

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDRA MRAMOR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDRA MRAMOR

**OPTIMIZACIJA METODE KVANTITATIVNE VERIŽNE REAKCIJE
S POLIMERAZO ZA OCENJEVANJE MULTIPOTENTNOSTI
MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC**

**QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD
OPTIMIZATION FOR EVALUATING MULTIPOTENCY OF
MESENCHYMAL STEM CELLS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem izdelala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod vodstvom mentorice prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorice asist. dr. Janje Zupan, mag. farm.

Vzorke subhondralne kostnine in skeletnih mišic smo pridobili na Inštitutu za sodno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, iz Ortopedske bolnišnice Valdoltra in Kliničnega oddelka za travmatologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Izolacijo molekule RNA iz kostnega in mišičnega tkiva, vrednotenje izolirane RNA ter prepis izolirane RNA v cDNA so opravili na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se vsem, ki so pripomogli k nastanku magistrske naloge. Kot prvi bi se rada zahvalila prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem., da me je sprejela pod svoje mentorstvo in mi omogočila možnost izdelave magistrske naloge. Prav tako se ji zahvaljujem za strokoven pregled vsebine naloge. Še posebej se zahvaljujem somentorici asist. dr. Janji Zupan, mag. farm., za potrpežljivost in za vso strokovno pomoč pri delu v laboratoriju ter spodbudo in nasvete pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi asist. Klemnu Čamerniku, mag. farm., za pripravo vzorcev in vso strokovno pomoč.

Iskrena hvala tudi staršem, ker mi vedno stojijo ob strani in so mi omogočili študij.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom asist. dr. Janje Zupan, mag. farm.

Sandra Mramor

Ljubljana, marec 2018

Člani komisije za zagovor in oceno magistrske naloge:

Predsednik: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Mentorica: prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

Somentorica: asist. dr. Janja Zupan, mag. farm.

Članica: doc. dr. Nina Kočevár Glavač, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	MATIČNE CELICE	1
1.2	MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE (MSC)	2
1.2.1	Prepoznavanje MSC	3
1.2.2	Izolacija MSC in gojenje v pogojih <i>in vitro</i>	3
1.2.3	Mezenhimske matične celice, izolirane iz mišic	4
1.3	DIFERENCIACIJA MSC	6
1.3.1	Adipogena diferenciacija	7
1.3.2	Osteogena diferenciacija.....	7
1.3.3	Miogena diferenciacija	8
1.4	UPORABNOST MSC V MEDICINI	8
1.5	KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR).....	9
1.5.1	Osnovni princip verižne reakcije s polimerazo	9
1.5.2	Načini zaznavanja produktov reakcije qPCR	10
1.5.3	Interpretacija krivulje pomnoževanja	11
1.5.4	Načrtovanje uspešne reakcije qPCR.....	12
1.5.5	Normalizacija.....	13
2	NAMEN DELA.....	14
2.1	NAČRT DELA	14
2.2	HIPOTEZE	15
3	MATERIALI IN METODE	16
3.1	SPLOŠNA OPOZORILA PRI DELU	16
3.2	VZORCI.....	16
3.3	KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR) ZA MERJENJE IZRAŽANJA PREISKOVANIH GENOV	17
3.3.1	Materiali in oprema	17
3.3.2	Optimizacija qPCR.....	21
3.3.3	Predhodna priprava in obdelava vzorcev.....	22
3.3.4	Postopek dela za metodo qPCR.....	22
3.4	DOLOČANJE REFERENČNIH GENOV ZA NORMALIZACIJO.....	24
3.4.1	Merjenje izražanja referenčnih genov z metodo qPCR.....	25

3.4.2	Analiza rezultatov z uporabo programa NormFinder.....	25
3.5	HISTOKEMIJSKO BARVANJE	26
3.6	KVANTIFIKACIJA REZULTATOV IZRAŽANJA IZBRANIH OZNAČEVALCEV	26
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	28
4.1	ANALIZIRANI VZORCI.....	28
4.2	ANALIZA PODATKOV REAKCIJE qPCR	28
4.2.1	Krivulja pomnoževanja.....	29
4.2.2	Standardna krivulja.....	29
4.2.3	Analiza talilne krivulje	30
4.3	ANALIZA OPTIMIZACIJE METODE qPCR	32
4.3.1	Oligonukleotidni začetniki za merjenje izražanja adipogenih označevalcev	33
4.3.2	Oligonukleotidni začetniki za merjenje izražanja osteogenih označevalcev.	34
4.3.3	Oligonukleotidni začetniki za merjenje izražanja miogenih označevalcev ...	35
4.4	IZBIRA TREH REREFENČNIH GENOV ZA NORMALIZACIJO	37
4.5	IZRAŽANJE OZNAČEVALCEV DIFERENCIACIJE	39
4.5.1	Izražanje označevalcev adipogene diferenciacije.....	40
4.5.2	Izražanje označevalcev osteogene diferenciacije	48
4.5.3	Izražanje označevalcev miogene diferenciacije	55
5	SKLEP.....	63
6	LITERATURA	64
7	PRILOGE	68
7.1	Priloga 1: Vzorci cDNA, uporabljeni v magistrski nalogi.....	68
7.2	Priloga 2: Normalizirane vrednosti izražanja adipogenih označevalcev na GAPDH in na tri referenčne gene.	71
7.3	Priloga 3: Normalizirane vrednosti izražanja osteogenih označevalcev na GAPDH in na tri referenčne gene.....	72
7.4	Priloga 4: Normalizirane vrednosti izražanja miogenih označevalcev na GAPDH.....	73
7.5	Priloga 5: Normalizirane vrednosti izražanja miogenih označevalcev na tri referenčne gene.	74

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Osnovna priporočila za načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov.	12
Preglednica II: Seznam oligonukleotidnih začetnikov za qPCR.	18
Preglednica III: Standardi za optimizacijo metode qPCR in merjenje izražanja izbranih označevalcev na vzorcih.	22
Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za izvedbo reakcije qPCR.	23
Preglednica V: Reakcijski pogoji za izvedbo reakcije qPCR.	24
Preglednica VI: Rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov za adipogene označevalce.	34
Preglednica VII: Rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov za osteogene označevalce.	35
Preglednica VIII: Rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov za miogene označevalce.	36
Preglednica IX: Rezultati analize NormFinder v skupini adipogenih označevalcev.	37
Preglednica X: Rezultati analize NormFinder v skupini osteogenih označevalcev.	38
Preglednica XI: Rezultati analize NormFinder v skupini miogenih označevalcev.	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Predstavitev potentnosti, plastičnosti in diferenciacijskega potenciala matičnih celic.....	1
Slika 2: Shema simetrične in asimetrične delitve.....	5
Slika 3: Najpogostejše poti diferenciacije MSC <i>in vitro</i>	6
Slika 4: Shema verižne reakcije s polimerazo.	9
Slika 5: Princip nespecifičnega načina zaznavanja produkta reakcije qPCR z uporabo barvila SYBR Green.	10
Slika 6: Krivulja pomnoževanja in njeni osnovni pojmi.	11
Slika 7: Krivulja pomnoževanja standardov pri merjenju izražanja RPL13A.	29
Slika 8: Standardna krivulja za analizo izražanja PPARG na vzorcih.	30
Slika 9: Prikaz idealne talilne krivulje. Krivuljo smo dobili pri analizi izražanja RUNX2 na vzorcih.	31
Slika 10: Prikaz analize talilnih vrhov pri izražanju COL1A1 na vzorcih in prikaz analize talilnih vrhov pri izražanju RPL13A na vzorcih.	32
Slika 11: Primerjava izražanja adipogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 3) in kontrolnim vzorcem (vzorec 4).	40
Slika 12: Barvanje tretiranega (vzorec 3) in kontrolnega vzorca (vzorec 4) z <i>Oil Red O</i> ... 40	
Slika 13: Primerjava izražanja adipogenih označevalcev med tretiranimi (5 in 8) in kontrolnimi vzorci (6 in 9).....	41
Slika 14: Barvanje tretiranega (vzorec 5) in kontrolnega vzorca (vzorec 6) z <i>Oil Red O</i> ... 42	
Slika 15: Primerjava izražanja adipogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 10) in kontrolnim vzorcem (vzorec 11).	43
Slika 16: Talilna vrhova tretiranega vzorca 10 in kontrolnega vzorca 11 pri izražanju ADIPOQ.	43
Slika 17: Barvanje tretiranega (vzorec 10) in kontrolnega vzorca (vzorec 11) z <i>Oil Red O</i>	44
Slika 18: Primerjava izražanja adipogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 12) in kontrolnim vzorcem (vzorec 13).	44
Slika 19: Barvanje tretiranega (vzorec 12) in kontrolnega vzorca (vzorec 13) z <i>Oil Red O</i>	45

Slika 20: Primerjava izražanja adipogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 14) in kontrolnim vzorcem (vzorec 15).	45
Slika 21: Barvanje tretiranega (vzorec 14) in kontrolnega vzorca (vzorec 15) z <i>Oil Red O</i>	46
Slika 22: Primerjava izražanja adipogenih označevalcev pri tretiranem vzorcu (vzorec 10), kontrolnem vzorcu (vzorec 11) in negativni kontroli (vzorec 18).....	47
Slika 23: Primerjava izražanja osteogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 41) in kontrolnim vzorcem (vzorec 42).	48
Slika 24: Barvanje tretiranega (vzorec 41) in kontrolnega vzorca (vzorec 42) z <i>Alizarin Red S</i>	49
Slika 25: Primerjava izražanja osteogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 43) in kontrolnim vzorcem (vzorec 44).	49
Slika 26: Barvanje tretiranega (vzorec 43) in kontrolnega vzorca (vzorec 44) z <i>Alizarin Red S</i>	50
Slika 27: Primerjava izražanja osteogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 45) in kontrolnim vzorcem (vzorec 46).	50
Slika 28: Barvanje tretiranega (vzorec 45) in kontrolnega vzorca (vzorec 46) z <i>Alizarin Red S</i>	51
Slika 29: Primerjava izražanja osteogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 48) in kontrolnim vzorcem (vzorec 49) v hipoksiji.	52
Slika 30: Barvanje tretiranega (vzorec 48) in kontrolnega vzorca (vzorec 49) z <i>Alizarin Red S</i>	52
Slika 31: Primerjava izražanja osteogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 51) in kontrolnim vzorcem (vzorec 52).	53
Slika 32: Barvanje tretiranega (vzorec 51) in kontrolnega vzorca (vzorec 52) z <i>Alizarin Red S</i>	53
Slika 33: Primerjava izražanja osteogenih označevalcev med osteoblasti (vzorec 47) in BMSC (vzorec 53).....	54
Slika 34: Primerjava izražanja miogenih označevalcev med tretiranimi vzorci 31, 32 in 33 ter kontrolnim vzorcem 34.	56
Slika 35: Primerjava izražanja miogenih označevalcev med različnimi pasažami MMSC in BMSC.	57
Slika 36: Desmin v vzorcu 30, kot dokaz uspešne miogene diferenciacije MMSC.....	58

Slika 37: Primerjava izražanja miogenih označevalcev v različnih pasažah MMSC.....	59
Slika 38: Primerjava izražanja miogenih označevalcev med MMSC (vzorec 27) in BMSC (vzorca 35 in 36).....	60
Slika 39: Primerjava izražanja miogenih označevalcev med MMSC (vzorec 29) in BMSC (vzorec 36).....	61
Slika 40: Primerjava izražanja miogenih označevalcev med MMSC (vzorec 22) in BMSC (vzorec 36).....	62

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Izračun izražanja gena z normalizacijo na en referenčni gen.	27
Enačba 2: Izračun izražanja gena z normalizacijo na tri referenčne gene.	27
Enačba 3: Izračun učinkovitosti reakcije qPCR.	30

POVZETEK

Mezenhimske matične celice (MSC) so multipotentne stromalne celice s sposobnostjo samoobnavljanja in pretvorbe v številne celične linije. Do danes so v mnogih študijah že dokazali, da z uporabo ustreznega gojitvenega medija v pogojih *in vitro* razvoj MSC lahko usmerimo npr. v hrustančne, maščobne, mišične in kostne celice, s čimer dokazujemo njihovo multipotentnost. Naš namen v magistrskem delu pa je bil dokazati adipogeno, osteogeno in miogeno diferenciacijsko sposobnost MSC, ki so bile izolirane iz skeletne mišice (MMSC). Diferenciacijsko sposobnost MMSC smo ocenili z merjenjem izražanja 15 specifičnih celičnih označevalcev z uporabo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR).

V raziskavo smo vključili 54 vzorcev subhondralne kostnine in skeletnih mišic preiskovancev z osteoporozo, osteoartrozo in brez mišično-skeletnih bolezni. Z metodo qPCR smo izmerili izražanje označevalcev adipogene (ADIPOQ, FABP4 in PPARG), osteogene (hALP, OC, PTHR1, COL1A1 in RUNX2) in miogene (PAX7, MYOD1, ACTA2, TPNT, MYOG, ACTC1 in MYH1) diferenciacije. Izmerjene gene smo normalizirali na referenčne gene, ki smo jih izbrali s pomočjo programa NormFinder. Te rezultate smo primerjali z rezultati histokemijskega barvanja diferenciranih MMSC s specifičnimi barvili za adipogenezo in osteogenezo.

Rezultati izražanja specifičnih adipogenih in osteogenih označevalcev so sovpadali z rezultati histokemijskega barvanja, s čimer smo dokazali uspešno adipogeno in osteogeno diferenciacijo MMSC v ti dve liniji. Nismo pa uspeli dokazati miogene diferenciacije MMSC, katere postopek je bil še v procesu optimizacije. Rezultate izražanja 15 genov smo normalizirali na GAPDH in na tri različne referenčne gene, vendar razlik nismo dokazali.

Na osnovi dokazov ujemanja med izražanjem adipogenih in osteogenih označevalcev z rezultati histokemijskega barvanja, lahko zaključimo, da so MMSC sposobne diferenciacije v adipogeno in osteogeno linijo. S tem smo deloma potrdili multipotentnost MMSC, predmet nadaljnjih študij pa bo razvoj novega postopka miogeneze in hondrogeneze. Pomemben zaključek naše naloge je tudi, da večje število referenčnih genov ne pripomore bistveno k večji kakovosti normalizacije rezultatov izražanja proučevanih genov.

Ključne besede: mezenhimske matične celice, diferenciacija, metoda qPCR, optimizacija, referenčni geni

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent stromal cells capable of self-renewal and they also possess an exceptional ability to differentiate into several cell lineages. To date, many studies have shown, that (depending on culture media) MSCs have the potential to differentiate into chondrocytes, adipocytes, myocytes or osteoblasts, thus proving their multipotency. The purpose of this master's thesis was to demonstrate the adipogenic, osteogenic and myogenic differentiation potential of MSC isolated from the skeletal muscle (MMSC) by measuring the expression of 15 specific markers of individual cell lines using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR).

The study included 54 samples of subchondral bone and skeletal muscles of patients with osteoporosis, osteoarthritis and donors with no musculoskeletal disorders. Using qPCR method, the expression of adipogenic (ADIPOQ, FABP4 in PPARG), osteogenic (hALP, OC, PTHR1, COL1A1 in RUNX2) and myogenic (PAX7, MYOD1, ACTA2, TPNT, MYOG, ACTC1 in MYH1) markers of differentiation was measured. To normalize the expression of the measured genes we used the most established approach, that is, the normalization to the reference genes, selected using the NormFinder program. These results were compared with the results of histochemical staining of differentiated MMSC with specific colorants for adipogenesis and osteogenesis.

The results of expressing specific adipogenic and osteogenic differentiation markers coincided with the results of histochemical staining, thus proving the successful adipogenic and osteogenic differentiation of MMSC in these two lines. We were not able to prove myogenic differentiation of the MMSC, which is still in the process of optimization. The expression results of 15 genes were normalized to GAPDH and to three different reference genes, but differences were not demonstrated.

Based on evidence of the correlation between the expression of adipogenic and osteogenic markers with the results of histochemical staining, we can conclude that the MMSC are capable of adipogenic and osteogenic differentiation. We partly confirmed the multipotency of the MMSC and the development of a new protocol of myogenesis and chondrogenesis will be the subject of further studies. We have shown, that a large number of reference genes do not significantly contribute to the quality of normalization of the expression results of the genes examined, which is also an important conclusion of our thesis.

Key words: mesenchymal stem cells, differentiation, qPCR method, optimization, reference gene

SEZNAM OKRAJŠAV

ACTA2	alfa-2 aktin gladkega mišičja aorte, <i>angl. actin, alpha 2, smooth muscle, aorta</i>
ACTB	beta aktin, <i>angl. actin beta</i>
ACTC1	alfa aktin srčne mišice 1, <i>angl. actin, alpha, cardiac muscle 1</i>
ALP	alkalna fosfataza, <i>angl. alkaline phosphatase</i>
ADIPOQ	adiponektin, vsebuje C1Q in kolagensko domeno, <i>angl. adiponectin, C1Q and collagen domain containing</i>
B2M	beta 2 mikroglobulin, <i>angl. beta-2-microglobulin</i>
BMSC	mezenhimske matične celice, izolirane iz kosti, <i>angl. bone-derived mesenchymal stem cells</i>
$\bar{c}$	povprečna koncentracija
CD	celični označevalec, <i>angl. clusters of differentiation</i>
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina, <i>angl. complementary deoxyribonucleic acid</i>
COL1A1	alfa 1 veriga kolagena tipa 1, <i>angl. collagen type I alpha 1</i>
Cp	točka prečkanja, <i>angl. crossing point</i>
Cq	cikel kvantifikacije, <i>angl. quantification cycle</i>
dH ₂ O	ultra čista voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina, <i>angl. deoxyribonucleic acid</i>
E	učinkovitost, <i>angl. efficiency</i>
F	istosmerni, <i>angl. forward</i>
FABP4	maščobne kisline vezoči protein 4, <i>angl. fatty acid binding protein 4</i>
FACS	pretočna citometrija, <i>angl. fluorescence activated cell sorting</i>
GC	bazni par gvanozin-citozin
gDNA	genomska DNA, <i>angl. genomic DNA</i>

GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza, <i>angl. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GUSB	beta glukoronidaza, <i>angl. glucuronidase beta</i>
hALP	humana alkalna fosfataza, <i>angl. human alkaline phosphatase</i>
MMSC	mezenhimske matične celice, izolirane iz mišic, <i>angl. muscle-derived mesenchymal stem cells</i>
MSC	mezenhimske matične/stromalne celice, <i>angl. mesenchymal stem/stromal cells</i>
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina, <i>angl. messenger ribonucleic acid</i>
MYH1	protein za težko verigo miozina 1, <i>angl. myosin heavy chain 1</i>
MyoD1	regulacijski protein za diferenciacijo mišičnih celic D1, <i>angl. myogenic differentiation 1</i>
Myog	miogenin, <i>angl. myogenin</i>
NTC	slepi vzorec, <i>angl. no-template control</i>
OC	osteokalcin, <i>angl. osteocalcin</i>
Pax7	»paired box« protein 7, <i>angl. paired box 7</i>
PCR	verižna reakcija s polimerazo, <i>angl. polymerase chain reaction</i>
PPARG	s peroksiomskim proliferatorjem aktivirani receptor gama, <i>angl. peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>
PTHr1	receptor za paratireoidni hormon 1, <i>angl. parathyroid hormone 1 receptor</i>
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času, <i>angl. quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
R	obratnosmerni, <i>angl. reverse</i>
RG	referenčni gen, <i>angl. reference gene</i>
RNA	ribonukleinska kislina, <i>angl. ribonucleic acid</i>
RPL13A	ribosomski protein L13a, <i>angl. ribosomal protein L13a</i>

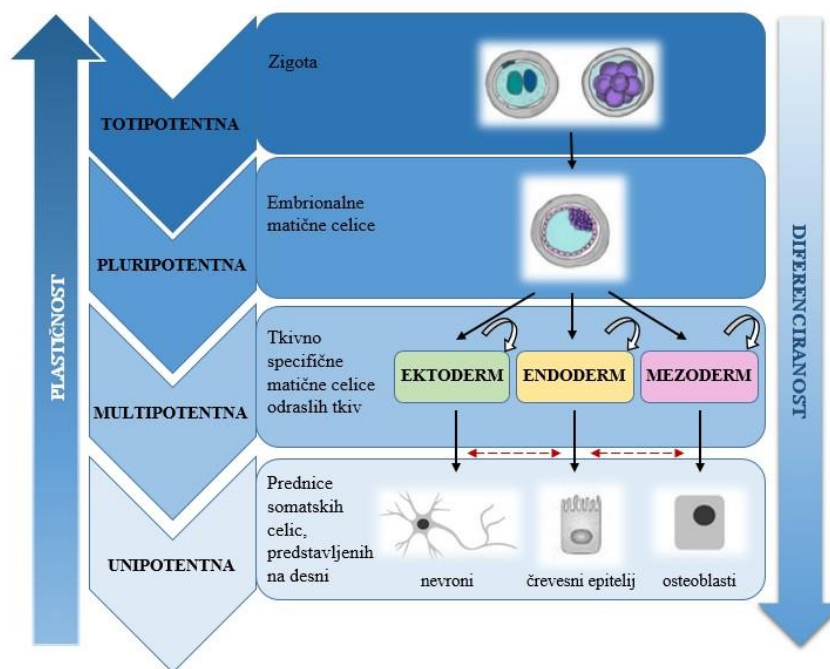
RPLP0	bočna podenota P0 ribosomskega proteina, <i>angl. ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i>
RT	reverzna transkriptaza, <i>angl. reverse transcriptase</i>
Runx2	transkripcijski dejavnik 2 z "Runt" domeno, <i>angl. Runt related transcription factor 2</i>
st	standard
Tm	talilna temperatura, <i>angl. melting temperature</i>
TBP	na TATA zaporedje vezoči se protein, <i>angl. TATA-box binding protein</i>
TPNT	troponin T2, srčni tip, <i>angl. troponin T2, cardiac type</i>
UBC	ubikvitin C, <i>angl. ubiquitin C</i>

1 UVOD

1.1 MATIČNE CELICE

Matične celice so posebna vrsta celic, ki jih najdemo v številnih tkivih odraslega človeka. Organizem jih ohranja vse življenje z namenom obnove tkivnih poškodb in nadomeščanja odmrlih celic. Gre za nespecializirane celice, ki se nahajajo v tkivu zarodka in odraslega organizma v majhnem številu in jih opredeljujejo tri ključne lastnosti. Prva lastnost je, da so popolnoma nediferencirane celice, ki imajo sposobnost dolgotrajnega asimetričnega deljenja in torej s tem sposobnost samoobnavljanja. Pri tem tvorijo na eni strani sebi identične kopije, na drugi strani pa se hčerinska celica usmeri v novo celično linijo, ki je bolj diferencirana in s tem izkazuje svojo potentnost, ki je druga ključna lastnost matičnih celic. Manj kot je celica diferencirana, večjo potentnost izkazuje. Tretja lastnost pa je plastičnost, kar pomeni, da so sposobne pretvorbe v celice tkiv drugih zarodnih plasti. Zaradi teh lastnosti matične celice predstavljajo močno orodje v regenerativni medicini, z njimi namreč že zdravimo določene degenerativne, presnovne, prirojene in celo rakave bolezni, prav tako zdravimo tudi mehanske poškodbe tkiv in organov (1, 2, 3).

Matične celice glede na potentnost delimo na totipotentne, pluripotentne, multipotentne in unipotentne (slika 1).



Slika 1: Predstavitev potentnosti, plastičnosti in diferenciacijskega potenciala matičnih celic. Prirejeno po (1, 4, 5).

Totipotentne celice so sposobne tvoriti celoten organizem, vključno z izvenembrionalnim tkivom. Pluripotentne celice so se sposobne diferencirati v vse tri zarodne plasti (mezoderm, ektoderm in endoderm), in podobno kot spolne celice ne morejo več tvoriti izvenembrionalnega tkiva. Multipotentne matične celice pa so tiste, ki se lahko diferencirajo v različne tipe celic, vendar iz iste zarodne plasti tj. mezoderma, ektoderma ali endoderma. Na primer, če multipotentne celice izvirajo iz mezodermalne zarodne plasti, se lahko diferencirajo samo v vse tipe celic mezoderma npr. osteoblaste, adipocite, miocite, hondrocite, ne pa ektoderma in endoderma. Celice, ki so tkivno specifične in se lahko razvijejo v samo eno celično linijo, pa so unipotentne. Imenujemo jih tudi progenitorske celice ali celice prednice (2, 3).

Vsa tkiva odraslega človeka vsebujejo določene matične celice. Običajno so to unipotentne matične celice, nekateri organi pa vsebujejo tudi določen delež multipotentnih ali celo pluripotentnih matičnih celic. Tak organ je kostni mozeg. V njem najdemo dve veliki skupini matičnih celic, pomembni za regenerativno medicino in celično terapijo, kot tudi za tkivno inženirstvo. Prva skupina so krvotvorne matične celice, ki jih od vseh vrst matičnih celic v medicini najbolj uspešno uporabljamo. Drugo veliko skupino pa predstavljajo mezenhimske matične/stromalne celice (MSC), ki so morfološko in fenotipsko zelo raznolika populacija matičnih celic, sposobnih obsežne proliferacije in diferenciacije v različna tkiva mezoderma (2). Posledično dandanes v raziskavah MSC dobivajo vse več pozornosti, saj želijo raziskovalci odkriti njihovo klinično uporabnost.

1.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE (MSC)

Dandanes obstajata dva različna pogleda na MSC. Prvi opredeljuje MSC kot stromalne celice kostnega mozga, ki predstavljajo multipotentne predhodnike mezenhimskih tkiv z zmožnostjo samoobnavljanja, hkrati pa so podpora krvotvornim celicam pri njihovi rasti in diferenciaciji (3, 6). Drugi vidik MSC opredeljuje kot multipotentne predhodnike, prisotne v številnih tkivih in zato jih lahko izoliramo iz praktično katerega koli organa odraslega človeka. Namreč ena od teorij MSC opredeljuje kot pericite, torej, da so to celice, ki se oklepajo žilnih sten (5, 6, 7, 8). Ne glede na omenjena vidika definicije so MSC heterogena in redka populacija celic, ki izvirajo iz mezodermalne zarodne plasti. Pripisujemo jim lastnosti matičnih celic, saj so sposobne samoobnavljanja in diferenciacije v specifično celično linijo. MSC sicer zaznamuje multipotentnost, vendar raziskave kažejo, da imajo tudi

pluripotentni potencial. Sposobne naj bi bile tudi transdiferenciacije *in vitro* v celice drugih zarodnih plasti (ektoderma in endoderma), česar pa v pogojih *in vivo* še niso potrdili (3, 4).

1.2.1 Prepoznavanje MSC

Najpogostejše uporabljen vir za izolacijo MSC je kostni mozeg, saj so te MSC tudi najbolj raziskane. Seveda pa lahko MSC izoliramo tudi iz maščobnega tkiva, skeletne mišice, sinovijske ovojnice, popkovnice in popkovnične krvi, amnijske tekočine, placente, pljuč in tudi iz zob (7). Pri vsaki izolaciji je potrebno preveriti in dokazati, da smo res izolirali MSC. Pri tem si pomagamo tudi z določenimi površinskimi molekulami, ki jih imenujemo celični označevalci (*angl. cluster of differentiation*, CD). Molekule CD so namreč značilni označevalci določenih tipov celic (9). Mednarodna zveza za celično terapijo (*angl. International Society for Cellular Therapy*, ISCT) je postavila tri minimalne kriterije, s katerimi lahko potrdimo istovetnost MSC:

1. Sposobnost pritrditve na plastiko v standardnih pogojih gojenja *in vitro*
2. Izražanje celičnih označevalcev:
 - Pozitivni označevalci MSC: CD73, CD90 in CD105
 - Negativni označevalci MSC: CD45, CD34, CD14 ali CD11b, CD79 α ali CD19, HLA-DR
3. Sposobnost diferenciacije *in vitro* v kostne, maščobne in hrustančne celice (1, 10).

Kljub temu, da MSC poznamo že dolgo časa (približno 25 let), še vedno nismo uspeli odkriti specifičnega označevalca, s katerim bi nedvoumno potrdili identifikacijo MSC (7, 11). To potrjuje heterogenost celic, kar pa je tudi za pričakovati glede na dejstvo, da MSC lahko pridobimo iz toliko različnih tkiv, ter glede na njihovo sposobnost diferenciacije v različne celične linije.

1.2.2 Izolacija MSC in gojenje v pogojih *in vitro*

Kljub temu, da lahko MSC izoliramo iz številnih tkiv, je še vedno problem, da so v teh tkivih maloštevilne. Namreč v kostnem mozgu je njihova zastopanost zgolj od 0,0001 do 0,01 %. Kljub temu je izolacija tako majhnega števila teh celic precej enostavna, saj izkoriščamo njihovo lastnost, da se prilepijo na plastično površino. Osamitev MSC lahko dosežemo tudi z uporabo centrifugiranja ali z uporabo razvrščanja s pomočjo pretočne citometrije (*angl. fluorescence activated cell sorting*, FACS), kjer celice razvrščamo glede na različno fluorescenco, s katero so označena protitelesa za celične označevalce. Slednji pristop je

najpogostejši, hkrati pa je veliko bolj specifičen v primerjavi s sposobnostjo pritrditve MSC (12).

V celični kulturi so MSC videti kot dolge celice vretenaste oblike, ki so precej podobne fibroblastom. Prepoznamo jih po tvorbi kolonij, ki nastanejo iz ene same proliferirajoče celice (7, 13). V kulturi rastejo v monosloju, običajno v mediju, ki vsebuje 10-odstotni fetalni goveji serum, antibiotik in antimikotik (1, 13).

