

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej

im. Ludwika Hirszfelda

Polskiej Akademii Nauk



Sylwia Janik

**Regulacja ekspresji genu *VDR* w czasie hematopoezy
u myszy**

Regulation of the *VDR* gene expression during murine
hematopoiesis

Promotor

dr hab. Małgorzata Cebrat

Praca doktorska wykonana w Laboratorium Immunologii Molekularnej i Komórkowej

Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

we Wrocławiu

Polskiej Akademii Nauk

Wrocław, 2021

Pracę dedykuję Mężowi i Dzieciom.

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojej promotor dr hab. Małgorzacie Cebrat za przyjęcie mnie do swojego zespołu badawczego. Jestem wdzięczna za możliwość rozwoju oraz za wszystkie daleko idące kompromisy – dziękuję, za miejsce, w którym możliwe jest łączenie pracy naukowej z macierzyństwem.

Dziękuję prof. dr hab. Ewie Marcinkowskiej za możliwość spełnienia mojego naukowego marzenia – pracy na komórkach macierzystych. Dziękuję za opiekę merytoryczną i czuwanie nad prawidłowym kierunkiem badań.

Składam podziękowania wszystkim pracownikom Zakładu Immunologii Nowotworów, którzy towarzyszyli mi w naukowej ścieżce. W szczególności dr Agnieszce Łaszkiwicz, za jej niewyczerpywalne pokłady pomocy i serdeczności.

Dziękuję kolegom i koleżankom, którzy tworzyli niesamowitą atmosferę pracy, zwłaszcza dr Łukaszowi Śnieżewskiemu, dr Mikołajowi Kłossowiczowi, dr Marcie Lisowskiej, dr Joannie Niedbalskiej-Tarnowskiej, dr Michałowi Majkowskiemu i mgr Karolinie Pyziak. Za owocną współpracę dziękuję mgr Klaudii Górczak.

Mojemu mężowi, rodzicom, rodzeństwu i teściom dziękuję za ogrom wsparcia i czas poświęcony na opiekę nad moimi dziećmi – bez Waszego zaangażowania i pomocy bycie mamą i doktorantką jednocześnie nie byłoby proste.

Za motywację do działania na ostatniej prostej dziękuję moim przyjacielom – Asi, Sebastianowi i Ani.

W wyniku realizacji niniejszej pracy doktorskiej powstały następujące publikacje:

1. Urszula Nowak, **Sylwia Janik**, Aleksandra Marchwicka, Agnieszka Łaszkiewicz, Agnieszka Jakuszek, Małgorzata Cebrat, Ewa Marcinkowska „**Investigating the Role of Methylation in Silencing of VDR Gene Expression in Normal Cells During Hematopoiesis and in Their Leukemic Counterparts.**” Cells 2020
2. **Sylwia Janik**, Urszula Nowak, Agnieszka Łaszkiewicz, Anastasiia Satyr, Michał Majkowski, Aleksandra Marchwicka, Łukasz Śnieżewski, Klaudia Berkowska, Marian Gabryś, Małgorzata Cebrat, Ewa Marcinkowska “**Diverse regulation of vitamin D receptor gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and ATRA in blood cells of mice and man.**” International Journal of Molecular Sciences 2017

Wyniki pracy zaprezentowano również podczas ogólnopolskich i międzynarodowych konferencji naukowych:

1. U. Nowak, **S. Janik**, A. Marchwicka, A. Łaszkiewicz, M. Majkowski, L. Śnieżewski, M. Cebrat, E. Marcinkowska, „**Different mechanisms of vitamin D receptor gene expression or silencing in blood cells of mice and man.**”. The FEBS Congress, Kraków 2019.
2. **Sylwia Janik**, Urszula Nowak, Agnieszka Łaszkiewicz, Michał Majkowski, Łukasz Śnieżewski, Aleksandra Marchwicka, Marian Gabryś, Małgorzata Cebrat, Ewa Marcinkowska “**Differences in regulation of vitamin D receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D and all-trans-retinoic acid in murine and human blood cells during hematopoiesis.**” International Behr Symposium on Stem Cells and Cancer - Heidelberg, Baden-Wurttemberg, Germany 16-19.05.2018
3. **Sylwia Janik**, Urszula Nowak, Agnieszka Łaszkiewicz, Michał Majkowski, Łukasz Śnieżewski, Aleksandra Marchwicka, Marian Gabryś, Małgorzata Cebrat, Ewa Marcinkowska “**Differences in regulation of vitamin D receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D and all-trans-retinoic acid in murine and human blood cells during hematopoiesis.**” The 21st Workshop on Vitamin D, 15 – 19.05.2018, Barcelona
4. Urszula Nowak, **Sylwia Janik**, Agnieszka Łaszkiewicz, Aleksandra Marchwicka, Małgorzata Cebrat, Ewa Marcinkowska, „**Warianty transkrypcyjne genu receptora**

witaminy D oraz ich regulacja przez kwas całkowicie trans retinowy w ludzkich i mysich komórkach krwi". VI Konferencja Biologii Molekularnej, 6-8.04.2017r. Łódź

Badania zrealizowano w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki OPUS 2015/17/B/NZ4/02632 „Współdziałanie receptora witaminy D (VDR) z receptorami kwasu retinowego (RAR) w procesie hematopoezy”. Kierownik projektu – prof. dr hab. Ewa Marcinkowska.

Streszczenie

Witamina D₃ wykazuje szerokie spektrum działań biologicznych, które związane są m.in. z funkcjonowaniem gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz z funkcjonowaniem układu odpornościowego. Działanie hormonalnie aktywnej formy tej witaminy, nazywanej kalcytriolem, wyraża się poprzez aktywację receptora jądrowego, należącego do nadrodziny receptorów steroidowych. Receptor witaminy D (*ang.* Vitamin D Receptor, VDR) odpowiada za kontrolę ekspresji wielu genów, a najnowsze badania wskazują na związek między poziomem ekspresji tego receptora i rokowaniem u pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Przeciwnowotworowe działanie witaminy D₃, związane z działaniem jej wewnątrzkomórkowego receptora, polega na uruchomieniu procesu różnicowania komórek nowotworowych. Wpływ sygnalizacji VDR na komórki białaczkowe jest dobrze udokumentowany, ale jej znaczenie w procesie prawidłowej hematopoezy pozostaje wciąż słabo poznane. Choć badania potwierdzają obecność tego receptora w komórkach krwi, wiedza o pełnionej przez niego funkcji jest bardzo ograniczona. Nieznany jest także sam sposób regulacji ekspresji genu *VDR* w procesie krwiotworzenia.

Celem podjętych badań było poznanie mechanizmów odpowiadających za proces regulacji ekspresji genu receptora witaminy D w procesie hematopoezy. Prace prowadzono na mysim modelu badawczym, który stanowi najczęściej stosowany model do badań nad ludzką hematopoezą. W ramach przeprowadzonych prac zidentyfikowano promotor genu *VDR* wykorzystywany w komórkach krwi. Ustalono warianty końca 5' i wyznaczono punkty startu transkrypcji genu *VDR*. Wyznaczono profil ekspresji genu *VDR* w mysich komórkach krwi, a uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę postulującą, iż aktywny transkrypcyjnie VDR jest obecny nie tylko w niektórych zróżnicowanych komórkach krwi, ale także w hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych. Ustalono wzór metylacji promotora badanego genu oraz podjęto pierwszą próbę określenia elementów regulatorowych odpowiadających za wiązanie receptora VDR w obrębie *locus VDR*.

Uzyskane wyniki umożliwiają analizę porównawczą mechanizmów regulacyjnych charakterystycznych dla prawidłowych komórek hematopoetycznych z danymi dotyczącymi komórek nowotworowych. Umożliwia to ustalenie, które z obserwowanych zjawisk stanowią fizjologiczną normę, a które świadczą o zainicjowaniu procesów nowotworowych w komórkach krwi.

Abstract

Vitamin D₃ shows a wide range of biological activities related to the functioning of the calcium-phosphate metabolism and the proper functioning of the immune system. The activity of vitamin D₃ is related to the activation of the nuclear receptor, which belongs to the group of steroid receptors. The vitamin D receptor is responsible for the control of the expression of many genes. Moreover, the latest research indicates a connection between the level of this receptor expression and the prognosis in patients with acute myeloid leukaemia. The anticancer effect of vitamin D₃, which is related to the activity of its intracellular receptor, is based on the activation of the process of the cancer cells differentiation. Nowadays, the influence of VDR signalling on leukemic cells is widely known, but its importance in the process of the normal haematopoiesis still remains obscure. The research confirms the presence of this receptor in blood cells, but its importance and function have not been fully understood. The method of regulating the expression of the VDR gene in the process of haematopoiesis is also unknown.

The aim of the research was to learn about the mechanisms responsible for the regulation of the vitamin D receptor gene expression in the process of haematopoiesis. The experiment was carried out on the mouse research model which is the most widely used model for research into human haematopoiesis. In the process of the research, the promoter of the VDR gene used in blood cells was identified. The 5' end variants and the VDR gene transcription starting points were determined. The VDR gene expression profile in mouse blood cells was determined, and the obtained results confirmed the hypothesis that transcriptionally active VDR is present not only in differentiated blood cells, but also in hematopoietic stem and progenitor cells. The promoter methylation pattern of the examined gene was determined and the regulatory factors responsible for binding of the VDR within the VDR locus were established.

The obtained results enable a comparative analysis of the regulatory mechanisms characteristic of the normal hematopoietic cells with the data on cancer cells, which consequently may enable the determination which of the observed phenomena constitute the physiological norm and which indicate the initiation of cancer processes in blood cells.

Wykaz skrótów

| | |
|-------|---|
| 1,25D | 1,25-dihydroksywitamina D ₃ , 1 α ,25-dihydroksycholekalcyferol, kalcytriol |
| AML | <i>ang.</i> Acute Myeloid Leukemia ostra białaczka szpikowa |
| APL | <i>ang.</i> Acute Promyelocytic Leukemia ostra białaczka promielocytowa |
| ATRA | <i>ang.</i> All-Trans Retinoic Acid kwas całkowicie trans-retinowy |
| BCP | <i>ang.</i> B-Cell Precursor prekursor limfocytów B |
| CAMP | <i>ang.</i> Cathelicidin Antimicrobial Peptide katelicydyny |
| cAMP | <i>ang.</i> Cyclic Adenosine Monophosphate cykliczny adenzynomonofosforan |
| ChIP | <i>ang.</i> chromatin immunoprecipitation immunoprecypitacja chromatyny |
| CIP | <i>ang.</i> Calf Intestinal Phosphatase alkaliczna fosfataza |
| CLP | <i>ang.</i> Common Lymphoid Progenitor progenitory wspólne dla linii limfoidalnej |
| CMP | <i>ang.</i> Common Myeloid Progenitor progenitory wspólne dla linii mieloidalnej |
| DBD | <i>ang.</i> DNA Binding Domain domena wiążąca DNA |
| DRIP | <i>ang.</i> Vitamin D Receptor Interacting Proteins białka oddziałujące z receptorem witaminy D |
| EMP | <i>ang.</i> Erythroid–Myeloid Progenitors progenitory erytroidowo-szpikowe |
| GMP | <i>ang.</i> Granulocyte-Macrophage Progenitor progenitory granulocytów i makrofagów |

| | |
|-------|---|
| GP | <i>ang.</i> Granulocyte Precursor prekursor granulocytów |
| HDAC | <i>ang.</i> Histone Deacetylase deacetylaza histonów |
| HSC | <i>ang.</i> Hematopoietic Stem Cells hematopoetyczne komórki macierzyste |
| LBD | <i>ang.</i> Ligand Binding Domain domena wiążąca ligand |
| Lin- | <i>ang.</i> Lineage-negative cells komórki linii negatywnej (niewyrażające markerów poszczególnych linii krwiotwórczych) |
| LSC | <i>ang.</i> Leukemia Stem Cells białaczkowe komórki macierzyste |
| LSK | <i>ang.</i> Lin- Sca1+ c-kit+ populacja komórek o fenotypie Lin- Sca1+ c-kit+ |
| LT | <i>ang.</i> Long-Term długoterminowe (HSC) |
| MARRS | <i>ang.</i> Membrane-Associated Rapid Response Steroid Binding Protein związany z błoną odpowiedzialny za szybką odpowiedź receptor wiążący steroidy |
| MeCP | <i>ang.</i> Methyl-CpG-Binding Protein białka wiążące metylo-CpG |
| MEP | <i>ang.</i> Megakaryocyte-Erythroid Progenitor progenitory megakariocytów i erytrocytów |
| MPP | <i>ang.</i> Multipotent Progenitor Cells multipotencjalne komórki progenitorowe |
| NLS | <i>ang.</i> Nuclear Localisation Signal sygnał lokalizacji jądrowej |
| NPC | <i>ang.</i> Nuclear Pore Complex kompleks porów jądrowych |
| PABP | <i>ang.</i> Poly(A)-Binding Protein białko wiążące poli(A) |
| PI3K | <i>ang.</i> Phosphoinositide 3-Kinase kinaza fosfatydyloinozytolu-3 |

| | |
|--------|---|
| PKC | <i>ang.</i> Protein Kinase C kinaza białkowa C |
| RAR | <i>ang.</i> Retinoic Acid Receptor receptor kwasu retinowego |
| RARE | <i>ang.</i> Retinoic Acid Response Elements elementy odpowiedzi na retinoidy |
| RXR | <i>ang.</i> Retinoid X Receptor receptor X dla retinoidów |
| SCF | <i>ang.</i> Stem Cell Factor czynniki komórek macierzystych |
| SP1 | <i>ang.</i> Specificity Protein 1 czynniki transkrypcyjny SP1 |
| SP3 | <i>ang.</i> Specificity Protein 3 czynniki transkrypcyjny SP3 |
| ST | <i>ang.</i> short-term krótkoterminowe (HSC) |
| STAT 1 | <i>ang.</i> Signal Transducer and Activator of Transcription 1 czynniki transkrypcyjny STAT1 |
| TAP | <i>ang.</i> Tobacco Acid Pyrophosphatase kwaśna pirofosfataza |
| TLR | <i>ang.</i> Toll-like Receptor receptory <i>toll</i> -podobne |
| TPO | <i>ang.</i> Thrombopoietin trombopoetyna |
| UGD | <i>ang.</i> Uracil-DNA Glycosylase glikozyłaza uracylu |
| VDBP | <i>ang.</i> Vitamin D Binding Protein białko wiążące witaminę D |
| VDR | <i>ang.</i> Vitamin D Receptor receptor witaminy D |
| VDRE | <i>ang.</i> Vitamin D Response Elements elementy odpowiedzi na witaminę D |

| | |
|---|----|
| Streszczenie..... | 8 |
| Abstract | 10 |
| Wykaz skrótów | 12 |
| 1 Wstęp | 20 |
| 1.1 Budowa, właściwości, synteza oraz mechanizm działania witaminy D..... | 20 |
| 1.2 Budowa i działanie receptora witaminy D oraz organizacja budowy genu receptora witaminy D..... | 22 |
| 1.3 Regulacja ekspresji genów..... | 27 |
| 1.4 Regulacja ekspresji genów a nowotwory wywodzące się z komórek krwi..... | 31 |
| 1.5 Rola metabolitów witaminy D w procesie nowotworzenia | 33 |
| 1.6 Rola witaminy A i jej pochodnych w procesie nowotworzenia | 35 |
| 1.7 Współdziałanie receptora witaminy D z receptorem witaminy A..... | 36 |
| 1.8 Hematopoeza – opis i znaczenie procesu | 37 |
| 1.9 Regulacja procesu hematopoezy..... | 42 |
| 2 Cel pracy | 46 |
| 3 Materiały i metody..... | 47 |
| 3.1 Materiały..... | 47 |
| 3.1.1 Bakterie..... | 47 |
| 3.1.2 Linie komórkowe..... | 47 |
| 3.1.3 Zwierzęta laboratoryjne | 47 |
| 3.1.4 Odczynniki chemiczne, komercyjne zestawy, enzymy, przeciwciała i cytokiny | 47 |
| 3.1.5 Bufory i media hodowlane..... | 50 |
| 3.1.6 Startery oligonukleotydowe..... | 52 |
| 3.1.7 Plazmidy | 53 |
| 3.1.8 Aparatura | 54 |
| 3.2 Metody | 56 |
| 3.2.1 Trawienie proteinazą K..... | 56 |
| 3.2.2 Izolacja DNA genomowego | 56 |
| 3.2.3 Izolacja DNA plazmidowego z komórek bakteryjnych w skali mini..... | 56 |
| 3.2.4 Izolacja plazmidów w skali midi | 57 |
| 3.2.5 Izolacja RNA z zastosowaniem TriReagent (duża ilość komórek)..... | 57 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.2.6 | Izolacja RNA z zastosowaniem PicoPure RNA Isolation Kit (mała ilość komórek)..... | 58 |
| 3.2.7 | Spektrofotometryczny pomiar stężenia i czystości kwasów nukleinowych DNA/RNA | 58 |
| 3.2.8 | Odwrotna transkrypcja | 59 |
| 3.2.9 | Reakcja PCR..... | 59 |
| 3.2.10 | Reakcja PCR na koloniach bakteryjnych | 61 |
| 3.2.11 | Elektroforeza DNA/RNA w żelu agarozowym..... | 61 |
| 3.2.12 | Oczyszczanie DNA z żelu agarozowego..... | 61 |
| 3.2.13 | Trawienie restrykcyjne DNA..... | 61 |
| 3.2.14 | Defosforylacja końców nici DNA | 62 |
| 3.2.15 | Oczyszczanie DNA po reakcji enzymatycznej..... | 62 |
| 3.2.16 | Ligacja DNA..... | 63 |
| 3.2.17 | Oczyszczanie DNA po ligacji..... | 63 |
| 3.2.18 | SLIC - klonowanie niezależne od sekwencji i ligacji (<i>ang.</i> Sequence- and Ligation-Independent Cloning)..... | 64 |
| 3.2.19 | Reakcja EXO/SAP..... | 65 |
| 3.2.20 | Reakcja sekwencjonowania DNA | 66 |
| 3.2.21 | Przechowywanie komórek bakteryjnych..... | 67 |
| 3.2.22 | Pomiar gęstości optycznej płynnej hodowli bakteryjnej | 68 |
| 3.2.23 | Otrzymywanie bakterii chemikompetentnych <i>E.coli</i> HST08..... | 68 |
| 3.2.24 | Transformacja bakterii chemikompetentnych <i>E.coli</i> HST08 | 68 |
| 3.2.25 | Hodowla płynna bakterii | 69 |
| 3.2.26 | Hodowla bakterii na podłożu stałym | 69 |
| 3.2.27 | Selekcja transformantów | 69 |
| 3.2.28 | Konstrukcja plazmidów reporterowych pNL1.2 | 70 |
| 3.2.29 | Dodawanie reszt adeniny na 3' końcach cząsteczek DNA..... | 71 |
| 3.2.30 | Klonowanie do plazmidu pGEM-T easy | 71 |
| 3.2.31 | Zamrażanie i rozmrażanie komórek | 72 |
| 4 | Wyniki | 88 |
| 4.1 | Identyfikacja promotorów genu <i>VDR</i> w komórkach krwi oraz ustalenie wariantów końca 5' i wyznaczenie punktu startu transkrypcji <i>VDR</i> z użyciem techniki 5'-RACE PCR | 88 |
| 4.2 | Opracowanie metody izolacji i namnażania mysich HSPC | 90 |

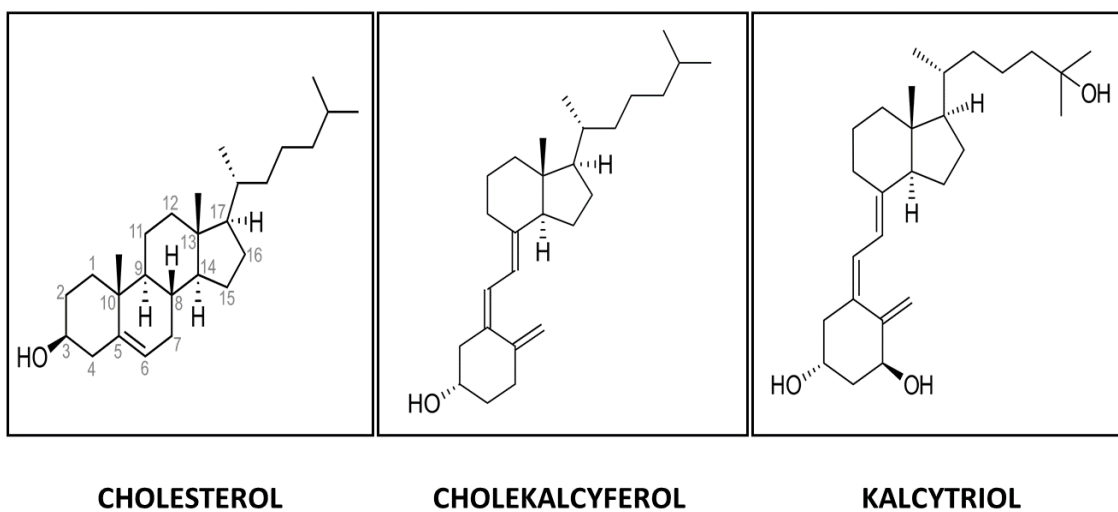
| | | |
|-------|---|-----|
| 4.3 | Ekspresja genu <i>VDR</i> w mysich komórkach | 92 |
| 4.4 | Stopień metylacji promotorów genu <i>VDR</i> w mysich komórkach krwi | 93 |
| 4.4.1 | Sekwencjonowanie genomowego DNA po jego konwersji pirosiarczynem sodu..... | 93 |
| 4.5 | Wyznaczenie profilu ekspresji genu <i>VDR</i> w mysich komórkach krwi z wykorzystaniem metody Real-Time PCR | 95 |
| 4.5.1 | Regulacja ekspresji genu <i>VDR</i> przez 1,25D i ATRA w mysich komórkach krwi oraz w nerce..... | 95 |
| 4.5.2 | Ekspresja i regulacja genu <i>VDR</i> przez 1,25D i ATRA w subpopulacjach mysich hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych | 99 |
| 4.5.3 | Autoregulacja receptora witaminy D w mysiej linii komórkowej 32D..... | 103 |
| 4.6 | Próba identyfikacji elementów regulatorowych wiążących receptor <i>VDR</i> w obrębie <i>locus VDR</i> z wykorzystaniem lucyferazowych testów reporterowych oraz immunoprecypitacji chromatyny | 106 |
| 4.6.1 | Analiza <i>in silico</i> obszaru promotorowego genu <i>VDR</i> w celu identyfikacji potencjalnych elementów odpowiedzi na witaminę D | 106 |
| 4.6.2 | Immunoprecypitacja chromatyny | 107 |
| 4.6.3 | Konstrukcja plazmidów zawierających potencjalne elementy odpowiedzi na witaminę D..... | 111 |
| 4.6.4 | Konstrukcja plazmidów zawierających sekwencję enhancera S1 | 114 |
| 4.6.5 | Elektroporacja komórek 32D i test lucyferazowy | 115 |
| 5 | Dyskusja..... | 118 |
| 6 | Podsumowanie i wnioski | 134 |
| | Bibliografia | 135 |
| | Spis rycin i tabel..... | 147 |

1 Wstęp

W minionych latach wiele uwagi poświęcono witaminie D, która wykazuje plejotropowe działanie na organizm ludzki. Pierwotnie jej rolę zawężano do regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej, dzisiaj jednak wiemy, że spektrum jej aktywności jest znacznie szersze. Najnowsze badania wskazują na jej właściwości immunomodulujące oraz co ciekawe, zdolność do różnicowania komórek. Właściwość ta jest obiektem badań związanych z procesem nowotworzenia, a prowadzone prace mają na celu opracowanie nowych ścieżek terapeutycznych. Biologiczne działanie witaminy D jest ściśle związane z jej receptorem (*ang.* Vitamin D Receptor, VDR), który działa jako czynnik transkrypcyjny, tym samym regulując ekspresję wielu docelowych genów. Celem tej części pracy jest przybliżenie działania witaminy D, budowy i funkcji jej receptora oraz omówienie jego znaczenia dla procesów związanych z prawidłowym rozwojem komórek krwi oraz procesami nowotworowymi.

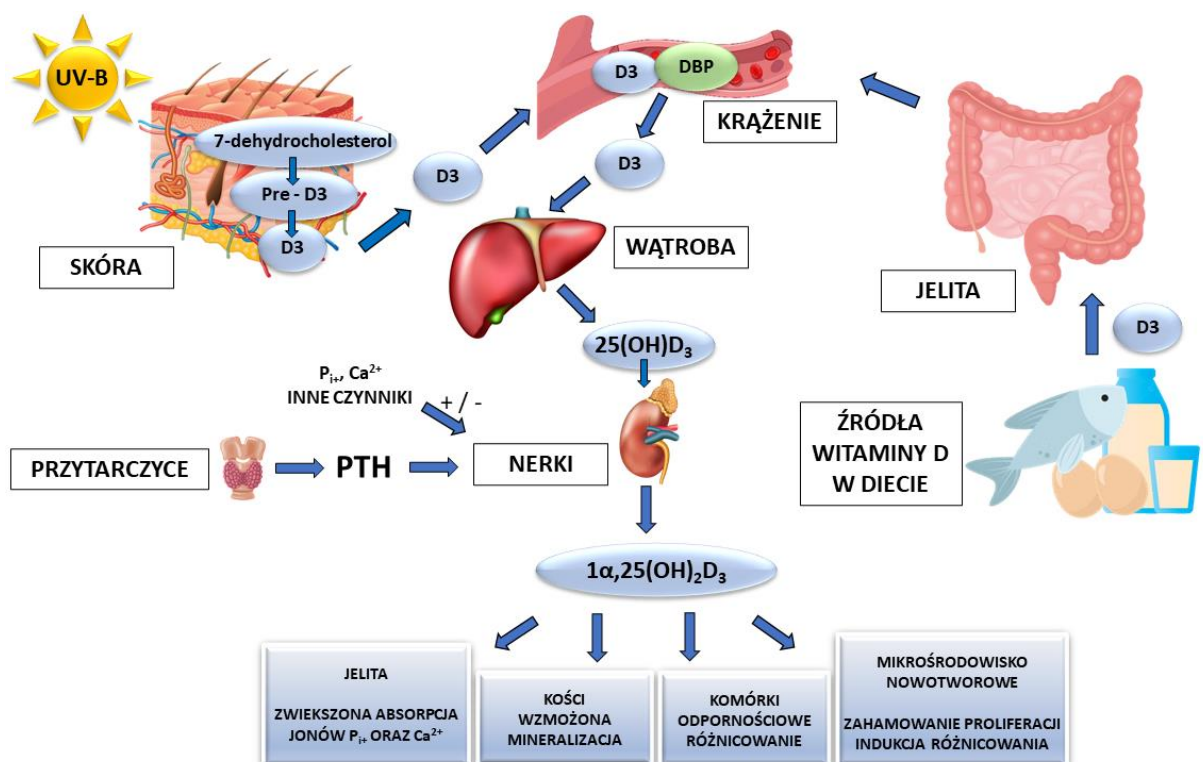
1.1 Budowa, właściwości, synteza oraz mechanizm działania witaminy D

Cholekalcyferol (witamina D₃) (Ryc.1) to substancja, która w tradycyjnym ujęciu jest klasyfikowana jako witamina, czyli organiczny związek chemiczny niezbędny do prawidłowego funkcjonowania ludzkiego organizmu. W odróżnieniu od wielu witamin cholekalcyferol pełni także funkcję prohormonalną, ponieważ w toku metabolicznych przekształceń przyjmuje postać 1 α ,25-dihydroksycholekalcyferolu, nazywanego kalcytrolem, który charakteryzuje się szerokim zakresem aktywności biologicznej [1] [2].



Rycina 1. Wzór chemiczny cholesterolu, cholekalcyferolu oraz kalcytroliu. Opracowanie własne na podstawie [2].

Źródłem witaminy D₃ dla ludzkiego organizmu jest pokarm lub proces biosyntezy skórnej (Ryc. 2). Pod wpływem promieniowania UV-B w warstwie rozrodczej naskórka powstający z cholesterolu 7-dehydrocholesterol ulega przekształceniom, wskutek których powstaje prewitamina D. W procesie izomeryzacji cieplnej prewitamina D przekształca się w witaminę D₃ [3]. Powstały w skórze cholekalcyferol jest transportowany do wątroby przez białko wiążące witaminę D (*ang.* VDBP, Vitamin D Binding Protein) [4]. W hepatocytach rozpoczyna się proces hydroksylacji i powstaje 25-hydroksywitamina D₃. Reakcja ta zachodzi z udziałem 25-hydroksylazy (CYP27A1) obecnej w mitochondriach hepatocytów [5]. Powstała 25-hydroksywitamina D₃ jest transportowana do nerek, gdzie w reakcji hydroksylacji katalizowanej przez enzym CYP27B1 powstaje 1α,25-dihydroksywitamina D₃ [6]. Za katabolizm kalcytriolu odpowiada enzym CYP24A1, wchodzący w skład cytochromu P450, który przeprowadza reakcję hydroksylacji przy 24-atomie węgla 1α,25-(OH)₂D₃. Powstały 24,25-dihydroksycholekalcyferol ulega rozszczepieniu, wskutek czego tworzy się kwas kalcytrionowy. Związek ten jest dobrze rozpuszczalny w wodzie, dlatego może zostać wydalony z organizmu [7].



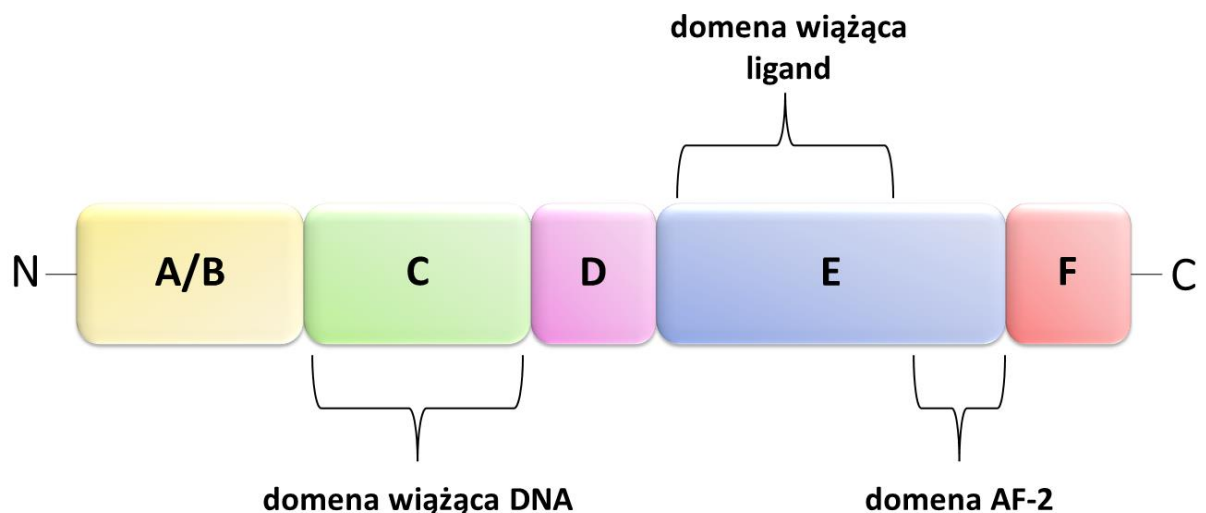
Rycina 2. Synteza, degradacja oraz działanie kalcytriolu. Opracowanie własne na podstawie [7]. Oznaczenia skrótów: Pre-D3 – prewitamina D₃, DBP – białko wiążące witaminę D, P_i – jony fosforanowe, Ca²⁺ – jony wapniowe, PTH – parathormon.

Hormonalnie aktywną formą witaminy D jest $1\alpha,25$ -dihydroksywitamina D_3 , nazywana kalcytriolem. Jej działanie wyraża się poprzez zdolność do wiązania się z receptorami wewnątrzkomórkowymi [8]. Kalcytriol jest znany przede wszystkim z pełnienia funkcji regulacyjnej w procesie homeostazy wapniowo-fosforanowej w ludzkim organizmie, a jego niedobór prowadzi do rozwoju krzywicy, osteoporozy lub osteomalacji [9]. Badania dowodzą, że spektrum jego działania jest znacznie szersze i obejmuje także procesy związane z prawidłowym funkcjonowaniem układu odpornościowego. Witamina D_3 wykazuje działanie immunomodulujące, które wyraża się m.in. poprzez regulację funkcjonowania komórek dendrytycznych, indukcję powstawania limfocytów T regulatorowych [10] oraz hamowanie proliferacji i różnicowania limfocytów B, co skutkuje inhibicją wytwarzania immunoglobulin [11]. Receptory witaminy D_3 są obecne we wnętrzu większości komórek układu odpornościowego. Aktywacja receptorów TLR (*ang.* Toll-like receptor) obecnych na powierzchni makrofagów indukuje hydroksylację witaminy D_3 , co skutkuje inicjacją odpowiedzi odpornościowej. Aktywowane kalcytriolem makrofagi stymulowane są do produkcji katelicyn, które wykazują właściwości bakteriobójcze [12]. Niedobór kalcytriolu koreluje z występowaniem chorób autoimmunologicznych takich jak stwardnienie rozsiane czy toczeń rumieniowy układowy [13] oraz skutkuje zahamowaniem odpowiedzi układu odpornościowego skierowanej przeciw wirusom i bakteriom [12].

1.2 Budowa i działanie receptora witaminy D oraz organizacja budowy genu receptora witaminy D

Działanie hormonalne kalcytriolu wyraża się poprzez aktywację jego wewnątrzkomórkowego receptora. Receptor witaminy D jest receptorem jądrowym należącym do nadrodziny receptorów hormonów steroidowych [14]. W budowie receptora VDR wyróżnić można kilka modułów, które zawierają domeny funkcjonalne, oznaczone jako A - F (Ryc. 3). Na N-końcu typowego receptora jądrowego znajduje się region A/B, w obrębie którego zazwyczaj występuje domena AF-1, stanowiąca miejsce fosforylacji – w przypadku VDR obserwuje się jej brak. Region C stanowi najbardziej konserwatywną domenę i charakteryzuje się wysokim powinowactwem wobec docelowych sekwencji DNA. W obrębie domeny wiążącej DNA (*ang.* DNA Binding Domain, DBD) wyróżnia się trzy α -helisy, które odpowiadają m.in. za wiązanie DNA przez monomeryczną formę receptora

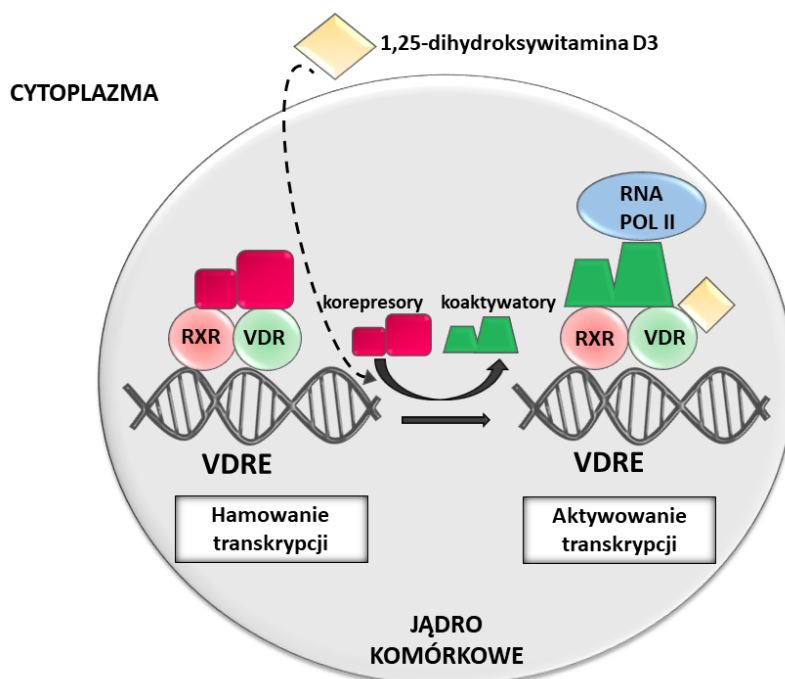
oraz za dimeryzację receptora. Region E zawiera domenę wiążącą ligand (*ang.* Ligand Binding Domain), w obrębie której znajduje się powierzchnia umożliwiająca heterodimeryzację VDR z receptorem X dla retinoidów (*ang.* Retinoid X Receptor) [15]. Domena ta utworzona jest przez 12 konserwatywnych regionów o strukturze alfa-helisy (H1-H12). W obrębie LBD znajduje się hydrofobowa wnęka, która stanowi właściwe miejsce wiązania liganda. Receptor przechodzi wyraźną zmianę konformacyjną po związaniu liganda – jego struktura przestrzenna staje się bardziej zwarta. Ligandy receptora witaminy D mogą stanowić $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i jego analogi oraz kwas litocholowy [16].



Rycina 3. Schemat budowy receptora witaminy D. Opracowanie własne na podstawie [15]. Opis w tekście powyżej.

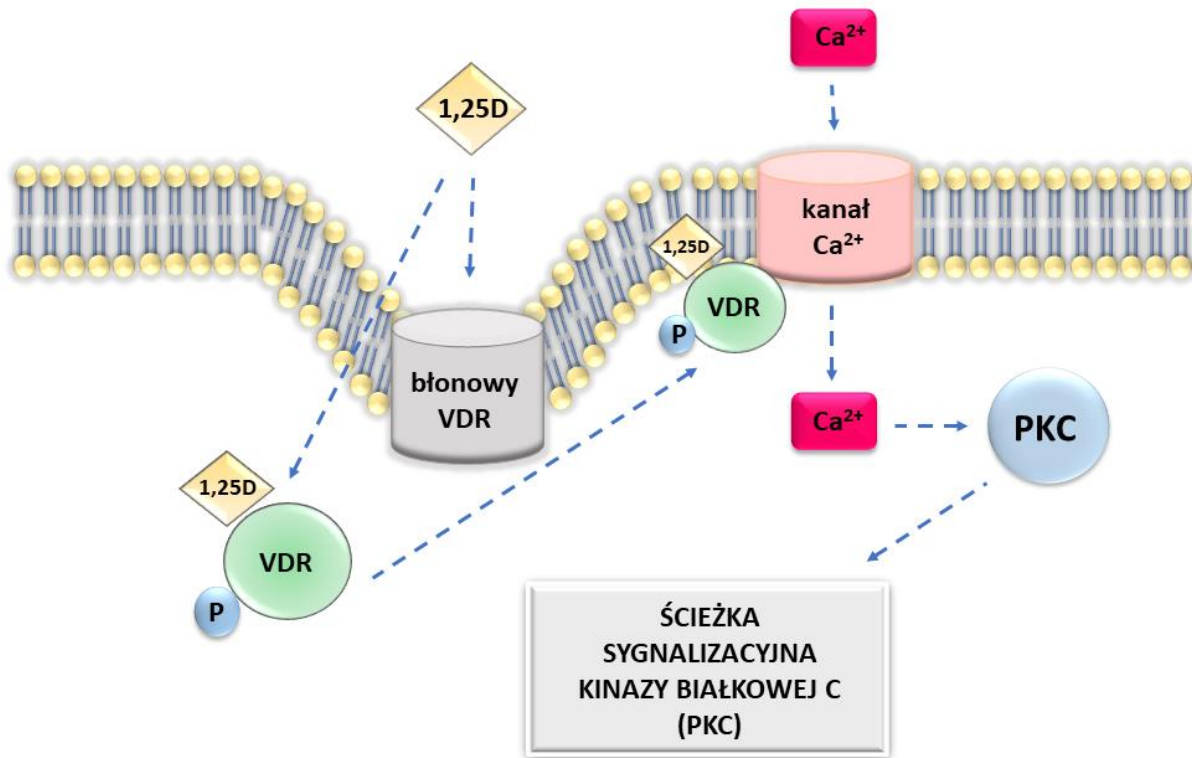
Działanie witaminy D_3 można rozróżnić na genomowe i niegenomowe. Pierwsze z nich wyraża się poprzez regulację transkrypcji docelowych genów wskutek wiązania się kalcytriolu z receptorem witaminy D. VDR przed związaniem liganda jest najczęściej zlokalizowany w cytoplazmie i aby pełnić swoją funkcję musi zostać przetransportowany do jądra komórkowego. Transport ten odbywa się z udziałem kompleksu porów jądrowych (*ang.* nuclear pore complex, NPC) oraz białek transportowych, takich jak importyna α i importyna β . Te ostatnie mają zdolność do łączenia się z importowanym białkiem poprzez sygnał lokalizacji jądrowej (*ang.* nuclear localisation signal, NLS), który znajduje się w jego obrębie. Związanie liganda przez VDR odsłania NLS i aktywuje transport receptora do jądra komórkowego [17]. Ekspresja docelowych genów jest regulowana w sposób zależny od liganda oraz procesu dimeryzacji VDR z RXR. Utworzony kompleks $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR jest czynnikiem przyłączającym się do sekwencji genomowych, tzw. elementów

odpowiedzi na witaminę D (*ang.* Vitamin D Response Elements, VDRE), które najczęściej zlokalizowane są w regionach promotorowych docelowych genów [18]. VDR w postaci monomeru charakteryzuje się niskim powinowactwem do sekwencji regulatorowej VDRE. Zwiększenie powinowactwa do elementów odpowiedzi na witaminę D zachodzi po heterodimeryzacji receptora witaminy D z RXR. Powstały heterodimer wiąże się w określony sposób do VDRE – VDR przyłącza się od jego końca 3’, natomiast RXR od końca 5’ [15]. Przed przyłączeniem liganda heterodimer RXR/VDR jest związany z deacetylazami histonów oraz korepresorami, czego skutkiem jest utrzymanie chromatyny w skondensowanej postaci (Ryc. 4). Po związaniu liganda w postaci kalcytriolu następuje wymiana korepresorów na koaktywatory, które są specyficzne wobec docelowego genu. Koaktywatory charakteryzują się właściwościami acetylotransferazy histonowej. Acetylowanie chromatyny skutkuje zmianą heterochromatyny w euchromatynę, dzięki czemu koaktywator w postaci kompleksu DRIP (*ang.* Vitamin D Receptor Interacting Proteins) może wejść w interakcję z kompleksem preinicjacyjnym i polimerazą RNA II, rozpoczynając proces transkrypcji [18]. Docelowe geny są związane m.in. z metabolizmem wapnia i fosforanów [19], funkcjonowaniem keranocytów [20] i komórek układu odpornościowego [11].



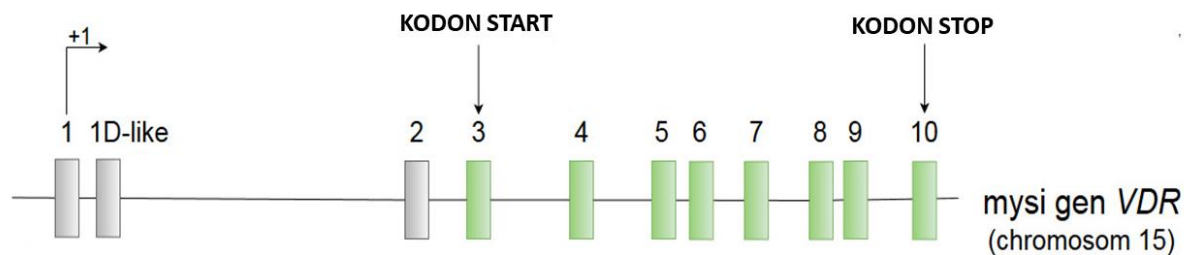
Rycina 4. Działanie genomowe kalcytriolu na transkrypcję docelowych genów. Opracowanie własne na podstawie [21].
Oznaczenia skrótów: RXR – receptor X dla retinoidów, VDR – receptor witaminy D, RNA POL II – polimeraza RNA II.

Działanie niegenomowe (Ryc.5) jest procesem niezależnym od transkrypcji, obejmuje natomiast aktywację cząsteczek sygnałowych takich jak kinazy białkowe. Molekularne cele tych cząsteczek stanowią m.in. czynniki transkrypcyjne, których przykład stanowią SP1 (*ang.* Specificity Protein 1) i SP3 (*ang.* Specificity Protein 3), które wiążą się z sekwencjami VDRE. Inny przykład działania niegenomowego stanowi regulacja wiązania VDR z białkiem STAT 1 (*ang.* Signal Transducer and Activator of Transcription 1), dzięki czemu możliwa jest regulacja ekspresji genów z wykorzystaniem cząsteczek niebędących ligandem VDR, np. IFN- γ lub TNF- α . Jest to ścieżka umożliwiająca regulację odpowiedzi odpornościowej organizmu poprzez mechanizm zwiększający dostępność VDR i $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dla komórek odpornościowych, dzięki czemu możliwa jest regulacja produkcji cytokin oraz interferonów. Działanie niegenomowe witaminy D skutkuje także otwarciem kanałów wapniowych i chlorkowych, a rodzaj aktywowanych cząsteczek sygnałowych jest związany z rodzajem komórki. Niegenomowe działanie witaminy D wyraża się także poprzez aktywację cząsteczek sygnałowych, takich jak kinazy erk1,2, fosfolipaza A2, fosfolipaza C czy kinaza fosfatidyloinozytolu-3 (PI3K). Inny mechanizm stanowi także generowanie wtórnych przekaźników w postaci jonów Ca^{2+} (Ryc.6), cAMP czy 3,4,5-trifosforan fosfatidyloinozytolu, którym towarzyszy aktywacja kinaz białkowych [21]. Od wielu lat prowadzone są badania, które mają na celu ustalenie, jakie receptory odpowiadają za niegenomowe działanie witaminy D. Oprócz jądrowego receptora witaminy D wyróżnia się także ulokowaną przy błonie komórkowej postać receptora VDR. Zidentyfikowano także białko MARRS (*ang.* Membrane-Associated Rapid Response Steroid Binding Protein), które odpowiada za wiązanie kalcytriolu w nabłonku jelita cienkiego i umożliwia jego transport przez błonę komórkową [22].



Rycina 5. Niegenomowe działanie receptora witaminy D. Opracowanie własne na podstawie [21]. Oznaczenia skrótów w powyższym tekście oraz poniżej: 1,25D - $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, PKC – kinaza białkowa C.

Gen *VDR* u myszy zlokalizowany jest na chromosomie 15, a w jego obrębie można wyróżnić 11 eksonów (Ryc.6). Eksony 1a, 1d-like i ekson 2 są niekodujące i znajdują się powyżej miejsca startu translacji. Kodon start zlokalizowany jest w trzecim eksonie, kodon stop w dziesiątym eksonie. Gen *VDR* koduje receptor jądrowy zbudowany z 423 aminokwasów. W eksonie trzecim zakodowana jest informacja o budowie pierwszego palca cynkowego domeny wiążącej DNA, natomiast w eksonie czwartym zakodowany jest drugi palec cynkowy tej domeny. Eksony od piątego do siódmego kodują region D, który oddziela domenę wiążącą DNA od domeny wiążącej ligand. Łącznik D oraz domeny E i F kodowane są przez eksony od siódmego do dziesiątego [23]. Sekwencje *cis*-regulatorowe znajdują się w obrębie eksonu pierwszego. Region promotorowy pozbawiony jest kasety TATA, zawiera natomiast bloki GC i CAAT, które stanowią moduły dla polimerazy RNA II. W obrębie wyspy CpG zlokalizowane są cztery miejsca wiązania dla czynnika transkrypcyjnego Sp1, który bierze udział w regulacji wielu genów istotnych rozwojowo [24].



