

Vežanje proteina CTCF i BORIS na promotor gena TOP2A u stanicama Cal 27

Ćuk, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:874330>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Katarina Ćuk

**Vežanje proteina CTCF i BORIS na promotor gena *TOP2A*
u stanicama Cal 27**

Diplomski rad

Zagreb, 2009. godina

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za epigenomiku (Zavod za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu) pod vodstvom dr. sc. Renate Novak-Kujundžić, znanstveni suradnik. Predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer: molekularna biologija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

VEZANJE PROTEINA CTCF I BORIS NA PROMOTOR GENA **TOP2A** U STANICAMA CAL 27

Katarina Ćuk

Laboratorij za epigenomiku, Institut R. Bošković, Bijenička cesta 54, 10002 Zagreb

Topoizomeraza II α (kodirana genom **TOP2A**) je enzim neophodan za preživljavanje stanica. Razina tog enzima je često povišena u zloćudnim tumorima i povezuje se sa osjetljivošću stanica na citotoksične lijekove. Protein CTCF i njegov paralog BORIS, koji se ispoljava samo u subpopulaciji spermatoocita te aberantno u brojnim tumorima, imaju važnu ulogu u uspostavljanju i održavanju metilacije DNK i regulaciji transkripcije brojnih gena. S obzirom da se ova dva proteina mogu vezati na ista mjesta u genomu, ali imaju različitu ulogu u regulaciji transkripcije, cilj ovog rada bio je utvrditi da li se oni vežu na promotor gena **TOP2A**. Tretmanom 3-aminobenzamidom sam potaknula ispoljavanje proteina BORIS u stanicama Cal 27 te metodom kromatinske imunoprecipitacije pokazala da se proteini CTCF i BORIS vežu na navedeni promotor. Rezultati ovog istraživanja će olakšati upoznavanje uloge ovih proteina u regulaciji transkripcije gena **TOP2A** i primjenjivosti njezine modulacije u nalaženju novih pristupa u liječenju tumora.

(50 stranica, 19 slika, 1 tablica, 92 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: **TOP2A** promotor, CTCF, BORIS, kromatinska imunoprecipitacija

Voditelj: Dr. sc. Renata Novak-Kujundžić, znanstveni suradnik

Suvoditelj: Prof. dr. sc. Nada Oršolić, redoviti profesor

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Dr. sc. Renata Novak- Kujundžić

Doc. dr. sc. Maja Matulić

Prof. dr. sc. Gordana Rusak

Zamjena: Doc. dr. sc. Zoran Tadić

Rad prihvaćen: 06. svibnja 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

BINDING OF CTCF AND BORIS TO **TOP2A** PROMOTER IN CAL 27 CELLS

Katarina Ćuk

Laboratorij za epigenomiku, Institut R. Bošković, Bijenička cesta 54, 10002 Zagreb

The enzyme topoisomerase II α (encoded by **TOP2A**) is essential for cell survival. Its expression is often upregulated in malignant tumors and has been implicated in cellular sensitivity to cytotoxic drugs. Protein CTCF and its paralogue BORIS, which is normally expressed only in a subpopulation of spermatocytes and aberrantly in various tumors, have important roles in the establishment and maintenance of DNA methylation and transcriptional regulation. Since those two proteins bind to the same DNA motifs, but have different roles in transcriptional regulation, the aim of this study was to investigate their association with the **TOP2A** promoter. With an 3-aminobenzamide treatment I have induced BORIS in Cal 27 cells and by chromatin immunoprecipitation demonstrated that CTCF and BORIS bind to the **TOP2A** promoter. Results of this study facilitate further investigation of their role in the regulation of **TOP2A** transcription and the applicability of its modulation in the therapy of malignant tumors.

(50 pages, 19 figures, 1 table, 92 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: **TOP2A** promoter, CTCF, BORIS, chromatin immunoprecipitation

Supervisor: Dr. sc. Renata Novak-Kujundžić, Research Associate

Co-supervisor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Reviewers: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Dr. sc. Renata Novak-Kujundžić

Doc. dr. sc. Maja Matulić

Prof. dr. sc. Gordana Rusak

Substitution: Doc. dr. sc. Zoran Tadić

Thesis accepted: 06. May 2009.

Popis kratica:

3-AB	3-aminobenzamid
ATP	adenozin-trifosfat
BSA	goveđi serumski albumin (engl. «bovine serum albumin»)
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medij
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamin-tetraoctena kiselina
kDa	kilodalton; mjerna jedinica za molekularnu masu
LOH	gubitak heterozigotnosti (engl. «loss of heterozygosity»)
Tris	Tris[hidroksimetil]aminometan
SDS	natrijev dodecil sulfat
Pa	paskal; mjerna jedinica za tlak
PBS	fosfatni pufer
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
TE	Tris-EDTA
TAE	Tris-acetat EDTA pufer
mRNK	glasnička mRNK

Sadržaj rada:

1. UVOD.....	1
1.1. Topoizomeraza II α	1
1.1.1. Topoizomeraze i njihova uloga.....	1
1.1.2. Topoizomeraza tipa II i njene izoforme.....	2
1.1.3. Građa i aktivnost promotora gena TOP2A.....	3
1.1.4. Topoizomeraza II α i rak.....	6
1.2. CTCF (engl. «CCCTC binding factor»).....	7
1.2.1. Protein CTCF.....	7
1.2.2. Uloga CTCF-a u regulaciji transkripcije.....	8
1.2.3. CTCF i rak.....	9
1.3. BORIS (engl. «Brother of the Regulator of Imprinted Sites»).....	9
1.3.1. Protein BORIS.....	9
1.3.2. Uloga i regulacija BORIS-a.....	10
1.3.3. BORIS i rak.....	11
1.4. Kromatinska imunoprecipitacija.....	12
1.5. Ciljevi istraživanja.....	13
2. MATERIJALI I METODE.....	14
2.1. Materijali.....	14
2.1.1. Kemikalije.....	14
2.1.2. Puferi i otopine.....	15
2.1.3. Sterilizacija otopina i opreme.....	16
2.1.4. Stanična linija.....	16
2.1.5. Specifična protutijela.....	17
2.1.6. Oligonukleotidne početnice.....	17
2.2. Metode.....	18
2.2.1. Uzgoj stanica Cal 27.....	18
2.2.2. Tretman Cal 27 stanica 3-aminobenzamidom.....	18
2.2.3. Određivanje broja stanica.....	18
2.2.4. Fiksacija formaldehidom i liza stanica.....	18
2.2.5. Sonifikacija lizata.....	19
2.2.5.1. Sonifikacija.....	19
2.2.5.2. Izolacija DNK za provjeru fragmentacije kromatina.....	19
2.2.5.3. Provjera fragmentacije kromatina.....	20
2.1.6. Imunoprecipitacija.....	20

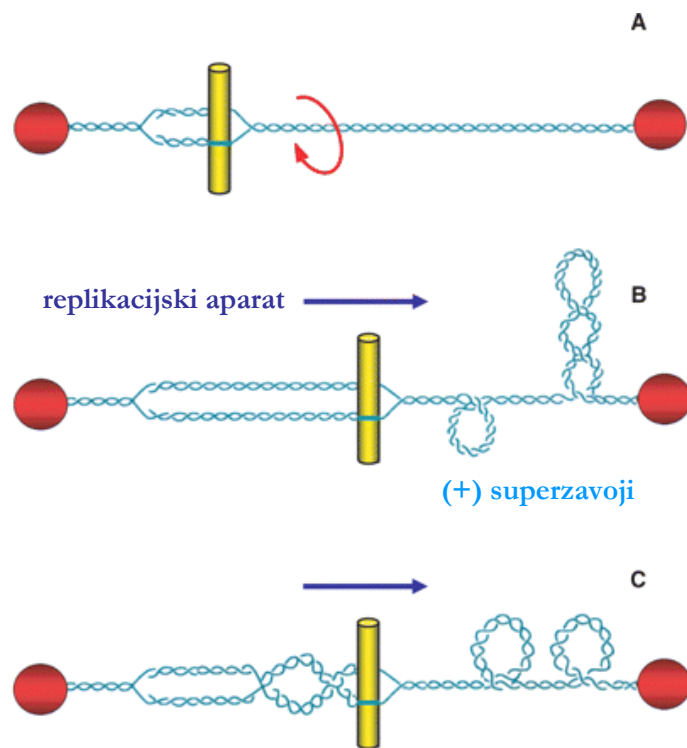
2.1.6.1. Taloženje imunokompleksa.....	20
2.1.6.2. Ispiranje istaloženih imunokompleksa.....	21
2.1.7. Elucija DNK sa istaloženih imunokompleksa.....	21
2.1.8. Izolacija imunoprecipitirane DNK.....	21
2.1.9. Određivanje efikasnosti kromatinske imunoprecipitacije.....	22
2.1.9.1. Semikvantitativna lančana reakcija polimerazom za izolatorsku regiju gena c-myc	22
2.1.9.2. Izračunavanje efikasnosti kromatinske imunoprecipitacije.....	22
2.1.10. Lančana reakcija polimerazom za promotor gena TOP2A	22
2.1.10.1. Optimizacija lančane reakcije polimerazom za promotor gena TOP2A	22
2.1.10.2. Lančana reakcija polimerazom za promotor gena TOP2A	23
2.1.11. Uzgoj i tretman Cal 27 stanica za pokus s magnetnim kuglicama.....	23
2.1.12. Priprema kompleksa protutijelo-magnetna kuglica.....	23
2.1.13. Određivanje broja stanica.....	24
2.1.14. Fiksacija formaldehidom.....	24
2.1.15. Liza stanica.....	24
2.1.16. Sonifikacija lizata.....	24
2.1.16.1. Sonifikacija.....	24
2.1.16.2. Određivanje koncentracije DNK.....	25
2.1.17. Imunoprecipitacija u pokusu sa magnetnim kuglicama.....	25
2.1.17.1. Taloženje imunokompleksa.....	25
2.1.17.2. Ispiranje istaloženih imunokompleksa.....	25
2.1.18. Elucija DNK sa imunokompleksa istaloženih pomoću magnetnih kuglica.....	25
2.1.19. Izolacija imunoprecipitirane DNK.....	26
2.1.20. Semikvantitativna lančana reakcija polimerazom za izolatorsku regiju gena c-myc	26
2.1.21. Lančana reakcija polimerazom za promotor gena TOP2A	26
3. REZULTATI.....	28
3.1. Provjera fragmentacije kromatina.....	28
3.2. Određivanje efikasnosti kromatinske imunoprecipitacije.....	28
3.2.6. Semikvantitativna lančana reakcija polimerazom za izolatorsku regiju gena c-myc	29
3.2.7. Izračunavanje efikasnosti kromatinske imunoprecipitacije.....	30
3.3. Optimizacija lančane reakcije polimerazom za promotor gena TOP2A	32
3.4. Lančana reakcija polimerazom za promotor gena TOP2A	33
4. RASPRAVA.....	35
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	41

1. UVOD

1.1. Topoizomeraza II α

1.1.1. Topoizomeraze i njihova uloga

Topoizomeraze su enzimi, koji su nužni za metabolizam molekula DNK time što moduliraju njihovo topološko stanje (Davies 1996; Joshi i sur. 2003; McClendon i Osheroff 2007). U svim živim sustavima dvostruka uzvojnica DNK je negativno superzavijena što joj daje jednolančani karakter i uvelike olakšava odvajanje lanaca potrebno za neke stanične procese poput replikacije (Espeli i Marians 2004). Enzimi koji se linerano pokreću po lancima DNK (primjerice helikaze i polimeraze) ispred sebe komprimiraju zavoje DNK u manju regiju (Slika 1). Stoga u dvostruko uzvojnici nizvodno od tih enzima nastaju pozitivni superzavoji koji otežavaju otvaranje strukture dvostruke uzvojnice i tako blokiraju esencijalne procese poput replikacije (Wang 2002). Takve i slične topološke probleme rješavaju topoizomeraze (Wang 2002).

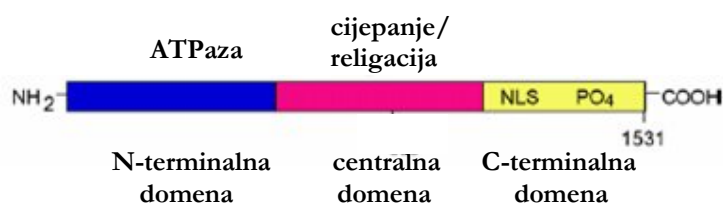


Slika 1. A: Replikacijski aparat je prikazan kao žuti štapić, a crvene kuglice predstavljaju hipotetsku nepokretnu strukturu (npr. jezgrina membrana). B: Ako je replikacijski aparat nepokretan, DNK se okreće kako prolazi kroz njega i pozitivni superzavoji se nakupljaju ispred replikacijske rašlje. C: Ako se replikacijski aparat može rotirati oko osi nereplicirane DNK, onda ta rotacija omogućava preraspodjelu pozitivnih superzavoja, koji se nalaze ispred rašlje, u područje iza nje, što dovodi do zapetljavanja/ispreplitanja para dupliciranih dvostrukih uzvojnica (kao prikazano) i/ili k pozitivnog superzavijanja te regije (nije prikazano). Takve topološke probleme rješava topoizomeraza tipa II. Preuzeto iz Wang (2002).

Stanice sisavaca sadrže dva tipa topoizomeraza (tip I i II). Ovi enzimi smanjuju torzijski stres u dvostrukoj uzvojnici DNK pomoću različitih katalitičkih mehanizama, koji uključuju prisutnost bivalentnog kationa, a u slučaju topoizomeraza tipa II i ATP (Berg i sur. 2002). Topoizomeraze tipa I stvaraju privremene jednolančane lomove u dvostrukoj uzvojnici DNK te tako igraju važnu ulogu u održavanju stabilnosti genoma; a topoizomeraze tipa II stvaraju privremene dvolančane lomove (Davies 1996) te su nužne za odvijanje procesa replikacije, transkripcije, rekombinacije, kondenzacije i odvajanja kromosoma tijekom mitoze i mejoze, a možda i za popravak DNK (Wang 2002).

1.1.2. Topoizomeraza tipa II i njene izoforme

Pronađene su dvije različite izoforme topoizomeraze tipa II kod sisavaca, topoizomeraza II α (TOP2A) i topoizomeraza II β (TOP2B) (Magan i sur. 2003; Williams i sur. 2007). Izoforme α i β imaju visok stupanj homologije slijeda aminokiselina (~70%), iako su kodirane različitim genima (TOP2A na kromosomu 17, a TOP2B na kromosomu 3) (Grue i sur. 1998; Fritz i sur. 2005). Primarna struktura im je veoma slična i može se, na temelju homologije slijeda aminokiselina sa bakterijskom topoizomerazom tipa II (DNK girazom), podijeliti u tri domene (Berg i sur. 2002; McClendon i Osheroff 2007): (1) N-terminalna domena (prvih 670 aminokiselina) sa mjestom za vezanje i hidrolizu ATP-a, (2) centralna domena (aminokiseline ~671-1200) sa tirozinom u aktivnom području važnom za cijepanje i ligaciju DNK te (3) C-terminalna domena (aminokiseline ~1200-1621), koja je veoma varijabilna, a sadrži mjesta za fosforilaciju, slijed odgovoran za smještaj u jezgri te ima ulogu u prepoznavanju geometrije DNK (Slike 2 i 3).



Slika 2. Shematski prikaz domena topoizomeraze tipa II. N-terminalna domena (plavo) ima ATP-aznu ulogu, centralna domena (ružo) cijepa i ligira DNK, a C-terminalna domena (žuto) je varijabilna i sadrži neka regulatorna mjesta. Preuzeto iz McClendon i Osheroff (2007).

Izoforme α i β se razlikuju svojim molekularnim masama (izoforma α ima 170 kDa, a β 180 kDa), stupnjem ispoljavanja te fiziološkim ulogama (Wang i sur. 1997; Falck i sur. 1999). Izoforma α je neophodna za preživljavanje stanica koje se dijele i rastu te joj se ispoljavanje dramatično

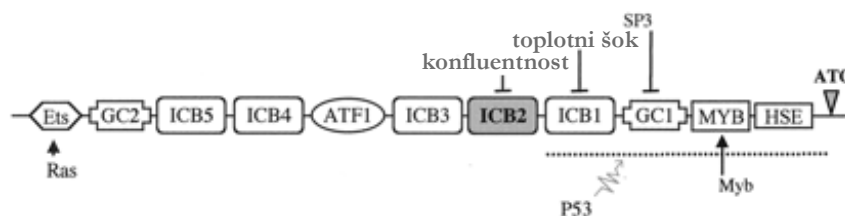


pojačava tijekom stanične proliferacije. Tako se ona pojačano ispoljava pri ulasku u stanični ciklus i vrhunac postiže u G_2/M fazi (Woessner i sur. 1991; Adachi i sur. 2000). Njeno pojačano ispoljavanje se povezuje i sa malignom transformacijom stanica (Grue i sur. 1998). Suprotno tome, stanice u mirovanju ispoljavaju izoformu β , ali ne i α (Isaacs i sur. 1996; Hopfner i sur. 2000). Točna uloga izoforme β za sada nije poznata, ali se zna da je nužna za razvoj neurona (McClendon i Osheroff 2007). Također se smatra da ima ulogu u transkripciji hormonalno i razvojno reguliranih gena (Ju i sur. 2006).