MSC imajo veliko sposobnost rasti v pogojih *in vitro*, med tem pa ohranjajo svojo multipotentnost, sposobnost samoobnavljanja in proliferacijski potencial. Vendar pa imajo omejeno število celičnih delitev in po dolgotrajnem gojenju *in vitro* se sčasoma zmanjša njihov diferenciacijski potencial. Zmanjšanje proliferacijskega in diferenciacijskega potenciala MSC je tudi v veliki meri odvisno od tkivnega izvora MSC. Prav tako na nastop senescence, torej na nepovratno izgubo proliferacijskega potenciala, vpliva starost darovalca. Namreč starejši kot je darovalec, hitreje bo nastopila senescenca (7, 14). Ključnega pomena za uporabnost in učinkovitost MSC pri zdravljenju sta torej vir teh celic za izolacijo in starost darovalca (8).

1.2.3 Mezenhimske matične celice, izolirane iz mišic

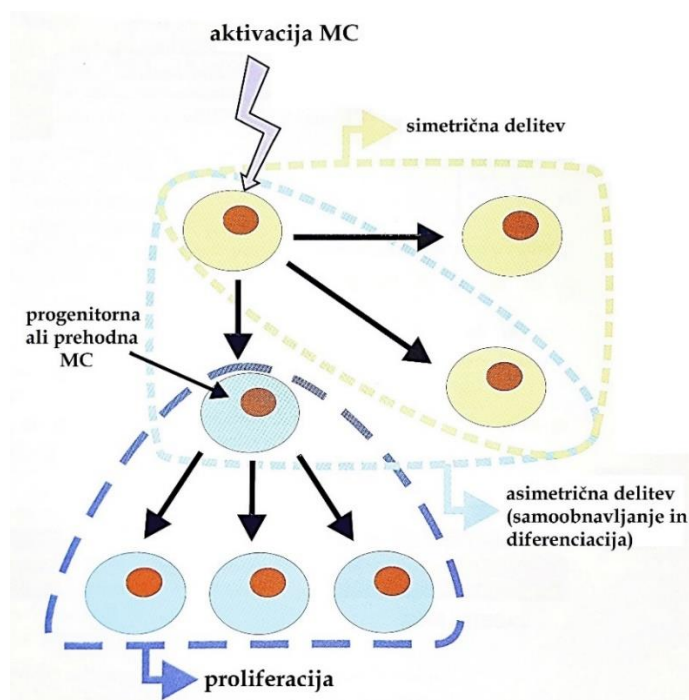
Kot smo že omenili, so MSC zelo heterogena populacija celic. Odkrili so že precej subpopulacij v kostnem mozgu ter skeletnih mišicah. Subpopulacije so odkrili na podlagi sposobnosti razvoja v končno specializirano linijo in na podlagi izražanja celičnih označevalcev (11).

Odraslo mišično tkivo se v fizioloških ali patoloških razmerah zelo hitro obnovi oz. propadlo tkivo nadomesti z novimi mišičnimi vlakni. To izjemno sposobnost obnove pripisujemo rasti in diferenciaciji mišičnih mezenhimskih matičnih celic (MMSC). Med njimi imajo vodilno vlogo v regeneraciji mišičnega tkiva tako imenovane satelitne celice (15). Satelitne celice so ena izmed subpopulacij MMSC in so definirane kot celice, ki se nahajajo v mitotično mirujočem stanju v skeletnem mišičnem vlaknu med bazalno membrano in sarkolemo. Kot odgovor na poškodbo mišice se aktivirajo, vstopijo v proces proliferacije in se diferencirajo v miocite. Majhen delež aktiviranih celic se zgolj podvoji, s procesom samoobnavljanja pa se vrnejo in obnovijo nabor mirujočih satelitnih celic (15). Satelitne celice opredeljuje tudi zanje specifično izražanje transkripcijskega dejavnika Pax7 (*angl. paired box 7*) (16), ki

hkrati predstavlja predpogoj za normalno delovanje satelitnih celic, torej za ohranitev mišične homeostaze (15, 17).

Poškodba mišice pomeni porušeno mirujoče celično okolje MMSC in s tem izgubo zavirajočih dejavnikov proliferacije in diferenciacije. Hkrati se ob poškodbi sprostijo dejavniki, ki stimulirajo proliferacijo in diferenciacijo. Iz tega sklepamo, da so spremembe mikrookolja odgovorne za aktivacijo MMSC iz mirujočega stanja (18). S proučevanjem in razumevanjem okolja lahko molekule, ki predstavljajo regulatorje, uporabimo v poskusih *in vitro*. Na ta način sami celice aktiviramo in jih vzpodbudimo k diferenciaciji, le te pa potem lahko uporabimo pri zdravljenju. Seveda je celoten postopek od same izolacije, gojenja in diferenciacije teh celic zelo dolgotrajen in zahteven zaradi velike raznolikosti celic.

Po aktivaciji lahko MMSC izberejo asimetrično ali simetrično celično delitev (slika 2). Asimetrična delitev proizvede dve različno diferencirani populaciji hčerinskih celic, od tega je ena populacija enaka svoji prednici in ohranja njeno matičnost, to je sposobnost samoobnavljanja, druga pa se usmeri v diferenciacijo. Pri simetrični delitvi pa nastaneta dve enako funkcionalni hčerinski celici (9, 15, 19).



Slika 2: Shema simetrične in asimetrične delitve. MC – matična celica. Povzeto po (20).

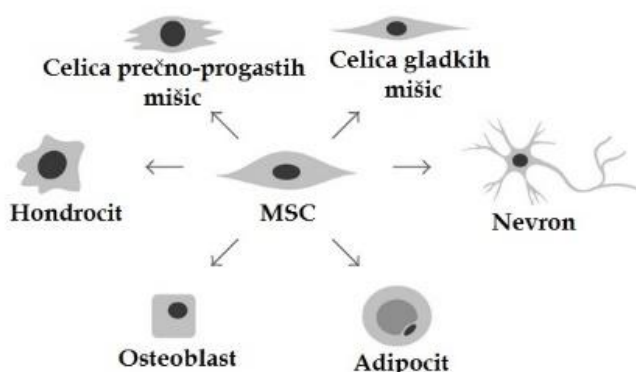
S pomočjo razvoja moderne tehnologije so raziskovalci odkrili, da so se MMSC, med njimi tudi satelitne celice, sposobne diferencirati v pogojih *in vitro* ne samo v miocite, ki so sicer

prevladujoča smer diferenciacije, ampak tudi v adipocite in osteocite. Iz tega vidika so MMSC zelo podobne MSC, izoliranim iz kostnega mozga (21, 22).

1.3 DIFERENCIACIJA MSC

Diferenciacija je proces, v katerem manj specializirana celica preko celice prednice pridobi lastnosti bolj specializiranih celic. Celica pri tem spremeni velikost in obliko, odzivnost na signale in presnovno aktivnost (1).

Humane MSC zaradi svojega večlinijskega diferenciacijskega potenciala predstavljajo izjemno uporabnost v celični in genski terapiji. Z ustreznim gojitvenim medijem lahko celice vzdržujemo v nediferenciranem stanju in hkrati ohranjamo njihove sposobnosti proliferacije, samoobnavljanja ter diferenciacije. Lahko pa njihov diferenciacijski potencial izkoristimo in z ustreznimi ravnimi dejavniki ter specifičnimi dodatki gojitvenemu mediju celice usmerimo v razvoj adipocitov, hondrocitov, miocitov, osteoblastov in fibroblastov. MSC so uspešno diferencirali tudi v živčne celice in celice črevesnega epitelija, ki pripadajo ektodermalni in endodermalni zarodni plasti (7). Slika 3 prikazuje najpogostejše poti diferenciacije MSC v pogojih *in vitro*.



Slika 3: Najpogostejše poti diferenciacije MSC *in vitro*. Povzeto po (5).

Molekularni mehanizmi, ki so odgovorni za proces diferenciacije MSC, so še vedno nejasni, zato ostajajo predmet mnogih raziskav. Ena izmed razlag regulacije njihove diferenciacije temelji na dveh stopnjah, ki jih preidejo MSC. V prvi stopnji, tako imenovani stopnji matičnih celic, v MSC poteka zgolj sprememba v naboru prepisanih genov, medtem ko nadalje, v stopnji celic, ki so že usmerjene v določeno linijo, pride do sprememb v fenotipu, torej v zgradbi in obliki celic (7).

Diferenciacija MSC je obsežen in zahteven proces, odvisen od številnih citokinov, rastnih dejavnikov, zunajceličnih molekul matriksa in transkripcijskih dejavnikov. Od tega nekateri delujejo zaviralno na proces diferenciacije, spet drugi pa ga spodbujajo (13). Možen pristop k diferenciaciji je tudi priprava mešanih kultur celic, kjer celicam MSC v kulturi dodamo že odrasle diferencirane celice določene linije (1).

1.3.1 Adipogena diferenciacija

Adipogenezo so raziskovalci opredelili kot dvostopenjski proces. Zajema stopnjo usmerjenosti multipotentnih MSC v adipogeno linijo in stopnjo končne diferenciacije ter zorenja predhodnikov adipocitov (5). Končni produkt adipogeneze je funkcionalen adipocit, ki prevzame naloge proizvodnje in shranjevanja lipidov ter proizvodnje zanj značilnih proteinov, kot so adiponektin, leptin in perilipin. Znanih je več transkripcijskih dejavnikov, ki so pomembni pri adipogeni diferenciaciji MSC. Med njimi je s peroksiomskim proliferatorjem aktivirani receptor gama (PPARG) v splošnem opredeljen kot glavni regulacijski gen za adipogenezo, kajti ob njegovi odsotnosti ni transkripcijskega dejavnika, ki bi lahko prevzel njegovo nalogo in bil odgovoren za nastanek adipocitov (5). Običajni gojitveni medij za diferenciacijo MSC v adipocite vsebuje deksametazon, 3-izobutil-1-metilksantin, inzulin in indometacin (10, 13). Nastanek adipocitov lahko dokažemo z merjenjem izražanja specifičnih genov, kot so maščobne kisline vezoči protein 4 (FABP4), PPARG in adiponektin, vsebujoč C1Q in kolagensko domeno (ADIPOQ), ali pa s histokemijskim barvanjem lipidnih kapljic z barvilom *Oil Red O* (11).

1.3.2 Osteogena diferenciacija

Podobno kot pri adipogenezi se tudi osteogeneza začne z usmerjanjem MSC v osteogeno linijo, ki ji sledi diferenciacija v različne stopnje zrelosti kostnih celic. Proces osteogeneze pa se konča z njihovim zorenjem v osteoblaste in po mineralizaciji s pretvorbo v osteocite. Eden izmed ključnih transkripcijskih dejavnikov, odgovornih za osteogenezo, je transkripcijski dejavnik 2 z "Runt" domeno (Runx2) (5). Runx2 protein preko DNA vezavne domene imenovane "Runt" MSC usmeri v osteogenezo, hkrati pa zavira njihovo adipogeno in hondrogeno diferenciacijo (13). Osteogeno diferenciacijo dosežemo z gojitvenim medijem, ki vsebuje deksametazon, beta-glicerofosfat in L-askorbinsko kislino-2-fosfat (12, 13). Uspešnost diferenciacije MSC v osteoblaste preverimo s histokemijskim barvanjem z barvilom *Alzarin Red S*, ki se veže na kalcijev fosfat, izločen iz nastalih osteoblastov. Lahko izmerimo tudi izražanje specifičnih genov za osteoblaste (11).

Dobro poznano dejstvo je, da s staranjem osteoblaste počasi začnejo nadomeščati adipociti (23). Zaradi tega so raziskovalci ugotavljali, ali obstaja med tema dvema celičnima linijama kakšna povezava. Na to temo so izvedli več raziskav in velika večina njihovih rezultatov nakazuje na teoretično inverzno povezavo med osteogeno in adipogeno diferenciacijo MSC. Po tej teoriji osteogena diferenciacija MSC preprečuje oz. zmanjša možnost adipogene diferenciacije in obratno. Ravnovesje med razvojem osteogene in adipogene linije je uravnavano preko številnih signalnih poti. Med temi določene delujejo v prid samo eni liniji, drugo pa zavirajo, spet druge pa pozitivno spodbujajo razvoj obeh celičnih linij (5).

1.3.3 Miogena diferenciacija

Že precej časa je znano, da so MSC sposobne razviti tudi specializirane mišične celice. To so dokazali pri poskusih, kjer so MSC gojili v mediju z dodanim demetilnim sredstvom 5-azaticidinom. Uspešno miogeno diferenciacijo MSC so dosegli tudi z dodatkom skeletnih mišičnih celic kulture MSC (12, 13). Za uspešno diferenciacijo je prav tako pomembna aktivacija določenih miogenih transkripcijskih dejavnikov. Med njimi so za usmeritev v miogeno linijo najpomembnejši pripadniki družine transkripcijskih dejavnikov t. i. »paired box«, kot sta paired box protein 7 (Pax7) in Pax3. Regulacijski protein za diferenciacijo mišičnih celic D1 (MyoD1) in miogenin (Myog) pa imata ključno vlogo pri sami diferenciaciji prednic skeletnih mišičnih celic (13). Nastanek mišičnih vlaken, torej uspešno miogenezo, dokažemo z uporabo indirektna imunofluorescence za različne označevalce, ki so specifični za mišice (npr. desmin) (11).

1.4 UPORABNOST MSC V MEDICINI

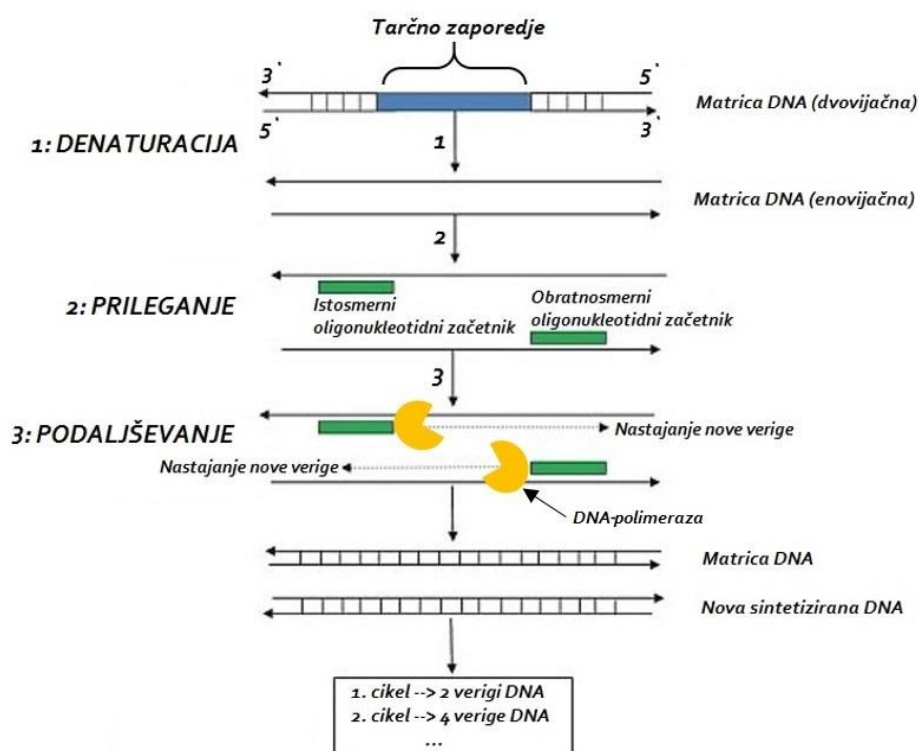
Izjemen proliferacijski in diferencijski potencial je celice MSC označil za obetavne kandidatke na področju regenerativne medicine. To pa ni njihova edina uporabnost, izkazujejo namreč tudi veliko protivnetno in imunomodulatorno sposobnost, na podlagi česar so celice uporabne pri terapijah bolezni imunskega sistema. Mehanizmi njihovega imunomodulatornega delovanja še niso popolnoma raziskani, njihovo protivnetno delovanje pa vključuje tako zaviranje prirojenega kot tudi pridobljenega imunskega odziva. Terapija z MSC do sedaj velja kot varna za uporabo. Žal pa zaradi njene kratkotrajne uporabe še nismo uspeli ugotoviti, ali ima dolgoročne posledice na delovanje imunskega sistema in nastanek novotvorb (4, 8).

1.5 KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR)

1.5.1 Osnovni princip verižne reakcije s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je *in vitro* metoda, ki omogoča pomnoževanje specifičnih odsekov znotraj DNA. Gre za enostavno in hitro metodo, ki je široko uporabljana v molekularni biologiji in s katero lahko merimo izražanje genov v številnih tkivih in celicah. Pomnoževanje poteka na osnovi encimske reakcije, in sicer v treh stopnjah (slika 4):

1. Denaturacija: Dvoverižno DNA razpremo s segrevanjem na 95 °C. Temperaturo prilagodimo glede na izbrano DNA-polimerazo. Čas denaturacije je prav tako prilagodljiv glede na vsebnost baznih parov gvanozin-citozin (GC).
2. Prileganje: Vezava oligonukleotidnih začetnikov na tarčno zaporedje. Temperatura prileganja je osnovana na podlagi talilne temperature (T_m) oligonukleotidnih začetnikov. Običajno je 5 °C nižja od T_m oligonukleotidnih začetnikov.
3. Podaljševanje verige: Reakcija poteka pri temperaturi od 70 do 72 °C, kjer je optimalna aktivnost DNA-polimeraze. Začne se izgrajevati komplementarna veriga matrični DNA s pričakovano hitrostjo od 1 do 100 baz na sekundo (24).



Slika 4: Shema verižne reakcije s polimerazo. Povzeto po (25).

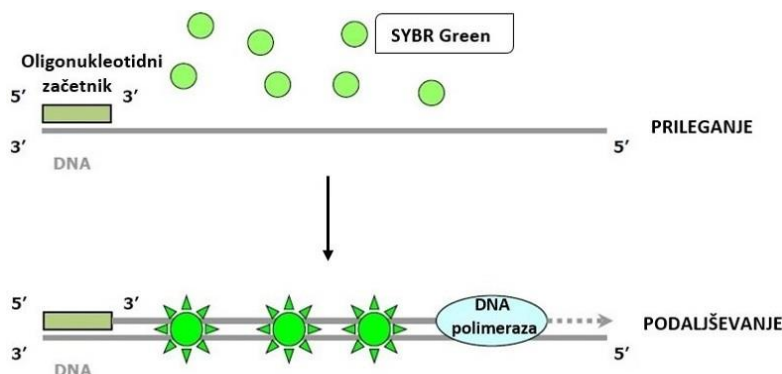
Vse tri stopnje skupaj sestavljajo en cikel reakcije PCR, ki se v splošnem ponovi 40-krat (24). Osnovni princip metode PCR so razvili leta 1983 in se do danes ni spremenil. Najpomembnejšo prelomnico v uporabi PCR pa je predstavljala uvedba možnosti merjenja količine produkta vzporedno s potekom reakcije. Metodo so zato poimenovali kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) (26). qPCR je metoda izbire za pomnoževanje in kvantifikacijo specifičnih odsekov DNA ter zaznavanje njihovih produktov. Količino produkta merimo sproti v vsakem ciklu. Teoretično se pri reakciji tarčni odsek DNA pomnožuje eksponentno, torej se v vsakem ciklu število kopij podvoji (24).

1.5.2 Načini zaznavanja produktov reakcije qPCR

Kontinuirano spremljanje reakcije z merjenjem količine produkta v vsakem ciklu temelji na merjenju fluorescence. Izmerjeni fluorescentni signal je sorazmeren količini nastalega produkta. Poznamo tri glavne načine zaznavanja fluorescence:

- Fluorescentna barvila, ki se vežejo v dvoverižno DNA (npr. SYBR[®] Green),
- Fluorescentno označeni oligonukleotidni začetniki (npr. LUX[™] fluorogenic primers, Amplifluor[™] qPCR primers),
- Fluorescentno označene sonde za specifična zaporedja (npr. TaqMan[®] sonde, FRET sonde) (24, 27).

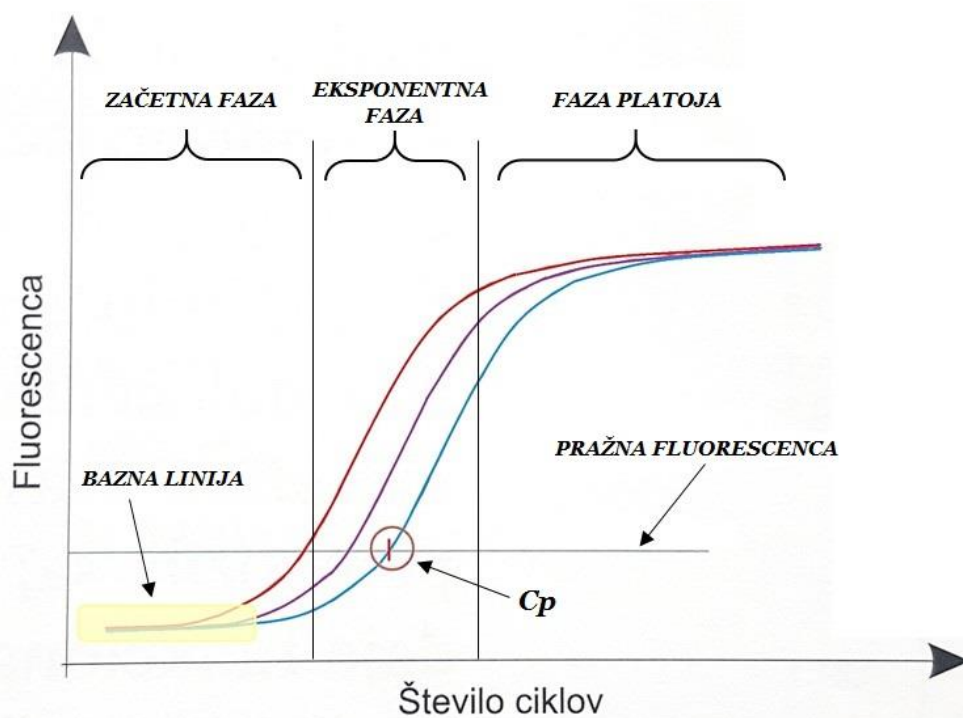
Prvi način zaznavanja je najenostavnejši, a najmanj specifičen. Barvilo se interkelira v vse dvojne vijačnice DNA, tako nespecifičnih produktov kot tudi dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Princip nespecifičnega zaznavanja je prikazan na sliki 5. Drugi in tretji način zaznavanja pa sta specifična za odsek, ki ga analiziramo. Fluorescentna barvila so v teh dveh primerih pritrjena na tarčno specifična zaporedja oligonukleotidov. V drugem primeru so to oligonukleotidni začetniki, v tretjem pa so to tako imenovane sonde.



Slika 5: Princip nespecifičnega načina zaznavanja produkta reakcije qPCR z uporabo barvila SYBR Green.

1.5.3 Interpretacija krivulje pomnoževanja

Inštrument qPCR je povezan z računalnikom preko programske opreme, s pomočjo katere poteka zaznavanje produktov. Programska oprema pa nam omogoča tudi številne analize pridobljenih rezultatov. Programska oprema qPCR inštrumenta nam vzporedno s potekom reakcije izrisuje krivuljo pomnoževanja, ki prikazuje odvisnost fluorescence od števila ciklov reakcije. Njena sigmoidna oblika predstavlja kopičenje produkta skozi celotno reakcijo qPCR (slika 6).



Slika 6: Krivulja pomnoževanja in njeni osnovni pojmi. Povzeto po (28).

V prvih ciklih začetne faze nastane zelo majhna količina produkta, ki je ni moč zaznati oz. je fluorescenca ozadja prevladujoča (24, 29). Temu signalu pravimo bazna linija. Cikel, v katerem količina produkta naraste toliko, da preseže prag fluorescence, imenujemo pragni cikel (*angl. threshold cycle*) in ga označimo s simbolom C_p (*angl. crossing point*). Prag fluorescence je opredeljen s stopnjo fluorescentnega signala, ki je značilno višja od signala ozadja. Običajno ta prag avtomatsko nastavi inštrument qPCR. Vrednosti C_p so odvisne od začetne količine DNA. Večja kot je začetna količina DNA, manjša je vrednost C_p , saj je potrebnih manj ciklov, da fluorescentni signal preseže prag fluorescence (24). V eksponentni fazi ima reakcija pomnoževanja optimalno kinetiko, kjer se ob predpostavljeni 100-odstotni učinkovitosti število kopij v vsakem ciklu podvoji, zato to fazo uporabljamo za

kvantifikacijo. Proti koncu eksponentne faze se začne kopičenje produkta, zmanjša se encimska aktivnost DNA-polimeraze, primanjkovati začne reagentov, kar vodi do zaviranja same reakcije. Na krivulji se zasičenost reakcije vidi kot faza platoja (28).

Po smernicah uporabe metode qPCR naj bi za označevanje prehoda praga fluorescence uporabljali splošno oznako Cq (*angl. quantification cycle*) (30).

1.5.4 Načrtovanje uspešne reakcije qPCR

Osnovnega pomena za uspešno reakcijo je ustrezno načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov. Pri načrtovanju oligonukleotidnih začetnikov uporabljamo za to namenjeno programsko opremo (24, 27). V preglednici I so predstavljene osnovne smernice za načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov.

Preglednica I: Osnovna priporočila za načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov. Povzeto po (24, 27).

Dolžina oligonukleotidnega začetnika	18–30 nukleotidov
Vsebnost GC baznih parov	40–60 %
Zaporedje oligonukleotidnega začetnika	▪ brez komplementarnih delov ▪ brez sposobnosti tvorbe dimerov ▪ specifično za tarčno zaporedje, ki naj bo dolgo 80–250 baznih parov ▪ polovica zaporedja komplementarna 3` koncu enega eksona, druga polovica pa 5` koncu sosednjega eksona
Tm oligonukleotidnih začetnikov	$\Delta T_m \leq 5\text{ }^{\circ}\text{C}$

Kontrole pri reakciji qPCR uporabljamo kot dokaz, da je signal, ki ga zaznamo, posledica prisotnosti res tistega produkta, ki ga želimo pomnoževati. Slep vzorec ali kontrola NTC (*angl. no-template control*) je vzorec, ki vsebuje vse komponente reakcijske zmesi za reakcijo qPCR razen vzorca DNA, ki ga želimo pomnožiti. S kontrolo NTC ugotovimo prisotnost dimerov oligonukleotidnih začetnikov ali neželenih nukleinskih kislin (24, 27). Kontrola brez encima reverzne transkriptaze (vzorec –RT) je vzorec, ki ga dobimo pri prepisu vzorca RNA v komplementarno verigo deoksiribonukleinske kisline (cDNA) brez reverzne transkriptaze, zato do prepisa v cDNA ne pride. V njem ostane RNA in možno prisotna genomska DNA (gDNA). Z vzorcem –RT torej preverjamo prisotnost gDNA (24, 27).

1.5.5 Normalizacija

Normalizacija je eden izmed zelo pomembnih delov zanesljive reakcije qPCR. Da lahko primerjamo in ovrednotimo rezultate reakcij qPCR različnih študij, je potrebno upoštevati vpliv mnogih variacij na različnih ravneh celotnega poskusa. Pri raziskavah analize genskega izražanja moramo uporabiti metodo normalizacije, saj le na ta način dobimo primerljive rezultate in lahko primerjamo izražanje genov med različnimi vzorci. Variabilnost v primeru genskega izražanja izvira že iz same kakovosti in količine začetnega vzorca, procesa izolacije RNA iz tkiv, reverzne transkripcije in navsezadnje tudi iz same reakcije pomnoževanja ter napak pri pipetiranju. Z normalizacijo dosežemo nevtralizacijo vpliva teh variabilnosti in nadzor nad eksperimentalnimi napakami (24, 31).

Najbolj razširjen pristop za normalizacijo je uporaba referenčnih genov. Pri tem raven izražanja tarčnega gena izmerimo skupaj z merjenjem izražanja nekega referenčnega gena v istem vzorcu. Tako sta obe meritvi podvrženi enakim variabilnostim, rezultat na koncu pa podamo kot relativno izražanje tarčnega gena glede na izražanje referenčnega gena. Endogeni referenčni gen običajno predstavlja hišni gen, ki se v tkivu izraža relativno konstantno. Predvideva se, da niti bolezen niti eksperimentalne razmere ne vplivajo na njegovo izražanje (9). Sodeluje pri osnovnih celičnih funkcijah, ki so ključne za njeno preživetje in je zato njegova regulacija izražanja minimalna (31). Eksogene referenčne gene, ki bi jih morali dodajati, pri meritvah izražanja redko uporabljamo. Tudi vsi endogeni referenčni geni niso idealni, saj zaradi zunanjih oz. notranjih vplivov njihovo izražanje ni stabilno (28). Za vsako tkivo in bolezen, ki jo proučujemo, moramo najprej poiskati ustrezen endogeni referenčni gen tako, da preverimo, če je njegovo izražanje neodvisno od patološkega stanja, ki ga raziskujemo.

Ustrezni referenčni gen opredeljuje konstantno izražanje pri izbranih eksperimentalnih pogojih. Izražal naj bi se v primerljivi količini kot proučevani gen. Njuni učinkovitosti reakcije pomnoževanja morata biti podobni, namreč le tako bodo rezultati res odražali pravilne razlike v izražanju posameznih tarčnih genov med različnimi vzorci (24, 30). Optimalno število ter izbiro referenčnih genov moramo določiti eksperimentalno. Uporaba zgolj enega referenčnega gena za normalizacijo je sprejemljiva, vendar s priloženimi dokazi, ki potrjujejo nespremenjeno izražanje tega referenčnega gena pri uporabljenih eksperimentalnih pogojih (30).

