

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA PAVLIN

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017 / 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA PAVLIN

**PRIMERJAVA PROFILOV IZRAŽENIH GENOV MED RAZLIČNIMI
GENERACIJAMI PRIMARNIH OSTEOLASTOV, GOJENIH *IN VITRO*
GENE EXPRESSION PROFILES COMPARISON BETWEEN DIFFERENT
GENERATIONS OF PRIMARY OSTEOLASTS CULTURED *IN VITRO***

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017 / 2018

Magistrsko delo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Tilna Kranjca, mag. farm. Vzorec so odvzeli na Ortopedski bolnišnici Valdoltra v Ankaranu. Primarne kulture humanih osteoblastov je po odvzemu pripravil asist. Klemen Čamernik, mag. farm. Merjenje izražanja genov s pomočjo mikromrež so za nas opravili na podjetju Macrogen v Seoulu v Južni Koreji.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Janji Marc za pomoč in strokovno vodenje pri izdelavi magistrske naloge ter vso znanje, ki sem ga pridobila skozi leta, in somentorju asist. dr. Tilnu Kranjcu za pomoč, posvečen čas, prilagodljivost, potrpežljivost in vzpodbudo pri izdelavi magistrske naloge. Zahvala gre tudi zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo za pogoje za izdelavo magistrske naloge ter pomoč in strokovne nasvete. Zahvaljujem pa se tudi mojim najbližjim, domačim in prijateljem, ki so me vzpodbujali in verjeli vame ves čas študija in mi tako pomagali, da sem dosegla zastavljene cilje.

IZJAVA

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

Tjaša Pavlin

Komisija za oceno in zagovor naloge:

-predsednik komisije: Izr. prof. dr. Mitja Kos, mag. farm.

-član komisije: Doc. dr. Stane Pajk, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	VII
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD.....	1
1.1. STARANJE CELIC	1
1.2. TELOMERE	4
1.2.1. Struktura in vloga telomer	4
1.2.2. Vzdrževanje dolžine telomer	5
1.2.3. Telomere v povezavi s staranjem in boleznimi	6
1.3. STARANJE KOSTNEGA TKIVA	7
1.3.1. Sestava in remodelacija kosti	7
1.3.2. Mehanizmi staranja kosti.....	9
1.4. MERJENJE IZRAŽANJA GENOV Z UPORABO MIKROMREŽ.....	11
2. NAMEN DELA	14
3. METODE.....	15
3.1. ODVZEM VZORCA IN PRIPRAVA PRIMARNIH KULTUR HUMANIH OSTEOBLASTOV	15
3.2. PRIPRAVA IN GOJENJE CELIC	16
3.3. IZOLACIJA RNA IZ CELIC S KOMPLETOM PEQGOLD TOTAL RNA KIT.....	17
3.4. MERJENJE KONCENTRACIJE RNA Z NANODROPOM.....	18
3.5. MERJENJE IZRAŽANJA GENOV Z MIKROMREŽAMI	19
4. REZULTATI	20

4.1.	GOJENJE PRIMARNIH OSTEOLASTOV	20
4.2.	IZOLACIJA IN MERJENJE KONCENTRACIJE RNA	21
4.3.	MERJENJE IZRAŽANJA GENOV	23
4.3.1.	Geni z nižjim izražanjem med staranjem osteoblastov med generacijama G3 in G4.....	28
4.3.2.	Geni z višjim izražanjem med staranjem osteoblastov med generacijama G3 in G4.....	32
4.3.3.	Spremembe v izražanju nekodirajočih RNA.....	35
4.4.	GO ANALIZA PROFILA IZRAŽENIH GENOV V PRIMARNIH OSTEOLASTIH	42
5.	RAZPRAVA.....	46
5.1.	IZOLACIJA, MERJENJE KONCENTRACIJE IN KONTROLA KAKOVOSTI RNA.....	46
5.2.	SPREMENJENO IZRAŽANJE GENOV V POVEZAVI S CELIČNIM STARANJEM	46
5.3.	SPREMENJENO IZRAŽANJE GENOV V POVEZAVI Z DELOVANJEM IN STAROSTNIMI SPREMEMBAMI KOSTI.....	52
5.4.	SPREMEMBE, KI VPLIVAJO NA KVALITETO CELIČNEGA MODELA....	53
6.	SKLEP	54
7.	LITERATURA	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura telomere in telomerase. Prirejeno po [24].	5
Slika 2: Shematski prikaz kostne remodelacije. Prirejeno po [40].	8
Slika 3: Shematski prikaz postopka mikromreže pri izvedbi z dvema vzorcema. Prirejeno po [47].	12
Slika 4: Primarni osteoblasti generacije G0 pri 40x povečavi.	21
Slika 5: Rezultati GO analize kategorije biološki proces.	43
Slika 6: Rezultati GO analize kategorije molekularna funkcija.	44
Slika 7: Rezultati GO analize kategorije celična komponenta.	45

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Količine in volumni RNA vzorcev za analizo.	19
Preglednica II: Rezultati merjenja koncentracije RNA.	22
Preglednica III: Geni, katerih izražanje se zniža ali zviša za več kot 2-krat med generacijama primarnih osteoblastov G3 in G4.	24
Preglednica IV: Podatki o RNA, katerih izražanje se zniža ali zviša za več kot 2-krat med generacijama primarnih osteoblastov G3 in G4.	36

POVZETEK

Celično staranje vključuje različne spremembe pri signaliziranju, celičnem transportu, delovanju mitohondrijev, proteostazi, strukturi celic in celičnih komponentah, najpomembnejši dejavnik staranja pa je senescenca povzročena zaradi krajšanja telomer. Staranje celic lahko vpliva na njihovo funkcijo in število in posledično določene s starostjo povezane bolezni, pri raziskavah pa lahko vpliva na kvaliteto celičnega modela. V procesu celičnega staranja pride tudi do spremenjenega izražanja genov. Z uporabo mikromrež, ki temeljijo na hibridizaciji vzorca na vezana zaporedja na čipu, smo želeli izmeriti spreminjanje genov pri različnih generacijah primarnih osteoblastov. Po pripravi kultur različnih generacij primarnih osteoblastov smo izolirali RNA posameznih vzorcev, jim izmerili koncentracije in jih poslali na analizo z mikromrežami. GO analiza različno izraženih genov je pokazala, da je večina njihovih produktov udeleženih pri signaliziranju preko receptorske aktivacije, transportu, vezavi in odzivu na stimulacijo iz okolice in so del celične membrane. Nekaj pa jih bilo tudi genov, katerih produkti so udeleženi pri drugih procesih celičnega staranja npr. pri spremembah proteostaze (metaloproteinaza 13), organizacije celičnega matriksa (fibrilin 2), nadzoru celičnega cikla (WD ponovitev 63), ohranjanju dolžine telomer (cinkov prst 676), ohranjanju funkcije matičnih celic (podenota 27 mediatorskega kompleksa) in mitohondrijskega delovanja (metaloproteinaza 3) ter geni, katerih produkti so nekodirajoče RNA (miRNA 488, miRNA 4328, ki delujeta tudi v kosteh). Produkti nekaterih drugače izraženih genov pa vplivajo na staranje kosti preko različnih mehanizmov (cinkov prst 657, ki je regulator osteoklastne diferenciacije in WD ponovitev 63, ki je udeležena pri diferenciaciji osteoblastov).

Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da je celično staranje najverjetneje posledica sprememb v delovanju signaliziranja celic in celične membrane, vpliv pa imajo tudi nekateri drugi mehanizmi.

Ključne besede: Staranje, telomere, ekspresija genov, mikromreže, osteoblasti

ABSTRACT

Cellular ageing includes various changes in signalling, cellular transport, mitochondrial activity, proteostasis, cell structure, and cellular components, but the most important factor of ageing is the senescence as the result of telomere shortening. Cellular ageing can influence cell function or numbers and, consequently, certain ageing-associated diseases, as well as the quality of the cell model in research. During the process of cellular ageing, gene expression is altered. With the use of microarrays that are based on the hybridization of the sample with the sequences bound to the chip, we wanted to measure the expression of genes in various generations of primary osteoblasts. After the preparation of primary osteoblast cultures of various generations, we were able to isolate the RNA of individual samples, determine its concentrations, and send the samples off for microarray analysis. GO analysis of differently expressed genes showed that the majority of their products are a part of the cell membrane and participate in transport, binding, the response to stimulus and signalling through receptor activation. However, we also found genes that have products which participate in other processes of cellular ageing for example changes in proteostasis (metaloproteinase 13), cell matrix organization (fibrillin 2), cell cycle control (WD repeat 63), telomere length conservation (zinc finger 676), stem cell function (mediator complex subunit 27), mitochondria function (metaloproteinase 3) and those that produce non-coding RNA (for example miRNA 488 and 4328, that have some function in bones). The products of some differently expressed genes influence bone ageing by means of various mechanisms (zinc finger 657, which regulates osteoclast differentiation and WD repeat 63, which regulates osteoblast differentiation).

Based on our results, we can conclude, that cell aging is at least in some way a consequence of changes in cell signalling and cell membrane and some other mechanisms might also play a part in that process.