Rycina 6. Organizacja mysiego genu receptora witaminy D. Opracowanie własne na podstawie [23]. Szare prostokąty symbolizują eksony niekodujące, zielone prostokąty eksony kodujące. Symbolem „+1” oznaczono miejsce startu transkrypcji.

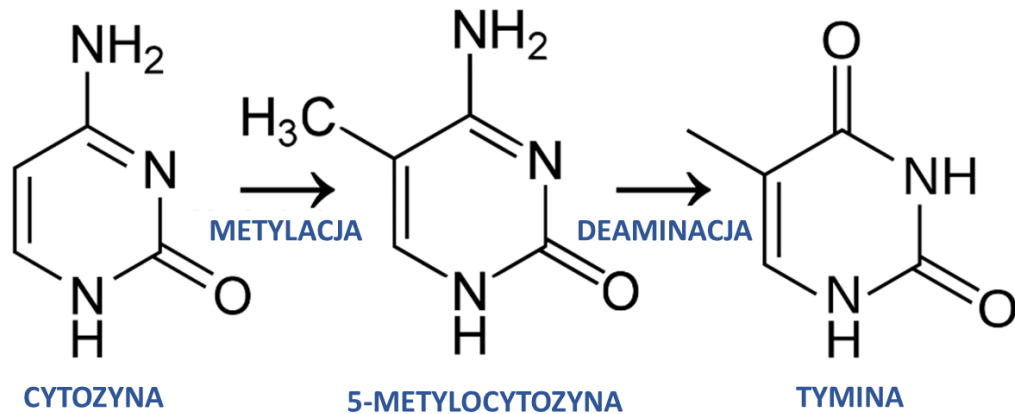
Podobieństwo budowy ludzkiego i mysiego *locus VDR* zaznacza się w obecności ośmiu kodujących eksonów. Różnice dotyczą m.in. umiejscowienia kodonu start, który w ludzkim genie zlokalizowany jest w obrębie drugiego eksonu. Powstałe na matrycy ludzkiego genu *VDR* białko liczy 427 lub 424 aminokwasów, w zależności od tego, czy zostało użyte alternatywne miejsce startu transkrypcji [25]. Obserwuje się także różnice związane są z liczbą sekwencji niekodujących znajdujących się w obrębie końca 5' – w mysim *locus VDR* można wyróżnić trzy niekodujące eksony (ekson 1., 1-d i ekson 2.), natomiast w obrębie ludzkiego *locus VDR* wyróżnia się 7 niekodujących eksonów (eksony 1a-1g). W ludzkim genie *VDR* potwierdzono obecność co najmniej dwóch promotorów [26].

1.3 Regulacja ekspresji genów

Receptor witaminy D działając jako czynnik transkrypcyjny stanowi jeden z elementów regulatorowych procesu ekspresji genów. Zjawisko to jest niezwykle skomplikowane i podlega kontroli na wielu etapach, stanowiąc tym samym jeden z najbardziej precyzyjnie regulowanych procesów biologicznych. Ekspresja genów polega na umożliwieniu odczytania informacji zakodowanej w sekwencji nukleotydowej DNA, co skutkuje powstaniem funkcjonalnej cząsteczki RNA. Ekspresja genów przebiega wieloetapowo, a mechanizmy kontrolne związane są z występowaniem sekwencji regulatorowych, modyfikacjami chromatyny, obecnością białek regulatorowych oraz regulatorowego RNA. Z klinicznego punktu widzenia jest to proces niezwykle istotny, ponieważ jego zaburzenia mogą skutkować rozwojem chorób. W procesach nowotworowych obserwowanych jest wiele zaburzeń ekspresji genów, skutkujących zarówno obniżonym, jak i podwyższonym poziomem ekspresji genów [27].

Pierwszy etap ekspresji genów stanowi transkrypcja, w wyniku której na matrycy cząsteczki DNA zostaje utworzona cząsteczka RNA, a całość katalizowana jest przez enzymy z grupy polimeraz [28]. Proces ten zależy zarówno od przestrzennej struktury chromatyny i oddziaływań białek regulatorowych oraz niekodujących cząsteczek RNA. Na poziomie cząsteczki DNA zakodowane są nie tylko informacje dotyczące budowy danego genu, ale również informacje dotyczące regulacji jego ekspresji. Kwas deoksyrybonukleinowy pełni funkcję nośnika informacji genetycznej, określa w jaki sposób sekwencja nukleotydów tworzących mRNA jest tłumaczona na kolejność aminokwasów tworzących białko. Proces ten jest regulowany przez modyfikacje epigenetyczne, których przykład stanowi metylacja DNA. Metylacja DNA polega na kowalencyjnym wiązaniu grupy metylowej do cytozyny, najczęściej występującej w piątej pozycji (m⁵C). Proces ten, przeprowadzany przez metylotransferazy, często zależy od obecności czynników transkrypcyjnych, np. białek SP (*ang.* Specificity Protein), które rekrutują metylotransferazy do docelowych sekwencji lub uniemożliwiają enzymom interakcję z DNA [29]. Szczególnie istotne znaczenie biologiczne ma metylacja tzw. wysp CpG, w obrębie których stosunkowo często występują dinukleotydy CG. Sekwencje te znajdują się w pobliżu promotorów genów, a metylacja wyspy CpG decyduje o wyciszeniu ekspresji danego genu. Taki rodzaj regulacji jest charakterystyczny dla genów kodujących białka metabolizmu podstawowego lub białka istotne rozwojowo [30]. Z tego powodu metylacja jest ważnym mechanizmem odpowiadającym za prawidłowy proces różnicowania komórek, inaktywację chromosomu czy imprinting rodzicielski. Stanowi także mechanizm umożliwiający wyciszenie transpozonów, które uległy integracji z genomem gospodarza [31]. U *Eukaryota* w wyniku działalności metylotransferazy DNA cytozyna może ulec przekształceniu w 5-metylocytozynę (Ryc.7) - dotyczy to około 10% cytozyn znajdujących się w genomie kręgowców. Metylacji podlegają cytozyny zlokalizowane w obrębie sekwencji 5'-CG-3'. W wyniku tych przekształceń może nastąpić spontaniczna reakcja deaminacji, wskutek której cytozyna przekształca się w tyminę. Nukleotyd ten nie jest skutecznie rozpoznawany przez system naprawy DNA i pozostaje w genomie. Cytozyna, która nie uległa metylacji również może ulec reakcji deaminacji, jednak system naprawy DNA rozpoznaje powstały uracyl i przywraca cytozynę. Wyróżnia się dwa rodzaje metylacji – zachowawczą oraz *de novo*. Pierwsza z nich umożliwia zachowanie wzoru metylacji rodzicielskiej cząsteczki DNA w komórkach potomnych, druga natomiast odpowiada za przyłączanie grup

metylowych w nowych miejscach w genomie. Oba rodzaje metylacji skutkują represją aktywności genów. Hamujący wpływ na ekspresję genów poprzez metylację sąsiadujących z nimi wysp CpG wyjaśniono działalnością białek wiążących metylo-CpG (MeCP, *ang.* methyl-CpG-binding protein), które stanowią element kompleksów deacetylaz histonów. W świetle tych doniesień postuluje się, że metylowane wyspy CpG stanowią miejsce wiązania kompleksu deacetylazy histonów, które modyfikują strukturę chromatyny, prowadząc do wyciszenia ekspresji genów [32].



Rycina 7. Metylacja cytozyny. Opracowanie własne na podstawie. Opis w tekście powyżej. [32].

DNA występuje w jądrze komórkowym w postaci chromatyny, która charakteryzuje się różnym stopniem upakowania. Nukleosom stanowi jednostkę strukturalną chromatyny, w obrębie której fragment DNA jest nawinięty na białka histonowe. Histony stanowią miejsce modyfikacji potranslacyjnych, ulegając modyfikacjom chemicznym takim jak acetylacja, metylacja, fosforylacja lub ubikwitynacja [33]. Struktura przestrzenna chromatyny w istotny sposób wpływa na dostępność cząsteczki DNA dla białek biorących udział w procesie transkrypcji. Chemiczne modyfikacje histonów stanowią tzw. kod histonowy. Odpowiada on za regulację struktury chromatyny, a tym samym decyduje o dostępności regionu genomu, który będzie ulegał ekspresji w określonej jednostce czasowej. Modyfikacje histonów są również skorelowane z procesami naprawczymi oraz koordynacją replikacji genomu z cyklem komórkowym. Chromatyna może przyjmować postać rozluźnioną, dostępną dla białek regulujących proces transkrypcji i nazywana jest wówczas euchromatyną. Charakterystyczne modyfikacje chemiczne dla euchromatyny to wysoki poziom acetylacji histonów oraz niski poziom metylacji DNA. Odmianą strukturę przyjmuje heterochromatyna, która jest silnie skondensowana i niedostępna transkrypcyjnie. Charakteryzuje się niskim poziomem acetylacji histonów

przy jednocześnie wysokim poziomie metylacji DNA. Szczególny znacznik heterochromatyny stanowi metylowana lizyna 9 histonu H3 (H3K9). Istnienie kodu histonowego w znaczący sposób poszerza potencjalną informację niesioną przez materiał genetyczny w postaci DNA. Umożliwia to regulację odczytu sekwencji nukleotydowej – odpowiednie geny mogą być aktywne transkrypcyjnie, a inne wyciszone, co całościowo będzie odpowiadać za aktywację proliferacji lub różnicowania komórek.

Regulacja ekspresji genów na poziomie transkrypcji odbywa się poprzez oddziaływanie czynników działających w układzie *trans* z sekwencjami *cis*-regulatorowymi, znajdującymi się w DNA. Czynniki regulatorowe działające w układzie *trans* to m.in. czynniki transkrypcyjne oraz regulatorowy niekodujący RNA. Sekwencje *cis*-regulatorowe stanowią obszary promotorowe, z promotorami minimalnymi włącznie, w obrębie których zlokalizowane są sekwencje stanowiące miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych. Przykładem sekwencji działającej w układzie *cis* są również sekwencje oddalone od promotora genu, mogące znajdować się w jego bliskiej lub dalekiej odległości, które mają charakter sekwencji wzmacniającej lub wyciszającej transkrypcję (*ang.* enhancer / silencer). Wskutek oddziaływań tych czynników może dojść do wyciszenia lub aktywacji ekspresji genu [34].

W pierwszym etapie transkrypcji, nazywanym inicjacją, istotną rolę pełnią białka wchodzące w skład kompleksu mediatora, polimeraza RNA II oraz czynniki regulatorowe, np. czynniki transkrypcyjne, które tworzą kompleks inicjacji transkrypcji. Kompleks mediatora odpowiada za rekrutację polimerazy RNA II i czynników transkrypcyjnych w odpowiednie miejsce w genomie, co umożliwia ich oddziaływanie z sekwencjami regulatorowymi w obrębie promotora. Dzięki aktywności białek wchodzących w skład kompleksu mediatora możliwe jest utworzenie domen funkcjonalnych poprzez odpowiednie ukształtowanie struktury przestrzennej chromatyny. W efekcie powstają pętle chromatynowe, które umożliwiają oddziaływania dystalnych sekwencji *cis*-regulatorowych z sekwencjami regulatorowymi i składowymi maszynierii transkrypcyjnej [35] [36].

Czynniki transkrypcyjne wiążą się z sekwencjami konsensusowymi, które znajdują się w obszarze promotorowym. Mają one postać krótkich motywów o długości około 10 par zasad [37]. Specyficzne przyłączanie się czynników transkrypcyjnych do sekwencji konsensusowych jest możliwe dzięki funkcjonowaniu tych białek w postaci kompleksów, które oddziałują z sekwencjami regulatorowymi w obrębie skupisk motywów

konsensusowych, rozpoznawanych przez składowe kompleksu [38]. Czynniki transkrypcyjne odpowiadają także za rekrutację białek pomocniczych, np. enzymów modyfikujących histony oraz białek remodelujących chromatynę [39].

W fazie elongacji transkrypcji następuje właściwa synteza RNA, która jest połączona z procesem modyfikacji transkryptu. Na wczesnym etapie elongacji polimeraza RNA II przyłącza się do miejsca startu transkrypcji i syntetyzuje komplementarną do matrycy DNA cząsteczkę RNA. Po przyłączeniu pierwszych kilkudziesięciu nukleotydów następuje pauzowanie, które jest związane z dodaniem czapeczki na końcu 5' powstającego transkryptu, poprzez przyłączenie 7-metyloguanozyny. Na tym etapie dochodzi także do ufosforylowania polimerazy RNA II. Dzięki tym modyfikacjom możliwe jest utworzenie białkowego kompleksu związanego z polimerazą RNA II, co przyczynia się do zwiększenia efektywności procesu elongacji [40]. Właściwa synteza transkryptu jest zależna od oddziaływań polimerazy RNA II z chromatyną oraz czynnikami regulatorowymi, a oddziaływania te są zależne od wielkości i ilości eksonów oraz intronów. Proces składania transkryptu jest związany z wycinaniem intronów, a terminacja transkrypcji jest związana z ukończeniem syntetyzowania fragmentu poli-A na końcu 3' powstającego transkryptu. Na tym etapie następuje oddysocjowanie polimerazy RNA II [41], a do powstałego fragmentu poli-A przyłącza się białko PABP, które jest odpowiedzialne za transport dojrzałego mRNA do cytoplazmy i wspomaga proces inicjacji translacji [42].

1.4 Regulacja ekspresji genów a nowotwory wywodzące się z komórek krwi

Proces regulacji ekspresji genów jest niezwykle istotny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. W wyniku zaburzeń ekspresji poszczególnych genów może dojść do niekontrolowanego podziału komórek, wskutek czego powstają komórki nowotworowe, które utraciły zdolność do różnicowania się w typowe dla danej tkanki komórki. Z punktu aktywności transkrypcyjnej VDR istotne są nowotwory wywodzące się z komórek krwi, ponieważ VDR, działając jako czynnik transkrypcyjny, reguluje ekspresję wielu docelowych genów, a wśród nich znajdują się geny odpowiedzialne za inicjację procesu różnicowania komórek krwi oraz za prawidłowe funkcjonowanie tych komórek.

Najczęściej spotykane nowotwory hematologiczne przyjmują postać ostrej białaczki limfoblastycznej, ostrej białaczki szpikowej, zespołów mielodysplastycznych, chłoniaków nieziarnicznych i chłoniaków Hodgkina. Analiza genomu umożliwia poznanie molekularnego podłoża tych jednostek chorobowych, co przekłada się na zwiększone możliwości diagnostyczne i właściwe postępowanie kliniczne [43]. Przyczyną powstania nowotworów wywodzących się z komórek krwi często są zmiany związane z nieprawidłowym kariotypem, genotypem oraz zmienioną ekspresją genów. Wśród obserwowanych zmian identyfikuje się zmiany związane z liczbą lub strukturą chromosomów, translokacje, delecje i insercje, a także zaburzenia w profilu epigenetycznym. Szczególne znaczenie mają mutacje, które skutkują zaburzeniem ścieżek sygnałowych związanych z procesami proliferacji i różnicowania komórek krwi, czyli mutacje zaburzające aktywność protoonkogenów oraz mutacje genów supresorowych [44] [45] [46].

Ostra białaczka szpikowa (*ang.* AML, Acute Myeloid Leukemia) to najczęściej występująca białaczka u osób dorosłych, która powstaje wskutek akumulacji słabo zróżnicowanych komórek szpikowych. Najczęściej zjawisko to ma miejsce w szpiku kostnym i prowadzi do jego niewydolności, a w przypadku braku leczenia - do śmierci pacjenta. W toku choroby obserwowane jest zajęcie krwi obwodowej przez niezróżnicowane komórki szpikowe, a w przypadku pacjentów z dużą liczbą blastów mogą wystąpić nacieki do innych narządów, np. mózgu lub płuc [47]. Ostra białaczka szpikowa jest chorobą wysoce niejednorodną, a na podstawie profilu cytogenetycznego poszczególne przypadki można podzielić na korzystne, pośrednie i niekorzystne grupy ryzyka, co wiąże się ze zróżnicowanym rokowaniem w poszczególnych kategoriach. Często spotykane mutacje dotyczą genów *FLT3-ITD*, *NMP1* i *CEBPa*, a ich identyfikacja umożliwia prognozowanie rozwoju choroby i wskazanie skutecznego postępowania klinicznego [48]. Patogeneza AML obejmuje nieprawidłową proliferację oraz nieprawidłowe różnicowanie populacji szpikowych komórek macierzystych, a w toku powstałych mutacji obserwuje się także obecność białek chimerycznych, które odpowiadają za zmianę prawidłowego dojrzewania komórek mieloidalnych [49]. Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych umożliwiły opracowanie modelu leukemogenezy na podstawie którego dokonuje się klasyfikacji mutacji związanych z AML [50]. Mutacje klasy I są związane z aktywacją szlaków proliferacyjnych, a mutacje klasy II upośledzają prawidłowe różnicowanie

komórek krwiotwórczych. Jednoczesne wystąpienie obu rodzajów mutacji skutkuje rozwojem białaczki [51] [52]. Mutacje klasy I często dotyczą genów *FLT3*, *K/NRAS*, *TP53* oraz *c-KIT*, natomiast istotne klinicznie mutacje klasy II dotyczą genów *NPM1* i *CEBP α* [48]. Istnieją również mutacje klasy III, które dotyczą genów związanych z regulacją epigenetyczną, co również ma wpływ na proliferację i różnicowanie komórek. Mutacje w genach związanych z metylacją DNA, tj. *DNMT3A*, *TET2* czy *IDH-1* występują u około 40% pacjentów z AML [49]. Zgodnie z francusko-amerykańsko-brytyjskim system klasyfikacji definiuje się 8 podtypów AML (od M0 do M7), a podstawę rozróżnienia poszczególnych podtypów stanowią cechy morfologiczne i cytochemiczne komórek białaczkowych. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wprowadziła ulepszony system klasyfikacji, który uwzględnia zarówno dane genetyczne, jak i immunofenotyp, morfologię komórek białaczkowych oraz obraz kliniczny. Na tej podstawie wyróżnia się 6 głównych jednostek chorobowych, m.in. AML z nawracającymi nieprawidłowościami genetycznymi, w obrębie których można wyróżnić wiele podtypów, AML związana z mielodysplazją, mięsak szpikowy czy proliferacje szpiku związane z zespołem Downa [48].

Podstawę terapii AML stanowi połączenie schematów opartych na działaniu leków cytostatycznych połączonych z allogenicznym przeszczepem komórek macierzystych. Taki schemat leczenia jest źle tolerowany przez starszych pacjentów, dlatego ich rokowania są dużo gorsze niż u pacjentów w młodszym wieku [48].

1.5 Rola metabolitów witaminy D w procesie nowotworzenia

1,25-dihydroksywitamina D₃ wykazuje działanie przeciwnowotworowe, pełniąc m.in. rolę czynnika regulującego szlaki sygnałowe związane z rozwojem nowotworów [53]. Związek ten wykazuje działanie o charakterze antyproliferacyjnym i różnicującym, wskutek czego blasty nowotworowe przyjmują dojrzały fenotyp. Kalcytriol odpowiada za indukcję apoptozy oraz hamowanie procesów przerzutowania i angiogenezy [54] [55]. Obserwowane jest także jego działanie przeciwzapalne, wyrażające się poprzez hamowanie produkcji prostaglandyn i interleukiny-8 [53]. Wykazano, że podwyższone stężenie 25-hydroksywitaminy D we krwi jest związane ze znacznie niższą zapadalnością na raka okrężnicy, piersi, jajników, nerek, trzustki czy prostaty, jakkolwiek nie jest jasne czy jest związek przyczynowy między jednym a drugim [56]. Kalcytriol reguluje szlaki sygnałowe

w tych komórkach, dzięki czemu może regulować działanie kluczowych czynników odpowiedzialnych za powstanie komórek nowotworowych [53].

Kalcytriol hamuje także wzrost komórek czerniaka złośliwego [57] oraz odpowiada za różnicowanie komórek białaczkowych linii HL60 w kierunku makrofagów [58]. W komórkach raka okrężnicy kalcytriol hamuje aktywność transkrypcyjną β -kateniny, dzięki czemu zapobiega nieprawidłowej aktywacji sygnalizacji WNT- β -katenina, która stanowi najczęstszą zmianę na podłożu molekularnym w sporadycznym raku jelita grubego [59]. Kalcytriol odpowiada również za hamowanie syntezy estrogenu w tkance tłuszczowej piersi oraz reguluje sygnalizację związaną z receptorem estrogenowym. Jego zastosowanie przyczynia się do skuteczności terapii skierowanej przeciw nowotworowi piersi, który rozwinął się u pacjentek będących po menopauzie [60].

Zaobserwowano jednak, że czynnik transkrypcyjny SNAIL obniża poziom ekspresji genu *VDR*, a podwyższona ekspresja tego czynnika odpowiada za utratę wrażliwości komórek na działanie kalcytriolu. Zmniejsza to przeciwnowotworowe działanie kalcytriolu, w związku z czym u pacjentów z podwyższoną ekspresją SNAIL istnieje małe prawdopodobieństwo odpowiedzi na terapię z zastosowaniem tego związku [61].

Mechanizm przeciwnowotworowej aktywności VDR jest związany z utworzeniem aktywnego transkrypcyjnie kompleksu. VDR połączony ze swoim ligandem w postaci hormonalnie aktywnej formy witaminy D tworzy kompleks wraz z receptorem X dla retinoidów i w takiej formie działa jako czynnik transkrypcyjny, wiążąc się z regionami regulatorowymi docelowych genów. Przeciwnowotworową aktywność utworzonego kompleksu obserwuje się m.in. w linii komórkowej HL60, gdzie następuje regulacja ekspresji genów związanych z różnicowaniem blastów białaczkowych w komórki o fenotypie charakterystycznym dla makrofagów. Komórki ostrej białaczki szpikowej reagują na stymulację $1\alpha,25$ -dihydroksywitaminą D_3 poprzez zwiększenie ilości receptora CD14 oraz integryn CD11b i CD11c. W nietraktowanych kalcytriolem komórkach białaczkowych białko VDR jest obecne w cytoplazmie w niewielkiej ilości, przy czym obserwowana jest ciągła ekspresja jego mRNA. Związanie VDR z ligandem skutkuje stabilizacją białka, po czym następuje jego translokacja do jądra komórkowego, dzięki czemu VDR może pełnić funkcję regulatora transkrypcji dla swoich docelowych genów [17].

1.6 Rola witaminy A i jej pochodnych w procesie nowotworzenia

Pochodna witaminy D nie jest jedynym związkiem organicznym wykazującym zdolność do zahamowywania procesów nowotworowych. Drugim z nich jest kwas całkowicie trans-retinowy (*ang.* ATRA, All-Trans Retinoic Acid) stanowiący najbardziej aktywny metabolit witaminy A, uczestniczący w regulacji procesów takich jak różnicowanie oraz apoptoza komórek. Jego działanie jest związane z aktywacją określonych szlaków genomowych i regulacją aktywności białek sygnałowych. Związek ten wykazuje właściwości przeciwnowotworowe i jest stosowany jako lek pierwszego wyboru w terapii różnicującej ostrej białaczki promielocytowej (*ang.* APL, Acute Promyelocytic Leukemia) u dorosłych oraz w leczeniu nerwiaka zarodkowego u dzieci. Nie udało się przenieść tej metody leczenia na guzy lite, co jest związane z problemem z dostarczeniem leku w odpowiednie miejsce w organizmie, a także z powodu oporności komórek nowotworowych tworzących guzy [62].

W obrębie receptorów retinoidów wyróżnia się dwie rodziny - receptory kwasu retinowego (*ang.* Retinoic Acid Receptor, RAR) oraz receptory retinoidowe X (RXRs – retinoic X receptors). Ligandy dla pierwszego rodzaju receptorów stanowią kwas całkowicie trans-retinowy, kwas 9-cis retinowy oraz kwas 13-cis retinowy, natomiast dla receptorów RXR ligand stanowi wyłącznie kwas 9-cis-retinowy. Receptory retinoidowe ulegają dimeryzacji po związaniu liganda i w takiej postaci pełnią rolę czynników transkrypcyjnych. Receptory RAR ulegają heterodimeryzacji, łącząc się z receptorem RXR, natomiast receptor RXR tworzy homodimery lub heterodimery w połączeniu z receptorami RAR, receptorem witaminy D lub receptorami hormonów tarczycy. Receptory retinoidów w postaci dimerycznej znajdują się w jądrze komórkowym, gdzie zarówno w postaci związanej z ligandem, jak i bez tego wiązania mogą przyłączać się do sekwencji regulatorowych. Miejsce wiązania stanowią tzw. elementy odpowiedzi na retinoidy (*ang.* Retinoic Acid Response Elements, RARE), które znajdują się w obrębie promotorów docelowych genów. Formy heterodimeryczne umożliwiają oddziaływanie krzyżowe pomiędzy różnymi ścieżkami sygnalizacyjnymi związanymi z aktywnością hormonów [63]. Przyłączenie heterodimerów pozbawionych liganda do sekwencji regulatorowych skutkuje wyciszeniem ekspresji genów poprzez kondensację chromatyny w wyniku aktywacji deacetylazy histonowej. Związanie liganda w postaci ATRA skutkuje aktywacją acetylotransferazy histonowej oraz koaktywatorów, przy jednoczesnym uwolnieniu korepresorów, wskutek

czego następuje acetylacja histonów, dekondensacja chromatyny i aktywacja transkrypcji [64].

Komórki nowotworowe charakteryzują się niekontrolowanymi podziałami, których nie można zatrzymać poprzez skierowanie na ścieżkę apoptozy. Wykazano, że fuzja genu *RARα* z genem *PML*, która następuje wskutek translokacji t (15;17) jest czynnikiem inicjującym ostrą białaczkę promielocytową [65]. W wyniku tej translokacji powstaje białko fuzyjne PML/RAR α , stanowiące nieprawidłową wersję RAR. Kwas całkowicie trans-retinowy wiążąc się z białkiem PML/RAR α umożliwia uruchomienie ścieżki związanej z różnicowaniem komórek nowotworowych, które zyskując dojrzały fenotyp mogą zostać skierowane na drogę programowej śmierci komórki [66]. Skuteczność antynowotworowego działania ATRA wykazano nie tylko w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej, ale także czerniaka, nowotworów piersi, płuc, prostaty czy nowotworów narządów przewodu pokarmowego. Działanie ATRA skutkujące zahamowaniem wzrostu nowotworów często wiąże się z zatrzymaniem komórek w fazie G1, poprzez obniżenie tempa syntezy DNA i wydłużenie czasu potrzebnego do podwojenia liczby komórek [67]. Analiza linii komórkowych wykazała różnice w poziomie ekspresji receptorów retinoidów między komórkami prawidłowymi a nowotworowymi. Udowodniono, że w przypadku nowotworów piersi komórki charakteryzują się obniżoną ekspresją RAR β [68].

Kompleks powstały z połączenia retinoidu z jego receptorem może wykazywać antagonistyczne działanie wobec różnych czynników transkrypcyjnych, rywalizując z nimi o koaktywatory, wskutek czego ogranicza ekspresję genów związanych z proliferacją [67].

1.7 Współdziałanie receptora witaminy D z receptorem witaminy A

Kwas całkowicie trans-retinowy oraz 1,25-dihydroksywitamina D₃ to niezwykle aktywne biologicznie związki, które są zaangażowane w regulację wielu procesów wewnątrzkomórkowych. ATRA odpowiada za różnicowanie blastów białaczkowych w kierunku linii granulocytarnej, natomiast kalcytriol różnicuje blasty w komórki wykazujące cechy podobne do monocytów [69]. Zastosowanie obu terapeutyków jednocześnie może wykazywać synergistyczny efekt na proces różnicowania komórek nowotworowych [70], jednak efekty takiej terapii nie zawsze są możliwe do przewidzenia. Jest to zależne od regulacji, której podlega gen receptora witaminy D wskutek obecności

ATRA. Wykazano, że w różnych liniach komórkowych w odpowiedzi na zastosowanie ATRA może następować regulacja ekspresji genu *VDR* zarówno w górę, jak i w dół. W białaczkowych liniach komórkowych charakteryzujących się niskim poziomem ekspresji genu *VDR* zastosowanie ATRA skutkuje zwiększeniem poziomu ekspresji *VDR*. Przykład stanowi linia komórkowa KG1, w której $RAR\alpha$ pozbawiony liganda działa jako represor transkrypcyjny, wyciszając ekspresję genu *VDR*. Odmienny przykład stanowi linia komórkowa HL60, która charakteryzuje się wysokim poziomem ekspresji genu *VDR*, a zastosowanie ATRA skutkuje obniżeniem ekspresji genu *VDR*. Komórki linii HL60 charakteryzują się niskim poziomem $RAR\alpha$, natomiast wykazują wysoki poziom ekspresji białka *VDR*. Aktywowany ligandem $RAR\alpha$ powoduje obniżenie ekspresji genu *VDR* w tym modelu białaczki [71].

Klasyczna sekwencja RARE nie występuje w obrębie *locus VDR*, co utrudnia zrozumienie mechanizmu regulacji ekspresji genu *VDR* przez retinoidy. Lokalizacja elementów odpowiedzi na retinoidy może być zmienna i różnorodna - sekwencje regulatorowe zlokalizowane są nie tylko w bliskim sąsiedztwie promotora, lecz także w obrębie intronów oraz regionów odległych od miejsca startu transkrypcji. Istnieją doniesienia o zróżnicowanej budowie sekwencji RARE, co również może skutkować utrudnioną identyfikacją tych elementów [72]. Jednoczesne stosowanie 1,25D i ATRA przynosi korzystne efekty terapeutyczne i może stać się jedną z metod leczenia nowotworów krwi, lecz efekt ich współdziałania jest zależny od rodzaju komórek, dlatego należy rozpatrzyć również wpływ synergistycznego działania tych terapeutyków na komórki prawidłowe [65].

1.8 Hematopoeza – opis i znaczenie procesu

W świetle doniesień klinicznych stanowiących o zasadności stosowania pochodnych witaminy D i A w leczeniu nowotworów krwi można wyciągnąć wniosek, że zarówno kalcytriol, jak i ATRA pełnią funkcję regulacyjną, związaną z różnicowaniem blastów białaczkowych. Czy związki te mają także wpływ na procesy związane z powstawaniem i rozwojem prawidłowych komórek krwi?

Hematopoeza to proces, w trakcie którego tkanka krwiotwórcza wytwarza wszystkie składniki morfotyczne krwi – erytrocyty, leukocyty i trombocyty. W okresie życia

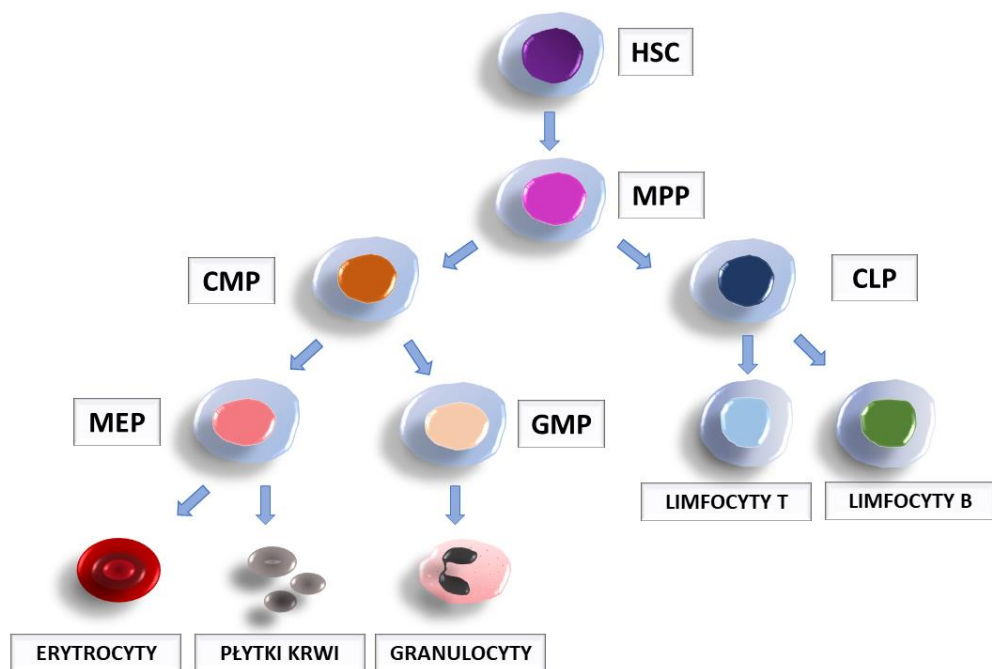
plodowego miejsce produkcji krwi stanowi wątroba, w wieku dziecięcym funkcję tę przejmuje szpik czerwony, znajdujący się wówczas we wszystkich kościach. U dorosłych rolę tkanki krwiotwórczej przejmuje szpik kostny, znajdujący się m.in. w jamach szpikowych kości biodrowych, mostku, żeber i kręgow. Wyróżnia się dwa rodzaje szpiku: czerwony, stanowiący właściwą tkankę krwiotwórczą, oraz żółty w postaci tkanki tłuszczowej wypełniającej znaczną część jamy szpikowej. Krew obwodowa, znajdująca się w naczyniach krwionośnych i sercu definiowana jest jako zawiesina krwinek czerwonych, białych i trombocytów w osoczu. W przypadku zwiększonego zapotrzebowania na krwinki, szpik żółty może ulec transformacji do szpiku czerwonego, a funkcje krwiotworzenia mogą zostać przejęte przez takie narządy jak śledziona i wątroba [73].

Proces hematopoezy – powstawanie i dojrzewanie elementów morfotycznych krwi – wyróżnia się spośród innych procesów rozwoju osobniczego, gdyż obserwujemy przemieszczanie się komórek wytwarzanych przez szpik kostny do innych narządów, w których ostatecznie uzyskują dojrzałość. Przykład stanowi wędrówka komórek wytwarzanych w szpiku kostnym lub grasicy do narządów limfopoetycznych, takich jak śledziona lub węzły chłonne, w których dochodzi do różnicowania i specjalizacji komórek.

Podczas rozwoju kręgowców można zaobserwować dwie fale rozwojowe hematopoezy – falę pierwotną i ostateczną. Pierwotna fala jest przejściowa i ma miejsce podczas wczesnego rozwoju zarodkowego, a powstające progenitory erytrocytów i makrofagów nie posiadają właściwości samoodnowienia. Głównym celem fali pierwotnej jest wytworzenie czerwonych krwinek, które odpowiadają za transport tlenu do tkanek rozwijającego się zarodka. Ostateczna fala hematopoezy występuje na późniejszych etapach rozwoju, w różnym czasie u różnych gatunków. U ludzi hematopoeza rozpoczyna się w woreczku żółtkowym, po czym przechodzi do wątroby, by ostatecznie zlokalizować się w szpiku kostnym [74].

Wszystkie komórki krwi powstają z hematopoetycznych komórek macierzystych, które w wyniku asymetrycznych podziałów odnawiają się oraz dają początek hematopoetycznym komórkom progenitorowym, z których powstają poszczególne linie rozwojowe komórek krwi [75]. Zgodnie z klasycznym modelem hematopoezy (Ryc.8), w wyniku proliferacji i różnicowania hematopoetycznych komórek macierzystych (*ang.* HSC – Hematopoietic Stem Cells) dochodzi do wczesnego rozdziału na linię mieloidalną i limfoidalną [76]. Dominujący model hematopoezy przedstawiany jest

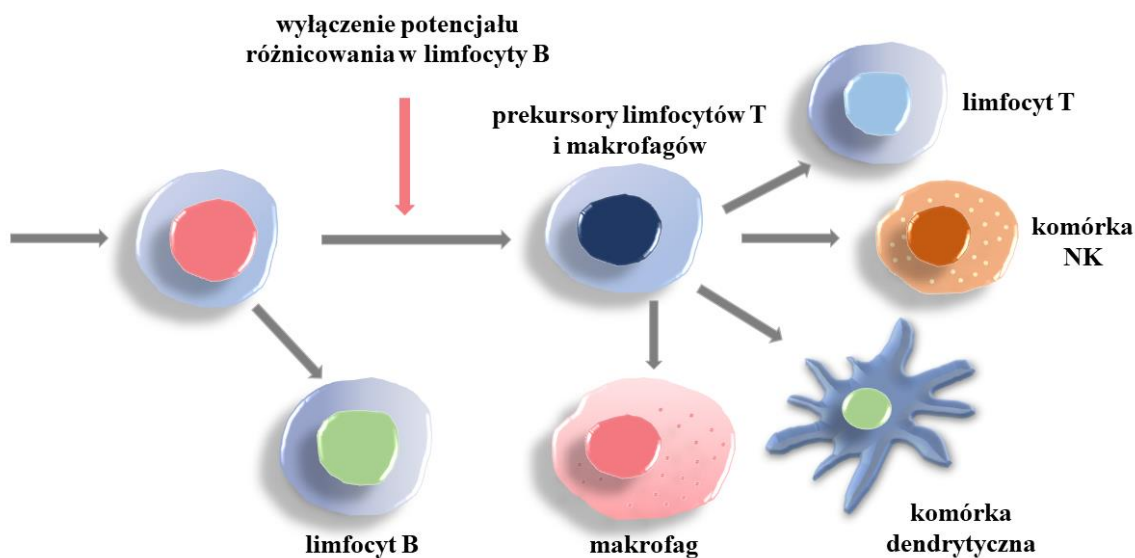
w formie rozgałęziającego się drzewa (Ryc. 8), w którym hematopoetyczne komórki macierzyste dają początek multipotencjalnym komórkom progenitorowym (*ang.* MPP - Multipotent Progenitor Cells), które z kolei zapoczątkowują powstanie komórek progenitorowych wspólnych dla linii limfoidalnej (*ang.* CLP - Common Lymphoid Progenitor) oraz komórek progenitorowych wspólnych dla linii mieloidalnej (*ang.* CMP - Common Myeloid Progenitor). Ostatnia z wymienionych linii rozwojowych komórek krwi w wyniku podziałów tworzy progenitory granulocytów i makrofagów (*ang.* GMP - Granulocyte-Macrophage Progenitor) oraz progenitory megakariocytów i erytrocytów (*ang.* MEP - Megakaryocyte-Erythroid Progenitor).



Rycina 8. Hematopoeza. Opracowanie własne na podstawie [76]. Opis w tekście powyżej.

Nowe badania pokazują, że relacje pomiędzy limfocytami T i monocyty są nieco bliższe, a wyniki eksperymentów wskazują, że tymocyty mogą zachować potencjał do różnicowania się w monocyty. [77]. Uważa się również, że jest wiele dróg różnicowania się komórek, co najlepiej reprezentowane jest na przykładzie komórek dendrytycznych [78]. Zaktualizowany model opisuje hematopoezę (Ryc. 9) jako proces, w którym możliwości różnicowania są nadal dostępne w kolejnych etapach rozwoju komórek krwi, podczas gdy inne z tych możliwości zostają utracone podczas rozwoju komórki w procesie hematopoezy. Badania przeprowadzone na mysich zarodkach wskazują alternatywny model hematopoezy, który zakłada, że potencjał mieloidalny komórek zostaje zachowany nawet w tych liniach

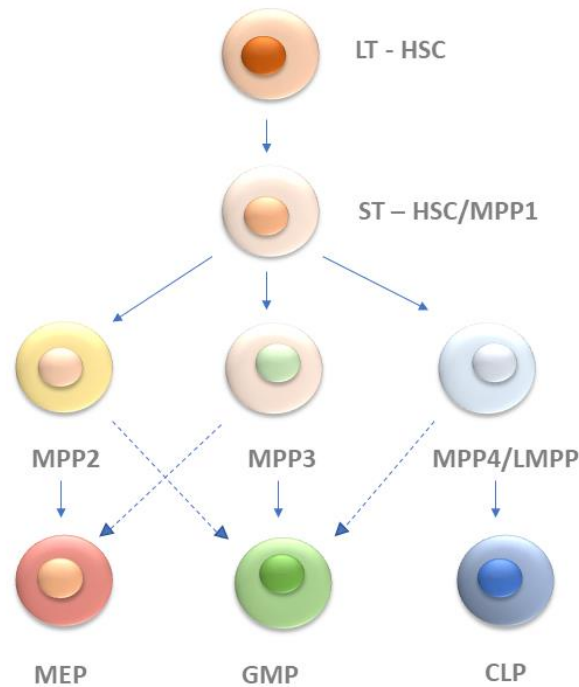
rozwojowych, które różnicują się w kierunku limfocytów T i B. Zakłada się istnienie modelu hematopoezy opartego na szpiku kostnym, w którym wyróżnia się dwie główne linie komórek progenitorowych: mielo-erytroidalnych oraz mielo-limfoidalnych. Uzyskane wyniki wskazują na istnienie w grasicy dorosłych osobników komórek prekursorowych, które utraciły możliwość różnicowania w limfocyty B, lecz posiadają potencjał przekształcania się w makrofagi, limfocyty T, komórki NK i komórki dendrytyczne. Ponadto wykazano, że znajdujące się w grasicy wczesne komórki prekursorowe dla limfocytów T mają zdolność do różnicowania się w makrofagi. Takie odkrycia zaprzeczają klasycznemu modelowi hematopoezy, w którym limfocyty T wywodzą się z linii progenitorów wspólnych dla linii limfoidalnej [79].



Rycina 9. Alternatywny model hematopoezy. Opracowanie własne na podstawie [79]. Wczesne prekursorsy limfocytów T, występujące w dorosłej grasicy, które utraciły potencjał różnicowania w limfocyty B, nadal zachowują znaczną zdolność do różnicowania w makrofagi.

Podczas rozwoju zarodkowego wszystkich ssaków pierwsze miejsce hematopoezy stanowi woreczek żółtkowy. W przypadku myszy rozpoczęcie tego procesu obserwuje się już około siódmego dnia embriogenezy, procesy krwiotwórcze ulokowane są wówczas w mezodermie woreczka żółtkowego. Tworzące się komórki hematopoetyczne tworzą tzw. wyspy, aż do momentu gdy zostaną uformowane naczynia woreczka żółtkowego. Woreczek żółtkowy jest miejscem pierwotnej erytropoezy, a wytwarzane w wyspach krwi woreczka żółtkowego pierwotne komórki erytroidalne zawierają białka hemoglobiny

różniące się od późnych białek płodowych i dorosłych występujących w linii erytroidalnej. Białka te charakteryzują się wyższym powinowactwem do tlenu niż globiny dorosłe. Przemieszczające się do krążenia pierwotne komórki erytroidalne początkowo mają postać jądrzastą, później tracą tę cechę. W woreczku żółtkowym mają początek także pierwotne płytki krwi i makrofagi oraz komórki o potencjale erytromieloidalnym określane jako progenitory erytroidowo-szpikowe (*ang.* Erythroid–Myeloid Progenitors, EMP). Hematopoetyczne komórki macierzyste, które wykazują długotrwałą zdolność do samoodnowy, pojawiają się w podczas embriogenezy w wielu lokalizacjach, m.in. okolicach tętnic żółtkowych i pępowinowych, okolicy przyaortalnej czy woreczku żółtkowym. Około 10-tego dnia embriogenezy komórki krwiotwórcze zasiedlają zawiązki wątroby płodu, rozpoczynając pierwszą falę hematopoezy [80]. Odkrycie HSC jest związane z badaniami przeprowadzonymi na myszach, w których wykazano, że szpik kostny zawiera komórki, które są w stanie odtworzyć u napromieniowanych myszy populacje komórek o potencjale mielo-erytroidalnym w śledzionie. Szczegółowa analiza komórek krwiotwórczych u myszy wykazała, że istnieje populacja komórek o właściwościach multipotencjalnych i samoodnawialnych, które nie wyrażają markerów poszczególnych linii krwiotwórczych, określana jako linia ujemna (Lin-). Linia ta charakteryzuje natomiast się ekspresją takich markerów jak Sca1 i CD117 (c-kit) i określa się ją jako Lin-Sca1+CD117+ (LSK). W jej obrębie można wyróżnić subpopulacje, które charakteryzują się długotrwałą (*ang.* long-term, LT) lub krótkotrwałą (*ang.* short-term, ST) zdolnością do samoodnawiania. W momencie gdy mysie HSC rozpoczynają wyrażać cząsteczkę CD34 przekształcają się z populacji LT-HSC do ST-HSC. Identyfikacji kolejnych subpopulacji hematopoetycznych komórek progenitorowych dokonuje się na podstawie zestawu poszczególnych markerów, a na ich podstawie można wyróżnić multipotencjalne progenitory (MPP) (Ryc.10), w których część posiada pełne spektrum samoodnawiania (ST-HSC/MPP1) lub ograniczone, zaangażowane w poszczególne linie rozwojowe (MPP2 do MPP4). Granice fenotypowe pomiędzy poszczególnymi populacjami nie są ścisłe i można je określić jako kontynuację stanów progenitorowych. Odpowiednie subpopulacje multipotencjalnych progenitorowych – MPP2, MPP3, MPP4 – różnicują się, dając początek kolejnym populacjom komórek progenitorowych - w MEP, GMP oraz CLP [81].



Rycina 10. Mysia hematopoeza. Opracowanie własne na podstawie [81]. Opis w tekście powyżej.

1.9 Regulacja procesu hematopoezy

Ostateczny los komórek podczas procesu hematopoezy jest regulowany przez czasoprzestrzenne fluktuacje stężenia czynników transkrypcyjnych. Czynniki te współpracują lub konkurują w kierowaniu ekspresją docelowego genu [82]. Niektóre czynniki transkrypcyjne pełnią istotną rolę podczas procesu różnicowania [83], czego przykład stanowi czynnik FOG-1, który jest niezbędny dla prawidłowego przebiegu erytropoezy i megakariopoezy [84]. Inne czynniki mogą mieć nakładające się funkcje i wzajemnie się zastępować, np. niektóre czynniki transkrypcyjne z rodziny C/EBP. Podczas mysiej hematopoezy czynnik C/EBP β może zrekompensować utratę czynnika C/EBP α i tym samym umożliwić różnicowanie granulocytów [85].

Pierwotna fala hematopoezy jest w dużej mierze regulowana przez dwa czynniki transkrypcyjne – Gata1 oraz Pu.1, które wykazują względem siebie hamujące działanie. Gata1 odpowiada za regulację rozwoju erytrocytów, a o jego istotności świadczy fakt, że u myszy z delecją *Gata1* $-/-$ zarodki umierają podczas ciąży, ponieważ nie dochodzi do różnicowania proerytoblastów do erytrocytów. Poza aktywowaniem genów specyficznych dla erytrocytów, Gata1 hamuje rozwój linii mieloidalnej. Eksperymenty

przeprowadzone u danio pręgowanego, u którego usunięto gen *Gata1*, wykazały zmianę szlaku rozwojowego komórek krwi w kierunku linii mieloidalnej i wzrost ekspresji genów specyficznych dla tej linii, tj. *pu.1*, *mpo* i *lcp1* [74]. Podobne eksperymenty wykazały, że Pu.1 jest głównym regulatorem linii mieloidalnej, obejmującej makrofagi i granulocyty. U danio pręgowanego z nokautem genu *Pu.1* dochodzi do wzrostu ekspresji genu *Gata1*, a następnie genu *hbae1*, co świadczy o zmianie ścieżki rozwojowej w kierunku erytrocytów [86].