2 NAMEN DELA

MSC imajo veliko sposobnost samoobnavljanja in tvorbe različnih tipov celic, zato predstavljajo velik potencial pri zdravljenju bolezni in poškodb mišično-skeletnega sistema. Kljub številnim raziskavam je njihova definicija še precej široka, identifikacija in fenotip pa ostajata premalo raziskana. Izoliramo jih lahko iz različnih tkiv in organov, med katerimi je najpogostejša izolacija iz kostnega mozga.

V tej magistrski nalogi se bomo osredotočili na MMSC, ki so veliko manj raziskane kot MSC, izolirane iz kosti (BMSC) in iz maščobnega tkiva. Najprej bomo optimizirali metodo qPCR za merjenje izražanja izbranih genov in na osnovi izražanja teh genov ocenili sposobnost diferenciacije in multipotentnost MMSC.

Pri uporabi metode qPCR je za zanesljivost rezultatov potrebna ustrezna normalizacija izražanja genov. Zadnje čase se pojavlja zahteva, da za normalizacijo rezultatov ni zadostna uporaba zgolj enega referenčnega gena. Zato bomo rezultate izražanja izbranih označevalcev na vzorcih normalizirali na en referenčni gen in primerjali z rezultati, normaliziranimi na tri referenčne gene.

2.1 NAČRT DELA

Najprej bomo izvedli optimizacijo metode qPCR za merjenje izbranih genov kot označevalcev adipogene, osteogene in miogene diferenciacije MMSC. Optimizirali bomo koncentracijo in specifičnost treh adipogenih, petih osteogenih in sedmih miogenih oligonukleotidnih začetnikov za merjenje izražanja izbranih označevalcev.

Nato bomo z optimizirano metodo qPCR na humanih MMSC izmerili izražanje izbranih označevalcev adipogene, osteogene in miogene diferenciacije v vzorcih MMSC, ki smo jih diferencirali v adipocite, osteoblaste in miocite v pogojih *in vitro*. V nalogi bomo vključili MMSC bolnikov z osteoporozo in osteoartrozo ter preiskovancev brez degenerativnih mišično-skeletnih bolezni. Poleg MMSC bomo v študijo vključili še BMSC teh preiskovancev in primarne osteoblaste, ki nam bodo služili kot kontrolni vzorci. MMSC bomo v pogojih *in vitro* gojili v adipogenem, osteogenem in miogenem diferenciacijskem mediju (tretirani vzorci) ter v osnovnem mediju za gojenje MMSC (kontrolni vzorci). Izolacijo in gojenje MMSC, BMSC in osteoblastov, diferenciacijo MMSC ter izolacijo RNA in prepis v cDNA za te vzorce so predhodno opravili na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo.

Z uporabo metode qPCR bomo izmerili izražanje osmih referenčnih genov in s pomočjo programa NormFinder določili najustreznejše tri referenčne gene, ločeno za adipogene, osteogene in miogene vzorce. Rezultate merjenja izražanja adipogenih in osteogenih označevalcev na vzorcih bomo tudi primerjali z rezultati histokemijskega barvanja na istih vzorcih in ugotavljali njihovo medsebojno povezavo.

2.2 HIPOTEZE

1. Po procesu adipogene, osteogene in miogene diferenciacije MMSC obstajajo razlike v izražanju specifičnih genov za posamezno linijo med tretiranimi in kontrolnimi celicami.
2. Med rezultati izražanja genov, specifičnih za adipogeno in osteogeno diferenciacijo, in rezultati histokemijskega barvanja MMSC obstaja pozitivna povezava.
3. Normalizacija izražanja genov adipogene, osteogene in miogene diferenciacije na en referenčni gen daje enake rezultate kot normalizacija na tri referenčne gene.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SPLOŠNA OPOZORILA PRI DELU

Eksperimentalno delo je zajemalo delo s cDNA, zato smo ves čas pazili na čistočo in s tem preprečevali možnost kontaminacije vzorcev in reagentov. V ta namen smo pri delu vedno uporabljali zaščitne rokavice za enkratno uporabo in zaščitno haljo. Delovno površino komore, vorteks in ves uporabljeni pribor ter material (pipete, plastični in stekleni vsebniki ter stojala za epice) smo pred delom in po njem očistili s 3-odstotnim hipokloritom za čiščenje. Priprava vzorcev, standardov in reakcijskih zmesi je potekala v delovni komori, ki smo jo skupaj s priborom predhodno 15 minut osvetljevali z UV lučjo. Nastavke za pipete in epice smo pred delom avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in 1 baru nadtlaka. Vse reagente smo shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C, vzorce cDNA pa na -80 °C. Pri delu smo uporabljali ultra čisto vodo (dH₂O), ki smo jo shranjevali pri 4 °C.

3.2 VZORCI

Meritve izražanja izbranih označevalcev adipogene, osteogene in miogene diferenciacije smo izvedli na vzorcih MMSC, BMSC in osteoblastih, zbranih od devetih različnih preiskovancev. Vzorce smo pridobili na Inštitutu za sodno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, iz Ortopedske bolnišnice Valdoltra in Kliničnega oddelka za travmatologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Študija ima soglasje Komisije za medicinsko etiko 0120-523/2016-2 KME 45/10/16 z dne 2. novembra 2016. Izolacijo in gojenje MMSC, BMSC in osteoblastov ter diferenciacijo MMSC (adipo-, osteo- in miogeneza) so predhodno naredili na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo. Po končanem procesu diferenciacije so en replikat MMSC uporabili za specifična histokemijska barvanja (*Oil Red O*, *Alizarin Red S*), drugi replikat pa za izolacijo RNA. Izolacijo RNA so naredili predhodno na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo z uporabo kita PqGold Total RNA kit (VWR, Avstrija), prepis v cDNA pa z uporabo kita High Capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Nemčija). Priloga 1 prikazuje uporabljene vzorce cDNA.

Optimizacijo qPCR smo za adipogene in osteogene oligonukleotidne začetnike izvedli na zmesi vzorcev cDNA iz kostnega tkiva različnih preiskovancev iz predhodnih študij. Predpostavili smo, da se adipogeni in osteogeni označevalci izražajo tudi v kostnem tkivu. Na ta način smo tudi varčevali z vzorci cDNA iz primarnih celic vključenimi v to nalogo.

Za optimizacijo metode qPCR pri miogenih oligonukleotidnih začetnikih smo uporabili vzorce cDNA iz primarnih celic, vključenih v to nalogo, z zaporednimi številkami 19, 20, 21, 22, 23 in 35.

3.3 KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR) ZA MERJENJE IZRAŽANJA PREISKOVANIH GENOV

Metodo qPCR najpogosteje uporabljamo, kadar želimo analizirati nivo izražanja genov za različne dejavnike v različnih tkivih. Z merjenjem genskega izražanja določimo količino informacijske ribonukleinske kisline (mRNA) določenega gena v vzorcu. Z reakcijo qPCR lahko pomnožujemo le DNA, zato moramo iz tkiva izolirano celokupno RNA z reakcijo reverzne transkripcije v prisotnosti encima reverzne transkriptaze (RT) predhodno prepisati v dvoverižno cDNA. Na vzorcih cDNA izvedemo reakcijo qPCR in nato preko kvantifikacije rezultatov ocenimo količino mRNA in s tem nivo izražanja gena (27). V tej magistrski nalogi smo z uporabo metode qPCR izmerili izražanje genov, da bi ugotovili, ali ima povečanje izražanja genov pozitivno povezavo z rezultati histokemijskega barvanja za posamezno diferenciacijo MMSC.

3.3.1 Materiali in oprema

REAGENTI:

- Delovne raztopine cDNA za pripravo standardov in pripravo vzorcev
- Ultra čista voda (dH₂O, Sigma-Aldrich)
- 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis BioDyne, Estonija), ki vsebuje:
 - HOT FIREPol® DNA polimerazo
 - Pufer
 - 12,5 mM MgCl₂ (1x raztopina=2,5 mM MgCl₂)
 - dNTP-je in dUTP
 - Barvilo EvaGreen®
 - Ojačevalec baznega para gvanozin-citozin
 - Modro vizualizacijsko barvilo
- 100 µM raztopine oligonukleotidnih začetnikov za gene, ki jih prikazuje preglednica II.

Preglednica II: Seznam oligonukleotidnih začetnikov za qPCR.

Oznaka gena	Zaporedje oligonukleotidnih začetnikov	Število nukleotidov v oligonukleotidnem začetniku	T prileganja [°C]	Optimalna koncentracija za reakcijsko zmes [nM]	Proizvajalec oligonukleotidnih začetnikov
Geni za adipogene označevalce					
FABP4	F: 5´-TGGTTGATTTTCCATCCCAT-3´	20	60	600	Macrogen
	R: 5´-GCCAGGAATTTGACGAAGTC-3´	20			
PPARG	F: 5´-CACAAGAACAGATCCAGTGGTTGCAG-3´	26	60	200	Macrogen
	R: 5´-AATAATAAGGTGGAGATGCAGGCTCC-3´	26			
ADIPOQ	F: 5´-TGGTGAGAAGGGTGAGAA-3´	18	60	100	Macrogen
	R: 5´-AGATCTTGGTAAAGCGAATG-3´	20			
Geni za osteogene označevalce					
ALP	F: 5´-CCTACACGGTCCTCCTATAC-3´	20	60	/	Macrogen
	R: 5´-TGACTGCTGCCGATACTC-3´	18			
hALP	F: 5´-CCGTGGCAACTCTATCTTTGG-3´	21	60	300	Sigma-Aldrich
	R: 5´-GCCATACAGGATGGCAGTGA-3´	20			
OC	F: 5´-AGCGAGGTAGTGAAGAGAC-3´	19	60	200	Macrogen
	R: 5´-GAAAGCCGATGTGGTCAG-3´	18			
PTHRI	F: 5´-GCCAACTACAGCGAGTGTG-3´	19	60	100	Macrogen
	R: 5´-GCCAGGGACACGGAGTAG-3´	18			
COL1A1	F: 5´-CCCTGGAAAAGAATGGAGATGAT-3´	22	60	100	Sigma-Aldrich
	R: 5´-ACTTGAAACCTCTGTGTCCCTTCA-3´	24			
RUNX2	F: 5´-AGCAAGGTTCAACGATCTGAGAT-3´	23	60	100	Sigma-Aldrich

	R: 5'-TTTGTGAAGACGGTTATGGTCAA-3'	23			
Geni za miogene označevalce					
PAX7	F: 5'-CACTGTGACCGAAGCACTGT-3'	20	60	200	Macrogen
	R: 5'-GTCAGGTTCCGACTCCACAT-3'	20			
MYOD1	F: 5'-TGCCACAACGGACGACTTC-3'	19	60	200	Macrogen
	R: 5'-CGGGTCCAGGTCTTCGAA-3'	18			
ACTA2	F: 5'-ACAACTGGCATCGTGCTGG-3'	19	60	200	Macrogen
	R: 5'-ATGATGGCATGGGGCAAGG-3'	19			
TPNT	F: 5'-AGAGCGGAAAAGTGGGAAGA-3'	20	60	200	Macrogen
	R: 5'-CTGGTTATCGTTGATCCTGT-3'	20			
MYOG	F: 5'-CACTCCCTCACCTCCATCGT-3'	20	60	100	Macrogen
	R: 5'-CATCTGGGAAGGCCACAGA-3'	19			
ACTC1	F: 5'-TCTATGAGGGCTACGCTTTG-3'	20	60	100	Macrogen
	R: 5'-GCCAATAGTGATGACTTGGC-3'	20			
MYH1	F: 5'-AGGAAGGCATTGAGTGGACG-3'	20	60	100	Macrogen
	R: 5'-TTGAAGGAGGTGTCTGTCGC-3'	20			
Referenčni geni					
ACTB	F: 5'-CTTCGCGGGCGACGAT-3'	16	60	600	Sigma-Aldrich
	R: 5'-AATCCTTCTGACCCATGCCC-3'	20			
B2M	F: 5'-AGATGAGTATGCCTGCCGTG-3'	20	60	600	Sigma-Aldrich
	R: 5'-GCGGCATCTTCAAACCTCCA-3'	20			
GAPDH	F: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	20	60	100	Sigma-Aldrich
	R: 5'-TGGCATGGACTGTGGTCATG-3'	20			
GUSB	F: 5'-GGCTCCGAATCACTATCGCC-3'	20	60	100	Sigma-Aldrich

	R: 5'-CCTTGGGATACTTGGAGGTGT-3'	21			
RPL13A	F: 5'-AAAAAGCGGATGGTGGTTC-3'	19	60	600	Sigma-Aldrich
	R: 5'-CTTCCGGTAGTGGATCTTGG-3'	20			
RPLP0	F: 5'-TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT-3'	23	60	100	Sigma-Aldrich
	R: 5'-CAATCTGCAGACAGACACTGG-3'	21			
TBP	F: 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'	21	60	600	Sigma-Aldrich
	R: 5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'	20			
UBC	F: 5'-CTTTCCAGAGAGCGGAACAGG-3'	21	60	100	Sigma-Aldrich
	R: 5'-GCATTGTCAAGTGACGATCACAGC-3'	24			

APARATURE IN PRIBOR:

- Avtoklav: LABOKLAV 25 (SHP Steriltechnik AG, Nemčija)
- Delovna PCR-komora z UV in VIS lučjo: DNA/RNA UV-Cleaner UVT-S-AR (BIOSAN, Latvija)
- Mini centrifuga/vorteks: Combi-Spin, FVL-2400N (BIOSAN, Latvija)
- Centrifuga za mikrotitrsko ploščico: CENTRIC 322A (Tehtnica, Slovenija)
- Polavtomatske pipete (0,5–1 μ L, 2–20 μ L, 20–200 μ L, 100–1000 μ L, Eppendorf Research, Nemčija)
- Nastavki za pipete: 0,5–10 μ L, 20–200 μ L in 100–1000 μ L (Sarstedt, TipOne, Nemčija)
- PCR plastične epruvete s pokrovčkom – epice: 0,5 in 1,5 ml (Sarstedt, Eppendorf, Nemčija)
- Ciklični pomnoževalnik: LightCycler® 480 II (Roche, Nemčija)
- Mikrotitrne ploščice s 384 vdolbinicami, bele (LightCycler® 480 II, Roche, Nemčija)
- Prozorna samolepljiva folija (LightCycler® 480 II, Roche, Nemčija)
- Aluminijska folija (zaščita ploščice pred svetlobo)

3.3.2 Optimizacija qPCR

Na reakcijo qPCR lahko vpliva veliko dejavnikov, ki jih je potrebno za pravilen rezultat ustrezno optimizirati. V naši nalogi smo se osredotočili predvsem na vpliv različnih koncentracij oligonukleotidnih začetnikov na reakcijo pomnoževanja in njihovo specifičnost, torej sposobnost, da z njimi pomnožujemo le želeni gen.

Oligonukleotidne začetnike smo načrtovali s prosto dostopnim programskim orodjem baze National Center for Biotechnology Information (NCBI) U.S. National Library of Medicine (32). Oligonukleotidne začetnike smo predhodno načrtovali tako, da so tvorili specifičen produkt in se niso prilegali na gDNA. Naročili smo jih pri podjetju Macrogen ali Sigma-Aldrich v koncentraciji 100 μ M. Njihovo optimalno koncentracijo smo določili s titracijo koncentracij oligonukleotidnih začetnikov in analizo parametrov standardne krivulje. Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov smo ocenili na podlagi analize talilne krivulje.

3.3.3 Predhodna priprava in obdelava vzorcev

MMSC smo izpostavili trem različnim diferenciacijskim medijem – adipogenemu, osteogenemu in miogenemu. Vzoredno smo iste vzorce MMSC gojili v osnovnem rastnem mediju (kontrolni vzorci). Adipogeno in osteogeno diferenciacijo smo spodbudili z adipogenim in osteogenim medijem, katerega sestavo smo določili na podlagi prejšnjih študij (33–36). Sestava miogenega medija pa je bila še v postopku optimizacije in zato tudi nismo izvedli nadaljnje analize na proteinskem nivoju (imunofluorescenca za miogeni marker desmin). Najprej smo želeli na genskem nivoju določiti, ali testirani miogeni medij spodbudi diferenciacijo MMSC v smer mioblastov in če lahko z metodo qPCR vidimo razlike v izražanju specifičnih genov med tretiranimi vzorci in kontrolami. Diferenciacijo MMSC je izvajal asist. Klemen Čamernik po različnih postopkih, ki jih je optimiziral sam. Iz celic smo po končanem postopku gojenja izolirali celokupno RNA, izvedli reverzno transkripcijo in dobili vzorce cDNA. Tako smo za vsak tip diferenciacije dobili tretirane in kontrolne vzorce, na katerih smo potem izmerili izražanje specifičnih genov kot diferenciacijskih označevalcev in na podlagi razlik v izražanju genov med tretiranim vzorcem in njegovo kontrolo opredelili sposobnost MMSC za diferenciacijo.

3.3.4 Postopek dela za metodo qPCR

Pri eksperimentalnem delu smo vedno upoštevali splošna opozorila pri delu. V delovni komori smo pripravili serijo razredčitev cDNA znane koncentracije za izdelavo standardne krivulje. Izhodiščna cDNA za pripravo standardov je predstavljala zmes več vzorcev. Koncentracije posameznih standardov so predstavljene v preglednici III.

Preglednica III: Standardi za optimizacijo metode qPCR in merjenje izražanja izbranih označevalcev na vzorcih.

OPTIMIZACIJA		MERJENJE IZRAŽANJA NA VZORCIH	
Standard	Koncentracija [ng/μL]	Standard	Koncentracija [ng/μL]
st1	5	st1	2,5
st2	2,5	st2	1,25
st3	1,25	st3	0,625
st4	0,625	st4	0,3125
st5	0,3125	st5	0,1563
st6	0,1563	st6	0,0782

Raztopine oligonukleotidnih začetnikov s koncentracijo 100 μM smo odtalili, dobro premešali in si pripravili delovne raztopine le teh s koncentracijo 20 μM . Pri optimizaciji smo za vsak oligonukleotidni začetnik pripravili tri reakcijske zmesi z različnimi koncentracijami: 100, 200 in 600 nM. Pri merjenju izražanja izbranih označevalcev smo uporabili izbrane optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov, predstavljene v preglednici II. Volumski deleži komponent za pripravo reakcijske zmesi so izhajali iz proizvajalčevih navodil uporabe 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermixa, z modifikacijami na osnovi eksperimentalne prakse. Reakcijsko zmes, predstavljeno v preglednici IV, smo pripravili po načelu pipetiranja manjših volumnov v večje. V epico smo najprej odmerili dH_2O , nato 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix, za tem pa še istosmerni in obratnosmerni oligonukleotidni začetnik. Vsak vzorec oz. standard smo nanegli v trojniku.

Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za izvedbo reakcije qPCR.

	100 nM oligonukleotidni začetniki	200 nM oligonukleotidni začetniki	300 nM oligonukleotidni začetniki	600 nM oligonukleotidni začetniki
Reagent	Volumen za eno vdolbinico			
dH_2O	5,85 μL	5,7 μL	5,55 μL	5,1 μL
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	3,0 μL	3,0 μL	3,0 μL	3,0 μL
Istosmerni oligonukleotidni začetnik [20 μM]	0,075 μL	0,15 μL	0,225 μL	0,45 μL
Obratnosmerni oligonukleotidni začetnik [20 μM]	0,075 μL	0,15 μL	0,225 μL	0,45 μL
Vzorec cDNA/standard	6,0 μL	6,0 μL	6,0 μL	6,0 μL
Skupni volumen	15 μL			

Pri optimizaciji smo standardno krivuljo naredili samo pri 200 nM koncentraciji, zaradi omejene količine zaloge cDNA, pri koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov 100 in 600 nM smo uporabili le standard 2 (st2). Pri 200 nM koncentraciji smo vključili negativno kontrolo oz. slepi vzorec (NTC), kjer smo namesto vzorca cDNA dodali dH_2O . Za potrditev, da produkt izvira iz mRNA in ne gDNA, smo pri vseh koncentracijah vključili tudi vzorec –RT (redčen tako kot st2). Vzorec –RT za optimizacijo je izhajal iz vzorca RNA SB 29, kateremu pri prepisu v cDNA nismo dodali encima reverzne transkriptaze.

Pri merjenju izražanja označevalcev na vzorcih smo pri vsakem označevalcu vključili kontrolo NTC. Vse vzorce smo redčili tako, da je bila njihova končna koncentracija enaka koncentraciji st3 (0,625 ng/ μ L).

Ploščico z nanesenimi vzorci smo prekrili s prozorno samolepljivo folijo in jo centrifugirali 3 minute pri 2000 obratih/min. Analizo smo izvedli na inštrumentu LightCycler® 480 II. Temperaturni program za izvedbo reakcije qPCR je bil modificiran priporočni program proizvajalca 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermixa (preglednica V).

Preglednica V: Reakcijski pogoji za izvedbo reakcije qPCR.

Stopnja reakcije	T	Čas	Število ciklov
Začetna aktivacija polimeraze	95 °C	12 min	1
*Denaturacija	95 °C	15 s	45
*Prileganje	60 °C	30 s	
*Podaljševanje	72 °C	30 s	
Talilna krivulja	65–97 °C		

*V navedenem vrstnem redu se stopnje reakcije ciklično ponavljajo. Po podaljševanju verige, na koncu vsakega cikla, je potekla kvantifikacija DNA.

DNA-polimeraza lahko deluje že pri sobni temperaturi med samo pripravo reakcijske zmesi za qPCR. Vendar v reagentu 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix je delovanje DNA-polimeraze preprečeno s hot-start mehanizmom in s tem je preprečeno tudi podaljševanje nespecifičnega prileganja oligonukleotidnih začetnikov ter nastanek njihovih dimerov. Zato je na začetku temperaturnega programa vključen korak začetne aktivacije polimeraze, ki torej poveča specifičnost reakcije qPCR (27).

V programu LightCycler® 480 II smo pri optimizaciji kot pri merjenju izražanja označevalcev na vzorcih označili uporabo metode absolutne kvantifikacije. Na shemi mikrotitrne ploščice smo opredelili standarde in njihove koncentracije, vzorce ter trojnike. Po končanem programu smo izvedli analizo krivulje pomnoževanja, standardne krivulje ter analizo talilne krivulje.

3.4 DOLOČANJE REFERENČNIH GENOV ZA NORMALIZACIJO

Izbira najustreznejših treh referenčnih genov je temeljila na uporabi programa NormFinder. Program nam poda vrednost stabilnosti posameznega gena oz. stabilnost njegovega izražanja. Zato smo najprej izvedli analizo izražanja referenčnih genov z metodo qPCR.

Nabor referenčnih genov so sestavljali: beta aktin (ACTB), beta 2 mikroglobulin (B2M), gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (GAPDH), beta glukoronidaza (GUSB), ribosomski protein L13a (RPL13A), bočna podenota P0 ribosomskega proteina (RPLP0), na TATA zaporedje vezoči se protein (TBP) in ubikvitin C (UBC). Pri normalizaciji na en referenčni gen smo se odločili za GAPDH, ki je najpogostejše uporabljeni referenčni gen v študijah.

3.4.1 Merjenje izražanja referenčnih genov z metodo qPCR

Z metodo qPCR smo izmerili izražanje osmih referenčnih genov na 30 vzorcih (priloga 1). Celoten postopek dela je potekal enako kot pri merjenju izražanja izbranih označevalcev na vzorcih. Uporabili smo predhodno optimizirane koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za referenčne gene, navedene v preglednici II.

3.4.2 Analiza rezultatov z uporabo programa NormFinder

Po analizi izražanja referenčnih genov s qPCR smo s pomočjo programskega orodja NormFinder določili najustreznejše referenčne gene za obravnavane cDNA vzorce.

NormFinder je algoritem, ki omogoča izbiro optimalnega referenčnega gena za normalizacijo iz ponujenega nabora referenčnih genov. Program za dani poskus in nabor vzorcev razvrsti kandidatne referenčne gene glede na njihovo stabilnost izražanja. V osnovi gre za matematični model, ki ne omogoča le ocene stabilnosti izražanja posameznega gena, ampak tudi oceno variabilnosti izražanja znotraj preiskovanih podskupin in med njimi. Za vsak gen nam določi vrednost stabilnosti, ki direktno odraža variabilnost izražanja (37). Večja kot je ta vrednost, manj je gen stabilen.

Priporočena je analiza nabora od 5 do 10 referenčnih genov in najmanj 8 vzorcev na skupino (37). V nalogi smo naredili analizo nabora referenčnih genov ločeno za vzorce, na katerih smo merili adipogene, osteogene in miogene označevalce. Za vsako skupino smo v Microsoft Excelu naredili tabelo z referenčnimi geni v prvem stolpcu in vzorci v prvi vrstici. V vsaki skupini vzorcev smo te razdelili na tretirane, označene z 1, in kontrole, označene z 0. Za vsak vzorec smo v tabelo vnesli povprečno koncentracijo triplikatov izražanja referenčnih genov, ki smo jo dobili s pomočjo standardne krivulje za posamezni referenčni gen, in izvedli analizo s programom NormFinder. Na podlagi pridobljenih rezultatov smo glede na najmanjše vrednosti stabilnosti, v vsaki izmed treh skupin označevalcev, izbrali po 3 najustreznejše referenčne gene.

3.5 HISTOKEMIJSKO BARVANJE

Izražanja adipogenih in osteogenih označevalcev na preiskovanih vzorcih smo primerjali z rezultati histokemijskega barvanja na istih vzorcih, da bi preverili njihovo medsebojno povezavo. Za potrditev, da so se MMMC, ki smo jih gojili v adipogenem mediju, res diferencirale v adipocite, smo na tretiranih in kontrolnih celicah izvedli barvanje z barvilom *Oil Red O* (33, 34). Z barvanjem z *Oil Red O* določamo prisotnost maščobnih kapljic znotraj adipocitov. Prav tako smo preverili, ali je v osteogenem mediju prišlo do nalaganja kalcijevih fosfatov, ki jih izločajo osteoblasti in kažejo na proces mineralizacije. Nastanek kalcijevih depozitov smo preverili z barvilom *Alizarin Red S*, ki se veže nanje (35, 36).

3.6 KVANTIFIKACIJA REZULTATOV IZRAŽANJA IZBRANIH OZNAČEVALCEV

Ločimo dve osnovni analizi: kvalitativno in kvantitativno analizo. Pri kvalitativni analizi je cilj določiti le prisotnost oz. odsotnost ustreznega produkta, ki je v primeru reakcije qPCR določen odsek DNA. Kvantitativna analiza pa ob zaznavanju prisotnosti omogoča tudi meritev količine te specifične DNA v vzorcu. Po zaznavanju produktov lahko kvantifikacijo izvedemo na dva načina – z uporabo absolutne ali relativne kvantifikacije. Kateri način kvantifikacije izberemo, je odvisno od cilja eksperimenta. Kadar želimo izražanje tarčnega gena v enem vzorcu, npr. tretiranem vzorcu, primerjati z izražanjem istega tarčnega gena v drugem, npr. kontrolnem vzorcu, uporabimo relativno kvantifikacijo, kjer določamo razmerje med količino tarčnega gena in količino referenčnega gena. Pri absolutni kvantifikaciji pa določamo absolutno količino tarčne molekule s pomočjo standardne krivulje (24, 27).

Rezultate, pridobljene z metodo qPCR, smo kvantitativno ovrednotili in določili stopnjo izražanja genov v vzorcih. Za oceno izražanja genov smo uporabili absolutno kvantifikacijo. Absolutno vrednost tarčnega gena v vzorcu, določeno s pomočjo zanj specifične standardne krivulje, smo normalizirali z absolutno vrednostjo referenčnega gena v istem vzorcu. Nivo izražanja posameznega gena smo izrazili z naslednjima enačbama.

Izražanje gena z normalizacijo na en referenčni gen smo izračunali po enačbi 1:

$$Izražanje = \frac{\bar{c}_{(tarčnega\ gena)}}{\bar{c}_{(RG)}}$$

Enačba 1: Izračun izražanja gena z normalizacijo na en referenčni gen.

Izražanje gena z normalizacijo na tri referenčne gene smo izračunali po enačbi 2:

$$Izražanje = \frac{\bar{c}_{(tarčnega\ gena)}}{\sqrt[3]{\bar{c}_{(RG_1)} \times \bar{c}_{(RG_2)} \times \bar{c}_{(RG_3)}}}$$

Enačba 2: Izračun izražanja gena z normalizacijo na tri referenčne gene.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 ANALIZIRANI VZORCI

V nalogi smo analizirali skupno 54 vzorcev, od tega smo nekatere vzorce izmerili pri vseh treh skupinah označevalcev. V rezultatih so vzorci vedno navedeni z zaporedno številko iz priloge 1. Pri prvem merjenju izražanja adipogenih označevalcev na MMSC smo uporabili vzorec z zaporedno številko 7, to je vzorec –RT, s katerim smo potrdili, da se gDNA ne izraža. Vzorca 1 in 2 sta predstavljala le preizkus dveh različnih postopkov adipogene diferenciacije, ki pa nista pokazala razlik v izražanju preiskovanih genov. Pri vzorcih 16 in 17 nismo opazili razlik v izražanju adipogenih označevalcev oz. diferenciacija sploh ni potekla. Pri vzorcih 19 in 38 so bile izmerjene vrednosti izražanja miogenih označevalcev premajhne za primerjavo. Pri vzorcih 24, 25 in 26, ki smo jih diferencirali v miocite, je bila diferenciacija neuspešna. Vzorci 40, 50 in 54 so imeli previsoko stopnjo izražanja nekaterih osteogenih genov. Vseh naštetih vzorcev nismo vključili v razpravo.