Slika 3. Vrpčasti dijagram kristalne strukture homodimera kvašćeve topoizomeraze tipa II. N-terminalna domena je prikazana žutom i narančastom bojom, a centralna domena crvenom i plavom. Za sada nema informacija o kristalnoj strukturi C-terminalne domene. Preuzeto iz McClendon i Osheroff (2007).

1.1.3. Građa i aktivnost promotora gena *TOP2A*

Aktivnost promotora gena *TOP2A* je regulirana tijekom staničnog ciklusa tako da je smanjena u G_0/G_1 , a pojačana u G_2/M fazama (Adachi i sur. 2000). Ispoljavanje gena *TOP2A* povećano je, primjerice, u snažno proliferirajućim stanicama nakon izlaganja toplotnom šoku (Matsuo i sur. 1993) i djelovanjem ras onkogeno (Chen i sur. 1999). S druge strane, ispoljavanje se smanjuje djelovanjem proteina p53 (Wang i sur. 1997; Joshi i sur. 2003) i zbog zastoja u rastu konfluentnih staničnih kultura (Isaacs i sur. 1996; Tolner i sur. 2001).



Slika 4. Promotorska regija gena *TOP2A*. Prikazana su mjesta važna za regulaciju aktivnosti promotora (ICB1-5, GC1-2 itd.) te mjesta interakcije sa regulatornim proteinima poput Sp3, p53 itd. Preuzeto iz Tolner i sur. (2001).

Ispoljavanje gena **TOP2A** reguliraju različiti transkripcijski mehanizmi. Promotorska regija sadrži pet invertiranih CCAAT bokseva (engl. «inverted CCAAT box», ICB), dva GC elementa, ATF vezno mjesto te mjesta za interakciju s drugim proteinima (Hochhauser i sur. 1992; Isaacs i sur. 1996; Wang i sur. 1997; Adachi i sur. 2000; Hopfner i sur. 2000) (Slika 4). CCAAT boks je umjereno konzerviran transkripcijski regulatorni element pronađen u mnogim eukariotskim promotorima i pojačivačkim regijama (Mantovani 1998), a pokazano je da djeluje i u invertiranoj orijentaciji (Ng i sur. 1995). GC elementi su također često prisutni u promotorima eukariota i to u višestrukom broju (Williams i sur. 2007).

DNK-protein i protein-protein interakcije, koje se odvijaju u **TOP2A** promotoru, su složene. Poznato je nekoliko transkripcijskih faktora koji dolaze u vezu sa promotorom tog gena: NF-Y, Sp1, Sp3, c-myb, p53, ATF itd. (Beck i sur. 1999; Adachi i sur. 2000; Hopfner i sur. 2000; Magan i sur. 2003; Allen i sur. 2004).

Za sada su najbolje opisane uloge proteina NF-Y i Sp1/Sp3 u regulaciji aktivnosti **TOP2A** promotora. NF-Y (engl. «nuclear factor-Y») je transkripcijski faktor koji specifično prepoznaje motiv CCAAT boks, a odgovoran je za savijanje DNK i privlačenje ostalih aktivatora u promotorsku regiju (Joshi i sur. 2003; Ronchi i sur. 1995; Magan i sur. 2003). Sp1 (engl. «specificity protein 1») i drugi proteini Sp obitelji su transkripcijski faktori koji se vežu na GC/GT bogate promotorske elemente i tako utječu na ispoljavanje mnogih gena uključenih u regulaciju staničnog ciklusa u normalnom i tumorskom tkivu (Kadonaga i sur. 1987; Majello i sur. 1994; Allen i sur. 2004; Williams i sur. 2007). Interakcije između proteina NF-Y i Sp1 već su pokazane u slučajevima drugih promotora, kao što su promotori humanog cdc25C gena, štakorjeg gena za sintazu masnih kiselina i p27(Kip1) gena (Magan i sur. 2003).

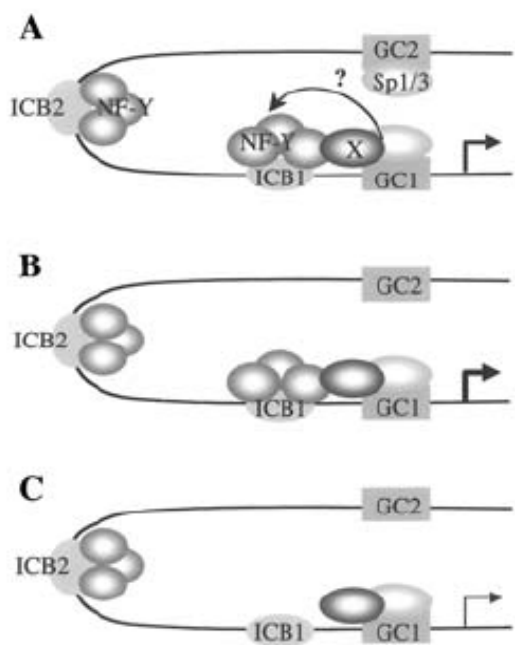
Maksimalna aktivnost **TOP2A** promotora se postiže regulacijom unutar prvih 617 parova baza (Hochhauser i sur. 1992; Adachi i sur. 2000), gdje se nalaze dva GC elementa (GC1 i GC2) te pet invertiranih CCAAT bokseva (ICB1-ICB5) kao mjesta za interakciju sa NF-Y i Sp proteinima.

ICB1 boks je najvažniji za postizanje bazalne razine transkripcije humanog **TOP2A** promotora (Slika 5A): interakcija NF-Y vezanog za ICB1 boks sa Sp1 vezanim na GC1 elementu aktivira bazalnu razinu transkripcije (Magan i sur. 2003; Williams, i sur. 2007).

Sp1/Sp3, koji je vezan za GC2 element, potiskuje transkripciju interakcijom sa ICB1 i GC1 elementima (Slika 5A), što je vjerojatno posredovano proteinom NF-Y i jednim, za sada još nepoznatim, proteinom (Magan i sur. 2003). Eksperimentalni dokazi upućuju na to da proteini koji se vežu za GC2 element djeluju kao represori transkripcije (Magan i sur. 2003; Yu i sur. 2003; Williams i sur. 2007).

NF-Y vezan za ICB2 boks, svojom funkcijom savijanja DNK, omogućuje predložene interakcije između proteina vezanih za GC1 i GC2 elemente (Ronchi i sur. 1995). Nemogućnost vezanja Sp1/Sp3 za GC2 element rezultira otvaranjem strukture promotora tako da ne može doći do represivne interakcije između Sp1/Sp3 vezanih za GC1 i GC2 elemente (Magan i sur. 2003), što vodi k pojačanoj transkripciji (Slika 5B).

Ako se NF-Y ne može vezati za ICB1 boks (Slika 5C), manje Sp1/Sp3 i/ili nepoznatog proteina bude privučeno na promotor i rezultat je smanjena transkripcija (Magan i sur. 2003). p53 i određeni antitumorski lijekovi induciraju smanjenje ispoljavanja **TOP2A** gena inhibicijom vezanja NF-Y za određene ICB elemente (Joshi i sur. 2003).



Slika 5. Prikaz strukture promotora i proteina vezanih za promotorske elemente gena **TOP2A**. A: Interakcija NF-Y vezanog za ICB1 boks sa Sp1 vezanim na GC1 element aktivira bazalnu razinu transkripcije. Oznaka X predstavlja nepoznati protein. B: Interakcija NF-Y vezanog za ICB1 boks sa Sp1 vezanim na GC1 elementu aktivira bazalnu razinu transkripcije, a nemogućnost vezanja Sp1/Sp3 za GC2 element vodi k pojačanoj transkripciji. C: Kada se NF-Y ne može vezati za ICB1 boks, manje Sp1/Sp3 i/ili nepoznatog proteina bude privučeno na promotor i rezultat je smanjena transkripcija. Preuzeto iz Magan i sur. (2003).

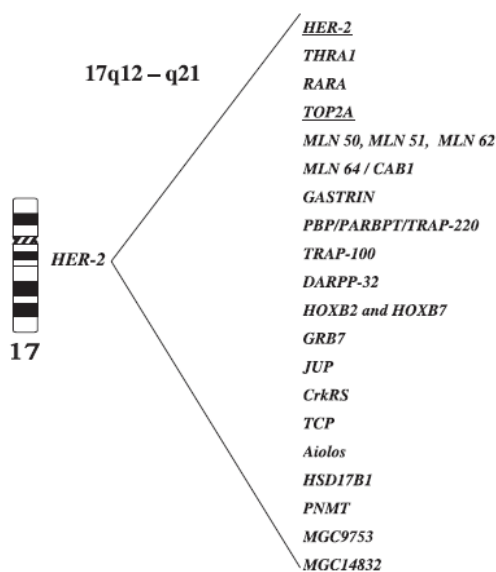
I drugi transkripcijski faktori, osim onih koji vežu CCAAT bokseve, mogu posredovati u regulaciji ispoljavanja gena. Tako, primjerice, ATF vezno mjesto u promotoru gena za cicklin A igra ulogu u njegovoj regulaciji, a prepoznaju ga proteini ATF-1 i CREB (Yoshizumi i sur. 1995). Promotor gena **TOP2A**, osim ICB i GC mjesta važnih za regulaciju, također ima ATF vezno mjesto (Isaacs i sur. 1996).

Važnu ulogu u regulaciji stanične razine topoizomeraze II α ima i stabilnost mRNK. Stanice u S fazi imaju najvišu razinu **TOP2A** mRNK, a poluvijek trajanja te mRNK je velik (preko 4 sata)

(Goswami i sur. 1996). Naprotiv, u G_1 fazi, kada je stanična razina **TOP2A** mRNA najniža, utvrđeno je da je poluvijek trajanja mRNA samo oko 30 minuta (Goswami i sur. 1996).

1.1.4. Topoizomeraza II α i rak

Rak je bolest, koja nastaje kao posljedica molekularnih događaja poput aktivacije onkogeni, inaktivacije tumor supresora i/ili disfunkcije proteina čija je uloga popravak DNK i održavanje stabilnosti genoma (Schulz 2005). U solidnim tumorima uglavnom dolazi do aktivacije onkogeni i to često mehanizmom amplifikacije gena. **HER-2** je primjer dobro poznatog onkogeni, koji je često amplificiran u tumorima dojke, želuca, jajnika, prostate, mokraćnog mjehura itd. (Jarvinen i Liu 2003b; Simon i sur. 2003; Schulz 2005; Murphy i sur. 2007), a smješten je na dužem kraku kromosoma 17 i kodira za transmembranski tirozin kinazni receptor (Fritz i sur. 2005). Za amplikon regije 17q12-21 je danas poznato da osim gena **HER-2** (Slika 6), nosi i druge biološki važne gene poput **THRA1** (gen za receptor tiroidnog hormona), **RARA** (gen za receptor retinoične kiseline), **GRP7** (gen za protein koji je dio receptora za faktor rasta) i sl., a također i gen **TOP2A** (Bofin i sur. 2003; Guérin i sur. 2003; Jarvinen i Liu 2003b; Fritz i sur. 2005).

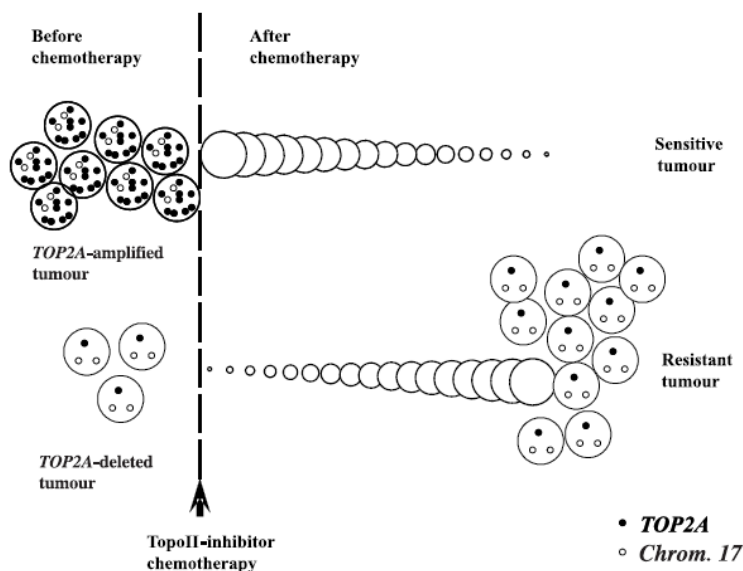


Slika 6. Smještaj gena **TOP2A** u blizini gena **HER-2** na dužem kraku kromosoma 17. Prikazani su i drugi geni, koji se u tumorima često amplificiraju zajedno sa genom **HER-2**. Preuzeto iz Jarvinen i Liu (2003b).

Topoizomeraza II α je meta velikog broja strukturalno različitih citotoksičnih agenasa, uključujući i neke od najznačajnijih antitumorskih lijekova poput antraciklina (npr. doksorubicin), epipodofilotoksina (npr. etopozid, tenipozid), derivata kumarinskih antibiotika (npr. novobiocin, kumermicin), merbarona itd. (Beck i sur. 1999; Zhou i sur. 1999; Jarvinen i sur. 2000). Istraživanja su pokazala da osjetljivost stanica na inhibitore topoizomeraze tipa II ovisi o ispoljavanju tog enzima u tumorskim stanicama (Champoux 2001; Jarvinen i Liu 2003a; Koren i sur. 2003). Stanice s manjom količinom topoizomeraze II α su manje osjetljive na antitumorske lijekove od onih gdje se taj protein pojačano ispoljava (Slika 7) (Jarvinen i sur. 2000; Schulz 2005).

Topoizomeraza II α je korisna i kao klinički značajan prognostički faktor jer služi kao marker za staničnu proliferaciju u normalnom i tumorskom tkivu (Muss i sur. 1994; Holden i sur. 1995).

Razina ispoljavanja **TOP2A** je pokazatelj stanja tumorskog oboljenja: viša razina topoizomeraze II α upućuje na veću vjerojatnost povratka bolesti i manju vjerojatnost preživljenja (Koren i sur. 2003; Fritz i sur. 2005).

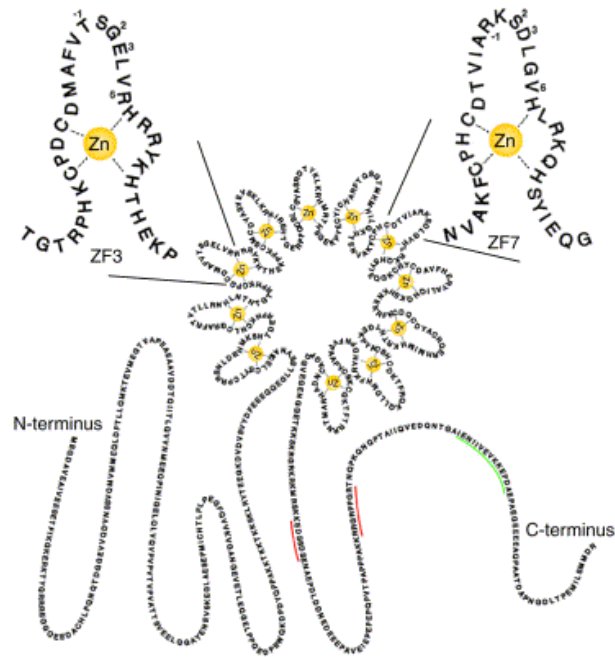


Slika 7. Shematski prikaz osjetljivosti tumorskih stanica na kemoterapiju sa inhibitorima topoizomeraze II. Stanice sa manjom koncentracijom proteina topoizomeraza II α su manje osjetljive na antitumorske lijekove od onih gdje se taj protein pojačano ispoljava. Preuzeto iz Jarvinen i Liu (2003b).

1.2. CTCF (engl. «CCCTC binding factor»)

1.2.1. Protein CTCF

CTCF je prvotno identificiran kao protein sa cinkovim prstima koji regulira promotor **c-myc** onkogen u stanicama kokoši i sisavaca (Lobanekov i Goodwin 1989; Lobanekov i sur. 1990; Klenova i sur. 1993). On nije samo strogo konzerviran, već je i neophodan te se ispoljava u svim somatskim stanicama ljudi (Filippova i sur. 1996). Smješten je u jezgri, ima molekularnu masu od 82 kDa i može ga se podijeliti u tri domene: dvije trećine proteina čine N- i C-terminalne domene koje su zaslužne za njegove funkcije, a između njih se nalazi DNK-vezujuća domena sastavljena od 11 cinkovih prstiju (Slika 8) (Filippova i sur. 1996; Ohlsson i sur. 2001; Klenova i sur. 2002).



Slika 8. Shematski prikaz proteina CTCF. Prikazan je potpuni slijed aminokiselina sa posebnim naglaskom na domenu, kojom se protein specifično veže za određene DNK sljedove, a to je 11 cinkovih prstiju. Uvećano su prikazani cinkovi prsti 3 i 7 (ZF3 i ZF7) te su na njima označene aminokiseline na pozicijama -1, 2, 3 i 6, koje su odgovorne za prepoznavanje DNK sljedova. Preuzeto iz Ohlsson i sur. (2001).