W regulacji ostatecznej fali hematopoezy kluczową rolę odgrywa czynnik transkrypcyjny Runx1. Myszy pozbawione genu *Runx1* tracą komórki linii mieloidalnej oraz limfoidalnej i wykazują zmniejszoną ekspresję genu *Cmyb*, należącego do rodziny proto-onkogenów [87]. Myszy z nokautem genów z rodziny *Myb* wykazywały silną anemię z powodu upośledzenia erytropoezy w wątrobie płodowej [88].

Czynniki ważne dla hematopoetycznych komórek macierzystych związane z ich zdolnością do samoodnowienia to przede wszystkim cząsteczki z rodziny Wnt oraz ścieżka sygnalizacyjna Notch [74]. Sygnały Wnt są krytyczne dla prawidłowego przebiegu embriogenezy, istnieją jednak sprzeczne doniesienia dotyczące istotności cząsteczek Wnt dla funkcji HSC. Wynika to najprawdopodobniej z faktu, iż poziom ekspresji omawianych cząsteczek jest zmienny w różnych warunkach eksperymentalnych [89] [90]. Aktywacja ścieżki Notch odpowiada za ekspansję i zdolność do samoodnawiania się przez HSC [91]. Po ekspozycji na ligandy Notch ludzkie komórki HSC mogą 100-krotnie powiększyć swoją bezwzględną liczbę, szybko wzrasta też liczba komórek mieloidalnych [92].

Istnieją czynniki transkrypcyjne, które są szczególnie istotne dla rozwoju poszczególnych linii rozwojowych komórek krwi, nazywane nadrzędnymi regulatorami. Przykład stanowi omawiany wcześniej czynnik GATA-1 regulujący ekspresję genów odpowiedzialnych za kontrolę procesu dojrzewania erytroblastów i megakariocytów, różnicujących się odpowiednio w erytrocyty i płytki krwi. Ponadto czynnik ten odpowiada za kontrolę procesu syntezy hemoglobiny [93] [94]. Funkcję nadrzędnego regulatora linii limfoidalnej pełnią dwa czynniki. Pierwszy z nich, czynnik transkrypcyjny GATA3, jest odpowiedzialny za różnicowanie limfocytów T i ulega także ekspresji w komórkach NK [95]. Drugi z regulatorów, czynnik transkrypcyjny Pax5, jest niezbędny do przekształcenia progenitorów limfoidalnych w limfocyty B [96]. Czynnik PU.1 określa się jako kluczowy regulator komunikacji komórkowej w układzie odpornościowym, ponieważ działa

jednocześnie na wczesnych i późnych etapach różnicowania, zarówno w linii mieloidalnej, jak i limfoidalnej [97]. Proces dojrzewania komórek linii mieloidalnej jest złożony, a istotne znaczenie w procesie jego regulacji mają czynniki z rodziny C/EBP. Podczas hematopoezy czynniki C/EBP α , C/EBP β , C/EBP ϵ oraz C/EBP δ wyrażane są głównie w granulocytach, monocytach i eozynofilach. Ekspresja C/EBP α dominuje w niedojrzałych komórkach wczesnych etapów hematopoezy tj. hematopoetycznych komórkach macierzystych, progenitorach wspólnych dla linii mieloidalnej oraz progenitorach wspólnych dla granulocytów i makrofagów. Czynniki C/EBP ϵ ulega ekspresji w późniejszych etapach rozwoju granulocytów. Dodatkowe czynniki zaangażowane w rozwój linii mieloidalnej to m.in. receptor witaminy D, który wspomaga dojrzewanie linii monocytarnej, a także receptor kwasu retinowego regulujący proces granulocytopoezy. Inhibicja RAR zatrzymuje granulocytopoezę na etapie promielocytów [82].

Decyzja o samoodnowieniu lub różnicowaniu się hematopoetycznej komórki macierzystej jest zależna od poziomu czynników transkrypcyjnych specyficznych dla różnych linii rozwojowych. Poziom ekspresji tych czynników może być różnorodny i zmienny, a ponadto podlega zewnątrzkomórkowym sygnałom regulacyjnym w postaci cytokin hematopoetycznych. Komórki podścieliska, obejmujące wyspecjalizowane fibroblasty, komórki śródbłonna i osteoblasty, produkują takie cytokiny jak SCF, Tpo, Flt3L, GM-CSF i G-CSF. Każda z tych cząsteczek jest produkowana w stosunkowo niskim stężeniu, jednak występują skoncentrowane lokalnie w szpiku kostnym, a ich wspólne działanie wspomaga przetrwanie i proliferację hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych. SCF (ang. Stem Cell Factor), który ulega ekspresji w fibroblastach podścieliska i w komórkach śródbłonna, jest niezwykle istotny dla przetrwania, proliferacji, migracji i różnicowania hematopoetycznych komórek macierzystych. Brak tego czynnika lub jego receptora (c-kit) skutkuje występowaniem ciężkiej niedokrwistości. Cytokina Flt3L ulega ekspresji w mezenchymalnych komórkach podścieliska, a jej niedobór powoduje zmniejszenie puli progenitorowych komórek hematopoetycznych, co skutkuje mniejszą ilością komórek mieloidalnych, limfocytów B, komórek NK i komórek dendrytycznych. Zwiększona proliferacja konkretnej linii rozwojowej może być odpowiedzią na wytwarzane w miejscach infekcji czynniki zapalne. I tak, fibroblasty i komórki śródbłonna mogą produkować zwiększone ilości G-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów) i GM-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów)

i makrofagów) w odpowiedzi na IL-1 i TNF α wytwarzane przez aktywowane monocyty lub makrofagi. Z kolei zwiększona produkcja TPO (trombopoetyna, czynnik wzrostu i rozwoju megakariocytów) następuje w odpowiedzi na TGF β , wytwarzany przez aktywowane limfocyty T [98]. SCF i TPO w połączeniu z takimi interleukinami jak IL-3, IL-6 czy IL-11 wpływają na przeżycie oraz proliferację hematopoetycznych komórek macierzystych [99].

Analiza genomu umożliwia poznanie molekularnego podłoża wielu chorób, co może mieć znaczenie dla lepszej diagnostyki i określenia właściwego postępowania klinicznego. Dla rozwoju nowotworów szczególnie istotne są mutacje, które zaburzają ścieżki sygnałowe związane z procesami różnicowania oraz proliferowania komórek. Zarówno kalcytriol, jak i ATRA pełnią funkcje regulacyjne związane z różnicowaniem blastów białaczkowych. Do niedawna funkcję receptora witaminy D badano głównie w kontekście komórek kości, skóry i nerek. Układ odpornościowy jest stosunkowo nowym obiektem pod względem badań dotyczących VDR, dlatego też nie ma informacji dotyczących regulacji ekspresji tego genu w procesie hematopoezy. Warto przyjrzeć się temu aspektowi, aby móc później stwierdzić, które procesy stanowią fizjologiczną normę, a które z nich świadczą o wkroczeniu komórki na ścieżkę nowotworzenia.

Większość badań dotyczących ludzkiej hematopoezy przeprowadzono na mysim modelu badawczym [100]. Słuszność takiego podejścia i zakres możliwości ekstrapolacji uzyskanych w ten sposób wyników na biologię człowieka zostanie dokładniej omówiona w rozdziale 5. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki mogą być pomocne w przyjęciu stanowiska w kwestii stosowania modeli zwierzęcych w tym zakresie, ponieważ stanowią część większego projektu, w którym regulacja ekspresji genu *VDR* w procesie hematopoezy badana jest zarówno na modelu mysim, jak i ludzkim.

2 Cel pracy

Celem niniejszej pracy było opisanie niektórych molekularnych mechanizmów regulacji transkrypcji genu *VDR* na różnych etapach mysiej hematopoezy, a w szczególności wpływu czynników, które są stosowane w czasie terapii nowotworów układu krwiotwórczego – kalcytriolu i kwasu retinowego. Aby osiągnąć ten cel, zaplanowano zbadanie aktywności promotora(ów) genu *VDR* i jego interakcji z elementami regulatorowymi. Prace miały również na celu określenie udziału mechanizmów epigenetycznych i potencjalnej roli receptorów kwasu retinowego w regulacji transkrypcji genu *VDR*. Uzyskana wiedza, dotycząca mechanizmów regulacji ekspresji receptora *VDR* w czasie prawidłowej hematopoezy, jest niezbędna do zrozumienia w jaki sposób dochodzi do zaburzeń regulacji ekspresji genu *VDR* w nowotworach układu krwiotwórczego. Ponadto, porównanie tych mechanizmów u myszy i ludzi może pozwolić na bardziej krytyczne odniesienie się do wyników uzyskanych na modelu mysim w kontekście planowania strategii terapeutycznych u ludzi.

Pracę można podzielić na pięć bloków eksperymentalnych, w których podjęto próbę realizacji wymienionych celów szczegółowych:

- I. Identyfikację wykorzystywanych w komórkach krwi promotorów genu *VDR* oraz ustalenie wariantów końca 5' i wyznaczenie punktu startu transkrypcji *VDR*.
- II. Wyznaczenie profilu ekspresji wariantów transkrypcyjnych genu *VDR* w mysich komórkach krwi.
- III. Zbadanie stanu metylacji promotorów genu *VDR* w mysich komórkach krwi.
- IV. Określenie elementów regulatorowych wiążących receptor *VDR* w obrębie *locus VDR*.

3 Materiały i metody

3.1 Materiały

3.1.1 Bakterie

- a. *Escherichia coli* DH5 α – szczep bakterii stosowany jako komórki kompetentne podczas klonowania, powielania i izolacji plazmidów;
- b. *Escherichia coli* HST08 – szczep bakterii stosowany jako komórki kompetentne podczas klonowania, powielania i izolacji plazmidów.

3.1.2 Linie komórkowe

- a. 32D – mysia mieloidalna linia komórkowa;
- b. NIH3T3 – mysia linia komórkowa embrionalnych fibroblastów.

3.1.3 Zwierzęta laboratoryjne

Mus musculus C57BL/6J.

3.1.4 Odczynniki chemiczne, komercyjne zestawy, enzymy, przeciwciała i cytokiny

Tabela 1. Wykaz odczynników chemicznych, komercyjnych zestawów, enzymów i przeciwciał odczynników wykorzystanych podczas realizacji projektu.

| Nazwa odczynnika | Producent | Aplikacja |
|------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| Odczynniki chemiczne | | |
| Woda MilliQ | Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN | Klonowanie, Izolacja DNA |
| Glicerol | POCH S.A. | Klonowanie |
| Izopropanol 99% | POCH S.A. | Izolacja DNA/RNA |
| Etylowy alkohol 96% | POCH S.A. | Izolacja RNA/DNA |
| Choroform | POCH S.A. | Izolacja RNA |
| TRI REAGENT | MRC | Izolacja RNA |
| Woda wolna od RNaz | Qiagen | Izolacja RNA |
| dATP Solution (100 mM) | Thermo Fisher Scientific | PCR |

| | | |
|--|-----------------------------------|------------------------|
| dNTP Set 100 mM Solutions | Thermo Fisher Scientific | PCR |
| Rozw6r betainy (5 M) | Sigma - Aldrich | PCR |
| 10X FastDigest Green Buffer | Thermo Fisher Scientific | Trawienie restrykcyjne |
| Proteinaza K | Roche | Izolacja kom6rek |
| Glikogen | Thermo Fisher Scientific | Ligacja |
| Octan Amonu | Sigma-Aldrich | Ligacja |
| GeneRuler 1 kb DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific | Elektroforeza 2elowa |
| GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific | Elektroforeza 2elowa |
| DNA Gel Loading Dye (6X) | Thermo Fisher Scientific | Elektroforeza 2elowa |
| TAE Buffer (Tris-acetate-EDTA) (50X) | Thermo Fisher Scientific | Elektroforeza 2elowa |
| AGAROSE, Biotechnology Grade | BioShop | Elektroforeza 2elowa |
| Midori Green Advance | Nippon Genetics | Elektroforeza 2elowa |
| Random Hexamer Primer | Thermo Fisher Scientific | Odwrotna transkrypcja |
| Oligo (dT)18 Primer | Thermo Fisher Scientific | Odwrotna transkrypcja |
| 10X RT Buffer | Thermo Fisher Scientific | Odwrotna transkrypcja |
| POP-6™ Polymer for the 310 Genetic Analyzer | Thermo Fisher Scientific | Sekwencjonowanie |
| 310 and 31xx Running Buffer | Thermo Fisher Scientific | Sekwencjonowanie |
| Hi-Di™ Formamide | Thermo Fisher Scientific | Sekwencjonowanie |
| Ampicylina | Sigma-Aldrich | Hodowle bakteryjne |
| Kanamycyna | Sigma-Aldrich | Hodowle bakteryjne |
| Chloramfenikol | Sigma-Aldrich | Hodowle bakteryjne |
| IPTG | Thermo Fisher Scientific | Hodowle bakteryjne |
| X-Gal | Thermo Fisher Scientific | Hodowle bakteryjne |
| LB Broth (Miller) | Sigma-Aldrich | Hodowle bakteryjne |
| LB Broth (Lennox) | Sigma-Aldrich | Hodowle bakteryjne |
| Agar | BioShop | Hodowle bakteryjne |
| 1 α ,25-dihydroksywitamina D ₃ | Cayman | Hodowle kom6rkowe |
| ATRA | Cayman | Hodowle kom6rkowe |
| Penicylina-Streptomycyna | Sigma-Aldrich | Hodowle kom6rkowe |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich | Hodowle kom6rkowe |
| Fetal Bovine Serum (FBS) | Sigma-Aldrich | Hodowle kom6rkowe |
| 99,5% DMSO | Sigma - Aldrich | Hodowle kom6rkowe |
| PBS | Pracownia Chemii Og6lnej IITD PAN | Hodowle kom6rkowe |
| Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) | Sigma - Aldrich | Hodowle kom6rkowe |

| Enzymy | | |
|---|--------------------------|---------------------------------|
| Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) | NEB | 5'RACE PCR |
| Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) | Epicentre | 5'RACE PCR |
| T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase) | NEB | 5'RACE PCR |
| SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/μl) | Thermo Fisher Scientific | Odwrotna transkrypcja |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase | Thermo Fisher Scientific | Odwrotna transkrypcja |
| FastDigest BglII | Thermo Fisher Scientific | Trawienie restrykcyjne |
| FastDigest KpnI | Thermo Fisher Scientific | Trawienie restrykcyjne |
| FastDigest XhoI | Thermo Fisher Scientific | Trawienie restrykcyjne |
| FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/L) | Thermo Fisher Scientific | Defosforylacja |
| T4 DNA Ligase | Thermo Fisher Scientific | Ligacja |
| RiboLock RNase Inhibitor (40 U/L) | Thermo Fisher Scientific | Odwrotna transkrypcja |
| DreamTaq DNA Polymerase | Thermo Fisher Scientific | PCR |
| Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase | Thermo Fisher Scientific | PCR |
| Komercyjne zestawy odczynników | | |
| GeneJet Plasmid Midiprep Kit | Thermo Fisher Scientific | Izolacja DNA plazmidowego |
| Wizard SV Gel and PCR Clean-Up | Promega | Oczyszczanie DNA plazmidowego |
| GeneJet Gel Extraction Kit | Thermo Fisher Scientific | Izolacja DNA z żelu agarozowego |
| PicoPure RNA Isolation Kit | Promega | Izolacja RNA |
| Abi Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit | Thermo Fisher Scientific | Sekwencjonowanie |
| ONE-Glo EX Luciferase Assay System | Promega | Test lucyferazowy |
| PowerUp™ SYBR®Green Master Mix | Thermo Fisher Scientific | qPCR |
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Thermo Fisher Scientific | Odwrotna transkrypcja |
| Magna CHIP A/G | Merck Millipore | Immunoprecypitacja chromatyny |

| | | |
|--------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| 5X In-Fusion HD Enzyme Premix | Takara Bio USA | Klonowanie |
| Przeciwciała | | |
| anti-mouse Sca-1 (Ly6A/E) FITC | BioLegend | Cytometria przepływowa |
| anti-mouse CD117 (c-kit) APC | BioLegend | Cytometria przepływowa |
| anti-mouse CD150 Pacific Blue | BioLegend | Cytometria przepływowa |
| anti-mouse CD16/32 APC/Cy7 | BioLegend | Cytometria przepływowa |
| anti-mouse CD34 PE | BioLegend | Cytometria przepływowa |
| anti-mouse CD127 PerCP/Cy5.5 | BioLegend | Cytometria przepływowa |
| Normal mouse IgG | Merck Millipore | Immunoprecypitacja chromatyny |
| anty-VDR (C-20) SC-1008 | Santa Cruz Biotechnology | Immunoprecypitacja chromatyny |
| Cytokiny | | |
| Rekombinowana mysia IL-3 | PeproTech | Hodowle komórkowe |
| Rekombinowana mysia IL-6 | PeproTech | Hodowle komórkowe |
| SCF (Stem Cell Factor) | PeproTech | Hodowle komórkowe |
| Flt3-Ligand 50ng/ml | PeproTech | Hodowle komórkowe |
| TPO (Thrombopoietin) | PeproTech | Hodowle komórkowe |

3.1.5 Bufory i media hodowlane

Tabela 2. Wykaz buforów i mediów hodowlanych wykorzystanych podczas realizacji projektu.

| Nazwa | Skład | Aplikacja |
|------------------------|---|--------------------------------|
| Media hodowlane | | |
| RPMI-1640 | 88 ml RPMI-1640 (4,5 g/l glukozy, 10 mM HEPES, 1,0 mM pirogronian sodu), 10 ml inaktywowanego FBS, 1 ml L-glutaminy, 1 ml roztworu penicylina- streptomycyna (100X) | Hodowla komórkowa Linia 32D |

| | | |
|--|--|--|
| DMEM | 87 ml medium Dulbecco's Modified Eagle's, 10 ml FBS, 1 ml roztworu penicylina-streptomycyna (100U/ml), 1 ml L-glutaminy (200 mM), 1ml β -merkaptoetanolu (100mM) | Hodowla komórkowa Linia NIH3T3 Hodowle pierwotne |
| Stemline® Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium | Tajemnica handlowa producenta | Sigma Aldrich |
| Bufory | | |
| Bufor P1 | 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 μ g/ml RNaza A | Izolacja DNA plazmidowego |
| Bufor P2 | 0,2 M NaOH 1% SDS | Izolacja DNA plazmidowego |
| Bufor P3 | 3 M octan potasu (pH 5,5) | Izolacja DNA plazmidowego |
| Cell Resuspension Soluton | 50mM Tris-HCl (pH 7.5) 10mM EDTA (pH 8.0) 100 μ g/ml RNaza A | Izolacja DNA plazmidowego |
| Cell Lysis Solution | 0.2M NaOH 1% SDS | Izolacja DNA plazmidowego |
| Neutralization Solution | 4.09M chlorowodorek guanidyny (pH 4.2) 759mM octan potasu 2.12M kwas octowy | Izolacja DNA plazmidowego |
| Column Wash Solution | 162.8mM octan potasu 22.6mM Tris-HCl (pH 7.5) 0.109mM EDTA (pH 8.0) | Izolacja DNA plazmidowego |
| Bufor TE | 100 mM 1M Tris-HCl (pH 7,5 lub 8.0) 10 mM 0,5M EDTA (pH 8) | Izolacja DNA |
| ACK (Ammonium-Chloride-Potassium) Lysing Buffer | 0.15 M NH ₄ Cl 0.01 M KHCO ₃ 0.0001 M Na ₂ EDTA | Hodowle komórkowe |
| Bufor do lizy (proteinaza K) | 100 mM Tris pH 8,0 5mM EDTA 0,5% SDS 200 mM NaCl | Hodowle komórkowe |

3.1.6 Startery oligonukleotydowe

Tabela 3. Wykaz starterów oligonukleotydowych wykorzystanych podczas realizacji projektu.

| Nazwa | Sekwencja |
|------------------------|--|
| mVDRpromR | 5' GGAAGATCTGAACCCCCTTCCCCCTGCAC 3' |
| mVDREpromF | 5' CCGCTCGAGGTGGTTGATTCCAAGTCAAGAAAGTTTCA 3' |
| mVDRE1F | 5' CCGCTCGAGTCCCTGTCCCCACTGAGCCTC 3' |
| mVDRE123F | 5' CCGCTCGAGGTGTGAGCTGCCAGGTAGG 3' |
| pNlucR | 5' CGCTCAGACCTTCATACGGGA 3' |
| pNlucF | 5' CCTAACTGGCCGGTACCTG 3' |
| mVDRslicR | 5' GGCTAGCGAGCTCAGGTACCCTGGCTGCCTCATGCTCAG 3' |
| mVDRslicF | 5' GGCCTAACTGGCCGGTACCTTCCTGATCTCACACACTCTC CC 3' |
| ChIPS1R | 5' AACCTGTCATTCTCTAACTGG 3' |
| ChIPS1F | 5' CCCCTGGCACTTTATGTTTTT 3' |
| ChIPCyp24a1R | 5' AGTGGCCAATGAGCACGC 3' |
| ChIPCyp24a1F | 5' GGTATCTCCGGGGTGGAGT 3' |
| ChIPVDRE1R | 5' CTACCTGACGTTCTTCTGCTAACT 3' |
| ChIPVDRE1F | 5' ATGAGTTCTCAGGAGCCATGC 3' |
| ChIPVDRE23R | 5' GCCATACTGACCTTACTGGGAATC 3' |
| ChIPVDRE23F | 5' TGAGAGGCAGTGTGAAATGATGG 3' |
| mGAPDHR | 5' ACACATTGGGGGTAGGAACA 3' |
| mGAPDHF | 5' AACTTTGGCATTGTGGAAGG 3' |
| mVDRR | 5' CTGGTCATCAGAGGTGAGGTC 3' |
| mVDRF | 5' CACCTGGCTGATCTTGTCAGT 3' |
| mCYP24A1R | 5' CCAGTCTTCGCAGTTGTCC 3' |
| mCYP24A1F | 5' CACGGTAGGCTGCTGAGATT 3' |
| mVDRex4RcOut | 5' TCTGTGAGGATGAACTCCTTCATC 3' |
| mVDRex4-5RcIn | 5' TCCTTGGTGATGCGGCAATCTC 3' |
| 5'RACE Outer Primer | 5' GCTGATGGCGATGAATGAACACTG 3' |
| 5'RACE Inner Primer | 5' CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG 3' |
| SP6 | 5' ATTTAGGTGACACTATAG 3' |

| | |
|----|---------------------------|
| T7 | 5' TAATACGACTCACTATAGG 3' |
|----|---------------------------|

3.1.7 Plazmidy

Tabela 4. Wykaz plazmidów wykorzystanych podczas realizacji pracy.

| Nazwa | Opis | Producent |
|---|--|----------------|
| <p>pNL 1.2 [NlucP]</p> <p>Rycina 11. Mapa plazmidu pNL 1.2 [NlucP] [101].</p> | <p>Wektor reporterowy służący do klonowania regionów promotorowych. Zawiera m.in. gen warunkujący oporność na ampicylinę oraz gen kodujący lucyferazę NanoLuc (NlucP). Enzym ten znajduje się pod kontrolą wklonowanego fragmentu promotorowego.</p> <p>Wektor wykorzystywany jest podczas testów lucyferazowych.</p> | <p>Promega</p> |
| <p>pRL-TK</p> <p>Rycina 12. Mapa plazmidu pRL-TK [102].</p> | <p>Wektor reporterowy stosowany w teście lucyferazowym jako wewnętrzna kontrola wydajności transfekcji. Wektor zawiera m.in. gen warunkujący oporność na ampicylinę oraz gen kodujący lucyferazę pochodzącą z <i>Renilla reniformis</i>, znajdującą się pod kontrolą promotora kinazy tymidynowej wirusa opryszczki pospolitej (HSV-TK).</p> | <p>Promega</p> |
| <p>pGL4.53 [luc2/PGK]</p> <p>Rycina 13. Mapa plazmidu pGL4.53 [luc2/PGK] [103].</p> | <p>Wektor reporterowy stosowany podczas testu lucyferazowego jako kontrola pozytywna. Wektor zawiera m.in. gen warunkujący oporność na ampicylinę oraz gen kodujący lucyferazę pochodzącą z <i>Photinus pyralis</i>, która znajduje się pod kontrolą promotora kinazy fosfoglicerynianowej.</p> | <p>Promega</p> |

| | | |
|---|--|----------------|
| <p style="text-align: center;">pGEM-T easy</p> <p>Rycina 14. Mapa plazmidu pGEM-T easy [104].</p> | <p>Wektor stosowany do klonowania produktów reakcji PCR. Wektor w postaci linearnej zawiera na końcach 3' tyminy. Umożliwia to wklonowanie produktu reakcji PCR, który zawiera reszty adeniny, dodawane na końcach przez polimerazę. Wektor warunkuje oporność na ampicylinę, ponadto posiada polilinker umiejscowiony w genie <i>lacZ</i>, który koduje β-galaktozydazę. Zastosowanie wektora pGEM-T easy umożliwia selekcję w systemie „blue-white”.</p> | <p>Promega</p> |
|---|--|----------------|

3.1.8 Aparatura

Tabela 5. Wykaz aparatury stosowanej podczas realizacji pracy.

| Urządzenie | Model | Producent |
|--|--|--------------------------|
| Spektrofotometr | NanoDrop | Thermo Fisher Scientific |
| Termocykler | MJ Research PTC-200 | Bio-Rad |
| Worteks | Vortex Genie 2 | Scientific Industries |
| Waga analityczna | AB204 | Mettler-Toledo |
| Łaźnia wodna | WB4 | Biosan |
| Mieszadło kołowe | F205 | Falc |
| Zasilacz do elektroforezy | E385 | Consort |
| Transluminator | BTX-20.M | Syngen Biotech |
| Aparat do archiwizacji żeli agarozowych | CN-TFX | Vilber Lourmat |
| Wirówka | 5417R | Eppendorf |
| Wirówka | 4K15 | Sigma |
| Termostat | ThermoStat plus | Eppendorf |
| Termostat | Thermomixer compact | Eppendorf |
| Inkubator | HT Ecotron | Inforst |
| Inkubator | IR Autoflow CO ₂ Water-Jacketed Incubator | Nuaire |
| Inkubator CO ₂ do hodowli komórkowych | (Model No. MCO-18AC-PE) | Panasonic Healthcare Co. |
| Laminar | Class II A/B3 Biological Safety Cabinet | Forma Scientific |

| | | |
|--------------------------|------------------------------|-------------------|
| Sorter komórkowy | BD FACSAria™ III Cell Sorter | Beckton Dickinson |
| Zamrażarka | -86°C Ultralow Freezer | Nuaire |
| Zamrażarka -20°C | Ardo | |
| Elektroporator | Gene Pulser II | Bio-Rad |
| Sekwenator | 310 Genetic Analyser | Abi Prism |
| Luminometr | TD-20/20 Luminometer | Turner Designs |
| Termocykler | MJ Reaserch Opticon 2 | Bio-Rad |
| Neon Pipette | | Invitrogen |
| Neon Pipette Station | | Invitrogen |
| Neon Tips | | Invitrogen |
| Neon Transfection Device | | Invitrogen |
| Mikroskop odwrócony | | OPTON |
| System próżniowy | Eluator™ | Promega |
| Szafa chłodnicza | Mawi | Mawi |

3.2 Metody

3.2.1 Trawienie proteinazą K

Fragment wybranej tkanki umieszczono w 200 μ l buforu do lizy, po czym dodawano proteinazę K do osiągnięcia końcowego stężenia 100 μ g/ml. Reakcję prowadzono w temperaturze 56°C przez około 12 godzin.

3.2.2 Izolacja DNA genomowego

Tkanki, z których wyizolowano materiał genetyczny zostały poddane trawieniu proteinazą K, po czym postępowano zgodnie z procedurą:

- a. Próbkę zawierającą zawiesinę komórkową wirowano 10 min przy obrotach 12 000xg, w temperaturze 4 °C, po czym supernatant przeniesiono do nowej probówki.
- b. Do próbki dodano 96% izopropanolu w stosunku 1:1. Całość dokładnie zmieszano i chłodzono przez 20 min, w temperaturze -20 °C.
- c. Całość zwirowano przez 20 min przy obrotach 12 000xg, w temperaturze 4 °C.
- d. Usunięto supernatant, dodano 500 μ l 75% roztworu etanolu i wirowano przez 5 min przy obrotach 12 000xg, w temperaturze 4 °C.
- e. Usunięto roztwór etanolu, próbkę wysuszono, a uzyskane DNA zawieszono w 50 μ l miliQ.

3.2.3 Izolacja DNA plazmidowego z komórek bakteryjnych w skali mini

Izolacja plazmidów z komórek bakteryjnych została przeprowadzana z hodowli bakteryjnej o objętości 1 ml zgodnie z procedurą:

- a. Hodowlę bakteryjną wirowano przez 5 min przy obrotach 5000xg, w temperaturze 4°C.
- b. Usunięto supernatant, osad bakteryjny zawieszono w 100 μ l buforu P1 i zwroteksowano.
- c. Dodano 200 μ l buforu P2 i delikatnie zmieszano poprzez inwersję. Całość inkubowano 5 min w temperaturze pokojowej.
- d. Dodano 150 μ l schłodzonego buforu P3. Całość zmieszano poprzez inwersję, po czym inkubowano 10 min na lodzie.

- e. Wirowano 10 min przy obrotach 20 000xg, w temperaturze 4°C.
- f. Supernatant zebrano i przeniesiono do nowej probówki. Dodano 96 % roztworu izopropanolu w stosunku 1:1, przepipetowano i inkubowano 20 min w temperaturze -20°C.
- g. Wirowano 20 min przy obrotach 20 000xg, w temperaturze 4°C.
- h. Usunięto supernatant, po czym dodano 1 ml 75% roztworu etanolu.
- i. Próbkę wirowano przez 5 min przy obrotach 20 000xg, w temperaturze 4°C.
- j. Supernatant usunięto, a peletkę pozostawiono do wyschnięcia przez 5 min w temperaturze pokojowej.
- k. Peletkę zawieszono w 30 µl wody wolnej od nukleaz. Uzyskany produkt przechowywano w temperaturze -20°C.

3.2.4 Izolacja plazmidów w skali midi

Izolacja plazmidów z komórek bakteryjnych w skali midi została przeprowadzana z wykorzystaniem zestawu GeneJet Plasmid Midiprep Kit zgodnie z protokołem załączonym przez producenta.

3.2.5 Izolacja RNA z zastosowaniem TriReagent (duża ilość komórek)

Całkowite RNA izolowano z linii komórkowych oraz tkanek i komórek wyizolowanych z myszy. Izolacje przeprowadzano zgodnie z następującą procedurą:

- a. uzyskany materiał biologiczny zwirowano, po czym usunięto supernatant i dwukrotnie przepłukano buforem PBS;
- b. Próbkę zawieszono w 1 ml Trizolu, a następnie inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej;
- c. Dodano 200 µl chloroformu i energicznie wytrząsano próbkę przez około 15 sekund, po czym inkubowano 5 min w temperaturze pokojowej;
- d. Próbkę wirowano 15 min przy obrotach 12 000xg, w temperaturze 4°C;
- e. Po zwirowaniu przeniesiono fazę wodną do nowej probówki, dodano 500 µl 96% roztworu izopropanolu i wymieszano, a następnie inkubowano 10 min na lodzie;
- f. Wirowano 20 min przy obrotach 20 000xg, w temperaturze 4°C;
- g. Supernatant odciągnięto, dodano 1 ml 75% roztworu etanolu i przepipetowano;

- h. Wirowano 5 min przy obrotach 7500xg, w temperaturze 4°C;
- i. Usunięto supernatant, peletkę pozostawiono do wyschnięcia, po czym zawieszono w 20 µl wody wolnej od nukleaz.
- j. Stężenie otrzymanego RNA określono przy użyciu spektrofotometru, a jakość uzyskanego kwasu nukleinowego została sprawdzona poprzez elektroforetyczny rozdział próbki w żelu agarozowym;
- k. Próbkę wyizolowanego RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

3.2.6 Izolacja RNA z zastosowaniem PicoPure RNA Isolation Kit (mała ilość komórek)

Izolację RNA z niewielkiej ilości materiału (od kilkuset komórek do 1 miliona) przeprowadzono użyciu PicoPure RNA Isolation Kit według załączonego przez producenta protokołu.

3.2.7 Spektrofotometryczny pomiar stężenia i czystości kwasów nukleinowych DNA/RNA

Stężenie oraz czystość próbek DNA i RNA dokonano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop. W analizowanej próbce mierzono absorbancję wiązki światła przy długości fal przy długości fal $\lambda=260$ nm i $\lambda=280$ nm. Pomiar za pomocą spektrometru NanoDrop przeprowadzono nakładając próbę na element optyczno-pomiarowy urządzenia. Pomiaru dokonano względem próby kontrolnej, stanowiącej rozcieńczalnik próby badanej. Spektrometr obsługiwano za pomocą komputera z wykorzystaniem oprogramowania Thermo Scientific NanoDrop2000. Pomiaru oraz obliczenia stężenia i stosunku Abs260/Abs280 dokonywane są automatycznie po wyborze rodzaju wykonywanej analizy. Wyznaczony stosunek wartości absorbancji A260/A280 informował o zanieczyszczeniu próbki białkami, który dla próbki niezanieczyszczonej powinien mieścić się w zakresie od 1,6 do 1,8. Stosunek wartości absorbancji A260/A230 dla próbki, która nie jest zanieczyszczona fenolem wynosi od 1,8 do 2,0. Przyjęto, że dla DNA o stężeniu 50 µg/ml oraz dla RNA o stężeniu 40 µg/ml wartość OD jest równa 1.

3.2.8 Odwrotna transkrypcja

W wyniku reakcji otrzymywane jest jednoniciowe cDNA, komplementarne do mRNA wyizolowanego z komórek. Proces ten przeprowadzany jest przy użyciu odwrotnej transkryptazy otrzymanej z wirusa M-MLV. Matrycę stanowiło 100 ng RNA otrzymanego podczas eksperymentu. Stosowano High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit zgodnie z zaleceniami producenta. Tabele 6-7 przedstawiają skład i program reakcji odwrotnej transkrypcji.

Tabela 6. Składniki reakcji odwrotnej transkrypcji.

| Składnik | Objętość |
|---|-------------|
| 10x RT Buffer | 2 μ l |
| 10x RT Random Primers | 2 μ l |
| 25x dNTP Mix (100 mM) | 0,8 μ l |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase | 1 μ l |
| RNase Inhibitor | 1 μ l |
| Nuclease-free H₂O | 3,2 |
| RNA* | 10 μ l |

Tabela 7. Program reakcji odwrotnej transkrypcji.

| Etap | Temperatura | Czas |
|------------------------------|-------------|----------|
| Annealing | 25 °C | 10 min |
| Odwrotna transkrypcja | 37 °C | 120 min |
| Inaktywacja termiczna | 85 °C | 5 min |
| Chłodzenie | 4 °C | ∞ |

3.2.9 Reakcja PCR

Podczas reakcji, których celem było określenie specyficzności i wielkości produktu stosowano polimerazę DreamTaq. Podczas klonowania stosowano polimerazę Phusion Hot Start II, która posiada właściwości egz nukleazy 3' -> 5', dzięki czemu otrzymywano wierne kopie powielanego fragmentu DNA. Poniżej przedstawiono tabele zawierające skład mieszaniny reakcyjnej lub program reakcji specyficzny dla danego rodzaju polimerazy (Tabele 8-11).

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej z użyciem polimerazy DreamTaq.

| Składnik | Objętość | Stężenie końcowe |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------|
| Bufor DreamTaq 10X | 2 µl | 1X |
| dNTP 10 mM | 0,3 µl | 150 µM |
| Starter Forward 50 µM | 0,2 µl | 0,5 µM |
| Starter Reverse 50 µM | 0,2 µl | 0,5 µM |
| Polimeraza DNA DreamTaq | 0,1 µl | 0,025 U/µl |
| Matryca DNA | X | 10 pg – 1 µg |
| Woda wolna od nukleaz | Uzupełnić do 20 µl | |

Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej z użyciem polimerazy Phusion.

| Składnik | Objętość | Stężenie końcowe |
|--|--------------------|-------------------------|
| Bufor Phusion Green HF 5X | 4 µl | 1X |
| dNTP 10 mM | 0,4 µl | 200 µM |
| Starter Forward 50 µM | 0,2 µl | 0,5 µM |
| Starter Reverse 50 µM | 0,2 µl | 0,5 µM |
| Polimeraza DNA Phusion Hot Start II | 0,2 µl | 0,02 U/µl |
| Matryca DNA | X | 10 pg – 1 µg |
| Woda wolna od nukleaz | Uzupełnić do 20 µl | |

Tabela 10. Program reakcji PCR dla Polimerazy DNA DreamTaq.

| Etap | Temperatura | Czas | Liczba cykli |
|----------------------------|--------------------|-------------|---------------------|
| Wstępna denaturacja | 94 °C | 3 min | 1 |
| Denaturacja | 94 °C | 30 s | |
| Annealing | | 30 s | 25-30 |
| Elongacja | 72 °C | 1 min/kpz | |
| Elongacja końcowa | 72 °C | 5 min | 1 |

Tabela 11. Program reakcji PCR dla Polimerazy DNA Phusion Hot Start II.

| Etap | Temperatura | Czas | Liczba cykli |
|----------------------------|--------------------|-------------|---------------------|
| Wstępna denaturacja | 98 °C | 30 min | 1 |
| Denaturacja | 98 °C | 5-10 s | |
| Annealing | x | 10-30 s | 25-30 |
| Elongacja | 72 °C | 15-30 s/kpz | |
| Elongacja końcowa | 72 °C | 5 min | 1 |

Temperaturę przyłączenia starterów (*ang.* annealing) ustalono zgodnie z właściwościami fizycznymi starterów. Czas elongacji zależny był od wielkości produktu reakcji i rodzaju zastosowanej polimerazy.

3.2.10 Reakcja PCR na koloniach bakteryjnych

W reakcji tej matrycę stanowi pojedyncza kolonia bakteryjna, pobrana bezpośrednio z płytki hodowlanej. Czas wstępnej denaturacji wydłużony jest do 5 min, pozostałe warunki pozostają niezmiennione. Technika ta stosowana jest po procesie transformacji bakterii, a jej celem jest sprawdzanie obecności insertu w wektorze.

3.2.11 Elektroforeza DNA/RNA w żelu agarozowym

Elektroforetyczny rozdział fragmentów DNA/RNA prowadzono w żelu agarozowym. Stężenie agarozy stosowane do analizy było zależne od wielkości rozdzielanych cząsteczek - dla fragmentów DNA poniżej 500 pb wykorzystywano żele o stężeniu agarozy 2%, dla większych cząsteczek stosowano żele o 1% stężeniu agarozy.

Żel przygotowano poprzez rozpuszczenie odpowiedniej ilości agarozy w 60 ml buforu TAE 1X, po czym dodawano 4,5 µl barwnika Midori Green Advanced. Próbkę nanoszono na żel z dodatkiem 6X stężonego buforu obciążającego. Stosowano marker wielkości cząsteczek DNA GeneRuler 1kb DNA. Elektroforezę prowadzono przy napięciu od 90 do 110V. Wizualizację rozdziału cząsteczek DNA/RNA w świetle ultrafioletowym dokonano przy użyciu transluminatora i archiwizowano z wykorzystaniem stacji Vilber Lourmat CN-TFX.

3.2.12 Oczyszczanie DNA z żelu agarozowego

Ekstrakcję DNA z żelu agarozowego przeprowadzono przy użyciu zestawu GeneJet Gel Extraction Kit zgodnie z protokołem podanym przez producenta.

3.2.13 Trawienie restrykcyjne DNA

Reakcję trawienia restrykcyjnego DNA przeprowadzono zgodnie protokołem podanym przez producenta dla poszczególnych enzymów restrykcyjnych. Proces przeprowadzono przez około 2h w temp. 37 °C. Poniżej przedstawiono tabelę przedstawiającą ogólny schemat mieszaniny stosowany podczas reakcji trawienia restrykcyjnego (Tabela 12).

Tabela 12. Ogólny schemat mieszaniny reakcji trawienia restrykcyjnego.

| Odczynnik | Ilość |
|-----------------------|-------------------------|
| 10X FastDigest Buffer | 2 μ l |
| enzym restrykcyjny | 1 μ l |
| DNA | $\leq 1 \mu$ g |
| woda wolna od DNaz | uzupełnić do 20 μ l |

3.2.14 Defosforylacja końców nici DNA

W reakcji stosowano enzym alkaliczną fosfatazę FastAP, która odłącza grupy fosforanowe od końców 5' zlinearyzowanego plazmidu, co zapobiega jego recyrkulacji podczas procesu klonowania. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 10 min. w temp. 37°C, a następnie inaktywowano termicznie enzym przez 5 min w temp. 75°C. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia Tabela 13.

Tabela 13. Skład reakcji defosforylacji.

| Odczynnik | Ilość |
|--------------------|-------------------------|
| 10X FastAP Buffer | 2 μ l |
| FastAP | 1 μ l |
| Zlinearyzowane DNA | $\leq 1 \mu$ g |
| woda wolna od DNaz | uzupełnić do 20 μ l |

3.2.15 Oczyszczanie DNA po reakcji enzymatycznej

Po zakończonych reakcjach enzymatycznych oczyszczano fragmenty DNA z mieszaniny reakcyjnej z wykorzystaniem zestawu Thermo Scientific GeneJet Gel Extraction Kit. Protokół producenta został zmodyfikowany w następujący sposób:

- a. Do próbki dodano Binding Buffer w stosunku objętościowym 1:1, całość przeniesiono na kolumnę dołączoną do zestawu;
- b. Wirowano przez 1 min przy prędkości 5000xg, w temperaturze pokojowej;
- c. Przesącz odrzucono, na kolumnę naniesiono 700 μ l Wash Buffer i wirowano w warunkach opisanych w punkcie nr 2;
- d. Przesącz odrzucono i ponownie wirowano w warunkach opisanych w punkcie nr 2;

- e. Kolumnę przeniesiono do nowej probówki i naniesiono na nią 30 μl Elution Buffer, całość inkubowano 3 min w temperaturze pokojowej;
- f. Wirowano przez 1 min przy prędkości 5000xg, w temperaturze pokojowej;
- g. Uzyskany roztwór DNA przechowywano w temp. -20°C .

3.2.16 Ligacja DNA

Stosunek molarny insertu do wektora wynosił 3:1. Reakcję przeprowadzono w temperaturze 14°C przez 16 godzin. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia Tabela 14.

Tabela 14. Skład reakcji ligacji.

| Odczynnik | Ilość |
|---------------------------|--------------------------------------|
| 10X Ligase Buffer | 1 μl |
| Ligaza DNA T4 | 1 μl |
| Zlinearyzowane DNA | 100 ng |
| Insert DNA | w stosunku molowym wobec wektora 3:1 |
| woda wolna od DNaz | uzupełnić do 10 μl |

3.2.17 Oczyszczanie DNA po ligacji

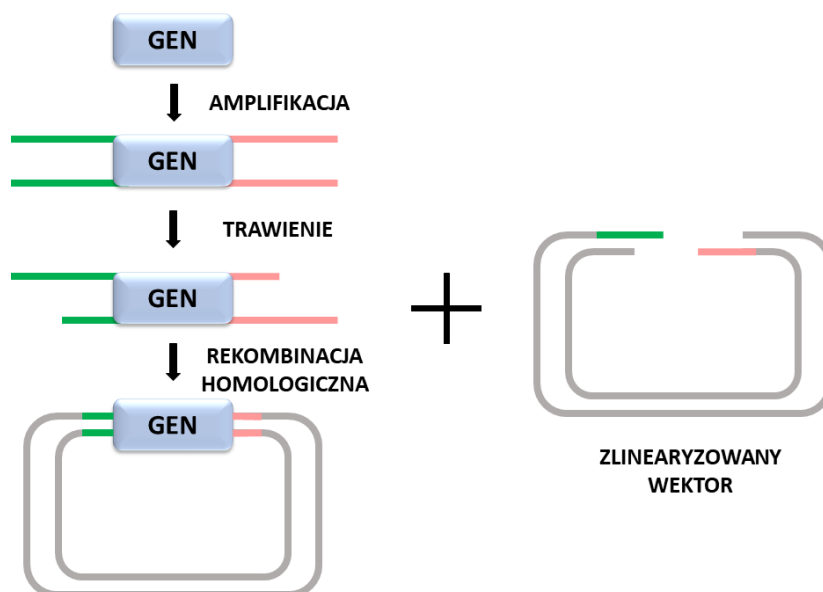
Oczyszczenie DNA z mieszaniny reakcyjnej przeprowadzono zgodnie z poniższym protokołem:

- a. Do roztworu reakcji ligacji dodano odczynniki w następującej kolejności:
 - 1 μl glikogenu
 - 9 μl miliQ
 - 6,6 μl 7,5 octanu amonu
 - 26 μl 96% izopropanolu
- b. Całość inkubowano przez 30 min w temperaturze -20°C , po czym wirowano 25 min przy prędkości 20 000xg, w temperaturze 4°C ;
- c. Usunięto supernatant, peletkę przemyto 100 μl 75% roztworem etanolu i wirowano 5 min przy prędkości 20 000 g, w temperaturze 4°C ;
- d. Usunięto supernatant, osad wysuszono i zawieszono w 10 μl wody wolnej od nukleaz;
- e. Oczyszczoną próbkę przechowywano w temperaturze -20°C .

3.2.18 SLIC - klonowanie niezależne od sekwencji i ligacji (*ang.* Sequence- and Ligation-Independent Cloning)

Podstawę stworzenia tej metody stanowi system rekombinacji homologicznej funkcjonujący w bakteriach *E.coli*, który pozwala na naprawę luk w sekwencjach DNA w oparciu o regiony homologii. W klonowaniu metodą SLIC wykorzystuje się właściwości egzonukleolityczne polimerazy DNA T4, która generuje jednoniciowe fragmenty DNA, stanowiące ramiona homologii, w sekwencjach insertu i wektora. Fragmenty te są następnie łączone *in vitro* i transformowane do *E.coli*, aby utworzyć rekombinowane DNA (Ryc.15). W przypadku niewielkiej ilości DNA proces może zostać usprawniony przy zastosowaniu białka RecA. Komplementarność sekwencji wystarcza do uporządkowania fragmentów i utrzymania ich razem, a system rekombinacji homologicznej znajdujący się w *E. coli* „naprawia” plazmid, tym samym generując żadaną cząsteczkę rekombinowanego DNA.

Proces klonowania metodą SLIC rozpoczyna się amplifikacją badanego fragmentu DNA z wykorzystaniem metody PCR, w celu dodania określonych regionów homologii 5' i 3'. Zamplifikowany w ten sposób fragment DNA oraz zlinearyzowany plazmid są częściowo trawione przy użyciu polimerazy T4 w nieobecności dNTP. W kolejnym etapie dodany zostaje pojedynczy deoksynukleotyd, np. dCTP, co skutkuje zatrzymaniem reakcji prowadzonej przez egzonukleazę. Fragment PCR i plazmid są następnie łączone, hybrydyzowane i transformowane do *E. coli*.



Rycina 15. Schemat reakcji klonowania niezależnego od sekwencji i ligacji. Opracowanie własne. Opis w tekście powyżej.