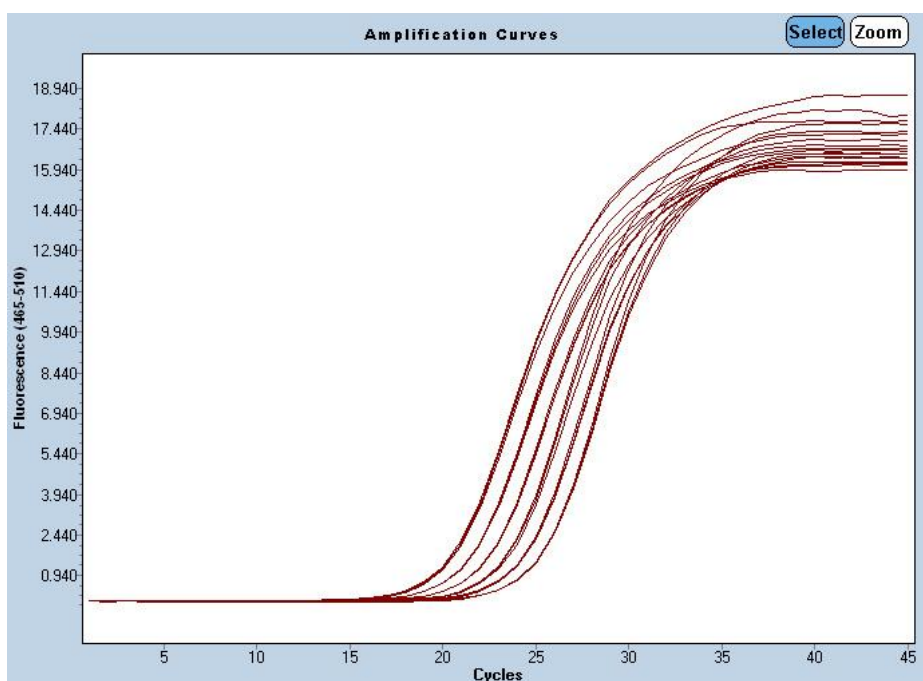
4.2 ANALIZA PODATKOV REAKCIJE qPCR

Celoten potek reakcije qPCR smo nadzorovali preko računalnika s posebno programsko opremo LightCycler® 480 Software. Po končanem pomnoževanju in izvedeni talilni krivulji nam je program podal naslednje rezultate:

- 1) Za vsak vzorec je izpisal:
 - vrednosti C_p za vsak individualni replikat
 - povprečno vrednost C_p vseh treh replikatov
 - standardni odklon vrednosti C_p
 - povprečno koncentracijo produkta ($\bar{c}$)
 - standardni odklon koncentracij produktov
- 2) Izris krivulje pomnoževanja
- 3) Izris standardne krivulje za preiskovani gen
- 4) Izračun naklona standardne krivulje in učinkovitosti reakcije qPCR
- 5) Posebej izris talilne krivulje in njene pretvorjene oblike, kjer je prikazana $\frac{\Delta F}{\Delta T}$ v odvisnosti od temperature

4.2.1 Krivulja pomnoževanja

Pri 100-odstotni učinkovitosti reakcije se količina cDNA v vsakem ciklu podvoji (24). Glede na razredčenost standardov se mora vrednost C_p vsakega naslednjega standarda povečati za ena. St2 s koncentracijo 2,5 ng/ μ L doseže C_p en cikel kasneje kot st1 s koncentracijo 5 ng/ μ L, saj ima za polovico manjšo vsebnost cDNA. V eksperimentalni praksi je to zelo težko doseči zaradi možne kontaminacije in napak pri pipetiranju. Napake pri pipetiranju odražajo tudi ponovljivost merjenja izražanja v trojnikih. Slika 7 prikazuje zelo dobro ponovljivost merjenja izražanja standardov v trojnikih.

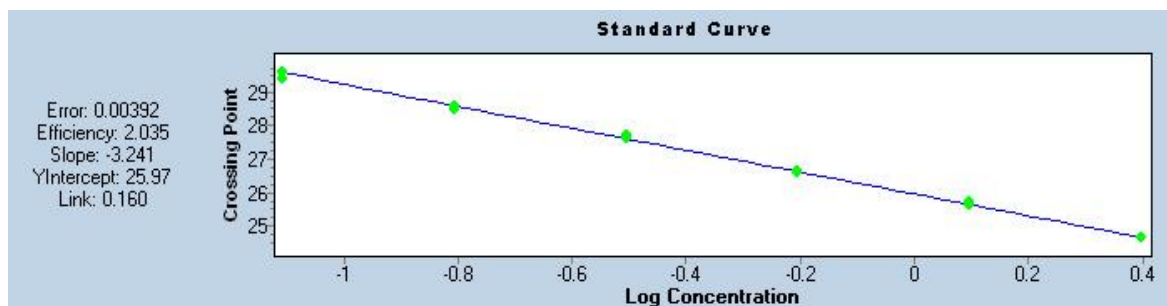


Slika 7: Krivulja pomnoževanja standardov pri merjenju izražanja RPL13A.

Kadar v vzorcu –RT in kontroli NTC krivulje pomnoževanja nismo zaznali, je to pomenilo, da v vzorcu ni prišlo do nastanka dimerov, ni bilo prisotnih neželenih nukleinskih kislin ali gDNA oz. ni prišlo do njenega prepisovanja. Kontroli sta bili uspešni, torej je bila zaznana krivulja pomnoževanja posledica prisotnosti proučevanega produkta.

4.2.2 Standardna krivulja

Pri uporabi programske opreme LightCycler® 480 II nam le ta izriše standardno krivuljo na grafu, ki prikazuje odvisnost vrednosti C_p (na y osi) od logaritmskih vrednosti koncentracij standardov (na x osi) (slika 8).



Slika 8: Standardna krivulja za analizo izražanja PPARG na vzorcih.

Standardno krivuljo naredimo z uporabo vsaj petih zaporedno redčenih standardov znane koncentracije za vsak proučevani gen posebej. Izmerjene vrednosti C_p neznanih vzorcev lahko nato neposredno primerjamo s standardno krivuljo za posamezen gen in določimo vrednost koncentracije tega gena oz. koncentracijo matrične DNA v neznanem vzorcu.

Pri analizi optimizacije kot tudi pri merjenju izražanja referenčnih genov in označevalcev na vzorcih smo za vsak gen ovrednotili standardno krivuljo. Iz standardne krivulje smo razbrali vrednost naklona, ki naj bi znašala med $-3,58$ in $-3,10$ (24). Vrednost naklona je pomembna, saj iz nje lahko izračunamo učinkovitost (E) reakcije qPCR s pomočjo enačbe 3.

$$E (\%) = (10^{\frac{-1}{\text{naklon}}} - 1) \times 100$$

Enačba 3: Izračun učinkovitosti reakcije qPCR. Povzeto po (27).

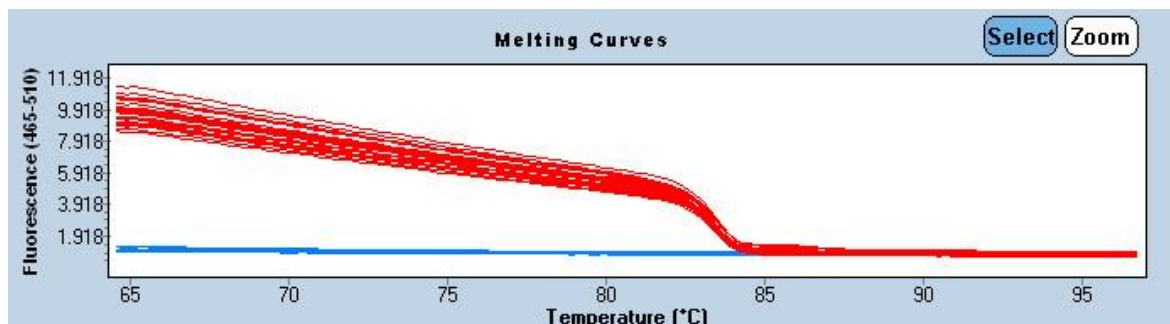
Uspešno reakcijo opredeljujemo z vrednostjo učinkovitosti med 90 in 110 % (24). To sta namreč tudi vrednosti, ki ustrezata izračunu po enačbi 3, upoštevajoč zgoraj navedeni vrednosti naklona. Učinkovitost reakcije predstavlja kazalec stanja reakcije, namreč ob preveliki učinkovitosti lahko sklepamo na inhibicijo reakcije, pogosteje pa je učinkovitost premajhna zaradi neustreznih koncentracij reagentov v reakcijski zmesi in neustreznih reakcijskih pogojev (24).

4.2.3 Analiza talilne krivulje

Pri našem eksperimentalnem delu smo se odločili za uporabo nespecifičnega načina zaznavanja fluorescence z barvilom, ki se lahko vgradi v vsako dvoverižno DNA. Zato je bilo potrebno oceniti specifičnost reakcije qPCR, torej opredeliti, ali smo z izvedeno reakcijo pomnoževali le želeni odsek DNA. To opredelitev nam je omogočila analiza talilne krivulje, ki smo jo v temperaturni program vključili po končanem pomnoževanju (preglednica V).

Talilna krivulja nam pokaže padec fluorescence, ki se zgodi zaradi razklenitve dvoverižne DNA v enoverižno DNA in posledične sprostitve fluorescentnega barvila, zato je analiza mogoča le pri tistih zaznavnih sistemih, kjer fluorofor ostaja združen s produktom. Razklenitev DNA dosežemo s segrevanjem do T_m , kjer pride do nenadnega padca fluorescence. Takrat je polovica DNA v enoverižni in polovica v dvoverižni obliki. T_m različnih odsekov dvoverižne DNA se lahko razlikujejo med sabo tudi za samo 1 °C, kar je posledica lastnosti DNA, kot so npr. dolžina, vsebnosti baznih parov gvanozin-citozin, vsebnost neustreznih baznih parov. Zato je analiza talilne krivulje po končanem pomnoževanju enostaven način za preverbo nastanka dimerov oligonukleotidnih začetnikov, nespecifičnih produktov in prisotnosti gDNA ter s tem oceno specifičnosti reakcije (24).

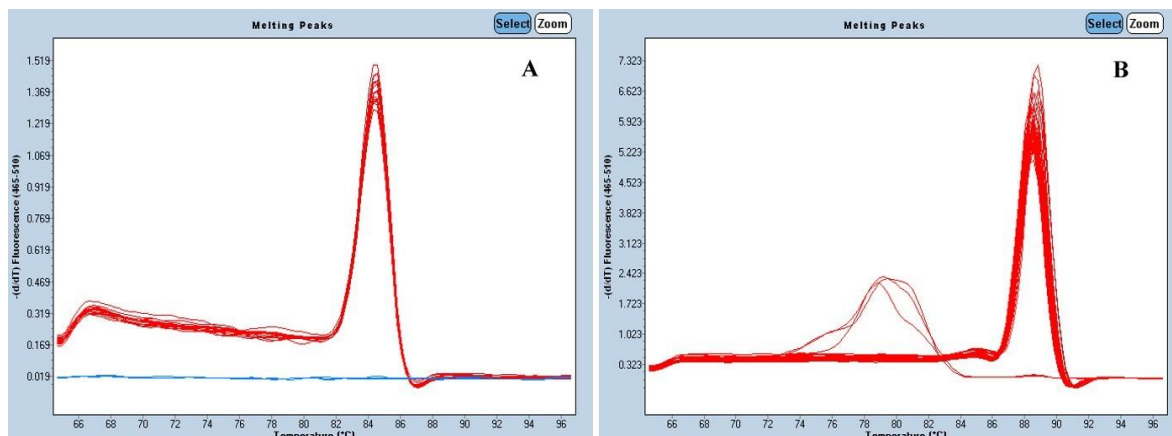
Talilna krivulja nam prikazuje jakost fluorescence v odvisnosti od temperature. Na sliki 9 modra ravna krivulja prikazuje odsotnost tako specifičnih kot nespecifičnih produktov reakcije qPCR ter odsotnost gDNA in dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Z rdečimi krivuljami je prikazan nenaden padec fluorescence pri isti T_m , kar dokazuje nastanek le enega, specifičnega produkta.



Slika 9: Prikaz idealne talilne krivulje. Krivuljo smo dobili pri analizi izražanja RUNX2 na vzorcih.

Z uporabo odvoda fluorescence po času lahko podatke pretvorimo in prikažemo na grafu $\frac{\Delta F}{\Delta T}$ v odvisnosti od temperature (24). Na ta način so posamezni produkti vidni kot individualni vrhovi, velikost vrha pa opredeljuje količino produktov. Višji vrh pomeni več nastalega produkta. Reakcijo opredelimo kot specifično, kadar je opazen samo en vrh, običajno nad 80 °C in je kontrola NTC brez vrhov ali pa so le ti majhni in se nahajajo pri nižjih temperaturah od glavnega vrha (38). Grafa na sliki 10 prikazujeta analizo talilnih vrhov. Na grafu A so prikazani idealni talilni vrhovi z rdečimi krivuljami in kontrola NTC brez vrhov z ravnimi modrimi krivuljami. Takšen graf bi dobili tudi v primeru uspešne analize vzorca

–RT. Na grafu B pa je poleg idealnih talilnih vrhov prikazan značilen izgled talilnih vrhov pri kontroli NTC, ki so posledica nastanka dimerov.



Slika 10: Prikaz analize talilnih vrhov pri izražanju COL1A1 na vzorcih (graf A) in prikaz analize talilnih vrhov pri izražanju RPL13A na vzorcih (graf B).

4.3 ANALIZA OPTIMIZACIJE METODE qPCR

Za točne in natančne rezultate metode qPCR največkrat ni dovolj, da samo sledimo navodilom postopka za izvedbo poskusa. Rezultat, ki ga dobimo, je odvisen od več parametrov. Z razumevanjem in proučevanjem vpliva le teh lahko poskus optimiziramo, da dosežemo najboljše možne in hkrati še natančne rezultate. Optimizacija lahko poteka na več ravneh, mi smo jo izvajali zgolj na dveh. Z optimizacijo metode qPCR smo želeli:

- določiti najustreznejšo koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov in
- ovrednotiti specifičnost oligonukleotidnih začetnikov za merjenje izbranih označevalcev adipogene, osteogene in miogene diferenciacije.

Pri nespecifičnem načinu zaznavanja je ustrezna koncentracija začetnih oligonukleotidov med 50 in 500 nM (24). Za izbrano koncentracijo je potrebno voditi standardno krivuljo, preko katere ocenimo linearnost in učinkovitost reakcije. Za optimalne rezultate pa je potrebno koncentracijo določiti eksperimentalno s titracijo koncentracij oligonukleotidnih začetnikov in analizirati parametre standardne krivulje. Izbira ustrezne koncentracije je v naši nalogi temeljila na vrednosti učinkovitosti, ki jo je izračunal program inštrumenta qPCR, odvisnosti, ali se je izražala gDNA oz. razlike med vrednostma C_p za st2 in za vzorec –RT, ter na podlagi najmanjše vrednosti C_p za st2. Program nam je izračunal vrednost učinkovitosti reakcije v obliki zapisa z enačbo $E = 10^{(-1/\text{naklon})}$. Te vrednosti so navedene v preglednicah rezultatov optimizacije in naj bi znašale od 1,8 do 2,2, ko predstavljajo

učinkovitost reakcije med 80 in 120 %. Pri 100 nM in 600 nM koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov, kjer standardne krivulje nismo imeli, smo opazovali razliko med vrednostma Cp za st2 in vzorec –RT. Zaradi enakega redčenja smo lahko njuni vrednosti Cp neposredno primerjali. Kadar je bila vrednost Cp vzorca –RT vsaj za 5 ciklov večja od vrednosti Cp st2, takšno pomnoževanje DNA v vzorcu –RT ni motilo kvantitativne ocene izražanja gena. To je pomenilo 32-krat (2^5 -krat) manjše izražanje produkta DNA (38). Večja kot je bila razlika med omenjenima Cp, primernejša je bila koncentracija oligonukleotidnega začetnika, saj se je s tem označevalec bolje ločil od morebitnih drugih, neželenih produktov. Seveda je najbolje, da sta koncentracija in specifičnost oligonukleotidnega začetnika za označevalec takšna, da v vzorcu –RT ne dobimo nobenega produkta ($C_p = 40$, ker je vzorec prerazredčen), medtem ko se standardi še izražajo. Načeloma smo vedno izbrali tisto koncentracijo, ki je imela najmanjšo vrednost Cp st2. Kadar se pri določeni koncentraciji oligonukleotidnega začetnika gDNA ni izražala, smo zaradi tega izbrali tisto koncentracijo.

Pri oceni talilne krivulje smo preverjali specifičnost oligonukleotidnih začetnikov v smislu vezave na morebiti prisotno gDNA in sposobnosti tvorbe dimerov. Kadar je prišlo do prekrivanja vrhov standardov in vzorca –RT na talilni krivulji, je to pomenilo, da takšen oligonukleotidni začetnik ni specifičen za kvantifikacijo želenega produkta. Pri prekrivanju vrhov se namreč oligonukleotidni začetnik veže na cDNA v vzorcu in na gDNA. V tem primeru ne vemo, kateri produkt je nastal v vzorcu, zato ne vemo, kaj kvantificiramo. Rešitev je, da poiščemo drug, bolj specifičen oligonukleotidni začetnik. Nastanek dimerov najpogosteje opazimo v kontroli NTC in v vzorcih, kjer je količina DNA zelo majhna. Njihov nastanek v prisotnosti tarčnega odseka DNA lahko vpliva na učinkovitost reakcije in prispeva k fluorescentnemu signalu, zato je v takem primeru potrebna optimizacija oligonukleotidnih začetnikov (24). Vrhovi, ki se pojavijo pri kontroli NTC, so posledica združevanja oligonukleotidnih začetnikov v dimere ali naključne kontaminacije.

4.3.1 Oligonukleotidni začetniki za merjenje izražanja adipogenih označevalcev

V skupini adipogenih označevalcev je bilo potrebno optimizirati oligonukleotidne začetnike za tri gene adipogenih označevalcev (FABP4, PPARG in ADIPOQ). V preglednici VI so predstavljeni rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov za adipogene označevalce.

Preglednica VI: Rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov za adipogene označevalce. Izbrane koncentracije so označene v zadnjem stolpcu s krepkim tiskom.

<i>Oligonukleotidni začetniki za adipogene označevalce</i>	<i>C_p</i>		<i>Učinkovitost (E)</i>	<i>Naklon</i>	<i>T_m</i>	<i>Specifičnost</i>
FABP4 200 nM	st2 st6 NTC SB29-RT	21,3 25,2 / 34,2	2,026	-3,262	Vrh standardov: 83 °C Vrh NTC: 83 °C, /, Vrh SB29-RT: 81 °C in 86,7 °C	Specifičen
FABP4 100 nM	st2 SB29-RT	22,1 37	-	-	Vrh st2: 83 °C Vrh SB29-RT: 81 °C	Specifičen
FABP4 600 nM	st2 SB29-RT	21,4 38	-	-	Vrh st2: 83 °C Vrh SB29-RT: 81 °C in 86,7 °C	Specifičen
PPARG 200 nM	st2 st6 NTC SB29-RT	25,9 29,9 40 35,3	2,010	-3,299	Vrh standardov: 81 °C Vrh NTC: 71 °C Vrh SB29-RT: 85 °C in 92 °C	Specifičen
PPARG 100 nM	st2 SB29-RT	28 40	-	-	Vrh st2: 81 °C SB29-RT: 85 °C	Specifičen
PPARG 600 nM	st2 SB29-RT	26 33,7	-	-	Vrh st2: 81 °C SB29-RT: 85 °C	Specifičen
ADIPOQ 200 nM	st2 st6 NTC SB29-RT	24,7 28,8 / 37,4	1,958	-3,426	Vrh standardov: 87 °C Vrh NTC: / Vrh SB29-RT: 86 °C	Specifičen
ADIPOQ 100 nM	st2 SB29-RT	25,7 40	-	-	Vrh st2: 87 °C Vrh SB29-RT: 86 °C	Specifičen
ADIPOQ 600 nM	st2 SB29-RT	24,5 37	-	-	Vrh st2: 87 °C Vrh SB29-RT: 86 °C	Specifičen

Analiza talilne krivulje je za gen ADIPOQ pokazala zgolj za 1 °C različna vrhova glavnega produkta in produkta vzorca -RT. Na podlagi razlike med vrednostma C_p za st2 in vzorec -RT (več kot 12 ciklov) smo potrdili specifičnost oligonukleotidnega začetnika tudi za gen ADIPOQ. V splošnem do kontaminacije pri delu ni prihajalo, tako kot tudi ne do nastanka dimerov.

4.3.2 Oligonukleotidni začetniki za merjenje izražanja osteogenih označevalcev

V skupini osteogenih označevalcev smo optimizirali oligonukleotidne začetnike za tri gene: alkalno fosfatazo (ALP), osteokalcin (OC) in receptor za paratireoidni hormon 1 (PTH1R). Rezultate optimizacije prikazuje preglednica VII.

Preglednica VII: Rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov za osteogene označevalce.
Izbrane koncentracije so označene v zadnjem stolpcu s krepkim tiskom.

<i>Oligonukleotidni začetniki za osteogene označevalce</i>	<i>C_p</i>		<i>Učinkovitost (E)</i>	<i>Naklon</i>	<i>T_m</i>	<i>Specifičnost</i>
ALP 200 nM	st2	35,5	1,970	−3,397	Vrh standardov: 92 °C	Nespecifičen
	st6	40			Vrh NTC: 78 °C	
	NTC	37,5			Vrh SB29-RT: 92 °C	
	SB29-RT	36,9				
ALP 100 nM	st2	40			Vrh st2: 92 °C	Nespecifičen
	SB29-RT	40			Vrh SB29-RT: 92 °C	
ALP 600 nM	st2	33,8			Vrh st2: 92 °C	Nespecifičen
	SB29-RT	35,6			Vrh SB29-RT: 92 °C	
OC 200 nM	st2	24,1	1,972	−3,390	Vrh standardov: 89 °C	Specifičen
	st6	28,2			Vrh NTC: 80 °C in 77 °C	
	NTC	37,5			Vrh SB29-RT: 92 °C	
	SB29-RT	35				
OC 100 nM	st2	24,7			Vrh st2: 89 °C	Specifičen
	SB29-RT	37			Vrh SB29-RT: 92 °C	
OC 600 nM	st2	23,7			Vrh st2: 89 °C	Specifičen
	SB29-RT	33			Vrh SB29-RT: 92 °C	
PTH1 100 nM	st2	27,8	1,887	−3,626	Vrh standardov: 86 °C	Specifičen
	st6	32			Vrh NTC: 80 °C	
	NTC	40			Vrh SB29-RT: 82 °C	
	SB29-RT	36,5				
PTH1 200 nM	st2	27,5	2,229	−2,873	Vrh standardov: 86 °C	Specifičen
	st6	31			Vrh NTC: 80 °C	
	NTC	33			Vrh SB29-RT: 82 °C	
	SB29-RT	33				
PTH1 600 nM	st2	27			Vrh st2: 86 °C	Specifičen
	SB29-RT	31			Vrh SB29-RT: 82 °C	

Prvotna optimizacija oligonukleotidnega začetnika za gen PTHR1 s koncentracijo 200 nM ni bila uspešna, saj naklon standardne krivulje in s tem tudi učinkovitost nista bila ustrezna. Glede na razliko med vrednostma C_p za st2 in vzorec –RT smo ponovili standardno krivuljo s koncentracijo 100 nM, kjer sta bila naklon in učinkovitost znotraj želenih meja. Po proučitvi talilne krivulje smo opazili nezadostno specifičnost oligonukleotidnega začetnika za gen ALP. Vrhovi standardov so pri vseh treh koncentracijah sovpadali z vrhom vzorca –RT, razlike med vrednostma C_p za st2 in vzorec –RT pa so bile premajhne, da produkti gDNA ne bi motili kvantifikacije. Zato smo ta oligonukleotidni začetnik izključili. Namesto njega smo izbrali drug, že optimiziran oligonukleotidni začetnik z oznako hALP.

4.3.3 Oligonukleotidni začetniki za merjenje izražanja miogenih označevalcev

V skupini miogenih označevalcev smo optimizirali sedem oligonukleotidnih začetnikov za naslednje gene: PAX7, MYOD1, MYOG, protein za težko verigo miozina 1 (MYH1),

troponin T2, srčni tip (TPNT), alfa aktin srčne mišice 1 (ACTC1) in alfa-2 aktin gladkega mišičja aorte (ACTA2). Prvotno smo optimizacijo izvedli na BMSC. Razumljivo, tkivo iz kosti ni najprimernejše za izražanje miogenih označevalcev, kar se je pokazalo z neustrezno učinkovitostjo in specifičnostjo reakcije qPCR (rezultati niso prikazani). Kljub temu smo iz rezultatov optimizacije na BMSC izbrali najoptimalnejšo koncentracijo za posamezen oligonukleotidni začetnik (na podlagi največje razlike med vrednostma C_p za st2 in vzorec –RT) in z njo preverili učinkovitost ter specifičnost na MMSC. Te rezultate prikazuje preglednica VIII.

Preglednica VIII: Rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov za miogene označevalce. Izbrane koncentracije so označene v zadnjem stolpcu s krepkim tiskom.

<i>Oligonukleotidni začetniki za miogene označevalce</i>	<i>C_p</i>		<i>Učinkovitost (E)</i>	<i>Naklon</i>	<i>T_m</i>	<i>Specifičnost</i>
PAX7 200 nM	st2 st6 NTC SM-RT BMSC	28,8 32,8 37,3 40 40	2,059	–3,188	Vrh standardov: 89 °C Vrh NTC: 79 °C Vrh SM-RT: 79 °C Vrh BMSC: 83 °C	Specifičen
MYOD1 200 nM	st2 st6 NTC SM-RT BMSC	24,7 28,5 32 36 32	2,044	–3,220	Vrh standardov: 86 °C Vrh NTC: 79 °C Vrh SM-RT: 79 °C Vrh BMSC: 79 °C in majhen pri 86 °C	Specifičen
MYOG 100 nM	st2 st6 NTC SM-RT BMSC	23 26,9 40 40 37	2,104	–3,096	Vrh standardov: 82,7 °C Vrh NTC: 78,7 °C Vrh SM-RT: 79 °C Vrh BMSC: 83 °C	Specifičen
MYH1 100 nM	st2 st6 NTC SM-RT BMSC	26,6 30,7 / / 29,2	2,028	–3,256	Vrh standardov: 86,7 °C Vrh NTC: / Vrh SM-RT: / Vrh BMSC: 86 °C	Specifičen
TPNT 200 nM	st2 st6 NTC SM-RT BMSC	23,6 27,3 / / 31	1,866	–3,690	Vrh standardov: 86 °C Vrh NTC: / Vrh SM-RT: / Vrh BMSC: 86 °C	Specifičen
ACTC1 100 nM	st2 st6 NTC SM-RT BMSC	22 27 / 40 29,5	1,700	–4,338	Vrh standardov: 87 °C Vrh NTC: / Vrh SM-RT: 77 °C Vrh BMSC: 87 °C	Specifičen
ACTA2 200 nM	st2 st6 NTC SM-RT BMSC	22 31,6 40 40 23,4	1,770	–4,031	Vrh standardov: 85 °C Vrh NTC: 82 °C in 92 °C Vrh SM-RT: 87 °C in 92 °C Vrh BMSC: 85 °C	Specifičen

Oligonukleotidna začetnika za gena ACTC1 in ACTA2 sta izkazala malo slabšo učinkovitost reakcije qPCR v primerjavi z ostalimi oligonukleotidnimi začetniki. Vendar smo ju opredelili kot ustrezna, saj sta v prvotni optimizaciji imela ustrezno učinkovitost. gDNA se pri vseh oligonukleotidnih začetnikih skoraj ni več izražala, kar pomeni, da je bila izolacija RNA zelo uspešna. Nastanek dimerov se je pojavil v kontroli NTC pri oligonukleotidnih začetnikih za gene PAX7, MYOD1, MYOG in ACTA2. Vrednosti Cp teh kontrol NTC so bile velike, kar pomeni, da je bilo izražanje dimerov zelo majhno. V skupini miogenih označevalcev smo imeli še dodatno negativno kontrolo, in sicer vzorec BMSC, ki naj izbranih označevalcev ne bi izražal oz. naj bi imel zgolj neko osnovno izražanje. Iz rezultatov izražanja v tem vzorcu lahko povzamemo, da imajo BMSC osnovno izražanje vseh miogenih označevalcev, razen PAX7. Namreč jakosti fluorescence izražanja so bile v primerjavi z izražanjem v standardih manjše.

4.4 IZBIRA TREH REREFENČNIH GENOV ZA NORMALIZACIJO

Po analizi stabilnosti referenčnih genov s programom NormFinder smo referenčne gene izbrali na osnovi najmanjše vrednosti stabilnosti, upoštevajoč hkrati najnižjo variabilnost znotraj in med skupinami tretiranih in kontrolnih vzorcev.

V skupini adipogenih označevalcev smo izbrali GUSB, RPL13A in RPLP0 kot najbolj stabilne referenčne gene. Rezultati analize NormFinder so prikazani v preglednici IX.

Preglednica IX: Rezultati analize NormFinder v skupini adipogenih označevalcev. Izbrani referenčni geni so obarvani modro.

Referenčni gen	Vrednost stabilnosti	Variabilnost znotraj skupine		Variabilnost med skupinama	
		Tretirani vzorci	Kontrolni vzorci	Tretirani vzorci	Kontrolni vzorci
ACTB	0,371	0,561	0,775	0,149	-0,149
B2M	0,201	0,175	0,171	-0,118	0,118
GAPDH	0,148	0,002	0,023	0,154	-0,154
GUSB	0,087	0,055	0,004	0,025	-0,025
RPL13A	0,089	0,045	0,009	-0,025	0,025
RPLP0	0,090	0,002	0,031	0,055	-0,055
TBP	0,102	0,003	0,092	0,028	-0,028
UBC	0,320	0,297	0,691	-0,269	0,269

Za normalizacijo izražanja osteogenih označevalcev smo izbrali GAPDH, RPL13A in RPLP0. Rezultate prikazuje preglednica X.