1.2.2. Uloga CTCF-a u regulaciji transkripcije

Do sada su opisana mnoga vezna mjesta za CTCF u promotorima, izolatorima i drugim regulatornim regijama gena (Lobanenkov i sur. 1990; Burcin i sur. 1997; Vostrov i Quitschke 1997; Bell i Felsenfeld 2000; Hark i sur. 2000; Kanduri i sur. 2000; Filipkova i sur. 2001). Ta vezna mjesta su obično dužine ~50 parova baza i različitih sljedova nukleotida (Filipkova i sur. 2002). Naime, CTCF koristi različite skupine pojedinih cinkovih prstiju da bi se vezao za različite regulatorne sljedove (Filipkova i sur. 1996; Burcin i sur. 1997). Xie i sur. te Kim i sur. su 2007. godine pokazali da humani genom sadrži gotovo 15 000 izolatorskih mjesta na koje se CTCF može vezati, što ukazuje na njegovu važnost u regulaciji gena. Tako se smatra da kod sisavaca CTCF ima ulogu u transkripcijskoj aktivaciji i utišavanju ispoljavanja gena, stvaranju konstitutivnih kromatinskih izolatora i granica te «čitanju» genomske upisa (Vostrov i Quitschke 1997; Bell i Felsenfeld 2000; Hark i sur. 2000; Ohlsson i sur. 2001; Yusufzai i sur. 2004).

CTCF je podložan i posttranslacijskim modifikacijama koje utječu na njegovu ulogu. Poznato je da fosforilacija obično smanjuje aktivnost transkripcijskih faktora (Hunter i Karin 1992). Sukladno tome su Klenova i sur. (2002) pokazali da fosforilacija umanjuje aktivnost CTCF-a, ali ne

mijenja njegovu lokalizaciju u jezgri niti svojstva vezanja za DNK. Yu i sur. (2004) su pokazali da se CTCF može modificirati i poli(ADP-ribozil)acijom pomoću enzima zvanih poli(ADP-riboza)polimeraze (skraćeno: PARP), koje na proteine dodaju ADP-ribozu, stvarajući polimere ADP-riboze (Naegeli i sur. 1989). Promjene u poli(ADP-ribozil)acijskom statusu CTCF-a mogu rezultirati epigenetskim poremećajima, koji se očituju gubitkom njegove izolatorske uloge i/ili uloge regulatora transkripcije te mogu dovesti do neravnoteže u cijelom genomu i potaknuti tumorigenezu (Klenova i Ohlsson 2005). Eksperimentalno, promjene u poli(ADP-ribozil)acijskom statusu CTCF-a mogu biti izazvane, primjerice, tretmanom 3-aminobenzamidom (3-AB), koji je nespecifičan inhibitor ADP-riboziltransferaza, uključujući enzime iz obitelji PARP. Tretman 3-aminobenzamidom rezultira smanjenjem poli(ADP-ribozil)acije (Yu i sur. 2004; Klenova i Ohlsson 2005). Osim toga, CTCF može stupati u vezu sa drugim proteinima u jezgri, poput faktora YB-1 i histon deacetilaza, što također utječe na njegovu ulogu (Chernukhin i sur. 2000). Vezanje CTCF-a za DNK može biti ovisno o metilaciji CTCF-veznih mjesta (Kanduri i sur. 2000).

1.2.3. CTCF i rak

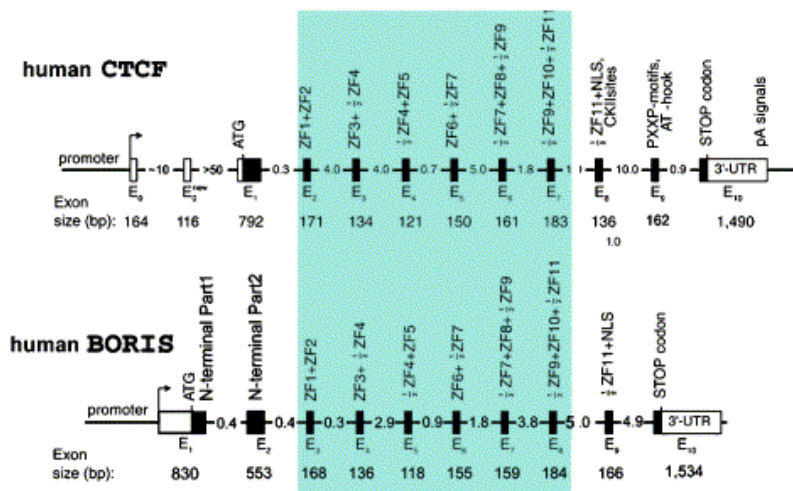
CTCF regulira ispoljavanje nekih gena koji se izravno povezuju sa rakom, primjerice **p53**, **c-myc**, **pRb**, **Igf2** i **BRCA1** (Lobanenkov i Goodwin 1989; Bell i Felsenfeld 2000; Hark i sur. 2000; Kanduri i sur. 2000; Qi i sur. 2003; Engel i sur. 2006; Butcher i Rodenhiser 2007; De La Rosa-Velázquez i sur. 2007), ali i sam prolazi kroz genetičke promjene u nekim humanim tumorima. Na važnu ulogu CTCF-a u razvoju tumora ukazuju činjenice (1) da je u tumorima često poremećena regulacija gena koje regulira CTCF (Ohlsson i sur. 2001), (2) da je regija 16q22.1 gdje se nalazi gen za CTCF podložna gubitku heterozigotnosti (engl. «loss of heterozygosity», LOH) u različitim tumorima (Filippova i sur. 2002), (3) da je vezanje CTCF-a za DNK u nekim tumorima smanjeno hipermetilacijom konzerviranih CpG otoka u sljedovima koje CTCF prepoznaje (Klenova i sur. 1998; Feinberg 2001).

1.3. BORIS (engl. «Brother of the Regulator of Imprinted Sites»)

1.3.1. Protein BORIS

Do nedavno se smatralo da CTCF nema srodnih proteina, no Loukinov i sur. (2002) su otkrili protein koji ima istih 11 cinkovih prstiju kao i CTCF, a potpuno drugačije N- i C-terminalne domene (Slika 9). Taj protein je nazvan BORIS. Sličnost u domeni sa cinkovim prstima navodi na zaključak da proteini CTCF i BORIS prepoznaju iste sljedove DNK, a razlike

u N- i C-terminalnim domenama, koje okružuju cinkove prste, ukazuju na to da su funkcionalne posljedice vezanja tih proteina za DNK vjerojatno različite (Klenova i sur. 2002; Loukinov i sur. 2002; Hong i sur. 2005). Naime, BORIS ne sadrži strukturalne motive pomoću kojih CTCF privlači proteinske partnere, niti posjeduje neka mjesta za specifične posttranslacijske modifikacije, kao što je fosforilacija, a koje su važne za funkciju CTCF-a (Klenova i sur. 2002; Klenova i Ohlsson 2005; Chernukhin i sur. 2007).



Slika 9. Usporedba strukture gena za humani CTCF i BORIS. Zelena boja označava regiju homologije koja kodira za 11 cinkovih prstiju. Preuzeto iz Loukinov i sur. (2002).

1.3.2. Uloga i regulacija BORIS-a

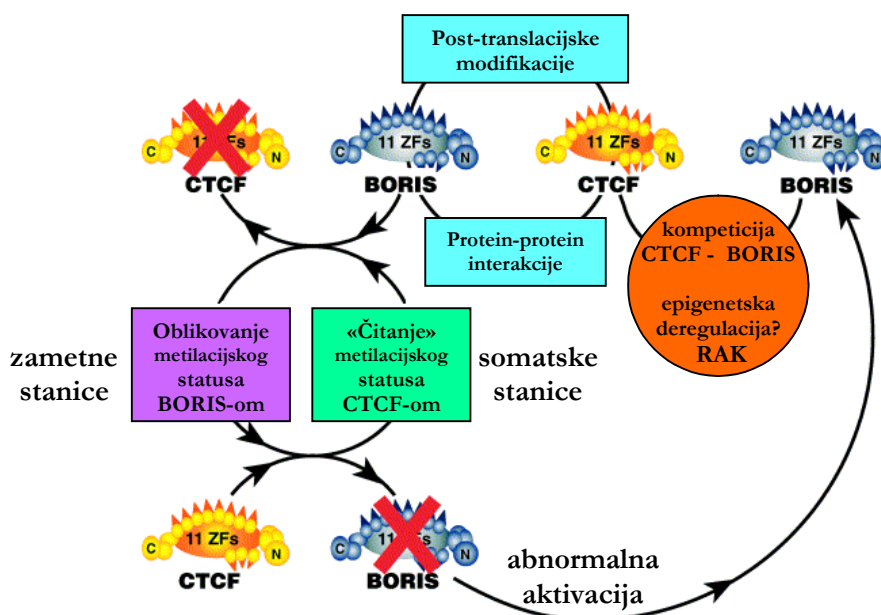
Za razliku od CTCF-a, BORIS nije ispoljen u normalnim somatskim stanicama, već samo u subpopulaciji spermatoocita u kojoj dolazi do uspostavljanja genomskog upisa tijekom razvoja zametnih stanica u testisima (Klenova i sur. 2002; Loukinov i sur. 2002; Vatolin i sur. 2005). U toj subpopulaciji stanica tada dolazi do značajnog smanjenja ispoljavanja CTCF-a i «brisanja» uzorka metilacije (Loukinov i sur. 2002) te transkripcijske aktivacije jedinstvene grupe gena, tzv. rak/testis gena, putem demetilacije DNK njihovih promotorskih regija (Vatolin i sur. 2005). Te promotorske regije su u normalnim somatskim stanicama utišane, a u testisima i različitim tipovima tumora aktivne te otuda naziv rak/testis geni (engl. «cancer/testis genes») (Chen i sur. 1998). U kasnijim fazama spermatogeneze, utišava se ispoljavanje gena **BORIS** i drugih rak/testis gena, a reaktivira ispoljavanje gena **CTCF** i nanovo uspostavlja očinski metilacijski uzorak, tj. genomski upis (Loukinov i sur. 2002; Hong i sur. 2005).

Transkripcijska aktivnost gena **BORIS** ovisi o metilaciji DNK te se eksperimentalno može potaknuti tretmanom DNK-demetilirajućim agensom 5-aza-2`-deoksicitidinom, koji uz gen **BORIS** inducira ispoljavanje brojnih drugih rak/testis gena (Hong i sur. 2005).

Aktivnosti proteina **BORIS** regulirana je njegovim premještanjem iz citoplazme, gdje se nalazi u velikoj količini, u jezgru, što nije svojstveno **CTCF**-u, koji je isključivo smješten u jezgrama stanica (Loukinov i sur. 2002).

1.3.3. **BORIS** i rak

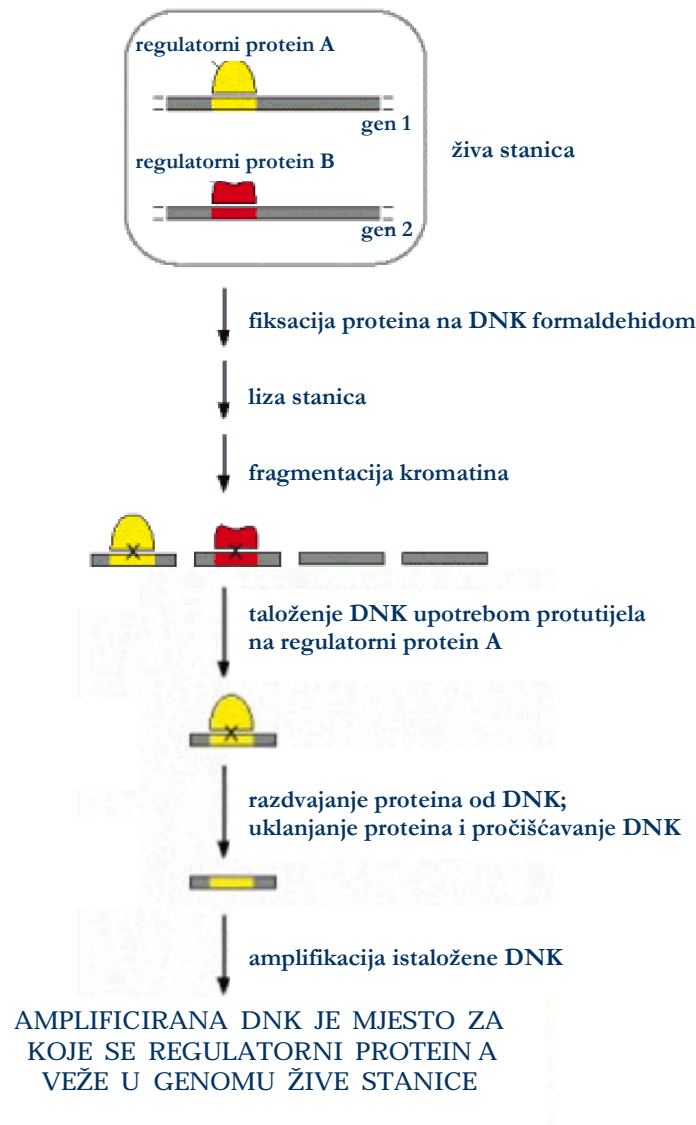
Gen za protein **BORIS** je smješten u regiji 20q13 (Loukinov i sur. 2002), a poznato je da je upravo ta regija često amplificirana u mnogim tipovima tumora kod kojih je često prisutan i gubitak heterozigotnosti (LOH) gena **CTCF** (Risinger i sur. 2007; D'Arcy i sur. 2008). Štoviše, u velikom broju različitih tumora uočena je aktivacija gena **BORIS** (Hong i sur. 2005; Vatolin i sur. 2005; D'Arcy i sur. 2008; Risinger i sur. 2007). Budući da tumorske stanice ispoljavaju i **CTCF**, vjerojatno dolazi do suparništva između ta dva proteina (Slika 10), pri čemu **CTCF** gubi dio svojih funkcija što rezultira epigenetskim promjenama kao što je gubitak genomskog upisa, aktivacija nekih onkogeni i sl., koje pogoduju razvoju malignih oboljenja (Klenova i sur. 2002; Ulaner i sur. 2003; Dougherty i sur. 2008).



Slika 10. Prikaz uloga proteina **CTCF** i **BORIS** u normalnim i tumorskim stanicama. **BORIS** i **CTCF** djeluju skladno u uspostavi epigenetskog statusa tijekom normalnog razvoja muških zametnih stanica, a njihovo suparništvo uzrokovano aktivacijom gena za **BORIS** u somatskim stanicama povezuje se sa rakom. Preuzeto iz Klenova i sur. (2002).

1.4. Kromatinska imunoprecipitacija

Kromatinska imunoprecipitacija je metoda koja se koristi za određivanje mjesta u genomu za koja se vežu određeni proteini (Slika 11). Ta metoda daje sliku protein-DNK interakcija koje se *in vivo* događaju u jezgrama stanica (Orlando 2000; Aparicio i sur. 2005). Temeljni princip je da se DNK-vezujući proteini (primjerice transkripcijski faktori) mogu fiksirati za DNK na koju su vezani i zatim uz pomoć specifičnog protutijela imunoprecipitirati (Solomon i Varshavski 1985; Orlando 2000). Iz istaloženih protein-DNK kompleksa se zatim razdvoji DNK od proteina te se ona zatim identificira i kvantificira lančanom reakcijom polimerazom (Spencer i sur. 2003).



Slika 11. Shematski prikaz kromatinske imunoprecipitacije pomoću protutijela specifičnog za regulatorni protein A. Preuzeto iz Alberts i sur. (2002).