Podczas prac korzystano z zestawu In-Fusion HD Cloning Takara Bio USA, zgodnie z następującą procedurą:

- a. W obrębie plazmidu pNL 1.2 [NlucP] określono miejsce do klonowania insertu, które stanowiło podstawę do zaprojektowania ramion homologii.
- b. Wektor zlinearyzowano poprzez trawienie enzymem restrykcyjnym, a następnie oczyszczono go z mieszaniny reakcyjnej.
- c. Zaprojektowane startery zawierały komplementarne do wektora 15-nukleotydowe ramiona homologii;
- d. Gen *VDR* został zamplifikowany z użyciem CloneAmp DNA polymerase.
- e. Produkt reakcji PCR wycięto z żelu agarozowego, a następnie oczyszczono.
- f. Przeprowadzono reakcję klonowania niezależnego od sekwencji i ligacji zgodnie z warunkami opisanymi w Tabeli 15.

Tabela 15. Skład reakcji SLIC.

| Odczynnik | Ilość |
|--------------------------------------|-------------------------|
| 5X In-Fusion HD Enzyme Premix | 2 μ l |
| zlinearyzowany wektor | 100 ng |
| insert DNA | 50 ng |
| woda wolna od DNaz | uzupełnić do 10 μ l |

- h. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 15 min w temperaturze 50°C, po czym umieszczono ją na lodzie.
- j. Przeprowadzono transformację bakterii, dodając 2,5 μ l mieszaniny reakcyjnej opisanej w kroku g.

3.2.19 Reakcja EXO/SAP

Reakcja ta stosowana jest przed przeprowadzeniem reakcji sekwencjonowania i ma na celu oczyszczenie produktu reakcji PCR. W reakcji tej wykorzystuje się enzym egzonukleazę I, która degradowuje nieużyte startery oraz enzym SAP (*ang.* Shrimp Alkaline Phosphatase), który odpowiada za defosforylację dNTP, które pozostały w mieszaninie reakcyjnej. Skład mieszaniny reakcyjnej i program przedstawiają Tabele 16-17.

Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej EXO/SAP.

| Odczynnik | Ilość |
|---------------------------|---------------|
| Exo I | 0,025 μ l |
| FastAP | 0,25 μ l |
| woda wolna od DNaz | 3 μ l |

Tabela 17. Program reakcji EXO/SAP.

| Etap | Temperatura | Czas |
|-------------------------------|--------------------|-------------|
| Trawienie enzymatyczne | 37°C | 20 min |
| Dezaktywacja termiczna | 85 °C | 15 |
| Chłodzenie | 10 °C | - |

3.2.20 Reakcja sekwencjonowania DNA

Sekwencjonowanie DNA zostało przeprowadzone metodą Sanger. Do reakcji stosowano odczynniki Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem sekwenatora kapilarnego ABI Prism 310 Genetic Analyser. Stosowano oprogramowanie Prism 310 Collection. Program oraz skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiają Tabele 18-19.

Tabela 18. Skład reakcji sekwencjonowania.

| Składnik | Objętość |
|---|-------------------------|
| BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer | 1,9 μ l |
| Terminator Ready Reaction Premix | 0,25 μ l |
| Starter 5 μM | 0,65 μ l |
| Matryca DNA | 50-200 ng |
| Woda wolna od nukleaz | Uzupełnić do 10 μ l |

Tabela 19. Warunki reakcji sekwencjonowania

| Etap | Temperatura | Czas | Liczba cykli |
|----------------------------|--------------------|---------------|---------------------|
| Wstępna denaturacja | 96 °C | 1 min | |
| Denaturacja | 96 °C | 30 sek. | |
| Annealing | 50 °C | 15 sek. | 15 |
| Elongacja | 60 °C | 1 min 15 sek. | |
| Denaturacja | 96 °C | 30 sek | |
| Annealing | 50 °C | 15 sek | 8 |
| Elongacja | 60 °C | 1 min 15 sek | |
| Denaturacja | 96 °C | 30 sek | |
| Annealing | 50 °C | 15 sek | 8 |
| Elongacja | 60 °C | 2 min | |

Produktu reakcji PCR przed rozdziałem elektroforetycznym w sekwenatorze został oczyszczony zgodnie z poniższą procedurą:

- a. Do mieszaniny reakcyjnej dodano 1 µl glikogenu, 9 µl wody miliQ oraz 80 µl 75% roztworu izopropanolu;
- b. Całość wymieszano i inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej;
- c. Wirowano przez 30 min przy prędkości 20 000xg, w temperaturze 4°C;
- d. Usunięto supernatant, osad przemyto 100 µl 75% roztworu izopropanolu;
- e. Wirowano przez 5 min przy prędkości 20 000xg, w temperaturze 4°C;
- f. Usunięto supernatant, osad suszono przez 5 min w temperaturze pokojowej;
- g. Osad zawieszono w 15 µl dejonizowanego formamidu.

Uzyskaną w ten sposób próbkę denaturowano przez 2 minuty w temperaturze 95°C, po czym umieszczono ją na lodzie. Podczas rozdziału kapilarnego stosowano kapilary o rozmiarze 5-47 cm x 50µm, które wypełniono polimerem POP-6. Elektroforeza kapilarna prowadzona była przy napięciu 15 kV, przez około 30 minut, w temperaturze 50 °C. Do analizy danych stosowano oprogramowania Prism Sequencing Analysis oraz Chromas Lite.

3.2.21 Przechowywanie komórek bakteryjnych

Komórki bakteryjne przechowywano w temperaturze -80°C, wcześniej dodając 27 µl 70% roztworu glicerolu, pełniącego funkcję krioprotektanta, do 100 µl hodowli bakteryjnej.

3.2.22 Pomiar gęstości optycznej płynnej hodowli bakteryjnej

Gęstość optyczną mierzono poprzez pomiar absorbancji fal o długości 600 nm przez zawiesinę bakteryjną. Próbkę kontrolną stanowiła pożywka hodowlana LB, w której zawieszono były bakterie w próbce badanej. Pomiaru dokonano z wykorzystaniem spektrofotometru Hitachi DigiLab U-1800.

3.2.23 Otrzymywanie bakterii chemikompetentnych *E.coli* HST08

- a. 2 ml podłoża LB zaszczerpiono bakteriami szczepu HST08. Hodowlę inkubowano przez noc w temperaturze 37°C, wytrząsając przy 225 obr./min;
- b. 100 ml pożywki LB zaszczerpiono 500 µl zawiesiny bakteryjnej z prehodowli;
- c. Hodowlę inkubowano w temperaturze 37°C, wytrząsając przy 225 obr./min do momentu osiągnięcia gęstości optycznej OD₆₀₀ = 0,4-0,5;
- d. Hodowlę inkubowano 10 minut na lodzie, a następnie przeniesiono do probówek typu Falcon o pojemności 50 ml i wirowano przez 5 minut przy prędkości 5 000xg, w temperaturze 4°C;
- e. Usunięto supernatant, osad bakteryjny zawieszono w 20 ml buforu TfbI o temperaturze 4°C, a następnie inkubowano na lodzie przez 15 min;
- f. Wirowano przez 10 minut przy prędkości 2000xg, w temperaturze 4°C;
- g. Usunięto supernatant, osad bakteryjny zawieszono w 1 ml buforu TfbII o temperaturze 4°C;
- h. Zawiesinę rozpipetowano po 50 µl do probówek typu Eppendorf.
- i. Przechowywano w temperaturze -80°C, nie dłużej niż pół roku.

3.2.24 Transformacja bakterii chemikompetentnych *E.coli* HST08

Metoda transformacji służy do wprowadzenia konstruktów plazmidowych do komórek bakteryjnych. Transformacji bakterii chemikompetentnych dokonano metodą szoku termicznego zgodnie z poniższą procedurą:

- a. Bakterie *E.coli* HST08 rozmrożono na lodzie;
- b. Do 50 µl chemikompetentnych bakterii HST08 dodano 100 ng plazmidu oczyszczonego po reakcji ligacji;
- c. Całość inkubowano 30 minut na lodzie;
- d. Przeprowadzono szok termiczny poprzez 30-sekundową inkubację bakterii w temperaturze 42°C; następnie inkubowano 2 minuty na lodzie;

- e. Do zawiesiny bakteryjnej dodano 250 μ l pożywki LB, a następnie inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C przy 225 obr./min;
- f. Bakterie wysiano na płytkę z podłożem LB-agar, które zawierało odpowiedni antybiotyk selekcyjny, po czym inkubowano przez noc w temperaturze 37°C.

3.2.25 Hodowla płynna bakterii

Płynne hodowle bakteryjne prowadzono, aby uzyskać odpowiednią ilość komórek bakteryjnych wykorzystywanych do procesu transformacji chemicznej oraz klonowania. Hodowle prowadzono w kolbach o objętości 100 ml, probówkach typu Falcon o objętości 15ml i 50 ml oraz probówkach typu Eppendorf o objętości 2 ml. Do płynnego podłoża hodowlanego LB przeznaczonego do hodowli bakterii zawierających plazmid warunkujący oporność na antybiotyk dodawano odpowiedni antybiotyk selekcyjny. Hodowlę inokulowano kolonią bakteryjną przeniesioną przy użyciu sterylnej ezy z hodowli bakteryjnej znajdującej się na płytce lub poprzez dodanie 10 μ l zawiesiny bakteryjnej pochodzącej z zamrożonej w glicerolu próbki lub poprzez dodanie 1 ml zawiesiny bakteryjnej pochodzącej z prehodowli o objętości 5 ml. Hodowlę inkubowano w temperaturze 37°C przy 225 obr./min, aż do momentu uzyskania odpowiedniej gęstości optycznej.

3.2.26 Hodowla bakterii na podłożu stałym

Metoda ta wykorzystywana była do przeprowadzenia selekcji pojedynczych klonów bakterii, które następnie namnażano w hodowli płynnej. Wybrane pojedyncze klony bakteryjne posiadają preferowany w danym eksperymencie genotyp uzyskany wskutek transformacji odpowiednim plazmidem.

Do hodowli stosowano szalki Petriego o średnicy 10 cm, na które wylewano 15 ml podłoża LB-agar. W zależności od eksperymentu podłoże hodowlane zawierało odpowiedni antybiotyk selekcyjny, IPTG (izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd) i X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galaktopiranozyd).

3.2.27 Selekcja transformantów

Pierwszą ze stosowanych metod selekcji stanowiła hodowla bakterii w podłożu różnicującym, zawierającym odpowiedni antybiotyk selekcyjny. Bakterie, które w procesie

transformacji przyjęły plazmid zawierający gen selekcyjny warunkujący oporność na antybiotyk, uzyskiwały zdolność do wzrostu w podłożu różnicującym.

Drugą ze stosowanych metod to niebiesko-biała selekcja transformantów (blue-white screening). Transformacji poddawano szczepy bakterii, które zawierały zmutowany gen *lacZ*, kodujący β -galaktozydazę. W bakteriach tych operon laktozowy funkcjonował nieprawidłowo. Podłoże selekcyjne zawierało syntetyczny substrat β -galaktozydazy, X-Gal, oraz syntetyczny induktor operonu laktozowego, IPTG. Podczas transformacji bakterie przyjmowały wektor z prawidłową wersją genu *lacZ*, w obrębie którego znajdowało się miejsce rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne. W momencie przyjęcia przez bakterie niezmodyfikowanego wektora komórki bakteryjne syntetyzowały β -galaktozydazę, która w toku przemian zmieniała X-Gal w niebieski produkt, który nadawał barwę kolonii bakteryjnej. Bakterie transformowane zmodyfikowanym w procesie klonowania wektorem nie wyrażały β -galaktozydazy i były białego koloru.

3.2.28 Konstrukcja plazmidów reporterowych pNL1.2

Odpowiednie fragmenty promotora genu *VDR* lub potencjalne sekwencje regulatorowe amplifikowano na podstawie DNA genomowego, które wyizolowano ze sztucznego chromosomu bakteryjnego, zawierającego pełne *locus* mysiego genu *VDR*. Stosowane startery dodawały otrzymywanym produktom reakcji PCR miejsca restrykcyjne rozpoznawane przez enzymy BglIII lub XhoI. Enzymy te stosowano do trawienia restrykcyjnego wektora oraz insertu. Wektor poddawano także reakcji defosforylacji, co miało na celu zapobieganie jego ponownej cyrkulacji. Po reakcjach enzymatycznych insert oczyszczono na kolumnie GeneJet Gel Extraction Kit zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.15. Plazmid poddano rozdzielni elektroforetycznemu, dzięki czemu można było wyizolować formę zlinearyzowaną, a następnie wyciąć ją z żelu i oczyścić. Insert łączyło ze 100 ng plazmidu w reakcji ligacji, w stosunku molowym 3:1. Oczyszczony produkt ligacji służył do transformacji bakterii chemikompetentnych na drodze szoku cieplnego (procedura 3.2.24). Transformowane bakterie wysiewano na podłożu selekcyjnym zawierającym odpowiedni antybiotyk i hodowano przez noc w temperaturze 37°C. Obecność prawidłowego insertu w wektorze potwierdzano z wykorzystaniem reakcji PCR na koloniach bakteryjnych (procedura 3.2.10). Kolonie te były stosowane także do inokulowania płynnej hodowli. Po całonocnej inkubacji z wytrząsaniem w temperaturze

37°C z hodowli bakteryjnej izolowano plazmidy w skali mini, przy czym odpowiednie klony zachowano w glicerolu i przechowywano w temperaturze -80°C. Plazmidy wyizolowane z odpowiednich klonów bakteryjnych poddano reakcji sekwencjonowania, która miała na celu potwierdzenie poprawności wklonowanej sekwencji nukleotydowej. Mrożenia glicerolowe służyły do inokulacji hodowli płynnych przeznaczonych do izolacji plazmidów w skali midi.

3.2.29 Dodawanie reszt adeniny na 3' końcach cząsteczek DNA

Metoda ta stosowana była w celu umożliwienia wklonowania do wektora pGEM-T Easy produktów reakcji PCR utworzonych przez polimerazy posiadające aktywność egzonukleazową 3' → 5'. Takie produkty pozbawione są reszt adeninowych na końcach 3' nici DNA. Reszty adeninowe dodawano z wykorzystaniem polimerazy Taq, która jest pozbawiona aktywności egzonukleazowej 3' → 5'. Reakcję prowadzono przez 30 min w temperaturze 70°C, skład mieszaniny reakcyjnej umieszczono w Tabeli 20.

Tabela 20. Skład reakcji przyłączania reszt adeniny do 3' końca nici DNA.

| Składnik | Objętość |
|--------------------------------|--------------------|
| Bufor DreamTaq 10X | 1 µl |
| dATP, 10 mM | 0,2 µl |
| Polimeraza DNA DreamTaq | 0,1 µl |
| Matryca DNA | 2 µl |
| Woda wolna od nukleaz | Uzupełnić do 10 µl |

3.2.30 Klonowanie do plazmidu pGEM-T easy

Stosowanie plazmidu pGEM-T Easy umożliwia bezpośrednie klonowanie produktów reakcji PCR. Wykorzystywany jest system klonowania TA, który polega na łączeniu reszt adeninowych, znajdujących się na końcach 3' produktów reakcji PCR, z resztami tymidyny, które znajdują się w linearnej formie plazmidu, utworzonej w wyniku trawienia restrykcyjnego.

Procedura obejmuje połączenie w reakcji ligacji oczyszczonego z żelu agarozowego produktu PCR ze 100 ng plazmidu pGEM-T w stosunku molarnym 3:1. Uzyskany w ten sposób wektor oczyszczono, a następnie użyto w procesie transformacji bakterii chemikompetentnych. Wykorzystanie plazmidu pGEM-T pozwala zarówno na selekcję

transformantów na drodze selekcji antybiotykowej, jak i zastosowanie niebiesko-białej selekcji transformantów. Do dalszej analizy wybierano kolonie bakteryjne o białym zabarwieniu, co potwierdza obecność insertu w wektorze. Z wykorzystaniem reakcji PCR na koloniach bakteryjnych sprawdzano czy wklonowany insert jest odpowiedniej wielkości. Pobranymi koloniami bakteryjnymi inokulowano także płynne hodowle, które służyły do namnożenia biomasy bakteryjnej w celu izolacji plazmidów w skali mini. Przygotowano także mrożenia glicerolowe, które używano do przygotowania hodowli bakteryjnych służących do izolacji plazmidów w skali midi.

3.2.31 Zamrażanie i rozmrażanie komórek

W celu przygotowania linii komórkowych do przechowywania w ciekłym azocie pobierano 8 milionów komórek i zawieszano w 1 ml medium, którego 95% objętości stanowiło medium hodowlane, a 5% DMSO, pełniące funkcję krioprotektanta. Tak przygotowaną zawiesinę przenoszono do kriopróbowce o pojemności 2ml i umieszczano w ciekłym azocie.

W celu rozmrożenia komórek postępowano zgodnie z poniższą procedurą:

- a. Probówkę zawierającą 10 ml medium hodowlanego ogrzano do temperaturze 37 °C;
- b. Probówkę zawierającą zamrożone komórki inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37 °C, a następnie dodawano niewielką ilość medium i przenoszono do probówki, w której znajdowała się pozostała część ogrzanego medium hodowlanego;
- c. Całość wirowano przez 5 min przy obrotach 300xg, w temperaturze pokojowej;
- d. Usunięto supernatant, a pozostały osad komórkowy zawieszono w 10 ml świeżego medium i przeniesiono do naczynia hodowlanego.

3.2.32 Hodowla komórek linii 32D oraz NIH3T3

Podczas hodowli linii komórkowych stosowano media i warunki hodowlane odpowiednie dla danego typu komórek. Komórki linii 32D rosną w zawiesinie, natomiast linia NIH 3T3 charakteryzuje się adherencją do podłoża. Hodowle prowadzone były w inkubatorze komórkowym, który zapewniał stałą kontrolę stężenia CO₂. Warunki hodowli komórkowych przedstawia Tabela 21.

Tabela 21. Warunki prowadzenia hodowli wybranych linii komórkowych.

| Linia komórkowa | Medium | Temperatura | Kontrola CO₂ |
|------------------------|-------------------|--------------------|--------------------------------|
| 32D | RPMI + suplementy | 37°C | Tak, 5% |
| NIH 3T3 | RPMI | 37°C | Tak, 5% |

Pasażowanie komórek rozpoczynano od sprawdzenia ich liczebności przy użyciu komory w komorze Bürckera. W przypadku linii komórkowej 32D z naczynia hodowlanego pobierano 10 µl zawiesiny komórkowej, a pozostałą część komórek wirowano przez 5 min przy obrotach 300xg, w temperaturze pokojowej. Supernatant odrzucano, pobierano odpowiednią ilość komórek i zawieszano w 20 ml świeżego medium suplementowanego 2 µl interleukiny 3.

Pasażowanie linii adherentnych wymagało oderwanie komórek od powierzchni naczynia hodowlanego, w tym celu przeprowadzono poniższą procedurę:

- a. Usunięto medium hodowlane, a na komórki naniesiono 10 ml buforu PBS;
- b. Usunięto bufor PBS, a na komórki naniesiono 3 ml buforu trypsyna + EDTA, całość inkubowano w temperaturze 37°C aż do momentu odklejenia się komórek od powierzchni płytki. Proces kontrolowano przez obserwację mikroskopową;
- c. Dodano 7 ml medium hodowlanego, wymieszano i przeniesiono do nowej probówki;
- d. Wirowano 5 min przy prędkości 300xg, w temperaturze pokojowej;
- e. Usunięto supernatant, a odpowiednią ilość komórek zawieszono w 20 ml medium hodowlanego.

3.2.33 Elektroporacja komórek z wykorzystaniem Neon Transfection System

Elektroporację komórek przeprowadzono 4 pulsami przy natężeniu 1350V, w czasie 10 ms.

Wykorzystano Neon Transfection System firmy Invitrogen zgodnie z poniższą procedurą:

- a. NeonTM Tube wypełniono 3 ml buforu E2, a następnie umieszczono w NeonTM Pipette Station;
- b. Do probówek rozpipetowano po 1 µg badanych plazmidów oraz plazmid kontrolny pRL-TK w ilości 50 ng;
- c. Komórki znajdujące się w medium hodowlanym przeniesiono do nowych probówek i zwirowano 5 min przy prędkości 300xg, w temperaturze pokojowej;

- d. Usunięto supernatant, a osad komórkowy zawieszono w 120 μ l Resuspension Buffer R;
- e. Do próbek zawierających rozpipetowane plazmidy dodano komórki zawieszono w Resuspension Buffer R, całość przepipetowano;
- f. Tak przygotowaną zawiesinę umieszczano w NeonTM Tube wypełnionym buforem E2 i przeprowadzono proces elektroporacji.

3.2.34 Analiza względnej aktywności promotora metodą Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (test lucyferazowy)

Test lucyferazowy jest metodą służącą do pomiaru aktywności promotorowej wybranych sekwencji DNA. W technice tej możliwa jest analiza aktywności badanego fragmentu promotorowego z jednoczesną weryfikacją wyników w odniesieniu do wektora kontrolnego. Kotransfekcja wektorem kontrolnym umożliwia niezależenie otrzymanych wyników od warunków transfekcji, kondycji hodowli komórkowej i innych czynników zewnętrznych. W badaniach stosowano wektor pNL1.2, który stanowił próbę badaną, oraz wektor kontrolny pRLTK. W wektorze kontrolnym gen kodujący lucyferazę znajduje się pod kontrolą promotora kinazy tymidynowej. W wektorze pNL1.2 wklonowane fragmenty promotorowe zlokalizowane są przed genem kodującym enzym lucyferazę NanoLuc, co umożliwia oszacowanie aktywności promotorowej badanych sekwencji DNA. Aktywność lucyferazy NanoLuc została znormalizowana względem aktywności lucyferazy pochodzącej z gąbki *Renilla reniformis*. Wykorzystywane enzymy utleniają różne substraty, dzięki czemu możliwe było przeprowadzenie reakcji z jednoczesnym wykorzystaniem obu białek. Podczas eksperymentu komórki zostają poddane przejściowej transfekcji plazmidami reporterowymi, których poziom ekspresji jest zależny od aktywności promotorów. Powstający enzym lucyferaza katalizuje proces bioluminescencji, a emitowane fale świetlne rejestrowane są przez luminometr i stanowią pochodną ekspresji lucyferazy w wektorze.

Podczas badań stosowano zestaw ONE-Glo EX Luciferase Assay System firmy Promega, a pomiaru luminescencji dokonano na luminometrze Turner Designs TD 20/20.

Na potrzebę testu lucyferazowego komórki linii 32D wysiano na 24-dołkową płytkę. W każdym z dołku znajdowało się $2,5 \times 10^5$ komórek zawieszonych w 500 μ l medium.

Po wysianiu komórek wykonywano transfekcję wykorzystując do tego celu DNA plazmidowe. Wektor pNL1.2, zawierający badane fragmenty promotorowe genu *VDR*, stosowano w ilości 1 µg, natomiast wektor kontrolny wektor pRL-TK stosowano w ilości 50 ng.

Eksperyment przeprowadzono zgodnie z poniższą procedurą:

1. Przygotowanie komórek:

- a. komórki poddane elektroporacji przeniesiono z płytki hodowlanej do probówek typu Eppendorf i zwirowano przez 5 min przy prędkości 3000xg w temperaturze pokojowej;
- b. Supernatant usunięto, a peletkę zawieszono w 500 µl buforu PBS;
- c. Zirowano przez 5 min przy prędkości 3000xg w temperaturze pokojowej i usunięto supernatant;
- d. Do każdej próbki dodano 70 µl 5-krotnie rozcieńczonego buforu do lizy i inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej;

2. Pomiar na luminometrze:

- a. Do lizatu komórkowego dodano 80 µl ONE- Glo EX reagent i inkubowano przez 3 min w temperaturze pokojowej;
- b. Dokonano 3 pomiarów na luminometrze w 5-sekundowych odstępach czasu;
- c. Zmieszano odczynnik ONE-Glo™ EX Luciferase Assay Buffer z odczynnikiem ONE-Glo™ EX Luciferase Assay Substrate w stosunku 100:1 i tak przygotowany roztwór rozpipetowano po 80 µl do każdej z probówek. Całość wymieszano i inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej;
- d. Zatrzymanie luminescencji powstającej w wyniku aktywności lucyferazy NanoLuc umożliwiło dokonanie pomiaru luminescencji lucyferazy z Renilii. Dokonano 3 pomiarów na luminometrze w 5-sekundowych odstępach czasu.

3.2.35 Przygotowanie zawiesin komórkowych z mysiej grasicy, śledziony, nerki oraz szpiku kostnego

Wyizolowano grasicę oraz śledzionę, a następnie przetarto narządy przez 30 µm filtr siatkowy. Uzyskaną zawiesinę komórkową zawieszono w 15 ml buforu PBS i zwirowano przez 5 min przy prędkości 300xg, w temperaturze 4°C. Supernatant odrzucono, osad

komórkowy zawieszono w 10 ml buforu ACK, co skutkowało lizą erytrocytów. Zawiesinę zwirowano, osad zawieszono w 15 ml buforu PBS i ponownie zwirowano.

Wyizolowaną nerkę zawieszono w 0,5 ml buforu HBSS i drobno pofragmentowano. Następnie dodano kolagenazę A typu II w stężeniu 1mg/ml oraz DNazę w stężeniu 10U/ml i trawiono enzymatycznie przez 40 min w temperaturze 37°C. Strawioną tkankę przetarto przez 100 µm filtr siatkowy i przemyto 5 ml buforu HBSS, czynność powtórzono dwukrotnie. Uzyskaną zawiesinę komórkową zwirowano przez 5 min przy prędkości 300xg, w temperaturze 4°C. Szpik kostny wyizolowano z kości udowych i piszczelowych za pomocą igły 25 GA. Otrzymaną zawiesinę komórkową przepuszczono przez 30 µm filtr siatkowy, zawieszono w 15 ml buforu PBS i zwirowano przez 5 min przy prędkości 300 g, w temperaturze 4°C. Tak otrzymane komórki były wykorzystywane w kolejnych krokach eksperymentu.

3.2.36. Izolacja tymocytów podwójnie pozytywnych (CD4+ CD8+)

Uzyskaną z grasicy zawiesinę komórkową zawieszono w 500 µl buforu PBS z dodatkiem FBS o stężeniu 2%, po czym dodano po 1 µg mysich przeciwciał anti-CD4-APC oraz anti-CD8-PE. Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano w ciemności przez 30 min w temperaturze 4°C. Następnie przepłukano 1 ml buforu PBS z 2% FBS, zwirowano przez 5 min przy prędkości 300xg, w temperaturze 4°C i zawieszono w 500 µl buforu PBS z 2% FBS. Tak przygotowane komórki sortowano na urządzeniu BD FACS ARIA.

3.2.37. Izolacja limfocytów T i limfocytów B ze śledziony

Uzyskaną ze śledziony zawiesinę komórkową zawieszono w 500 µl buforu PBS z 2% FBS i dodano po 1 µg mysich przeciwciał anti-CD3-APC i anti-CD19-PE, które odpowiednio łączyły się z limfocytami T oraz limfocytami B. Całość inkubowano w ciemności przez 30 min w temperaturze 4°C. Następnie przepłukano 1 ml buforu PBS z 2% FBS, zwirowano przez 5 min przy prędkości 300xg, w temperaturze 4°C i zawieszono w 500 µl buforu PBS z 2% FBS. Tak przygotowane komórki sortowano na urządzeniu BD FACS ARIA.

3.2.38. Izolacja granulocytów ze szpiku kostnego

Uzyskaną ze szpiku kostnego zawiesinę komórkową zawieszono w 500 µl buforu PBS z 2% FBS i dodano 1 µg mysiego przeciwciała anti-CD45-FITC. Całość inkubowano

w ciemności przez 30 min w temperaturze 4°C. Następnie przepłukano 1 ml buforu PBS z 2% FBS, zwirowano przez 5 min przy prędkości 300xg, w temperaturze 4°C i zawieszono w 500 µl buforu PBS z 2% FBS. Tak przygotowane komórki sortowano na urządzeniu BD FACS ARIA.

3.2.39 Separacja magnetyczna hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych ze szpiku kostnego

Uzyskaną ze szpiku kostnego zawiesinę komórkową zawieszono w buforu PBS z 2% FBS z dodatkiem 1 mM EDTA – na 1×10^8 komórek przypadał 1 ml roztworu. Następnie dodano szczurzą surowicę w stężeniu 50 µl/ml roztworu oraz EasySep™ Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Isolation Cocktail w stężeniu 50 µl/ml roztworu. Całość wymieszano i inkubowano przez 15 min w temperaturze 4°C. W kolejnym kroku dodano EasySep™ Streptavidin RapidSpheres™ w stężeniu 75 µl/ml roztworu, po czym całość wymieszano i inkubowano przez 10 min w temperaturze 4°C. Probówkę umieszczono EasySep™ Magnet na 3 min, a następnie przelano roztwór z wyizolowanymi komórkami do nowej probówki. Czynność powtórzono dodając 2,5 ml buforu PBS z 2% FBS z dodatkiem 1mM EDTA do probówki umieszczonej w EasySep™ Magnet.

Czystość izolacji sprawdzano poprzez barwienie części uzyskanych komórek z wykorzystaniem 0,2 µg mysiego przeciwciała anti-c-kit-APC oraz 0,5 µg mysiego przeciwciała anti-Sca-1-FITC.

3.2.40 Sortowanie poszczególnych populacji hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych ze szpiku kostnego z użyciem cytometrii przepływowej

Uzyskane mysie hematopoetyczne komórki macierzyste i progenitorowe barwiono za pomocą przeciwciał:

- a. anti-mouse Sca-1 (Ly6A/E) FITC (0,5 µg/10⁶ komórek)
- b. anti-mouse CD117 (c-kit) APC (0,06 µg/10⁶ komórek)
- c. anti-mouse CD150 Pacific Blue (1 µg/10⁶ komórek)
- d. anti-mouse CD16/32 APC/Cy7 (0,25 µg/10⁶ komórek)
- e. anti-mouse CD34 PE (1 µg/10⁶ komórek)

Komórki zawieszono w 500 μ l buforu PBS z 2% FBS i dodano przeciwciała, całość inkubowano w ciemności przez 30 min w temperaturze 4°C. Następnie przepłukano 1 ml buforu PBS z 2% FBS, zwirowano przez 5 min przy prędkości 300xg, w temperaturze 4°C i zawieszono w 500 μ l buforu PBS z 2% FBS. Z wykorzystaniem urządzenia BD FACS ARIA CELL SORTER wyizolowano poszczególne populacje komórek hematopoetycznych:

- a. HSCs (Hematopoietic stem cells) Lin⁻, Sca1⁺, cKit⁺, CD150⁺;
- b. CLP (Common lymphoid progenitor) Lin⁻, Sca1⁺, cKit⁺ CD127⁺;
- c. CMP (Common myeloid progenitor) Lin⁻, Sca1⁻, cKit⁺, CD16/32^{low}, CD34⁺;
- d. GMP (Granulocyte-macrophage progenitor) Lin⁻, Sca1⁻, cKit⁺, CD16/32^{hi}, CD34⁺;
- e. MEP (Megakaryocyte-erythroid progenitor) Lin⁻, Sca1⁻, cKit⁺, CD16/32^{low}, CD34⁻

3.2.41 Stymulacja komórek 1,25-dihydroksywitaminą D3 i ATRA

W celu zbadania współdziałanie receptora witaminy D z receptorami kwasu retinowego każdą z hodowli dzielono na cztery części i stymulowano lub nie odpowiednimi witaminami:

- a. warunki kontrolne (brak witamin)
- b. stymulacja 1,25-dihydroksywitaminą D3 (1,25D) w stężeniu 10 nM
- c. stymulacja kwasem całkowicie trans-retinowym (ATRA) w stężeniu 1 μ M
- d. stymulacja 1,25D (10 nM) i ATRA (1 μ M)

3.2.42 Stymulacja cytokinami poszczególnych populacji hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych ze szpiku kostnego

W celu zatrzymania procesu różnicowania w wysortowanych populacjach hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych stosowano medium Stemline® Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium oraz rekombinowane mysie cytokiny w odpowiednich stężeniach:

- a. SCF (Stem Cell Factor) 50ng/ml
- b. Flt3-Ligand 50ng/ml,
- c. TPO (Thrombopoietin) 50ng/ml
- d. interleukina-6 10ng/ml

3.2.43 Real-Time PCR (qPCR)

Analizę Real-Time PCR przeprowadzono stosując zestaw PowerUp™ SYBR®Green Master Mix (tabela 23) zgodnie z zaleceniami producenta (tabela 24). Matrycę stanowiło cDNA otrzymane w reakcji odwrotnej transkrypcji. Stosowano urządzenie Bio-Rad MJ Research Opticon 2 wraz z oprogramowaniem Bio-Rad MJ Opticon Monitor. Po zakończonej reakcji sprawdzano czy sygnał fluorescencyjny jest specyficzny dla amplifikowanego genu poprzez analizę krzywych topnienia oraz krzywych amplifikacji. Obliczenia względnej oceny ilościowej dokonano z wykorzystaniem metody relatywnej, opierającej się na wyznaczeniu względnej różnicy poziomu ekspresji pomiędzy próbą badaną a próbą referencyjną. Wartość ekspresji genów badanych *VDR*, *Cyp24a1* i *Cyp26a1* normalizowano względem genu metabolizmu podstawowego *GAPDH*.

Metoda komparatywna pozwala na obliczenie względnej różnicy poziomu ekspresji badanego genu pomiędzy próbkami nieznanymi oraz próbkami referencyjnymi. W pierwszym kroku tej metody wyznacza się wartości cykli progowych (Ct) dla reakcji amplifikacji badanych genów oraz genów kontrolnych zarówno w próbach nieznanymi, jak i referencyjnych. Następnie wylicza się dla poszczególnych prób nieznanymi i kalibracyjnych różnice między wartością Ct uzyskaną dla genu badanego oraz kontrolnego (ΔCt), zgodnie ze wzorami:

$$\Delta Ct (\text{próba nieznana}) = Ct_{\text{genu badanego}} - Ct_{\text{genu referencyjnego}}$$

$$\Delta Ct (\text{kalibrator}) = Ct_{\text{genu badanego}} - Ct_{\text{genu referencyjnego}}$$

W niniejszej pracy genami badani były geny *VDR*, *Cyp24a1* i *Cyp26a1*, a gen referencyjny stanowił gen *GAPDH*. W kolejnym kroku stosowano wzór:

$$\Delta\Delta Ct \text{ próby} = Ct (\text{próba nieznana}) - Ct (\text{kalibrator})$$

W przeprowadzonych eksperymentach funkcję kalibrator pełniła wybrana tkanka referencyjna (np. nerka) lub wynik uzyskany dla eksperymentu przeprowadzonego w warunkach kontrolnych. Znormalizowaną wartość poziomu badanego genu względem kalibratora obliczano stosując następujący wzór:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Otrzymany wynik stanowi wielokrotność próby kalibracyjnej, przy czym gdy wartość parametru R wynosi 1 oznacza to, że poziom ekspresji genu w próbie nieznanej i próbie kalibracyjnej jest identyczny. Wartość parametru R poniżej 1 oznacza wyższy poziom ekspresji genu w próbie kalibracyjnej niż w próbie nieznanej. Program oraz skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiają Tabele 22-23.

Tabela 22. Składniki reakcji Real-time PCR.

| Składnik | Objętość |
|---------------------------------------|-----------------|
| PowerUp™ SYBR®Green Master Mix | 5 µl |
| Forward Primer (500 nM) | 1 µl |
| Reverse Primer (500 nM) | 1 µl |
| Matryca cDNA | 2 µl |
| Woda wolna od nukleaz | 1 µl |

Tabela 23. Warunki prowadzenia reakcji Real-Time PCR.

| Etap | Temperatura | Czas | Ilość cykli |
|-----------------------------|--------------------|-------------|--------------------|
| Aktywacja UGD | 50 °C | 2 min | 1 |
| Aktywacja polimerazy | 95 °C | 2 min | 40 |
| AmpliAq® | | | |
| Denaturacja | 95 °C | 15 s | 40 |
| Elongacja | 60 °C | 1 min | 40 |

3.2.44 Ustalanie punktu startu transkrypcji metodą 5'-RACE PCR

Metoda szybkiej amplifikacji końców 5' cDNA służy do ustalenia punktów startu transkrypcji. W pierwszym etapie całkowite RNA wyizolowane z mysiego jelita cienkiego, nerki oraz szpiku kostnego poddano działaniu alkalicznej fosfatazy (*ang.* calf intestinal phosphatase, CIP). Enzym ten przeprowadza reakcję defosforylacji końca 5' rRNA, tRNA, zdegradowanego mRNA oraz DNA zanieczyszczającego próbkę. Niezdegradowane mRNA jest chronione czapeczką na końcu 5' przed działaniem alkalicznej fosfatazy. Reakcję prowadzono w temperaturze 37 °C przez 1 godzinę. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia Tabela 24.

Tabela 24. Skład reakcji defosforylacji z użyciem alkalicznej fosfatazy.

| Składnik | Ilość |
|---|-------------------------|
| 10X NEB bufor | 2 μ l |
| CIP | 2 μ l |
| inhibitor RNaz, RiboLock RNase Inhibitor | 0,5 μ l |
| Całkowite RNA (10 μg) | x |
| Woda wolna od nukleaz | Uzupełnić do 20 μ l |

Po ustaniu defosforylacji mieszaninę reakcyjną oczyszczono stosując 500 μ l Trizolu zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.5. Uzyskane RNA zawieszono w 10 μ l wody wolnej od nukleaz. W kolejnym kroku użyto kwaśnej pirofosfatazy (*ang.* tobacco acid pyrophosphatase, TAP), która usunęła czapkę 5' z niezdegradowanego mRNA i odsłoniła grupę monofosforanową potrzebną do przeprowadzenia procesu ligacji. Reakcję prowadzono w temperaturze 37 °C przez 1 godzinę. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia Tabela 25.

Tabela 25. Skład reakcji defosforylacji z użyciem kwaśnej pirofosfatazy.

| Składnik | Ilość |
|---|--------------|
| Bufor TAP | 1 μ l |
| TAP | 0,5 μ l |
| inhibitor RNaz, RiboLock RNase Inhibitor | 0,5 μ l |
| RNA | 5 μ l |
| Woda wolna od nukleaz | 3 μ l |

Następny etap reakcji polegał na przyłączeniu oligonukleotydowego adaptera do RNA pozbawionego czapki, z wykorzystaniem enzymu ligazy T4 RNA. Adapter składał się z 45 nukleotydów o sekwencji 5' GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCU GGCUUUGAUGAAA 3' i podczas reakcji został przyłączony do końca 5' mRNA. Reakcję prowadzono w temperaturze 37 °C przez 1 godzinę. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia Tabela 26.

Tabela 26. Skład reakcji ligacji oligonukleotydowego adaptera.

| Składnik | Ilość |
|---|--------------|
| RNA 5'RACE Adapter (0,3 µg/µl) | 1 µl |
| Bufor ligazy T4 RNA | 1 µl |
| inhibitor RNaz, RiboLock RNase Inhibitor | 0,5 µl |
| ATP | 1 µl |
| Ligaza RNA I (10U/µl) | 0,5 µl |
| RNA | 2 µl |
| Woda wolna od nukleaz | 4 µl |

Matrycę w reakcji odwrotnej transkrypcji stanowiły 2 µl mieszaniny reakcyjnej po ligacji adaptera. Stosowane były trzy rodzaje starterów:

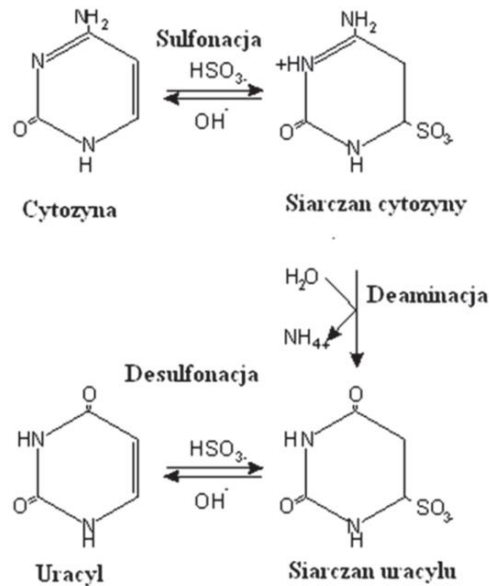
- startery specyficzne do sekwencji genu *VDR* (mVDRex2)
- randomowe heksamery
- oligonukleotydy oligo-dT.

W kolejnym kroku pobrano 2 µl uzyskanego cDNA, które stanowiło matrycę w reakcji zagnieżdżonego PCR (ang. Nested-PCR). W pierwszej reakcji PCR, tzw. zewnętrznej, stosowano startery komplementarne do adaptera (5'RACE Outer) oraz do sekwencji genu *VDR* (mVDRex4RcOut). Następnie przeprowadzono drugą reakcję PCR, tzw. wewnętrzną, w której matrycę stanowiły 2 µl produktu reakcji zewnętrznej. Stosowano startery komplementarne do adaptera (5'RACE Inner) oraz do sekwencji genu *VDR* (mVDRex4-5RcIn). Uzyskany produkt rozdzielono podczas elektroforezy żelowej, następnie wycięto DNA z żelu agarozowego i oczyszczono. Przeprowadzono klonowanie produktu reakcji PCR do plazmidu pGEM-T easy i transformację bakterii. Z odpowiednich kolonii bakteryjnych wyizolowano plazmidy, które sekwencjonowano z zastosowaniem starterów SP6 i T7. Punkt startu transkrypcji określono poprzez analizę sekwencji uzyskanego DNA w miejscu ligacji adaptera z sekwencją badanego genu.

3.2.45 Konwersja DNA wodorosiarczynem sodu

Metoda ta służy do badania metylacji DNA i jest skuteczną techniką umożliwiającą analizę zmian epigenetycznych. Enzym metylaza DNA przeprowadza reakcję, w wyniku której do cytozyny przyłączona zostaje grupa metylowa (-CH₃), wskutek czego powstaje 5-metylocytozyna. Omawiana metoda umożliwia rozróżnienie sekwencji zmetylowanych

od niezmetylowanych. W reakcji tej dokonuje się modyfikacji DNA z wykorzystaniem wodorosiarczynu sodu. W wyniku deaminacji dochodzi do konwersji niezmetylowanej cytozyny do uracylu, natomiast cytozyna zawierająca grupę metylową w pozycji 5' pozostaje niezmieniona. Odpowiednio zaprojektowane startery umożliwiają rozpoznanie zmian związanych z procesem metylacji cytozyny.



Rycina 16. Modyfikacja DNA przy pomocy wodorosiarczynu IV sodu [105]. Opis w tekście powyżej.

Podczas eksperymentu sprawdzano stan metylacji wyspy CpG, znajdującej się w obrębie promotora mysiego genu *VDR*. DNA wyizolowano z limfocytów T i B pochodzących ze śledziony, tymocytów oraz granulocytów wyizolowanych ze szpiku kostnego. Reakcję przeprowadzono według poniższej procedury:

- a. Zmieszano 4 μl 1M roztworu kwasu solnego z 2 μg DNA i inkubowano przez 2 min w temperaturze pokojowej;
- b. Dodano 4,3 μl 3M roztworu NaOH i inkubowano przez 20 min w temperaturze 37 °C;
- c. Dodano 28 μl 10 mM roztworu hydrochinonu oraz 500 μl bisulfitu pH 5 o stężeniu 40,5%, całość zmieszano i inkubowano w ciemności przez 4 godziny w temperaturze 55 °C;
- d. Dodano 80 μl miliQ i 365 μl 96% roztworu etanolu. Całość wymieszano i przeniesiono na kolumnę (Genoplast), a następnie zwirowano przez 2 min przy prędkości 6000xg, w temperaturze pokojowej;

- e. Kolumnę przepłukano 750 μ l buforu WASH i zwirowano przez 1 min przy prędkości 11 000xg, w temperaturze pokojowej;
- f. Dodano 500 μ l świeżego 0,15M NaOH (rozpuszczonego w EtOH) i inkubować 10 min w temperaturze pokojowej;
- g. Zwirowano przez 1 min przy prędkości 11 000xg, w temperaturze pokojowej, po czym przepłukano kolumnę 500 μ l buforu W1 i ponownie zwirowano w powyższych warunkach;
- h. Kolumnę przepłukano 750 μ l buforu WASH i zwirowano przez 1 min przy prędkości 11 000xg, w temperaturze pokojowej;
- i. W celu usunięcia pozostałości buforów ponownie zwirowano przez 2 min przy prędkości 14 000xg, w temperaturze pokojowej;
- j. DNA eluowano 50 μ l buforu TE zagrzanego do temperatury 75 °C.

Otrzymane DNA stanowiło matrycę w reakcji zagnieżdżonego PCR. W pierwszym kroku przeprowadzono reakcję zewnętrzną PCR, z wykorzystaniem starterów BSmVDRF i BSmVDRR2. Matrycę stanowiło 5 μ l DNA po konwersji wodorosiarczynem sodu, w reakcji wykonano 35 cykli amplifikacji produktu. W kolejnym kroku przeprowadzono reakcję wewnętrzną PCR, stosując parę starterów BSmVDRF i BSmVDRR1. Matrycę stanowiło 2,5 μ l produktu reakcji zewnętrznego PCR, ponownie wykonano 35 cykli amplifikacji produktu. Otrzymano produkt rozdzielono w elektroforezie żelowej, następnie wycięto z żelu agarozowego i oczyszczono. Przeprowadzono klonowanie produktu reakcji PCR do plazmidu pGEM-T easy i transformację bakterii. Z odpowiednich kolonii bakteryjnych wyizolowano plazmidy, które sekwencjonowano z zastosowaniem starterów SP6 i T7, po czym przeprowadzono analizę uzyskanej sekwencji DNA.

3.2.46 Immunoprecypitacja chromatyny

Immunoprecypitację chromatyny wykonano z wykorzystaniem zestawu Magna ChIP™ A/G Chromatin Immunoprecipitation Kit firmy Sigma-Aldrich.

Na 24 h przed rozpoczęciem eksperymentu 1×10^6 komórek linii 32D, znajdujących się w medium hodowlanym z dodatkiem inetrleukiny-3, zastymulowano $1\alpha,25$ -dihydroksywitaminą D3 o stężeniu końcowym 10^{-7} M. Próbkę kontrolna stanowiła identyczna ilość komórek, które nie stymulowana.

Postępowano zgodnie z poniższą procedurą:

1. Utrwalenie wiązania białko-DNA i liza komórek:

- a. Do próby badanej i kontrolnej dodano 550 μ l 37 % roztworu formaldehydu, całość wymieszano i inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej;
- b. Dodano 2 ml 10-krotnie rozcieńczonej glicyny, zmieszano i inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej;
- c. Próbkę przeniesiono do probówek typu Falcon, znajdujących się na lodzie. Wirowano przez 5 minut przy prędkości 400xg, w temperaturze 4°C;
- d. Usunięto supernatant, komórki zawieszono w 10 ml schłodzonego buforu PBS, po czym zwirowano przez 5 minut przy prędkości 400xg, w temperaturze 4°C;
- e. Usunięto supernatant, komórki ponownie zawieszono w 10 ml schłodzonego buforu PBS i zwirowano przez 5 minut przy prędkości 400xg, w temperaturze 4°C;
- f. Peletkę zawieszono w 2 ml buforu PBS zawierającego 10 μ l Protease Inhibitor Cocktail II i przeniesiono do probówek typu Eppendorf;
- g. Wirowano przez 5 minut przy prędkości 800xg, w temperaturze 4°C, usunięto supernatant, a peletkę zawieszono w 0,5 ml Lysis Buffer z 2,5 μ l Protease Inhibitor Cocktail II;
- h. Komórki inkubowano przez 15 min w temperaturze 4°C, worteksując mieszaninę co 5 minut;
- i. Wirowano przez 5 minut przy prędkości 800xg, w temperaturze 4°C, usunięto supernatant, a peletkę zawieszono w 0,5 ml Nuclear Lysis Buffer z 2,5 μ l Protease Inhibitor Cocktail II i inkubowano 20 min w temperaturze 4°C.