Preglednica X: Rezultati analize NormFinder v skupini osteogenih označevalcev. Izbrani referenčni geni so obarvani modro.

Referenčni gen	Vrednost stabilnosti	Variabilnost znotraj skupine		Variabilnost med skupinama	
		Tretirani vzorci	Kontrolni vzorci	Tretirani vzorci	Kontrolni vzorci
ACTB	0,288	0,668	0,222	-0,021	0,021
B2M	0,134	0,082	0,098	-0,096	0,096
GAPDH	0,050	0,027	0,003	-0,023	0,023
GUSB	0,082	0,061	0,014	0,084	-0,084
RPL13A	0,072	0,016	0,038	0,024	-0,024
RPLP0	0,056	0,036	0,003	0,109	-0,109
TBP	0,202	0,173	0,238	0,025	-0,025
UBC	0,224	0,099	0,472	-0,102	0,102

Za merjenje izražanja miogenih označevalcev smo na podlagi rezultatov v preglednici XI izbrali naslednje referenčne gene: ACTB, GAPDH in RPL13A.

Preglednica XI: Rezultati analize NormFinder v skupini miogenih označevalcev. Izbrani referenčni geni so obarvani modro.

Referenčni gen	Vrednost stabilnosti	Variabilnost znotraj skupine		Variabilnost med skupinama	
		Tretirani vzorci	Kontrolni vzorci	Tretirani vzorci	Kontrolni vzorci
ACTB	0,040	0,008	0,006	0,003	-0,003
B2M	0,060	0,023	0,006	0,040	-0,040
GAPDH	0,035	0,001	0,002	0,021	-0,021
GUSB	0,048	0,009	0,007	-0,023	0,023
RPL13A	0,039	0,006	0,000	-0,028	0,028
RPLP0	0,052	0,002	0,009	-0,044	0,044
TBP	0,062	0,016	0,016	0,036	-0,036
UBC	0,048	0,012	0,009	-0,006	0,006

Uporabljeni referenčni geni v naši nalogi so bili izbrani eksperimentalno, vključujoč vzorce treh različnih smeri diferenciacije. Našo izbiro referenčnih genov lahko primerjamo z drugimi raziskavami, kjer so določali najustreznejše referenčne gene tudi na podlagi različnih smeri diferenciacije ter izvora MSC. V raziskavi so prav tako uporabili analizo NormFinder, ki je RPL13A, RPLP0, GUSB, GAPDH in ACTB uvrstila med boljše referenčne gene, še posebej RPL13A in GUSB (39). V drugi raziskavi so pri proučevanju sedmih najpogostejše uporabljenih referenčnih genov s pomočjo več algoritmov, med njimi tudi NormFinder-ja, določali stabilnost le teh skozi tri različne diferenciacije (40). Ugotovili so, da je največjo stabilnost izražanja izkazoval RPL13A, kar potrjuje ustreznost naše izbire RPL13A kot enega izmed treh referenčnih genov pri vsaki skupini označevalcev. V študiji proučevanja stabilnosti osmih najpogostejših referenčnih genov na štirih različnih virih MSC se je GAPDH izkazal za najmanj stabilnega, podobno so dokazali tudi za referenčni gen ACTB (41). Zato ju kot referenčna gena v raziskavah humanih MSC ne priporočajo. V naši raziskavi smo kot referenčna gena med drugimi izbrali tudi GAPDH in ACTB, saj sta pri naših eksperimentalnih pogojih izkazala visoko stabilnost. Ta izbira potrjuje, da so referenčni geni res celično in tkivno specifični ter odvisni od eksperimentalnih pogojev. Z neoptimalno izbiro referenčnih genov, kar pomeni ne upoštevajoč eksperimentalne pogoje in izvor MSC, lahko dobimo napačne rezultate izražanja ter s tem izgubimo in razvrednotimo celoten pomen raziskave (39).

4.5 IZRAŽANJE OZNAČEVALCEV DIFERENCIACIJE

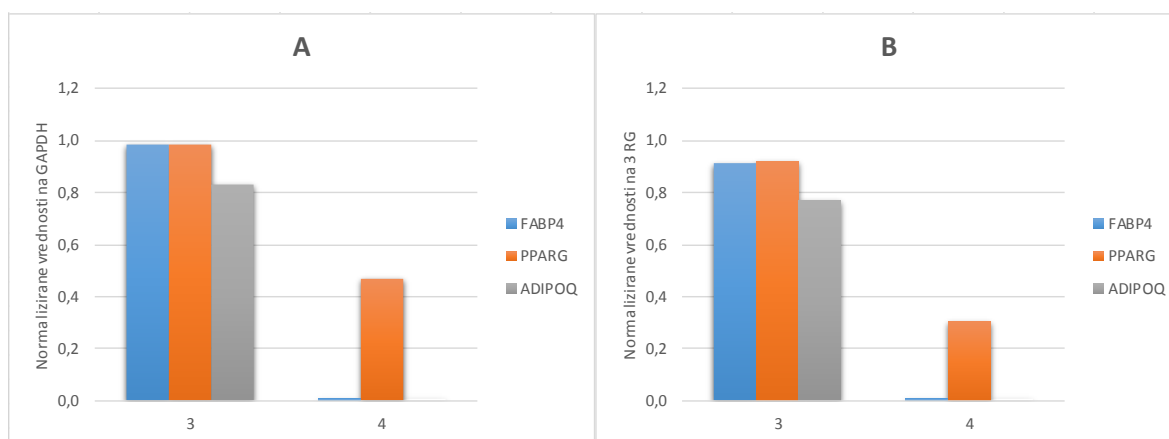
Preverjali smo izražanje označevalcev adipogene, osteogene in miogene diferenciacije z merjenjem izražanja njihovih genov z metodo qPCR. Razlike v izražanju označevalcev med tretiranimi in kontrolnimi celicami smo primerjali z rezultati histokemijskih barvanj in hkrati opazovali razlike v normalizaciji izražanja označevalcev na en oz. na tri referenčne gene.

Ker so vzorci pripadali različnim patologijam in pasažam ter izhajali iz različnih virov, je bilo vzorcev premalo, da bi jih razdelili v skupine in jih obravnavali s statističnimi metodami. Zato smo za rezultate izražanja z metodo qPCR sprejeli dogovor za opredelitev značilne razlike v izražanju. Značilno mejo smo postavili pri 4-kratnem povečanju izražanja v tretiranih vzorcih v primerjavi s kontrolo.

4.5.1 Izražanje označevalcev adipogene diferenciacije

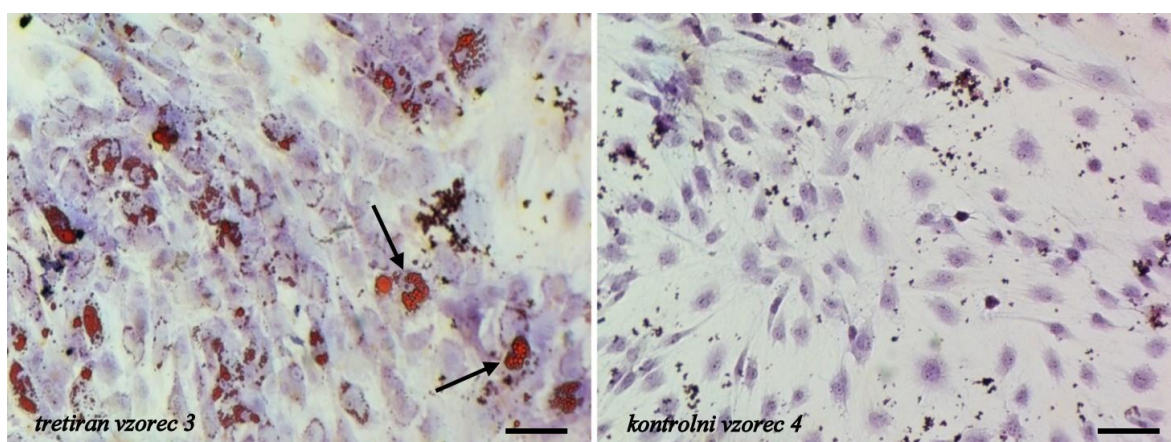
Sposobnost MMSC, da se diferencirajo v adipocite, smo preverili na 6 parih tretiranih in kontrolnih vzorcev preiskovancev z osteoartrazo kolka ali *post mortem*.

Izražanje adipogenih označevalcev pri vzorcu 3 (tretiran) in 4 (kontrola) ter primerjavo normalizacij prikazuje slika 11. Pri vzorcu 3 je razvidno veliko večje izražanje vseh treh preiskovanih adipogenih genov v primerjavi z vzorcem 4. Razmerja izražanja genov med tretiranimi in kontrolnimi vzorci se niso spremenila v odvisnosti od števila referenčnih genov, uporabljenih za normalizacijo.



Slika 11: Primerjava izražanja adipogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 3) in kontrolnim vzorcem (vzorec 4). Graf A: normalizacija na GAPDH; graf B: normalizacija na tri referenčne gene (3 RG: GUSB, RPL13A in RPLP0).

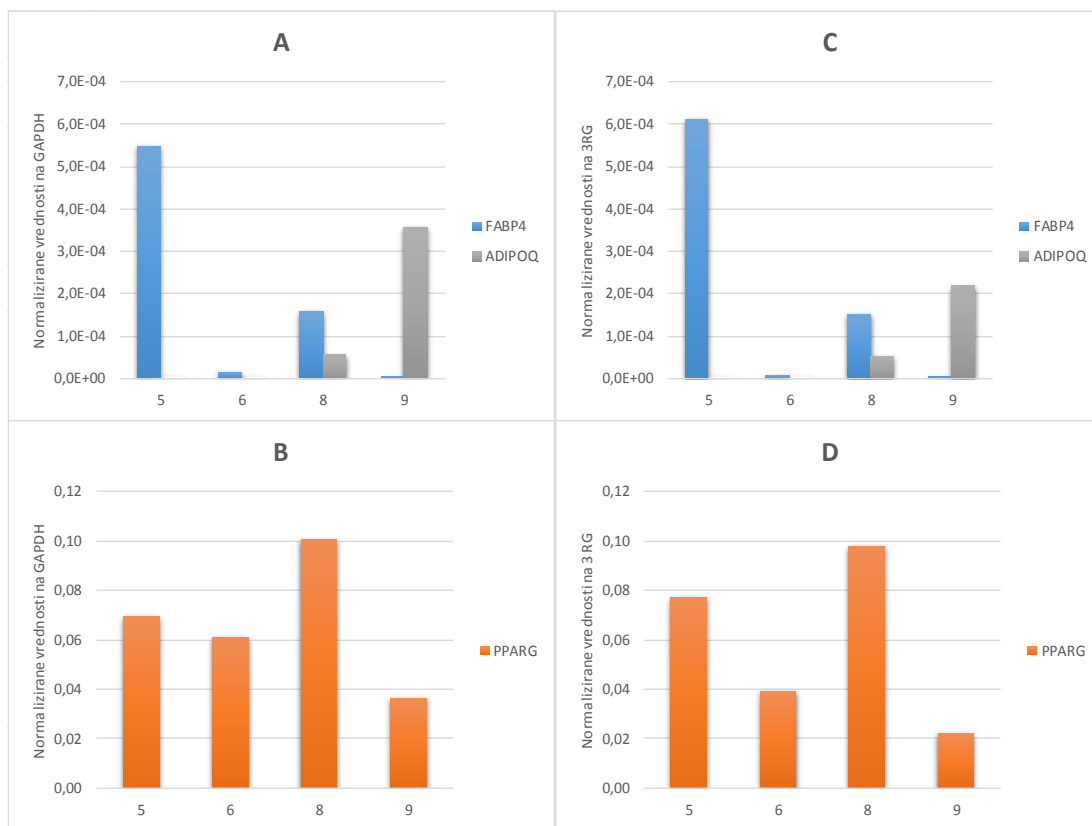
Z barvanjem *Oil Red O* smo preverili nastanek maščobnih kapljic (slika 12). V tretiranem vzorcu so bile vidne obarvane maščobne kapljice, medtem ko v kontrolnem vzorcu maščobne kapljice niso nastale.



Slika 12: Barvanje tretiranega (vzorec 3) in kontrolnega vzorca (vzorec 4) z *Oil Red O*. S puščicama so označeni posamezni *Oil Red O* pozitivni adipociti. Črna črta predstavlja 100 µm.

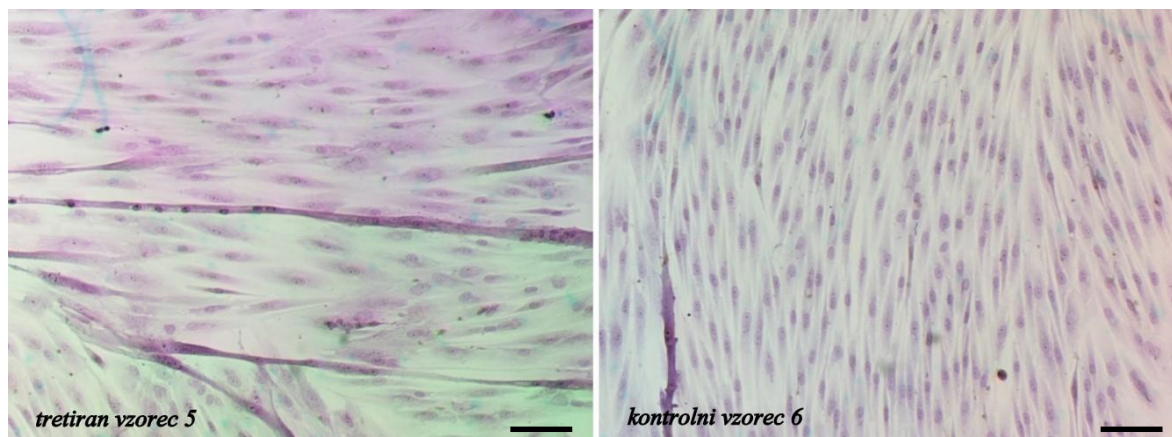
Rezultati barvanja torej potrjujejo, da je v vzorcu 3 res potekla diferenciacija v adipocite, prav tako pa razlike med tretiranim in kontrolnim vzorcem opazimo tudi na nivoju izražanja adipogenih genov FABP4 in ADIPOQ. Izražanje PPARG se je med vzorcema najmanj razlikovalo, vendar glede na rezultate barvanja in dejstvo, da je PPARG glavni odgovorni transkripcijski dejavnik za adipogeno diferenciacijo, je možno, da se v vzorcu 3 še niso diferencirale vse celice in bi izražanje genov še naraščalo.

Tretirana vzorca 5 in 8 sta pokazala več kot 10-kratno razliko v izražanju FABP4 v primerjavi z njunima kontrolama – vzorcema 6 in 9 (slika 13). ADIPOQ se pri vzorcu 5 in 6 sploh ni izražal, medtem ko se je pri vzorcu 9, ki predstavlja kontrolo, izražal bolj kot pri tretiranem vzorcu 8. Pri izražanju PPARG so rezultati pokazali malo večjo razliko v izražanju med tretiranimi in kontrolnimi vzorci, kadar smo normalizacijo izvedli s tremi referenčnimi geni. Kljub temu se je PPARG v vzorcu 5 izražal le 2-krat več kot v njegovem kontrolnem vzorcu, v vzorcu 8 pa 5-krat več kot v vzorcu 9. To so majhne razlike, ki skupaj z neizražanjem ADIPOQ v vzorcih 5 in 6 in ravno nasprotno izraženim ADIPOQ v vzorcih 8 in 9, ne morejo potrditi diferenciacije na podlagi izražanja genov.



Slika 13: Primerjava izražanja adipogenih označevalcev med tretiranimi (5 in 8) in kontrolnimi vzorci (6 in 9). Grafi A in B: normalizacija na GAPDH; grafi C in D: normalizacija na 3 referenčne gene (3 RG: GUSB, RPL13A in RPLP0).

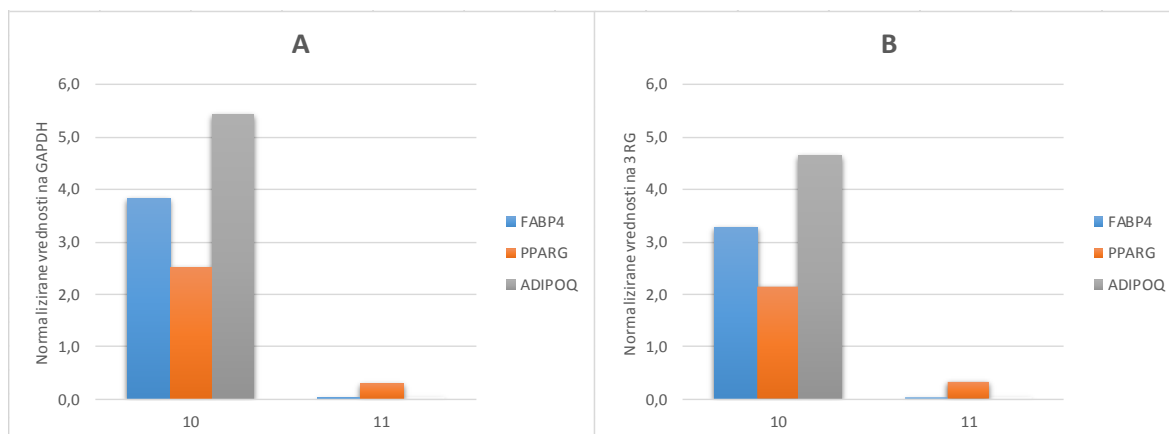
Rezultati barvanja z *Oil Red O* (slika 14) so bili negativni za vzorca 5 in 6, kar pomeni, da tako v tretiranem kot v kontrolnem vzorcu ni prišlo do nastanka maščobnih kapljic, ki se obarvajo s tem barvilom.



Slika 14: Barvanje tretiranega (vzorec 5) in kontrolnega vzorca (vzorec 6) z *Oil Red O*. Črna črta predstavlja 100 μm .

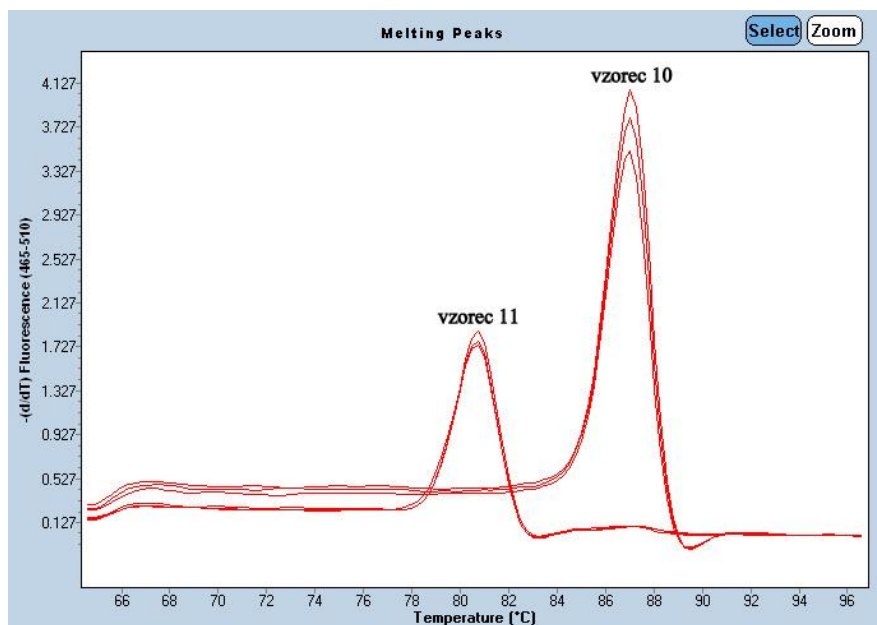
Normalizirane vrednosti izražanja posameznih genov so bile zelo nizke v primerjavi z vrednostmi izražanja pri vzorcih 3 in 4, kjer smo dokazali uspešno diferenciacijo. Že na podlagi te ugotovitve in rezultatov barvanja vzorcev 5 in 6 z *Oil Red O*, ki so bili negativni, smo zaključili, da diferenciacija v adipocite ni potekla. V študiji izvora maščobnega tkiva v mišicah so prišli do spoznanja, da obstaja veliko različnih subpopulacij MMSC, ki imajo večjo ali manjšo sposobnost adipogeneze (22). Neuspešno diferenciacijo vzorcev 5 in 8 smo si na podlagi tega razložili kot posledico izolacije subpopulacije MMSC, ki se ni bila zmožna usmeriti v adipogeno linijo, kar pa bi bilo potrebno še naprej raziskati.

Vzorec 10, ki predstavlja tretiran vzorec, je izražal 10-krat večjo količino FABP4 in tudi 6- do 8-krat več PPARG kot vzorec 11, ki ni bil izpostavljen pogojem adipogene diferenciacije (slika 15). ADIPOQ se pri kontrolnem vzorcu ni izražal. Tudi tu normalizacija na en referenčni gen, GAPDH, in na tri izbrane referenčne gene ni pokazala razlik v izražanju adipogenih označevalcev. Razmerja izražanja genov med tretiranimi in kontrolnimi vzorci so se namreč ohranila.



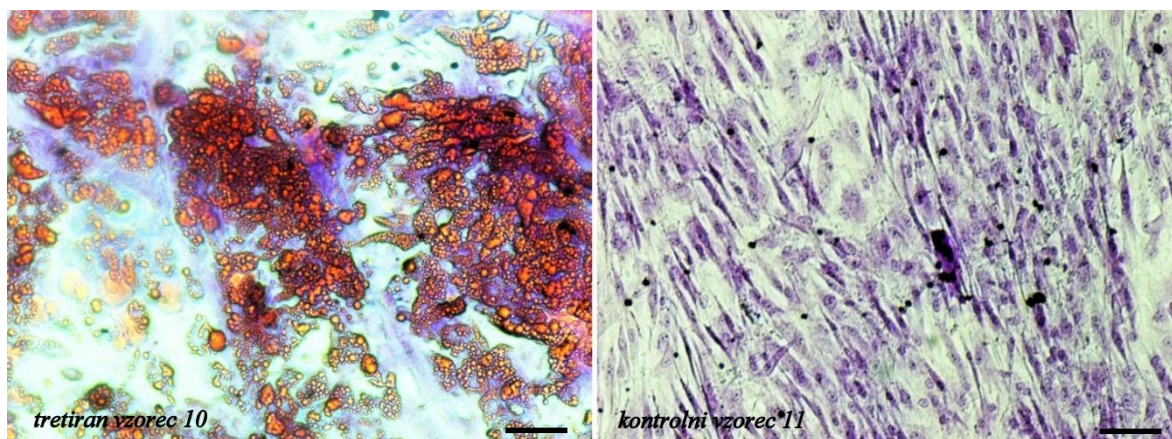
Slika 15: Primerjava izražanja adipogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 10) in kontrolnim vzorcem (vzorec 11). Graf A: normalizacija na GAPDH; graf B: normalizacija na tri referenčne gene (3 RG: GUSB, RPL13A in RPLP0).

Primer neizražanja ADIPOQ je razviden tudi s talilne krivulje na sliki 16. Opazimo, da v kontrolnem vzorcu 11 ni nastal specifičen produkt za ta gen, kaže le na prisotnost dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Specifičnost produkta v tretiranem vzorcu 10 smo opredelili na podlagi ujemanja z vrhom standardov.



Slika 16: Talilna vrhova tretiranega vzorca 10 in kontrolnega vzorca 11 pri izražanju ADIPOQ.

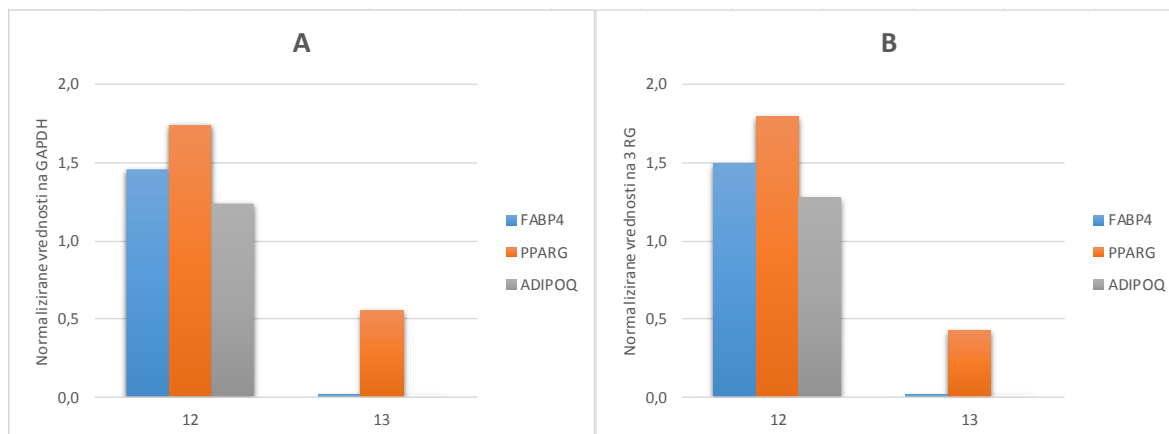
Z barvanjem z *Oil Red O* smo v tretiranem vzorcu opazili nastanek velikega števila maščobnih kapljic, medtem ko v kontrolnem vzorcu do obarvanja ni prišlo (slika 17).



Slika 17: Barvanje tretiranega (vzorec 10) in kontrolnega vzorca (vzorec 11) z *Oil Red O*. Črna črta predstavlja 100 µm.

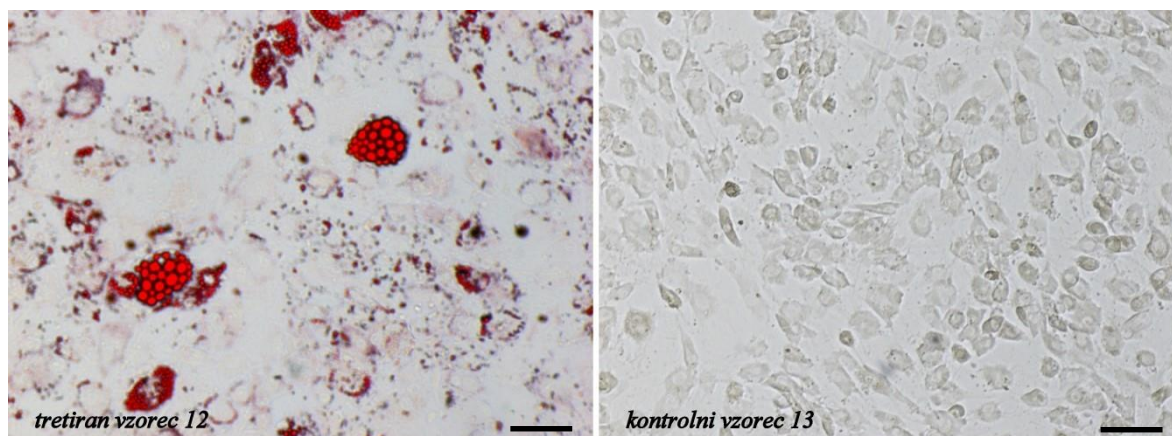
Izražanje vseh treh genov v tretiranem vzorcu skupaj s pozitivnim rezultatom histokemijskega barvanja maščobnih kapljic, glede na kontrolni vzorec, potrjuje uspešno adipogeno diferenciacijo. Tudi tu se je v kontrolnem vzorcu med vsemi geni pokazalo največje osnovno izražanje gena PPARG.

Zelo podobne rezultate smo dobili pri vzorcu 12 in vzorcu 13 (slika 18). Tretirani vzorec 12 kaže veliko večje izražanje vseh treh adipogenih označevalcev v primerjavi s kontrolnim vzorcem 13. Glede normalizacije na en ali tri referenčne gene razlik v izražanju nismo opazili.



Slika 18: Primerjava izražanja adipogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 12) in kontrolnim vzorcem (vzorec 13). Graf A: normalizacija na GAPDH; graf B: normalizacija na tri referenčne gene (3 RG: GUSB, RPL13A in RPLP0).

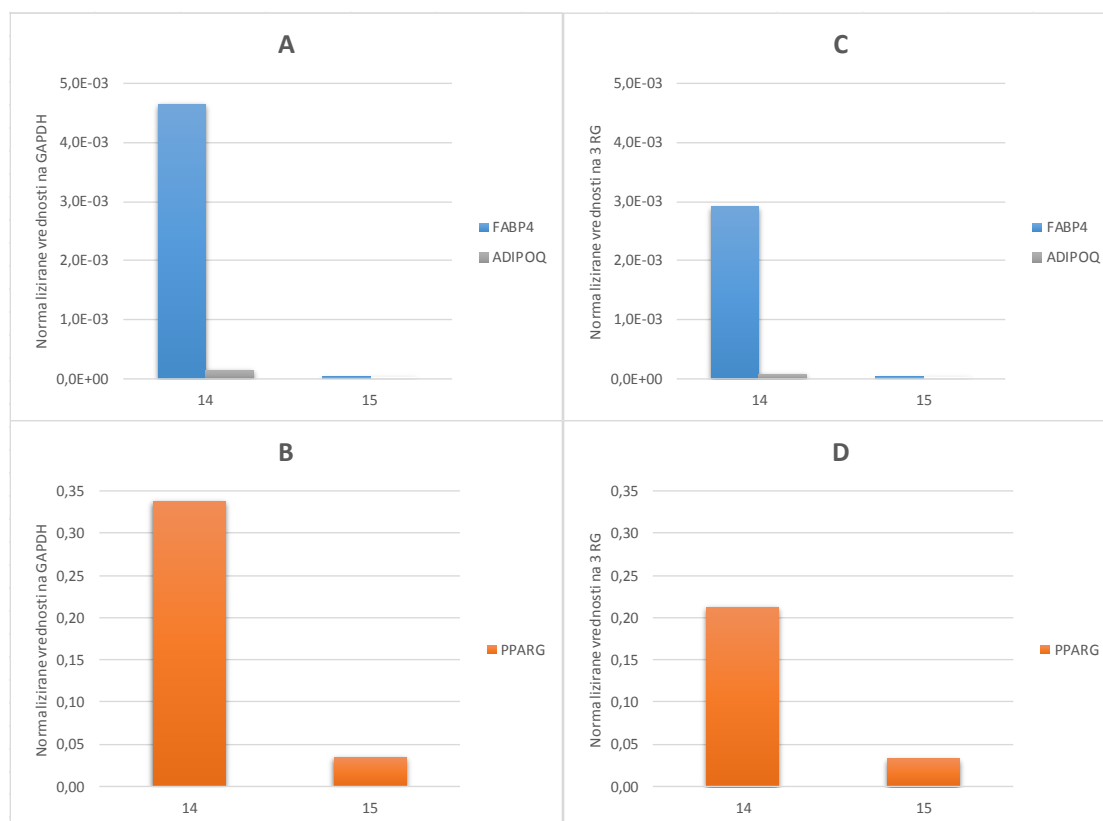
Z barvanjem z *Oil Red O* smo pri tretiranem vzorcu dobili pozitivno obarvanje, saj so bile vidne obarvane maščobne kapljice, ki pri kontroli niso nastale (slika 19).