1.5. Ciljevi istraživanja:

Ciljevi istraživanja provedenih za izradu diplomskog rada bili su:

- optimizirati metode kromatinske imunoprecipitacije pomoću agaroznih i magnetnih kuglica
- provjeriti da li se protein CTCF veže na promotorsku regiju gena **TOP2A**
- otkriti da li se protein BORIS također veže na promotorsku regiju gena **TOP2A**, nakon što potaknemo njegovo ispoljavanje tretiranjem stanica 3-aminobenzamidom

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Kemikalije

- agaroza tipa I niske endosmotske jakosti (Sigma)
- akrilamidni nosač (Sigma)
- 3-aminobenzamid (Sigma)
- bromfenolno modriilo (Sigma)
- DMEM medij za uzgoj stanica (Gibco/BRL)
- DMSO (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- EGTA (Sigma)
- etanol **p.a.**, 96% (Kemika)
- fenol (pH 8,0; ekvilibriran s Tris-HCl) (Sigma)
- fenilmetilsulfonil fluorid (Sigma)
- fetalni teleći serum (Sigma)
- formaldehid 36,5% (Sigma)
- glicin (Sigma)
- glikogen (Ambion)
- GoTaq[®] Green Master Mix 2X (Promega)
- izoamilni alkohol (Kemika)
- KH₂PO₄ (Sigma)
- KCl (Kemika)
- kloroform **p.a.** (Kemika)
- komplet kemikalija za kromatinsku imunoprecipitaciju: «Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit» (Upstate, Millipore)
- ksilen-cijanol (Kemika)
- LiCl (Upstate, Millipore)
- MgCl₂ (Applied Biosystems)
- natrijev acetat (Kemika)
- natrijev deoksikolat
- NaCl (Kemika)
- NaHCO₃ (Sigma)
- Na₂HPO₄ (Sigma)
- NP-40 (IGEPAL, Sigma)

- otopina magnetnih kuglica prekrivenih proteinom A (Dynabeads® Protein A) (Invitrogen)
- otopina penicilin/streptomycin (Sigma)
- proteinaza K (Sigma)
- RNaza A (bez DNaza) (Sigma)
- SDS (Sigma)
- smjesa inhibitora proteaza (Sigma)
- standard DNK XIII (Roche Applied Science): odsječci DNK su veličine 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 i 2642 parova baza
- standard DirectLoad™ Step Ladder, 50 bp (Sigma-Aldrich): odsječci DNK su veličine 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000 i 3000 parova baza
- SYBR® Safe boja 10 000X (Invitrogen)
- tripsansko modriilo (Sigma)
- tripsin (Sigma)
- Tris-HCl (pH 6,5) (Upstate)
- Triton X-100 (Sigma)
- voda bez nukleaza (Promega)

2.1.2. Pufferi i otopine

- PBS puffer (1X): 130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)
- puffer za lizu: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 1% SDS
- TE puffer (1X): 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8)
- RIPA puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,1% Na-deoksikolat, 140 mM NaCl
- elucijski puffer (protokol sa paramagnetskim kuglicama): 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 50 mM NaCl
- smjesa fenol/kloroform/izoamilni alkohol (omjer 25:24:1)
- smjesa kloroform/izoamilni alkohol (omjer 24:1)
- smjesa fenol/kloroform (omjer 1:1)
- puffer za bubrenje («swelling buffer»): 10 mM Tris-Cl (pH 7,5), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,5% NP-40
- TAE puffer (1X): 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA (pH 8)
- puffer za nanošenje uzoraka na gel za elektroforezu: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA (pH 8), 0,025% bromfenolno modriilo, 0,025% ksilen-cijanolo, 30% glicerol

- otopina DNK iz sperme lososa/protein A-agaroz (dio kompleta kemikalija «ChIP assay kit», Upstate, Millipore): 1,5 mL agaroznih kuglica, 600 µg sonificirane DNK sperme lososa, 1,5 mg BSA, 4,5 mg rekombinantnog proteina A, 0,05% natrijevog azida, TE pufer (pH 8) do konačnog volumena od 3 mL
- pufer za razrjeđivanje (dio kompleta kemikalija «ChIP assay kit», Upstate, Millipore): 16,7 mM Tris-HCl (pH 8,1), 1,2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 0,01% SDS, 1,1% Triton X-100
- pufer niske ionske jakosti za ispiranje imunokompleksa (dio kompleta kemikalija «ChIP assay kit», Upstate, Millipore): 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,1), 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS
- pufer visoke ionske jakosti za ispiranje imunokompleksa (dio kompleta kemikalija «ChIP assay kit», Upstate, Millipore): 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,1), 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS
- LiCl pufer za ispiranje imunokompleksa (dio kompleta kemikalija «ChIP assay kit», Upstate, Millipore): 0,25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoksikolat, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
- 2X GoTaq[®] Green Master Mix: DNK polimeraza GoTaq[®], pufer za lančanu reakciju polimerazom (pH 8,5), 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3 mM MgCl₂ (Promega)

2.1.3. Sterilizacija otopina i opreme

Otopine i plastični materijal neosjetljiv na toplinu sterilizirala sam 60 minuta u autoklavu (121°C, 10⁵ Pa), a otopine osjetljive na toplinu filtriranjem. Sve otopine sam priredila u deioniziranoj vodi.

2.1.4. Stanična linija

Koristila sam staničnu liniju Cal 27, koja je uspostavljena 1982. godine od tkiva tumora jezika 56.-godišnjeg bijelca prije nego li je bio podvrgnut terapiji. Stanice Cal 27 su epitelne stanice, poligonalnog oblika sa veoma granuliranom citoplazmom i aneuploidnim brojem kromosoma. U staničnoj kulturi rastu prilijepljene za podlogu i vrijeme udvostručavanja im iznosi 35 sati.

Za uzgoj ove stanične linije koristila sam DMEM medij uz dodatak fetalnog telećeg seruma i antibiotika. Stanice sam uzgajala u inkubatoru pri 37°C uz 5% CO₂. Medij za smrzavanje stanica u tekućem dušiku sadrži 95% potpunog medija za uzgoj i 5% DMSO.

2.1.5. Specifična protutijela

Za kromatinsku imunoprecipitaciju sam koristila poliklonalna kuničja protutijela na CTCF (Upstate) te poliklonalna kuničja protutijela na BORIS (Abcam).

2.1.6. Oligonukleotidne početnice

Sve korištene početnice sam prikazala u Tablici 1. Početnice su sintetizirane u Invitrogen-u.

Tablica 1. Oligonukleotidni slijedovi početnica i produkt koji umnažaju.

početnica	nukleotidni slijed početnica (5' → 3')	umnoženi produkt
ChIPinsF	CTG AAA GAA TAA CAA GGA GGT GGC TGG	izolator gena c-myc
ChIPinsR	AAA TTA CTC CTG CCT CCA GGC CTT TG	izolator gena c-myc
TOP-Pf1	TTG AGG CAG ATG CCA GAA TCT GTT CG	promotor gena TOP2A
TOP-Pr1	ATT GAC AGG GAA TCT GGC CAA TG	promotor gena TOP2A

```

-617 AGCCACCGCACACAGCCTACTTTTATTTCTTTGAAAAATGAATTCGAGGGTAAAGGGGCG GC2
-557 GGGTTGAGGCAGATGCCAGAATCTGTTCGCCTCAACCAAGCAGCCAGGCTGCCTGTCCAG
-497 AAAGCCGGCACTCAGTTTCTCTCAGGAAAACGAAGCTAAGGCTCCCATTTCCCTCGCTAAC
-437 AACGTCAGAACAGAGGACAGTTTTTAGATTTCAGGGATCTTAAATAGATTGGCAGTTTCT ICB5
-377 GGAGAATAAACATCCTTTGCTTTTTCTCCTGCACACTTTTGCCTCAGGCCACCCCTTCCCG ICB4
-317 CTTCCAAAGCCCATCTCTTCCAAGCTTTCGCGACGAGAAAACAAGTGAGCCCTTCTCATT ATF
-257 GGCCAGATTCCTGTCAATCTCTCCGCTATGACGCCGAGTGGTGCCTTTTGAAGCCTCTC ICB3
-197 TAGTCCCGCCTCCCTAACCTGATTGGTTTTATTCAAACAAACCCCGGCCAACTCAGCCGTT ICB2
-137 CATAGGTGGATATAAAAGGCAAGCTACGATTGGTTCTTCTGGACGGAGACGGTGAGAGCG ICB1
-77 AGTCAGGGATTGGCTGGTCTGCTTCGGGCGGGCTAAAGGAAGGTTCAAGTGAGCTCTCC GC1
-17 TAACCGACGCGCTCTGTGGAGAAGCGGCTTGGTCGGGGGTGGTCTCGTGGGGTCTCGCC
+44 TGTTTAGTCGCTTTCAGGGTTCTTGAGCCCCCTTACGACCGTCACCATG

```

Slika 12. Slijed nukleotida prvih 617 parova baza TOP2A promotora, gdje se nalaze dva GC elementa (GC1 i GC2) te invertni CCAAT boksevi (ICB1-ICB5) kao mjesta za interakciju sa NF-Y i Sp proteinima. Plavom bojom je potcrtana sekvenca korištenih početnica TOP-Pf1 i TOP-Pr1, a zelenom bojom četiri potencijalna vezna mjesta za protein CTCF. Preuzeto iz Isaacs i sur. 1996.

2.2. Metode

2.2.1. Uzgoj stanica Cal 27

Stanice Cal 27 sam uzgajala u bočicama površine 75 cm² (T-75) u DMEM mediju (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) sa 10% fetalnog telećeg seruma, 2 mM L-glutamina i 1% otopine penicilin (6 mg/mL)/streptomycin (5 mg/mL). Presađivala sam ih neposredno prije postizanja konfluentnosti tako što sam uklonila medij i stanice isprala PBS puferom te ih inkubirala u otopini tripsin-EDTA (0,25% tripsin, 0,53 mM EDTA) pri 37°C dok se sve stanice nisu odlijepile od podloge. Zatim sam staničnu suspenziju prebacila u Falcon tubicu i centrifugirala pet minuta na 1200 rpm. Nakon uklanjanja supernatanta sam talog resuspendirala u DMEM mediju te stanice razdijelila u čiste bočice za uzgoj i stavila ih u inkubator (37°C, 5% CO₂).

2.2.2. Tretman Cal 27 stanica 3-aminobenzamidom

Stanice, koje sam tretirala 3-aminobenzamidom, sam u inkubatoru uzgajala 48 sati u DMEM mediju sa dodatkom 3-aminobenzamida konačne koncentracije 10 mM.

2.2.3. Određivanje broja stanica

Za kromatinsku imunoprecipitaciju sam stanicama uklonila medij i isprala ih PBS puferom te inkubirala u otopini tripsin-EDTA (0,25% tripsin, 0,53 mM EDTA) pri 37°C da se stanice odlijepe od podloge. Zatim sam iz svake T-75 bočice uzela 50 μL stanične suspenzije i tome dodala 75 μL DMEM medija i 125 μL tripsanskog modrila te odredila broj stanica pomoću hemocitometra. Ostatak stanične suspenzije sam prebacila u Falcon tubicu i centrifugirala pet minuta na 1200 rpm. Nakon uklanjanja supernatanta sam talog resuspendirala u DMEM mediju sa serumom te uzela po 6,5 x 10⁷ stanica u Falcon tubicu od 50 mL i centrifugirala pet minuta na 1200 rpm. Nakon uklanjanja supernatanta, talog stanica sam resuspendirala u DMEM mediju tako da konačni volumen bude 40 mL.

2.2.4. Fiksacija formaldehidom i liza stanica

U staničnu suspenziju sam zatim dodala 36,5%-tne otopine formaldehida tako da ga u suspenziji konačno bude 1% (v/v) i inkubirala 15 minuta pri sobnoj temperaturi uz lagano

miješanje. Reakciju unakrsnog povezivanja kromatina i proteina sam prekinula inkubiranjem pet minuta u glicinu konačne koncentracije 200 mM pri sobnoj temperaturi.

Uzorak sam zatim centrifugirala pet minuta pri 450 rcf na 4°C i u sljedećim koracima držala na ledu. Odlila sam supernatant, a talog stanica resuspendirala u 10 mL ledenog PBS pufera te centrifugirala pet minuta pri 450 rcf na 4°C. Stanice sam još jednom isprala sa PBS puferom, a zatim tri puta sa po 10 mL pufera za bubrenje («swelling buffer») bez inhibitora proteaza. Uklonila sam pufer i talog jezgara zamrzнула uranjanjem Falcon tubica sa uzorcima u tekući dušik na 15 sekundi. Uzorak sam odmrzнула u hladnoj vodi i dodala 1,3 mL pufera za lizu sa dodatkom PMSF konačne koncentracije 1 mM i inhibitora proteaza (1X). Sadržaj Falcon tubice sam ravnomjerno (po 650 µL) razdijelila u dvije tubice od 1,5 mL te inkubirala 10 minuta na ledu.

2.2.5. Sonifikacija lizata

2.2.5.1. Sonifikacija

Uzorak sam, držeći ga na ledu, sonificirala pomoću uređaja Ultrasonic processor (Core Palmer) na sljedeći način: 2 x 60 sekundi pri A_{50} ; 5 x 45 sekundi pri A_{50} te 5 x 45 sekundi pri A_{60} . Nakon centrifugiranja 15 minuta na 14 000 rpm pri 4°C, u čiste tubice sam prebacila oko 600 µL supernatanta te ponovno centrifugirala na isti način. 500 µL supernatanta sam zatim prenijela u kriotubu i zamrzнула u tekućem dušiku te pohranila na -80°C do sljedećeg dana, a ostatak supernatanta iskoristila za provjeru fragmentacije kromatina.

Na dio supernatanta uzetog za provjeru fragmentacije kromatina, dodala sam približno jednak volumen (100 µL) svježeg pripremljenog pufera za eluciju (pH 8,3), koji sadrži 1% SDS i 100 mM NaHCO₃, te 20 µg RNaze A i inkubirala 15 minuta pri 37°C. Zatim sam dodala 50 µg proteinaze K i inkubirala preko noći pri 65°C. Idući dan sam izolirala DNK metodom opisanom u stavci 2.2.5.2. i izoliranu DNK nanijela na 2%-tni gel agaroze prema metodi opisanoj u stavci 2.2.5.3.

2.2.5.2. Izolacija DNK za provjeru fragmentacije kromatina

Na uzorak sam dodala jednak volumen fenola (pH 7,9), inkubirala 10 minuta na kružnoj mješalici te potom centrifugirala 10 minuta na 10 000 rpm pri sobnoj temperaturi. U čistu tubicu od 1,5 mL sam prenijela vodenu fazu i dodala jednaki volumen smjese fenol/kloroform te na isti način rotirala na kružnoj mješalici i centrifugirala. Postupak sam ponovila dodavanjem jednakog volumena kloroforma, miješanjem i centrifugiranjem.

U čistu tubicu sam zatim prenijela dobivenu vodenu fazu i istaložila DNK dodavanjem 1/10 volumena 3 M natrijevog-acetata (pH 5,2), 8 µg glikogena i 2,5 volumena ledenog 96%-tnog etanola te inkubacijom pri -20°C preko noći.

Uzorak sam sljedeći dan centrifugirala 30 minuta na 14 000 rpm pri 4°C. Nakon uklanjanja supernatanta talog DNK sam isprala dva puta sa 1 mL ledenog 70%-tnog etanola, a između ispiranja centrifugirala 5 minuta na 13 000 rpm pri 4°C. Uklonila sam etanol i taloge inkubirala pet minuta pri 37°C te istaloženu DNK otopila u 15 µL TE pufera (pH 7,5).

2.2.5.3. Provjera fragmentacije kromatina

Izoliranu DNK sam radi provjere uspješnosti fragmentacije kromatina nanijela na agarozni gel sastava: 1X TAE pufer, 2% agaroze (m/v) i 1X SYBR[®] Safe boje. Uzorke sam neposredno prije nanošenja na gel pomiješala sa oko 2 µL pufera za nanošenje uzoraka i elektroforezu provodila 30 minuta na 100 V. Ishod elektroforeze sam promatrala pomoću UV transiluminatora (Uvitek).

2.2.6. Imunoprecipitacija

2.2.6.1. Taloženje imunokompleksa

Alikvot od 500 µL, koji su bili pohranjeni pri -80°C, sam otopila na ledu te centrifugirala 10 minuta na 14 000 rpm pri 4°C. Supernatant sam potom prebacila u Falcon tubicu od 15 mL i deset puta razrijedila puferom za razrjeđivanje, u koji sam dodala PMSF konačne koncentracije 1 mM i inhibitore proteaza (1X). Zatim sam dodala 1/25 volumena otopine DNK iz sperme lososa/protein A-agarozna i inkubirala tri sata uz rotiranje na kružnoj mješalici pri 4°C.

Nakon inkubacije sam uzorke centrifugirala pet minuta na 300 rcf pri 4°C i supernatant (5 mL) prebacila u novu Falcon tubicu. 500 µL supernatanta (10%) sam odvojila kao ulaznu («input») DNK te pohranila pri -20°C do daljnje upotrebe. 2 mL supernatanta sam uzela za negativnu kontrolu i dodala 60 µL otopine DNK iz sperme lososa/protein A-agarozna, a u ostatak supernatanta (2,5 mL) sam dodala 10 µg odgovarajućeg protutijela (na CTCF ili na BORIS, ovisno o uzorku) i 70 µL otopine DNK iz sperme lososa/protein A-agarozna te inkubirala pri 4°C preko noći uz rotiranje na kružnoj mješalici.

2.2.6.2. Ispiranje istaloženih imunokompleksa

Sljedeći dan sam uzorke centrifugirala jednu minutu na 1000 rcf pri 4°C te uklonila supernatant. Sljedeća tri ispiranja sam izvodila držeći uzorke na ledu i centrifugirajući ih pri 4°C. Prvo sam talog isprala sa 1 mL pufera niske ionske jakosti za ispiranje imunokompleksa, rotirala 5 minuta na kružnoj mješalici te centrifugirala dvije minute na 200 rcf, a zatim postupak ponovila sa 1 mL pufera visoke ionske jakosti i sa 1 mL LiCl pufera za ispiranje imunokompleksa. Nakon toga sam talog pri sobnoj temperaturi na isti način isprala dva puta s TE puferom.

2.2.7. Elucija DNK sa istaloženih imunokompleksa

Na isprani talog sam dodala 250 µL svježe pripremljenog pufera za eluiranje (pH 8,3), koji sadrži 1% SDS i 100 mM NaHCO₃, vorteksirala i inkubirala 10 minuta pri 65°C. Nakon dvominutnog centrifugiranja na 1000 rcf sam supernatant prebacila u čistu tubicu od 1,5 mL. Na preostali talog sam nanovo dodala 250 µL pufera za eluiranje i ponovila postupak te supernatant dodala odgovarajućem supernatantu dobivenom u prethodnom koraku i pohranila uzorke pri 4°C do sljedećeg dana.