Key words: Aging, telomeres, gene expression, microarray, osteoblasts

SEZNAM OKRAJŠAV

A: adenin

bp: bazni par

ATP: adenzin trifosfat (*ang. adenosine triphosphate*)

BCR: B-celični receptor

BMP: kostni morfogenetski proteini (*ang. bone morphogenetic proteins*)

cAMP: ciklični adenzin monofosfat (*ang. cyclic adenosine monophosphate*)

cDNA: komplementarna deoksiribonukleinska kislina

CTGF: rastni dejavnik vezivnega tkiva (*ang. connective tissue growth factor*)

DMEM: medij za celice (*ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO: dimetil sulfoksid

DNA: deoksiribonukleinska kislina

FBS: fetalni goveji serum (*ang. Fetal bovine serum*)

FGF: fibroblastni rastni dejavnik (*ang. fibroblast growth factor*)

G: gvanin

HLA: sistem human levkocitnih antigenov (*ang. Human leukocyte antigens*)

IL-10: interlevkin 10

IL-29: interlevkin 29

INFL-1: interferon lambda 1

JAK: janus kinaza

KMC: krvotvorne (hematopoetske) matične celice

LncRNA: dolga nekodirajoča RNA (*ang. long non-coding RNA*)

MiRNA: mikro RNA

MKG: mineralna kostna gostota

MMC: mezenhimske matične celice

mRNA: informacijska ribonukleinska kislina (*ang. messenger RNA*)

OPG: osteoprotegerin

OSX: osteoblastno specifični transkripcijski faktor Osterix (*ang. osteoblast-specific transcription factor Osterix*)

PBS: fosfatni pufer (*ang. Phosphate buffered saline*)

POT1: protein, ki ščiti telomere (*ang. Protection of telomeres 1 protein*)

RANK: receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (*ang. receptor activator of nuclear factor κ B*)

RANKL: ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (*ang. receptor activator of nuclear factor κ B ligand*)

RNA: ribonukleinska kislina

RNAze: ribonukleaze

RNS: reaktivne dušikove zvrsti (*ang. reactive nitrogen species*)

ROS: reaktivne kisikove zvrsti (*ang. reactive oxygen species*)

RUNX2- z Run povezan transkripcijski faktor 2 (*ang. Runt-related transcription factor 2*)

SnoRNA: majhna nukleolarna RNA (*ang. small nucleolar RNA*)

SNP: polimorfizem posameznega nukleotida (*ang. Single nucleotide polymorphism*)

T: timin

SP-1: specifičnostni protein 1

TGF- β : transformirajoči rastni dejavnik beta

TIN2: jedrni faktor, ki interagira z TRF1 (*ang. TRF1-interacting nuclear factor 2*)

TINT1 oz. TPP1: protein, ki interagira z TIN2 (*ang. TIN2-interacting protein*)

TRAF: s TNF receptorjem povezan faktor (*ang. TNF receptor associated factor*)

UBE2C: encim E2 C, ki konjugira ubikvitin (*ang. Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C*)

UV: ultravijolični del spektra

1. UVOD

1.1. STARANJE CELIC

Staranje organizma, ki je opredeljeno z morfološkimi, funkcionalnimi, biokemičnimi in fiziološkimi spremembami, poteka na različnih nivojih in je zaradi genetike, epigenetike, prehrane in fizične aktivnosti zelo heterogeno. Obstajajo štiri teorije staranja – neuroendokrini, imunološka, teorija celičnega staranja in teorija telomer, te pa v grobem lahko uvrščamo v eno izmed dveh - teorijo programiranega staranja in teorijo okvar [1, 2, 3, 4, 5].

Po teoriji programiranega staranja je le-to programirano stanje, kjer naj bi se na določeni stopnji spremenilo izražanje pomembnih genov, ki nadzorujejo popravilo poškodb, homeostazo in obrambne mehanizme, to pa naj bi bila posledica fiziološkega časovnega razvoja človeka [1, 3, 6]. V to kategorijo spadata neuroendokrini in imunološka teorija. Neuroendokrini teorija govori o tem, da je staranje posledica zmanjšanja izločanja hormonov osi hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza in posledično neuropeptidov in neurotransmiterjev. Glede na imunološko teorijo s starostjo učinkovitost protiteles pada, produkcija interleukinov se zmanjša, prav tako pride do sprememb na nivoju sistema humanih levkocitnih antigenov (HLA), zaradi česar je tveganje za okužbe z infekcijskimi boleznimi večje [1, 2, 6, 7]. Pri teoriji okvar na organizem tekom življenja vplivajo različni okoljski dejavniki, ki povzročajo poškodbe na različnih sistemih, kasneje tkivih, in posledično njegovo staranje [1, 5, 7].

Celično staranje je posledica sprememb v med seboj povezanih kontrolnih procesih celične viabilnosti na različnih nivojih: Organizacija in struktura kromosomov, jedrni transport, regulacija transkripcije, translacija proteinov, proteostaza (ohranjanje kvalitete sintetiziranih proteinov), ohranjanje citoskeletne strukture, signaliziranje, avtofagija, ohranjanje zunajceličnega matriksa in zunajceličnega signaliziranja. V staranje vodijo napake v regulaciji in postopna neučinkovitost teh procesov in interakcije med genetskimi, epigenetskimi in okoljskimi dejavniki, ki vplivajo na te celične procese in celično funkcijo [2, 6, 7, 8, 9].

Lipidi, proteini, DNA in organeli so ves čas podvrženi različnim stresorjem kot so reaktivne kisikove zvrsti (ROS), reaktivne dušikove zvrsti (RNS), ultravijolična svetloba (UV), toksini in vnetja, kar povzroči molekularne poškodbe, ki se kljub popravljivim mehanizmom sčasoma začnejo kopičiti, pri metabolizmu pa nastanejo stranski produkti, ki se ne odstranjujejo več tako učinkovito [1, 5, 6, 7, 8]. To vpliva na zmanjšanje števila celic in funkcionalne, biokemične in morfološke spremembe, kar posledično povzroča disfunkcijo tkiva in bolezni [1, 7, 8, 10]. Značilne so tudi starostne biokemične spremembe lizosomov, v katerih poteka fagocitoza in tako omogočajo razgradnjo makromolekul, poškodovanih organelov in tudi proteinov [3, 6, 8].

Staranje lahko razdelimo na različne stopnje s svojimi karakteristikami:

Iniciacija staranja se začne z epigenetskimi spremembami in opisanimi spremembami v celičnem delovanju - okrnjena avtofagija, okrnjen proces proteostaze in poškodbe DNA, ki vodijo v mutacije. Avtofagija je potrebna za odstranjevanje poškodovanih proteinov in njihovih agregatov, lipidov in organelov in njihovih sestavin in inhibicija tega procesa ima lahko za posledico nekatere karakteristike staranja. Nepravilno sestavljeni in poškodovani proteini ter proteinski agregati lahko poškodujejo organele, vplivajo pa tudi na povečano produkcijo ROS in s tem obseg oksidativnega stresa, ki je eden izmed pomembnih dejavnikov staranja, ki tudi poškoduje organele, DNA in tudi zaščitne konce kromosomov imenovane telomere [1, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14]. Telomere imajo pri iniciaciji staranja ključno vlogo, saj njihovo krajšanje povzroči senescenco ali apoptozo in tako ustavitev proliferacijske (obnovitvene) zmožnosti celic.

Stopnja z antagonističnimi karakteristikami: Spremembe prve stopnje vodijo v spremembo fizioloških procesov in naslednjo stopnjo staranja z antagonističnimi karakteristikami, kamor spada tudi senescenca, ki jo poleg kratkih telomer lahko povzročijo tudi poškodbe DNA in oksidativni stres. Senescenca je stanje, ko je celica metabolno aktivna, vendar se ni zmožna več deliti, v svoje mikrookolje sprošča kemokine, citokine, proteaze in rastne dejavnike, ki spodbujajo proliferacijo okoliških tkiv in imunski odziv, značilno pa je tudi spremenjeno izražanje genov in spremenjena morfolologija celic. Povečana produkcija vnetnih dejavnikov celic v tem stanju še dodatno pospeši proces staranja, prav tako take celice pri kroničnih patoloških procesih, kamor spada tudi staranje, ne opravljajo svoje funkcije, ne odstranjujejo se ustrezno in tako preprečijo regeneracijo tkiv [3, 5, 8, 9, 12, 15].

Na tej stopnji pride tudi do mitohondrijske disfunkcije oz. mutacij mitohondrijske DNA, kjer zaradi manj učinkovite transportne verige pride do zmanjšanja produkcije energije, kopičijo pa se lahko tudi toksični stranski produkti in ROS, ki poškodujejo citosol, organele in telomere [1, 3, 5, 6, 8, 9, 12, 14, 16]. Pomembna karakteristika te stopnje je še spremenjena zmožnost celic za zaznavanje hranil, procesiranje in odzivanje na mehansko stimulacijo in spremenjene komponente celičnega signaliziranja [5, 6, 8, 9, 17].

Stopnja z integrativnimi karakteristikami: Pri stopnji te spremembe neposredno vplivajo na tkiva in organe in se kažejo kot značilnosti staranja. Pomemben del tega je staranje matičnih celic, katerih število se zmanjša, njihova senescenca pa onemogoči učinkovito tkivno homeostazo in obnavljanje tkiv, saj se le-te izčrpajo [1, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 18].

Zaradi spremenjene translacije pride pri staranju celic tudi do sprememb v ekspresijskih profilih med različnimi stopnjami staranja [1, 3, 9, 17]. Večinoma geni, katerih izražanje se v starosti zviša, sodelujejo pri vnetnem in imunskem odzivu in so povezani z delovanjem lizosomov in lizosomsko membrano, medtem ko med gene, katerih izražanje se v starosti zniža, spadajo geni za kolagen, zunajcelični matriks, geni, ki sodelujejo pri energetskem metabolizmu (mitohondrijski geni), in geni, ki so povezani z apoptozo, oksidativno fosforilacijo, biomarkerji celičnega cikla in celične senescence, kar je logično povezano z opisanim dogajanjem v celicah med staranjem [3]. Pomemben vpliv na spremembe izražanja genov, ki sodelujejo pri opisanih procesih, imajo mikro RNA (miRNA), ki se vežejo na 3'UTR regije informacijske RNA (mRNA), povzročijo njihovo razgradnjo in tako inhibirajo njihovo izražanje, lahko pa tudi nepravilno delovanje miRNA ali pa njihovo prekomerno izražanje inducira senescenco [3, 5, 9, 17].