Slika 19: Barvanje tretiranega (vzorec 12) in kontrolnega vzorca (vzorec 13) z *Oil Red O*. Črna črta predstavlja 100 µm.

Izmerjeno izražanje genov adipogene diferenciacije in histokemijsko barvanje tretiranega in kontrolnega vzorca je dokazalo uspešno adipogenezo MMSC v vzorcu 12. V kontrolnem vzorcu zopet ni bilo izražanja ADIPOQ, medtem ko je imel največje izražanje PPARG.

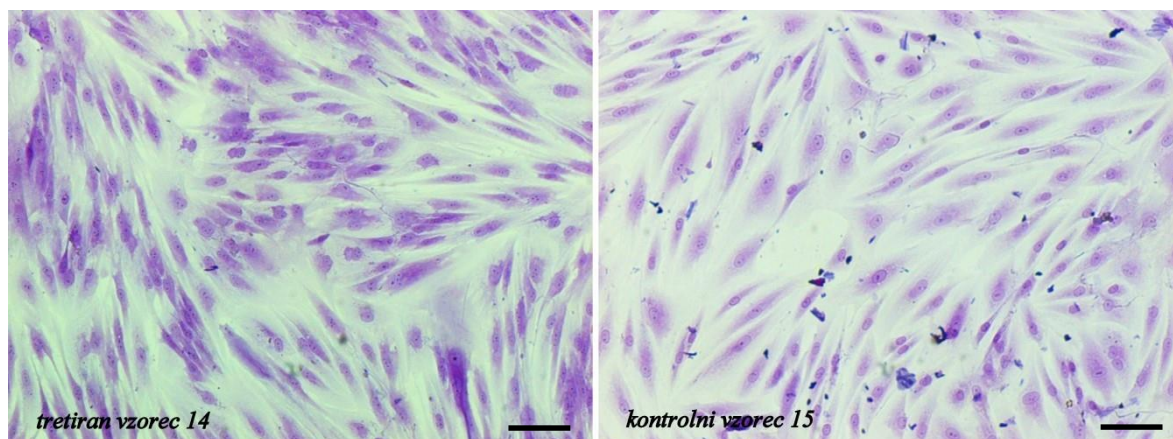
Slika 20 prikazuje izražanje označevalcev adipogene diferenciacije in primerjavo normalizacij v vzorcih 14 in 15.



Slika 20: Primerjava izražanja adipogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 14) in kontrolnim vzorcem (vzorec 15). Grafi A in B: normalizacija na GAPDH; grafi C in D: normalizacija na tri referenčne gene (3 RG: GUSB, RPL13A in RPLP0).

Tretirani vzorec 14 je izražal 10-krat večjo količino FABP4 kot kontrolni vzorec 15. Tudi izražanje PPARG v tretiranem vzorcu je bilo opazno višje kot pri kontrolnem, vendar je bila razlika manjša. ADIPOQ se je pri tretiranem vzorcu zelo slabo izražal, pri kontrolnem vzorcu pa sploh ni nastal specifičen produkt za ta gen. Tukaj smo opazili majhno razliko v normalizaciji izražanja adipogenih označevalcev glede na število referenčnih genov. Izražanje vseh treh genov pri tretiranem vzorcu je bilo pri normalizaciji na tri referenčne gene za tretjino nižje kot pri normalizaciji na GAPDH. Izražanje vseh treh genov pri kontrolnem vzorcu pa je bilo enako pri obeh normalizacijah. Posebnost teh dveh vzorcev so tudi zelo nizke absolutne vrednosti izražanja vseh treh genov, kar je lahko tudi vzrok za večje razlike pri obeh načinih normalizacije.

Rezultati barvanja z *Oil Red O* so pri obeh vzorcih dali negativno obarvanje (slika 21). Do nastanka maščobnih kapljic ni prišlo niti v tretiranem niti v kontrolnem vzorcu.

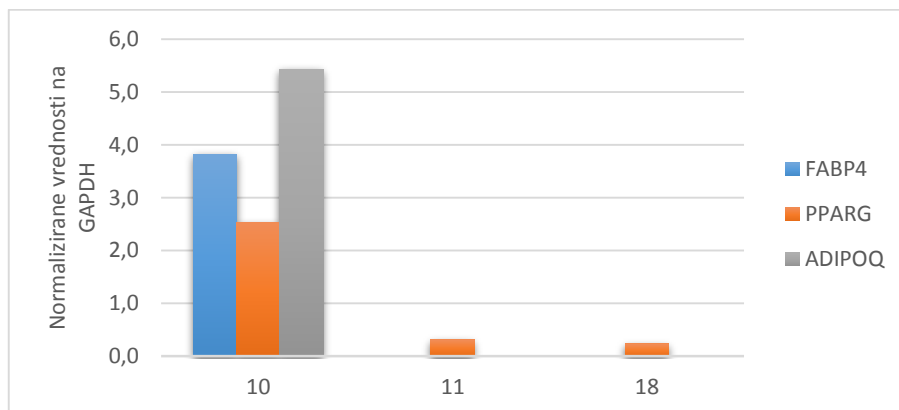


Slika 21: Barvanje tretiranega (vzorec 14) in kontrolnega vzorca (vzorec 15) z *Oil Red O*. Črna črta predstavlja 100 μm .

Podobno kot pri vzorcih 5 in 6 ter 8 in 9 so tudi tukaj vrednosti izražanja posameznih označevalcev zelo nizke v primerjavi z vzorci, kjer je bila diferenciacija uspešna. Zato smo sklepali, da tu diferenciacija v adipocite ni potekla. Naš zaključek so potrdili še rezultati barvanja z barvilom *Oil Red O*, saj ni prišlo do nastanka maščobnih kapljic.

Kot kontrolo diferenciacije MMSC smo ves čas uporabljali vzporedne kontrolne vzorce, ki jih nismo izpostavili adipogenem mediju. Vključili smo še dodatno negativno kontrolo in to je vzorec 18, ki predstavlja BMSC. BMSC prav tako nismo izpostavili adipogenem mediju. Primerjava tretiranega vzorca 10 s kontrolnim vzorcem 11 in negativno kontrolo – vzorcem 18, je pokazala, da imata obe kontroli enako izražanje FABP4, PPARG in ADIPOQ (slika 22). Izražanje teh genov je bilo pri tretiranem vzorcu opazno (10-krat) večje. Vrednosti smo

normalizirali zgolj na en referenčni gen, zaradi porabljene količine RNA, izolirane iz vzorca 18.



Slika 22: Primerjava izražanja adipogenih označevalcev pri tretiranem vzorcu (vzorec 10), kontrolnem vzorcu (vzorec 11) in negativni kontroli (vzorec 18).

Dodatno kontrolo so predstavljale BMSC, za katere velja, da jih z gojenjem v adipogenem mediju lahko diferenciramo v adipocite (42). Pri merjenju izražanja adipogenih označevalcev v teh celicah pa smo opazili osnovno izražanje tudi v primeru, ko celic ne diferenciramo. To izražanje je bilo zelo podobno izražanju v netretiranih MMSC. Tako kot netretirani vzorec 11 tudi vzorec BMSC ni izražal ADIPOQ. S takšno primerjavo smo tudi potrdili specifičnost FABP4, PPARG, in ADIPOQ kot izbranih adipogenih označevalcev za oceno sposobnosti diferenciacije MMSC v adipogeno linijo in dokazali, da imajo MMSC ter BMSC, gojene v osnovnem mediju, enako izražanje adipogenih označevalcev. Seveda bi za potrditev tega odkritja bilo potrebno takšno primerjavo izvesti na več vzorcih BMSC.

Pri vseh parih tretiranih in kontrolnih vzorcev smo opazili, da se v kontrolnem vzorcu ADIPOQ sploh ni izražal. V tretiranem vzorcu pa je bilo njegovo izražanje primerljivo z izražanjem FABP4 in PPARG. ADIPOQ je gen, ki se izraža samo v maščobnem tkivu, vključen je v metabolizem oz. razgradnjo maščobnih kislin ter hormonske procese (43). Glede na rezultate izražanja in njegovo vlogo v organizmu lahko sklepamo, da je ADIPOQ res eden izmed tistih specifičnih označevalcev za dokazovanje uspešnega razvoja v adipocite. V nasprotju z izražanjem ADIPOQ pa se je PPARG izražal v vseh tretiranih in kontrolnih vzorcih, s tem da je bilo izražanje v kontrolnih vzorcih manjše. Gen za PPARG nosi zapis za jedrni receptor in predstavlja glavni regulator adipocitne diferenciacije (44). Iz naših rezultatov merjenja izražanja tega gena lahko sklepamo, da nizko izražanje ni dovolj za nastanek adipocitov, saj ni prišlo do nastanka maščobnih kapljic. FABP4 predstavlja transportni protein za maščobne kisline ter sodeluje pri njihovem metabolizmu (45). Tudi

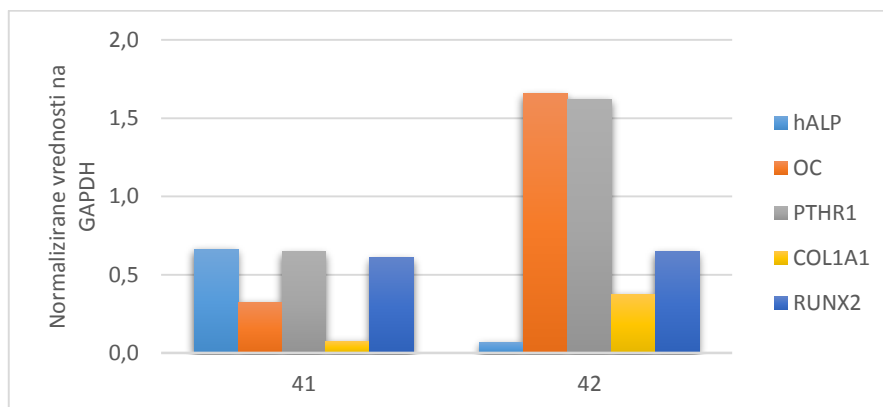
FABP4 je v kontrolnih vzorcih izkazoval minimalno osnovno izražanje, ki pa je precej manjše od izražanja PPARG v kontrolnih vzorcih.

Rezultati primerjav normalizacije izražanja adipogenih označevalcev na en in na tri referenčne gene pri večini vzorcev niso pokazali razlike. Razmerje izražanja posameznega označevalca med tretiranim in kontrolnim vzorcem se je namreč ohranilo, ne glede na to, koliko referenčnih genov smo uporabili za normalizacijo. Iz tega lahko sklepamo, da je GAPDH zadosten za normalizacijo izražanja adipogenih označevalcev MMSC. Rezultat je pomemben, saj na ta način privarčujemo tako z vzorci cDNA kot tudi z uporabljenimi reagenti za qPCR.

4.5.2 Izražanje označevalcev osteogene diferenciacije

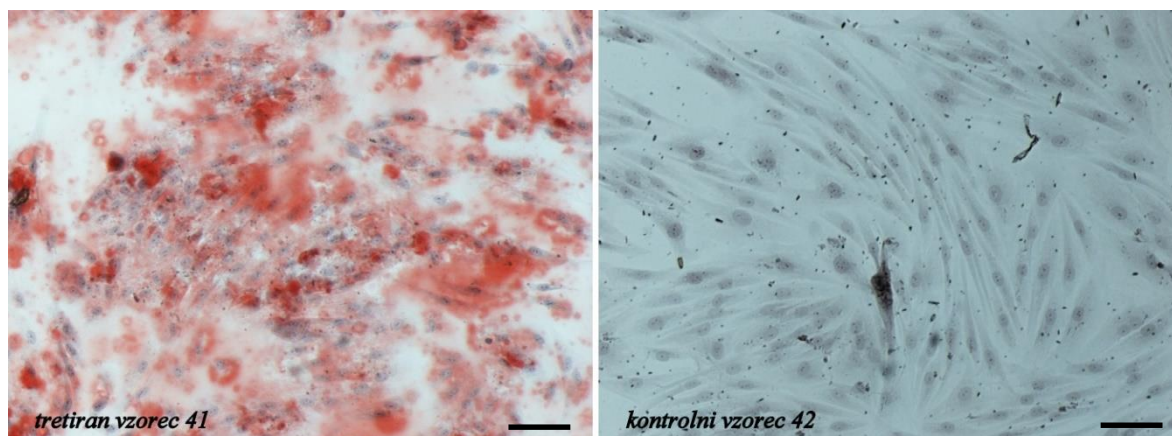
Sposobnost osteogene diferenciacije MMSC smo preverili z merjenjem petih osteogenih označevalcev na 10 vzorcih diferenciranih in kontrolnih celic. Vzorci so bili odvzeti od preiskovancev z osteoartrazo ali *post mortem*.

Vzorec 41 predstavlja izražanje osteogenih označevalcev pri celicah, gojenih v osteogenem mediju, vzorec 42 je njegova kontrola (slika 23). Samo hALP se je v tretiranem vzorcu izražala z 10-kratno razliko glede na kontrolni vzorec, vsi ostali geni pa so se v tretiranem vzorcu izražali celo v manjši količini kot v kontrolnem vzorcu. Normalizacijo izražanja smo izvedli samo na GAPDH, ker zaradi porabljene količine RNA iz vzorca 41 nismo mogli izmeriti izražanja referenčnih genov RPL13A in RPLP0.



Slika 23: Primerjava izražanja osteogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 41) in kontrolnim vzorcem (vzorec 42).

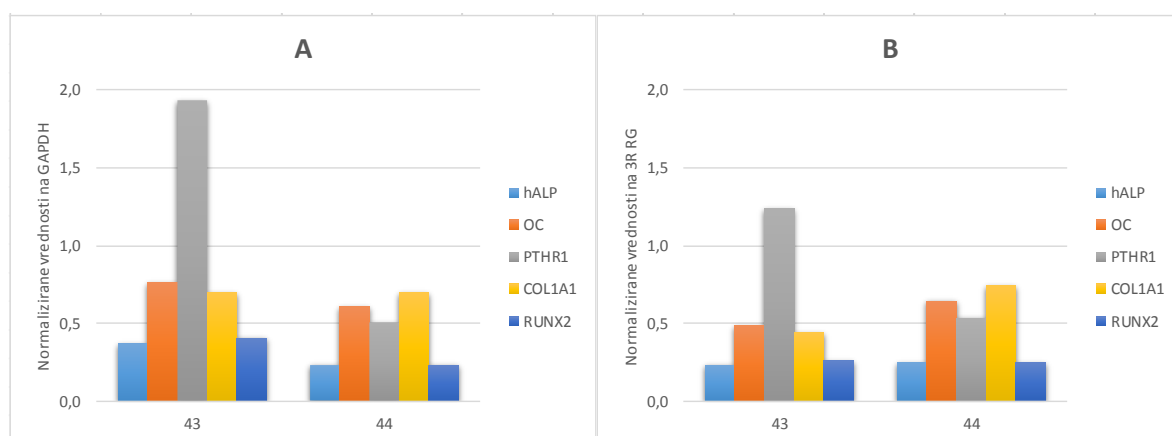
Po barvanju z barvilom *Alizarin Red S* smo v vzorcu 41 dobili samo nespecifično rdeče obarvanje, ne pa tudi temnih lis, ki so pokazatelj prisotnosti kalcijevih depozitov (slika 24).



Slika 24: Barvanje tretiranega (vzorec 41) in kontrolnega vzorca (vzorec 42) z *Alizarin Red S*. Črna črta predstavlja 100 µm.

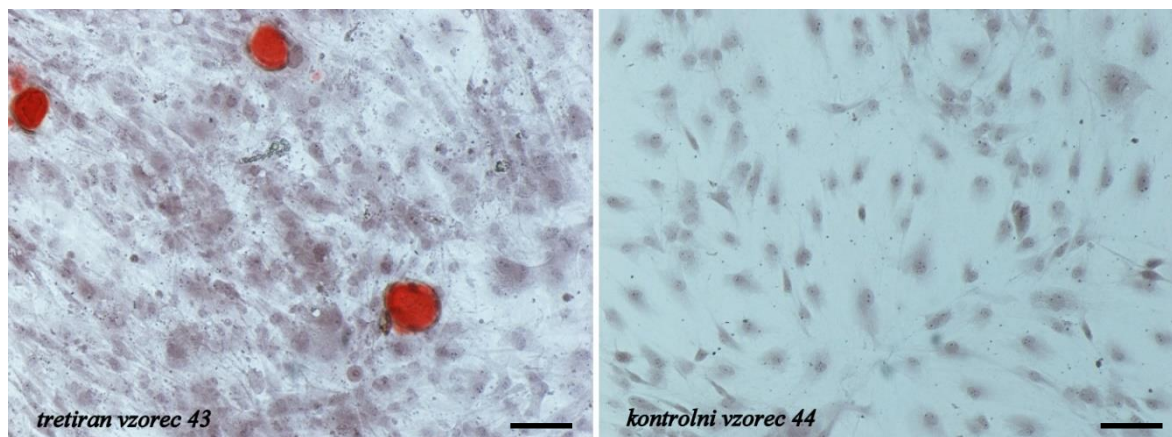
Kljub temu, da je bil gen za hALP, ki kodira alkalno fosfatazo, povečan v tretiranem vzorcu, to ni zadosten znak osteogene diferenciacije, kar smo potrdili tudi z rezultati histokemijskega barvanja z barvilom *Alizarin Red S*. Alkalna fosfataza s svojo aktivnostjo odceplja fosfate, ki nato s prisotnim kalcijem v kosti tvorijo kalcijev hidroksiapatit oz. tako imenovane kalcijeve depozite, kar opredeljujemo kot proces mineralizacije (46).

Izražanje petih označevalcev osteogene diferenciacije v tretiranem vzorcu 43 ni bilo večje od izražanja v kontrolnem vzorcu 44 (slika 25). Samo PTHR1 je imel v tretiranem vzorcu 2- do 3-krat večje izražanje v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Glede normalizacije ni bilo zelo očitnih razlik, vendar so se osteogeni označevalci v malo večji meri izražali pri normalizaciji na GAPDH, če primerjamo samo tretirane vzorce. Izražanje pri kontrolah pa je bilo pri obeh normalizacijah enako.



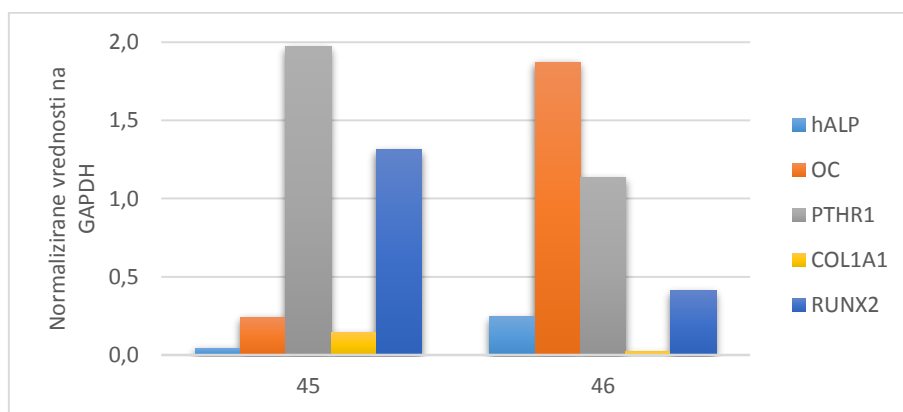
Slika 25: Primerjava izražanja osteogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 43) in kontrolnim vzorcem (vzorec 44). Graf A: normalizacija na GAPDH; graf B: normalizacija na tri referenčne gene (3 RG: GAPDH, RPL13A in RPLP0).

Barvanje z barvilom *Alizarin Red S* je pri obeh vzorcih dokazalo, da osteogena diferenciacija ni potekla, saj ni bilo vidnih kalcijevih depozitov (slika 26). S tem smo potrdili, da zgolj povečanje PTHR1 ni zadosten pokazatelj osteogeneze na nivoju izražanja genov.



Slika 26: Barvanje tretiranega (vzorec 43) in kontrolnega vzorca (vzorec 44) z *Alizarin Red S*. Črna črta predstavlja 100 µm.

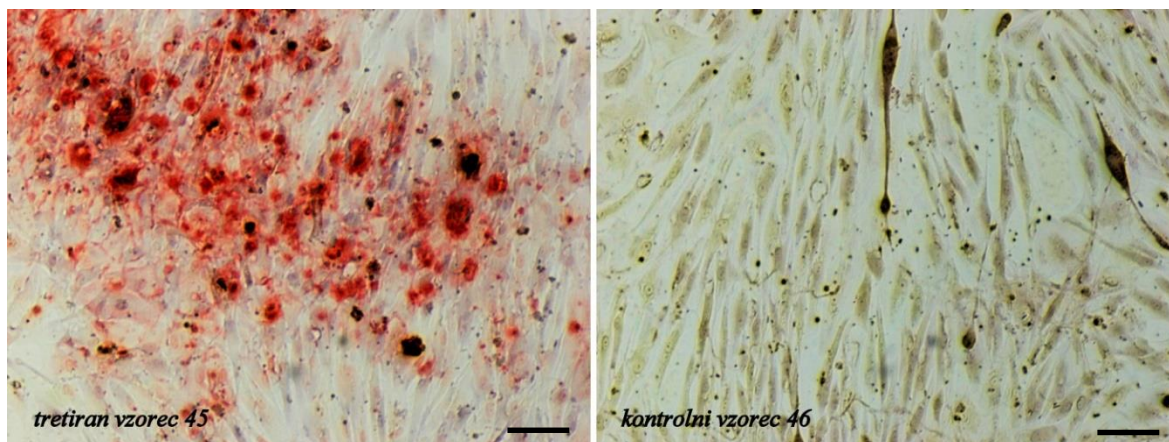
Na sliki 27 so predstavljeni rezultati izražanja osteogenih označevalcev, ki smo jih dobili pri vzorcih 45 in 46. V tretiranem vzorcu 45 se je hALP izražala 6-krat manj, OC pa 8-krat manj kot v kontrolnem vzorcu 46. Ostali trije geni so se v tretiranem vzorcu izražali bolj kot v kontrolnem vzorcu, in sicer PTHR1 z enkratno razliko, gen za alfa 1 verigo kolagena tipa 1 (COL1A1) s 7-kratno razliko in RUNX2 s 3-kratno razliko. Izražanje smo normalizirali le na GAPDH, ker smo porabili vso RNA, izolirano iz vzorca 46.



Slika 27: Primerjava izražanja osteogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 45) in kontrolnim vzorcem (vzorec 46).

Barvanje z *Alizarin Red S* je v tretiranem vzorcu pokazalo obarvanje, ki bi ga lahko opredelili kot šibko pozitivnega, ker je obarvanje kalcijevih depozitov, kot temnih lis, premalo intenzivno in premalo obširno (slika 28). V kontrolnem vzorcu do obarvanja ni prišlo. Z

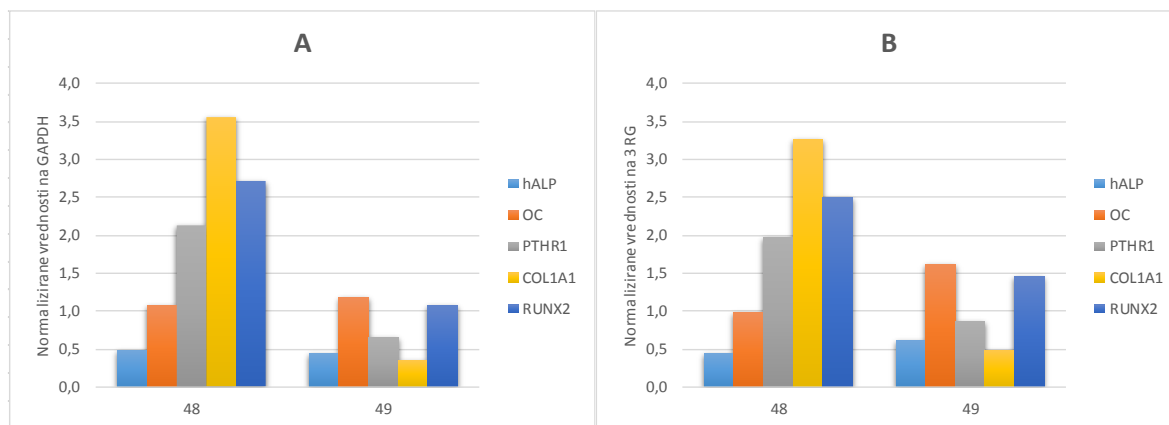
rezultati izražanja osteogenih genov in histokemijskega barvanja, smo nato zaključili, da je v vzorcu 45 osteogena diferenciacija potekla le v nizkem obsegu.



Slika 28: Barvanje tretiranega (vzorec 45) in kontrolnega vzorca (vzorec 46) z Alizarin Red S. Črna črta predstavlja 100 μ m.

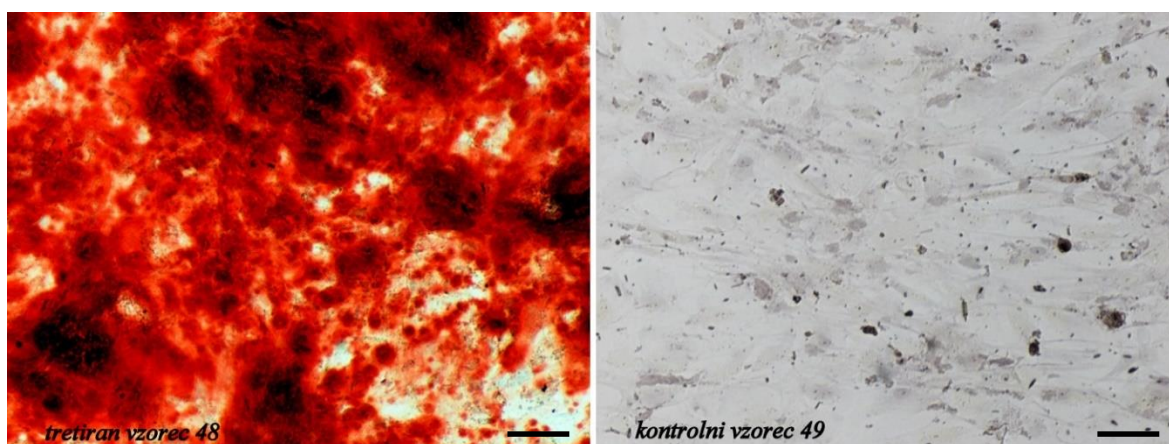
Neuspešni rezultati izražanja označevalcev v vzorcih so lahko posledica različnih vzrokov. Med njimi je npr. dejstvo, da do uspešne diferenciacije ne more priti, če po izolaciji celic iz tkiva z gojitvenim medijem nismo uspeli vzdrževati multipotentnosti MMSC. Tu je ključnega pomena izbrani osnovni gojitveni medij, brez dodatkov, ki spodbujajo diferenciacijo. Vpliva lahko na sposobnost celične rasti in na odzivnost celic na diferenciacijo (47). Populacija MSC obsega subpopulacije celic na različnih stopnjah diferenciacije (od več- do enopotentnih MSC) (7), kar je zopet možna razlaga, zakaj smo pri določenem vzorcu dosegli uspešno diferenciacijo, v drugem pa ne. Uspešna osteogena diferenciacija lahko poteče v prisotnosti multipotentnih celic, sposobnih razvoja v adipogeno, hondrogeno in osteogeno linijo, ali prisotnosti prednic osteogene linije, ne pa prednic npr. zgolj adipogene linije.

Izražanje osteogenih označevalcev smo preverili tudi v odvisnosti od deleža kisika. Tretirani vzorec 48 in kontrolni vzorec 49 smo izpostavili hipoksičnim pogojem (5 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C). Rezultati so pokazali enako izražanje hALP in OC v obeh vzorcih, medtem ko je bilo izražanje PTHR1, COL1A1 in RUNX2 večje v tretiranem vzorcu (slika 29). Pri normalizaciji na GAPDH je bilo izražanje PTHR1 3-krat večje, COL1A1 10-krat večje in izražanje RUNX2 2-krat večje v tretiranem vzorcu. Pri normalizaciji na tri referenčne gene so bile razlike malo manjše. Izražanje PTHR1 je bilo 2-krat večje, COL1A1 6-krat večje, izražanje RUNX2 pa le 1,7-krat večje. Ker so bile te razlike v izražanju med normalizacijama tako majhne, jih lahko pripišemo sami variabilnosti izvedbe reakcije qPCR.