2. Sonikacja chromatyny:

- a. Przeprowadzono siedem cykli sonikacji trwające 15 s o mocy 60%. Między cyklami stosowano 50-sekundowe przerwy, a komórki trzymano na lodzie.
- b. Po sonikacji próbki wirowano przez 10 min przy prędkości 10 000xg, w temperaturze 4°C;
- c. Pobrano 5 μ l supernatantu celu dokonania analizy elektroforetycznej;
- d. Pozostały supernatant przeniesiono po 50 μ l do probówek typu Eppendorf.

3. Immunoprecypitacja DNA:

- a. Na każdą próbkę przygotowano 450 μ l buforu do rozcieńczenia, zawierającego 2,25 μ l Protease Inhibitor Cocktail II, kulki magnetyczne opłaszczane białkami A/G zworteksowano;
- b. Do 50 μ l lizatu dodano 450 μ l buforu do rozcieńczenia, 20 μ l kulek magnetycznych oraz odpowiednie przeciwciało:
 - kontrola pozytywna - 1 μ l przeciwciała anty-RNA Polimeraza II
 - kontrola negatywna - 1 μ l mysiego przeciwciała IgG
 - próba badana - 25 μ l poliklonalnego przeciwciała anty-VDR

Przed dodaniem przeciwciała z każdej próbki pobrano 5 μ l roztworu, stanowiącego tzw. Input DNA, które przechowywano w temperaturze 4°C.

- c. Próbki zawierające odpowiednie przeciwciała inkubowano przez noc w temperaturze 4°C na mieszadle kołowym.
- d. Wykorzystując magnes przeprowadzono sedymentację magnetycznych kulek opłaszczonych białkami A/G, do których związały się przeciwciała;
- e. Usunięto supernatant, a osad zawieszano kolejno w odpowiednich buforach:
 - 500 μ l Low Salt Wash Buffer
 - 500 μ l High Salt Wash Buffer
 - 500 μ l LiCl Wash Buffer
 - 500 μ l TE Buffer

Po dodaniu odpowiedniego buforu o temperaturze 4° C inkubowano mieszaninę przez 5 minut na mieszadle kołowym, po czym supernatant usuwano z wykorzystaniem magnetycznego separatora, a otrzymaną peletkę zawieszano w kolejnym buforze.

- f. Po serii płukań do próbki dodano 100 μ l buforu ChIP Elution Buffer, zawierającego 1 μ l Proteinazy K i inkubowano z wytrząsaniem przez 2 h w temperaturze 62° C;
- g. Inkubowano przez 10 min w temperaturze 95°C, po czym ostudzono do temperatury pokojowej;
- h. Próbkę sedymentowano wykorzystując magnetyczny separator, a otrzymany supernatant przeniesiono do nowej próbki i oczyszczono na kolumnkach.

3.2.47 Analiza *in silico* obszaru promotorowego genu *VDR*

Wytypowanie sekwencji DNA zawierających potencjalne elementy odpowiedzi na witaminę D wykonano poprzez analizę bioinformatyczną z wykorzystaniem programów Jaspas oraz Lasagna. Do programów wprowadzono sekwencję genu *VDR* w formacie Fasta, po czym wybierając sekwencję konsensusową *VDR* dokonano identyfikacji miejsc rozpoznawanych przez badany receptor. W wyniku przeprowadzonej analizy *in silico* wytypowano trzy potencjalne miejsca VDRE, które mogą być odpowiedzialne za mechanizm autoregulacji *VDR* w mysich komórkach hematopoetycznych. Zlokalizowane są w obrębie promotora genu *VDR* i znajdują się odpowiednich odległościach od miejsca startu transkrypcji: VDRE1 -680 nt, VDRE2 -1560 nt, VDRE3 – 1689 nt.

3.2.48 Statystyczne opracowanie wyników

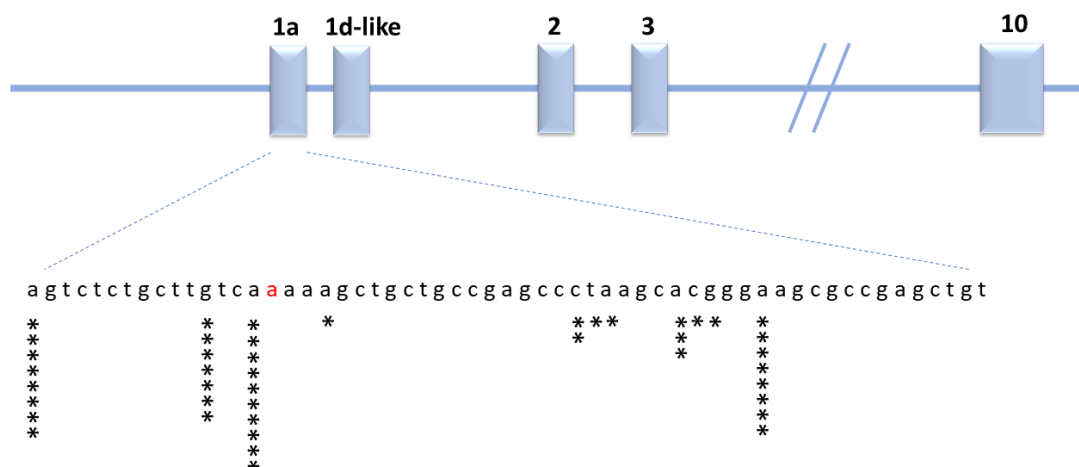
Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono w programie Microsoft Excell, z wykorzystaniem dodatku RealStats. W pierwszym etapie testem Shapiro-Wilka sprawdzono, czy uzyskane dane pochodzą z rozkładu normalnego. W przypadku otrzymania próbek o rozkładzie normalnym stosowano test T do oceny istotności różnic. W pozostałych próbkach stosowano test nieparametryczny ANOVA Kruskala-Wallisa, a następnie test U Manna-Whitneya do szczegółowego porównania dwóch grup danych. Różnice oznaczano jako istotne statystycznie, gdy wartość $p < 0,05$.

4 Wyniki

4.1 Identyfikacja promotorów genu *VDR* w komórkach krwi oraz ustalenie wariantów końca 5' i wyznaczenie punktu startu transkrypcji *VDR* z użyciem techniki 5'-RACE PCR

Dane literaturowe wskazują, iż u myszy miejsce startu translacji genu *VDR* zlokalizowane jest w obrębie trzeciego eksonu [23]. Nie jest jednak określone, gdzie w mysich hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych znajduje się miejsce startu transkrypcji omawianego genu. Badania dotyczące regulacji ekspresji ludzkiego genu *VDR* wskazują, że budowa regionu 5' jest złożona. W jego obrębie znajduje się kilka promotorów, które są alternatywnie wykorzystywane w specyficznej tkankowo regulacji transkrypcji. Może to leżeć u podstaw zróżnicowanej ekspresji genu *VDR* w różnych komórkach [71]. W związku z powyższym, w pierwszym etapie badań ustalono punkty startu transkrypcji genu *VDR* w mysich hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych, wykorzystując do tego celu technikę 5'-RACE. Postępowano zgodnie z protokołem FirstChoice® RLM-RACE Kit zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.44. Reakcję przeprowadzono na RNA wyizolowanym z mysiego szpiku kostnego, nerek oraz jelita cienkiego. Pierwsza z tkanek stanowiła obiekt badań, a otrzymane wyniki miały dostarczyć informacji o punktach startu transkrypcji genu *VDR* w komórkach krwi, zarówno tych prekursorowych, jak i zróżnicowanych. Kolejne dwie tkanki charakteryzują się wysoką ekspresją genu *VDR* i stosowane były jako tkanki referencyjne. Procedura 5'RACE rozpoczynała się od izolacji całkowitego RNA ze szpiku kostnego, nerki i jelita cienkiego oraz jego enzymatycznej modyfikacji (patrz Materiały i metody, procedura 3.2.44). Następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji z zastosowaniem startera specyficznego wobec sekwencji genu *VDR* (mVDRex2), zdegenerowanych oligonukleotydów oraz oligonukleotydów oligo-dT. Produkt reakcji udało się otrzymać tylko z zastosowaniem zdegenerowanych oligonukleotydów i stanowił on matrycę w reakcji zagnieżdżonego PCR. Reakcję zewnętrzną wykonano z zastosowaniem startera komplementarnego do adaptera (5'RACE Outer) oraz do sekwencji genu *VDR* (mVDRex4RcOut). Reakcję wewnętrzną, w której matrycę stanowiły 2 µl produktu reakcji zewnętrznej wykonano z zastosowaniem startera komplementarnego do adaptera (5'RACE

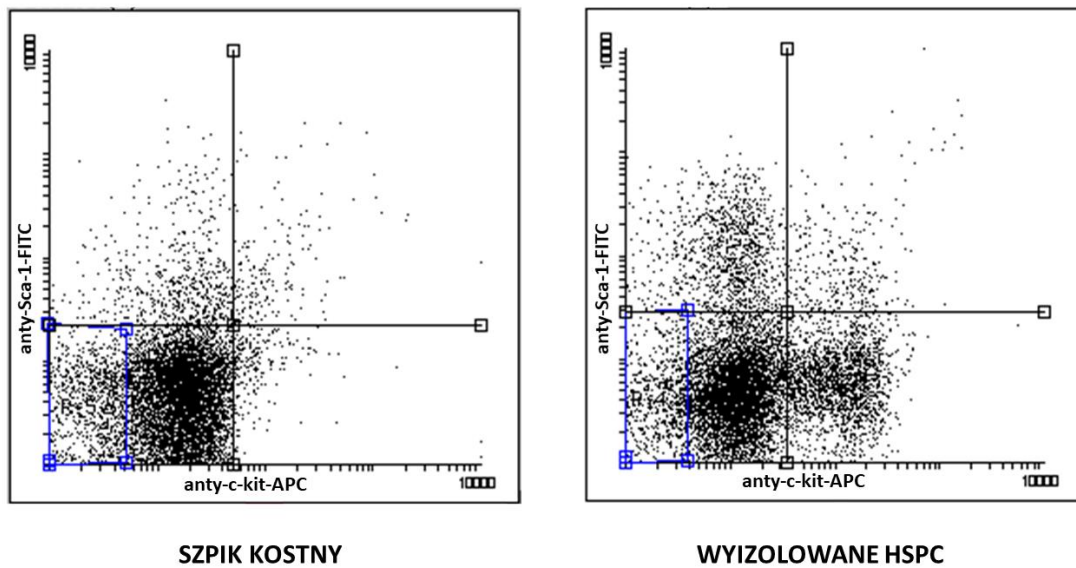
Inner) oraz do sekwencji genu *VDR* (mVDRex4-5RcIn). Otrzymane produkty wklonowano do plazmidu pGEM-T Easy, po czym przeprowadzono transformację bakterii. Uzyskane klony poddano reakcji sekwencjonowania. Uzyskano produkt o długości około 200 pz, fragment ten został porównany z sekwencją genu *VDR* (baza danych GenBank, numer referencyjny NC_000081.7). Analiza otrzymanych sekwencji wykazała, że istnieje kilka miejsc startu transkrypcji mysiego genu *VDR*, zlokalizowanych w pojedynczym regionie obejmującym 45 nukleotydów. Region ten zlokalizowany jest w bezpośrednim sąsiedztwie opisanego wcześniej eksonu homologicznego do ludzkiego eksonu 1a. Najczęstsze punkty startu transkrypcji mysiego genu *VDR* w szpiku kostnym to nukleotydy adenylowe - pierwszy znajduje się bezpośrednio przed pierwszym nukleotydem eksonu 1a, drugi zlokalizowany jest w odległości 15 nukleotydów powyżej omawianego eksonu. Przedstawione punkty startu transkrypcji (Ryc.17) powtarzają się w obrębie wszystkich badanych tkanek, w związku z czym nie znaleziono żadnych silnych preferencji tkankowych dotyczących miejsca startu transkrypcji. W związku z powyższym zidentyfikowany został tylko jeden wariant transkrypcji badanego genu, choć punkt startu transkrypcji nie jest w jego obrębie ściśle zlokalizowany – jest to cecha charakterystyczna dla promotorów pozbawionych sekwencji typu TATA-box [106]. W przeciwieństwie do złożonej regulacji transkrypcji genu *VDR* w ludzkich komórkach, kontrolowanej przez kilka promotorów, transkrypcja genu *VDR* u myszy jest kontrolowana przez pojedynczy region promotorowy.



Rycina 17. Miejsca startu transkrypcji genu *VDR* w wybranych mysich narządach. Schemat genu *VDR* z zaznaczeniem miejsc startu transkrypcji (*). Niebieskie pola reprezentują eksony genu *VDR*. Rozszerzony widok (dolny panel) przedstawia sekwencję genomową otaczającą miejsca rozpoczęcia transkrypcji mysich transkryptów - gwiazdki oznaczają lokalizację miejsc startu transkrypcji zidentyfikowanych podczas reakcji 5'-RACE, liczba gwiazdek - liczbę transkryptów. Na czerwono zaznaczono pierwszy nukleotyd eksonu 1a.

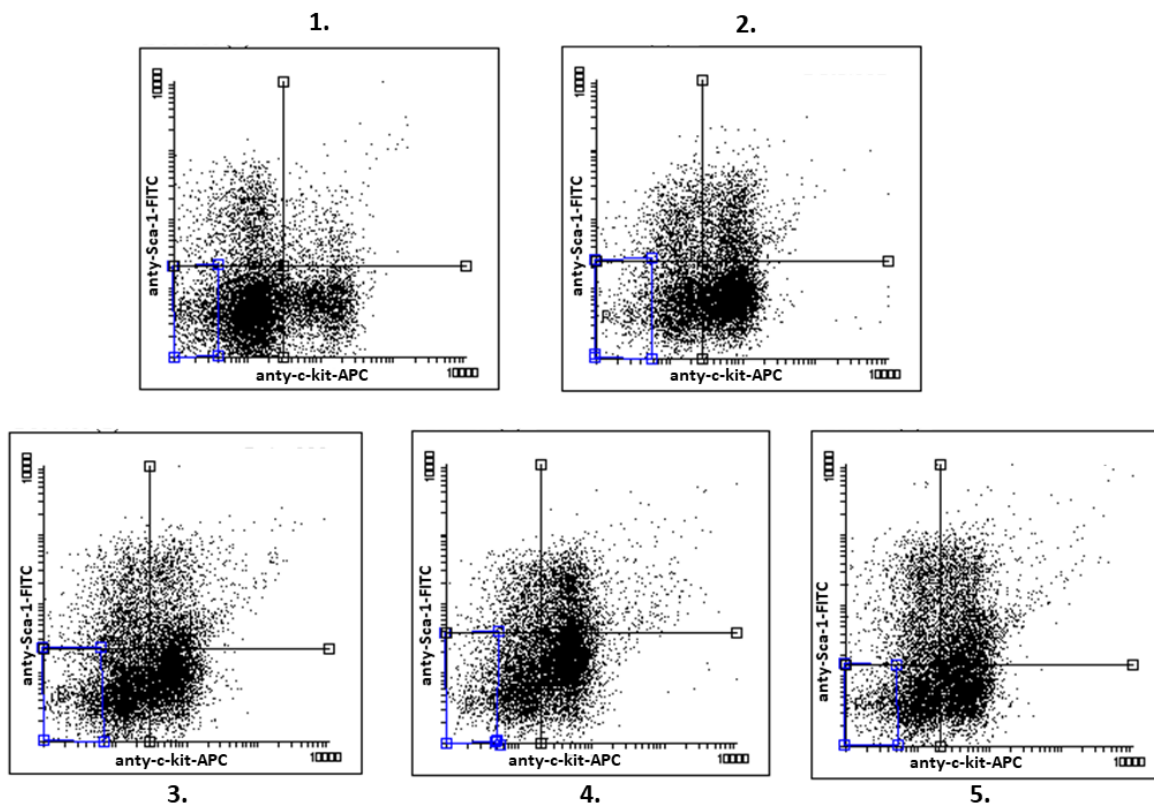
4.2 Opracowanie metody izolacji i namnażania mysich HSPC

Przed rozpoczęciem badań testowano różne metody i komercyjnie dostępne zestawy, które służyły do izolacji mysich HSPC. Wybrana metoda sortowania mysich hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych opiera się na negatywnej selekcji dojrzałych populacji komórkowych. Do izolacji mysich HSPC ze szpiku kostnego stosowano zestaw EasySep™ Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Isolation. Zróznicowane komórki wyznakowano biotynylowanymi przeciwciałami (CD5, CD11b, CD19, CD45R / B220, Ly6G / C (Gr-1), TER119, 7-4), po czym z wykorzystaniem cząsteczek magnetycznych powlekanych streptawidyną i magnetycznego separatora usunięto niepożądane komórki z zawiesiny. Działanie zestawu zostało potwierdzone poprzez wybarwienie przeciwciałami poszczególnych populacji komórkowych szpiku kostnego przed i po izolacji mysich HSPC (Ryc.18). Do analizy liczebności poszczególnych populacji komórkowych wykorzystano metodę cytometrii przepływową.



Rycina 18. Analiza liczebności mysich HSPC przed i po izolacji magnetycznej. Wykresy przedstawiają populacje komórkowe, wyodrębnione na podstawie obecności markerów Sca-1 i c-kit, charakterystycznych dla komórek macierzystych i progenitorowych krwi. Po lewej stronie (komórki niesortowane) widoczna jest jedna populacja komórek, która charakteryzuje się niskim poziomem ekspresji markerów Sca-1 i c-kit. Po prawej stronie (komórki po separacji magnetycznej) widocznych jest kilka populacji komórkowych, wśród których można wyodrębnić populacje o wysokim poziomie ekspresji markerów Sca-1 i c-kit.

W celu namnożenia jak największej liczby mysich hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych przeprowadzono proces optymalizacji czasu hodowli, sprawdzano także różne kombinacje i ilości cytokin dodawanych do medium hodowlanego. Ostatecznie dla hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych stosowano następujące cytokiny w odpowiednich stężeniach: SCF (50 ng/ml), Flt3 (50 ng/ml), TPO (50 ng/ml) oraz Il-6 (10 ng/ml). Wyizolowane komórki stymulowane były przez 4 dni kalcytriolem w stężeniu 10 nm/ml lub ATRA w stężeniu 1 μ m/ml. Analiza wyników (Ryc.19) wskazała, że wybrany zestaw związków pozytywnie wpłynął na utrzymanie puli HSPC w hodowli, o czym świadczy wzrost liczebności populacji komórkowych charakteryzujących się wysoką ekspresją Sca-1 i c-kit w porównaniu do stanu wyjściowego hodowli.



Rycina 19. Analiza 96-godzinnej hodowli mysich HSPC z zastosowaniem cytokin: SCF (50 ng/ml), FLT3 (100 ng/ml), TPO (50 ng/ml) i Il-6 (20 ng/ml), stymulowanych lub nie kalcytriolem (10 nM/ml) lub ATRA (1 μ M/ml).

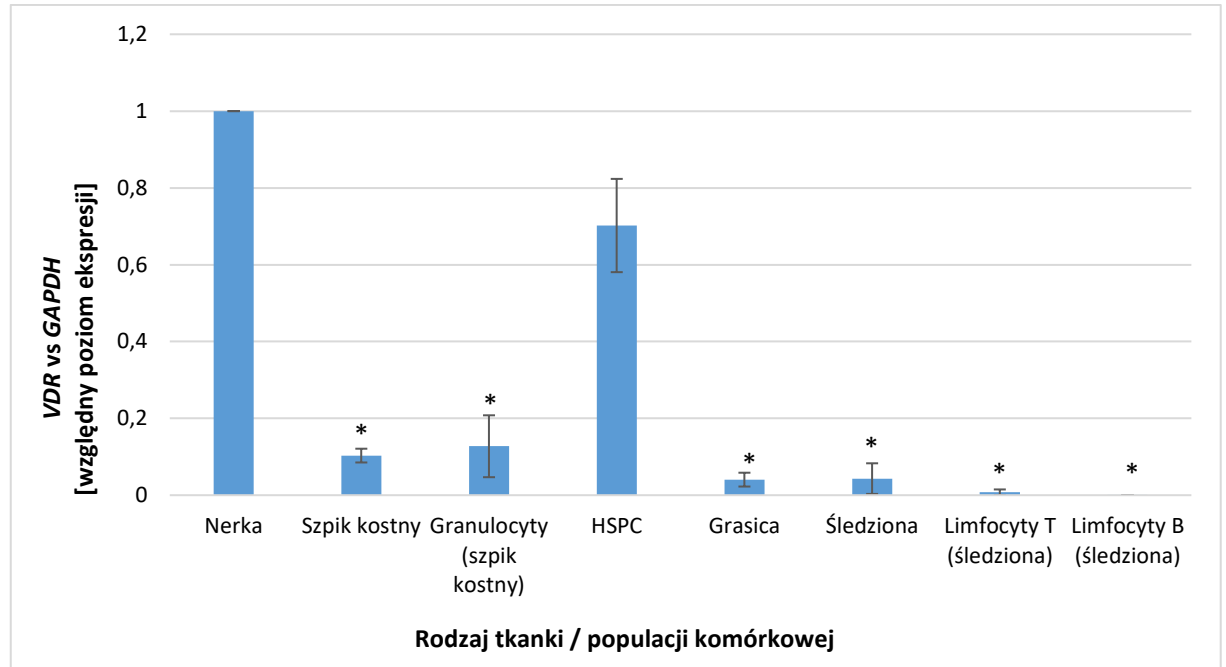
1. – stan wyjściowy hodowli, 2. – hodowla w warunkach kontrolnych, wyłącznie z cytokinami, 3. – hodowla z cytokinami i kalcytriolem, 4. – hodowla z cytokinami i ATRA, 5. – hodowla z cytokinami, kalcytriolem i ATRA.

4.3 Ekspresja genu *VDR* w mysich komórkach

W kolejnym etapie prac przeprowadzono eksperymenty, których celem było sprawdzenie poziomu ekspresji poznanego wariantu transkrypcyjnego genu *VDR* w różnych tkankach. W tym celu z myszy typu dzikiego wyizolowano nerkę, grasicę, śledzionę, szpik kostny oraz dokonano izolacji poszczególnych populacji komórkowych: limfocytów T i B ze śledziony oraz granulocytów ze szpiku kostnego.

Z wybranych tkanek i komórek wyizolowano RNA, przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji, w wyniku której otrzymywano matryce do reakcji Real-Time PCR. Wyniki były normalizowane do poziomu ekspresji genu referencyjnego (*GAPDH*), a następnie do znormalizowanego poziomu ekspresji genu *VDR* w nerce. Otrzymane wyniki wskazały najwyższą ekspresję genu *VDR* w nerce i znacząco niższy poziom ekspresji w pozostałych populacjach komórkowych, za wyjątkiem HSPC (Ryc. 20). Otrzymane wyniki pokazały, że najniższa ekspresja *VDR* zachodzi w dojrzałych limfocytach T i B, natomiast stosunkowo

wyższy poziom ekspresji badanego genu obserwuje się w śledzionie, grasicy i szpiku kostnym. Obserwowana różnica w poziomie ekspresji genu *VDR* w badanych tkankach stanowiła punkt wyjścia do kolejnego etapu prac, którego celem było zbadanie poziomu metylacji promotora genu *VDR*.



Rycina 20. Ekspresja genu *VDR* u myszy typu dzikiego (normalizacja do *GAPDH*). Wyniki przedstawiają średnią wartość wraz z odchyleniem standardowym, $p < 0,05$. Wyniki obrazują dane uzyskane z sześciu eksperymentów. Gwiazdkami (*) oznaczono istotną statystycznie różnicę w poziomie ekspresji genu *VDR* w odniesieniu do wyniku uzyskanego dla nerki. Stosowano test nieparametryczny ANOVA Kruskala-Wallis oraz test U Manna-Whitneya.

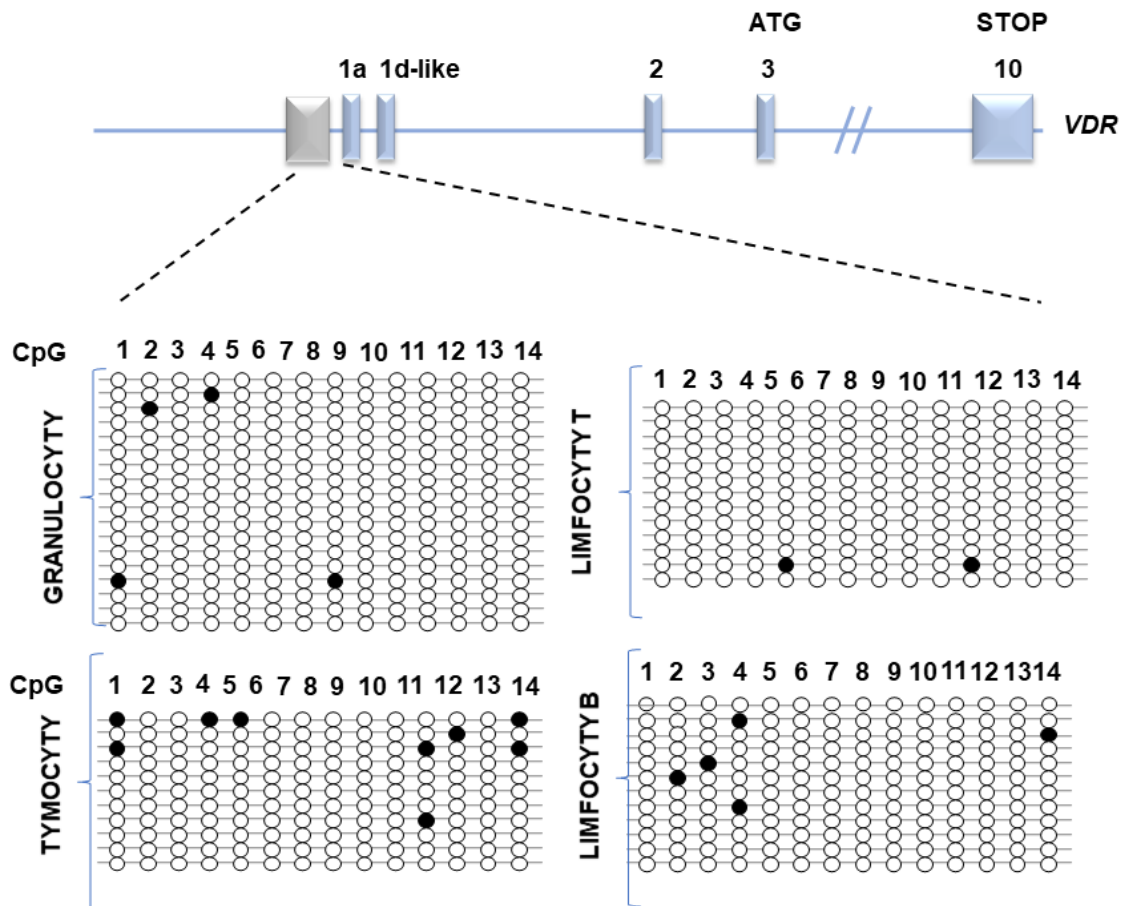
4.4 Stopień metylacji promotorów genu *VDR* w mysich komórkach krwi

4.4.1 Sekwencjonowanie genomowego DNA po jego konwersji pirosiarczynem sodu

Po określeniu miejsca startu transkrypcji i wariantu transkrypcyjnego genu *VDR*, a także po ustaleniu, że za ekspresję genu *VDR* w mysich komórkach krwi jest odpowiedzialny tylko jeden promotor, rozpoczęto badania, które miały na celu sprawdzenie jaki mechanizm jest odpowiedzialny za regulację aktywności badanego promotora. Badania dotyczące profilu ekspresji genu *VDR* w mysich tkankach (patrz Wyniki, punkt 4.2) wskazały różnice w poziomie ekspresji badanego genu pomiędzy różnymi tkankami. Przeprowadzono eksperymenty, których wyniki miały udzielić odpowiedzi, czy za obserwowane różnice w poziomie ekspresji *VDR* w badanych tkankach odpowiada metylacja wysp CpG zidentyfikowanych w obrębie promotora mysiego genu *VDR*. Przesłanką do sprawdzenia,

czy metylacja promotora jest czynnikiem regulującym aktywność genu *VDR* jest fakt, że u ludzi epigenetyczne wyciszenie promotora genu *VDR* zostało zademonstrowane m.in. w ludzkim łożysku, komórkach linii kosmówkowej naczyńówki, guzach piersi oraz w komórkach zakażonych HIV.

W pierwszym kroku, posługując się programem EMBOSS CpGplot, zidentyfikowano wyspę CpG, znajdującą się w regionie -469 do -328 w stosunku do punktu startu transkrypcji genu *VDR*. W obrębie badanej wyspy można wyróżnić 14 dinukleotydów CpG, stanowiących potencjalne miejsce metylacji cytozyny. Badania przeprowadzono na DNA genomowym wyizolowanym ze zróżnicowanych komórek krwi – granulocytów wyizolowanych ze szpiku kostnego, limfocytów T i B wyizolowanych ze śledziony oraz tymocytów (CD4+ CD8+). Stosowano metodę sekwencjonowania genomowego DNA po jego konwersji pirosiarczynem sodu. Wyizolowane DNA poddano konwersji, po czym amplifikowano, a otrzymane amplikony wklonowano do wektora pGEM-T-Easy i przeprowadzono transformację bakterii. Analiza wyników (Ryc.21) otrzymanych w reakcji sekwencjonowania wykazała, że promotor *VDR* we wszystkich badanych typach komórek jest słabo zmetylowany i w związku z tym nie zachodzi korelacja pomiędzy stopniem metylacji promotora i jego aktywnością. W świetle uzyskanych wyników sformułowano wniosek, iż aktywność promotora *VDR* w badanych komórkach nie jest regulowana poprzez mechanizm metylacji DNA.



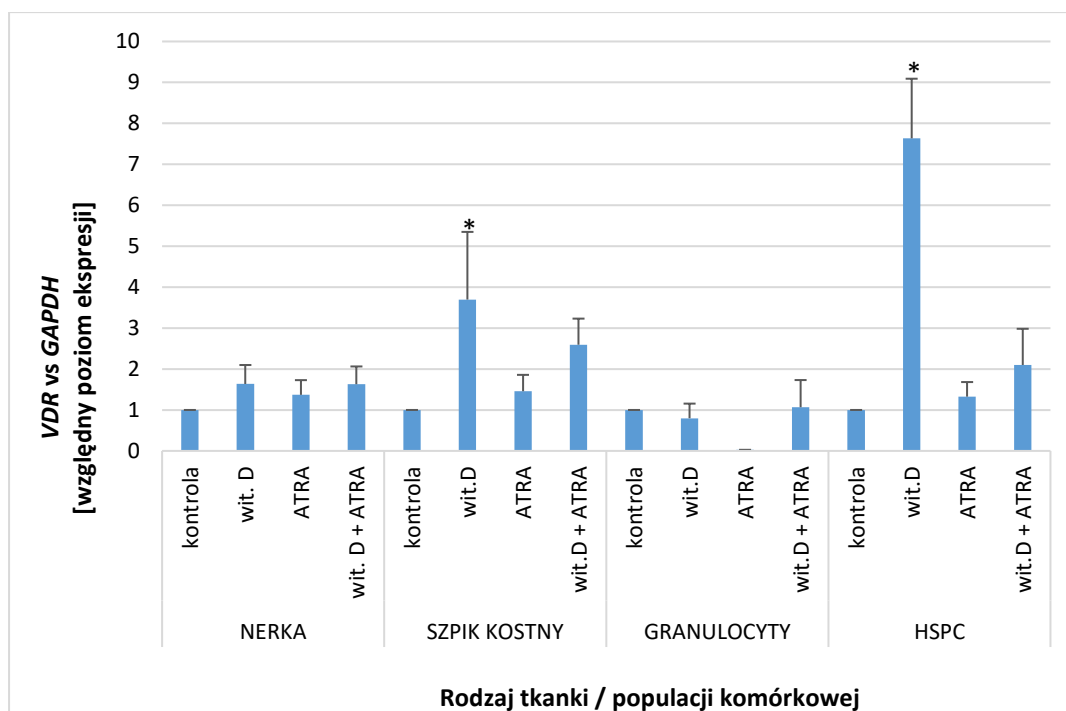
Rycina 21. Organizacja mysiego locus *VDR*. Niebieskie pola reprezentują eksony. Miejsca metylacji DNA w promotorze genu *VDR* w mysich komórkach krwi: granulocytach, limfocytach T, limfocytach B i tymocytach. Czarne i białe kółka oznaczają odpowiednio metylowane i niemetylowane cytozyny.

4.5 Wyznaczenie profilu ekspresji genu *VDR* w mysich komórkach krwi z wykorzystaniem metody Real-Time PCR

4.5.1 Regulacja ekspresji genu *VDR* przez 1,25D i ATRA w mysich komórkach krwi oraz w nerce

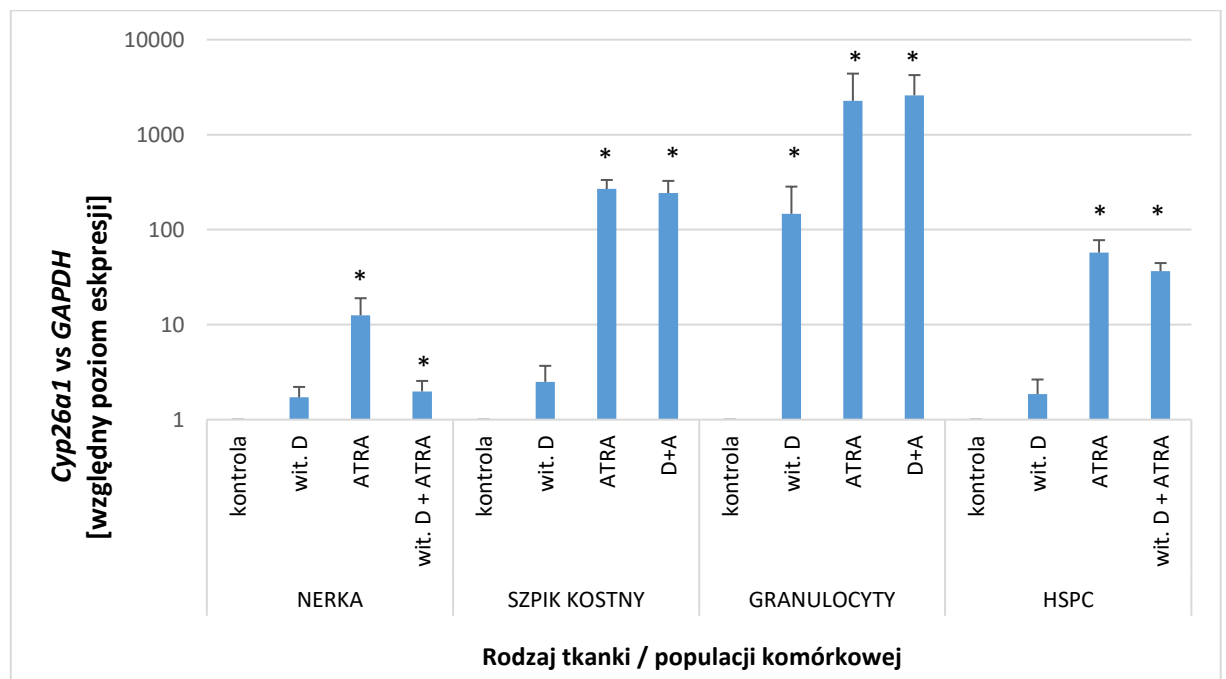
Znając wyjściowy poziom ekspresji genu *VDR* w mysich narządach, postanowiono sprawdzić czy ekspresja ta jest regulowana przez ATRA, tak jak ma to miejsce w ludzkich komórkach, gdzie ATRA reguluje ekspresję genu *VDR* zarówno w górę jak i w dół, w zależności od rodzaju komórek. Przykład ludzkiego genu *VDR* i jego złożonej struktury pokazuje jak trudne jest do ustalenia w jaki sposób jest regulowana ekspresja tego genu i jakie czynniki są w nią zaangażowane [71]. Przeprowadzone badania miały na celu

sprawdzenie hipotezy stanowiącej o tym, iż miejsce startu transkrypcji genu *VDR* może stanowić miejsce krzyżowania się ścieżek sygnalizacyjnych zależnych od $1\alpha,25$ -hydroksywitaminy D_3 i retinoidów, stąd drugim czynnikiem stosowanym do stymulacji komórek był kalcytriol. Badania przeprowadzono na niesortowanych komórkach szpiku kostnego, granulocytach, komórkach HSPC wyizolowanych ze szpiku kostnego oraz na nerce, stosowanej jako narząd referencyjny. Podczas eksperymentu komórki stymulowano *ex vivo* 1,25D lub ATRA przez 96 godzin, po czym badano poziom mRNA *VDR* w stosunku do ekspresji dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*GAPDH*). Otrzymane wyniki (Ryc. 22) wskazują, że ATRA nie reguluje ekspresji genu *VDR* w żadnym rodzaju badanych komórek. W komórkach szpiku kostnego oraz HSPC nastąpił znaczny wzrost ekspresji genu *VDR* w odpowiedzi na stymulację kalcytriolem, przy czym w HSPC obserwowany wzrost był największy. Zarówno w granulocytach, jak i w komórkach wyizolowanych z nerki nie zaobserwowano regulacji ekspresji badanego genu przez żaden ze stosowanych związków.



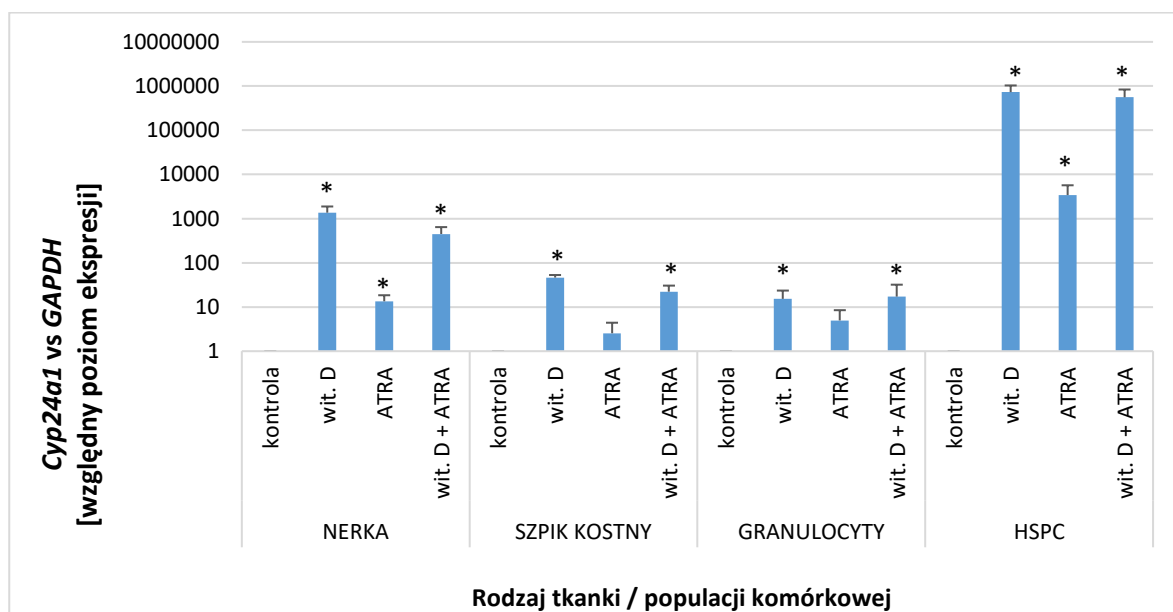
Rycina 22. Ekspresja genu *VDR* w wybranych mysich tkankach stymulowanych kalcytriolem (wit.D) i ATRA (normalizacja do *GAPDH*). Wyniki przedstawiają średnią wartość wraz z błędem standardowym średniej (SEM), $p < 0,05$. Wyniki dla każdej grupy komórek normalizowane były w stosunku do komórek niestymulowanych, stanowiących kontrolę. Gwiazdką (*) zaznaczono istotnie statystycznie wartości, które są znacznie wyższe od wartości uzyskanych dla odpowiedniej kontroli. Stosowano test nieparametryczny ANOVA Kruskala-Wallisa oraz test U Manna-Whitneya. Przedstawiono uśrednione wyniki z sześciu niezależnych eksperymentów.

ATRA stanowi uniwersalny ligand dla wszystkich izoform RAR, dlatego w związku z obserwacją świadcząca o braku regulacji mysich komórek przez ATRA postanowiono sprawdzić, czy RAR jest obecny w badanych komórkach. W tym celu sprawdzono ekspresję genu *CYP26A1*, który jest docelowym genem RAR. Badania przeprowadzono ponownie na niesortowanym szpiku kostnym, granulocytach i HSPC wyizolowanych ze szpiku kostnego oraz na komórkach wyizolowanych z nerki. Podczas eksperymentu komórki stymulowano *ex vivo* 1,25D lub ATRA przez 96 godzin, po czym badano poziom mRNA *Cyp26A1* w stosunku do ekspresji genu *GAPDH*. Ekspresję genu *Cyp26A1* w komórkach stymulowanych normalizowano względem ekspresji w komórkach niestymulowanych. We wszystkich rodzajach komórek, które były stymulowane ATRA, zaobserwowano podwyższoną względną ekspresję genu *CYP26A1* (Ryc.23), najwyższą w komórkach niesortowanego szpiku kostnego i granulocytach. Wyniki te, wraz z opisanymi powyżej, wskazują, że RAR jest obecny i aktywny transkrypcyjnie w badanych komórkach, lecz nie odpowiada za regulację ekspresji genu *VDR*.



Rycina 23. Badanie aktywności transkrypcyjnej RAR. Ekspresja genu *Cyp26a1* w mysich komórkach (normalizacja do *GAPDH*). Wyniki przedstawiają średnią wartość wraz z błędem standardowym średniej (SEM). Wyniki dla każdej grupy komórek normalizowane były w stosunku do komórek niestymulowanych, stanowiących kontrolę. Stosowano test nieparametryczny ANOVA Kruskala-Wallisa oraz test U Manna-Whitneya. Przedstawiono uśrednione wyniki z sześciu niezależnych eksperymentów. Gwiazdką (*) zaznaczono istotne statystycznie wartości, które są znacznie wyższe od wartości uzyskanych dla odpowiedniej kontroli.

Kolejne badania miały na celu sprawdzenie, czy powstające w komórkach mRNA VDR zostaje przekształcone w funkcjonalne białko, stanowiące aktywnie transkrypcyjny receptor witaminy D. Pomiaru aktywności transkrypcyjnej badanego receptora dokonano poprzez sprawdzenie poziomu ekspresji genu *Cyp24A1*, który jest najsilniej regulowanym przez VDR genem. Podobnie jak w poprzednich eksperymentach komórki poddano działaniu 1,25D lub ATRA przez 96 godzin. Ekspresję genu *Cyp24A1* w komórkach stymulowanych normalizowano względem ekspresji w komórkach niestymulowanych. Uzyskane wyniki (Ryc.24) potwierdziły obecność aktywnego transkrypcyjnie VDR w badanych komórkach. Indukowana obecnością 1,25D ekspresja genu *CYP24A1* w komórkach nerki jest bardzo wysoka - niemal tysiąc razy wyższa niż w warunkach kontrolnych. Jeszcze wyższy poziom ekspresji genu *CYP24A1*, indukowany obecnością 1,25D, zaobserwowano w stymulowanych komórkach HSPC, gdzie w porównaniu do warunków kontrolnych poziom ekspresji VDR jest niemal milion razy wyższy. Zaskakujący wynik uzyskano w komórkach nerek i HSPC stymulowanych ATRA – zaobserwowano znaczny wzrost ekspresji *CYP24A1*. Wytlumaczenie mechanizmu molekularnego tego efektu wymaga dalszych badań.

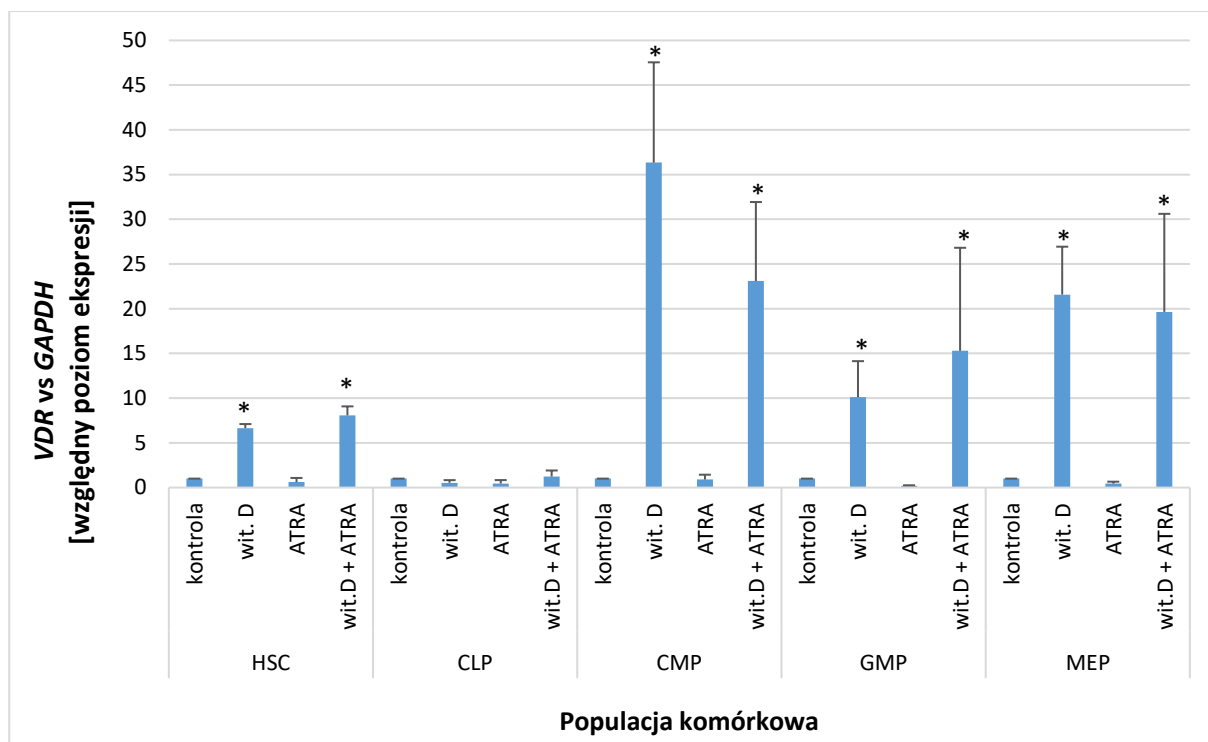


Rycina 24. Badanie aktywności transkrypcyjnej VDR. Ekspresja genu *Cyp24a1* w mysich komórkach (normalizacja do *GAPDH*). Wyniki przedstawiają średnią wartość wraz z błędem standardowym średniej (SEM), $p < 0,05$. Wyniki dla każdej grupy komórek normalizowane były w stosunku do komórek niestymulowanych, stanowiących kontrolę. Gwiazdką (*) zaznaczono istotne statystycznie wartości, które są znacznie wyższe od wartości uzyskanych dla odpowiedniej kontroli. Stosowano test nieparametryczny ANOVA Kruskala-Wallisa oraz test U Manna-Whitneya. Przedstawiono uśrednione wyniki z sześciu niezależnych eksperymentów.