Ne glede na to ali je staranje spontano ali programirano pa imajo vsi ti mehanizmi kumulativni učinek in so med seboj povezani, staranje pa poteka postopno in progresivno [1, 2, 5, 8]. Vsi skupaj imajo za posledico staranje na nivoju organov kar se odraža kot značilnosti starosti oz. t.i. starostnih bolezni kot so osteoporoza, Alzheimerjeva bolezen, ateroskleroza, kardiovaskularne bolezni, sladkorna bolezen in rakava obolenja, pri biomedicinskih raziskavah, ki vključuje delo na celicah, pa lahko ti procesi vplivajo na kvaliteto uporabljenega celičnega modela in interpretacijo rezultatov [2, 4, 8, 11, 13, 16, 18].

1.2. TELOMERE

1.2.1. Struktura in vloga telomer

Zaradi problema podvojevanja koncev kromosomov se pri vsaki delitvi izgubi približno 50 baznih parov (bp) na koncu DNA, kar bi rezultiralo v izgubi pomembnih zapisov na koncu kromosomov [2, 8, 10, 14, 18, 19, 20, 21, 22]. Celice imajo zato DNA-proteinske komplekse na koncih kromosomov, ki se imenujejo telomere (iz grške besede *telos*- konec in *meros*-del). To so dolga ponavljajoča zaporedja $(TTAGGG)_n$, ki imajo poleg 5 do 15 kilobaz dolgega dvovijačnega dela še od 150 do 300 nukleotidov dolg podaljšan enovijačen 3' konec (glej sliko 1), ki izgleda kot poškodovana DNA, zato se vrine med dvovijačno strukturo in tvori zaščitni T in D zanki [10, 11, 12, 13, 16, 19, 20, 23]. Ta zaporedja skupaj s kompleksom šestih proteinov imenovanim telosom ali šelterin ščitijo konce DNA pred krajšanjem in ohranjajo zaščitno strukturo koncev kromosomov [10, 11, 12, 19, 20, 23, 24]. Pri rojstvu razlik v dolžini telomer med spoloma ni, skrajšajo pa se za 50 do 200 bp pri vsaki podvojitvi, vendar je ta proces hitrejši pri moških kot ženskah. Hitrost krajšanja telomer pri matičnih celicah je manjša kot pri somatskih celicah ker vzdržujejo dolžino telomer s telomerozo, spolne celice pa ves čas vzdržujejo enako dolžino telomer [11, 16, 18, 25, 26]. Poleg zaščite pred krajšanjem koncev kromosomov, zlepljanjem in prepoznavo kot poškodovano DNA, sodelujejo tudi v številnih drugih celičnih procesih kot so funkcijska organizacija kromosomov v jedru, genomska stabilnost in regulacija ekspresije genov [2, 10, 12, 14, 23, 24].

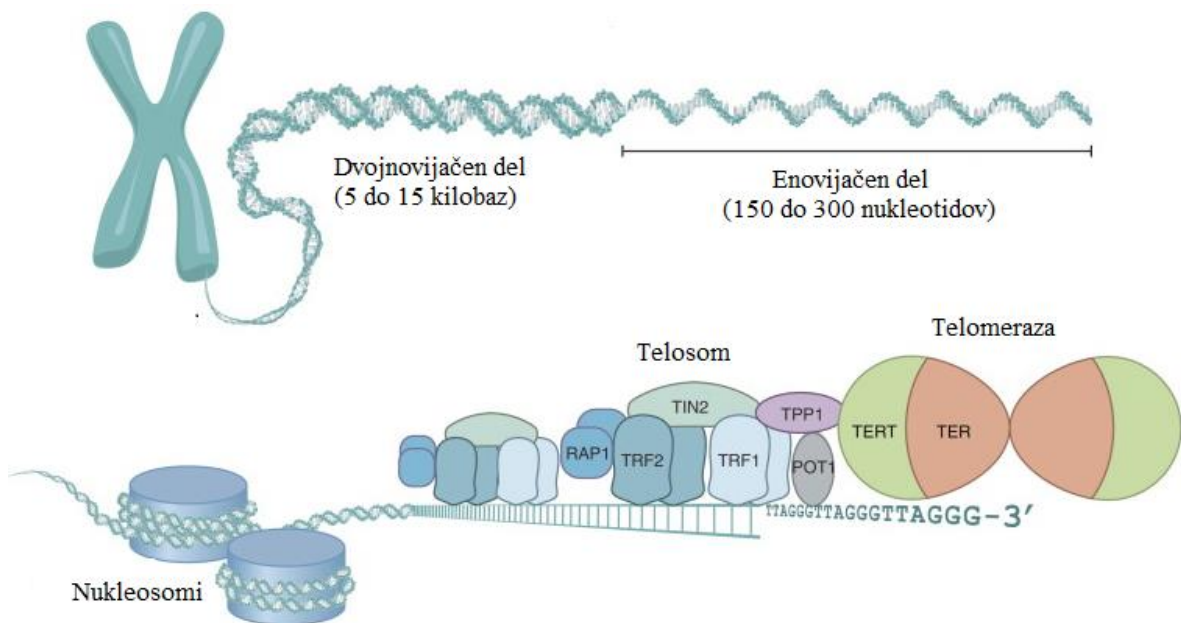
Zaradi krajšanja telomer imajo človeške celice omejeno število proliferacij (40-60), po katerem se delitev ustavi, kar imenujemo Hayflickova limita [1, 2, 8, 10, 11]. Pri tej kritični točki se telomere ne razlikujejo več od poškodovane DNA (DNA dvojno-vijačni zlomi), kar ima za posledico aktivacijo gena za tumor supresorski protein P53. P53 deluje pri kontrolni točki med G1 in S fazi celičnega cikla. V tej fazi senescence celica ostane, dokler ne gre v apoptozo [2, 10, 11, 12, 14, 19, 20].

Telomere tako predstavljajo tudi biološko molekulsko uro, ki kontrolira podvojevalno kapaciteto celic ter njihovo senescenco in kaže na pretekle proliferacije [2, 6, 12, 14, 10, 13, 16, 19, 27].

1.2.2. Vzdrževanje dolžine telomer

Telomeraza je od RNA odvisna DNA polimeraza, ki podaljšuje telomere. Sestavljena je iz katalitičnega proteinskega dela (hTERT), ki služi kot reverzna transkriptaza in funkcionalnega RNA dela (hTERC), ki služi kot matrica na podlagi katere encim podaljšuje telomerne ponovitve. Telomeraza se preko hTERT dela in s pomočjo POT1 (protein, ki ščiti telomere) in TIN2 (protein, ki interagira s TIN2) proteinov v telosomu veže na podaljšan enovijačen 3' konec in na podlagi hTERC dela dodaja nukleotide, sintezo pa nadaljuje DNA polimeraza, ki izgradi dvojnovijačno verigo (glej sliko 1) [2, 10, 11, 14, 19, 20, 21, 23, 24, 28]. hTERC se visoko izraža v vseh celicah, aktivnost telomeraze pa je pogojena z izražanjem hTERT [10, 11, 19, 23].

Telomeraza je pomembna za obnavljanje tkiv. V germinalnih celicah in odraslih matičnih celic (npr. matične celice kože in hematopoetske matične celice), rakavih celicah in in-vitro nesmrtnih celicah, se ta encim izraža, medtem ko je v večini somatskih celic izražanje zelo nizko ali negativno [1, 2, 6, 10, 11, 12, 14, 21, 23, 16, 19, 24, 28].



Slika 1: Struktura telomere in telomeraze. Prirejeno po [24]. Telomera je sestavljena iz dvojnovijačnega dela in podaljšanega enovijačnega 3' konca. Preko TPP1 in POT1 proteinov v šelterinu se s svojim TERT delom telomeraza pripenja na telomerni del in tako podaljšuje telomere.

1.2.3. Telomere v povezavi s staranjem in boleznimi

Poleg fiziološkega krajšanja telomer naj bi h krajšanju prispevali tudi vnetje, nekateri toksini, oksidativni stres in ROS, ki poškodujejo predvsem z gvaninom bogate regije, kamor spadajo tudi telomere [5, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 27]. Senescenca celic zaradi skrajšanja telomer ima pomembno vlogo pri preprečitvi neskončne proliferacije malignih tumorskih celic, vendar hkrati tudi pri starejših celicah omeji funkcijo matičnih celic za regeneracijo tkiv, kar se kaže kot proces staranja organizma [6, 8, 9, 10, 12, 13, 18, 25].

Kljub zaščitni vlogi telomer proti kancerogenezi, lahko 85-90 % teh celic tudi v senescenci reaktivira telomero ali podaljšujejo telomere z alternativnim mehanizmom podaljševanja, izgubi kontrolo nad celičnim ciklom in si tako zagotovi nesmrtnost. Zaradi kopičenja mutacij pri takih celicah so te genetsko nestabilne. V celicah v senescenci se kopičijo prosti radikali, ki dodatno sodelujejo tako pri procesu staranja kot kancerogeneze [2, 10, 11, 12, 13, 19, 20, 23, 25, 28].