Slika 29: Primerjava izražanja osteogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 48) in kontrolnim vzorcem (vzorec 49) v hipoksiji. Graf A: normalizacija na GAPDH; graf B: normalizacija na tri referenčne gene (3 RG: GAPDH, RPL13A in RPLP0).

Z barvanjem z barvilom *Alizarin Red S* smo v tretiranem vzorcu opazili zelo močno pozitivno obarvanje kalcijevih depozitov, vidnih kot velike temne lise. Pozitivnega obarvanja v kontrolnem vzorcu ni bilo (slika 30).

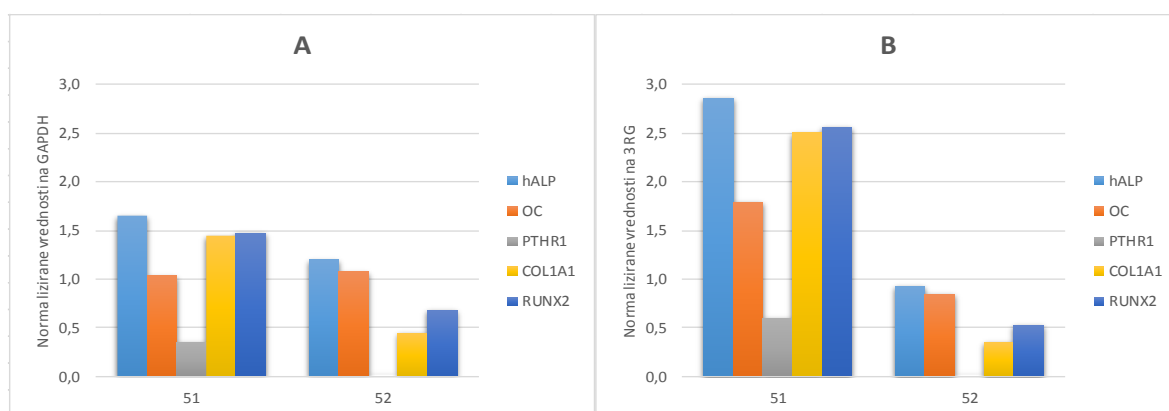


Slika 30: Barvanje tretiranega (vzorec 48) in kontrolnega vzorca (vzorec 49) z *Alizarin Red S*. Črna črta predstavlja 100 μm .

Na podlagi izražanja PTHR1, COL1A1 in RUNX2 in predvsem pozitivnega histokemijskega obarvanja smo osteogeno diferenciacijo v hipoksičnih pogojih v vzorcu 48 opredelili kot uspešno. Študija, ki je med drugim proučevala tudi vpliv hipoksije na osteogeni potencial, je dokazala, da hipoksija poveča proliferacijo MSC in njihovo sposobnost za osteogeno diferenciacijo (48). Obravnavala je sicer zajčje MSC in vpliv hipoksije je dokazala v primerjavi z vzorcem v normoksiji. Druga študija pa je vpliv hipoksije proučevala na humanih MSC in osteogeni diferenciacijski potencial preverjala s kontrolnimi in tretiranimi vzorci tako v normoksiji kot v hipoksiji (49). Dokazali so, da je osteogeneza v hipoksiji zelo zavirana v primerjavi z normoksijo. Vendar pa je primerjava

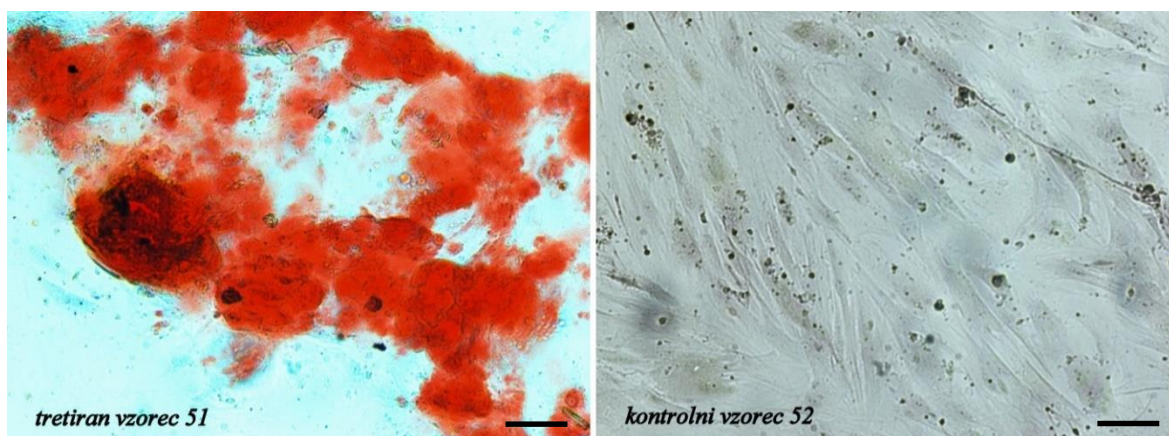
kontrole in tretiranega vzorca v hipoksiji, to je primerjava, kakršno smo izvedli tudi mi v naši nalogi, v tretiranem vzorcu pokazala prav tako povečano izražanje osteogenih označevalcev.

Tretirani vzorec 51 je izražal 3-krat večjo količino hALP, 2-krat večjo količino OC, 7-krat večjo količino COL1A1 in 5-krat večjo količino RUNX2 kot kontrolni vzorec 52 (slika 31). PTHR1 se v kontrolnem vzorcu ni izražal. Četudi so razlike v izražanju genov med vzorcema majhne, lahko sklepamo, da je osteogena diferenciacija v vzorcu 51 potekla. Navedene razlike v izražanju so v tem primeru opazne le pri normalizaciji na tri referenčne gene, kajti pri normalizaciji na GAPDH so razlike med tretiranim vzorcem in kontrolo veliko manjše.



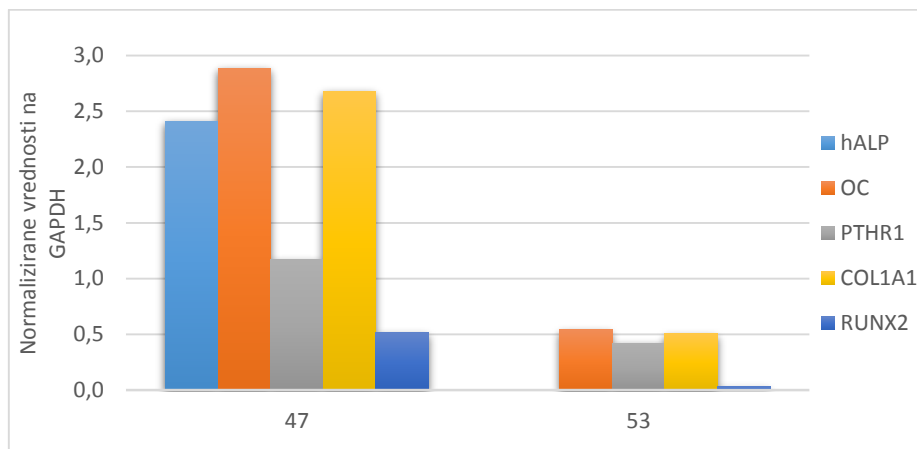
Slika 31: Primerjava izražanja osteogenih označevalcev med tretiranim (vzorec 51) in kontrolnim vzorcem (vzorec 52). Graf A: normalizacija na GAPDH; graf B: normalizacija na tri referenčne gene (3 RG: GAPDH, RPL13A in RPLP0).

Barvilo *Alizarin Red S* je v tretiranem vzorcu obarvalo nastale kalcijeve depozite, v kontrolnem vzorcu pa do obarvanja ni prišlo (slika 32), s čimer smo potrdili naš prejšnji sklep in uspešnost osteogeneze.



Slika 32: Barvanje tretiranega (vzorec 51) in kontrolnega vzorca (vzorec 52) z *Alizarin Red S*. Črna črta predstavlja 100 µm.

Izvedli smo tudi primerjavo izražanja osteogenih označevalcev med osteoblasti in BMSC (slika 33).



Slika 33: Primerjava izražanja osteogenih označevalcev med osteoblasti (vzorec 47) in BMSC (vzorec 53).

Izražanje OC in COL1A1 v osteoblastih je bilo 5-krat večje, PTHR1 skoraj 3-krat večje in RUNX2 več kot 10-krat večje kot v BMSC. Izražanje je bilo ustrezno višje pri osteoblastih, saj so osteoblasti diferencirane celice, ki naj bi osteogene označevalce izražale v večji meri kot pa BMSC. S tem smo še na enem nivoju primerjav potrdili specifičnost izbranih osteogenih označevalcev za oceno sposobnosti diferenciacije MMSC v osteogeno linijo. Tu je sicer potrebno poudariti, da smo primerjali osteoblaste in BMSC različnih pasaž. Za boljšo oceno primerjave izražanja bi morali primerjati celice na nivoju istih pasaž, ali pa preveriti, kako se spreminja izražanje osteogenih označevalcev v odvisnosti od pasaže, kakor smo tudi storili pri izražanju miogenih označevalcev. Izražanja hALP v BMSC nismo izmerili zaradi porabljene RNA, izolirane iz vzorca 53. Iz istega razloga tudi nismo izmerili izražanja referenčnih genov RPL13A in RPLP0, zato smo izražanje genov v vzorcih normalizirali le na GAPDH.

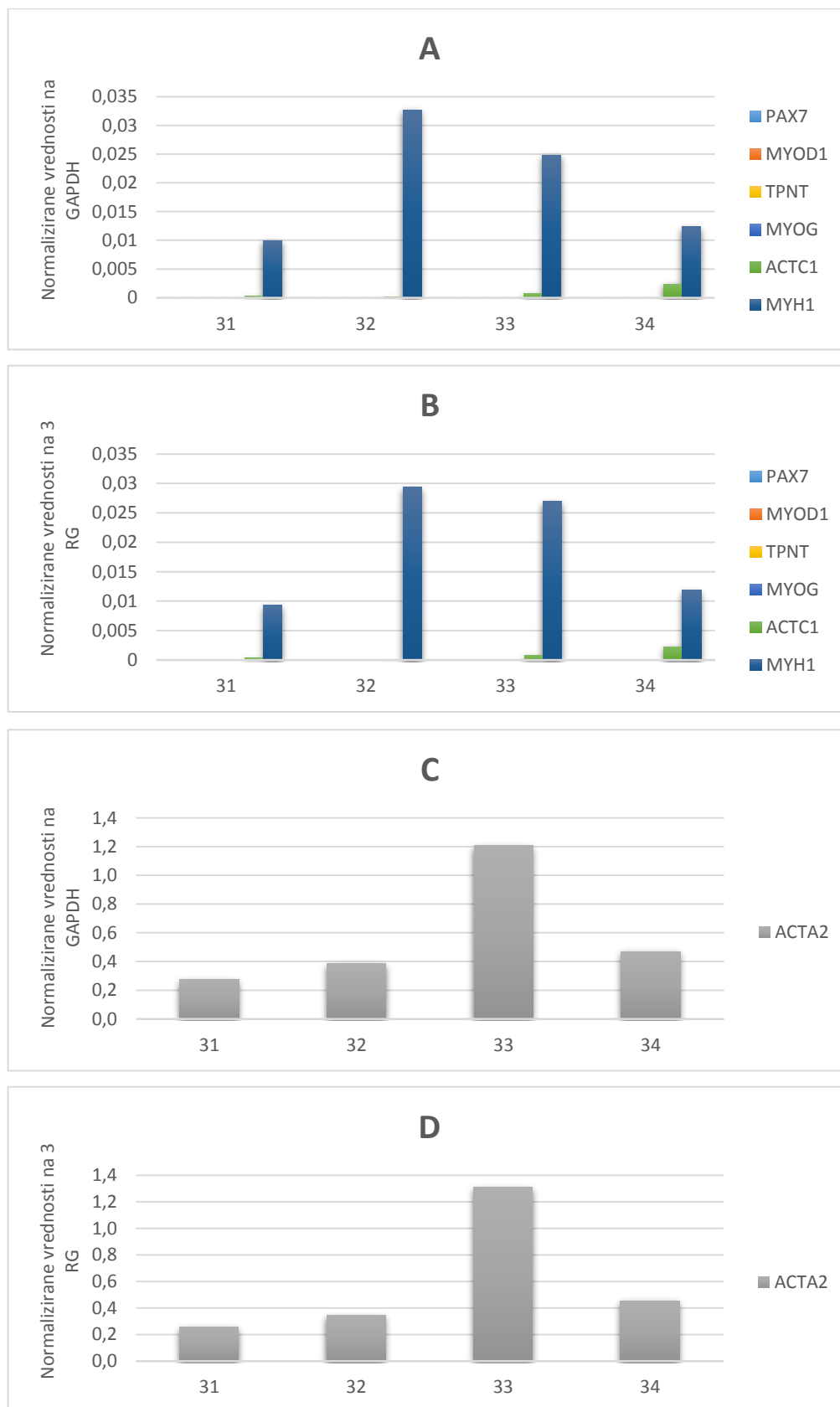
Znano je, da med adipogeno in osteogeno linijo obstaja določena plastičnost v smislu prepletanja signalnih poti (42). V naši nalogi nismo preverjali izražanja adipogenih označevalcev pri osteogenezi in obratno, a so že dokazali, da so nekateri adipogeni in osteogeni označevalci premalo linijsko specifični (42). Izbrani trije označevalci adipogene diferenciacije in izbranih pet osteogenih označevalcev so se v naši nalogi izkazali za specifične. Tudi mnoge druge študije uporabljajo za merjenje adipogene in osteogene diferenciacije ravno te označevalce (10, 12, 22, 47).

V skupini osteogenih označevalcev pri treh parih vzorcev nismo mogli primerjati normalizacije na en in na tri referenčne gene zaradi porabljene RNA iz vzorcev. Pri vzorcih 48 in 49 smo opazili, da se razlika v izražanju označevalcev med tretiranimi in kontrolnimi celicami malo bolje izrazi pri normalizaciji na GAPDH, vendar je bila ta razlika premajhna, da bi normalizacijo na GAPDH opredelili kot boljšo. Pri vzorcih 51 in 52 pa smo opazili, da se je razlika med tretiranimi in kontrolnimi celicami bolje pokazala pri normalizaciji na tri referenčne gene. Zaradi premalo vzorcev žal ne moremo posplošiti, da je izražanje označevalcev osteogene diferenciacije bolje normalizirati na tri referenčne gene kot samo na enega. Za potrditev bi morali izvesti še več takšnih primerjav na več vzorcih.

4.5.3 Izražanje označevalcev miogene diferenciacije

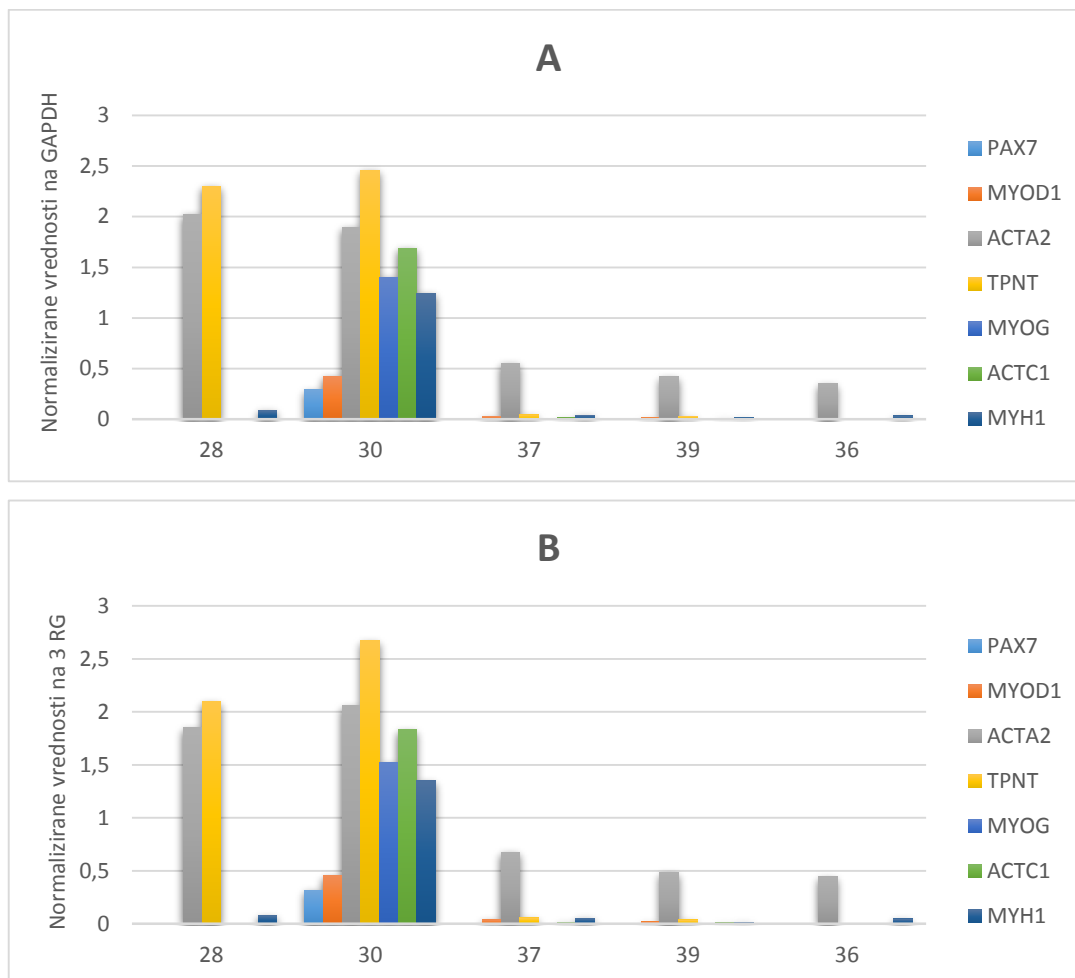
Merjenje izražanja miogenih označevalcev smo izvedli na 15 vzorcih.

Rezultati izražanja genov miogene diferenciacije so prikazani na sliki 34. Preizkusili smo tri različne postopke miogene diferenciacije. Posamezno diferenciacijo predstavljajo vzorci 31, 32 in 33, vzorec 34 pa je služil kot njihova kontrola. Na tri različne diferenciacije so se MMSC odzvale zgolj z izražanjem ACTA2, MYH1 in ACTC1, ostali geni se v teh vzorcih niso izražali. Izražanje teh treh genov se glede na kontrolni vzorec ni povečalo za več kot 3-krat, nasprotno je bilo izražanje v nekaterih vzorcih tudi manjše kot v kontrolnem vzorcu. Glede normalizacije nismo opazili razlik v izražanju med tretiranimi vzorci in njihovo kontrolo. Normalizirane vrednosti izražanja so bile majhne in glede na to, da tretirani vzorci niso izražali glavnega transkripcijskega dejavnika PAX7, potrebnega za usmeritev v miogenezo, smo zaključili, da miogena diferenciacija MMSC ni potekla.



Slika 34: Primerjava izražanja miogenih označevalcev med tretiranimi vzorci 31, 32 in 33 ter kontrolnim vzorcem 34. Grafa A in C: normalizacija na GAPDH; grafa B in D: normalizacija na 3 referenčne gene (3 RG: ACTB, GAPDH in RPL13A).

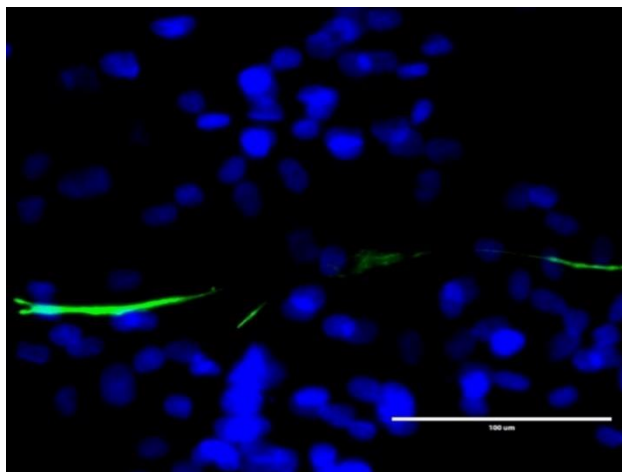
Izvedli smo tudi primerjavo vzorcev MMSC istih preiskovancev v različnih pasažah (slika 35). Vzorci RNA so bili odvzeti iz celic, ki smo jih gojili v osnovnem mediju za MMSC.



Slika 35: Primerjava izražanja miogenih označevalcev med različnimi pasažami MMSC in BMSC. Vzorec 28: MMSC p0; vzorec 30: MMSC p1; vzorec 37: MMSC p2; vzorec 39: MMSC p3; vzorec 36: BMSC p0. Graf A: normalizacija na GAPDH; graf B: normalizacija na 3 referenčne gene (3 RG: ACTB, GAPDH in RPL13A).

Vzorci 28, 30, 37 in 39 predstavljajo nediferencirane MMSC pasaže 0, 1, 2 in 3 istega preiskovanca z osteoartrito. Opazovali smo izražanje izbranih miogenih označevalcev in ga primerjali z izražanjem v vzorcu 36, ki predstavlja BMSC. Vzorec 36 nam je torej služil kot negativna kontrola, saj se v BMSC miogeni označevalci ne izražajo oz. imajo le osnovno izražanje, kot smo to dokazali pri optimizaciji oligonukleotidnih začetnikov za miogene označevalce. V vzorcih 28 in 30 smo dobili podobno izražanje ACTA2 in TPNT, medtem ko je njuno izražanje v vzorcih 37 in 39 padlo. Ostali geni, PAX7, MYOD1, MYOG, ACTC1 in MYH1 so samo v vzorcu 30 izkazali visoko izražanje, medtem ko so se ti geni v ostalih vzorcih, vključno z vzorcem 36, izražali podobno ali pa izražanja ni bilo.

Za vzorec 30 smo nastanek mišičnega vlakna preverili z imunofluorescenco za desmin, ki predstavlja intracelularni protein, specifičen za mišice (slika 36). Eden od pokazateljev nastanka novega mišičnega vlakna je lahko tudi povečano izražanje gena MYH1, saj to pomeni tvorbo miozina.

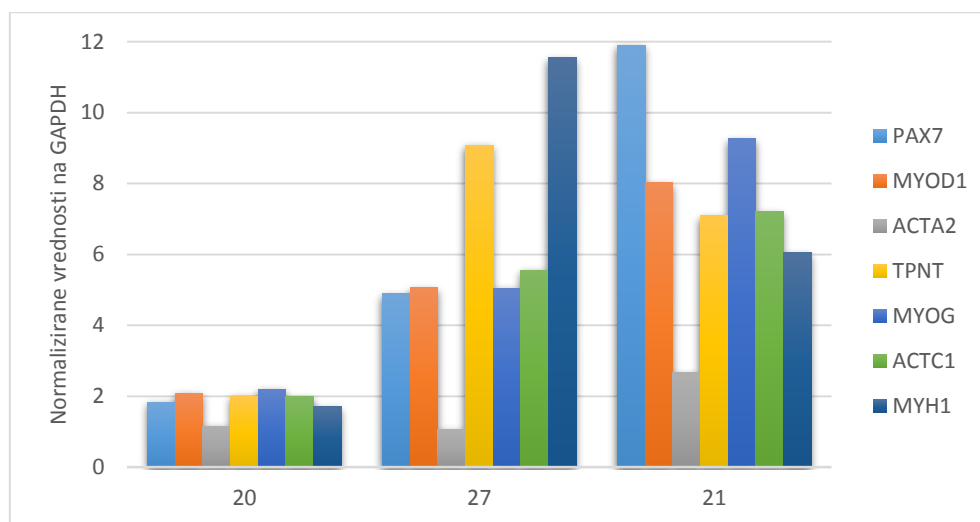


Slika 36: Desmin v vzorcu 30 (zeleno obarvani intracelularni protein), kot dokaz uspešne miogene diferenciacije MMSC. Bela črta predstavlja 100 μ m.

Iz slike 35 je razvidno, da so se miogeni označevalci v začetnih pasažah dobro izražali, kasneje, s kultivacijo v pogojih *in vitro*, pa je to izražanje padlo. Pri izolaciji MMSC iz skeletne mišice skoraj vedno dobimo heterogeno kulturo, sestavljeno iz različnih subpopulacij mišičnih matičnih celic kot tudi mišičnih celic (miocitov) na različnih stopnjah zrelosti (11). Mogoče je večje začetno izražanje miogenih genov posledica tega, da smo zraven MMSC izolirali tudi že zrele miocite, ki imajo izražanje teh genov seveda večje kot MMSC. Zrele celice se manj delijo in med gojenjem kmalu odmrejo (11). To bi lahko bila ena izmed razlag, zakaj smo potem opazili padec izražanja genov v poznejših pasažah. Kot je razvidno iz slike 35, normalizacija na različno število referenčnih genov ni vplivala na rezultate izražanja.

Na sliki 37 je predstavljeno izražanje miogenih označevalcev v odvisnosti od naraščajoče pasaže v pogojih *in vitro*. Vzorci 20, 27 in 21 so pridobljeni *post mortem* iz celic istega preiskovanca in predstavljajo pasaže 0, 1 in 2. Rezultati so pokazali, da izražanje vseh sedmih genov iz nižje v višjo pasažo narašča. Povečanje izražanja je postopno, namreč gre za od 2- do skoraj 7-kratno povečanje izražanja posameznih genov. Ti rezultati so ravno v nasprotju z rezultati, ki smo jih prikazali na sliki 35 in so lahko posledica razlik med MMSC pri osteoartritozi in pri nepatološkem mišično-skeletnem vzorcu. Možno je, da pri osteoartritozi

z naraščajočimi pasažami izražanje miogenih označevalcev pada, brez prisotnosti osteoartroze pa njihovo izražanje narašča. Vsekakor bi bilo potrebno to teorijo preizkusiti na več vzorcih. Normalizacijo smo izvedli samo na GAPDH zaradi porabljene količine RNA, izolirane iz vzorca 20.

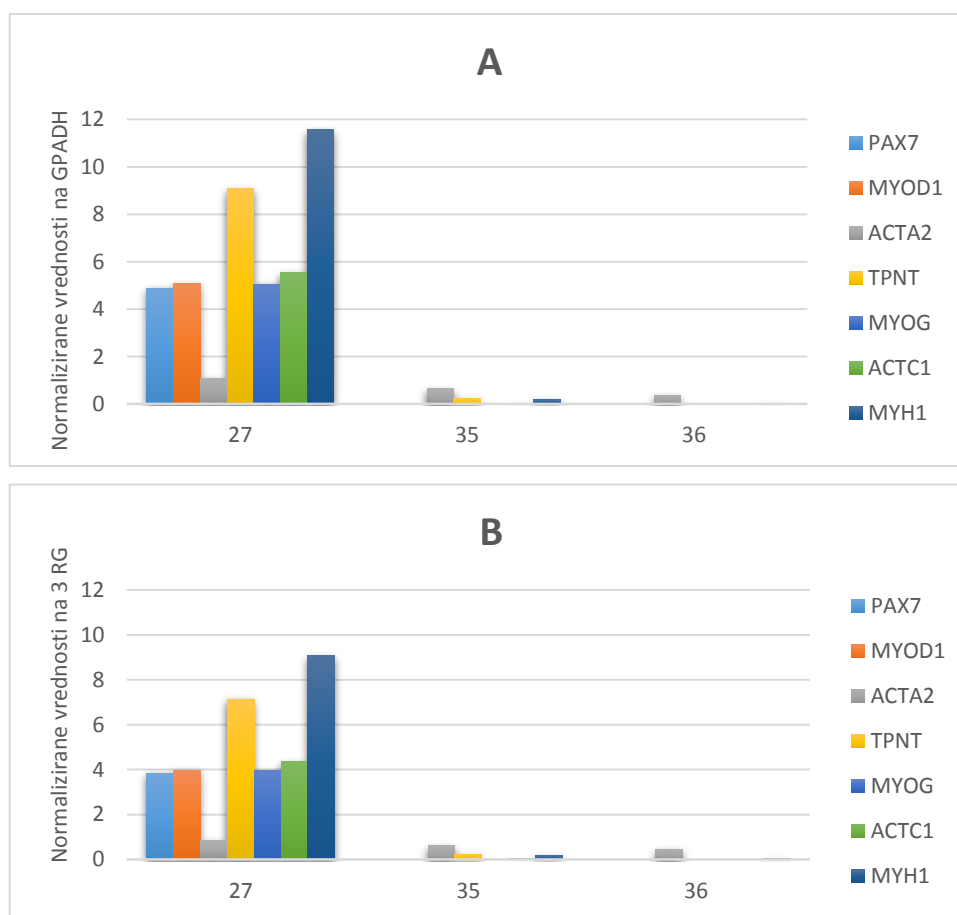


Slika 37: Primerjava izražanja miogenih označevalcev v različnih pasažah MMSC. Vzorec 20: MMSC p0; vzorec 27: MMSC p1; vzorec 21: MMSC p2.