Na imunoprecipitirane i ulazne («input») uzorke sam dodala RNazu A do konačne koncentracije 0,05 µg/µL te inkubirala jedan sat pri 37°C uz blagu trešnju. Potom sam dodala 10 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl (pH 6,5) i proteinazu K, tako da joj konačna koncentracija u smjesi bude 0,5 µg/µL. Takvu smjesu sam inkubirala tri sata pri 37°C. Zatim sam dodala NaCl do konačne koncentracije 200 mM i inkubirala uzorke pet sati pri 65°C.

2.2.8. Izolacija imunoprecipitirane DNK

DNK sam izolirala na način opisan u stavci 2.2.5.2., s razlikom da sam u ovom slučaju za taloženje DNK (uz natrijev acetat i apsolutni alkohol) dodala 20 µg glikogena te dobivene taloge otopila u 30 µL TE pufera.

2.2.9. Određivanje efikasnosti kromatinske imunoprecipitacije

2.2.9.1. Semikvantitativna lančana reakcija polimerazom za izolatorsku regiju gena *c-myc*

Lančanu reakciju polimerazom sam provodila u smjesi u kojoj sam na 4 μ L DNK dodala po 0,4 μ M ChIPinsF i ChIPinsR početnica, 1 mM MgCl₂, GoTaq[®] Green Master Mix (da mu konačna koncentracija bude 1X) i vode bez nukleaza do konačnog reakcijskog volumena od 12,5 μ L. Uzorci DNK su bili različita razrjeđenja ulazne («input») DNK, imunoprecipitirana DNK te negativna kontrola kromatinske imunoprecipitacije.

Umnažanje produkta se odvijalo prema sljedećem programu: početna denaturacija pri 95°C (tri minute), zatim 30 ciklusa denaturacije pri 95°C (30 sekundi), nalijeganja početnica na kalup pri 63°C (30 sekundi) i produženja novonastalih lanaca pri 72°C (30 sekundi u prvom ciklusu, a zatim po jednu sekundu duže u svakom sljedećem) te završnog produženja novonastalih lanaca pri 72°C (sedam minuta). Umnažanje lančanom reakcijom polimerazom sam izvodila u uređaju GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems).

2.2.9.2. Izračunavanje efikasnosti kromatinske imunoprecipitacije

Ishod semikvantitativne lančane reakcije polimerazom za izolatorsku regiju gena *c-myc* sam provjerila elektroforezom u 2%-tnom gelu agaroze na način opisan u stavci 2.2.5.3. Jačinu vrpce dobivenih produkata umnažanja usporedila sam uz pomoć Image analyzer softvera te efikasnost kromatinske imunoprecipitacije izračunala po sljedećoj formuli:

$$\text{efikasnost imunoprecipitacije} = \frac{\text{količina produkta imunoprecipitirane DNK}}{\text{količina produkta ulazne («input») DNK}}$$

2.2.10. Lančana reakcija polimerazom za promotor gena *TOP2A*

2.2.10.1. Optimizacija lančane reakcije polimerazom za promotor gena *TOP2A*

Lančanu reakciju polimerazom sam provodila u smjesi u kojoj sam na 4 μ L DNK dodala po 0,4 μ M TOP-Pf1 i TOP-Pr1 početnica, 1 mM MgCl₂, GoTaq[®] Green Master Mix (da mu

konačna koncentracija bude 1X) i vode bez nukleaza do konačnog reakcijskog volumena od 12,5 μ L. Kao uzorak DNK koristila sam 20 puta razrijeđenu ulaznu («input») DNK stanica Cal 27.

Umnažanje produkta se odvijalo prema sljedećem programu: početna denaturacija pri 95°C (tri minute), zatim različit broj ciklusa denaturacije pri 95°C (30 sekundi), nalijeganja početnica na kalup pri 63°C (30 sekundi) i produženja novonastalih lanaca pri 72°C (30 sekundi u prvom ciklusu, a zatim po jednu sekundu duže u svakom sljedećem) te završnog produženja novonastalih lanaca pri 72°C (sedam minuta). Broj ciklusa koji sam isprobala bio je 26, 28, 30, 31, 32, 33, 34 i 36. Umnažanje lančanom reakcijom polimerazom sam izvodila u uređaju GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems).

Za proučavanje ishoda optimizacije lančane reakcije polimerazom za promotor gena **TOP2A** uslijedila je elektroforeza u 2%-tnom gelu agaroze na način opisan u stavci 2.2.5.3.

2.2.10.2. Lančana reakcija polimerazom za promotor gena *TOP2A*

Lančanu reakciju polimerazom sam provodila na način opisan u stavci 2.2.10.1., a broj ciklusa za umnažanje produkta bio je 32. Nakon lančane reakcije polimerazom za promotor gena **TOP2A** uzorke sam nanijela na 2%-tni gel agaroze i provela elektroforezu opisanu u stavci 2.2.5.3.

2.2.11. Uzgoj i tretman Cal 27 stanica za pokus s magnetnim kuglicama

Stanice Cal 27 sam uzgajala na način opisan u stavci 2.2.1., samo što sam u ovom slučaju koristila bočice površine 25 cm² (T-25). Zatim sam dio stanica uzgajala 48 sati u DMEM mediju uz dodatak 3- aminobenzamida u konačnoj koncentraciji od 20 mM.

2.2.12. Priprema kompleksa protutijelo-magnetna kuglica

Za kromatinsku imunoprecipitaciju pet uzoraka uzela sam 55 μ L dobro promiješane otopine magnetnih kuglica prekrivenih proteinom A. Nakon stavljanja na magnetsko postolje, uklonila sam pufer u kojem su bile magnetne kuglice te dodala 125 μ L RIPA pufera. Vorteksirala sam smjesu i uklonila pufer te još jednom ponovila ispiranje sa 125 μ L RIPA pufera. Zatim sam magnetne kuglice resuspendirala u 50 μ L RIPA pufera.

U male tubice od 200 μ L alikvotirala sam po 90 μ L RIPA pufera, dodala 10 μ L prethodno pripremljene suspenzije magnetnih kuglica prekrivenih sa proteinom A i 2,4 μ g odgovarajućeg

specifičnog protutijela (na CTCF i na BORIS, ovisno o uzorku). Navedene smjese sam inkubirala dva sata pri 4°C uz rotaciju na kružnoj miješalici.

2.2.13. Određivanje broja stanica

Broj stanica u bočicama za uzgoj sam odredila na način opisan u stavci 2.2.3.. Za potrebe ovog pokusa sam uzimala po 1×10^6 stanica u Falcon tubicu od 15 mL i talog stanica, nakon centrifugiranja, resuspendirala u PBS puferu tako da konačni volumen resuspendiranih stanica bude 500 μ L.

2.2.14. Fiksacija formaldehidom

Resuspendiranim stanicama sam dodala 36,5%-tne otopine formaldehida tako da ga u suspenziji konačno bude 1% (v/v) i inkubirala na tresilici 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Reakciju unakrsnog povezivanja kromatina i proteina sam prekinula dodavanjem glicina do konačne koncentracije 125 mM i inkubiranjem 5 minuta pri sobnoj temperaturi.

2.2.15. Liza stanica

Lizu stanica sam provodila držeći uzorke na ledu. Stanice sam centrifugirala 10 minuta na 300 rcf pri 4°C i resuspendirala u 500 μ L PBS pufera. Navedeni korak sam ponovila još jednom i nakon centrifugiranja uklonila supernatant te odredila veličinu taloga. Stanice sam zatim lizirala resuspendiranjem u šesterostrukom razrjeđenju taloga u puferu za lizu sa dodatkom inhibitora proteaza (1X) i 1 mM PMSF te inkubirala pet minuta na ledu.

2.2.16. Sonifikacija lizata

2.2.16.1. Sonifikacija

Stanične lizate sam, držeći ih na ledu, sonificirala pomoću uređaja Ultrasonic processor (Core Palmer) na sljedeći način: 8 x 30 sekundi sonifikacije pri amplitudi A_{30} i ciklusu 0,5 sa probom od 3 mm. Lizate sam zatim centrifugirala 10 minuta na 10 000 rcf pri 4°C. Supernatante sam prenijela u čiste tubice na ledu.

Za ulaznu («input») DNK sam uzela 20 μ L supernatanta i razrijedila ga sa 80 μ L RIPA pufera sa 0,01% SDS i pohranila pri 4°C do daljnje upotrebe.

2.2.16.2. Određivanje koncentracije DNK

Koncentraciju DNK sam odredila mjerenjem apsorpcije na $\lambda = 260$ nm (Beckman) u alikvotu lizata, koji sam sto puta razrijedila u TE puferu. Zatim sam uzorke razrijedila sa RIPA puferom sa 0,01% SDS-a tako da u konačnom volumenu od 100 μ L imam 10 μ g DNK. U otopinu sam dodala i inhibitore proteaza te 1 mM PMSF.

2.2.17. Imunoprecipitacija u pokusu sa magnetnim kuglicama

2.2.17.1. Taloženje imunokompleksa

Male tubice od 200 μ L sa prethodno pripremljenim magnetnim kuglicama prekrivenima proteinom A sam stavila na ledeno magnetsko postolje, pričekala jednu minutu i uklonila supernatant. U svaku tubicu sam zatim dodala 100 μ L kromatina razrijedenog u RIPA puferu i inkubirala preko noći pri 4°C uz rotaciju na kružnoj miješalici.

2.2.17.2. Ispiranje istaloženih imunokompleksa

Sljedeći dan sam uzorke tri puta isprala sa 100 μ L svježeg RIPA pufera tako da sam supernatant uklanjala na magnetskom postolju, a magnetne kuglice potom resuspendirala u puferu pomoću pipete i inkubirala četiri minute pri 4°C na kružnoj miješalici. Komplekse magnetna kuglica-protutijelo sam zatim isprala u 100 μ L TE pufera i inkubirala četiri minute pri 4°C na kružnoj miješalici te prvo prenijela smjese u čiste tubice od 200 μ L i tek tada stavila na magnetsko postolje te uklonila TE pufer.

2.2.18. Elucija DNK sa imunokompleksa istaloženih pomoću magnetnih kuglica

Na imunoprecipitirane uzorke sam dodala 150 μ L elucijskog pufera, koji sadrži 1% SDS i 50 μ g/mL proteinaze K, a na ulazne («input») uzorke 200 μ L elucijskog pufera i proteinazu K do konačne koncentracije 50 μ g/mL. Sve uzroke sam zatim inkubirala dva sata pri 68°C.

Na magnetskom postolju sam pri sobnoj temperaturi uklonila supernatante i prebacila ih u čiste tubice od 1,5 mL. Eluciju DNK sam ponovila još jednom dodajući 150 μ L elucijskog pufera sa 1% SDS i 50 μ g/mL proteinaze K na imunoprecipitirane uzorke te inkubirala pet minuta pri 68°C. Supernatante sam prebacila u odgovarajuće tubice sa supernatantima iz prve elucije.

2.2.19. Izolacija imunoprecipitirane DNK

Na imunoprecipitirane i ulazne («input») uzorke sam dodala 200 µL elucijskog pufera te započela izolaciju DNK dodavanjem jednakog volumena (500 µL) otopine fenol/kloroform/izoamilni alkohol. Uzorke sam centrifugirala pet minuta na 15000 rcf pri sobnoj temperaturi. Prenijela sam 460 µL vodene faze u čistu tubicu i dodala jednaki volumen otopine kloroform/izoamilni alkohol te centrifugirala na isti način kao i u prethodnom koraku. U čistu tubicu sam zatim prenijela 400 µL vodene faze i istaložila DNK dodavanjem 1/10 volumena 3 M natrijevog-acetata (pH 7,0), 10 µL 0,25% akrilamidnog nosača i 2,5 volumena ledenog 96% etanola te inkubacijom uzoraka 30 minuta na -80°C.

Centrifugirala sam uzorke 15 minuta na 20 000 rcf pri 4°C i talog DNK isprala dva puta u 1 mL ledenog 70% etanola, a između ispiranja centrifugirala 10 minuta na 20 000 rcf pri 4°C. Uklonila sam etanol i taloge inkubirala pet minuta pri 37°C te istaloženu DNK otopila u 150 µL TE pufera (pH 8,0).

2.2.20. Semikvantitativna lančana reakcija polimerazom za izolatorsku regiju gena *c-myc*

Lančanu reakciju polimerazom sam provodila na način opisan u stavci 2.2.9.1., a umnažanje produkta se odvijalo prema sljedećem programu: početna denaturacija pri 95°C (pet minuta), zatim 30 ciklusa denaturacije pri 95°C (30 sekundi), nalijeganja početnica na kalup pri 63°C (30 sekundi) i produženja novonastalih lanaca pri 72°C (45 sekundi u prvom ciklusu, a zatim po jednu sekundu duže u svakom sljedećem) te završnog produženja novonastalih lanaca pri 72°C (sedam minuta). Umnažanje lančanom reakcijom polimerazom sam izvodila u uređaju GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems).

Ishod semikvantitativne lančane reakcije polimerazom za izolatorsku regiju gena *c-myc* sam provjerila elektroforezom u 2%-tnom gelu agaroze na način opisan u stavci 2.2.5.3. Također sam izračunala efikasnost pokusa kromatinske imunoprecipitacije pomoću magnetnih kuglica na način opisan u stavci 2.2.9.2.

2.2.21. Lančana reakcija polimerazom za promotor gena *TOP2A*

Lančanu reakciju polimerazom sam provodila na način opisan u stavci 2.2.10.1. Umnažanje produkta se odvijalo prema sljedećem programu: početna denaturacija pri 95°C (tri minute),

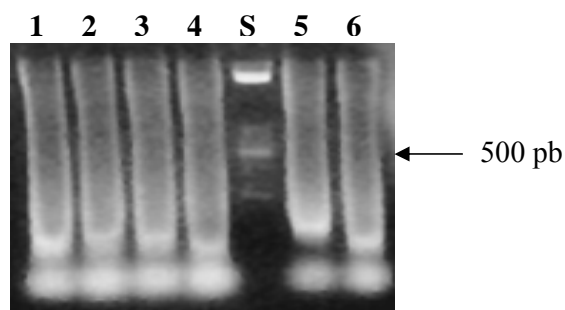
zatim 32 ciklusa denaturacije pri 95°C (30 sekundi), nalijeganja početnica na kalup pri 63°C (30 sekundi) i produženja novonastalih lanaca pri 72°C (45 sekundi u prvom ciklusu, a zatim po jednu sekundu duže u svakom sljedećem) te završnog produženja novonastalih lanaca pri 72°C (deset minuta). Umnazanje lančanom reakcijom polimerazom sam izvodila u uređaju GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems).

Nakon lančane reakcije polimerazom za promotor gena **TOP2A** uzorke sam nanijela na 2%-tni gel agaroze i provela elektroforezu opisanu u stavci 2.2.5.3.

3. REZULTATI

3.1. Provjera fragmentacije kromatina

U pokusu kromatinske imunoprecipitacije pomoću agaroznih kuglica sam iz lizata stanica Cal 27, kao i stanica tretiranih 3-aminobenzamidom, nakon sonifikacije izolirala DNK. Nanošenjem te DNK na gel agaroze sam potvrdila da su odsječci fragmentiranog kromatina manji od 1000 parova baza (Slika 13, linije 1-6).



Slika 13. Provjera fragmentacije kromatina nakon sonifikacije. Strjelicom je posebno naznačen odsječak standarda DNK veličine 500 parova baza.

1-4 – sonificirani stanični lizati

S – standard DNK XIII

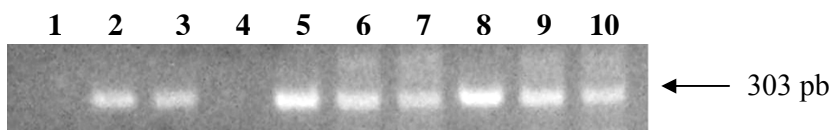
5-6 – sonificirani stanični lizati

3.2. Određivanje efikasnosti kromatinske imunoprecipitacije

DNK dobivenu pokusima kromatinske imunoprecipitacije pomoću agaroznih i magnetnih kuglica sam kvantificirala semikvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom za izolatorsku regiju gena *c-myc*. Zatim sam izračunala efikasnost kromatinske imunoprecipitacije usporedbom jačine vrpce imunoprecipitiranih uzoraka sa jačinama vrpce različitih razrjeđenja odgovarajućih uzoraka ulazne («input») DNK pomoću programa Image analyzer.

3.2.1. Semikvantitativna lančana reakcija polimerazom za izolatorsku regiju gena *c-myc*

U pokusu kromatinske imunoprecipitacije pomoću agaroznih kuglica nisam dobila produkt lančane reakcije polimerazom u negativnoj kontroli (uzorak gdje nisam dodala protutijelo tijekom kromatinske imunoprecipitacije), kao ni u uzorku kromatina stanica Cal 27 tretiranih 3-aminobenzamidom gdje sam imunoprecipitaciju provodila sa anti-BORIS protutijelom (Slika 14, linije 1 i 4). Umnoženi produkt veličine 303 parova baza sam dobila u uzorcima kromatina netretiranih i tretiranih stanica Cal 27 imunoprecipitiranim sa anti-CTCF protutijelom (linije 2 i 3). Usporedbom jačine vrpce navedenog produkta (linija 2) sa jačinama vrpce različitih razrjeđenja odgovarajućih uzoraka ulazne («input») DNK (linije 8-10), dobila sam da je jačina vrpce uzorka kromatina stanica Cal 27 imunoprecipitiranih sa anti-CTCF protutijelom približno jednaka 25x razrjeđenju ulazne («input») DNK netretiranih Cal 27 stanica. Osim toga se vidi da je jačina vrpce uzorka tretiranih Cal 27 stanica imunoprecipitiranih sa anti-CTCF protutijelom (linija 3), slabija od odgovarajuće vrpce stanica koje nisu bile tretirane 3-aminobenzamidom (linija 2).