Telomeraza pri velikem številu delitev matičnih celic ne more več vzdrževati dolžine telomer, zaradi česar se sčasoma zmanjša zmožnost vzdrževanja homeostaze organov, zaradi česar so krajše telomere povezane s povečanim tveganjem za nekatere kronične bolezni kot so kardiovaskularne bolezni, sladkorna bolezen, depresija, rakava obolenja, avtoimunske bolezni, osteoartritis in osteoporoza [2, 11, 13, 16, 18, 25, 27]. Dolžina telomer je lahko uporabna kot marker poteka biološkega staranja teh bolezni, pri nekaterih pa tudi kot faktor tveganja, in bi lahko bila uporabna kot njihovo prognostično in diagnostično orodje [11, 13, 16, 18].

Korelacija staranja in dolžine telomer je vidna pri mutacijah v genih za vzdrževanje dolžine telomer, zaradi česar imajo bolniki krajše telomere kot enako stari, vendar zdravi posamezniki, to pa povzroča degenerativne motnje, ki se kažejo kot znaki prezgodnjega staranja-telomeropatije (npr. Wernerjev sindrom, idiopatska pljučna fibroza, aplastična anemija, kongenitalna diskeratoza, ki lahko povzroči tudi odpoved kostnega mozga, osteoporozo in raka) [10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 29].

1.3. STARANJE KOSTNEGA TKIVA

1.3.1. Sestava in remodelacija kosti

Skelet igra vlogo strukturne podpore organizma, nanj se pripenjajo mišice, ščiti notranje organe, saj lahko prenese visoke mehanične obremenitve, predstavlja zalogo kalcija, fosfatov, magnezija, natrija in drugih ionov in vsebuje kostni mozeg, ki proizvaja krvne celice. Kostni mozeg je sestavljen iz kostne medceličnine (matriksa) in kostnih celic. Kostna medceličnina je sestavljena iz 40% organskega in 60% anorganskega dela. Organski del predstavlja kolagen tipa I, proteoglikani, glikoproteini, fosfolipidi in fosfoproteini in tudi nekateri rastni dejavniki (osteokalcin, osteonektin). Anorganski del pa kalcijevi in fosfatni ioni. Kalcij se v kosteh pojavlja v dveh oblikah: amorfni, ki je vezan labilno, in omogoča izmenjavanje kalcija ter stabilno v obliki kristalov kalcijevega hidroksiapatita, ki se nalagajo na osnovo iz organske medceličnine [4, 17, 30, 31, 32, 33, 34].

Organski del sestavljajo tudi kostne celice:

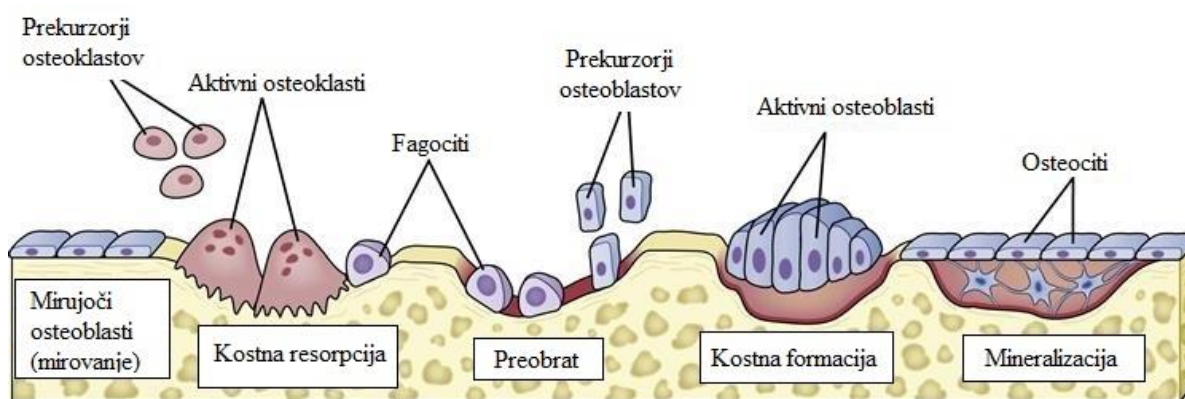
- **Osteoblasti:** Iz mezenhimskih matičnih celic (MMC) nastanejo osteoprogenitorne celice iz njih pa osteoblasti, ki so glavne celice osteogeneze (kostne formacije), saj sintetizirajo organski del kostne medceličnine-kolagen tipa I in proteoglikane, ki so del kostnega matriksa (osteoida).
- **Osteoklasti:** Nastanejo iz krvotvornih matičnih celic (KMC) makrofagno-monocitne vrste in so primarne celice kostne resorpcije (razgradnje).
- **Osteociti:** Ko postanejo osteoblasti manj aktivni, se premaknejo iz površine kosti v notranjost in preoblikujejo v osteocite, ki ležijo v lakunah in so obdani s kostnim matriksom ter sodelujejo pri celičnem signaliziranju [9, 17, 4, 30, 31, 35].

Makroskopsko ločimo dva tipa kostnine in sicer trabekularno (spongiozno), ki se nahaja v sredici posameznih kosti, v ploščatih kosteh in vretencih in je metabolno aktivna in kortikalno (kompaktno), ki se nahaja v diafizah dolgih kosti in obdaja trabekularno kostnino na površini kosti [4, 17, 30, 31, 32, 34, 35, 36].

Kostna remodelacija je reguliran hkraten proces formacije in resorpcije kosti za obnavljanje poškodb, kateremu je ves čas podvrženo 5% kosti.

Področju remodelacije rečemo kostna remodelacijska enota, katere glavne vrste celic so osteoblasti in osteoklasti. Površina kosti je prekrita z mirujočimi ploščatimi osteoblasti (faza mirovanja), ki se ob poškodbi razmaknejo (faza aktivacije). Celice zamenjajo prekurzorji osteoklastov pod vplivom citokinov, ki se sprostijo iz področja poškodbe, in signalov osteoblastov (faza pridobivanja osteoklastov). Ti diferencirajo v osteoklaste, ki sproščajo hidrolitične encime in HCl in ustvarijo okolje za izgradnjo resorpcijske lakune in tako odstranijo poškodovano kostnino (faza resorpcije). Ko je resorpcija končana gredo osteoklasti v apoptozo, fagociti očistijo dno resorpcijske lakune, s proliferacijo osteoprogenitornih celic pa nastanejo osteoblasti, ki začnejo izdelovati medceličnino (faza preobrata in pridobivanja osteoblastov). Kasneje se transformirajo v osteocite, ki tvorijo osteoid (faza tvorbe osteoida), ki postopoma mineralizira. Površino pa ponovno prekrijejo neaktivni osteoblasti in ponovno nastopi faza mirovanja. Proces traja 6-12 mesecev in mora biti ves čas reguliran, da je zagotovljeno ravnotežje med resorpcijo in formacijo kosti [4, 9, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37].

Približno po 35. letu starosti je to ravnotežje porušeno in hitrost resorpcije presega hitrost formacije (osteoblasti ne morejo zapolniti resorpcijske lakune), kar ima za posledico zmanjšano kostno maso, kar poveča tveganje za zlom, kot se to zgodi pri osteoporozi [4, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39].



Slika 2: Shematski prikaz kostne remodelacije. Prirejeno po [40]. V procesu kostne remodelacije si znotraj faz sledijo kostna resorpcija, preobrat, kostna formacija in na koncu mineralizacija, v katerih sodelujejo mirujoči osteoblasti, osteociti, fagociti ter osteoblasti in osteoklasti z njihovimi prekurzorji.

Osteoporozo je karakterizirana z zmanjšano mineralno kostno gostoto (MKG) in abnormalnostmi v mikrostrukturi kosti, ki poveča tveganje za zlome. Poleg starosti, ki je najpogostejši vzrok za osteoporozo zaradi zmanjšane količine estrogena (primarna oblika), jo lahko povzročijo tudi nekatere endokrine bolezni (Cushingov sindrom, sladkorna bolezen, hipogonadizem, hiperparatiroidizem), nekatera zdravila (heparin, glukokortikoidi) in alkoholizem, imobilizacija in izguba teže [4, 9, 15, 29, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 39].

1.3.2. Mehanizmi staranja kosti

Staranje vpliva na vse komponente skeleta- spremenijo se mehanske značilnosti kosti, morfologija kosti, celice kosti in tudi proteini in minerali v kosteh. Pojavijo pa se tudi spremembe na genetskem in molekularnem nivoju. Na mehanskem nivoju se med staranjem pojavijo spremembe kot so npr. količina mineralov v kosteh, struktura kolagena in struktura osteocitov, ki vplivajo na razmerje med trdnostjo skeleta in hkratno prožnostjo, da prenese velike mehanske obremenitve, zato se na nekaterih kosteh pojavijo mikropoškodbe. Te bi se sicer popravile v procesu kostne remodelacije, vendar ker je ta pri starosti okrnjena, to lahko vodi v večje poškodbe in posledično tudi zlome [17].

Tudi pri celicah kosti oksidativni stres igra pomembno vlogo, saj ROS, ki se pri starosti v kosteh kopičijo, povečajo obseg celic kosti v senescenci, stimulirajo aktivacijo osteoklastov in apoptozo osteoblastov in inhibirajo osteogeno diferenciacijo. Na genetskem in molekularnem nivoju oksidativni stres vpliva na eno izmed najpomembnejših signalnih poteh WNT/ β katenin, ki je osrednja pri osteoblastogenezi in ki inhibira apoptozo osteoblastov in osteocitov ter poveča proliferacijo in preživetje predhodnikov osteoblastov. Poleg te vpliva tudi na še drugo zelo pomembno regulatorno pot ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B/ receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B /osteoprotegerin (RANKL/RANK/OPG), ki pa ima osrednjo vlogo pri osteoklastogenezi in uravnava preživetje in funkcijo osteoklastov [9, 15, 17, 35, 36].

