,01446E-07
LKO53 rep		lox/-; +	2,60170E-08	1,19853E-07	2,10185E-07
LKO50 vz1	vzorci za izrez	lox/lox; +	6,64245E-08	4,64626E-07	8,58692E-07
LKO50 vz1		lox/lox; +	6,33837E-08	4,61823E-07	9,24353E-07
LKO50 vz1		lox/lox; +	7,05591E-08	5,12941E-07	8,88035E-07
LKO64 vz2		lox/lox; +	1,16352E-07	7,81193E-07	1,06877E-06
LKO64 vz2		lox/lox; +	1,16345E-07	7,50037E-07	1,04212E-06
LKO64 vz2		lox/lox; +	1,21693E-07	7,57657E-07	1,15584E-06
LKO60 vz3		lox/lox; +	5,07799E-08	3,73944E-07	6,46339E-07
LKO60 vz3		lox/lox; +	5,16689E-08	3,99946E-07	6,41297E-07
LKO60 vz3		lox/lox; +	5,36691E-08	3,67946E-07	6,39549E-07
LKO53 vz4		lox/-; +	2,69195E-08	4,99922E-07	5,20490E-07
LKO53 vz4		lox/-; +	2,78172E-08	5,09773E-07	5,13850E-07
LKO53 vz4		lox/-; +	2,87630E-08	5,10769E-07	5,07390E-07
LKO65 vz5		lox/-; +	3,12941E-08	5,10187E-07	5,23674E-07
LKO65 vz5		lox/-; +	3,24054E-08	5,27854E-07	5,46345E-07
LKO65 vz5		lox/-; +	3,16209E-08	5,10723E-07	5,23842E-07
LKO66 vz6		lox/-; +	2,91720E-08	5,33655E-07	4,92761E-07
LKO66 vz6		lox/-; +	2,93817E-08	5,09041E-07	4,79366E-07
LKO66 vz6		lox/-; +	2,87811E-08	5,36213E-07	5,10759E-07

Priloga E: Normalizacija vrednosti vzorčnih DNA parov Cyp+1 in Cyp01(novi) s parom Actb ter preglednici z združenimi podatki vrednosti deležev (MEAN) in pripadajoče vrednosti SD in SEM alelov *Cyp51^{lox}* pri paru Cyp+1 in alelov *Cyp51⁻* pri paru Cyp01(novi), katere smo uporabili za risanje grafov posameznih deležev alelov za vsak specifičen par začetnih oligonukleotidov

Cyp+1	Cyp01(novi)	Cyp+1	Cyp01(novi)		Cyp+1	stdev	Cyp01(novi)	stdev
0,24	0,05	0,79	0,04	+/+	1,00	0,287145	0,04	0,0010861
0,27	0,05	0,88	0,04	+/+				
0,40	0,05	1,33	0,04	+/+				
0,13	0,74	0,44	0,55	+/-	0,54	0,088045	0,55	0,017363
0,17	0,77	0,57	0,57	+/-				
0,18	0,72	0,60	0,53	+/-				
0,01	1,49	0,03	1,10	-/-	0,03	0,000570	1,00	0,1434874
0,01	1,45	0,03	1,07	-/-				
0,01	1,13	0,03	0,84	-/-				
0,27	0,06	0,89	0,04	lox/lox; -	0,89	0,005965	0,04	0,000534
0,27	0,06	0,88	0,04	lox/lox; -				
0,27	0,06	0,88	0,04	lox/lox; -				
0,12	0,53	0,40	0,39	+/-	0,42	0,025102	0,40	0,022421
0,14	0,51	0,45	0,38	+/-				
0,12	0,57	0,41	0,42	+/-				
0,08	0,54	0,26	0,40	lox/lox; +	0,25	0,019123	0,40	0,0287633
0,07	0,50	0,23	0,37	lox/lox; +				
0,08	0,58	0,26	0,43	lox/lox; +				
0,11	0,73	0,36	0,54	lox/lox; +	0,36	0,010555	0,52	0,0300002
0,11	0,72	0,37	0,53	lox/lox; +				
0,11	0,66	0,35	0,48	lox/lox; +				
0,08	0,58	0,26	0,43	lox/lox; +	0,27	0,008954	0,44	0,0199145
0,08	0,62	0,27	0,46	lox/lox; +				
0,08	0,58	0,28	0,42	lox/lox; +				
0,05	0,96	0,17	0,71	lox/-; +	0,18	0,008229	0,73	0,0173969
0,05	0,99	0,18	0,73	lox/-; +				
0,06	1,01	0,19	0,74	lox/-; +				
0,06	0,97	0,20	0,72	lox/-; +	0,20	0,001746	0,72	0,0036039
0,06	0,97	0,20	0,71	lox/-; +				
0,06	0,97	0,20	0,72	lox/-; +				
0,06	1,08	0,20	0,80	lox/-; +	0,20	0,008217	0,78	0,0123672
0,06	1,06	0,20	0,78	lox/-; +				
0,06	1,05	0,19	0,77	lox/-; +				
0,30	1,36							

Par Cyp+1	K +/+	K +/-	K -/-	Rep L50 lox/lox; +	Rep L53 lox/-; +	Jetra L50 lox/lox; +	Jetra L64 lox/lox; +	Jetra L60 lox/lox; +	Jetra L53 lox/-; +	Jetra L65 lox/-; +	Jetra L66 lox/-; +
MEAN	100,0 %	53,6 %	3,4 %	88,5 %	41,9 %	24,9 %	36,0 %	26,8 %	17,9 %	19,8 %	19,5 %
SD	28,7 %	8,8 %	0,1 %	0,6 %	2,5 %	1,9 %	1,1 %	0,9 %	0,8 %	0,2 %	0,8 %
SEM	16,6 %	5,1 %	0,0 %	0,3 %	1,4 %	1,1 %	0,6 %	0,5 %	0,5 %	0,1 %	0,5 %

Par Cyp01 (novi)	K +/+	K +/-	K -/-	Rep L50 lox/lox; +	Rep L53 lox/-; +	Jetra L50 lox/lox; +	Jetra L64 lox/lox; +	Jetra L60 lox/lox; +	Jetra L53 lox/-; +	Jetra L65 lox/-; +	Jetra L66 lox/-; +
MEAN	3,7 %	54,9 %	100,0 %	4,4 %	39,6 %	39,8 %	51,7 %	43,7 %	72,7 %	71,6 %	78,5 %
SD	0,1 %	1,7 %	14,3 %	0,1 %	2,2 %	2,9 %	3,0 %	2,0 %	1,7 %	0,4 %	1,2 %
SEM	0,1 %	1,0 %	8,3 %	0,0 %	1,3 %	1,7 %	1,7 %	1,1 %	1,0 %	0,2 %	0,7 %