Slika 14. Semikvantitativna lančana reakcija polimerazom za izolatorsku regiju gena *c-myc* sa DNK dobivenom kromatinskom imunoprecipitacijom pomoću agaroznih kuglica.

- 1 – negativna kontrola
- 2 – Cal 27, anti-CTCF protutijelo
- 3 – Cal 27 + 3-AB, anti-CTCF protutijelo
- 4 – Cal 27 + 3-AB, anti-BORIS protutijelo
- 5 – ulazna («input») DNK Cal 27 + 3-AB, razrjeđenje 10x
- 6 – ulazna («input») DNK Cal 27 + 3-AB, razrjeđenje 20x
- 7 – ulazna («input») DNK Cal 27 + 3-AB, razrjeđenje 40x
- 8 – ulazna («input») DNK Cal 27, razrjeđenje 10x
- 9 – ulazna («input») DNK Cal 27, razrjeđenje 20x
- 10 – ulazna («input») DNK Cal 27, razrjeđenje 40x

U pokusu kromatinske imunoprecipitacije pomoću magnetnih kuglica također nisam dobila produkt lančane reakcije polimerazom u negativnoj kontroli kao ni uzorcima kromatina iz stanica Cal 27, koje su bile imunoprecipitirane pomoću anti-BORIS protutijela (Slika 15, linije 5, 6 i 7). Umnoženi produkt veličine 303 parova baza sam dobila u uzorku kromatina iz stanica Cal 27, koje sam imunoprecipitirala sa anti-CTCF protutijelom (linija 4). Usporedbom jačine vrpce navedenog produkta (linija 4) sa jačinama vrpce različitih razrjeđenja odgovarajućih uzoraka ulazne («input») DNK (linije 1-3), dobila sam da je jačina vrpce uzorka stanica Cal 27 imunoprecipitiranih sa anti-CTCF protutijelom približno jednaka 3x razrjeđenju ulazne («input») DNK stanica Cal 27.

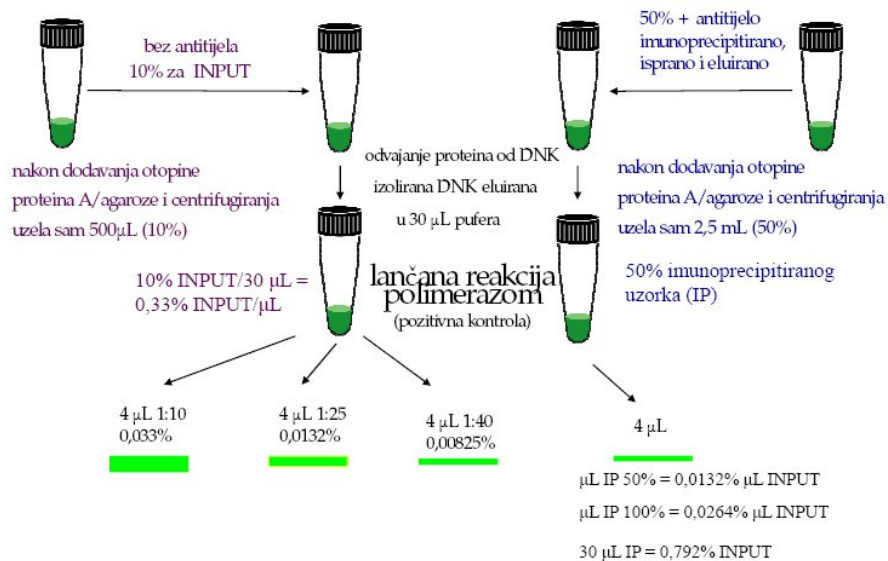


Slika 15. Semikvantitativna lančana reakcija polimerazom za izolatorsku regiju gena *c-myc* sa DNK dobivenom kromatinskom imunoprecipitacijom pomoću magnetnih kuglica.

- 1 – ulazna («input») DNK Cal 27, razrjeđenje 10x
- 2 – ulazna («input») DNK Cal 27, razrjeđenje 20x
- 3 – ulazna («input») DNK Cal 27, razrjeđenje 30x
- 4 – Cal 27, anti-CTCF protutijelo
- 5 – Cal 27, anti-BORIS protutijelo
- 6 – negativna kontrola
- S – standard DirectLoad Step Ladder
- 7 – Cal 27 + 3-AB, anti-BORIS protutijelo

3.2.2. Izračunavanje efikasnosti kromatinske imunoprecipitacije

U pokusu kromatinske imunoprecipitacije pomoću agaroznih kuglica sam uz pomoć programa Image analyzer odredila da je količina produkta umnažanja DNK izolatorske regije **c-myc** gena stanica Cal 27 imunoprecipitiranih anti-CTCF protutijelom približno jednaka količini odgovarajuće ulazne («input») DNK razrjeđene 25x (Slika 14). Efikasnost imunoprecipitacije sam izračunala prema shemi na Slici 16. Za umnažanje lančanom reakcijom polimerazom koristila sam 4 µL imunoprecipitiranog uzorka (oznaka IP u shemi) što je ekvivalentno 4 µL ulazne DNK (oznaka INPUT u shemi) razrjeđene 25x. Tih 4 µL ulazne DNK razrjeđene 25x je jednako 0,0132% od početnog volumena jer sam 10% volumena inkubiranog sa protein A/agarozom uzela za uzorak ulazne («input») DNK, koju sam nakon imunoprecipitacije izolirala i otopila u 30 µL pufera. Tako količina od 1 µL 100% imunoprecipitiranog uzorka (IP) odgovara količini od 1 µL 0,0264% ulazne DNK (INPUT), što daje efikasnost kromatinske imunoprecipitacije od 0,79%.



Slika 16. Shematski prikaz za izračunavanje efikasnosti kromatinske imunoprecipitacije pomoću agaroznih kuglica.

Efikasnost kromatinske imunoprecipitacije pomoću magnetnih kuglica sam izračunala na isti način. Odredila sam da je efikasnost pokusa za uzorke stanica Cal 27 precipitiranih sa anti-CTCF protutijelom iznosila 0,65% te za uzorke tretiranih Cal 27 stanica 1,14%.

3.3. Optimizacija lančane reakcije polimerazom za promotor gena *TOP2A*

Lančanu reakciju polimerazom za umnažanje promotorske regije gena *TOP2A* sam optimizirala umnažanjem ulazne («input») DNK stanica Cal 27 iz pokusa kromatinske imunoprecipitacije pomoću agaroznih kuglica. Za optimizaciju postupka produkt sam umnožila kroz 26 do 36 ciklusa (Slika 17, linije 1-8). Uočila sam da količina umnoženog produkta veličine 271 parova baza sa povećanjem broja ciklusa raste. Kao optimalan broj ciklusa sam odredila 32 ciklusa umnažanja (linija 5).



Slika 17. Optimizacija broja ciklusa umnažanja za lančanu reakciju polimerazom promotorske regije gena *TOP2A*.

- 1 – 26 ciklusa umnažanja
- 2 – 28 ciklusa umnažanja
- 3 – 30 ciklusa umnažanja
- 4 – 31 ciklus umnažanja
- 5 – 32 ciklusa umnažanja
- 6 – 33 ciklusa umnažanja
- 7 – 34 ciklusa umnažanja
- 8 – 36 ciklusa umnažanja
- S – standard DNK XIII

3.4. Lančana reakcija polimerazom za promotor gena *TOP2A*

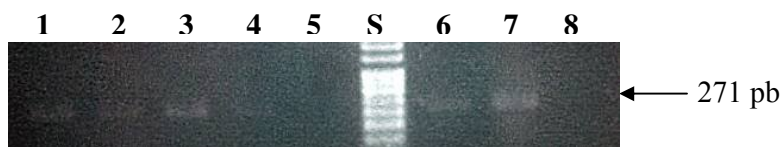
U uzorcima netretiranih i tretiranih Cal 27 stanica imunoprecipitiranih pomoću anti-CTCF i anti-BORIS protutijela u pokusu kromatinske imunoprecipitacije sa agaroznim kuglicama sam uspjela lančanom reakcijom polimerazom umnožiti DNK promotorske regije gena *TOP2A* veličine 271 parova baza (Slika 18, linije 3-5). Vidi se da je jačina vrpce umnožene DNK imunoprecipitirane sa anti-CTCF protutijelom (linije 3 i 4) znatno manja od jačine vrpce umnožene razrjeđene ulazne («input») DNK odgovarajućih uzoraka (linije 1 i 2). Također se vidi da je jačina vrpce umnožene DNK imunoprecipitirane sa anti-BORIS protutijelom znatno manja od jačine vrpce umnožene razrjeđene ulazne («input») DNK odgovarajućeg uzorka (linije 2 i 5). Vidi se i veoma slaba vrpca umnoženog produkta negativne kontrole (linija 6).



Slika 18. Lančana reakcija polimerazom za promotor gena *TOP2A* nakon kromatinske imunoprecipitacije pomoću agaroznih kuglica.

- S – standard DNK XIII
- 1 – ulazna («input») DNK Cal 27, razrjeđenje 20x
- 2 – ulazna («input») DNK Cal 27 + 3-AB, razrjeđenje 25x
- 3 – Cal 27, anti-CTCF protutijelo
- 4 – Cal 27 + 3-AB, anti-CTCF protutijelo
- 5 – Cal 27 + 3-AB, anti-BORIS protutijelo
- 6 – negativna kontrola

U pokusu kromatinske imunoprecipitacije sa magnetnim kuglicama sam također u uzorcima netretiranih i tretiranih Cal 27 stanica imunoprecipitiranih pomoću anti-CTCF i anti-BORIS protutijela uspjela lančanom reakcijom polimerazom umnožiti DNK promotorske regije gena **TOP2A** (Slika 19, linije 4, 6 i 7). Vidi se da je jačina vrpce umnožene DNK stanica Cal 27 imunoprecipitirana sa anti-CTCF protutijelom približno jednaka umnoženoj ulaznoj («input») DNK stanica Cal 27 razrjeđenoj 20x (linija 1), dok je jačina vrpce umnožene DNK stanica Cal 27 imunoprecipitirana sa anti-BORIS protutijelom slabija i jedva se vidi (linija 4). U slučaju negativne kontrole nema umnoženog produkta (linija 5), ali ga ima u uzorcima sa stanicama Cal 27 tretiranim 3-aminobenzamidom i imunoprecipitiranim sa anti-CTCF i anti-BORIS protutijelima (linije 6 i 7).



Slika 19. Lančana reakcija polimerazom za promotor gena **TOP2A** nakon kromatinske imunoprecipitacije pomoću magnetnih kuglica.

- 1 – ulazna («input») DNK Cal 27, razrjeđenje 20x
- 2 – ulazna («input») DNK Cal 27, razrjeđenje 30x
- 3 – Cal 27, anti-CTCF protutijelo
- 4 – Cal 27, anti-BORIS protutijelo
- 5 – negativna kontrola
- S – standard DirectLoad Step Ladder
- 6 – Cal 27 + 3-AB, anti-BORIS protutijelo
- 7 – Cal 27 + 3-AB, anti-CTCF protutijelo
- 8 – ulazna («input») DNK Cal 27 + 3-AB, razrjeđenje 30x

4. RASPRAVA

Topoizomeraza II α je enzim neophodan za preživljavanje stanica koje se dijele i rastu (Adachi i sur. 2000). Razina tog enzima je često povišena u zloćudnim tumorima i stoga je meta često korištenih kemoterapeutika poput doksorubicina, mitozantrona i etopozida (Froelich-Ammon i Osheroff 1995). Iako su ovi lijekovi vrlo učinkoviti, često se na njih razvija otpornost. Pokazano je da postoji povezanost između razine enzima topoizomeraze II α u stanicama i njihove osjetljivosti na citotoksične lijekove (Champoux 2001; Jarvinen i Liu 2003a; Koren i sur. 2003). Naime, smanjenje količine topoizomeraze II α u stanici je jedan od mehanizama pomoću kojih tumorske stanice stječu otpornost na kemoterapeutike (Falck i sur. 1999). Burgess i sur. (2008) su pokazali da je upravo razina topoizomeraze II α u tumorskim stanicama ključni čimbenik njihove osjetljivosti na doksorubicin. Sukladno tome rađeni su pokusi koji su pokazali da se otpornost na inhibitore topoizomeraza tipa II može zaobići unosom gena za topoizomerazu II α u stanicu. Zhou i sur. (1999) su na taj način uspjeli povećati staničnu razinu navedenog enzima i istovremeno pojačati osjetljivost tih stanica na njegove inhibitore. Dakle, poznavanje mehanizama regulacije transkripcije gena **TOP2A** nužno je za nalaženje novih pristupa u liječenju zloćudnih tumora.

Istraživanja su pokazala da je transkripcija gena **TOP2A** ovisna o utjecajima iz okoline kao što su toplotni šok, zastoje rasta konfluentnih staničnih kultura te tretman lijekovima i nekim kemikalijama (Matsuo i sur. 1993; Isaacs i sur. 1996; Tolner i sur. 2001; Joshi i sur. 2003), a isto tako se mijenja i tijekom staničnog ciklusa (Woessner i sur. 1991; Adachi i sur. 2000). Objavljeni podaci o čimbenicima koji utječu na transkripciju **TOP2A** nisu dostatni da bi se u potpunosti objasnio mehanizam regulacije transkripcije tog gena. Najveća aktivnost promotora je regulirana nukleotidnim slijedom od 617 parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije (Hochhauser i sur. 1992; Adachi i sur. 2000). U tom području se nalaze dva GC bogata motiva, GC1 i GC2, na koja se vežu čimbenici transkripcije Sp1 i Sp3 (Majello i sur. 1994; Allen i sur. 2004). Sp1 je aktivator transkripcije **TOP2A**, kada je smješten na GC1 element (Magan i sur. 2003; Williams i sur. 2007). Sp3 je, nasuprot tome, represor transkripcije gena **TOP2A** i funkcionalno je dominantan u usporedbi sa Sp1 (Magan i sur. 2003; Yu i sur. 2003; Williams i sur. 2007). Između GC1 i GC2 elemenata u promotorskoj regiji **TOP2A** se, prema podacima iz baza podataka Insulator Database i programa za traženje CTCF veznih mjesta na web stranici <http://www.essex.ac.uk/bs/molonc/spa.htm>, nalaze 4 potencijalna vezna mjesta za protein CTCF (vidi Sliku 12). S obzirom da CTCF ima brojne i vrlo raznovrsne uloge u regulaciji transkripcije brojnih gena, htjela sam provjeriti da li se on doista veže u tom području. Također sam željela utvrditi da li se u tom području veže njegov paralog BORIS nakon što potaknemo njegovo

ispoljavanje tretmanom 3-aminobenzamidom. Vežanje ovih proteina na predviđena vezna mjesta u promotoru **TOP2A** bi moglo imati važnu ulogu u regulaciji transkripcije ovog gena zbog toga što je nedavno pokazano da CTCF dolazi u vezu sa poli(ADP-riboza)polimerazom-1 (PARP-1) i potiče njezinu aktivnost (Gustafierro i sur. 2008). PARP-1 se veže na Sp1 i poli(ADP-ribozil)ira ga, čime je onemogućeno vežanje Sp1 na DNK (Zaniolo i sur. 2007). Kako su CTCF vezna mjesta smještena bliže distalnom GC2 elementu, postoji mogućnost da CTCF regrutiranjem enzima PARP-1 u to područje i poticanjem njegove aktivnosti negativno utječe na vežanje Sp1 na GC2 element. Time ne bi bilo onemogućeno vežanje Sp3 na GC2 element, ali s obzirom da Sp3 ne može multimerizirati, za razliku od Sp1 koji može formirati homodimere/oligomere, došlo bi do Sp3 ovisne represije **TOP2A** transkripcije. S obzirom da se CTCF i BORIS razlikuju u svojim N- i C- terminalnim dijelovima te stoga vežu različite proteinske partnere, a imaju visok stupanj homologije u području cinkovih prstiju, očekivano je da se BORIS može vezati u tom području i utjecati na transkripciju gena **TOP2A** različito od proteina CTCF. BORIS, za razliku od proteina CTCF, može vezati Sp1 i privući ga u područje promotora (Kang i sur. 2007). Takvo regrutiranje Sp1 i njegovo vežanje na GC2 element bi moglo imati za posljedicu formiranje Sp1 multimera između elemenata GC1 i GC2 te povećanu transkripcijsku aktivnost promotora **TOP2A**. Ipak, kako su ovi pokusi rađeni na stanicama Cal 27 u kojima je tretmanom 3-aminobenzamidom potaknuto ispoljavanje proteina BORIS, treba imati na umu da ovaj tretman osim učinka na ispoljavanje proteina BORIS dovodi i do globalne hipermetilacije (Klenova i Ohlsson 2005; Gustafierro i sur. 2008) te nužno ne reflektira stanje u tumorskim stanicama, koje imaju izraženu aktivnost proteina BORIS ili je on potaknut na neki drugi način (npr. tretmanom 5-azacitidinom).