4.5.2 Ekspresja i regulacja genu *VDR* przez 1,25D i ATRA w subpopulacjach mysich hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych

Celem niniejszej pracy jest zbadanie poziomu ekspresji *VDR* i sposobu jego regulacji w czasie hematopoezy, dlatego w kolejnych etapach pracy obiekt badawczy stanowiły hematopoetyczne komórki macierzyste i progenitorowe. Co ważne, wyniki uzyskane we wcześniejszych etapach pracy (patrz Wyniki, punkt 4.5.1) wskazały, że HSPC charakteryzują się najwyższym poziomem ekspresji *VDR* wśród badanych komórek. Ponadto zaobserwowano niespotykany w ludzkich komórkach krwi mechanizm autoregulacji ekspresji genu *VDR* przez 1,25D. W toku eksperymentu z mysiego szpiku kostnego wyizolowano następujące populacje komórkowe (patrz Materiały i metody, procedury 3.2.39 i 3.2.40): hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC), progenitory wspólne dla linii limfoidalnej (CLP), progenitory wspólne dla linii mieloidalnej (CMP), progenitory granulocytów i makrofagów (GMP) oraz progenitory megakariocytów i erytrocytów (MEP). Analogicznie do poprzednich eksperymentów, w pierwszym kroku sprawdzono ekspresję *VDR* w komórkach niestymulowanych, a następnie potencjalne zmiany ekspresji *VDR* w wyniku stymulacji 1,25D lub ATRA. Podczas eksperymentu komórki stymulowano *ex vivo* 1,25D lub ATRA przez 96 godzin, po czym badano poziom mRNA *VDR* w stosunku do ekspresji GAPDH.

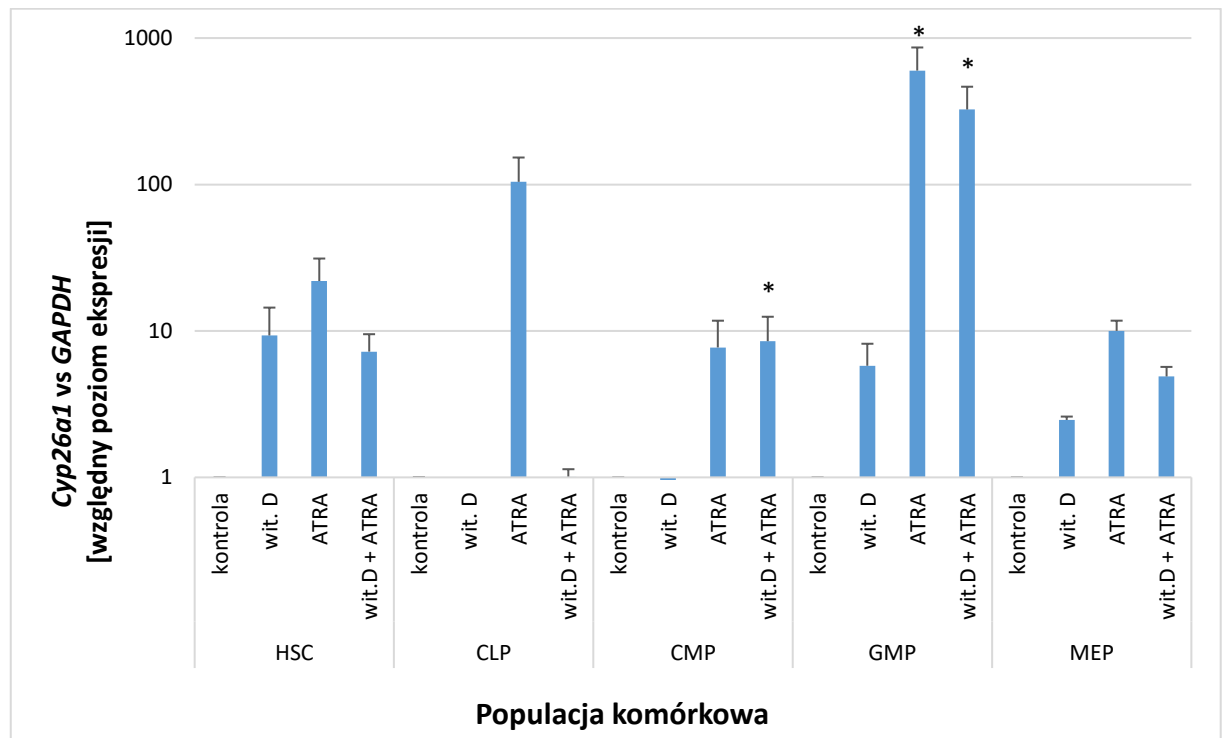
Wyniki (Ryc.25) okazały się podobne do wcześniejszych obserwacji poczynionych na niesortowanym szpiku kostnym, granulocytach, HSPC wyizolowanych ze szpiku kostnego oraz na komórkach wyizolowanych z nerki - ATRA nie reguluje ekspresji *VDR* w żadnej z subpopulacji hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych. W populacjach progenitorów wspólnych dla linii mieloidalnej (CMP), progenitorów megakariocytów i erytrocytów (MEP) oraz progenitorów wspólnych dla granulocytów i makrofagów (GMP) nastąpił znaczny wzrost ekspresji genu *VDR* w odpowiedzi na stymulację kalcytriolem, przy czym największy wzrost zaobserwowano w populacji CMP. Stosunkowo niższą reakcję na stymulację 1,25D zaobserwowano w populacji hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC), natomiast w populacji progenitorów wspólnych dla linii limfoidalnej nie zaobserwowano regulacji ekspresji badanego genu przez żaden ze stosowanych związków.



Rycina 25. Ekspresja genu *VDR* w różnych populacjach hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych (normalizacja do *GAPDH*). Wyniki przedstawiają średnią wartość wraz z błędem standardowym średniej (SEM), $p < 0,05$. Wyniki dla każdej grupy komórek normalizowane były w stosunku do komórek niestymulowanych, stanowiących kontrolę. Gwiazdką (*) zaznaczono istotne statystycznie wartości, które są znacznie wyższe od wartości uzyskanych dla odpowiedniej kontroli. Stosowano test nieparametryczny ANOVA Kruskala-Wallisa oraz test U Manna-Whitneya. Przedstawiono uśrednione wyniki z sześciu niezależnych eksperymentów.

W kolejnym kroku sprawdzono, czy RAR jest obecny w badanych komórkach. W tym celu sprawdzono ekspresję genu *CYP26A1*, docelowego genu RAR (Ryc. 26). Podwyższoną ekspresję genu *CYP26A1* w komórkach stymulowanych ATRA zaobserwowano w populacji HSC (30-krotny wzrost ekspresji genu w porównaniu do warunków kontrolnych), CLP (ponad 150-krotny wzrost ekspresji) oraz populacji GMP (niemalże 800-krotnie wzrost ekspresji). W pozostałych populacjach nie zaobserwowano tak silnego wzrostu ekspresji badanego genu (kilka lub kilkunastokrotnie wyższy poziom ekspresji genu *CYP26A1* po stymulacji ATRA w stosunku do warunków kontrolnych). Wyniki te świadczą o tym, że w badanych komórkach RAR jest obecny i aktywny transkrypcyjnie, lecz poziom jego ekspresji znacząco się różni w poszczególnych populacjach komórek hematopoetycznych. Podobnie jak we wcześniejszych eksperymentach (patrz Wyniki, punkt 4.5.1) należy stwierdzić, iż mimo obecności RAR w badanych komórkach nie bierze on udziału w regulacji ekspresji genu *VDR*. Zaobserwowano także niewielki, aczkolwiek widoczny,

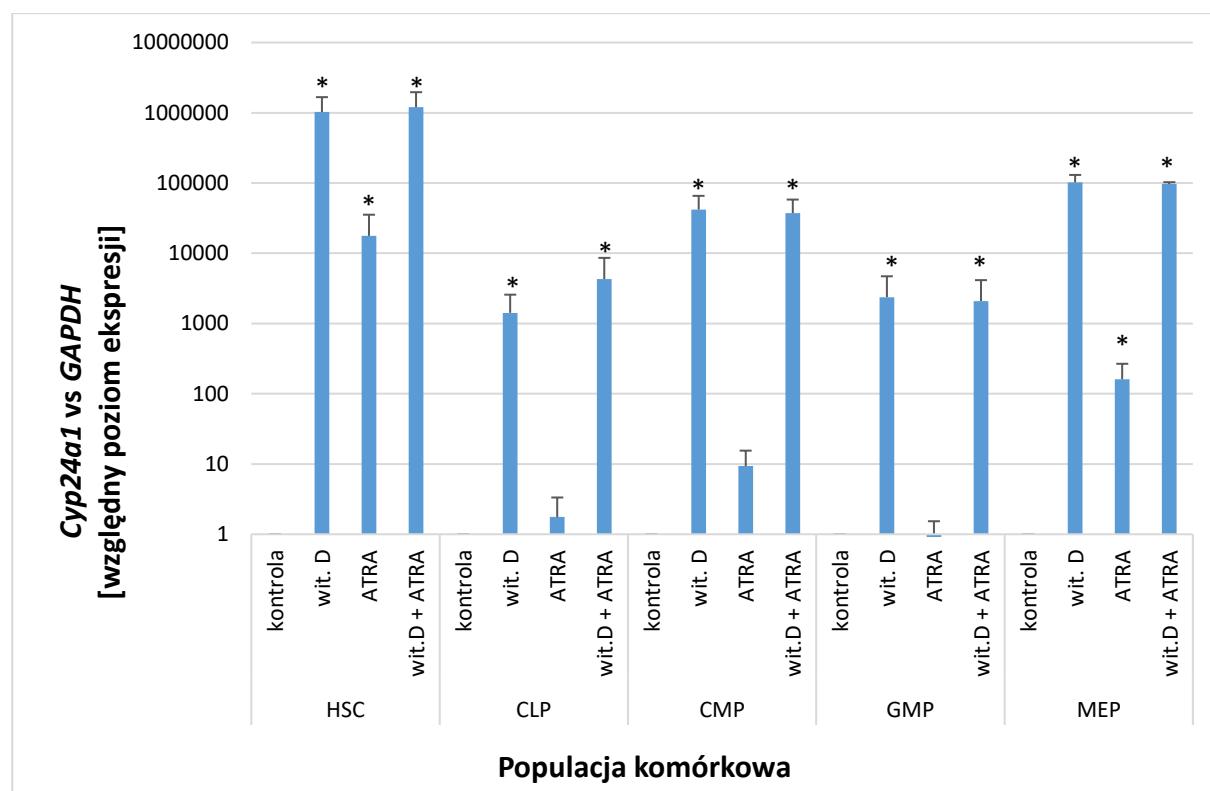
wzrost ekspresji genu *CYP26A1* pod wpływem stymulacji 1,25D w populacjach HSC, GMP i MEP. Wyjaśnienie mechanizmu tego zjawiska wymaga odrębnych badań.



Rycina 26. Ekspresja genu *Cyp26a1* w różnych populacjach hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych (normalizacja do *GAPDH*). Wyniki przedstawiają średnią wartość wraz z błędem standardowym średniej (SEM), $p < 0,05$. Gwiazdką (*) zaznaczono istotne statystycznie wartości. Wyniki dla każdej grupy komórek normalizowane były w stosunku do komórek niestymulowanych, stanowiących kontrolę. Stosowano test nieparametryczny ANOVA Kruskala-Wallisa oraz test U Manna-Whitneya. Przedstawiono uśrednione wyniki z sześciu niezależnych eksperymentów.

Ostatni etap badania miał na celu sprawdzenie czy powstające w hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych mRNA VDR zostaje przekształcone w aktywnie transkrypcyjnie receptor witaminy D. Pomiaru aktywności transkrypcyjnej badanego receptora dokonano poprzez sprawdzenie poziomu ekspresji genu *Cyp24A1*, a badane populacje komórkowe poddano działaniu 1,25D lub ATRA przez 96 godzin. Poziom mRNA badanego genu obliczano w stosunku do ekspresji genu *GAPDH*, a ekspresję genu *Cyp24A1* w komórkach stymulowanych normalizowano względem ekspresji w komórkach niestymulowanych. Uzyskane wyniki (Ryc. 27) potwierdziły obecność aktywnego transkrypcyjnie VDR w badanych populacjach komórkowych. Indukowana obecnością 1,25D ekspresja genu *CYP24A1* jest najwyższa w populacjach MEP i HSC, gdzie

w stosunku do warunków kontrolnych wzrosła ponad milion razy. Wśród komórek stymulowanych 1,25D wysoki wzrost ekspresji badanego genu obserwujemy także w populacjach CMP, najniższy w populacjach GMP i CLP. W populacjach HSC i MEP zaobserwowano wzrost ekspresji badanego genu pod wpływem stymulacji ATRA, jednak jest znacząco niższy w porównaniu do wzrostu indukowanego obecnością kalcytriolu.



Rycina 27. Ekspresja genu *Cyp24a1* w różnych populacjach hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych (normalizacja do *GAPDH*). Wyniki przedstawiają średnią wartość wraz z błędem standardowym średniej (SEM), $p < 0,05$. Wyniki dla każdej grupy komórek normalizowane były w stosunku do komórek niestymulowanych, stanowiących kontrolę. Gwiazdką (*) zaznaczono istotne statystycznie wartości, które są znacznie wyższe od wartości uzyskanych dla odpowiedniej kontroli. Stosowano test nieparametryczny ANOVA Kruskala-Wallisa oraz test U Manna-Whitneya. Przedstawiono uśrednione wyniki z sześciu niezależnych eksperymentów.

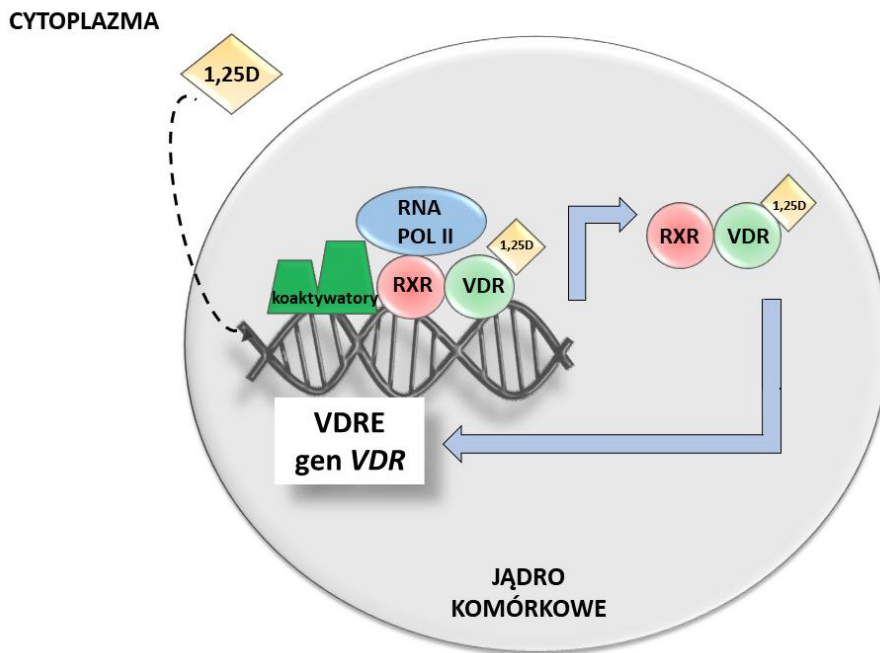
Uzyskane wyniki świadczą o tym, że w hematopoetycznych komórkach macierzystych VDR jest obecny i aktywny transkrypcyjnie. Badając ekspresję genu *VDR* pod wpływem stymulacji 1,25D i ATRA zaobserwowano mechanizm autoregulacji VDR oraz wykluczono współdziałanie transkrypcyjne VDR i RAR w regulacji ekspresji genu *VDR*. Potwierdzono także hipotezę, która zakłada, że gen *VDR* ulega ekspresji i jest aktywny nie tylko w całkowicie zróżnicowanych komórkach krwi, lecz także podczas hematopozy.

Kolejne eksperymenty miały na celu zbadanie autoregulacji VDR, która została zaobserwowana w komórkach hematopoetycznych.

4.5.3 Autoregulacja receptora witaminy D w mysiej linii komórkowej 32D

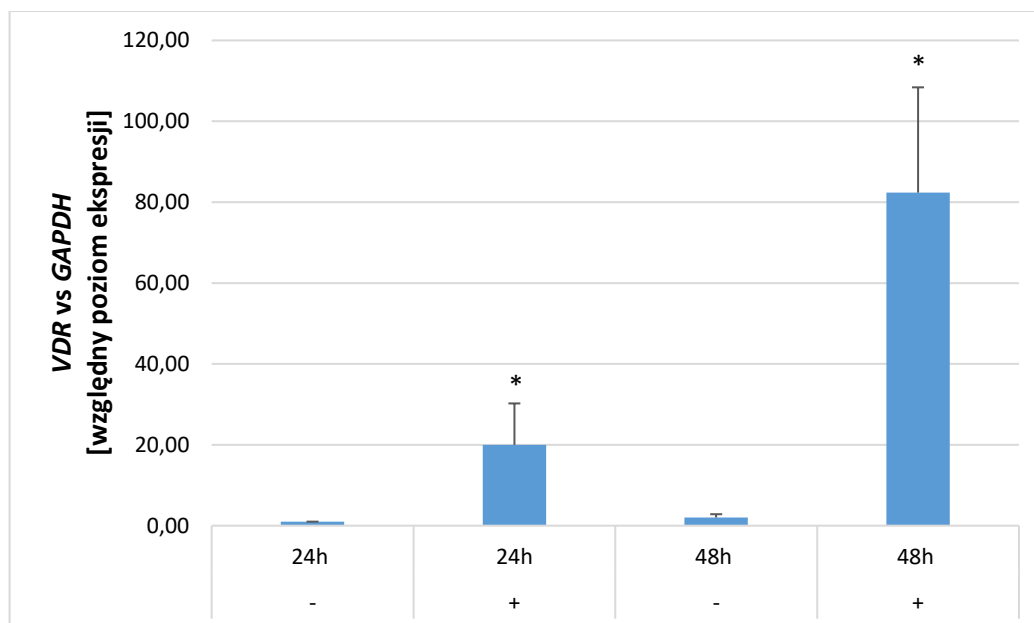
4.5.3.1 Wykazanie autoregulacji receptora witaminy D w mysich komórkach mieloidalnych

Najciekawszym wynikiem z poprzednich etapów badań jest dotychczas nieopisana w komórkach hematopoetycznych autoregulacja VDR (Ryc.28), dlatego podjęto prace, które miały na celu zbadanie mechanizmu tego zjawiska. Wcześniejsze eksperymenty prowadzono *ex vivo*, stosując hodowlę pierwotną komórek, jednak niska liczebność HSPC stanowiła czynnik ograniczający w przypadku technik stosowanych na dalszych etapach badań. Testy reporterowe wymagają dużej ilości dobrze transfekujących się komórek, dlatego zmieniono stosowane wcześniej podejście i dalsze badania prowadzono z wykorzystaniem linii komórkowej. Wyniki uzyskane w poprzednich etapach badań wskazały znaczny wzrost ekspresji genu *VDR* na skutek stymulacji kalcytriolem w populacjach CMP, MEP i GMP, przy czym najsilniej zjawisko autoregulacji VDR było widoczne w populacji progenitorów wspólnych dla linii mieloidalnej. Biorąc pod uwagę powyższe informacje na podstawie danych literaturowych do dalszym badań wytypowano mysia mieloidalną linię komórkową 32D, która jest szeroko stosowana jako model procesów proliferacji i różnicowania komórek hematopoetycznych w badaniach *in vitro* [107]. Pierwotnie linię tę uzyskano wskutek zakażenia komórek szpiku kostnego myszy wirusem onkogennym. Linia ta charakteryzuje się zdolnością do proliferacji w obecności IL-3 oraz zdolnością do różnicowania w kierunku neutrofilii w obecności G-CSF. Linię komórkową 32D z powodzeniem stosowano w badaniach dotyczących mielopoetyzy i różnicowania neutrofilii, a wyniki uzyskane przez wiele grup badawczych korelowały z danymi, które uzyskano w przypadku stosowania hodowli pierwotnych oraz myszy transgenicznym [108]. Zastosowanie linii komórkowej umożliwiło otrzymanie wystarczającej ilości komórek do przeprowadzania eksperymentów. Aby przystąpić do badań mających na celu identyfikację w obrębie *locus VDR* elementów regulatorowych, w pierwszym kroku sprawdzono czy w wybranej linii komórkowej występuje zjawisko autoregulacji VDR.

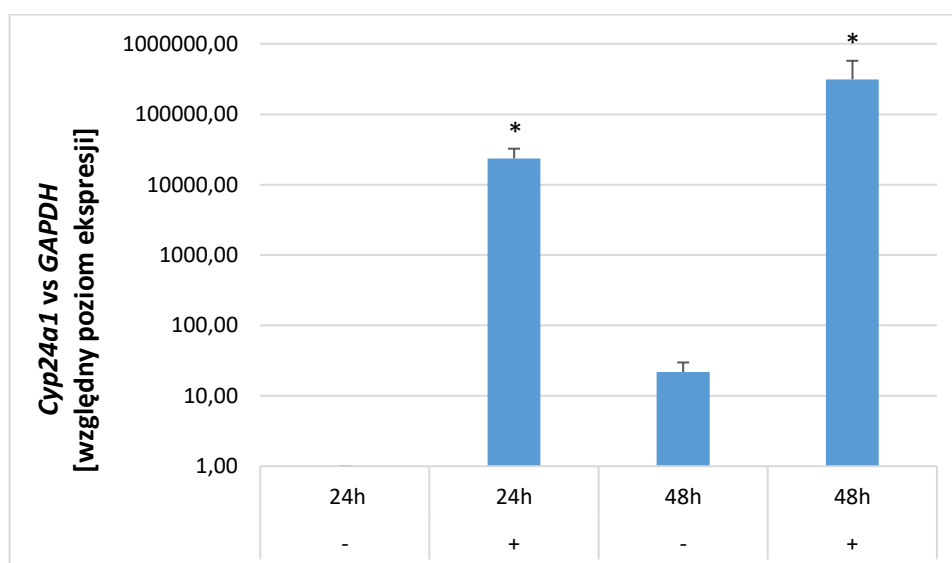


Rycina 28. Schemat hipotetycznego mechanizmu autoregulacji receptora witaminy D. Opracowanie własne na podstawie [65].

W pierwszym etapie badań komórki linii 32D stymulowano lub nie $1\alpha,25$ -hydroksywitaminą D_3 przez 24 godziny oraz 48 godzin. Po tym czasie wyizolowano RNA z hodowli, przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji, a uzyskane cDNA stanowiło matrycę w reakcji Real-Time PCR. Wyniki uzyskane dla genów *VDR* (Ryc.29) i *Cyp24a1* (Ryc.30) normalizowano względem wyników otrzymanych dla genu *GAPDH*. Przeprowadzono trzy niezależne eksperymenty, a otrzymane wyniki przedstawiono poniżej.



Rycina 29. Wykres ekspresji genu *VDR* w linii 32D. Komórki były stymulowane (+) bądź nie (-) kalcytriolem przez 24h lub 48h. Ekspresję genu *VDR* normalizowano w stosunku do ekspresji genu *GAPDH*. Przedstawiono uśrednione wyniki z trzech niezależnych eksperymentów. Wyniki przedstawiają średnią wartość wraz z błędem standardowym średniej (SEM), $p < 0,05$. Gwiazdką (*) zaznaczono istotne statystycznie wartości, które są znacznie wyższe od wartości uzyskanych dla odpowiedniej kontroli.



Rycina 30. Wykres ekspresji genu *Cyp24a1* w linii 32D. Komórki były stymulowane (+) bądź nie (-) kalcytriolem przez 24 lub 48h. Ekspresję genu *VDR* normalizowano w stosunku do ekspresji genu *GAPDH*. Przedstawiono uśrednione wyniki z trzech niezależnych eksperymentów. Wyniki przedstawiają średnią wartość wraz z błędem standardowym średniej (SEM), $p < 0,05$. Gwiazdką (*) zaznaczono istotne statystycznie wartości, które są znacznie wyższe od wartości uzyskanych dla odpowiedniej kontroli.

Uzyskane wyniki potwierdziły zjawisko autoregulacji VDR w linii komórkowej 32D. W komórkach stymulowanych kalcytriolem przez 24 godziny ekspresja genu *VDR* wzrasta 20-krotnie (Ryc.29), natomiast po 48 godzinach wzrasta ponad 80-krotnie. Obserwowana jest także wysoka indukcja ekspresji genu *Cyp24a1* (Ryc.30), świadcząca o obecności aktywnego transkrypcyjnie białka VDR. Po 24-godzinnej stymulacji kalcytriolem ekspresja genu *Cyp24a1* wzrasta 20 000-krotnie, a po 48-godzinnej stymulacji 300 000-krotnie.

4.6 Próba identyfikacji elementów regulatorowych wiążących receptor VDR w obrębie *locus VDR* z wykorzystaniem lucyferazowych testów reporterowych oraz immunoprecypitacji chromatyny

4.6.1 Analiza *in silico* obszaru promotorowego genu *VDR* w celu identyfikacji potencjalnych elementów odpowiedzi na witaminę D

Kolejny etap badań rozpoczęto od wytypowania potencjalnych elementów odpowiedzi na witaminę D odpowiedzialnych za mechanizm autoregulacji receptora witaminy D w mysich komórkach mieloidalnych. W tym celu przeprowadzono analizę bioinformatyczną z wykorzystaniem programów Jaspar oraz Lasagna. Wytypowano trzy potencjalne miejsca wiązania receptora witaminy D, znajdujące się w obrębie promotora genu *VDR*. Sekwencje te zlokalizowane są w następujących odległościach od startu transkrypcji: VDRE1 -680 nukleotydów, VDRE2 -1560 nukleotydów, a VDRE3 -1689 nukleotydów (Ryc.31).

| | | | | | | | | | | |
|------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|
| 1001 | TGAGGGTGT | GGATCCCCG | GAACAAGAGT | TACAGACAGT | TGTGAGCTGC | CAGGTAGGTA | TGGGAATTG | AACCCCTGGTC | CTCTGGAAGA | GCAGACAGTG |
| | ACTCCCAAA | CCTAGGGGAC | CTTGTCTCA | ATGTCTGTCA | ACACTCGACG | GTCATCCAT | AACCCCTAAC | TGGGACCAG | GAGACCTTCT | CGTCTGTAC |
| 1101 | CTTTTAATG | CCAAAGTATC | TCTTTGCCCC | TCTCCTCACA | TGGTTGGTIT | TCTTAGACTG | TGATCCAATA | GGTGAAAAT | ACTTGGGATT | TTTTTTTTTT |
| | GAAAATTACC | GGTTCGATAG | AGAAACGGGG | AGAGGAGTGT | ACCAACCAAA | AGATCTGCAC | ACTAGGTTAT | CCACTTTTAA | TGAAACCTTA | AAAAAAAAAA |
| 1201 | TGAGAGGCAG | TGTGAARTGA | TGAGGTCAG | TCATTAAGAA | GACGGGTTTC | AAGTGGTTCT | GTCATTGCCC | ACCTGCARAA | ATGCCAAGT | TTAAGATGGG |
| | ACTCCTCGTC | ACACTTTACT | ACCTCCAGTC | AGTATTTCTT | CTGCCCCAAG | TTACCAAGA | CAGTAACGGG | TGACGTTTTT | TACGTTTCAA | AAITCTACCC |
| 1301 | GGGGGGGGA | GTTTTGCTG | CTCTGTCTTG | AAAGATTGAC | ATGAAGGTTG | AATAAAACAT | CCAGAGAACA | TGCTACCCCTA | TGTGAACCTC | CAGCTCACGG |
| | CCCCCGCCT | CAAAAACAC | GAGACAGAAC | TTCTAACTG | TACTTCCAAC | TTATTTTGA | GGTCTCTTGT | ACGATGGGAT | ACACTTGAAG | GTCGAGTGCC |
| 1401 | CTGTGAAAA | GATTCCCAGT | AAGGTCAGTA | TGGCTTATGT | AGGTGCACAT | CTTCCATCGC | CTCCTGCAGA | GGCTCACGGG | GGGGGGGGT | GGGGGGGTTG |
| | GACACTTTTT | CTAAGGGTCA | TTCCAGTCAT | ACCBAATACA | TCCACGTGTA | GAAGGTAGCG | GAGGACGTCT | CCGAGTGCCC | CCCCCCCCAA | CCCCCCCCAC |
| 1501 | GGGGGGTGG | GGGTGGGGG | GGGGATTTC | AAATGCCCTA | AGGTGTGGC | TGTTGAGACT | CCCTCCTGTG | CTTTTCTTCT | TGAGAGAGTC | AGCTTTCCCC |
| | CCCCCAACC | CCCACCCCC | CCCTAAAGT | TTTACGGGAT | TCCACACCGG | ACAACCTCTG | GGGAGGACAC | GAAAAGAAGA | ACTCTCTCAG | TCCGAAAGGG |
| 1601 | TGATGTTCTA | GAAAGTATT | CTTTCAATTA | GAATTAATGA | CAATTTAGAT | AAACACAGC | CTGGAGGGC | TCCCAAAAG | ACTCTCTCAG | AGCTTTCCAT |
| | ACTACAGAT | CTTCACTAA | GAAAGTAAAT | CTTATTTACT | AAAAGAAAA | GTAATCTTA | TTTGTGGTGC | GACCTCCCG | AGGTTTTTCC | GGAGAGGTA |
| 1701 | TCATTCAITG | AGTTTAAACA | CCATGTGTCA | CATGTTTTCT | GAAAAGTTG | AAGCCTTCCC | AGAATGTTTC | CACTACCGTC | TCTTAAAGG | CTCCTCACAG |
| | AGTAAAGTAA | TCAAATTTGT | GATACACAGT | GTAACAAAGA | CTTTTCCAAC | TTCCGAAGGG | TCTTACAAAG | TGATGAGGAC | AGAAATTTCT | GAGGATGTCT |
| 1801 | CTTCCCCTCA | GACCCCACTG | TCTGAAAGCT | CTTTCTTCTA | TTTAGCCTCC | GTTGGTTTTCT | TGGGACAGT | CAGCAAGAGC | TGAAAGGGGC | AGTATTTCTT |
| | GAAAGGGAGT | CTGGGTTGAC | AGACCTTCCA | GAAAGAGAT | AAATTCGGAG | CAACCAAGA | ACCCCTGTCA | GTCGTTCTCG | ACCTTCCCGG | TCATAAAGAA |
| 1901 | CCACTCTAAC | ACCTCTGTGT | GAGAAATGAG | AAATCACTA | ACCGCCAGGC | TGGGCTCTCA | TCCTCCACTG | GTCCACGGCT | TGGTCTGTGC | AAATCACTGG |
| | GGTGAGATT | TGGAGACACA | CCTCTTACTC | TTCCAGTGTG | TGGGGTCCG | ACCCGAGAGT | AGGAGGTGAC | CAGGTGCCGA | ACCAGACACG | TTTAGTGACC |
| 2001 | GTCTCCACC | TCCCTGTCCC | CACGTAGCCT | CCTAAACATT | ATCTTTTCTT | ACTACAGGAG | GTCCACCACT | CTCCAGTGC | ATTGGGGGTA | TCTGTATCTT |
| | CAAGAGTGG | AGGGACAGGG | GTACTCCGA | GGATTTGTAA | TAGAAGGAT | TGATGCTCTC | CAGTGTGTGA | CAGGTCACTG | TAACCCCAT | AGACATAGA |
| 2101 | AGAACCCCT | TATGTTTAT | TATGCATACA | TCTCTACTC | AAAAAGGGA | CCCTATAGA | CTGCGGAGCA | CGGAGCGTGT | GAGTAGAGTA | ATCTTTATCC |
| | TCTTGTGGA | ATACAATAA | ATAAGTATGT | AGAGGATGAG | TTTTTCCCT | GGGATATCT | GACGCTCGT | GCTCTCCACA | CTCATCTCAT | TAGAAATAGG |
| 2201 | AAATTTTCT | ACAATGAGT | CTCAGGAGCC | ATGCACAGT | CCAGGCTTGG | AGTGAACCTT | TGTGCTTTTC | CTTCAACCA | GGGTCTGGT | GGCAGGGAT |
| | TTTAAAGA | TGTTACTCA | GAGTCTCCG | TACGTGTCAA | GGTCCAGAAC | TCCACTTGA | ACACGGAAAG | GAGTGTGTGT | CCAGAGCCA | CCGTTCCCTA |
| 2301 | GATCTGGGAG | GCAGAGACCT | CAGAAGCTAC | AGCAAGGCTT | GCTGGAAATG | GATGCAATTA | GCCAGGAACA | TGCTCCGTGC | CTGAGATTAG | CAGAAGAAGC |
| | CTAGACCCCT | CGTCTCTGGA | GTCTTCGATG | TCGTTCCGAA | GCACCTTACT | CTACGTTAAT | CGGTCTTGT | ACGAGGCAGC | CACATCAATC | GTCTCTTGTG |
| 2401 | TCAGTAGGAG | GAGAGGAGC | AACTCCAACC | TCCAATCTGG | TTTTCTTGGG | CTAATCCTAA | CCAGTAGAGT | CCGGCTGAGC | GCCTGCGAGG | AGAAACTCAC |
| | AGTCCATCCT | CTCTCCTGCG | TTGAGGTTGG | AGGTTAGACC | AAAAGAACCC | GATTAGGATT | GSTCATCTCA | GGCCGACTCG | CGGGACGTCC | TCITTTGAGT |
| 2501 | CTGAGGTTC | CCATCCGGCG | CGCGCAGAGA | ACGGCTCCCT | GCAGCCGCGC | CGGGCGTGC | GGGTCCCGGG | TCAACTCAGG | TACGGGTGAC | ACACCTGGGG |
| | GACTCCAAAG | GSTAGGCCGC | CGCGGCTCT | TGCCAGGGA | CGTCCGCGGG | CGCCCGCAGC | CCCAGGGCCC | AGTTGAGTCC | ATGCCCACTG | TGTGGACCCC |
| 2601 | GAGGGGTTA | CAGCAGATTG | GGTAGAACCA | CGGCGGCAGG | GGTGGGTGTT | GGCTACATCA | CGGATCATCA | CAGGCAGAAA | CGTGGATTTG | CACACACGAC |
| | CTCCGCAAA | GTGCTCTAAC | CCATCTTGGT | CGCCGCTCC | CCACCCACCA | CCGATGTAGT | GCCTAGTAGT | GTCCGCTTIT | GCACCTAAAC | GTGTGTGCTG |
| 2701 | ATCTCRAAT | ACTGTTCCAC | GGAGGCGAGA | CCCTGTGCT | GCATGTGGC | TGGGCTCCT | GGAGCCCTCC | ACRAGGCGAG | GCCTCCAGG | GCACAGTGCA |
| | TAGTAGTTA | TGACRAGGTG | CCTTCCGCT | CGGGACAGCA | CGTGCACCG | ACCCGCAAGA | CCTCGGGGAG | TGTTCCGTC | CGGAGGTTCC | CGTGTCAAGT |
| 2801 | GTGGTTGATT | CCAAGTCAAG | AAAGTTTCAG | GGCTTCAGAG | GACTGAACIT | AGTGGGCGTG | GTTGAGGGGC | AGGGCGTCC | GGGGCGGGG | CCTTGGGGGG |
| | CACCAACTAA | GGTTCAGTTC | TTTCAAGTTC | CCGAAGTCTC | CTGACTTGAA | TCACCCGCAC | CAACTCCCGC | TCCCGCCAGG | CCCCCGCCCC | GGAAACCCCC |
| 2901 | CGGGGGCCAG | GTGCTGAGCA | GTCTCTGCTT | GTCAAAAAGC | TGCTGGCCAG | CCCTAAGCAC | GGGAGCGCC | GAGCTGTGTG | TCCACCGCCA | GACCAAGTGC |
| | CGCCCCGCTG | CACGACTCGT | CAGAGACGAA | CAGTTTTTTC | ACGACGGCTC | GGGATTCGTT | CCCTTCGCGG | CTCGACACAC | AGGTGGCGGT | CTGCTCCACG |
| 3001 | GGATCGGGGT | GCAGGGGAA | GGGGTTCTG | GGTGGTGGT | TAGACCCGGG | CGAGCCGCT | GGGATCTAGA | GGTCTCAGCG | TTCCGGTGC | AGCGCTAGAG |
| | CCTAGCCCCA | CGTCCCTT | CCCCAAGAC | CCACTCACCA | ATCTGGGCC | CGTCCGCGA | CCCTAGATCT | CCAGAGTCCG | AGCCCAAGT | TCCGATGCTC |

Rycina 31. Sekwencja nukleotydoma przedstawiająca konstrukt III, obejmujący wszystkie potencjalne VDRE. Kolorem zielonym zaznaczono startery użyte do klonowania badanej sekwencji, kolorem czerwonym potencjalne VDRE. Strzałką i symbolem +1 oznaczono miejsce startu.

4.6.2 Immunoprecypitacja chromatyny

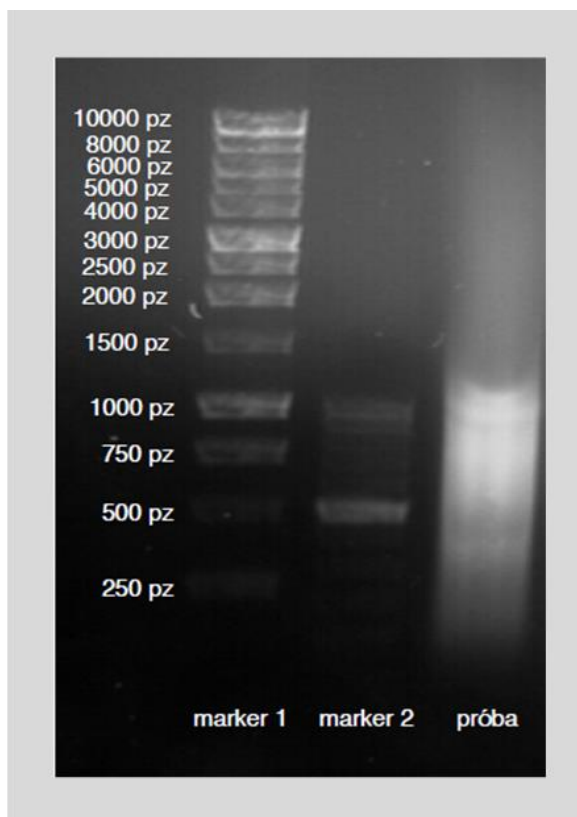
Ekspresja genów jest regulowana na poziomie transkrypcji poprzez oddziaływanie czynników *trans* z sekwencjami *cis*-regulatorowymi, obecnymi w sekwencji DNA w obrębie m.in. promotora minimalnego lub enhancera. Wynikiem oddziaływania czynników *cis* i *trans* może być zarówno aktywacja ekspresji lub represja docelowych genów. Wskutek tego działania mogą powstawać pętle chromatynowe, dzięki którym możliwe jest współdziałanie oddalonych od siebie sekwencji *cis*-regulatorowych. W obrębie sekwencji *cis*-regulatorowych znajdują się krótkie motywy nukleotydomowe, tzw. sekwencje konsensusowe, które rozpoznawane są przez białka regulatorowe.

Znając sekwencję konsensusową dla białka VDR [109], wiedząc, że pełni ono funkcję czynnika transkrypcyjnego i obserwując zjawisko autoregulacji receptora witaminy D, postanowiono z wykorzystaniem techniki immunoprecypitacji chromatyny zweryfikować, które z wytypowanych podczas analizy bioinformatycznej potencjalnych VDRE odpowiada za zjawisko autoregulacji receptora witaminy D w mysich komórkach mieloidalnych.

Receptor witaminy D po związaniu się ze swoim ligandem w postaci hormonalnie aktywnej formy witaminy D działa jako czynnik transkrypcyjny. Docelowe geny są rozpoznawane poprzez sekwencje VDRE znajdujące się obrębie sekwencji *cis*-regulatorowych. Wytypowane podczas analizy bioinformatycznej potencjalne VDRE znajdują się w obszarze promotora proksymalnego – w miejscu, będącym miejscem wiązania polimerazy RNA II. Ponadto badano także enhancer S1, który znajduje się w intronie między 3. a 4. eksonem mysiego genu *VDR* i odpowiada za zjawisko autoregulacji receptora witaminy D w mysich osteoblastycznych liniach komórkowych MC3T3-E1 oraz ST2 [26]. W toku eksperymentu przeprowadzono prace, które miały sprawdzić, czy i które z badanych VDRE odpowiada za zaobserwowane zjawisko autoregulacji. Stosowano metodę ChIP-PCR, w której zaprojektowano startery okalające sekwencje VDRE znajdujące się w obszarze promotora proksymalnego (sekwencje VDRE1, VDRE2, VDRE3 – w poprzednim kroku znajdowały się odpowiednio w konstruktach II i III), startery okalające sekwencję VDRE w obrębie enhancera S1, startery okalające sekwencję VDRE w obrębie promotora genu *Cyp24a1*, stanowiące kontrolę pozytywną eksperymentu. Amplifikowano także sekwencję znajdującą się w ścisłym otoczeniu miejsca startu transkrypcji, która stanowiła kontrolę negatywną eksperymentu, ponieważ analiza bioinformatyczną nie wykazała w jej obrębie potencjalnych VDRE.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowej 32D niestymulowanej lub traktowanej kalcytriolem. Profil oddziaływania VDR sprawdzano dla fragmentów znajdujących się w odległości -404/-202, -14/+186 oraz +186/+357 od miejsca startu transkrypcji genu *VDR* oraz w obrębie sekwencji promotora genu *Cyp24a1* i bezpośrednim sąsiedztwie miejsca startu transkrypcji. W początkowym etapie eksperymentu z wykorzystaniem paraformaldehydu utrwalono wiązania białko-DNA, dzięki czemu można było uchwycić moment wiązania białka VDR do sekwencji regulatorowej (VDR-VDRE). Proces sieciowania został zatrzymany poprzez dodanie glicyny. Liza błony komórkowej oraz dezintegracja błony jądrowej umożliwiła uwolnienie zawartości jądra komórkowego,

w postaci kwasów nukleinowych i białek. Z użyciem sonikatora i generowanych ultradźwięków uzyskaną chromatynę pofragmentowano na fragmenty mniejsze niż 1000 pz (Ryc. 32).



Rycina 32. Analiza elektroforetyczna długości fragmentów chromatyny otrzymanych w wyniku sonikacji. Na ścieżkę naniesiono 5 μ l próby. Większość DNA została pofragmentowana na odcinki o długości od 600 do 1000 pz. Marker 1: Perfect Plus 1kb DNA Ladder, marker 2: Perfect 100-1000 bp DNA Ladder.

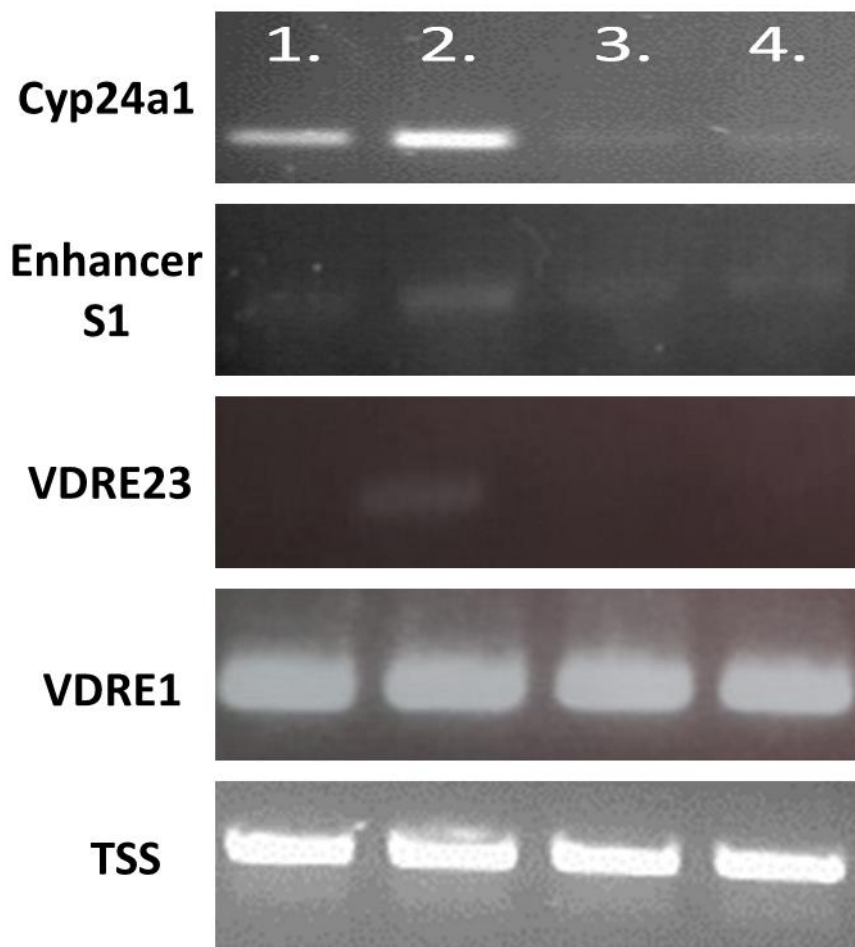
W kolejnym kroku przystąpiono do immunoprecypitacji chromatyny z zastosowaniem poliklonalnego przeciwciała anti-VDR (próba badana) i przeciwciał IgG (kontrola poziomu niespecyficznych wiązań). Przed dodaniem przeciwciał do próbki pobierano 5 μ l DNA poddanego sonikacji - stanowiło ono tzw. „input DNA” (patrz Metody 3.2.46). Input DNA stanowiło kontrolę, dzięki której możliwe było porównanie otrzymanego wyniku do ilości materiału genetycznego uzyskanego przed rozpoczęciem właściwej procedury z wykorzystaniem przeciwciał. Otrzymane kompleksy utworzone z DNA, białek i przeciwciał wyizolowano z użyciem magnetycznych kulek opłaszczonymi białkami A/G, które wykazują wysokie powinowactwo do immunoglobulin. Przeprowadzono serię płukań, trawienie proteinazą K oraz inkubację w temperaturze 62°C, dzięki czemu uzyskano roztwór DNA, stanowiący matrycę do reakcji PCR. Podsumowując, prawidłowo przeprowadzona

procedura immunoprecypitacji chromatyny powinna umożliwić utrwalenie oddziaływania VDR-VDRE, a zastosowanie przeciwciała specyficznego wobec VDR powinno umożliwić wzbogacenie puli otrzymanego w wyniku całej procedury DNA o fragmenty w obrębie których doszło do wiązania VDR.