Pri proteinih kostnega matriksa, lahko s starostjo pride do sprememb v njihovi razporeditvi v tkivu, njihovem izražanju in post-translacijskih modifikacij. Zmanjšano izražanje proteinov kaže na zmanjšano zmožnost proliferacije celic med staranjem. Osrednji protein organskega dela kosti kolagen tipa I nastane v obliki manjših vlaken, ki se povežejo v večja in zunaj celice premrežijo, kar daje kostem fleksibilnost in prožnost, da lahko prenesejo obremenitve. Premreženje lahko poteka encimsko ali neencimsko.

Pri neencimskem premreženju, ki poteče takrat ko je kolagen dlje časa prisoten v kosteh in dokazano pri starejših poteka v večji meri kot encimsko, pride do adicije sladkorjev na kolagenska vlakna, pri čemer nastanejo stranski produkti glikacije in ROS. Kostni so pri tej vrsti premreženja manj prožni, še en dejavnik tega pa so stranski produkti teh reakcij, ki se lahko odstranijo samo s kostno resorpcijo in tako spodbujajo povečano aktivnost osteoklastov [8, 17].

Kot v vseh somatskih celicah je tudi pri kosteh krajšanje telomer najpomembnejši dejavnik staranja, saj imajo osteoklasti, osteoblasti in osteociti zaradi tega omejeno število delitev [9, 11, 15, 17, 27, 41]. MMC so pomembne za zalogo osteoblastov, ki so potrebni pri stalni kostni remodelaciji. Telomere v MMC sicer podaljšuje telomeraza, vendar se njeno izražanje s starostjo zmanjša, zato kritično kratke telomere sčasoma povzročijo njihovo senescenco, upad njihovega števila in funkcije in posledično vpliv na njihov osteogeni potencial (starejše MMC diferencirajo v večji meri v adipocite), kar je povezano z zmanjšano diferenciacijo v osteoblaste. Ta naj bi skupaj z zmanjšano življenjsko dobo osteoblastov, njihovim številom in signalov za diferenciacijo vodila v zmanjšano učinkovitost kostne remodelacije. Na porušeno ravnotežje med kostno formacijo in resorpcijo vpliva tudi starostno povečanje obsega apoptoze MMC in osteoblastov, ta pa povzroči šibkost kosti zaradi zmanjšanja sposobnosti obnavljanja mikropoškodb in tvorbe območij mikropetroze. Posledica je manjša masa kosti in povečano tveganje za zlome in razvoj osteoporoze, ki jo zato uvrščamo v starostne bolezni [9, 7, 11, 15, 17, 27, 41, 42].

Povezavo med krajšanjem telomer in staranjem kosti potrjujejo tudi nekatere že prej omenjene genetske bolezni: Wernerjev sindrom, ki prizadane počasi deleče mezenhimsko tkivo (kosti, dermis, maščobno tkivo, žile) in kongenitalna diskeratoza, ki prizadane hitro proliferajoče tkivo (kostni mozeg, epidermis), povzročita disfunkcijo v ohranjanju dolžine telomer kar lahko dodatno zmanjša hitrost diferenciacije osteoblastov, osteogeni potencial in kostno formacijo in posledično prezgodnjo osteoporozo. Pri bolnikih s sindromi prezgodnjega staranja so odkrili zmanjšano število celic, povečan obseg poškodb DNA in abnormalnosti jedra v MMC, kar ovira njihovo funkcijo [13, 15, 29, 41]. Tudi pri MMC pride zaradi sprememb v histonski acetilaciji, metilaciji DNA, jedrni lamini, proteinih, ki spreminjajo kromatinsko strukturo in proteinih, ki so povezani s kontrolo celičnega cikla, do sprememb v ekspresiji genov.

Ti so večinoma povezani z osteoporozo, sintezo proteinov, signalnimi potmi za degradacijo in kostno remodelacijo in signalno pot za kalcij ter senescenco.

Te spremembe vplivajo na njihovo staranje, število in diferenciacijo v osteoblaste, pomembno vlogo pa ima tudi v kosteh vpliv miRNA na proteostazo, signalne poti, zaznavanje hranil, mitohondrijsko disfunkcijo in izčrpanje teh celic, zaradi česar bi bile te lahko uporabne kot biomarker osteoporoze [7, 9].

1.4. MERJENJE IZRAŽANJA GENOV Z UPORABO MIKROMREŽ

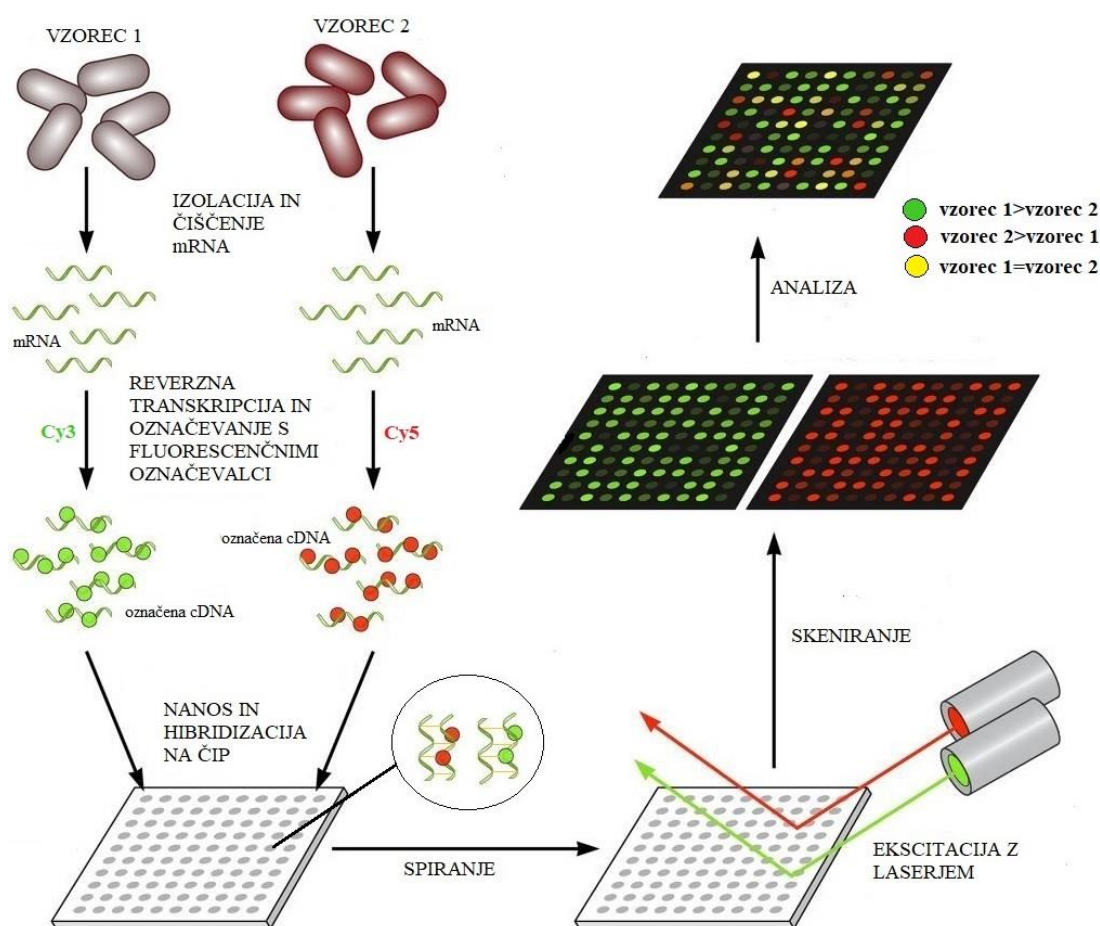
1.4.1. Uporaba metode

Tradicionalna metoda za merjenje izražanja genov je uporaba mikromrež, s pomočjo katerih lahko izmerimo izražanje genov celotnega transkriptoma hkrati na velikem številu vzorcev, za razliko od starejših metod, pri katerih smo lahko spremljali izražanje genov enega ali le nekaj izbranih genov. Razvila se je iz metod prenosov Southern in Northern pri katerih detekcija in identifikacija določenih nukleotidnih zaporedij temeljita na hibridizaciji označenih sond. S pomočjo te metode lahko spremljamo izražanje genov in njihovo vlogo pri celičnih procesih ter ustvarimo ekspresijski profil določenega biološkega vzorca, uporabna pa je tudi pri raziskovanju različnih bolezenskih stanj, saj lahko z njo identificiramo diagnostične in prognostične biomarkerje, opredelimo in klasificiramo bolezni, dobimo vpogled v njen mehanizem nastanka, spremljamo njen odziv na zdravljenje, določimo pa lahko tudi status vzorca glede na njegov ekspresijski profil in določimo podskupine bolnikov glede na njihov ekspresijski profil. Mikromreže so zato lahko uporabne kot raziskovalno, prognostično in diagnostično orodje [43, 44, 45, 46].