Dokazali so, da je subpopulacija MMSC, imenovana satelitne celice, sposobna diferenciacije v adipocite, osteocite in miocite, vendar te sposobnosti nimajo vse satelitne celice. Namreč odkrili so, da adipogene in miogene satelitne celice predstavljata različni populaciji satelitnih celic, kljub temu da obe populaciji izražata tako PAX7 kot tudi PPARG (21). Adipogena diferenciacija na dveh parih tretiranih in kontrolnih vzorcev (5 in 6 ter 8 in 9) ni bila uspešna, prav tako na dveh parih tretiranih in kontrolnih vzorcev (41 in 42 ter 45 in 46) ni bila uspešna osteogena diferenciacija. Te vzorce smo pridobili od istega preiskovanja. V skupini miogenih označevalcev smo od tega preiskovanja imeli 3 vzorce, in sicer vzorec 20, 21 ter 27, ki so predstavljeni na sliki 37. Pri teh vzorcih smo opazili visoko in s pasažo naraščajoče izražanje vseh sedmih označevalcev miogene diferenciacije. Iz tega smo sklepali, da smo v teh vzorcih iz skeletne mišice preiskovanja najverjetneje izolirali satelitne celice in to tisto populacijo, ki je sama po sebi usmerjena v razvoj miocitov. Žal imunofluorescence za desmin, ki bi dokazovala nastanek mišičnega vlakna nismo izvedli, vendar pa smo potrdili negativen rezultat adipogeneze in osteogeneze z uporabo histokemijskega barvanja na vzorcih tega preiskovanja. Na sliki 14, kjer smo vzorca 5 in 6 barvali z barvilom *Oil Red O*, pa smo opazili tvorbo oz. združitve domnevno diferenciranih satelitnih celic v mišično vlakno, kar potrjuje našo razlago. Torej smo v teh vzorcih najverjetneje res imeli satelitne

celice, ki so bile usmerjene zgolj v razvoj miocitov in je bil posledično razvoj adipocitov ter osteoblastov, kljub gojenju v diferenciacijskih pogojih, nemogoč. Heterogenost v smislu miogenega in nemiogenega razvojnega potenciala satelitnih celic je in ostaja predmet mnogih raziskav, vedno več pa je podatkov, da so satelitne celice v prvi vrsti predane miogenezi (21).

V nadaljnje smo se osredotočili na primerjavo izražanja miogenih označevalcev med MMSC in BMSC, odvzetih od preiskovancev z osteoartrozo, osteoporozo in *post mortem*. Celice, iz katerih smo pridobili vzorce, smo gojili v osnovnem mediju za MMSC. Vzorec 27, ki predstavlja MMSC pasaže 1, smo primerjali z dvema vzorcema BMSC pasaže 3 in 0 – vzorcem 35 in vzorcem 36 (slika 38).

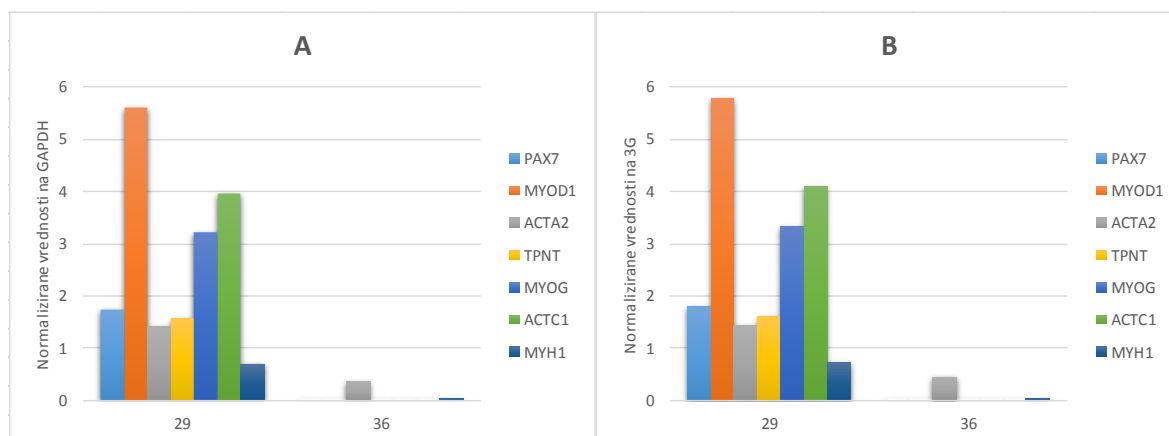


Slika 38: Primerjava izražanja miogenih označevalcev med MMSC (vzorec 27) in BMSC (vzorci 35 in 36). Vzorec 27: MMSC p1; vzorec 35: BMSC p3; vzorec 36: BMSC p0. Graf A: normalizacija na GAPDH; graf B: normalizacija na 3 referenčne gene (3 RG: ACTB, GAPDH in RPL13A).

Izražanje vseh sedmih miogenih označevalcev je bilo pri MMSC najmanj 10-krat večje kot pri obeh BMSC, z izjemo izražanja ACTA2, ki se je pri vseh treh vzorcih izražal podobno. Pri vzorcih BMSC do nastanka nekaterih specifičnih produktov sploh ni prišlo, tisti geni, ki

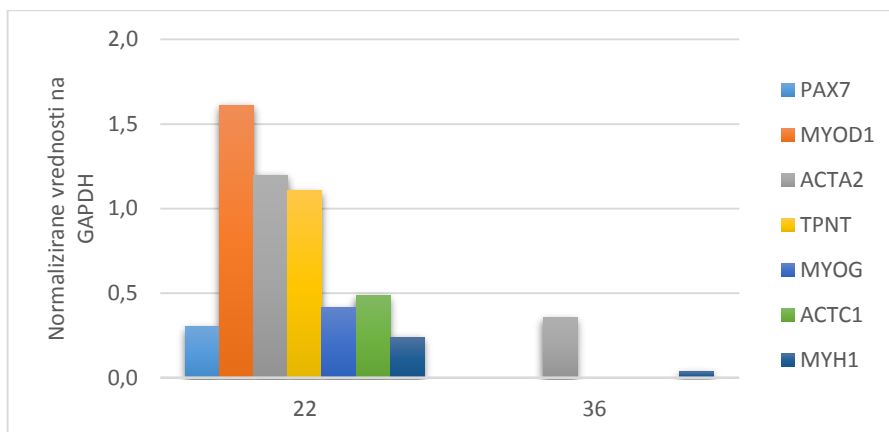
pa so se pomnožili, so imeli zelo nizko izražanje. Rezultati so pokazali veliko razliko v izražanju miogenih označevalcev med MMSC in BMSC. Tu je potrebno poudariti, da so v to primerjavo vključeni vzorci različnih pasaž in bi za ustrežnejšo oceno izražanja bilo potrebno primerjati vzorce MMSC in BMSC istih pasaž. V prejšnjih poizkusih smo sicer dokazali, da izražanje miogenih označevalcev z naraščajočo pasažo tudi narašča (slika 37). Obe normalizaciji sta dali enake rezultate izražanja.

Primerjavo nediferenciranih MMSC in BMSC smo izvedli še na dveh vzorcih MMSC, in sicer na nivoju istih pasaž (slika 39). Vsi miogeni označevalci, razen ACTA2, so se pri vzorcu 29, ki predstavlja MMSC pasaže 0, izražali z več kot 10-kratno razliko v primerjavi z vzorcem 36, ki predstavlja BMSC pasaže 0. Izražanje PAX7, MYOD1, TPNT, MYOG, ACTC1 je bilo opazno večje, saj se ti geni pri vzorcu 36 sploh niso izražali. Razmerja izražanja genov med vzorcema MMSC in BMSC se niso spremenila v odvisnosti od števila referenčnih genov, uporabljenih za normalizacijo.



Slika 39: Primerjava izražanja miogenih označevalcev med MMSC (vzorec 29) in BMSC (vzorec 36). Vzorec 29: MMSC p0; vzorec 36: BMSC p0. Graf A: normalizacija na GAPDH; graf B: normalizacija na 3 referenčne gene (3 RG: ACTB, GAPDH in RPL13A).

Podobno kot pri vzorcu 29 smo dokazali tudi pri vzorcu 22 (slika 40). Tudi te MMSC pasaže 0 so izražale večjo količino miogenih označevalcev v primerjavi z BMSC pasaže 0 (vzorcem 36), vendar je bilo to izražanje v primerjavi z vzorcem 29 manjše. Rezultate izražanja vzorca 22 smo zaradi porabljene količine RNA normalizirali le na GAPDH.



Slika 40: Primerjava izražanja miogenih označevalcev med MMSC (vzorec 22) in BMSC (vzorec 36). Vzorec 22: MMSC p0; vzorec 36: BMSC p0.

Vzorca 29 in 22 sta prav tako potrdila, da je izražanje izbranih miogenih označevalcev res večje pri MMSC. Vzorec BMSC pa je pokazal zgolj minimalno izražanje le teh.

Z izvedenimi primerjavami izražanja v vzorcih MMSC in BMSC smo dokazali in potrdili specifičnost izbranih miogenih označevalcev ter odkrili, da imajo MMSC večje osnovno izražanje miogenih označevalcev kot BMSC. Za primerjavo smo imeli zgolj dva vzorca BMSC, zato bi bilo za potrditev te teorije potrebno pridobiti več vzorcev tako MMSC kot tudi BMSC.

Rezultati primerjave normalizacije izražanja miogenih označevalcev na en in na tri referenčne gene so pri vseh vzorcih, kjer smo primerjavo lahko izvedli, dokazali, da sta si normalizaciji enakovredni. V nobenem primeru pri normalizaciji ni prišlo do razlik v izražanju miogenih označevalcev med tretiranimi in kontrolnimi vzorci, kot tudi ne med vzorci MMSC in BMSC.

5 SKLEP

V okviru rezultatov magistrske naloge smo prišli do zaključka, da so MMSC multipotentna populacija celic, ki jih lahko diferenciramo v celice mezodermalne linije, predvsem v adipocite in osteoblaste. Naši rezultati potrjujejo dokaze predhodnih objav o sposobnosti diferenciacije MMSC.

Če povzamemo rezultate, lahko prvo hipotezo delno potrdimo, delno pa ovržemo:

1. Po procesih adipogene in osteogene diferenciacije MMSC obstajajo razlike v izražanju specifičnih genov za določeno linijo med tretiranimi in kontrolnimi celicami. Po procesu miogene diferenciacije MMSC razlik v izražanju miogenih označevalcev med tretiranimi in kontrolnimi vzorci nismo opazili, vzrok pa je najverjetneje v neuspešnem postopku miogeneze.

Drugo in tretjo hipotezo lahko v celoti potrdimo:

2. Med rezultati izražanja genov, specifičnih za adipogeno in osteogeno diferenciacijo, in rezultati histokemijskega barvanja MMSC obstaja pozitivna povezava.
3. Normalizacija izražanja genov adipogene, osteogene in miogene diferenciacije na en referenčni gen daje enake rezultate kot normalizacija na tri referenčne gene.

V tej nalogi smo uspešno optimizirali metodo qPCR za kvantifikacijo adipogeneze in osteogeneze. Namreč diferenciaciji MMSC v adipocite in osteoblaste sta bili uspešni, kar smo preverili in potrdili tudi z rezultati histokemijskih barvanj. Ti so bili namreč v pozitivni povezavi s povečanim izražanjem specifičnih označevalcev tako pri adipogenezi kot pri osteogenezi. Žal pa miogeneza MMSC v naši nalogi ni bila uspešna, zato bo za slednjo potrebno ustrezne postopke še optimizirati oz. razviti nov postopek miogene diferenciacije. Rezultati normalizacij izražanja so pokazali, da je za ustrezne rezultate izražanja adipogenih, osteogenih in miogenih označevalcev dovolj že normalizacija na GAPDH. Ta ugotovitev bo imela pomemben vpliv na delo v prihodnje, saj na ta način lahko privarčujemo tako pri vzorcih kot tudi pri reagentih za qPCR.

6 LITERATURA

1. Maličev E, Jež M: Terapevtska biotehnologija – učbenik za vaje, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana, 2014: 5-17, 21-26.
2. Rožman P, Strbad M, Kneževič M: Uporaba matičnih celic v medicini. V: Genialna prihodnost: genetika, determinizem in svoboda. Mednarodni posvet Biološka znanost in družba, Ljubljana, 4. in 5. oktober 2007. Strgulc-Krajšek S, Popit T, Vičar M (ur.), Zavod Republike Slovenije za šolstvo, Ljubljana, 2007: 202-212. Dostopno na: <https://www.zrss.si/bzid/geni/posnetki.htm>.
3. Jež M, Veber M, Rožman P: Pluripotentne matične celice v embrionalnem razvoju in pri odraslem. *Farm Vestn* 2012; 63: 305-311.
4. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V: Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008; 8 (9): 726-736.
5. James AW: Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation. *Scientifica (Cairo)* 2013; 2013: 684736.
6. Sacchetti B, Funari A, Remoli C, Giannicola G, Kogler G, Liedtke S, Cossu G, Serafini M, Sampaolesi M, Tagliafico E, Tenedini E, Saggio I, Robey PG, Riminucci M, Bianco P: No identical "mesenchymal stem cells" at different times and sites: Human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels. *Stem Cell Reports* 2016; 6 (6): 897-913.
7. Baksh D, Song L, Tuan RS: Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004; 8 (3): 301-316.
8. DiMarino AM, Caplan AI, Bondfield TL: Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol* 2013; 4:201.
9. Rožman P, Jež M: Matične celice in napredno zdravljenje (zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo) – Pojmovnik. Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije, Ljubljana 2010. Dostopno na: <http://www.dctis.si/publikacije> (dostopano: november 2017)
10. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R: Gene expression and protein secretion during human mesenchymal cell differentiation into adipogenic cells. *BMC Cell Biol* 2014; 15:46.

11. Zupan J, Čamernik K, Jeras M, Barlič A, Drobnič M, Marc J: Mezenhimske matične celice: uporaba in potencial za zdravljenje ter diagnostiko mišično-skeletnih bolezni. *Farm Vestn* 2017; 68: 234-247.
12. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V: Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 2007; 53 (2): 121-127.
13. Almalki SG, Agrawal DK: Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation* 2016; 92 (1-2): 41-51.
14. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B: Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* 2006; 7:14.
15. Motohashi N, Asakura A: Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Front Cell Dev Biol* 2014; 2:1.
16. Latil M, Rocheteau P, Châtre L, Sanuli S, Mémet S, Ricchetti M, Tajbakhsh S, Chrétien F: Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. *Nat Commun* 2012; 3:903.
17. von Maltzahn J, Jones AE, Parks RJ, Rudnicki MA: Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110 (41): 16474-16479.
18. Brack AS, Rando TA: Tissue-specific stem cells: Lessons from the skeletal muscle satellite cell. *Cell Stem Cell* 2012; 10 (5): 504-514.
19. Wang YX, Dumont NA, Rudnicki MA: Muscle stem cells at a glance. *J Cell Sci* 2014; 127 (Pt 21): 4543-4548.
20. Jeras M: Celično in tkivno inženirstvo. v *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, 1. izd., Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 628-658.
21. Yin H, Price F, Rudnicki MA: Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 2013; 93 (1): 23-67.
22. Vettor R, Milan G, Franzin C, Sanna M, De Coppi P, Rizzuto R, Federspil G: The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297 (5): E987-E998.
23. Mencelj Bedrač S, Ostanek B, Mlakar V, Zupan J, Kocjan T, Preželj J, Marc J: Sodobni pogled na nastanek osteoporoze. *Farm Vestn* 2012; 63: 269-278.
24. Real-Time PCR: from theory to practice. *Invitrogen™* 2008.

25. Maheaswari R, Kshirsagar JT, Lavanya N: Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *J Indian Soc Periodontol* 2016; 20 (2): 128-135.
26. Kralik P, Ricchi M: A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol* 2017; 8:108.
27. Critical Factors for Successful Real-Time PCR. Real-Time PCR Brochure. Qiagen® 2010: 1-64.
28. Slanc P: Genska informacija in kako do nje. v *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. 1. izd., Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 26-66.
29. Repnik K, Potočnik U: *Genomika v biomedicinski tehnologiji: navodila za laboratorijske vaje*. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, 2013/2014.
30. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipely GL, Vandesompele J, Wittwer CT: The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55 (4): 611-622.
31. Piazza VG, Bartke A, Miquet JG, Sotelo AI: Analysis of different approaches for the selection of reference genes in RT-qPCR experiments: A case study in skeletal muscle of growing mice. *Int J Mol Sci* 2017; 18 (5): 1060.
32. Primer-BLAST. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
33. Scott MA, Nguyen VT, Levi B, James AW: Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2011; 20 (10): 1793-1804.
34. Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, Niibe K, Araki D, Suzuki S, Okano H, Matsuzaki Y: Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α . *Nat Protoc* 2012; 7 (12): 2103-2111.
35. Orriss IR, Hajjawi MO, Huesa C, MacRae VE, Arnett TR: Optimisation of the differing conditions required for bone formation in vitro by primary osteoblasts from mice and rats. *Int J Mol Med* 2014; 34 (5): 1201-1208.
36. Vater C, Kasten P, Stiehler M: Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 2011; 7 (2): 463-477.
37. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF: Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify

- genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004; 64 (15): 5245-5250.
38. qPCR Technical Guide. Sigma-Aldrich 2008.
39. Ragni E, Viganò M, Rebullà P, Giordano R, Lazzari L: What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. *J Cell Mol Med* 2013; 17 (1): 168-180.
40. Studer D, Lischer S, Jochum W, Ehrbar M, Zenobi-Wong M, Maniura-Weber K: Ribosomal protein L13a as reference gene for human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells during expansion, adipo-, chondro-, and osteogenesis. *Tissue Eng Part C Methods* 2012; 18 (10): 761-771.
41. Li X, Yang Q, Bai J, Xuan Y, Wang Y: Identification of appropriate reference genes for human mesenchymal stem cell analysis by quantitative real-time PCR. *Biotechnol Lett* 2015; 37 (1): 67-73.
42. Köllmer M, Buhrman JS, Zhang Y, Gemeinhart RA: Markers are shared between adipogenic and osteogenic differentiated mesenchymal stem cells. *J Dev Biol Tissue Eng* 2013; 5 (2): 18-25.
43. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9370> (dostopano: oktober 2017)
44. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5468> (dostopano: oktober 2017)
45. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2167> (dostopano: oktober 2017)
46. Valenti MT, Dalle Carbonare L, Mottes M: Osteogenic differentiation in healthy and pathological conditions. *Int J Mol Sci* 2016; 18 (1): 41.
47. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS: Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells* 2003; 21 (6): 681-693.
48. Huang J, Deng F, Wang L, Xiang XR, Zhou WW, Hu N, Xu L: Hypoxia induces osteogenesis-related activities and expression of core binding factor $\alpha 1$ in mesenchymal stem cells. *Tohoku J Exp Med* 2011; 224 (1): 7-12.
49. Cicione C, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete I, Díaz Prado S, Blanco FJ: Effects of severe hypoxia on bone marrow mesenchymal stem cells differentiation potential. *Stem Cells Int* 2013; 2013: 232896.

7 PRILOGE

7.1 Priloga 1: Vzorci cDNA, uporabljeni v magistrski nalogi.

Zaporedna številka	Oznaka vzorca	Vrsta celic	Patologija	Pasaža	Vir celic	Tip diferenciacije	Opombe
Adipogeni označevalci							
1	7	MMSC	OP	P4	mišično tkivo	adipo tretiran	Samo indukcija postopka za diferenciacijo
2	8	MMSC	OP	P4	mišično tkivo	adipo tretiran	Standardni postopek za diferenciacijo
3	10	MMSC	OA	P2	mišično tkivo	adipo tretiran	R
4	11	MMSC	OA	P2	mišično tkivo	adipo kontrola	R
5	12	MMSC	K	P1	mišično tkivo	adipo tretiran	R
6	13	MMSC	K	P1	mišično tkivo	adipo kontrola	R
7	14	MMSC	OA	P2	mišično tkivo	adipo tretiran	Brez encima RT
8	23	MMSC	K	P2	mišično tkivo	adipo tretiran	R
9	24	MMSC	K	P2	mišično tkivo	adipo kontrola	R
10	37	MMSC	OA	P0	mišično tkivo	adipo tretiran	R
11	38	MMSC	OA	P0	mišično tkivo	adipo kontrola	R
12	39	MMSC	OA	P3	mišično tkivo	adipo tretiran	
13	40	MMSC	OA	P3	mišično tkivo	adipo kontrola	
14	50	MMSC	K	P0	mišično tkivo	adipo tretiran	
15	51	MMSC	K	P0	mišično tkivo	adipo kontrola	
16	52	MMSC	OA	P1	mišično tkivo	adipo tretiran	

17	53	MMSC	OA	P1	mišično tkivo	adipo kontrola	
18	5	BMSC	OP	P3	kostno tkivo	adipo kontrola	
Miogeni označevalci							
19	1	MMSC	OA	P0	mišično tkivo	mio kontrola	R
20	2	MMSC	K	P0	mišično tkivo	mio kontrola	R
21	3	MMSC	K	P2	mišično tkivo	mio kontrola	
22	4	MMSC	OA	P0	mišično tkivo	mio kontrola	R
23	9	BMSC	OP	P3	kostno tkivo	mio kontrola	Brez encima RT
24	15	MMSC	K	P1	mišično tkivo	mio tretiran	R
25	16	MMSC	K	P1	mišično tkivo	mio tretiran	R
26	17	MMSC	K	P1	mišično tkivo	mio tretiran	R
27	18	MMSC	K	P1	mišično tkivo	mio kontrola	R
28	29	MMSC	OA	P0	mišično tkivo	mio kontrola	R
29	33	MMSC	K	P0	mišično tkivo	mio kontrola	
30	34	MMSC	OA	P1	mišično tkivo	mio kontrola	
31	45	MMSC	OA	P3	mišično tkivo	mio tretiran	R
32	46	MMSC	OA	P3	mišično tkivo	mio tretiran	R
33	47	MMSC	OA	P3	mišično tkivo	mio tretiran	R
34	48	MMSC	OA	P3	mišično tkivo	mio kontrola	R
35	5	BMSC	OP	P3	kostno tkivo	mio kontrola	
36	36	BMSC	OA	P0	kostno tkivo	mio kontrola	

37	41	MMSC	OA	P2	mišično tkivo	mio kontrola
38	42	MMSC	K	P0	mišično tkivo	mio kontrola
39	49	MMSC	OA	P3	mišično tkivo	mio kontrola

Osteogeni označevalci

40	6	OB	OP	P1	kostno tkivo	osteo pozitivna kontrola	
41	19	MMSC	K	P1	mišično tkivo	osteo tretiran	R
42	20	MMSC	K	P1	mišično tkivo	osteo kontrola	R
43	21	MMSC	OA	P2	mišično tkivo	osteo tretiran	R
44	22	MMSC	OA	P2	mišično tkivo	osteo kontrola	R
45	27	MMSC	K	P2	mišično tkivo	osteo tretiran	R
46	28	MMSC	K	P2	mišično tkivo	osteo kontrola	R
47	30	OB	K	P0	kostno tkivo	osteo pozitivna kontrola	
48	31	MMSC	OA	P1	mišično tkivo	osteo tretiran	R
49	32	MMSC	OA	P1	mišično tkivo	osteo kontrola	R
50	35	OB	OA	P0	kostno tkivo	osteo pozitivna kontrola	
51	43	MMSC	OA	P0	mišično tkivo	osteo tretiran	R
52	44	MMSC	OA	P0	mišično tkivo	osteo kontrola	R
53	5	BMSC	OP	P3	kostno tkivo	osteo kontrola	
54	36	BMSC	OA	P0	kostno tkivo	osteo kontrola	

Legenda: MMSC – mišične mezenhimske matične celice; BMSC – kostne mezenhimske matične celice; OB – osteoblasti; OP – osteoporoza; OA – osteoartroza; K – kontrola; RT – reverzna transkriptaza; P – pasaža; R – vzorci na katerih je bilo izmerjeno izražanje referenčnih genov

7.2 Priloga 2: Normalizirane vrednosti izražanja adipogenih označevalcev na GAPDH in na tri referenčne gene.

Zaporedna številka	Normalizirane vrednosti na GAPDH			Normalizirane vrednosti na 3 RG		
	FABP4	PPARG	ADIPOQ	FABP4	PPARG	ADIPOQ
1	1,28E-04	0,41	5,19E-04	1,73E-04	0,55	7,00E-04
2	0,06	1,12	0,22	0,10	1,78	0,35
3	0,98	0,99	0,83	0,91	0,92	0,77
4	9,58E-06	0,47	0	6,30E-06	0,31	0
5	5,50E-04	0,07	0	6,11E-04	0,08	0
6	1,38E-05	0,06	0	8,79E-06	0,04	0
8	1,57E-04	0,10	5,57E-05	1,53E-04	0,10	5,41E-05
9	8,59E-07	0,04	3,58E-04	5,26E-07	0,02	2,19E-04
10	3,82	2,52	5,43	3,28	2,16	4,66
11	3,15E-04	0,31	0	3,40E-04	0,33	0
12	1,45	1,75	1,24	1,50	1,80	1,28
13	1,06E-05	0,55	0	8,18E-06	0,42	0
14	4,65E-03	0,34	1,36E-04	2,91E-03	0,21	8,49E-05
15	8,54E-06	0,03	0	8,09E-06	0,03	0
16	1,12E-03	0,19	1,56E-04	1,27E-03	0,22	1,77E-04
17	3,79E-05	0,15	0	2,85E-05	0,11	0
18	2,47E-03	0,23	0	MP	MP	MP

MP: manjka podatek

7.3 Priloga 3: Normalizirane vrednosti izražanja osteogenih označevalcev na GAPDH in na tri referenčne gene.

Zaporedna številka	Normalizirane vrednosti na GAPDH					Normalizirane vrednosti na 3 RG				
	hALP	OC	PTHr1	COL1A1	RUNX2	hALP	OC	PTHr1	COL1A1	RUNX2
53	MP	0,54	0,42	0,51	0,03	MP	MP	MP	MP	MP
40	MP	3,21	1,25	0,88	0,17	MP	MP	MP	MP	MP
41	0,66	0,33	0,65	0,08	0,61	MP	MP	MP	MP	MP
42	0,07	1,66	1,62	0,38	0,65	0,07	1,70	1,66	0,39	0,66
43	0,37	0,77	1,93	0,70	0,41	0,23	0,49	1,24	0,45	0,26
44	0,23	0,60	0,50	0,70	0,23	0,25	0,64	0,54	0,75	0,25
45	0,04	0,24	1,97	0,14	1,31	0,09	0,49	3,97	0,29	2,64
46	0,24	1,87	1,13	0,02	0,41	MP	MP	MP	MP	MP
47	2,41	2,89	1,17	2,68	0,52	MP	MP	MP	MP	MP
48	0,49	1,06	2,13	3,55	2,71	0,45	0,98	1,96	3,27	2,50
49	0,45	1,18	0,64	0,36	1,06	0,61	1,61	0,87	0,49	1,45
50	0,12	1,67	12,04	0,29	1,63	MP	MP	MP	MP	MP
54	0,79	40,94	2,08	0,18	1,47	MP	MP	MP	MP	MP
51	1,65	1,03	0,34	1,44	1,47	2,86	1,79	0,60	2,51	2,56
52	1,19	1,08	0	0,45	0,68	0,92	0,84	0	0,35	0,53

MP: manjka podatek

7.4 Priloga 4: Normalizirane vrednosti izražanja miogenih označevalcev na GAPDH.

Normalizirane vrednosti na GAPDH							
Zaporedna številka	PAX7	MYOD1	ACTA2	TPNT	MYOG	ACTC1	MYH1
19	0	0	1,13	3,99	1,05E-04	1,40E-03	0,05
20	1,84	2,09	1,15	2,01	2,20	1,99	1,70
21	11,90	8,02	2,67	7,10	9,25	7,19	6,04
22	0,30	1,61	1,20	1,11	0,42	0,49	0,24
35	0	0	0,64	0,24	0	0,03	0,18
24	4,48	1,39	1,19	4,05	2,15	3,02	5,19
25	1,80	1,52	1,79	3,95	2,70	2,63	6,07
26	3,79	0,69	1,51	0,40	0,21	1,04	0,82
27	4,89	5,07	1,07	9,08	5,05	5,55	11,56
28	0	0	2,03	2,30	0	6,30E-04	0,09
29	1,75	5,61	1,40	1,56	3,23	3,97	0,70
30	0,29	0,42	1,90	2,46	1,40	1,69	1,25
36	0	0	0,36	0	0	0	0,04
37	0	0,03	0,55	0,05	0	0,01	0,04
38	0	0,12	2,96	0,18	0	0,18	0,32
31	0	0	0,27	0	0	3,30E-04	9,96E-03
32	0	0	0,38	0	0	1,03E-04	0,03
33	0	0	1,21	0	0	7,01E-04	0,02
34	0	0	0,47	0	0	2,35E-03	0,01
39	0	0,02	0,42	0,03	0	0,01	0,02

7.5 Priloga 5: Normalizirane vrednosti izražanja miogenih označevalcev na tri referenčne gene.

Normalizirane vrednosti na 3 RG							
Zaporedna številka	PAX7	MYOD1	ACTA2	TPNT	MYOG	ACTC1	MYH1
19	0	0	0,99	3,51	9,21E-05	0,00	0,05
20	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
21	9,52	6,42	2,14	5,68	7,40	5,76	4,83
22	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
35	0	0	0,60	0,22	0	0,02	0,16
24	4,18	1,29	1,11	3,77	2,01	2,82	4,84
25	1,76	1,49	1,76	3,87	2,65	2,57	5,96
26	3,60	0,65	1,43	0,38	0,20	0,99	0,78
27	3,84	3,98	0,84	7,14	3,96	4,36	9,08
28	0	0	1,85	2,10	0	0,00	0,08
29	1,80	5,77	1,45	1,61	3,32	4,09	0,72
30	0,32	0,46	2,06	2,67	1,52	1,83	1,35
36	0	0	0,44	0	0	0	0,05
37	0	0,04	0,68	0,06	0	0,02	0,05
38	0	0,10	2,31	0,14	0	0,14	0,25
31	0	0	0,26	0	0	3,10E-04	9,35E-03
32	0	0	0,34	0	0	9,28E-05	0,03
33	0	0	1,31	0	0	7,61E-04	0,03
34	0	0	0,45	0	0	2,27E-03	0,01
39	0	0,02	0,48	0,04	0	0,01	0,02

MP: manjka podatek