Zaobserwowano, że w komórkach niestymulowanych kalcytriolem w obrębie sekwencji enhancera S1 (Ryc. 33) i promotora genu *Cyp24a1* nie dochodzi do oddziaływania z białkiem VDR. Po traktowaniu komórek kalcytriolem następuje znaczący wzrost sygnału w analizowanych obszarach. Podobne wzmocnienie sygnału otrzymano dla fragmentu obejmującego potencjalne VDRE2 i VDRE3, natomiast zależności takich nie otrzymano dla fragmentu promotorowego zawierającego potencjalne VDRE nr 1. W próbie stanowiącej kontrolę negatywną (Ryc. 33, TSS) również nie odnotowano wzrostu sygnału.

Podjęto próbę ujęcia ilościowego obserwowanych oddziaływań, wykorzystując technikę Real-Time PCR. Próba ta została zakończona niepowodzeniem – w toku reakcji nie udało uzyskać się produktów, mimo wielu prób optymalizacji reakcji. Najprawdopodobniej niepowodzenie jest związane z rodzajem stosowanej w reakcji Real-Time PCR polimerazy.

Wyniki immunoprecypitacji chromatyny silnie wskazują, że enhancer S1 oraz sekwencja DNA obejmująca VDRE2 i VDRE3 stanowią miejsca wiązania VDR. Jednak wspomniany brak ilościowego ujęcia wyników powoduje, że uzyskane wyniki należy traktować jako wstępne. Stosowano podejście celowane – na podstawie danych literaturowych oraz analizy bioinformatycznej wytypowano potencjalne elementy odpowiedzialne za zjawisko autoregulacji w mysich komórkach mieloidalnych. Z pewnością lepsze rozwiązanie stanowi połączenie reakcji immunoprecypitacji z sekwencjonowaniem nowej generacji (*ang.* Next Generation Sequencing, NGS), ponieważ umożliwia identyfikację miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych do DNA w obrębie całego genomu. Z powodu wysokich kosztów wspomnianej techniki stosowano tradycyjną metodę CHIP-PCR.



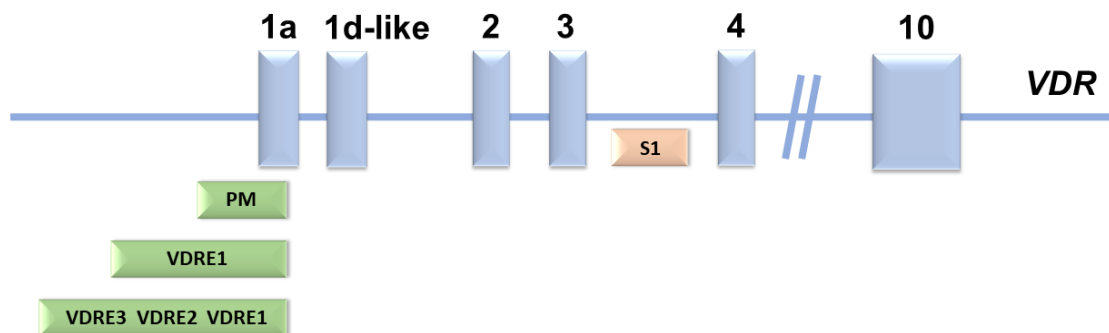
Rycina 33. Analiza ChIP-PCR z wykorzystaniem linii komórkowej 32D niestymulowanej (ścieżka 1. i 3.) lub traktowanej kalcytriolem (ścieżka 2. i 4.). Użyte przeciwciała i warunki hodowli: 1. przeciwciała anti-VDR warunki kontrolne, 2. przeciwciała anti-VDR stymulacja wit. D, 3. - przeciwciała IgG warunki kontrolne, 4. przeciwciała IgG stymulacja wit. D. Cyp24a1 – badaną sekwencję stanowił enhancer w obrębie promotora genu *Cyp24a1* – kontrola pozytywna eksperymentu. Enhancer S1 - badaną sekwencję stanowił enhancer S1 zlokalizowany w intronie między 3. a 4. eksonem genu *VDR*. VDRE23 - badaną sekwencję stanowił fragment obejmujący potencjalne VDRE2 i VDRE3. VDRE1 - badaną sekwencję stanowił fragment obejmujący potencjalny VDRE1. TSS - badaną sekwencję stanowił fragment genu *VDR* w obrębie miejsca startu transkrypcji, stanowiący kontrolę negatywną eksperymentu.

4.6.3 Konstrukcja plazmidów zawierających potencjalne elementy odpowiedzi na witaminę D

Próba rozszerzenia wyników uzyskanych w poprzednim kroku były badania przeprowadzone z wykorzystaniem testów reporterowych. W pierwszym etapie prac przygotowano konstrukty zawierające fragmenty promotora lub jego fragmenty z potencjalnymi miejscami VDRE, które następnie wprowadzono do komórek linii 32D.

Wykorzystując metodę PCR, przeprowadzono amplifikację promotora minimalnego genu *VDR*, wyznaczonego na podstawie danych literaturowych [26] oraz fragmentów promotorowych zawierających wytypowane podczas analizy bioinformatycznej potencjalne miejsca wiązania receptora witaminy D. Matrycę stanowiło DNA genomowe wyizolowane ze sztucznego chromosomu bakteryjnego, zawierającego pełne *locus VDR*. Zamplifikowano trzy fragmenty (Ryc. 34):

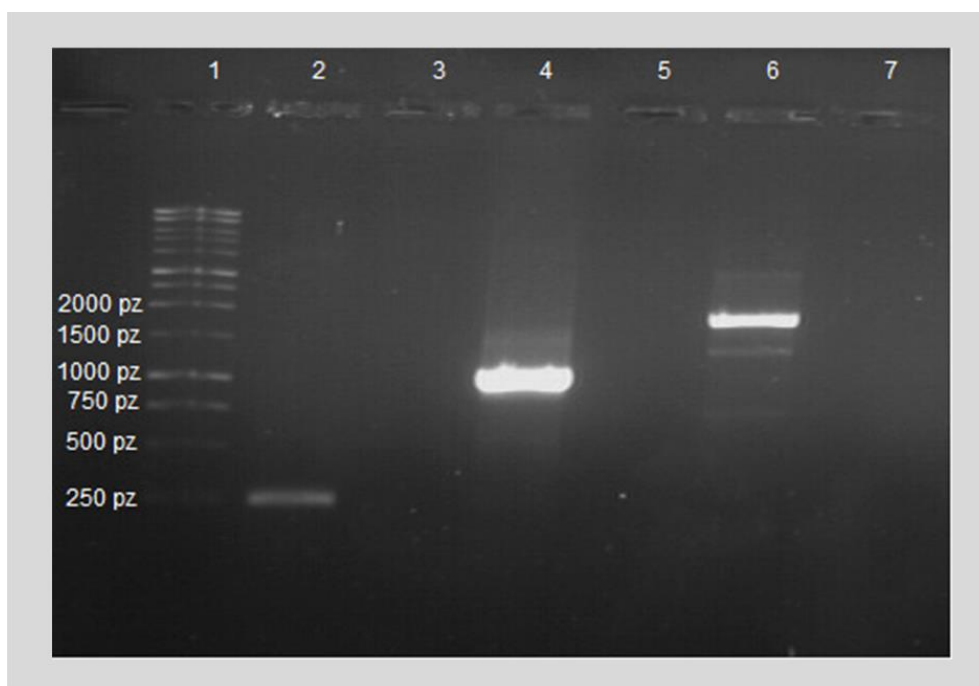
- a) konstrukt I – obejmował promotor minimalny o długości 228 pz (zlokalizowany między nukleotydami -133 do +95 względem miejsca startu transkrypcji mysiego genu *VDR*);
- b) konstrukt II - obejmował fragment o długości 1018 pz (zlokalizowany między nukleotydami -923 do +95 względem miejsca startu transkrypcji), zawierający promotor minimalny i pierwszy z wytypowanych potencjalnych elementów odpowiedzi na witaminę D VDRE1;
- c) konstrukt III - obejmował fragment o długości 1990 pz (zlokalizowany między nukleotydami -1895 do +95 względem miejsca startu transkrypcji), zawierający promotor minimalny i wszystkie potencjalne elementy odpowiedzi na witaminę D.



Rycina 34. Schemat przedstawiający umiejscowienie klonowanych fragmentów w obrębie mysiego *locus VDR*.

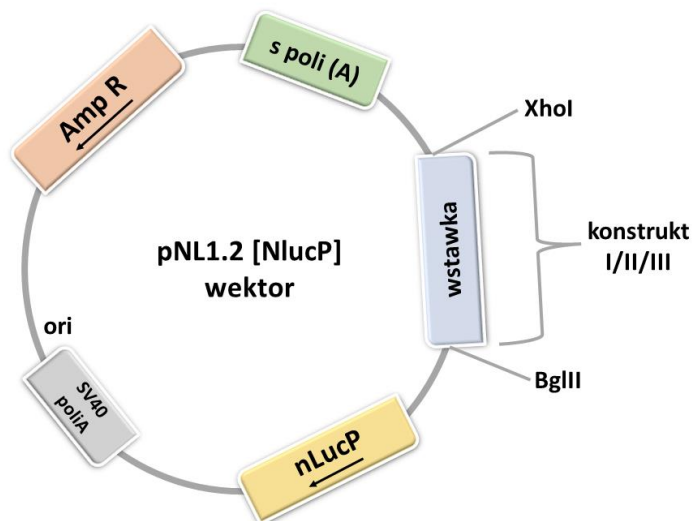
PM – promotor minimalny genu *VDR*, VDRE1,2,3 - fragmenty promotorowe zawierające wytypowane podczas analizy bioinformatycznej potencjalne miejsca wiązania receptora witaminy D. Na różowo zaznaczono enhancer znajdujący się w intronie między 3. a 4. eksonem, stanowiący obiekt badawczy w dalszej części pracy.

Stosowane startery oflankowane były sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne BglII i XhoI.



Rycina 35. Elektroforeza żelowa przedstawiająca sklonowane konstrukty I, II, III. Ścieżka 1: standard masy, ścieżka 2: konstrukt I (228 pz), ścieżka 3: kontrola negatywna, ścieżka 4: konstrukt II (1018 pz), ścieżka 5: kontrola negatywna, ścieżka 6: konstrukt III (1990 pz), ścieżka 7: kontrola negatywna.

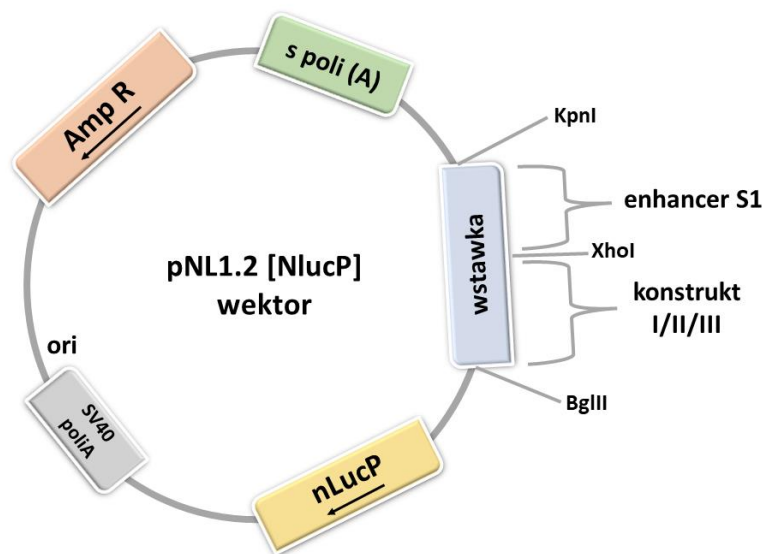
Otrzymane produkty reakcji PCR rozdzielono podczas elektroforezy (Ryc.35), następnie wycięto z żelu i oczyszczono. Z użyciem enzymów BglII i XhoI przeprowadzono trawienie restrykcyjne uzyskanych konstruktyw oraz plazmidu pNL1.2. Wektor ten nie zawiera promotora, koduje natomiast lucyferazę NanoLuc® i służy do pomiaru aktywności sekwencji promotorowych oraz sekwencji wzmacniających. Produkty reakcji oczyszczono, po czym przeprowadzono reakcję ligacji. Uzyskanymi wektorami (Ryc. 36) transformowano chemikompetentne bakterie *E.coli* HST08. W celu weryfikacji poprawności wyników procesu klonowania przeprowadzono reakcję PCR na koloniach bakteryjnych. Poprawność sekwencji insertu została potwierdzona w reakcji sekwencjonowania. Na potrzeby dalszych eksperymentów wszystkie konstrukty uzyskano na drodze izolacji DNA plazmidowego z hodowli bakteryjnej.



Rycina 36. Schemat wektora pNL1.2 [NlucP] z wklonowanymi wstawkami. Konstrukt I zawierał promotor minimalny, konstrukt II zawierał promotor minimalny i potencjalne VDRE1, konstrukt III zawierał promotor minimalny i potencjalne VDRE1, VDRE2, VDRE3.

4.6.4 Konstrukcja plazmidów zawierających sekwencję enhancera S1

W toku badań przygotowano także konstrukty zawierające dodatkowo sekwencję enhancera S1 zlokalizowaną przed odpowiednim fragmentem promotorowym (konstrukt I, II, III). Sekwencja DNA obejmująca enhancer S1 liczyła 707 pz (zlokalizowana jest między nukleotydami +36882 do +36175 względem miejsca startu transkrypcji), która została wklonowana metodą SLIC do plazmidów uzyskanych w poprzednim kroku (Ryc.37). Działania te miały na celu sprawdzenie czy regulacja transkrypcji genu *VDR* w mysich mieloidalnych komórkach jest zależna od elementów regulatorowych zlokalizowanych wyłącznie w regionie promotorowym, czy w regulację tę zaangażowane są także dystalne elementy. Ponadto potencjalne rezultaty badań przeprowadzonych z wykorzystaniem testów lucyferazowych mogłyby stanowić potwierdzenie wyników uzyskanych podczas eksperymentów z wykorzystaniem immunoprecypitacji chromatyny.

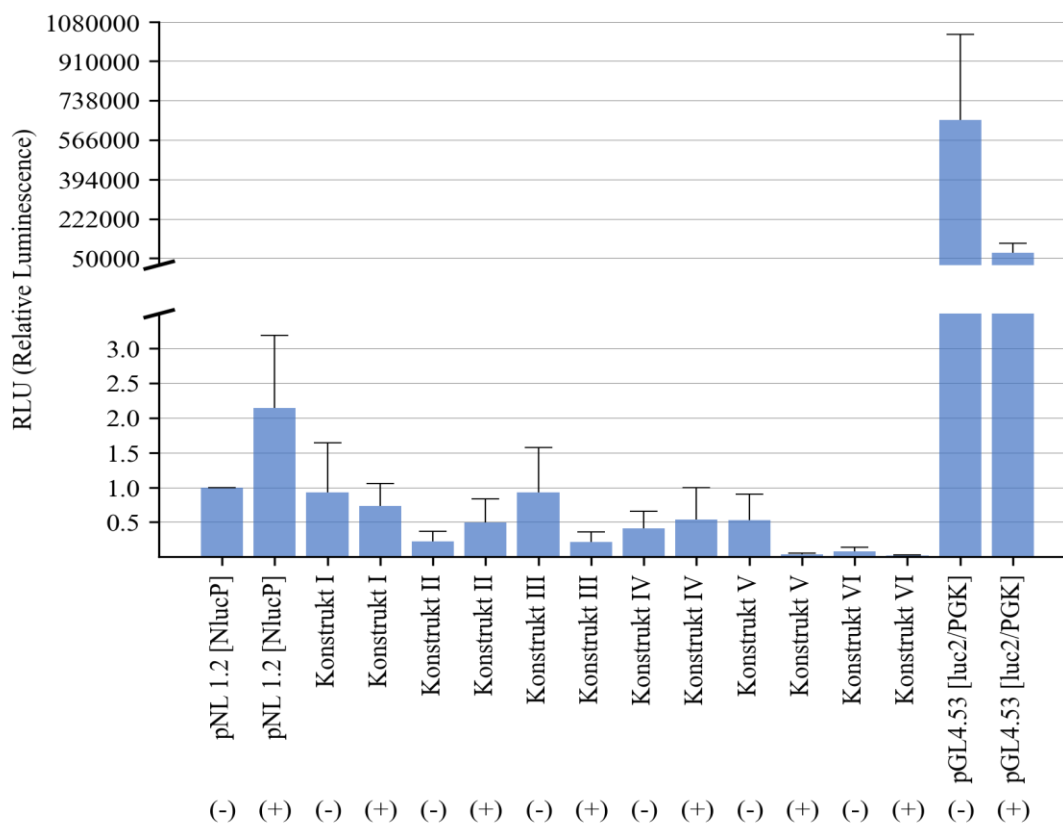


Rycina 37. Schemat wektora pNL1.2 [NlucP] z wklonowanymi wstawkami. Konstrukt IV zawierał enhancer S1 i promotor minimalny, konstrukt V zawierał promotor minimalny i potencjalne VDRE1, konstrukt VI zawierał enhancer S1 i promotor minimalny i potencjalne VDRE1, VDRE2, VDRE3.

4.6.5 Elektroporacja komórek 32D i test lucyferazowy

W celu weryfikacji aktywności promotorowej wytypowanych podczas analizy bioinformatycznej sekwencji DNA przeprowadzono pomiar luminometryczny. Komórki linii 32D stymulowano lub nie kalcytriolem i wprowadzono do nich uzyskane konstrukty reporterowe. Próbkę badaną stanowiły wektory zawierające promotor minimalny i potencjalne VDRE (konstrukt I, II, II) oraz wektory, w których przed badanymi fragmentami promotorowymi znajdowała się sekwencja enhancera S1 (konstrukty IV, V, VI). Wektor pGL4.53 [luc2/PGK], posiadający gen lucyferazy pod promotorem kinazy fosfoglicerynianowej stanowił kontrolę pozytywną. Pusty wektor pNL 1.2 [NlucP] pozbawiony sekwencji promotorowej stanowił kontrolę negatywną eksperymentu. Wektory stanowiące właściwą próbkę badaną były kontransfekowane wraz z plazmidem pRL-TK, zawierającym gen lucyferazy z *Renilla reniformis*. Wektor ten stanowił kontrolę wewnętrzną, umożliwiającą uniezależnienie otrzymanych wyników eksperymentów od różnic w wydajności transfekcji komórek. Podczas badań mierzono aktywność transkrypcyjną badanych sekwencji DNA, które aktywowały ekspresję genu kodującego lucyferazę. Wyniki bioluminescencji lucyferazy NanoLuc normalizowano względem wyników otrzymanych dla lucyferazy z *Renilla reniformis*. Aktywność promotorowa mierzona jako pochodna średniego poziomu wzbudzenia luminescencji została obliczona

względem luminescencji wektora pNL1.2, który nie zawierał insertu. Pomiarów dokonano po 24-godzinnej stymulacji komórek $1\alpha,25$ -dihydroksywitaminą D_3 w stężeniu 10^{-8} M z dodatkiem interleukiny 3 w stężeniu 0,5 ng/ml. Analizę wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach, a przedstawione na wykresach wartości (Ryc.38) odpowiadają średnim poziom wzbudzenia luminescencji prób badanych. Otrzymane wyniki wykazują brak aktywności promotorowej badanych konstruktów. O poprawności przeprowadzonych eksperymentów świadczą wartości uzyskane dla kontroli pozytywnej eksperymentów.



Rycina 38. Analiza wyników testu lucyferazowego przeprowadzonego na linii 32D. (-) –warunki kontrolne, (+) – stymulacja kalcytriolem. Przedstawiono uśrednione wyniki z trzech niezależnych eksperymentów i stanowią średnią wartość wraz z błędem standardowym średniej (SEM). Nie uzyskano wyników istotnych statystycznie pomiędzy konstruktami stanowiącymi próbę badaną (konstrukty I-VI). Wektor pGL4.53 stanowił kontrolę pozytywną eksperymentu, wektor pNL1.2 kontrolę negatywną.

Pomimo wielu prób nie udało uzyskać się wyników ani podczas eksperymentów z zastosowaniem wektorów zawierających wyłącznie fragmenty promotorowe z wytypowanymi potencjalnymi VDRE ani z wektorami z dodatkową sekwencją enhancera

S1. Wielokrotnie próbowano zmodyfikować parametry elektroporacji dla badanej linii komórkowej, lecz nie wpływało to na wyniki eksperymentu. Również optymalizacja warunków hodowli komórek linii 32D poprzez modyfikacje stężenia $1\alpha,25$ -dihydroksywitaminy D_3 oraz interleukiny 3 nie przyniosły pozytywnych rezultatów. Postanowiono zmienić linię komórkową na linię NIH3T3, która również wykazuje ekspresję genu *VDR*, jednakże w porównaniu do linii 32D charakteryzuje się znacząco wyższą wydajnością transfekcji. Również ta zmiana nie przyczyniła się do zaobserwowania aktywności promotorowej badanych konstruktów. Promotory pozbawione kasety TATA, do których należy promotor genu *VDR*, mogą nie wykazywać aktywności podczas transfekcji przejściowej, co zostanie omówione w rozdziale nr 5 – Dyskusja.

5 Dyskusja

Z racji trudności z uzyskaniem niektórych rodzajów ludzkich komórek do badań naukowych często stosuje się organizmy modelowe. Podstawą takich działań jest koncepcja jedności w biologii, która została ujęta w aforyzmie J. Monoda i F. Jacoba – „wszystko, co jest prawdą w odniesieniu do *E.coli*, musi być również prawdziwe w odniesieniu do słoni” [110]. Trzeba jednak mieć na uwadze, iż organizmy żywe charakteryzują się różnorodnością i założenie, że modele badawcze w postaci gryzoni będą wiarygodnymi modelami dla zagadnień związanych z biologią człowieka może w niektórych przypadkach być mylne [111]. Sztuka wyboru właściwego organizmu modelowego polega na analizie właściwości danego organizmu modelowego i porównaniu ich z docelowym obiektem badań, co jest szczególnie istotne w kontekście badań biomedycznych [112]. W badaniach dotyczących tworzenia nowych leków trudno znaleźć lepszy model badawczy niż myszy, których hodowla laboratoryjna jest łatwa i nie wymaga dużych nakładów finansowych. Ponadto techniki związane z manipulacjami genetycznymi na myszach są stosunkowo proste i dostępne komercyjnie. Uważa się, że ze względu na przynależność do tej samej gromady jaką są ssaki, myszy i ludzie wykazują homologię pod względem podobieństwa genomu, anatomii i fizjologii [113]. Trzeba jednak mieć na względzie, że gatunki te przystosowały się w procesie ewolucji do życia w odmiennych środowiskach [111]. Poza ewidentną różnicą jaką stanowi wielkość ciała, myszy charakteryzują się znacznie wyższym tempem metabolizmu, ich dieta opiera się na zbożach, prowadzą nocny tryb życia, a ciało jest pokryte futrem [113]. Linie rozwojowe gryzoni i naczelnych rozdzieliły się około 85 milionów lat temu [114] i od tego czasu ewoluowały niezależnie, przystosowując się do życia w odmiennych warunkach. Co ważne, różnice te wzmocnił również proces tworzenia i rozmnażania nowych szczepów myszy na potrzeby prac naukowych [115]. Podczas ewolucji organizmów eukariotycznych wystąpiły trzy rundy duplikacji genomu, a po drugiej z nich wyodrębniła się ścieżka ewolucyjna wspólna dla ludzi oraz myszy. Jednak pomimo wspólnej ewolucji ludzkich i mysich genów *VDR* ich budowa jest zróżnicowana [113]. Różnice między gatunkami są szczególnie wyraźne w badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy. Związane są z odmiennym mechanizmem

regulacji receptora witaminy D oraz różnym poziomem ekspresji VDR i jego genów docelowych. U ludzi gen *VDR* może być aktywowany zarówno na ścieżce związanej z retinoidami, jak i kalcytriolem [71], natomiast u myszy retinoidy i ich receptory jądrowe nie są zaangażowane w ten proces. Znacząco wyższy poziom ekspresji genów *VDR* i *Cyp24a1* w komórkach stymulowanych kalcytriolem obserwowano w przypadku myszy, co zostanie dokładniej omówione w dalszej części rozdziału. Myszy często odpowiadają na eksperymentalne ingerencje w sposób znacząco odmienny niż ludzie, a temat ten jest podejmowany w literaturze przedmiotu od wielu lat. Dotyczy to zwłaszcza wykorzystania myszy do badań nad ludzkimi chorobami, w przeciwieństwie do badań związanych z biologicznymi procesami wspólnymi dla gryzoni oraz naczelnych [111]. Przykładowo terapia z wykorzystaniem leku przeciwnowotworowego jakim jest endostatyna jest skuteczna w przypadku myszy, wykazuje jednak ograniczoną skuteczność u ludzi [116]. Stwierdzono także, że wiele substancji o działaniu rakotwórczym u myszy, nie wywołuje takiego działania u ludzi i odwrotnie [117]. Znacząca część leków przeciwnowotworowych, które zostały zaklasyfikowane do etapu badań klinicznych, nigdy nie trafiło na rynek. Jedną z przyczyn trudności dotyczących nowych strategii opracowania leków są ograniczenia modeli zwierzęcych [118]. Szczepy mysie, które zostały opracowane, aby stanowić model ludzkich chorób genetycznych, charakteryzują się odmiennym fenotypem w stosunku do człowieka [119]. Pewne analogiczne szlaki mogą obejmować tę samą ilość genów zaangażowanych w dany proces biologiczny, lecz sposób regulacji ekspresji tych genów oraz zależność między genotypem a fenotypem mogą być zróżnicowane między omawianymi gatunkami [120] [121]. Zróżnicowana architektura tych szlaków i odmiennie zależności między genotypem a fenotypem w kontekście mysiego i ludzkiego modelu badawczego będą także prawdopodobnie skutkować różnicami w relacjach między genotypem a jednostką chorobową, co sprawia, że myszy stanowią problematyczny model badawczy do studium ludzkich chorób [111].

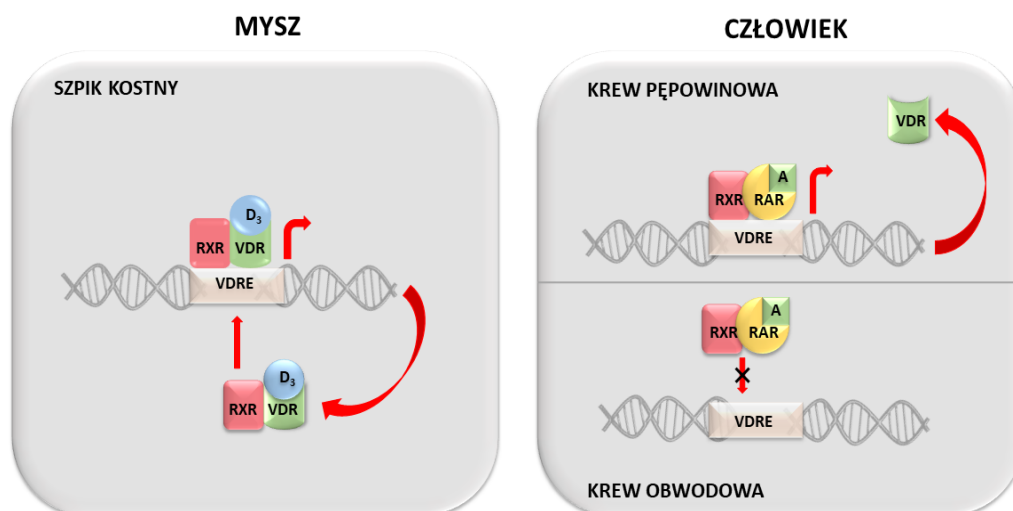
Jednym z największych wyzwań współczesnej nauki jest opracowanie skutecznych terapii przeciwnowotworowych, które na wczesnych etapach ich tworzenia testowane są na liniach komórkowych i modelach zwierzęcych. Wśród stosowanych metod szerokie zastosowanie znalazły leki cytostatyczne, jednak dzięki badaniom nad biologią nowotworów wyznaczane są nowe ścieżki walki z nowotworami. Sygnalizacja VDR jest związana z indukcją różnicowania i zatrzymania wzrostu komórek, dlatego stosowanie analogów

witaminy D stanowi atrakcyjną alternatywę dla leków cytostatycznych w kontekście leczenia ostrej białaczki szpikowej. Działanie przeciwnowotworowe witaminy D związane jest z aktywacją różnicowania komórek nowotworowych. Istotą badań przedstawionych w niniejszej pracy było zidentyfikowanie mechanizmów regulacyjnych charakterystycznych dla prawidłowych komórek hematopoetycznych. Umożliwia to analizę porównawczą z danymi literaturowymi dla komórek nowotworowych i ustalenie, które z obserwowanych zjawisk stanowią fizjologiczną normę, a które świadczą o wkroczeniu komórek na ścieżkę nowotworzenia. Istotny aspekt stanowi kliniczne znaczenie poziomu ekspresji genu *VDR* w patogenezie AML, ponieważ wykazano istnienie korelacji między poziomem ekspresji genu *VDR* i wskaźnikiem całkowitego przeżycia. Pacjenci z wysokim poziomem ekspresji *VDR* mieli wyższy wskaźnik całkowitego przeżycia w porównaniu z pacjentami z niższą ekspresją *VDR*. Informacja ta może zostać wykorzystana do analizy rokowania pacjentów, w szczególności w podtypie białaczki AML4–5 [122]. O tym, jak istotną rolę pełni witamina D świadczą obserwacje kliniczne, z których wynika, że biorcy HSC, u których występuje niedobór tej witaminy, mają gorsze wyniki przeszczepu w porównaniu do osób z prawidłowym poziomem witaminy D – obserwuje się m.in. występowanie choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi [123].

Receptor witaminy D może pełnić znaczącą rolę w procesie kształtowania komórek krwi, ponieważ ulega w nich ekspresji, a jego istotność dla hematopoetycznych komórek podkreślają wyniki uzyskane w badaniach dotyczących nowotworów hematologicznych [124]. Projekt badawczy obejmował model myszy i ludzki, przy czym pierwszy z nich jest właściwym obiektem niniejszej pracy. Pierwsze z przeprowadzonych eksperymentów umożliwiły identyfikację promotora, wariantu transkrypcyjnego oraz punktów startu transkrypcji genu *VDR*, występujących podczas hematopoezy. Zaobserwowano, że w mysich komórkach krwi ekspresja genu *VDR* jest regulowana w wyniku aktywności pojedynczego promotora. Odnotowano obecność jednego wariantu transkrypcyjnego oraz kilku miejsc startu transkrypcji, które zlokalizowane są w obrębie 45-nukleotydowego regionu. Występowanie wielu miejsc startu transkrypcji jest cechą charakterystyczną promotorów nieposiadających kasetę TATA, do których należy promotor genu *VDR* [106]. Nie zaobserwowano ponadto preferencji tkankowych w odniesieniu do miejsca startu transkrypcji. Otrzymane wyniki kontrastują ze złożoną regulacją transkrypcji genu *VDR* w komórkach ludzkich, gdzie obserwuje się obecność kilku specyficznych tkankowo

promotorów [65]. W kolejnych badaniach sprawdzono poziom ekspresji poznanego wariantu transkrypcyjnego genu *VDR* w mysich narządach związanych z procesem dojrzewania komórek krwi (szpik kostny, grasica, śledziona). Narząd referencyjny stanowiła nerka, która charakteryzuje się wysokim poziomem ekspresji badanego genu [65]. Otrzymane wyniki wskazały, iż najniższa ekspresja *VDR* zachodzi w dojrzałych limfocytach T i B, natomiast w komórkach wyizolowanych ze śledziony, grasicy i szpiku kostnego poziom ten był stosunkowo wyższy. Jediną grupą komórek, która wykazywała poziom ekspresji *VDR* zbliżony do poziomu obserwowanego w nerce były hematopoetyczne komórki macierzyste i progenitorowe. I właśnie w tych komórkach dostrzeżono zjawisko autoregulacji receptora witaminy D, co wcześniej obserwowane było tylko w mysich osteoblastach [26]. Analiza wyników dla genu *Cyp24a1* potwierdziła obecność funkcjonalnego białka *VDR* w badanych tkankach. Rozwinięciem powyższych badań było sprawdzenie poziomu ekspresji genu *VDR* w poszczególnych populacjach mysich hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych. Wśród analizowanych populacji komórek hematopoetycznych najwyższą ekspresją genu *VDR* indukowaną obecnością kalcytriolu charakteryzowała się populacja CMP, natomiast najniższą indukcję ekspresji genu *VDR* obserwowano w populacji CLP. Dane te pokrywają się z wynikami uzyskanymi w poprzednim eksperymencie, gdzie najniższy poziom ekspresji badanego genu zaobserwowano w dojrzałych limfocytach T i B, a stosunkowo wyższy w granulocytach. Zjawisko autoregulacji *VDR* było dobrze widoczne w populacjach komórkowych CMP, MEP, GMP oraz HSC. Analiza poziomu ekspresji genu *Cyp24a1* potwierdziła obecność aktywnego transkrypcyjnie *VDR* we wszystkich populacjach hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych. Szczególnie wysokim względnym poziomem ekspresji tego genu charakteryzowały się populacje MEP i HSC, co może świadczyć o tym, iż sygnalizacja *VDR* jest istotna nie tylko w białaczkowych komórkach macierzystych, lecz także w prawidłowych hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych [122]. W analogicznych badaniach z wykorzystaniem ludzkiej krwi pępowinowej nie zaobserwowano tak wysokich poziomów ekspresji genów *VDR* i *Cyp24a1*. W mysich hematopoetycznych komórkach macierzystych stymulowanych kalcytriolem obserwuje się około 10-krotny wzrost poziomu ekspresji genu *VDR*, natomiast w komórkach ludzkich niespełna dwukrotny wzrost ekspresji. W mysiej populacji komórek CMP obserwuje się niemal 30-krotny wzrost ekspresji *VDR* po stymulacji kalcytriolem,

a w komórkach ludzkich tylko 4-krotny wzrost ekspresji [124]. Jeszcze większe różnice występują podczas analizy poziomu ekspresji genu *Cyp24a1* u obu gatunków – w mysich hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych obserwujemy niemal milion-krotny wzrost ekspresji badanego genu w komórkach stymulowanych kalcytriolem, a w ludzkich odpowiednikach tylko około 5-krotny wzrost ekspresji [124]. Przeprowadzono także badania, które miały umożliwić znalezienie odpowiedzi na pytanie, które oddziaływania stanowią właściwy mechanizm odpowiedzialny za regulację ekspresji genu *VDR* w mysich HSPC – autoregulacja *VDR* czy regulacja na szlaku związanym z RAR. Analiza ekspresji genu *Cyp26a1* potwierdziła obecność aktywnego transkrypcyjnie RAR w badanych populacjach komórkowych, jednakże analiza poziomu ekspresji genu *VDR* pod wpływem stymulacji ATRA wskazuje, iż RAR nie odpowiada za regulację ekspresji *VDR* w mysich hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych. W ludzkich komórkach aktywacja ścieżki *VDR* może być zależna zarówno od stymulacji komórek kalcytriolem, jak i ATRA, a ponadto jest to związane z poziomem białka *VDR* w komórce. *VDR* aktywowany przez RAR, może być dalej aktywowany na ścieżce związanej ze stymulacją komórek kalcytriolem [125] – receptory współdziałają ze sobą. W przypadku myszy zaobserwowano przeciwną tendencję – komórki stymulowane kalcytriolem i ATRA wykazywały niższy poziom ekspresji *VDR* w stosunku do komórek stymulowanych wyłącznie kalcytriolem (Ryc.22). W przedstawionych badaniach przeprowadzonych na mysich komórkach hematopoetycznych wiodącym szlakiem regulacji receptora witaminy D jest autoregulacja, natomiast w ludzkich komórkach regulacja ta jest zależna od ATRA (Ryc.39). W ludzkich hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych ATRA odpowiada za zwiększenie ekspresji genu *VDR*, natomiast w mysich HSPC za zjawisko to jest odpowiedzialny kalcytriol [65].



Rycina 39. Regulacja ekspresji genu *VDR* u myszy i człowieka. Opracowanie własne na podstawie [65].

Wyniki uzyskane w poprzednich krokach wskazały różnice w poziomie ekspresji genu *VDR* pomiędzy różnymi tkankami. Przeprowadzono eksperymenty, które miały zweryfikować hipotezę postulującą, iż za obserwowane różnice w poziomie ekspresji badanego genu odpowiada metylacja wysp CpG zidentyfikowanych w obrębie mysiego promotora genu *VDR*. Epigenetyczne wyciszenie promotora genu *VDR* zademonstrowano m.in. w ludzkim łożysku oraz guzach piersi. Nie bez znaczenia pozostaje fakt, iż modyfikacje epigenetyczne są istotne podczas prawidłowej hematopoezy, warunkując m.in. prawidłowy przebieg erytropoezy [126]. Wyniki uzyskane z prób pochodzących z komórek krwi (granulocytów wyizolowanych ze szpiku kostnego, limfocytów T i B wyizolowanych ze śledziony oraz tymocytów CD4⁺ i CD8⁺) wykazały brak charakterystycznego wzoru metylacji promotora mysiego genu *VDR*. Równoległe prowadzone badania na komórkach wyizolowanych z ludzkiej krwi pępowinowej dostarczyły zbieżnych rezultatów. W pracach z wykorzystaniem ludzkiego modelu badawczego zastosowano dodatkowo środki hipometylujące. Nie zaobserwowano zmian w ekspresji różnych transkryptów *VDR*, jednakże dostrzeżono, że środki te zwiększają całkowitą ekspresję genu *VDR* i genu docelowego *Cyp24a1* [124]. Rzeczone rezultaty wskazują, że metylacja regionu promotorowego genu *VDR* nie stanowi głównego mechanizmu regulacyjnego w przypadku prawidłowych mysich komórek krwi. W ludzkich komórkach hematopoetycznych mechanizmy epigenetyczne tylko częściowo regulują ekspresję badanego genu. Badania przedstawione w niniejszej pracy prowadzono

z wykorzystaniem prawidłowych komórek hematopoetycznych, natomiast znaczącą rolę metylacji promotora genu *VDR* obserwuje się w komórkach białaczkowych, zwłaszcza w białaczkowych komórkach macierzystych. W literaturze przedmiotu można odnaleźć wyniki prac odnoszących się do jednoczesnego zastosowania środków hipometylujących w połączeniu z analogami witaminy D, w kontekście terapii ostrej białaczki szpikowej. Wykazano, iż użycie takiej kombinacji farmaceutyków wykazuje addytywne i synergistyczne działanie w kierunku różnicowania oraz zatrzymania wzrostu białaczkowych komórek macierzystych (*ang.* Leukemia Stem Cells, LSC) [122]. Metylacja DNA jest istotnym mechanizmem w patogenezie AML, a w obrębie różnych podtypów AML można wyróżnić specyficzne sygnatury epigenetyczne [127], które mogą stanowić cel terapeutyczny [128]. Metylacja promotora genu *VDR* zmniejsza poziom jego ekspresji w komórkach ostrej białaczki szpikowej. Ogranicza to zastosowanie analogów witaminy D w celu inicjacji procesu różnicowania mieloidalnego komórek AML [122]. Epigenetyczna regulacja ekspresji genu *VDR* jest związana także ze zmniejszeniem puli białaczkowych komórek macierzystych. W badaniach z zastosowaniem mysich modeli AML wykazano, że skojarzenie agonistów receptora witaminy D ze środkami o właściwościach hipometylujących jest czynnikiem sprzyjającym wyczerpaniu puli LSC. Zapobiega to progresji choroby oraz rozprzestrzenianiu się komórek nowotworowych. Można zatem uznać, iż *VDR* pełni funkcję regulatora homeostazy białaczkowych komórek macierzystych [122]. W przeciwieństwie do komórek ostrej białaczki szpikowej w prawidłowych komórkach hematopoetycznych promotor *VDR* jest słabo zmetylowany i jest to istotna cecha odróżniająca te dwa rodzaje komórek.

Wiodącym tematem niniejszej rozprawy okazała się nowo odkryta autoregulacja receptora witaminy D w mysich komórkach hematopoetycznych. Ze względu na ograniczoną liczebność HSPC kolejne badania, mające na celu poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za regulację ekspresji genu *VDR* w komórkach krwi, prowadzono na linii komórkowej 32D, wywodzącej się ze szpiku kostnego. Linia ta stanowi dobry model do badania mechanizmów molekularnych związanych z procesem różnicowania krwiotwórczego, ponieważ komórki te różnicują w obecności różnych sygnałów fizjologicznych w populacje komórek zależnych od Epo, GM-CSF lub G-CSF, co umożliwia naśladowanie ścieżki rozwojowej komórek krwi [129]. W pierwszym etapie prac potwierdzono występowanie zjawiska autoregulacji *VDR* w linii komórkowej 32D.

W dalszych częściach pracy przeprowadzono próbę identyfikacji elementów regulatorowych w obrębie *locus VDR* z wykorzystaniem dwóch metod - immunoprecypitacji chromatyny oraz testów reporterowych, przy czym druga z nich okazała się nieskuteczna. Podczas badań z użyciem testów lucyferazowych przygotowano konstrukty zawierające promotor minimalny genu *VDR* oraz fragmenty promotorowe, w obrębie których znajdowały wytypowane potencjalne VDRE. Przygotowano także konstrukty zawierające dodatkowo sekwencję enhancera S1 przed badaną sekwencją promotorową. Działania te miały na celu rozszerzenie wyników uzyskanych podczas immunoprecypitacji chromatyny, które zostaną omówione w dalszej części. Analiza aktywności promotorowej badanych sekwencji wykonana była z wykorzystaniem pomiaru luminometrycznego. Konstrukty wprowadzono do stymulowanych kalcytriolem lub niestymulowanych komórek linii 32D metodą elektroporacji. Mimo długotrwałej próby optymalizacji warunków metody, a także zmiany linii komórkowej nie udało uzyskać się wyników, które umożliwiłyby analizę aktywności promotorowej badanych sekwencji. Prawdopodobnie związane jest to z faktem, iż promotory pozbawione kasety TATA, do których należy promotor genu *VDR*, mogą nie wykazywać aktywności podczas transfekcji przejściowej. Doświadczenia innych zespołów badawczych pokazują, że wykorzystanie sztucznych plazmidów niesie ze sobą pewne ograniczenia; kontekst, w którym analizowane sekwencje regulatorowe są umieszczane w wektorach może silnie wpływać na ich zdolności regulacyjne. Może być to związane z orientacją w stosunku do dalszych fragmentów promotorowych lub wpływem obecności lub braku obecności transaktywatorów i represorów, które wiążą się z badanymi regionami regulatorowymi. Istotna może być także konfiguracja nici DNA, związana z cechami stosowanego plazmidu – prawdopodobnie nie będzie ona identyczna z tą występującą w natywnej chromatynie [130]. Ponadto istnieją doniesienia literaturowe wskazujące, że mimo potwierdzenia występowania miejsca wiązania VDR w obrębie danego regionu w natywnej chromatynie mogą wystąpić problemy z oceną zdolności transkrypcyjnej tych regionów w sztucznych plazmidach reporterowych z powodu dodatkowych, jeszcze nieokreślonych czynników [26]. Być może stosowanie kotransfekcji z wektorem ekspresyjnym kodującym VDR umożliwiłoby uzyskanie wyników, jednak nie zostało to stosowane, aby nie zaburzyć naturalnych mechanizmów regulacyjnych. Taką metodę stosowano jednak w pracach prowadzonych przez Zella i wsp., mających na celu scharakteryzowanie właściwości

transkrypcyjnych regionów regulatorowych w obrębie *locus VDR* w osteoblastach. Linia komórkowa transfekowana była wektorami zawierającymi właściwe konstrukty oraz wektorem ekspresyjnym pcDNA-hVDR. Zastanawiające było użycie ludzkiej sekwencji VDR w badaniach dotyczących elementów regulatorowych w obrębie mysiego *locus VDR* [26]. W niniejszej pracy sceptycznie podchodzono do takiego rozwiązania (mimo jego skuteczności), obawiając się ingerencji w naturalnie występujące mechanizmy regulacyjne i możliwość otrzymania wyników, które mogłyby okazać się artefaktami.

Metodą, która umożliwiła próbę charakteryzacji sekwencji regulatorowej odpowiadającej za autoregulację VDR w mysich komórkach krwi była immunoprecypitacja chromatyny. Technika ta może stanowić alternatywę dla badań z wykorzystaniem testów lucyferazowych, gdy zmiana modelu badawczego nie przynosi rezultatu i nie jest możliwe uzyskanie wyników podczas przejściowej transfekcji. Alternatywę może stanowić także stabilna transfekcja linii komórkowej, podczas której wprowadzony zostałby sztuczny chromosom bakteryjny zawierający pełne *locus* mysiego genu *VDR*. Jednakże uzyskanie takiego sztucznego chromosomu bakteryjnego i jego stabilna transfekcja do linii komórkowej jest procesem trudnym i długotrwałym. Należy pamiętać o tym, że istnieją doniesienia literaturowe świadczące o tym, iż mimo braku obserwowania funkcjonalnej aktywności sekwencji regulatorowych, mogą one stanowić miejsce wiązania VDR [26].

Eksperyment z użyciem immunoprecypitacji chromatyny został zaplanowany w taki sposób, aby możliwe było rozpoznanie sygnału świadczącego o związaniu się VDR z sekwencją enhancera S1 lub z wytypowanymi z wykorzystaniem analizy bioinformatycznych potencjalnych VDRE. Sekwencja VDRE znajdująca się w obrębie promotora genu *Cyp24a* stanowiła kontrolę pozytywną eksperymentu. Podczas przeprowadzania doświadczeń stosowano także kontrolę negatywną w postaci sekwencji znajdującej się w obrębie startu transkrypcji genu *VDR*. Analiza bioinformatyczna oraz dane literaturowe zaświadczały, iż w obrębie tej sekwencji nie występują miejsca wiązania receptora VDR. Eksperyment został przeprowadzony w warunkach kontrolnych oraz w warunkach, w których komórki linii 32D były stymulowane kalcytriolem, po czym uzyskane wyniki porównywano ze sobą. W komórkach niestymulowanych nie dochodziło do wiązania się VDR z badanymi sekwencjami lub oddziaływanie te były słabe. Po stymulacji komórek kalcytriolem zaobserwowano wzmocnienie sygnału w obrębie sekwencji promotora genu *Cyp24a1*, co świadczyło o prawidłowo przeprowadzonym eksperymencie, a także w obrębie

enhancera S1 i sekwencji VDRE23. Dla pozostałych analizowanych sekwencji nie otrzymano wzmocnienia sygnału. Uzyskane wyniki należy uznać za wstęp do dalszych badań, których celem będzie szczegółowe ustalenie sekwencji odpowiadającej za zjawisko autoregulacji VDR w mysich komórkach krwi. Niewykluczone także, że w przyszłości ta tematyka badawcza zostanie podjęta dla innego modelu badawczego oraz, że zostanie przeprowadzona m.in. ukierunkowana mutageneza badanych sekwencji regulatorowych. Umożliwiłoby to ostateczną identyfikację VDRE odpowiedzialnych za zjawisko autoregulacji w mysich komórkach krwi. Badania z wykorzystaniem immunoprecypitacji chromatyny mogłyby zostać poszerzone o eksperymenty, których celem byłoby określenie czy w badanych potencjalnych VDRE następuje wiązanie RXR oraz polimerazy RNA II. Można także zbadać czy następuje rekrutacja koaktywatora i następują zmiany funkcjonalne w modyfikacji histonów, co wydaje się zasadne, gdyż dane literaturowe potwierdzają, że polimeraza RNA II może być rekrutowana do dystalnych miejsc regulatorowych [131]. Powstawanie w obrębie enhancerów kompleksów transkrypcyjnych może świadczyć o tym, iż sekwencje te stanowią centra rekrutacyjne, których obecność skutkuje zwiększonym stężeniem składników transkrypcyjnych niezbędnych do zwiększenia ekspresji danego genu [132].