1.3.4. Princip in izvedba

Mikromreže so mikroskopski čipi iz stekla ali silikona, na katere so pritrjene sonde, ki so poznane DNA sekvence oz. geni, katerih izražanje nas zanima. Za izvedbo te metode je potrebno izolirati mRNA in jo pretvoriti v komplementarno DNA (cDNA) z metodo reverzne transkripcije, pri kateri med sintezo vključimo tudi fluorescenčne označevalce.

Sledi hibridizacija, pri kateri se cDNA veže na komplementarno zaporedje na čipu, večkratno spiranje, pri katerem se odstrani nevezane vzorce in se tako prepreči tudi hibridizacija podobnih genov, in detekcija, pri kateri z laserjem obsevamo čip, pri tem pa fluorescenčni označevalci v vezanih cDNA emitirajo fluorescenčno svetlobo določene valovne dolžine (glej sliko 3). Merjenje je lahko kvalitativno (signal na specifičnem mestu pomeni prisotnost specifične mRNA oz. gen se izraža), ali kvantitativno, pri kateri je količina fluorescence na določenem mestu proporcionalna količini mRNA v vzorcu. Metoda nam ne pove absolutnega izražanja genov, je pa uporabna za primerjavo izražanja med različnimi vzorci [43,44].



Slika 3: Shematski prikaz postopka mikromreže pri izvedbi z dvema vzorcema. Prirejeno po [47]. Po izolaciji in čiščenju mRNA dveh različnih vzorcev (npr. nepatološki in patološki) sledi reverzna transkripcija in označevanje sintetizirane cDNA z dvema različnima fluorescenčnima označevalcema (vzorec 1: zelen označevalec, vzorec 2: rdeč označevalec). Po nanosu in spiranju sledita hibridizacija na zaporedja vezana na čipu, ekscitacija z laserjem in skeniranje. Zelen signal na mestu z določeno sekvenco kaže na višje izražanje tega gena v vzorcu 1 kot v vzorcu 2, rdeč signal na mestu z določeno sekvenco pomeni višje izražanja tega gena v vzorcu 2 kot v vzorcu 1, rumen signal pa pomeni, da se približno v enaki meri ta gen izraža v obeh vzorcih.

Izvedbe mikromrež lahko razdelimo glede na tri kriterije:

- Dolžina uporabljenih sond: Izvedbe, ki uporabljajo od 100 do 1000 bp dolge sonde (celotni transkripti) in tiste, ki uporabljajo kratke do 50 bp dolge sonde (oligonukleotide).
- Metoda proizvodnje mikromreže: Izvedbe, kjer se že v naprej sintetizirane sonde »natisne« na specifično mesto na čip, in tiste, ki uporabljajo *in-situ* sintezo, kjer se sintetizira sonde na specifično mesto direktno na čip s pomočjo fotolitografije ali elektrokemične sinteze.
- Število vzorcev, ki jih lahko hkrati analiziramo: Pri enokanalni izvedbi lahko na eni mikromreži merimo izražanje genov enega vzorca z uporabo enega označevalca, pri dvokanalni pa lahko s pomočjo različnih označevalcev na eni mikromreži merimo izražanje genov različnih vzorcev in pri detekciji uporabimo različne valovne dolžine svetlobe [44, 45, 48, 49, 50].

2. NAMEN DELA

Starostne bolezni se s staranjem svetovne populacije povečujejo in poglobljajo. Predstavljajo najpogostejša bolezenska stanja na svetu zato je potreba po njihovem boljšem razumevanju za namen učinkovitega preprečevanja, spremljanja in zdravljenja vse večja. Za razumevanje teh bolezni moramo poznati biokemično ozadje, mehanizem staranja celic in nastanek senescence, saj je kopičenje celic v stanju senescence glavni vzrok teh bolezni. V tem stanju izgubijo sposobnost proliferacije in s tem funkcije.

Namen našega magistrskega dela je bil na osnovi profilov izraženih genov identificirati signalne poti, ki so udeležene in se spreminjajo pri staranju celic ter bi lahko vplivale na kvaliteto celičnega modela med različnimi generacijami celic. Tako bi bolje razumeli mehanizme staranja in hkrati zagotovili pomembne informacije za nadaljnje raziskovanje vloge teh genov pri staranju celic in raziskovanju mehanizmov nastanka starostnih bolezni.

S tem namenom bomo:

- Pripravili in v laboratoriju vzgojili različne generacije primarnih osteoblastov
- Izolirali celotno RNA
- Določili profile izraženih genov z metodo mikromrež
- Primerjali profile izražanja med generacijami in ugotovili, kateri geni se spreminjajo in kakšna je njihova vloga. Na osnovi tega bomo skušali odkriti signalne poti vpletene v staranje osteoblastov.

3. METODE

3.1. ODVZEM VZORCA IN PRIPRAVA PRIMARNIH KULTUR

HUMANIH OSTEOLASTOV

Vzorec je bil del trabekularnega kostnega tkiva odvzet iz stegenice med totalno artroplastiko in je bil do izolacije shranjen v osnovnem mediju za gojenje, pripravljen z DMEM celičnem medijem (Biowest, MO, ZDA), 10 % fetalnega goveja seruma (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA), 1% glutamina (Biowest, MO, ZDA) in 1% penicilina/streptamicina (Biowest, MO, ZDA) na 4°C. Primarne kulture humanih osteoblastov so pripravljali s postopkom spontane migracije osteoblastov iz kostnega tkiva v gojitveni medij. Vzorec so intenzivno spirali s fosfatnim pufrom (PBS) in prenesli v gojilno posodo s 7 mL osnovnega medija in jih potem inkubirali. Medij so nato zamenjali naslednji dan in potem vsak tretji dan. Prve celice so bile pod mikroskopom opažene 3 dni po izolaciji. Po dveh tednih so iz gojilne posode odstranili delce kosti in osnovni medij zamenjali z osteogenim medijem (dodatek 50 µg/mL askorbinske kisline in 10 mM β-glicerofosfata), da so vzdrževali celice osteoblastne vrste. Medij so še naprej zamenjali vsak tretji dan. Ob vsaki zamenjavi medija so kulturo mikroskopsko pregledali za oceno napredka kulture in za prisotnost infekcije. Primarna kultura humanih osteoblastov je bila pripravljena po 28 dneh od začetka priprave. Celice so bile tripsinizirane ob približno 80% konfluenci, ob pasažiranju pa je bilo vsakič nasajenih 50.000 celic.

Pogoji:

- Inkubiranje: temperatura 37 °C, 100 % vlažnost, 5% O₂, atmosfera s 5% CO₂,

3.2. PRIPRAVA IN GOJENJE CELIC

Celice smo prejeli zamrznjene v dimetil sulfoksidu (DMSO) v tekočem dušiku v kriovialah. Pripravili smo jih v komori z laminarnim pretokom zraka (VARIOLAB Mobilien W 90, WALDNER Holding, Wangen, Nemčija), ki smo jo prej temeljito očistili z 70% etanolom in obsevali z UV svetlobo. Razkužili smo tudi vso opremo in rokavice in tako zagotovili sterilne pogoje dela pred vsakim delom s celicami. Označili smo posode za gojenje celičnih kultur ter vanje napipetirali po 10 mL na 37 °C segretega DMEM celičnega medija (Biowest, MO, ZDA), ki smo ga predhodno pripravili tako, da smo mu dodali 10% FBS (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA), 1% 100x L-glutamina (Biowest, MO, ZDA) in 1% 100x antibiotika/antimikotika (Biowest, MO, ZDA). Celice smo odmrznili s premikanjem vial v rokah in celoten volumen (1 mL) prenesli v označene 15 mL centrifugirke s 4 ml medija ter koncentrirali celice s centrifugiranjem (centrifuga Megafuge 16R, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA). Po centrifugiranju smo aspirirali supernatant do 0,5 mL, dodali vseh 10 mL medija iz posode za gojenje in dobro premešali s pipetiranjem. Celoten volumen smo prenesli nazaj v gojilne posode in pod svetlobnim mikroskopom (Olympus CK40, Olympus, Hamburg, Nemčija) preverili če so celice prisotne in jih prestavili v inkubator (MCO-18IAC, Sanyo Electronics, Osaka, Japonska). Pazili smo, da smo zaprli posode tako, da je bil pretok zraka še mogoč. Vsak tretji dan (ponedeljek, sredo, petek) smo aspirirali star medij in dodali 10 mL svežega in spremljali rast celic in morebitno prisotnost infekcije. Ko je bila konfluentnost ustrezna (približno 100%) smo jih poslikali z mikroskopom (EVOS FL, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA) iz celic izolirali RNA.