Kako bih istražila navedenu problematiku, pokuse sam radila sa netretiranim Cal 27 stanicama, kao i sa onima koje sam tretirala 3-aminobenzamidom, koji je nespecifični inhibitor ADP-riboziltransferaza i koji dovodi do ispoljavanja proteina BORIS. Način tretiranja stanica (konačne koncentracije 3-aminobenzamida i trajanje samog tretmana) sam temeljila na istraživanjima drugih znanstvenika, poput Yu i sur. (2004). Uočila sam da se stanice nakon izlaganja 3-aminobenzamidu razlikuju od netretiranih stanica po morfologiji te još nekim svojstvima, kao što je stopa rasta (rezultati nisu prikazani). Navedene promjene, poput sporijeg rasta, su vjerojatno posljedica globalne hipermetilacije DNK uslijed inhibicije poli-ADPribozilacije, a time i dokidanja negativnog utjecaja polimera ADP-riboze na katalitičku aktivnost DNK metilaze Dnmt1 (Gustafierro i sur. 2008). Ovakav negativan učinak 3-aminobenzamida na proliferaciju stanica vjerojatno je posljedica nemogućnosti vežanja Sp1 na metiliranu DNK kako u promotoru **TOP2A** tako i u promotorima drugih gena važnih za odvijanje staničnog ciklusa, koji su pod utjecajem Sp1.

Uloga poli(ADP-ribozil)acije u tumorigenezi je za sada slabo istražena i vjerojatno uključuje kombinaciju izravnih i neizravnih efekata, ali važno je napomenuti da inhibicija poli(ADP-ribozil)acije 3-aminobenzamidom utječe i na funkcije proteina CTCF. Tako su Yu i sur. (2004) pokazali da je kod miševa više od 140 lokusa, koji vežu CTCF, osjetljivo na tretman 3-aminobenzamidom. Dakle, promjene u poli(ADP-ribozil)acijskom statusu mogu dovesti do gubitka izolatorske funkcije proteina CTCF, a i do razvoja patoloških promjena u ispoljavanju nekih gena (Klenova i sur. 2002; Vatolin i sur. 2005). Sukladno tome sam pokazala da navedeni tretman, vjerojatno gubitkom uloge proteina CTCF u utišavanju transkripcije gena za protein BORIS, potiče njegovo ispoljavanje u stanicama Cal 27 (vidi Slike 18 i 19).

Jednako tako je vidljivo da tretman 3-aminobenzamidom ne inhibira ispoljavanje proteina CTCF u potpunosti (vidi Slike 18 i 19), što je u skladu sa činjenicom da je CTCF esencijalan protein te se tolerira samo djelomičan gubitak njegove funkcije (Filippova i sur. 2002; Klenova i sur. 2002).

Broj i lokalizacija potencijalnih mjesta vezanja proteina CTCF i BORIS u humanom genomu su tema brojnih istraživanja. Takva istraživanja je omogućio razvoj metoda poput kromatinske imunoprecipitacije i metoda koje objedinjuju tehnologiju kromatinske imunoprecipitacije i genskih čipova te omogućuju određivanje veznih mjesta istraživanih proteina na razini genoma (Kim i sur. 2007; Xie i sur. 2007). Zbog sličnosti u području sa cinkovim prstima, odgovornom za vezanje na DNK, vjeruje se da se CTCF i BORIS vežu za ista mjesta u genomu (Klenova i sur. 2002). To vrijedi barem za dio gena koje regulira CTCF, a pokazala sam da je to svakako slučaj kod promotora gena **TOP2A** (vidi Slike 18 i 19). Otkrivanje CTCF-veznih mjesta u humanom genomu je korisno za određivanje uloga proteina CTCF u organizaciji i regulaciji kromatina, ali i u istraživanju njegove uloge kao potencijalnog tumor-supresorskog gena (Filippova i sur. 2002; Klenova i sur. 2002). Važnost ispoljavanja gena za protein BORIS u stanicama tumora za sada još nije sasvim jasna, ali se vjeruje da taj protein utječe na regulaciju gena koje inače regulira CTCF tako što je BORIS sa proteinom CTCF u suparništvu za vezanje na CTCF-vezna mjesta (Klenova i sur. 2002; Hong i sur. 2005). Stoga se pretpostavlja da u tumorskim stanicama BORIS djeluje kao epigenetski onkogen, koji uzrokuje abnormalnu metilaciju i deregulaciju nekih gena i/ili onkogeni koji imaju CTCF-vezna mjesta (Ulaner i sur. 2003; Vatolin i sur. 2005; D'Arcy i sur. 2006; Dougherty i sur. 2008).

Pokuse kromatinske imunoprecipitacije, kojima sam pokazala da se proteini CTCF i BORIS vežu za promotorsku regiju gena **TOP2A** izvodila sam na dva načina. Oba imaju isti osnovni princip, ali se donekle razlikuju u izvedbi pa se tako jedan izvodi pomoću agaroznih kuglica, dok se drugi izvodi pomoću magnetnih.

U pokusu kromatinske imunoprecipitacije pomoću agaroznih kuglica pokus sam izvodila tako da sam optimizirala protokol komercijalno dostupnog kompleta kemikalija «Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit» (Upstate). Između ostaloga je za svaku staničnu liniju i volumen lizata bilo potrebno odrediti optimalan način fragmentacije kromatina. To sam postigla sonifikacijom staničnih lizata u nekoliko pokušaja sa različitim amplitudama i brojem ciklusa sonifikacije (nisu prikazani svi rezultati, već samo konačan rezultat postupka koji je omogućio dobivanje fragmenata poželjne veličine; vidi Sliku 13). Pri samoj sonifikaciji je važno paziti da ne dođe do pjenjenja uzorka jer bi to dovelo do denaturacije prisutnih proteina, a kao rezultat je optimalno dobiti fragmente kromatina veličine 200-1000 parova baza jer to utječe na njihovu topivost i stoga na efikasnost same imunoprecipitacije (Orlando 2000).

U kromatinskoj imunoprecipitaciji pomoću magnetnih kuglica pokus sam izvodila tako da sam optimizirala protokol «Q² ChIP - Quick and quantitative chromatin immunoprecipitation», dostupan na internetskoj stranici www.collaslab.com. Taj protokol uključuje i upotrebu natrijevog butirata, koji je inhibitor histon deacetilaza, no on se pri imunoprecipitaciji transkripcijskih faktora može i izostaviti. Budući da je poznato da natrijev butirat ima značajan utjecaj na promotor gena **TOP2A** tako što privremeno uzrokuje njegovu snažnu indukciju (Kurz i sur. 2001), odlučila sam provesti pokus bez njegovog dodatka jer nisam bila sigurna kakav bi on utjecaj imao na moje rezultate.

Optimizirati je trebalo i uvjete lančane reakcije polimerazom za umnažanje promotorske regije gena **TOP2A**, što se prvenstveno odnosi na same uvjete provođenja tog koraka, tj. broj ciklusa umnažanja. Odredila sam da je u uvjetima u kojima sam izvodila pokus optimalan broj ciklusa umnažanja 32 (vidi Sliku 17), jer je u tom dijelu postupka umnažanja još uvijek prisutan linearni porast količine produkta, tj. još nije postignut maksimum (engl. «end-point») reakcije pri kojem više ne dolazi do umnažanja produkta. Time sam postigla da se količine produkata u različitim uzorcima mogu relativno kvantificirati i međusobno uspoređivati, što je bilo nužno za određivanje valjanosti postupka imunoprecipitacije. Kako je već poznato da lančana reakcija polimerazom ima svoja ograničenja što se tiče kvantitativne analize, za precizniju analizu bi bilo poželjno provesti lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (engl. «real-time PCR») koja prati količine produkta u svakom ciklusu tijekom umnažanja, a ne samo količinu produkta koja je prisutna u uzorku nakon određenog broja ciklusa (Kubista i sur. 2006). No, za potrebe ovih pokusa imunoprecipitacije su rezultati lančane reakcije polimerazom bili zadovoljavajući za određivanje efikasnosti i valjanosti postupka.

Kao pozitivnu kontrolu kromatinske imunoprecipitacije koristila sam izolatorsku regiju gena **c-myc** jer je poznato da se CTCF veže za tu regiju (Lobanenkov i sur. 1990; Filippova i sur. 1996).

Takva pozitivna kontrola je također bila nužna za računanje efikasnosti. Naime, ako je izračunata efikasnost pokusa u rasponu vrijednosti od 0,2% - 2%, onda je taj pokus kromatinske imunoprecipitacije bio uspješan (Aparicio i sur. 2005). Budući da sam u pokusu sa agaroznim kuglicama dobila efikasnost od 0,79%, potvrdila sam da je taj pokus nedvojbeno bio valjan. I u pokusu sa magnetnim kuglicama je dobivena efikasnost bila u odgovarajućem rasponu vrijednosti (0,65% i 1,14%) te je i taj pokus bio uspješan.

Glavni nedostatak metode kromatinske imunoprecipitacije je mogućnost dobivanja pozitivnog rezultata u slučaju negativne kontrole, kao što sam dobila u pokusu pomoću agaroznih kuglica (vidi Sliku 18). Takva nespecifična kromatinska pozadina se obično dobiva u slučajevima kada se smanjuje količina ulaznog («input») materijala i volumen uzoraka, jer je tada povećan omjer površine tubice u odnosu na reakcijski volumen. No, važno je da jačina vrpce te nespecifične kromatinske pozadine u lančanoj reakciji polimerazom bude slabija od jačine vrpce imunoprecipitiranih uzoraka, što je u mojem pokusu bio slučaj jer se vrpca kod negativne kontrole jedva nazire, dok su vrpce imunoprecipitiranih uzoraka jasno vidljive (vidi Sliku 18). U pokusu pomoću magnetnih kuglica taj problem sam izbjegla tako što sam reakcijski materijal, dok je za vrijeme ispiranja istaloženih imunokompleksa još bio u TE puferu, prenijela u čistu tubicu i tek tada stavila na magnetsko postolje te uklonila pufer (vidi Sliku 19). To se već i u slučaju autora protokola «Q² ChIP - Quick and quantitative chromatin immunoprecipitation» (www.collaslab.com), pokazalo kao ključan korak za povećanje specifičnosti pokusa.

Iako za sada postoje još mnoge nepoznanice što se tiče mehanizama regulacije gena **TOP2A** i uloga koje u tome igraju proteini CTCF i BORIS, pokazivanje da se proteini CTCF i BORIS vežu za tu promotorsku regiju bio je prvi korak. Sada bi trebala uslijediti istraživanja koja će odgovoriti na sljedeća pitanja: (1) koje je točno vezno mjesto tih proteina u promotorskoj regiji, (2) kako to utječe na ostala regulatorna mjesta i proteine koji se tamo vežu, (3) kakav to utjecaj ima na razinu ispoljavanja tog gena, (4) da li i kako se razlikuju posljedice vezanja proteina BORIS, umjesto proteina CTCF, na to mjesto, (5) da li postoji potencijal korištenja tih saznanja u nalaženju novih pristupa liječenju zloćudnih bolesti.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Protein CTCF se veže za promotorsku regiju gena **TOP2A**.
2. Tretman stanica Cal 27 s 3-aminobenzamidom potaknuo je ispoljavanje gena za protein BORIS.
3. Iako je u tretiranim stanicama potaknuto ispoljavanje gena za protein BORIS, te stanice i dalje ispoljavaju i gen za protein CTCF.
4. Protein BORIS se također veže za promotorsku regiju gena **TOP2A**.

6. LITERATURA

1. Adachi N., Nomoto M., Kohno K., Koyama H. (2000): Cell-cycle regulation of the DNA topoisomerase II α promoter is mediated by proximal CCAAT boxes: possible involvement of acetylation. *Gene* **245**: 49-57.
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002): Control of gene expression. U: Alberts B. i sur. (ur.) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, str. 375-466.
3. Allen K. A., Williams A. O., Isaacs R. J., Stowell K. M. (2004): Down-regulation of human topoisomerase II α correlates with altered expression of transcriptional regulators NF-YA and Sp1. *Anticancer Drugs* **15**: 357–362.
4. Aparicio O., Geisberg J. V., Sekinger E., Yang A., Moqtaderi Z., Struhl K. (2005): Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences **in vivo**. U: Ausubel F. M. i sur. (ur.) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. Poglavlje 21.3.
5. Beck W. T., Morgan S. E., Mo Y. Y., Bhat U. G. (1999): Tumor cell resistance to DNA topoisomerase II inhibitors: new developments. *Drug Resistance Updates* **2**: 382–389.
6. Bell A. C., Felsenfeld G. (2000): Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the **Igf2** gene. *Nature* **405**: 482-485.
7. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2002): DNA replication, recombination and repair. U: Berg J. M. i sur. (ur.) *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, str. 745-780.
8. Bofin A. M., Ytterhus B., Hagmar B. M. (2003): **TOP2A** and **HER-2** gene amplification in fine needle aspirates of breast carcinomas. *Cytopathol.* **14**: 314–321.
9. Burcin M., Arnold R., Lutz M., Kaiser B., Runge D., Lottspeich F., Filippova G. N., Lobanenkova V. V., Renkawitz R. (1997): Negative protein 1, which is required for function of the chicken lysozyme gene silencer in conjunction with hormone receptors, is identical to the multivalent zinc finger repressor CTCF. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 1281-1288.
10. Burgess D. J. (2008): Topoisomerase levels determine chemotherapy response **in vitro** and **in vivo**. *PNAS* **105**: 9053-9058.
11. Butcher D. T., Rodenhiser D. I. (2007): Epigenetic inactivation of **BRCA1** is associated with aberrant expression of **CTCF** and DNA methyltransferase (**DNMT3B**) in some sporadic breast tumours. *European J. of Cancer* **43**: 210-219.
12. Champoux J. J. (2001): DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Ann. Rev. Biochem.* **70**: 369–413.

13. Chen Y. T., Gure A. O., Tsang S., Stockert E., Jager E., Knuth A., Old L. J. (1998): Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *PNAS USA* **95**: 6919–6923.
14. Chen G., Templeton D., Suttle D. P., Stacey D. W. (1999): Ras stimulates DNA topoisomerase II α through MEK: a link between oncogenic signaling and a therapeutic target. *Oncogene* **18**: 7149-7160.
15. Chernukhin I. V., Shamsuddin S., Robinson A. F., Carne A. F., Paul A., El-Kady A. I., Lobanenkov V. V., Klenova E. M. (2000): Physical and functional interaction between two pluripotent proteins, the Y-box DNA/RNA-binding factor, YB-1, and the multivalent zinc finger factor, CTCF. *J. Biol. Chem.* **275**: 29915-29921.
16. Chernukhin I., Shamsuddin S., Kang S. Y., Bergstrom R., Kwon Y.-W., Yu W. Q., Whitehead J., Mukhopadhyay R., Docquier F., Farrar D., Morrison I., Vigneron M., Wu S.-Y., Chiang C.-M., Loukinov D., Lobanenkov V., Ohlsson R., Klenova E. (2007): CTCF interacts with and recruits the largest subunit of RNA polymerase II to CTCF target sites genome-wide. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 1631-1648.
17. D'Arcy V., Pore N., Docquier F., Abdullaev Z. K., Chernukhin I., Kita G.-X., Rai S., Smart M., Farrar D., Pack S., Lobanenkov V., Klenova E. (2008): BORIS, a paralogue of the transcription factor, CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours. *British J. of Cancer* **98**: 571–579.
18. Davies S.M (1996): Function of topoisomerase II and the consequences of inhibition. *Med. and Pediat. Oncol. Supplement* **1**: 12-19.
19. De La Rosa-Velázquez I. A., Rincón-Arano H., Benítez-Bribiesca L., Recillas-Targa F. (2007): Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res.* **67**: 2577-2585.
20. Dougherty C. J., Ichim T. E., Liu L., Reznik G., Min W.-P., Ghochikyan A., Agadjanyan M. G., Reznik B. N. (2008): Selective apoptosis of breast cancer cells by siRNA targeting of BORIS. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* **370**: 109-112.
21. Engel N., Thorvaldsen J. L., Bartolomei M. S. (2006): CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted **H19/Igf2** locus. *Human Mol. Genetics* **15**: 2945-2954.
22. Espeli O., Marians K. J. (2004) Untangling intracellular DNA topology. *Mol. Microbiol.* **52**: 925–931.