Można podjąć próbę wytłumaczenia genezy i znaczenia zjawiska autoregulacji VDR u myszy, opierając się na analizie porównawczej z danymi dotyczącymi ludzi. Metabolizm i wytwarzanie witaminy D jest ściśle związane z promieniowaniem słonecznym, pod wpływem którego 7-dehydrocholesterol zostaje przekształcony w hormonalnie aktywną postać witaminy D [113]. Ponadto witamina D może być także przyjmowana wraz z pożywieniem. Obie ścieżki występują u omawianych organizmów, jednak z powodu nocnego trybu życia i pokrycia ciała futrem, myszy mają mniejsze możliwości wytwarzania tej witaminy dzięki ekspozycji na światło słoneczne w porównaniu do człowieka [133]. Co ciekawe, wykazano korelację między zwiększoną zawartością melaniny w skórze i zmniejszoną zdolnością do syntezy witaminy D₃ w populacjach afrykańskich lub azjatyckich [134]. Tak więc występowanie czynników ograniczających dostęp promieniowania słonecznego do skóry ma znaczenie dla procesu syntezy witaminy D₃. W toku ewolucji wykształcił się u myszy system autoregulacji receptora witaminy D, który może stanowić bardziej czuły i wydajniejszy system związany z metabolizmem witaminy D₃. Najprawdopodobniej obserwujemy mechanizm regulacyjny działający na zasadzie

mechanizmu sprzężenia zwrotnego dodatniego. Występowanie witaminy D skutkuje aktywacją ekspresji genu *VDR* – w ten sposób w odpowiedzi na dostępność witaminy D stosunkowo szybko pojawia się duża ilość aktywowanego ligandem receptora, który działa jako czynnik transkrypcyjny. Skutkuje to efektywnym wykorzystaniem obecności witaminy D w organizmie i możliwością uruchomienia szlaków zależnych od sygnalizacji *VDR*.

Mimo występujących różnic między myszami a ludźmi, stanowią one nadal wartościowy model do badań. Z pewnością przydatny byłby system umożliwiający gromadzenie i analizowanie badań dotyczących biologii człowieka, które zostały opracowane na mysim modelu, co umożliwiłoby weryfikację czy w danej problematyce badawczej zastosowanie modelu mysiego jest adekwatnym rozwiązaniem [111]. Niekorzystnie na zaistniałą sytuację wpływa fakt, że negatywne wyniki często nie są publikowane [135], wskutek czego brakuje danych mogących informować o tym, czy dane badania były już przeprowadzone na myszach i czy otrzymane wyniki mogą zostać ekstrapolowane na ludzi. Problemy związane z przenoszeniem wyników uzyskanych na modelu mysim lub innych organizmach modelowych na model ludzki sprawiły, iż tego typu prace są kwestionowane przez naukowców, w szczególności gdy stosowane są wprowadzające w błąd sformułowania mówiące o możliwości bezpośredniego przeniesienia takich wyników na biologię człowieka [136]. Badania prowadzone na liniach komórkowych nigdy nie oddadzą pełni skomplikowania mechanizmów występujących w organizmie, stąd w przypadku trudności z uzyskaniem ludzkiego materiału badawczego badania na organizmach modelowych pozostają jedynym rozsądnym rozwiązaniem. Należy jednak badania te odpowiednio zaplanować, uwzględniając różnice oraz podobieństwa międzygatunkowe [111]. Przykładem zalet i ograniczeń eksperymentów na mysim modelu, w kontekście biologii człowieka, są badania dotyczące układu odpornościowego. To dzięki badaniom przeprowadzonych na myszach odkryto geny głównego kompleksu zgodności tkankowej, geny receptorów limfocytów T czy mechanizmy regulujące proces produkcji przeciwciał [137]. Jednak istnieją także znaczące różnice między ludźmi a myszami, co powoduje, że niektóre aspekty związane z funkcjonowaniem układu odpornościowego nie można przenieść na ten model badawczy. W literaturze przedmiotu można znaleźć publikacje, w których immunolodzy nawołują do powrotu do badań związanych z immunologią człowieka [138] [139]. Przykład zróżnicowanej gatunkowo regulacji w kontekście immunologii i witaminy D stanowią geny związane z wrodzoną odpornością

m.in. geny kodujące peptydy przeciwdrobnoustrojowe, receptory rozpoznające wzorce czy geny kodujących cytokiny. Ich transkrypcja jest regulowana przez VDR [140]. Doskonałym przykładem takiej odmiennej regulacji stanowią mechanizmy odpowiadające za indukcję genu *Camp* (ang. Cathelicidin Antimicrobial Peptide), który stanowi docelowy gen VDR. W mysich komórkach nabłonkowych AT84, które wykazują wysoką wrażliwość na działanie witaminy D, obrazowaną silną indukcją ekspresji genu *Cyp24a1*, obserwowana jest także niewielka indukcja genu *Camp* i brak znaczącej aktywności przeciwdrobnoustrojowej w kondycjonowanych pożywkach z hodowli komórek AT84, w przeciwieństwie do ludzkich odpowiedników. W ludzkich komórkach nabłonka po stymulacji kalcytriolem obserwuje się wysoki poziom ekspresji obu wspomnianych genów. Obserwowane różnice tłumaczy się odmienną lokalizacją VDRE. W ludzkich komórkach jest on umiejscowiony proksymalnie względem promotora, natomiast nie występuje w porównywalnej lokalizacji w mysim *locus* genu *Camp*. Może to świadczyć o regulacji ekspresji omawianego genu *Camp* przez VDR za pośrednictwem innych mechanizmów, np. dystalnych VDRE znajdujących się w obrębie locus mysiego genu *Camp* [141]. Nasuwa się skojarzenie z odmienną regulacją ekspresji samego genu *VDR* u myszy i u ludzi. Występujące różnice związane są ze sposobem regulacji ekspresji genu *VDR* – u ludzi występuje regulacja poprzez działanie RAR oraz VDR, u myszy obserwuje się autoregulację VDR. U człowieka kompleks RXR-VDR przyłącza się do regionu promotorowego, natomiast za zjawisko autoregulacji u myszy odpowiada najprawdopodobniej dystalny VDRE – enhancer S1 zlokalizowany w intronie między 3 a 4 eksonem [26]. Co ciekawe, wyjaśnieniem różnic w mechanizmie indukcji przez VDR transkrypcji genów kodujących peptydy przeciwdrobnoustrojowe, do których należy gen *Camp*, może być także związek z odmiennym trybem życia myszy i ludzi. Przeciwbakteryjne działanie witaminy D jest związane z aktywacją wrodzonej odpowiedzi odpornościowej. Stymulacja receptora TLR obecnego w błonie komórkowej ludzkich makrofagów indukuje enzym, który katalizuje konwersję witaminy D do jej hormonalnie aktywnej formy, co skutkuje uruchomieniem sygnalizacji VDR i indukcją genów kodujących peptydy przeciwdrobnoustrojowe, np. katelicydyny. VDR stanowi więc kluczowy łącznik między aktywacją TLR a wrodzoną odpowiedzią odpornościową skierowaną przeciw bakteriom. Porównując mechanizmy aktywacji szlaków przeciwdrobnoustrojowych u myszy i ludzi stwierdza się ich rozbieżną ewolucję. U myszy,

zwierząt nocnych, we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej aktywacja receptorów Toll-like skutkuje bezpośrednim działaniem przeciwdrobnoustrojowym, w którym pośredniczy głównie tlenek azotu. Natomiast u ludzi, aktywnych w dzień, następuje synteza witaminy D w skórze po ekspozycji na słońce i uaktywniany jest szlak przeciwdrobnoustrojowy związany z sygnalizacją VDR [142].

Warto prowadzić badania na różnych obiektach badawczych, sprawdzać istniejące różnice i podobieństwa. Umożliwia to weryfikację informacji czy dany organizm modelowy stanowi właściwy obiekt badawczy w sytuacji, gdy mamy ograniczone możliwości pracy na ludzkich komórkach. Większość informacji dotyczących hematopoezy uzyskano w badaniach prowadzonych na mysim modelu. Analizując te informacje trzeba mieć na uwadze, że tylko część tych danych można odnieść bezpośrednio do ludzkiej hematopoezy [100]. Prowadzono także badania dotyczące roli receptora witaminy D w hematopoezie z wykorzystaniem danio pręgowanego. Uzyskane wyniki dostarczyły informacji o tym, że dostępność $1,25(\text{OH})\text{D}_3$ jest czynnikiem, który moduluje produkcję HSPC, ponieważ witamina D_3 działa w bezpośredni sposób na HSPC, stymulując je do proliferacji. Wykazano także, że zjawisko to jest konserwowane u różnych gatunków. Traktowanie *ex vivo* ludzkich HSPC hormonalnie aktywną formą witaminy D również zwiększyło liczbę kolonii komórek hematopoetycznych [143]. Utrata biosyntezy $1,25(\text{OH})\text{D}_3$ skutkowało nagromadzeniem nieaktywnej formy witaminy D_3 , co blokowało sygnalizację hedgehog i prowadziło do upośledzenia niszy naczyniowej. W konsekwencji nastąpiło zmniejszenie ilości hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych [144]. Danio pręgowany mógł posłużyć jako model do badania szlaku syntezy i sygnalizacji związanej z $1\alpha,25$ -hydroksywitaminą D_3 , ponieważ szlak sygnalizacji VDR jest u niego zachowany. Należy jednak mieć na uwadze, że w genomie danio pręgowanego kodowane są dwa rodzaje VDR – *vdra* oraz *vdrb*, przy czym *vdra* działa jako kanoniczny VDR [145].

Znaczenie prowadzonych badań może podkreślić fakt, iż analizowanie mechanizmów regulacji ekspresji genu VDR w komórkach hematopoetycznych jest tematem ważnym, mogącym znaleźć zastosowanie praktyczne. Prowadzone są badania kliniczne (NCT02802267) dotyczące zastosowania analogów witaminy D i środków hipometylujących w kontekście terapii przeciwnowotworowej. Takie leczenie ma umożliwić kontrolowanie masy guza i zapobieganie nawrotom choroby, głównie

poprzez zmniejszenie puli LSC [108]. W obrębie różnych podtypów AML można wyróżnić specyficzne sygnatury epigenetyczne [110], mogące stanowić cel terapeutyczny [128]. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem mysich modeli chorób białaczkowych wykazały, że obserwowana w komórkach AML inaktywacja genu *VDR*, powstała wskutek metylacji jego promotora jest wystarczająca, aby ograniczyć różnicowanie mieloidalne. Tym samym sprawia, że analogi witaminy D tracą swoje zastosowanie jako leki przeciwnowotworowe. Analiza poziomu ekspresji genu *VDR* umożliwia prognozowanie przebiegu procesu różnicowania blastów AML do dojrzałych komórek mieloidalnych. Niski poziom ekspresji *VDR* jest związany z zaburzeniem różnicowania mieloidalnych komórek progenitorowych, o czym świadczy fakt, iż w procesie złośliwej transformacji komórek pochodzących od myszy *VDR* $-/-$ występowało blokowanie różnicowania linii mieloidalnej, zwiększona była także samoodnawialność białaczkowych komórek macierzystych. Aktywacja sygnalizacji *VDR* skutkuje indukcją docelowych genów *VDR*, a wyższy poziom ich ekspresji również koreluje z lepszym rokowaniem u pacjentów z AML [122]. Co ważne, już sama analiza myszy nokautowej *VDR* $-/-$ dostarczyła wiele interesujących wyników w kontekście hematopoezy i białaczek. W porównaniu z myszami WT komórki krwi myszy *VDR* $-/-$ posiadają niedojrzały fenotyp, co ma związek ze zwiększoną klonogennością i sugeruje, że brak ekspresji *VDR* jest czynnikiem sprzyjającym niedojrzałemu stanowi komórek białaczkowych, co skutkuje brakiem ich różnicowania [122]. U myszy nokautowej *VDR* $-/-$ obserwuje się także zwiększenie liczby hematopoetycznych komórek macierzystych (LT-HSC) oraz zmniejszenie liczby mieloidalnych komórek progenitorowych (CMP i GMP), a porównaniu z mysimi modelami dla chorób nowotworowych, zwiększenie liczby białaczkowych komórek macierzystych (LSC). Komórki te różnicują się w monocyty pod wpływem aktywacji sygnalizacji *VDR*, dlatego stanowią cel terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem analogów witaminy D [122]. Sygnalizacja *VDR* ma znaczenie zarówno w normalnej, jak i złośliwej hematopoezie, co wyraża się poprzez utrzymanie prawidłowej homeostazy HSC – świadczy o tym wzrost liczby HSPC u myszy *VDR* $-/-$ [122]. Analiza dojrzałych komórek krwi myszy *VDR* $-/-$ wykazała natomiast prawidłową liczbę monocytów, co świadczy o tym, iż w warunkach ustabilizowanych *VDR* nie jest konieczny do procesu różnicowania komórek szpiku kostnego [142]. Nie zaobserwowano także różnic w ilości płytek krwi, erytrocytów i granulocytów między myszą WT a *VDR* $-/-$. Badania na myszach nokautowych *VDR* $-/-$ nie wykazały zaburzeń w ilości liczby czerwonych

i białych krwinek, pod warunkiem, że zwierzęta te znajdowały się w środowisku wolnym od patogenów [142]. W przeciwnym razie obserwowano zaburzenia w produkcji elementów morfotycznych krwi, przejawiające się występowaniem komórek przypominających blasty białaczkowe, a ponadto obserwowano granulocytozę, trombocytozę oraz zmniejszoną erytropoezę, co dodatkowo potwierdza znaczenie sygnalizacji VDR w hematopoezie [146]. Aktualnie poszukuje się terapii celowanych na nowotworowe komórki macierzyste, które są odpowiedzialne za odnawianie choroby [71]. Terapie skierowane na LSC opierające się na indukcji ekspresji genu *VDR* wydają się interesującą perspektywą, w szczególności dla pacjentów, którzy z różnych względów medycznych nie mogą być poddani chemioterapii. Jednoczesne zastosowanie analogów witaminy D i środków hipometylujących może skutkować aktywowaniem mechanizmów różnicowania uśpionych LSC. Analiza poziomu ekspresji genu *VDR* i stanu metylacji wysp CpG umożliwia zidentyfikowanie komórek, dla których sygnalizacja VDR jest istotna. Daje to możliwość opracowania skutecznych terapii związanych z przywracaniem poziomu ekspresji genu *VDR* lub jej wyhamowaniem. Znając charakterystykę prawidłowych i złośliwych komórek hematopoetycznych w kontekście sygnalizacji VDR można stosować terapie celujące w nowotworowe komórki macierzyste (LSC), przy jednoczesnym zachowaniu krwiotwórczych komórek macierzystych (HSC). Powinno to poprawić skuteczność terapii i przeżycie pacjentów. Teoretycznie istnieje możliwość, że terapia skierowana przeciw białaczkowym komórkom macierzystym może doprowadzić do stanu cytopenii. W rzeczywistości klinicznej nie zaobserwowano jednak zmniejszenia liczby dojrzałych komórek krwi wskutek wyczerpania puli HSC, np. podczas terapeutycznego stosowania ATRA w leczeniu APL. Nie oznacza to jednak, że w przypadku zastosowania czynnika inicjującego różnicowanie komórek w postaci analogów witaminy D nie może dojść do takiej sytuacji. Pozostaje to opcją kliniczną, zależną od różnych czynników [115]. Analiza danych literaturowych nie dostarcza jednoznacznej odpowiedzi dotyczącej tego zagadnienia, mimo stosowania analogów witaminy D do leczenia dużej liczby pacjentów z AML [108].

Działanie przeciwnowotworowe 1,25-dihydroksywitamina D₃, skutkujące aktywacją różnicowania komórek nowotworowych, wpływ sygnalizacji VDR na prawidłowe funkcjonowanie wrodzonej odpowiedzi immunologicznej oraz znaczenia w homeostazie hematopoetycznych komórek macierzystych – wszystkie te informacje podkreślają wagę

badaniach dotyczących receptora witaminy D i znaczenia witaminy D dla prawidłowego funkcjonowania ludzkiego organizmu. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w niniejszym projekcie należy jednak zastanowić się nad zasadnością stosowania mysiego modelu w badaniach dotyczących sygnalizacji VDR w kontekście ludzkiej hematopoezy.

6 Podsumowanie i wnioski

Prace przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej należą do kręgu badań podstawowych. W ramach prowadzonych eksperymentów udało się ustalić następujące informacje:

1. W mysich komórkach krwi występuje jeden wariant transkrypcyjny genu *VDR*, punkt startu transkrypcji nie jest ściśle zlokalizowany, a transkrypcja jest kontrolowana przez pojedynczy region promotorowy.
2. Promotor *VDR* we wszystkich badanych typach komórek jest słabo zmetylowany, jego aktywność nie jest regulowana poprzez mechanizm metylacji DNA.
3. Wśród badanych komórek krwi najniższa ekspresja *VDR* zachodzi w dojrzałych limfocytach T i B, stosunkowo wyższa obserwowana jest w śledzionie, grasicy i szpiku kostnym, a najwyższy poziom obserwuje się w hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych.
4. *RAR* jest obecny i aktywny transkrypcyjnie w badanych komórkach, lecz nie odpowiada za regulację ekspresji genu *VDR*.
5. *VDR* jest obecny i aktywny transkrypcyjnie w badanych komórkach. Wykluczono współdziałanie transkrypcyjne *VDR* i *RAR* w regulacji ekspresji genu *VDR*.
6. W mysich komórkach krwi ekspresja genu *VDR* jest regulowana poprzez mechanizm autoregulacji.
7. Wyniki immunoprecypitacji chromatyny silnie wskazują, że enhancer S1 oraz sekwencja DNA obejmująca VDRE2 i VDRE3 stanowią miejsca wiązania *VDR*.
8. Gen *VDR* ulega ekspresji i jest aktywny nie tylko w całkowicie zróżnicowanych komórkach krwi, lecz także w hematopoetycznych komórkach macierzystych i progenitorowych.

Uzyskane dane dotyczące mechanizmu regulacji ekspresji genu *VDR* znacząco różnią się od danych uzyskanych na modelu ludzkim. Można zatem zastanowić się, czy w przypadku badań dotyczących znaczenia receptora witaminy D w procesie hematopoezy mysz stanowi odpowiedni model badawczy. Wspomniane różnice mogą zakłócać architekturę sygnalizacji *VDR*, tym samym ograniczając możliwość ekstrapolacji uzyskanych wyników na model ludzki.

Bibliografia

1. Omdahl J, Holick M, Suda T, Tanaka Y, DeLuca HF. Biological activity of 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Biochemistry*. 1971 Jul 20;10(15):2935-40
2. Idoko A, Ugwudike PO, Ayomide TA, Blessing NO. Cholesterol and its implications - a review. *Universal Journal of Pharmaceutical Research* 5 (6). 2020, 52-63.
3. Webb AR. Who, what, where and when-influences on cutaneous vitamin D synthesis. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006 Sep;92(1):17-25.
4. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT Jr, Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science*. 1980 Oct 10;210(4466):203-5.
5. Zhu J, DeLuca HF. Vitamin D 25-hydroxylase - Four decades of searching, are we there yet? *Arch Biochem Biophys*. 2012 Jul 1;523(1):30-6.
6. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol*. 2014 Mar 20;21(3):319-29.
7. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys*. 2012 Jul 1;523(1):9-18.
8. P. Rodwell A. Bender V. Botham D. Kennelly K. Weil. "Biochemia Harpera". PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa 2018, 336.
9. Christodoulou S, Goula T, Ververidis A, Drosos G. Vitamin D and bone disease. *Biomed Res Int*. 2013;2013:396541.
10. Kongsbak M, Levring TB, Geisler C, von Essen MR. The vitamin d receptor and T cell function. *Front Immunol*. 2013 Jun 18;4:148.
11. Mathieu C. Vitamin D and the immune system: Getting it right. 2011 *IBMS BoneKEy* 8(4):178-186.
12. Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int*. 2010 Jul;78(2):140-5.
13. Aranow C. Vitamin D and the immune system. *J Investig Med*. 2011 Aug;59(6):881-6.
14. Laudet V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol*. 1997 Dec;19(3):207-26.

15. Feldman J, Pike W, Adams J. "Vitamin D" III. *Academic Press*, Oksford 2011, 139.
16. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 2006 Dec;58(4):685-704.
17. Gocek E, Bourska H, Marchwicka A, Marcinkowska E. Regulation of Leukemic Cell Differentiation through the Vitamin D Receptor at the Levels of Intracellular Signal Transduction, Gene Transcription, and Protein Trafficking and Stability. *Leuk Res Treatment.* 2012;2012:713243.
18. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2007 Sep;7(9):684-700.
19. Bouillon R, Carmeliet G, Boonen S. Ageing and calcium metabolism. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jul;11(2):341-65.
20. Bikle DD. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *J Cell Biochem.* 2004 Jun 1;92(3):436-44.
21. Hii CS, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients.* 2016 Mar 2;8(3):135.
22. Zanello LP, Norman AW. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 alpha,25(OH)₂-vitamin D₃ in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol.* 2004 Nov;18(11):2660-71.
23. Hewison D, Feldman J, Pike W, Bouillon E, Giovannucci D, Goltzman M. „Vitamin D”. IV *Academic Press*, Oksford 2017, 159.
24. Jehan F, DeLuca HF. Cloning and characterization of the mouse vitamin D receptor promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 16;94(19):10138-43.
25. Kaleta B. Vitamin D receptor gene polymorphism in Polish patients with morbid obesity. *Postępy Nauk Medycznych*, 2014; 27(1):65-69
26. Zella LA, Kim S, Shevde NK, Pike JW. Enhancers located within two introns of the vitamin D receptor gene mediate transcriptional autoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Mol Endocrinol.* 2006 Jun;20(6):1231-47.
27. Castro MA, Mombach JC, de Almeida RM, Moreira JC. Impaired expression of NER gene network in sporadic solid tumors. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(6):1859-67.
28. Levine M, Tjian R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature.* 2003 Jul 10;424(6945):147-51.

29. Hervouet E, Vallette FM, Cartron PF. Dnmt1/Transcription factor interactions: an alternative mechanism of DNA methylation inheritance. *Genes Cancer*. 2010 May;1(5):434-43.
30. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 31;103(5):1412-7.
31. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012 May 29;13(7):484-92.
32. Brown TA. "Genomy". *Wydawnictwo Naukowe PWN SA*, Warszawa 2009. str. 285-287.
33. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet*. 2012 Apr 3;13(5):343-57.
34. Ko LJ, Yamamoto M, Leonard MW, George KM, Ting P, Engel JD. Murine and human T-lymphocyte GATA-3 factors mediate transcription through a cis-regulatory element within the human T-cell receptor delta gene enhancer. *Mol Cell Biol*. 1991 May;11(5):2778-84.
35. Allen BL, Taatjes DJ. The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 Mar;16(3):155-66.
36. Plank JL, Dean A. Enhancer function: mechanistic and genome-wide insights come together. *Mol Cell*. 2014 Jul 3;55(1):5-14.
37. Spitz F, Furlong EE. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet*. 2012 Sep;13(9):613-26.
38. Göttgens B. Regulatory network control of blood stem cells. *Blood*. 2015 Apr 23;125(17):2614-20.
39. Marmorstein R, Trievel RC. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jan;1789(1):58-68.
40. Kwak H, Lis JT. Control of transcriptional elongation. *Annu Rev Genet*. 2013;47:483-508.
41. Jonkers I, Kwak H, Lis JT. Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing, chromatin, and exons. *Elife*. 2014 Apr 29;3:e02407.

42. Read RL, Norbury CJ. Roles for cytoplasmic polyadenylation in cell cycle regulation. *J Cell Biochem.* 2002;87(3):258-65.
43. Taylor J, Xiao W, Abdel-Wahab O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood.* 2017 Jul 27;130(4):410-423.
44. Heerema NA et al. Frequency and clinical significance of cytogenetic abnormalities in pediatric T-lineage acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol.* 1998 Apr;16(4):1270-8.
45. Rowley JD, Testa JR. Chromosome abnormalities in malignant hematologic diseases. *Adv Cancer Res.* 1982;36:103-48.
46. Staal FJ, Langerak AW. Signaling pathways involved in the development of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2008 Apr;93(4):493-7.
47. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2018 Oct;93(10):1267-1291.
48. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J.* 2016 Jul 1;6(7):e441.
49. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013 May 30;368(22):2059-74.
50. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 2002 Sep 1;100(5):1532-42.
51. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* 2011 Sep 14;4:36.
52. Kihara R et al. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia.* 2014 Aug;28(8):1586-95.
53. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer.* 2014 May;14(5):342-57.
54. Flores O, Wang Z, Knudsen KE, Burnstein KL. Nuclear targeting of cyclin-dependent kinase 2 reveals essential roles of cyclin-dependent kinase 2 localization and cyclin E in vitamin D-mediated growth inhibition. *Endocrinology.* 2010 Mar;151(3):896-908.

55. Gocek E, Studzinski GP. Vitamin D and differentiation in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46(4):190-209.
56. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC. Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol.* 2009 Jul;19(7):468-83.
57. Colston K, Colston MJ, Feldman D. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology.* 1981 Mar;108(3):1083-6.
58. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, Yoshiki S, Suda T. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Aug;78(8):4990-4.
59. Pereira F, Larriba MJ, Muñoz A. Vitamin D and colon cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2012 May 3;19(3):R51-71.
60. Simboli-Campbell M, Narvaez CJ, van Weelden K, Tenniswood M, Welsh J. Comparative effects of 1,25(OH)₂D₃ and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 1997 Jan;42(1):31-41.
61. Larriba MJ, Muñoz A. SNAIL vs vitamin D receptor expression in colon cancer: therapeutics implications. *Br J Cancer.* 2005 Mar 28;92(6):985-9.
62. Giuli MV, Hanieh PN, Giuliani E, Rinaldi F, Marianecchi C, Screpanti I, Checquolo S, Carafa M. Current Trends in ATRA Delivery for Cancer Therapy. *Pharmaceutics.* 2020 Jul 28;12(8):707.
63. Hoffman E, Mielicki WP. Kwas całkowicie trans-retinowy (ATRA) w prewencji i terapii nowotworów [All-trans retinoic acid (ATRA) in prevention and cancer therapy]. *Postepy Hig Med Dosw* 2010 Jun 9;64:284-90.
64. Clarke N., Germain P., Altucci L., Gronemeyer H.: Mode of action of RAR-RXR heterodimers. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2004; 6: 25–30.
65. Janik S, Nowak U, Łaszkiewicz A, Satyr A, Majkowski M, Marchwicka A, Śnieżewski Ł, Berkowska K, Gabryś M, Cebrat M, Marcinkowska E. Diverse Regulation of Vitamin D Receptor Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D and ATRA in Murine and Human Blood Cells at Early Stages of Their Differentiation. *Int J Mol Sci.* 2017 Jun 21;18(6):1323.

66. Simoni D, Tolomeo M. Retinoids, apoptosis and cancer. *Curr Pharm Des.* 2001 Nov;7(17):1823-37.
67. Soprano DR, Qin P, Soprano KJ. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr.* 2004;24:201-21.
68. Peng X, Yun D, Christov K. Breast cancer progression in MCF10A series of cell lines is associated with alterations in retinoic acid and retinoid X receptors and with differential response to retinoids. *Int J Oncol.* 2004 Oct;25(4):961-71.
69. Brackman D, Lund-Johansen F, Aarskog D. Expression of cell surface antigens during the differentiation of HL-60 cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, retinoic acid and DMSO. *Leuk Res.* 1995 Jan;19(1):57-64.
70. Lee HJ, Johnson C, Trump D, Wetzler M. Vitamin D and Acute Myeloid Leukemia. *J. Cancer* 2010; (3):101–107.
71. Marchwicka A, Cebrat M, Łaszkiewicz A, Śnieżewski Ł, Brown G, Marcinkowska E. Regulation of vitamin D receptor expression by retinoic acid receptor alpha in acute myeloid leukemia cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016 May;159:121-30.
72. Hua S, Kittler R, White KP. Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer. *Cell.* 2009 Jun 26;137(7):1259-71.
73. Szczeklik A, Gajewski P. „Choroby wewnętrzne”. *Medycyna Praktyczna*, Kraków 2010, s. 1445-1448.
74. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development.* 2013 Jun;140(12):2463-7.
75. Krzymowski T, Przała J. Fizjologia zwierząt : podręcznik dla studentów wydziałów medycyny weterynaryjnej, wydziałów biologii i hodowli zwierząt akademii rolniczych i uniwersytetów: praca zbiorowa. *Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne*, Warszawa 2005, s. 228-230.
76. Brown G, Ceredig R. Modeling the Hematopoietic Landscape. *Front Cell Dev Biol.* 2019 Jun 18;7:104.
77. Bell JJ, Bhandoola A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature.* 2008 Apr 10;452(7188):764-7.
78. Brown G, Tsapogas P, Ceredig R. The changing face of hematopoiesis: a spectrum of options is available to stem cells. *Immunol Cell Biol.* 2018 Oct;96(9):898-911.

79. Wada H, Masuda K, Satoh R, Kakugawa K, Ikawa T, Katsura Y, Kawamoto H. Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature*. 2008 Apr 10;452(7188):768-72.
80. Yamane T. Mouse Yolk Sac Hematopoiesis. *Front Cell Dev Biol*. 2018 Jul 20;6:80.
81. Aurrand-Lions M, Mancini SJC. Murine Bone Marrow Niches from Hematopoietic Stem Cells to B Cells. *Int J Mol Sci*. 2018 Aug 10;19(8):2353.
82. Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene*. 2007 Oct 15;26(47):6816-28.
83. Brown G, Hughes PJ, Michell RH, Rolink AG, Ceredig R. The sequential determination model of hematopoiesis. *Trends Immunol*. 2007 Oct;28(10):442-8.
84. Tsang AP, Fujiwara Y, Hom DB, Orkin SH. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev*. 1998 Apr 15;12(8):1176-88.
85. Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington CJ, Mizuno S, Imanishi J, Akashi K, Tenen DG. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol*. 2006 Jul;7(7):732-9.
86. Rhodes J, Hagen A, Hsu K, Deng M, Liu TX, Look AT, Kanki JP. Interplay of pu.1 and gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev Cell*. 2005 Jan;8(1):97-108.
87. Burns CE, Traver D, Mayhall E, Shepard JL, Zon LI. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev*. 2005 Oct 1;19(19):2331-42.
88. Mucenski ML, McLain K, Kier AB, Swerdlow SH, Schreiner CM, Miller TA, Pietryga DW, Scott WJ Jr, Potter SS. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell*. 1991 May 17;65(4):677-89.
89. Luis TC, Ichii M, Brugman MH, Kincade P, Staal FJ. Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):414-21.
90. Luis TC, Naber BA, Roozen PP, Brugman MH, de Haas EF, Ghazvini M, Fibbe WE, van Dongen JJ, Fodde R, Staal FJ. Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. *Cell Stem Cell*. 2011 Oct 4;9(4):345-56.
91. Guruharsha KG, Kankel MW, Artavanis-Tsakonas S. The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet*. 2012 Sep;13(9):654-66.

92. Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C, Voorhies H, Manger RL, Bernstein ID. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med*. 2010 Feb;16(2):232-6.
93. Katsumura KR, DeVilbiss AW, Pope NJ, Johnson KD, Bresnick EH. Transcriptional mechanisms underlying hemoglobin synthesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Sep 1;3(9):a015412.
94. Gruber TA, Downing JR. The biology of pediatric acute megakaryoblastic leukemia. *Blood*. 2015 Aug 20;126(8):943-9.
95. Ho IC, Tai TS, Pai SY. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2009 Feb;9(2):125-35.
96. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol*. 2007 May;8(5):463-70.
97. Turkistany SA, DeKoter RP. The transcription factor PU.1 is a critical regulator of cellular communication in the immune system. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011 Dec;59(6):431-40.
98. Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*. 2002 May 13;21(21):3295-313.
99. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010 Nov-Dec;2(6):640-53.
100. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012 Feb 3;10(2):120-36.
101. Promoterless NanoLuc® Genetic Reporter Basic Vector, [online] <https://pl.promega.com/products/luciferase-assays/genetic-reporter-vectors-and-cell-lines/promoterless-nanoluc-genetic-reporter-basic-vectors/?catNum=N1001>
102. pRL Renilla Luciferase Control Reporter Vector, [online] <https://pl.promega.com/products/luciferase-assays/genetic-reporter-vectors-and-cell-lines/prl-renilla-luciferase-control-reporter-vectors/?catNum=E2231>
103. Promoter-Driven Control Firefly Luciferase Vector, [online] <https://pl.promega.com/products/luciferase-assays/genetic-reporter-vectors-and-cell-lines/promoter-driven-control-firefly-luciferase-vectors/?catNum=E6681>
104. pGEM®-T Easy Vector, [online] <https://pl.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>

105. Majchrzak A, Baer-Dubowska W. Markery epigenetyczne w diagnostyce: Metody oceny metylacji DNA. *Journal of Laboratory Diagnostics*. 2009;45(2): 167-173.
106. Anish R, Hossain MB, Jacobson RH, Takada S. Characterization of transcription from TATA-less promoters: identification of a new core promoter element XCPE2 and analysis of factor requirements. *PLoS One*. 2009;4(4):e5103.
107. Aglianó AM, Santangelo C, Silvestri I, Gazzaniga P, Giuliani L, Naso G, Frati L, Castiglia R. On chromosomal instability: what is the karyotype of your 32D Cl3 cell line. *Blood*. 2000 Jun 1;95(11):3636-7.
108. Zjablovskaja P, Danek P, Kardosova M, Alberich-Jorda M. Proliferation and Differentiation of Murine Myeloid Precursor 32D/G-CSF-R Cells. *J Vis Exp*. 2018 Feb 21;(132):57033.
109. Carlberg C, Bendik I, Wyss A, Meier E, Sturzenbecker LJ, Grippo JF, Hunziker W. Two nuclear signalling pathways for vitamin D. *Nature*. 1993 Feb 18;361(6413):657-60.
110. Monod J, Jacob F. Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1961;26:389-401.
111. Perlman RL. Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evol Med Public Health*. 2016 May 21;2016(1):170-6.
112. Bolker J. Model organisms: There's more to life than rats and flies. *Nature*. 2012 Nov 1;491(7422):31-3.
113. Marcinkowska E. The Vitamin D System in Humans and Mice: Similar but Not the Same. *Reports*. 2020;3(1):1.
114. Springer MS, Murphy WJ. Mammalian evolution and biomedicine: new views from phylogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2007 Aug;82(3):375-92.
115. Rader, K. A. Making Mice: Standardizing Animals for American Biomedical Research, 1900–1955. *Princeton NJ: Princeton University Press*. 2004
116. Kerbel RS. What is the optimal rodent model for anti-tumor drug testing? *Cancer Metastasis Rev*. 1998-1999;17(3):301-4.
117. Anisimov VN, Ukraintseva SV, Yashin AI. Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans? *Nat Rev Cancer*. 2005 Oct;5(10):807-19.

118. Adams DJ. The Valley of Death in anticancer drug development: a reassessment. *Trends Pharmacol Sci.* 2012 Apr;33(4):173-80.
119. Elsea SH, Lucas RE. The mousetrap: what we can learn when the mouse model does not mimic the human disease. *ILAR J.* 2002;43(2):66-79.
120. Kraja AT, Province MA, Huang P, Jarvis JP, Rice T, Cheverud JM, Rao DC. Trends in metabolic syndrome and gene networks in human and rodent models. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2008 Sep;8(3):198-207.
121. Ravasi T et al. An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell.* 2010 Mar 5;140(5):744-52.
122. Paubelle E et al. Vitamin D Receptor Controls Cell Stemness in Acute Myeloid Leukemia and in Normal Bone Marrow. *Cell Rep.* 2020 Jan 21;30(3):739-754.e4.
123. von Bahr L et al. Increased incidence of chronic GvHD and CMV disease in patients with vitamin D deficiency before allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2015 Sep;50(9):1217-23.
124. Nowak U, Janik S, Marchwicka A, Łaszkiewicz A, Jakuszek A, Cebrat M, Marcinkowska E. Investigating the Role of Methylation in Silencing of *VDR* Gene Expression in Normal Cells during Hematopoiesis and in Their Leukemic Counterparts. *Cells.* 2020 Aug 29;9(9):1991.
125. Gocek E, Marchwicka A, Bauska H, Chrobak A, Marcinkowska E. Opposite regulation of vitamin D receptor by ATRA in AML cells susceptible and resistant to vitamin D-induced differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012 Nov;132(3-5):220-6.
126. Shearstone JR, Pop R, Bock C, Boyle P, Meissner A, Socolovsky M. Global DNA demethylation during mouse erythropoiesis in vivo. *Science.* 2011 Nov 11;334(6057):799-802.
127. Akalin A et al. Base-pair resolution DNA methylation sequencing reveals profoundly divergent epigenetic landscapes in acute myeloid leukemia. *PLoS Genet.* 2012;8(6):e1002781.
128. Abdel-Wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013 May 2;121(18):3563-72.

129. Migliaccio G, Migliaccio AR, Kreider BL, Rovera G, Adamson JW. Selection of lineage-restricted cell lines immortalized at different stages of hematopoietic differentiation from the murine cell line 32D. *J Cell Biol.* 1989 Aug;109(2):833-41.
130. Lee SM, Meyer MB, Benkusky NA, O'Brien CA, Pike JW. Mechanisms of Enhancer-mediated Hormonal Control of Vitamin D Receptor Gene Expression in Target Cells. *J Biol Chem.* 2015 Dec 18;290(51):30573-86.
131. Gribnau J, Diderich K, Pruzina S, Calzolari R, Fraser P. Intergenic transcription and developmental remodeling of chromatin subdomains in the human beta-globin locus. *Mol Cell.* 2000 Feb;5(2):377-86.
132. Strom M, Sandgren ME, Brown TA, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 up-regulates the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Dec;86(24):9770-3.
133. Abulmeaty A. Sunlight exposure vs. vitamin D supplementation on bone homeostasis of vitamin D deficient rats. *Clinical Nutrition Experimental.* 2017;11:1e9
134. Liu PT et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006 Mar 24;311(5768):1770-3.
135. Ioannidis JP. Extrapolating from animals to humans. *Sci Transl Med.* 2012 Sep 12;4(151):151ps15.
136. Pound P, Bracken MB. Is animal research sufficiently evidence based to be a cornerstone of biomedical research? *BMJ.* 2014 May 30;348:g3387.
137. Khanna R, Burrows SR. Human immunology: a case for the ascent of non-furry immunology. *Immunol Cell Biol.* 2011 Mar;89(3):330-1.
138. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 2004 Mar 1;172(5):2731-8.
139. Bailey M, Christoforidou Z, Lewis MC. The evolutionary basis for differences between the immune systems of man, mouse, pig and ruminants. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013 Mar 15;152(1-2):13-9.
140. Riddell J, Gazit R, Garrison BS, Guo G, Saadatpour A, Mandal PK, Ebina W, Volchkov P, Yuan GC, Orkin SH, Rossi DJ. Reprogramming committed murine

- blood cells to induced hematopoietic stem cells with defined factors. *Cell*. 2014 Apr 24;157(3):549-64.
141. Dimitrov V, White JH. Species-specific regulation of innate immunity by vitamin D signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016 Nov;164:246-253.
142. O'Kelly J, Hisatake J, Hisatake Y, Bishop J, Norman A, Koeffler HP. Normal myelopoiesis but abnormal T lymphocyte responses in vitamin D receptor knockout mice. *J Clin Invest*. 2002 Apr;109(8):1091-9.
143. Cortes M, Chen MJ, Stachura DL, Liu SY, Kwan W, Wright F, Vo LT, Theodore LN, Esain V, Frost IM, Schlaeger TM, Goessling W, Daley GQ, North TE. Developmental Vitamin D Availability Impacts Hematopoietic Stem Cell Production. *Cell Rep*. 2016 Oct 4;17(2):458-468.
144. Cortes M, Liu SY, Kwan W, Alexa K, Goessling W, North TE. Accumulation of the Vitamin D Precursor Cholecalciferol Antagonizes Hedgehog Signaling to Impair Hemogenic Endothelium Formation. *Stem Cell Reports*. 2015 Oct 13;5(4):471-9.
145. Lin CH, Su CH, Tseng DY, Ding FC, Hwang PP. Action of vitamin D and the receptor, VDRa, in calcium handling in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One*. 2012;7(9):e45650.
146. Erben RG, Zeitz U, Weber K, Stierstorfer B, Wolf G, Schmahl W, Balling R, Quintanilla-Martinez L. A non-functioning vitamin D receptor predisposes to leukaemoid reactions in mice. *Hematol Oncol*. 2010 Dec;28(4):185-91.

Spis rycin i tabel

| | |
|--|-----|
| Rycina 1. Wzór chemiczny cholesterolu, cholekalcyferolu oraz kalcytriolu..... | 20 |
| Rycina 2. Synteza, degradacja oraz działanie kalcytriolu..... | 21 |
| Rycina 3. Schemat budowy receptora witaminy D..... | 23 |
| Rycina 4. Działanie genomowe kalcytriolu na transkrypcję docelowych genów..... | 24 |
| Rycina 5. Niegenomowe działanie receptora witaminy D..... | 26 |
| Rycina 6. Organizacja mysiego genu receptora witaminy D..... | 27 |
| Rycina 7. Metylacja cytozyny..... | 29 |
| Rycina 8. Hematopoeza..... | 39 |
| Rycina 9. Alternatywny model hematopoezy..... | 40 |
| Rycina 10. Mysia hematopoeza..... | 42 |
| Rycina 11. Mapa plazmidu pNL 1.2..... | 53 |
| Rycina 12. Mapa plazmidu pRL-TK..... | 53 |
| Rycina 13. Mapa plazmidu pGL4.53..... | 53 |
| Rycina 14. Mapa plazmidu pGEM-T easy..... | 54 |
| Rycina 15. Schemat reakcji klonowania niezależnego od sekwencji i ligacji..... | 64 |
| Rycina 16. Modyfikacja DNA przy pomocy wodorosiarczanu IV sodu..... | 83 |
| Rycina 17. Miejsca startu transkrypcji genu <i>VDR</i> w wybranych mysich narządach..... | 90 |
| Rycina 18. Analiza liczebności mysich HSPC przed i po izolacji magnetyczne..... | 91 |
| Rycina 19. Analiza 96-godzinnej hodowli mysich HSPC..... | 92 |
| Rycina 20. Ekspresja genu <i>VDR</i> u myszy typu dzikiego..... | 93 |
| Rycina 21. Organizacja mysiego locus <i>VDR</i> | 95 |
| Rycina 22. Ekspresja genu <i>VDR</i> w wybranych mysich tkankach..... | 96 |
| Rycina 23. Badanie aktywności transkrypcyjnej RAR..... | 97 |
| Rycina 24. Badanie aktywności transkrypcyjnej <i>VDR</i> | 98 |
| Rycina 25. Ekspresja genu <i>VDR</i> w różnych populacjach hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych..... | 100 |
| Rycina 26. Ekspresja genu <i>Cyp26a1</i> w różnych populacjach hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych..... | 101 |
| Rycina 27. Ekspresja genu <i>Cyp24a1</i> w różnych populacjach hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych..... | 102 |

| | |
|---|-----|
| Rycina 28. Schemat hipotetycznego mechanizmu autoregulacji receptora witaminy D .. | 104 |
| Rycina 29. Wykres ekspresji genu <i>VDR</i> w linii 32D | 105 |
| Rycina 30. Wykres ekspresji genu <i>Cyp24a1</i> w linii 32D..... | 105 |
| Rycina 31. Sekwencja nukleotydowa przedstawiająca konstrukt III | 107 |
| Rycina 32. Analiza elektroforetyczna długości fragmentów chromatyny otrzymanych w wyniku sonikacji | 109 |
| Rycina 33. Analiza ChIP-PCR z wykorzystaniem linii komórkowej 32D | 111 |
| Rycina 34. Schemat przedstawiający umiejscowienie klonowanych fragmentów w obrębie mysiego <i>locus VDR</i> | 112 |
| Rycina 35. Elektroforeza żelowa przedstawiająca sklonowane konstrukty | 113 |
| Rycina 36. Schemat wektora pNL1.2..... | 114 |
| Rycina 37. Schemat wektora pNL1.2..... | 115 |
| Rycina 38. Analiza wyników testu lucyferazowego przeprowadzonego na linii 32D..... | 116 |
| Rycina 39. Regulacja ekspresji genu <i>VDR</i> u myszy i człowieka. | 123 |
| | |
| Tabela 1. Wykaz odczynników chemicznych, komercyjnych zestawów, enzymów i przeciwciał odczynników wykorzystanych podczas realizacji projektu. | 47 |
| Tabela 2. Wykaz buforów i mediów hodowlanych wykorzystanych podczas realizacji projektu. | 50 |
| Tabela 3. Wykaz starterów oligonukleotydowych wykorzystanych podczas realizacji projektu. | 52 |
| Tabela 4. Wykaz plazmidów wykorzystanych podczas realizacji pracy. | 53 |
| Tabela 5. Wykaz aparatury stosowanej podczas realizacji pracy. | 54 |
| Tabela 6. Składniki reakcji odwrotnej transkrypcji. | 59 |
| Tabela 7. Program reakcji odwrotnej transkrypcji..... | 59 |
| Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej z użyciem polimerazy DreamTaq. | 60 |
| Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej z użyciem polimerazy Phusion..... | 60 |
| Tabela 10. Program reakcji PCR dla Polimerazy DNA DreamTaq. | 60 |
| Tabela 11. Program reakcji PCR dla Polimerazy DNA Phusion Hot Start II..... | 60 |
| Tabela 12. Ogólny schemat mieszaniny reakcji trawienia restrykcyjnego. | 62 |
| Tabela 13. Skład reakcji defosforylacji..... | 62 |

| | |
|--|----|
| Tabela 14. Skład reakcji ligacji..... | 63 |
| Tabela 15. Skład reakcji SLIC. | 65 |
| Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej EXO/SAP. | 66 |
| Tabela 17. Program reakcji EXO/SAP. | 66 |
| Tabela 18. Skład reakcji sekwencjonowania. | 66 |
| Tabela 19. Warunki reakcji sekwencjonowania | 67 |
| Tabela 20. Skład reakcji przyłączania reszt adeniny do 3' końca nici DNA..... | 71 |
| Tabela 21. Warunki prowadzenia hodowli wybranych linii komórkowych..... | 73 |
| Tabela 22. Składniki reakcji Real-time PCR..... | 80 |
| Tabela 23. Warunki prowadzenia reakcji Real-Time PCR..... | 80 |
| Tabela 24. Skład reakcji defosforylacji z użyciem alkalicznej fosfatazy. | 81 |
| Tabela 25. Skład reakcji defosforylacji z użyciem kwaśnej pirofosfatazy..... | 81 |
| Tabela 26. Skład reakcji ligacji oligonukleotydowego adaptera. | 82 |