Pogoji:

- Centrifugiranje za koncentriranje celic: 5 minut, sobna temperatura, 1200 g, pospeševanje 9, zaviranje 9
- Inkubiranje: temperatura 37 °C, 100 % vlažnost, atmosfera s 5% CO₂

3.3. IZOLACIJA RNA IZ CELIC S KOMPLETOM PEQGOLD TOTAL RNA KIT

Izolacija temelji na centrifugiranju in silika kolonah, na katere se reverzibilno veže nukleinska kislina pod določenimi pogoji. Postopek je sestavljen iz lize, kjer z lizirnim pufrom razbijemo celično membrano in jedro in kjer pod denaturacijskimi pogoji inaktiviramo ribonukleaze (RNAze), vezave nukleinske kisline na silika membrano, spiranja, kjer očistimo nečistoče, ter elucije. Pri izvedbi smo sledili protokolu, ki je bil priložen kompletu za izolacijo RNA (PeqGOLD Total RNA kit, PEQLAB Biotechnologies Erlangen, Nemčija). V celičnem laboratoriju v komori smo najprej celicam odstranili medij in trikrat spirali s 3 mL hladnega PBS pufra. Po vsakem spiranju smo ga aspirirali iz gojilne posode. Potem smo dodali 400 μ L lizirnega pufra (priložen kompletu) in s pipetnim nastavkom postrgali celice z dna gojilne posode. Pod mikroskopom smo preverili koliko celic je še prisotnih in po potrebi še postrgali. Lizat smo prenesli v mikrocentrifugirko in to prenesli do predhodno očiščene in z UV svetlobo obsevane RNA komore (DNA/RNA UV-cleaner UVC/T-M-AR, Biosan, Riga, Latvija). Celoten volumen lizata smo prenesli na DNA kolono (priložene kompletu) v mikrocentrifugirki in centrifugirali pri 12.000 g 1 minuto (centrifuga 5415 R, Eppendorf, Hamburg, Nemčija). Volumnu, ki je prišel skozi kolono smo dodali enak volumen 70% etanola in dobro premešali na rotacijskem mešalniku. Celoten volumen (800 μ L) smo prenesli v RNA kolono (priložene kompletu) v novi mikrocentrifugirki in centrifugirali na 10.000 g 1 minuto. Odstranili smo mikrocentrifugirko in tekočino, ki je prišla skozi kolono. Sledilo je prvo spiranje, kjer smo na kolono napipetirali 500 μ L spiralnega RNA pufra I (priložen kompletu) in centrifugirali na 10.000 g 15 sekund. Po odstranitvi tekočine v mikrocentrifugirki smo dodali 600 μ L spiralnega RNA pufra II (priložen kompletu in pripravljen po navodilih proizvajalca) in centrifugirali na 10.000 g 15 sekund, odstranili tekočino in ponovili spiranje. Kolono smo nato centrifugirali na 10.000 g še 2 minuti, s čimer smo zagotovili, da se je ta popolnoma posušila in da se je odstranil odvečen etanol iz pufra, ki bi lahko vplival na čistost izolirane RNA. Po sušenju smo kolono predstavili v novo označeno mikrocentrifugirko in direktno nanjo napipetirali 50 μ L vode brez RNAz (priložena kompletu), ki smo jo predhodno segreli na 70 °C. Da je voda pronicala skozi kolono smo jo inkubirali 5 minut in zaključili izolacijo z elucijo s centrifugiranjem na 5.000 g 1 minuto.

Pogoji:

- Temperatura, pri kateri se vsi koraki izvajajo: sobna temperatura
- Temperatura centrifuge: 23 °C

3.4. MERJENJE KONCENTRACIJE RNA Z NANODROPOM

Za merjenje koncentracije smo uporabili napravo Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA), ki temelji na merjenju absorbance pri valovni dolžini 260 nm, pri kateri absorbirajo nukleinske kisline, prav tako pa nam izmeri in poda čistost izolirane RNA s pomočjo razmerja med absorbanco med 260 nm in 280 nm ter 260 nm in 230 nm. Za slepi vzorec smo uporabili vodo brez RNAz (priložena kompletu), po merjenju pa shranili vzorce v zamrzovalniku.

Pogoji:

- Valovna dolžina, pri kateri se meri absorbanca: 260 nm
- Volumen vzorca in slepega vzorca: 1,5 µL
- Temperatura, pri kateri se meri: sobna temperatura
- Temperatura shranjevanja: - 80°C

3.5. MERJENJE IZRAŽANJA GENOV Z MIKROMREŽAMI

Merjenje izražanja genov so z metodo mikromrež, ki je opisana v uvodu, opravili na podjetju MacroGen v Seoulu v Južni Koreji, kamor smo vzorce poslali v mikrocentrifugirki po shemi v preglednici. Uporabili so mrežo Affymetrix GeneChip™ Human Gene 2.0 ST (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA), ki pokrije 40.716 transkriptov, med katerimi je 30.645 dobro poznanih kodirajočih in tudi nekaj nekodirajočih transkriptov. Te mikromreže so pripravljene z *in situ* sintezo, v postopku pa so cDNA označili s fluorescenčno označenim biotinom. Ta vrsta mikromrež omogoča tudi merjenje alternativnega izrezovanja in različic transkriptov [49, 51]. V preglednici I so prikazane količine in volumni RNA vzorcev generacije osteoblastov 1, 3 in 4 (G0, G3, G4) za analizo.

Pogoji pošiljanja:

- Temperatura: Suhi led (-78,5 °C)
- Potrebna koncentracija: >70 ng/μL
- Potreben volumen: >10 μL
- Potrebna količina: >0,7 μg
- Potrebna čistost: A (260 nm)/A(280 nm), (260 nm) /A (230 nm) >1,8

Preglednica I: Količine in volumni RNA vzorcev za analizo.

VZOREC	KONCENTRACIJA [ng/μL]	VOLUMEN [μL]	KOLIČINA RNA [μg]
G0	207,8	20	4,156
G3	265,9	20	5,318
G4	218,2	20	4,364

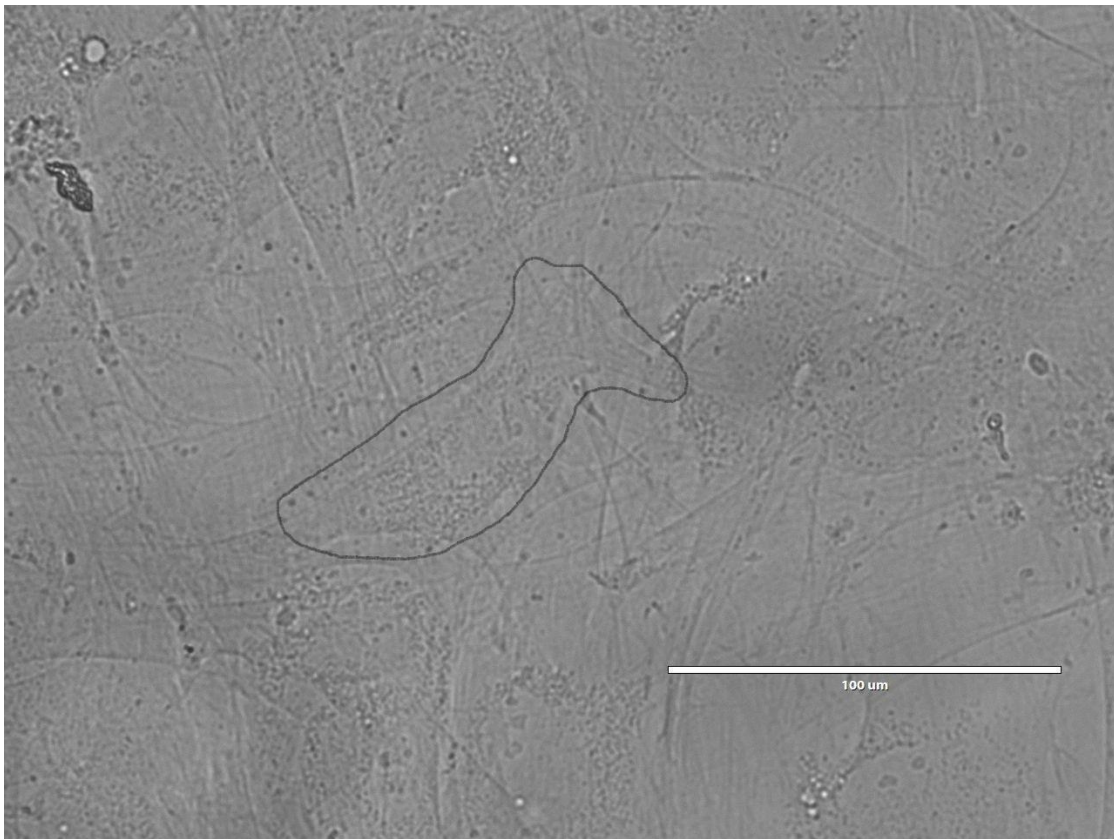
4. REZULTATI

Glavni namen dela v tej raziskavi je bil preučevanje sprememb izražanja genov med različnimi generacijami primarnih osteoblastov, kar nakazuje na spremembe izražanja genov tekom *in vitro* staranja celic. V raziskavi smo kot celični model uporabili primarne osteoblaste, ki smo jih pridobili od pacientov med totalno artroplastiko. Po odvzemu vzorca kosti v laboratoriju za primarne celične kulture na Fakulteti za farmacijo rutinsko izolirajo primarne osteoblaste, jih gojijo več generacij ter vsako generacijo shranijo v tekočem dušiku. Za našo raziskavo smo iz laboratorija za primarne celične kulture pridobili generacije 0, 3 in 4 (G0, G3, G4) primarnih osteoblastov istega pacienta ter ponovno vzpostavili primarno kulturo. Generacija 0 predstavlja celice takoj po izolaciji iz vzorca kosti ter je stanje najbolj podobno stanju celic v tkivu. Ko so te celice popolno prekrile dno petrijevke so jih v laboratoriju presadili ter tako ustvarili generacijo 1. Na podoben način pridobimo tudi vse kasnejše generacije.

4.1. GOJENJE PRIMARNIH OSTEOLASTOV

Kulture primarnih osteoblastov smo gojili v laboratoriju za tkivne kulture dokler niso popolnoma prekrili dno 10 cm petrijevke. Tekom tega procesa smo preverjali istovetnost kulture ter določali potencialne kontaminacije.