23. Falck J., Jensen P. B., Sehested M. (1999): Evidence for repressional role of an inverted CCAAT box in cell cycle-dependent transcription of the human DNA topoisomerase II α gene. *J. Biol. Chem.* **274**: 18753-18758.
24. Feinberg A. (2001): Cancer epigenetics takes center stage. *PNAS USA* **98**: 392-394.
25. Filippova G. N., Fagerlie S., Klenova E. M., Myers C., Dehner Y., Goodwin G., Neiman P. E., Collins S. J., Lobanekov V. V. (1996): An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian *c-myc* oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2802–2813.
26. Filippova G. N., Thienes C. P., Penn B. H., Cho D. H., Hu Y. J., Moore J. M., Klesert T. R., Lobanekov V. V., Tapscott S. J. (2001): CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the **DM1** locus. *Nat. Genet.* **28**: 335-343.
27. Filippova G. N., Qi C. F., Ulmer J. E., Moore J. M., Ward M. D., Hu Y. J., Loukinov D. I., Pugacheva E. M., Grundy P. E., Feinberg A. P., Cleton-Jansen A. M., Moerland E. W., Cornelisse C. J., Suzuki H., Komiya A., Lindblom A., Dorion-Bonnet F., Neiman P. E., Morse III H. C., Collins S. J., Lobanekov V. V. (2002): Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity. *Cancer Res.* **62**: 48–52.
28. Fritz P., Cabrera C. M., Dippon J., Gerteis A., Simon W., Aulitzky W.E' van der Kuip H. (2005): *c-erbB2* and topoisomerase II α protein expression independently predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study. *Breast Cancer Res.* **7**: 374-384.
29. Froelich-Ammon S. J., Osheroff N. (1995): Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J. Biol. Chem.* **270**:21429-21432.
30. Goswami P. C., Roti Roti J. L., Hunt C. R. (1996): The cell cycle-coupled expression of topoisomerase II α during S phase is regulated by mRNA stability and is disrupted by heat shock or ionizing radiation. *Mol. and Cell. Biol.* **16**: 1500–1508.
31. Grue P., Gräßer A., Sehested M., Jensen P. B., Uhse A., Straub T., Ness W., Boege F. (1998): Essential mitotic functions of DNA topoisomerase II alfa are not adopted by topoisomerase II beta in human H69 cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 33660-33666.
32. Gustafierro T., Cecchinelli B., Zampieri M., Reale A., Riggio G., Sthandier O., Zupi G., Calabrese L., Caiafa P. (2008): CTCF activates PARP-1 affecting DNA methylation machinery. *J. Biol. Chem.* **283**: 21873–21880.
33. Guérin E., Entz-Werlé N., Eyer D., Pencreac'h E., Schneider A., Falkenrodt A., Uettwiller F., Babin A., Voegeli A.-C., Lessard M., Gaub M.-P., Lutz P., Oudet P. (2003): Modification of

- topoisomerase genes copy number in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **17**: 532–540.
34. Hark A. T., Schoenherr C. J., Katz D. J., Ingram R. S., Levorse J. M., Tilghman S. M. (2000): CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the **H19/Igf2** locus. *Nature* **405**: 486-489.
 35. Hochhauser D., Stanway C. A., Harris A. L., Hickson I. D. (1992): Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human topoisomerase IIalpha gene. *J. Biol. Chem.* **267**: 18961-18965.
 36. Holden J. A., Perkins S. L., Snow G. W., Kjeldsberg C. R. (1995): Immunohistochemical staining for DNA topoisomerase II in non-Hodgkin's lymphomas. *Am. J. Clin. Pathol.* **104**: 54–59.
 37. Hong J. A., Kang Y., Abdullaev Z., Flanagan P. T., Pack S. D., Fischette M. R., Adnani M. T., Loukinov D. I., Vatin S., Risinger J. I., Custer M., Chen G. A., Zhao M., Nguyen D. M., Barrett J. C., Lobanenko V. V., Schrupp D. S. (2005): Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the **NY-ESO-1** promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. *Cancer Res.* **65**: 7763-7774.
 38. Hopfner R., Mousli M., Jeltsch J.-M., Voulgaris A., Lutz Y., Marin C., Bellocq J.-P., Oudet P., Bronner C. (2000): ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase II α expression. *Cancer Res.* **60**: 121-128.
 39. Hunter T., Karin M. (1992): The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**: 375-387.
 40. Isaacs R. J., Harris A. L., Hickson I. D. (1996): Regulation of the human topoisomerase II α gene promoter in confluence-arrested cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 16741-16747.
 41. Järvinen T. A., Tanner M., Rantanen V., Bärlund M., Borg A., Grénman S., Isola J. (2000): Amplification and deletion of topoisomerase II α gene are common in **ErbB-2** amplified breast cancer and alter the sensitivity to doxorubicin. *Am. J. Pathol.* **156**: 839–847.
 42. Järvinen T. A., Liu E. T. (2003a): **HER-2/neu** and topoisomerase II α in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **78**: 299–311.
 43. Järvinen T. A., Liu E. T. (2003b): Topoisomerase II α gene (**TOP2A**) amplification and deletion in cancer – more common than anticipated. *Cytopathol.* **14**: 309–313.
 44. Joshi A. A., Wu Z., Reed R. F., Suttle D. P. (2003): Nuclear factor-Y binding to the topoisomerase II α promoter is inhibited by both the p53 tumor suppressor and anticancer drugs. *Mol. Pharmacol.* **63**: 359-367.

45. Ju B. G., Lunnyak V. V., Perissi V., Garcia-Bassets I., Rose D. W., Glass C.K., Rosenfeld M. G. (2006): A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* **312**: 1798–1802.
46. Kadonaga J. T., Carner K. R., Masiarz F. R., Tjian R. (1987): Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **51**: 1079–1090.
47. Kanduri C., Pant V., Loukinov D., Pugacheva E., Qi C. F., Wolffe A., Ohlsson R., Lobanekov V. V. (2000): Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr. Biol.* **10**: 853-856.
48. Kang Y., Hong J.A., Chen G.A., Nguyen D.M., Schrupp D.S. (2007): Dynamic transcriptional regulatory complexes including BORIS, CTCF and Sp1 modulate NY-ESO-1 expression in lung cancer cells. *Oncogene* **26**: 4394-4403.
49. Kim T. H., Abdullaev Z. K., Smith A. D., Ching K. A., Loukinov D. I., Green R. D., Zhang M. Q., Lobanekov V. V., Ren B. (2007): Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* **128**: 1231–1245.
50. Klenova E. M., Nicolas R. H., Paterson H. F., Carne A. F., Heath C. M., Goodwin G. H., Neiman P. E. Lobanekov V. V. (1993): CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken *c-myc* gene, is an 11 Zn finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7612–7624.
51. Klenova E. M., Fagerlie S., Filippova G. N., Kretzner L., Goodwin G. H., Loring G., Neiman P. E., Lobanekov V. V. (1998): Characterization of the chicken CTCF genomic locus, and initial study of the cell cycle-regulated promoter of the gene. *J. Biol. Chem.* **273**: 26571–26579.
52. Klenova E. M., Morse H. C., Ohlsson R., Lobanekov V. V. (2002): The novel **BORIS** + **CTCF** gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Seminars in Cancer Biol.* **12**: 399-414.
53. Klenova E., Ohlsson R. (2005): Poly(ADP-ribosyl)ation and epigenetics: is CTCF PART of the plot? *Cell Cycle* **4**: 96–101.
54. Koren R., Kugel V., Dekel Y., Weissman Y., Livne P.M., Gal R. (2003): Human DNA topoisomerase-II α expression as a prognostic factor for transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *BJU International* **91**: 489–492.
55. Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjobgreen B., Strombom L., Stahlberg A., Zoric N. (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects of Med.* **27**: 95–125.

56. Kurz E. U., Wilson S. E., Leader K. B., Sampey B. P., Allan W. P., Yalowich J. C., Kroll D. J. (2001): The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate induces DNA topoisomerase II alpha expression and confers hypersensitivity to etoposide in human leukemic cell lines. *Mol. Cancer Ther.* **1**: 121-131.
57. Lobanenkov V. V., Goodwin G. H. (1989): CCCTC-binding protein: a new nuclear protein factor which interaction with 5'-flanking sequence of chicken **c-myc** oncogene correlates with its repression. *Proc. Acad. Sci. USSR (Moscow)* **309**: 741–745.
58. Lobanenkov V. V., Nicolas R. H., Adler V. V., Paterson H., Klenova E. M., Polotskaja A. V., Goodwin G. H. (1990): A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken **c-myc** gene. *Oncogene* **5**: 1743–1753.
59. Loukinov D. I., Pugacheva E., Vatolin S., Pack S. D., Moon H., Chernukhin I., Mannan P., Larsson E., Kanduri C., Vostrov A. A., Cui H., Niemitz E. L., Rasko J. E. J., Docquier F. M., Kistler M., Breen J., Zhuang Z., Quitschke W. W., Renkawitz R., Klenova E., Feinberg A. P., Ohlsson R., Morse H. C., Lobanenkov V. V. (2002): BORIS, a novel male germline-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11 Zn finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *PNAS USA* **99**: 6806–6811.
60. Magan N., Szremska A. P., Isaacs R. J., Stowell K. M. (2003): Modulation of DNA topoisomerase II α promoter activity by members of the Sp (specificity protein) and NF-Y (nuclear factor Y) families of transcription factors. *Biochem. J.* **374**: 723–729.
61. Majello B., De Luca P., Hagen G., Suske G., Lania L. (1994): Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4914–4921.
62. Mantovani R. (1998): A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res.* **26**: 1135-1143.
63. Matsuo K.-I., Kohno K., Sato S., Uchiumi T., Tanimura H., Yamada Y., Kuwano M. (1993): Enhanced expression of the DNA topoisomerase II gene in response to heat shock stress in human epidermoid cancer cells. *Cancer Res.* **53**: 1085-1090.
64. McClendon A. K., Osheroff N. (2007): DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutation Res.* **623**: 83–97.
65. Murphy A. J., Hughes C. A., Barrett C., Magee H., Loftus B., O'Leary J. J., Sheils O. (2007): Low-level **TOP2A** amplification in prostate cancer is associated with **HER2** duplication, androgen resistance, and decreased survival. *Cancer Res.* **67**: 2893-2898.

66. Muss H. B., Thor A. D., Berry D. A., Kute T., Liu E. T., Koerner F., Cirrincione C. T., Budman D. R., Wood W. C., Barcos M., Henderson I. C. (1994): **c-erbB-2** expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **330**: 1260-1266.
67. Naegeli H., Loetscher P., Althaus F. R. (1989): Poly ADP-ribosylation of proteins. Processivity of a post-translational modification. *J. Biol. Chem.* **264**: 14382-14385.
68. Ng S.-W., Eder J. P., Schnipper L. E., Chan V. T. W. (1995): Molecular cloning and characterization of the promoter for the Chinese hamster DNA topoisomerase II α gene. *J. Biol. Chem.* **270**: 25850-25858.
69. Ohlsson R., Renkawitz R., Lobanekov V. (2001): CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet.* **17**: 520–527.
70. Orlando V. (2000): Mapping chromosomal proteins **in vivo** by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *TIBS* **25**: 99-104.
71. Qi C. F., Martensson A., Mattioli M., Dalla-Favera R., Lobanekov V. V., Morse H. C. 3rd. (2003): CTCF functions as a critical regulator of cell-cycle arrest and death after ligation of the B cell receptor on immature B cells. *PNAS USA* **100**: 633-638.
72. Risinger J. I., Chandramouli G. V. R., Maxwell G. L., Custer M., Pack S., Loukinov D., Aprelikova O., Litzi T., Schrupp D. S., Murphy S. K., Berchuck A., Lobanekov V., Barrett J. C. (2007): Global expression analysis of cancer/testis genes in uterine cancers reveals a high incidence of BORIS expression. *Clinical Cancer Res.* **13**: 1713-1719.
73. Ronchi A., Bellorini M., Mongelli N., Mantovani R. (1995): CCAAT-box binding protein NF-Y (CBF,CP1) recognizes the minor groove and distorts DNA. *Nuc. Acids Res.* **23**: 4565–4572.
74. Schulz W. A. (2005): Breast cancer. U: Schulz, W. A (ur.) *Molecular Biology of Human Cancers (An Advanced Student`s Textbook)*. Springer Verlag, str. 357-382.
75. Simon R., Atefy R., Wagner U., Forster T., Fijan A., Bruderer J., Wilber K., Mihatsch M. J., Gasser T., Sauter G. (2003): **HER-2** and **TOP2A** coamplification in urinary bladder cancer. *J. of Cancer* **107**: 764-772.
76. Solomon M. J., Varshavski A. (1985): Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: A probe for **in vivo** chromatin structures. *PNAS USA* **82**: 6470-6474.
77. Spencer V. A., Sun J.-M., Li L., Davie J.R. (2003): Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* **31**: 67-75.
78. Tolner B., Hartley J. A., Hochhauser D. (2001): Transcriptional regulation of topoisomerase II α at confluence and pharmacological modulation of expression by **bis**-benzimidazole drugs. *Mol. Pharmacol.* **59**: 699-706.

79. Ulaner G. A., Vu T. H., Li T., Hu J.-F., Yao X.-M., Yang Y., Gorlick R., Meyers P., Healey J., Ladanyi M., Hoffman A. R. (2003): Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site. *Hum. Mol. Genet.* **12**: 535–549.
80. Vatolin S., Abdullaev Z., Pack S. D., Flanagan P. T., Custer M., Loukinov D. I., Pugacheva E., Hong J. A., Morse III H., Schrupp D. S., Risinger J. I., Barrett J. C., Lobanenko V. V. (2005): Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of **MAGE-A1** and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res.* **65**: 7751-7762.
81. Vostrov A. A., Quitschke W. W. (1997): The zinc finger protein CTCF binds to the APB β domain of the amyloid β -protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **272**: 33353-33359.
82. Wang J.C. (2002): Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **3**: 430-440.
83. Wang Q., Zambetti G. P., Suttle D. P. (1997): Inhibition of DNA topoisomerase II α gene expression by the p53 tumor suppressor. *Mol. and Cell. Biol.* **17**: 389–397.
84. Williams A. O., Isaacs R. J., Stowell K. M. (2007): Down-regulation of human topoisomerase II α expression correlates with relative amounts of specificity factors Sp1 and Sp3 bound at proximal and distal promoter regions. *BMC Mol Biol.* **8**: 36.
85. Woessner R. D., Mattern M. R., Mirabelli C. K., Johnson R. K., Drake F.H. (1991): Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ.* **2**: 209-214.
86. Xie X., Mikkelsen T. S., Gnirke A., Lindblad-Toh K., Kellis M., Lander E. S. (2007): Systematic discovery of regulatory motifs in conserved regions of the human genome, including thousands of CTCF insulator sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 7145–7150.
87. Yoshizumi M., Hsieh C., Zhou F., Tsai J., Patterson C., Perrella M. A., Lee M. (1995): The ATF site mediates downregulation of the cyclin A gene during contact inhibition in vascular endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3266-3272.
88. Yu B., Datta P. K., Bagchi S. (2003): Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites. *Nucleic Acids Res.* **31**: 5368–5376.
89. Yu W., Ginjala V., Pant V., Chernukhin I., Whitehead J., Docquier F., Farrar D., Tavosoidana G., Mukhopadhyay R., Kanduri C., Oshimura M., Feinberg A. P., Lobanenko V., Klenova

- E., Ohlsson R. (2004): Poly(ADP-ribosylation) regulates CTCF-dependent chromatin insulation. *Nature Genetics* **36**: 1105 – 1110.
90. Yusufzai T. M., Tagami H., Nakatani Y., Felsenfeld G. (2004): CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol. Cell* **13**: 291-298.
91. Zaniolo K., Desnoyers S., Leclerc S., Guérin S. L. (2007): Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene expression through the post-translational modification of Sp1: a nuclear target protein of PARP-1. *BMC Mol. Biol.* **8**: 96.
92. Zhou Z., Zwelling L. A., Kawakami Y., An T., Kobayashi K., Herzog C., Kleinerman E.S. (1999): Adenovirus-mediated human topoisomerase II α gene transfer increases the sensitivity of etoposide-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res.* **59**: 4618-4624.

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 6.10.1985. u Karlovcu, gdje sam s odličnim uspjehom i pohvalama završila osnovnu školu „Braća Seljan“ i srednju školu „Gimnazija Karlovac“. Tijekom školovanja sudjelovala sam na Županijskim natjecanjima iz ekologije, engleskog i njemačkog jezika te biologije, a kao najveći uspjeh istaknula bih osvojeno prvo mjesto na Državnom natjecanju iz njemačkog jezika 2004. godine.

Studij za dipl. ing. molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala sam 2004. godine. Tri semestra sam radila na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka kao demonstrator na Praktikumumu iz genetike (listopad 2006. - veljača 2008.), a zatim i jedan semestar kao demonstrator na Praktikumumu iz molekularne genetike (svibanj 2008). Na četvrtoj godini studija sam sa kolegom radila projekt pod vodstvom doc. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek u Laboratoriju za fiziologiju bilja na Botaničkom zavodu. Iz dobivenih rezultata smo napisali znanstveni rad pod naslovom «Epigenetski prijenos odgovora na UV-C stres u vrste *Arabidopsis thaliana* L.: antioksidacijski enzimi i protein Hsp70», za kojeg smo 2008. godine dobili Rektorovu nagradu za najbolji rad na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu.

Od listopada 2006. do ožujka 2008. bila sam uključena u rad Hrvatske udruge za međunarodnu razmjenu studenata prirodnih i tehničkih znanosti (IAESTE Croatia) u radnim grupama «Izlazna administracija» i «Ljetna recepcija». Preko navedene udruge sam 2008. godine bila primljena na dvomjesečnu stručnu praksu na Institutu «Hans Knöll» u Jeni (Njemačka).

Aktivno govorim njemački i engleski jezik te kao dokaz toga imam potvrdu DAAD-a («Deutscher akademischer Austauschdienst») i položeni jezični ispit TOEFL («Test of English as a foreign language»). Posjedujem osnovno znanje o radu na računalima.