Za ta namen smo opazovali morebitne spremembe v morfologiji celic in spremembe v hitrosti rasti. Sprememb pri morfologiji med generacijami nismo opazili, celice so se pri vseh generacijah razvijale pravilno, znakov kontaminacije kulture tudi ni bilo. Na fotografiji kulture osteoblastov generacije G0 (40x povečava) je vidno, da so bile celice na dan izolacije RNA skoraj 100% konfluentne, vidna je tudi značilna podolgovata vretenasta morfologija osteoblastov z izrastki (slika 4).



Slika 4: Primarni osteoblasti generacije G0 pri 40x povečavi. Označen je eden izmed osteoblastov podolgovate oblike in z izrastki.

4.2. IZOLACIJA IN MERJENJE KONCENTRACIJE RNA

Ko so celice v vseh generacijah popolnoma prekrile dno petrijevke smo izvedli izolacijo RNA. Za zagotovitev čim večje čistosti izoliranih vzorcev smo celice pred lizo dobro spirali, korake RNA izolacije pa izvajali natančno po protokolu in pod sterilnimi pogoji, s čimer smo zaščitili vzorce pred razkrajanjem z RNazami in morebitno znižanje koncentracije. Izoliranim RNA smo izmerili koncentracijo RNA ter določili čistost (Preglednica II).

Preglednica II: Rezultati merjenja koncentracije RNA.

GENERACIJA	ČAS GOJENJA	KONCENTRACIJA [ng/ μL]	A (260 nm)/ A(280 nm)*	A (260 nm) / A (230 nm)*
G0	14.3.- 26. 4. 2018	207,8	2,04	1,82
G3	14.3.-18.4. 2018	265,9	2,05	2,01
G4	14.3.-4.4. 2018	218,2	2,04	1,90

*Razmerje absorbanc za analizo na mikromreži nad 1.8.

Koncentracije RNA so dovolj ustrezne za nadaljno analizo, prav tako so ustrezna razmerja absorbanc, kar kaže na čistost izolirane RNA. Meritve čistosti ustrezajo minimalnim zahtevam za analizo RNA z mikromrežo, ki je poleg dovolj visoke koncentracije še ustrezno območje razmerij absorbanc. Večjih razlik pri koncentraciji in razmerjih ni bilo, kar pomeni, da je bila izolacija pri vseh treh vzorcih metodološko primerljiva.

4.3. MERJENJE IZRAŽANJA GENOV

Glavni namen te študije je bil določanje sprememb v izražanju genov med generacijami *in vitro* gojenih osteoblastov na nivoju celotnega transkriptoma. Za to smo uporabili metodo mikromrež, ki izmeri izražanje večine genov transkriptoma.

Vzorci za analizo smo pripravili v količinah in pogojih, ki so navedene v preglednici I. V analiznem laboratoriju so najprej izvedli kontrolo kakovosti vzorcev, ki vključuje določanje integritete RNA. Ugotovili so, da je RNA pridobljena iz generacije G0 razgrajena ter tako neprimerna za nadaljnjo analizo. Analizo izražanja genov so tako izvedli le na vzorcih generacij 3 in 4 primarnih osteoblastov (G3 in G4).

Rezultati o ravni izražanja genov so bili podani kot razmerje med stopnjami izražanja genov med G4 in G3 generacijo za vsak transkript (prilogi A in B).

Ker je naš namen ugotoviti, kateri se spreminjajo in kakšna je njihova vloga smo jih razdelili na tiste, pri katerih se izražanje med generacijo G3 in G4 zniža (*ang. downregulated*) in tiste, pri katerih se izražanje med generacijama zviša (*ang. upregulated*), in sicer za več kot 2-krat. Podrobneje smo pogledali gene, ki bi bili lahko povezani s procesi, ki so vključeni pri celičnem staranju, organskimi sistemi, ki jih prizadane staranje in boleznimi, ki so povezane s starostjo in bi lahko bili potencialno povezani s staranjem kosti. Za podatke o genih in povezanih biokemičnih poteh ter bolezenskih stanjih smo uporabili objavljene članke in genske podatkovne baze (npr. portal GeneCards, kjer sem v iskalno polje vpisala ime gena). Izvedli smo še analizo genske ontologije (GO analiza), ki nam pokaže vpletenost genov v signalne poti, biološke procese ter njihovo lokacijo. V preglednici III so navedeni nekateri splošni podatki o genih, katerih izražanje se je pri staranju osteoblastov znižalo ali zvišalo za 2-krat med generacijama primarnih osteoblastov G3 in G4 in so kasneje podrobneje analizirani. S to analizo dobimo pregled nad različno izraženimi geni in razumemo njihovo funkcijo pri mehanizmih celičnega staranja celic ali drugih vidik staranja.

Preglednica III: Geni, katerih izražanje se zniža ali zviša za več kot 2-krat med generacijama primarnih osteoblastov G3 in G4.

GEN	G4/ G3	FUNKCIJA IN PROCESI	POVEZANE BOLEZNI IN STANJA
MMP13 (matriksna metaloproteinaza 13)	-4,41	Encim, ki razgrajuje ekstracelularni matriks (kolagen, fibronektin). Procesi: Embrionalen razvoj, reprodukcija, remodelacija tkiva, celjenje ran, razgradnja hrustanca, razvoj kosti, mineralizacija kosti, popravilo kosti, aktivacija in razgradnja regulatornih proteinov (TGFB1, CTGF) [52].	Artritis, metastaziranje tumorjev, osteoartritis, različni tipi displazij [52].
ENPP1 (pirofosfataza/fosfo diesteraza)	-2,38	Encim (transmembranski glikoprotein), ki veže veliko substratov, npr. fosfodiestrsko vez in pirofosfatno vez nukleotidov. Uravna koncentracije pirofosfata, hidrolizira ATP, sodeluje pri mineralizaciji kosti in kalcifikaciji mehkega tkiva, modulira občutljivost na inzulin [52].	Sladkorna bolezen tipa 2, osifikacija zadnjega vzdolžnega ligamenta torakalnih segmentov, avtosomna dominantna genodermatoza [52].
PLAT (aktivator plazminogena)	-2,92	Serinska proteinaza, ki pretvori plazminogen v plazmid, ki je fibrinolitičen encim. Udeležen je pri migraciji celic in remodelaciji tkiva [52].	Povečano izražanje povezano z hiperfibrinolizo (krvavenje), zmanjšano pa s hipofibrinolizo (tromboza, embolizem). Trombofilija, pljučni embolizem, koronarna tromboza [52].

COL11A1 (alfa 1 veriga kolagena tipa XI)	-2,45	Ta gen kodira eno izmed dveh alfa verig kolagena tipa XI. Kolagen je glavni protein vezivnega tkiva, ki mu daje oporo [52].	Sticklerjev sindrom, Marshallov sindrom [52, 53].
IGHV1-18 (variabilni del teške verige imunoglobulina 1-18)	-2,39	Sodeluje pri prepoznavi antigena. Ob vezavi gena se sproži klonska ekspanzija limfocitov B, ki proizvajajo ustrezna protitelesa [52].	Kronična limfocitna levkemija [52].
ZNF675 (cinkov prst 675)	-2,37	Tip cinkovega prsta, ki so samostojne proteinske domene, ki služijo za stabilizacijo drugih proteinov in kot interaktorji, ki vežejo RNA, DNA in proteine [52].	Bolezni oči, ki lahko prizadanejo tudi kosti [52].
CENPF (centromerni protein F)	-2,36	Protein, ki je del centromerno-kinetohornega kompleksa, sodeluje pri segregaciji kromosomov pri mitozii [52].	Strommov sindrom, črevesna atrezija, bolezen presadka proti gostitelju, mikrocefalija [52].
ITGA8 (Alfa 8 podenota integrina)	-2,30	Heterodimerni transmembranski receptorski proteini. Regulirajo adhezijo celic, preurejanju citoskeleta, aktivacija signalnih poti [52].	Renalna ageneza, Fraserjev sindrom [52].
MED27 (Podenota 27 mediatorskega kompleksa)	-2,26	Podenota CRSP kompleksa, tudi ščitničnega hormonskega receptorja. Regulacija transkripcije od RNA-polimeraze II odvisnih genov [52].	Rak na možganih, adrenalni kortikalni rak, osteosarkom, melanom [52, 54, 55, 56].
KCNAB1 (Beta podenota kalijevega napetostnega kanalčka)	-2,23	Regulirajo izločanje neurotransmitorjev, bitje srca, sekrecija insulina, eksitacijo nevronov, epitelijski elektrolitski transport, krčenje gladkih mišic, volumen celic [52].	Epizodna ataksija, epilepsija, nastanek tumorjev [52, 57].

SHISA3 (Član družine SHISA proteinov)	-2,21	Modulacija WNT/ β -katenin in FGF (fibroblastni rastni dejavnik), tumor supresor [52].	Rak grla, kolorektalni rak, pljučni rak [58, 59, 60].
MMP3 (matriksna metaloproteinaza 3)	-2,06	Encim, ki razgrajuje ekstracelularni matriks (kolagen, fibronektin, laminin, hrustančni proteoglikani). Procesi: Embrionalen razvoj, reprodukcija, remodelacija tkiva, celjenje ran [52].	Artritis, metastaziranja raka, koronarna srčna bolezen, sinovitis, bolezen limfnih vozlov [52].
SLC22A3 (prenašalec 3 družine 22)	-2,01	Prenašalec organskih kationov v jetrih, ledvicah, črevesju in drugih organih. Pomemben pri prenosu nevtrasmeterjev in nevrotoksinov v možganih [52].	Cerebralna paraliza, sladkorna bolezen tipa 1, zloraba amfetamina, ekstragonadaln i seminom [52].
ADCY1 (adenilat ciklaza 1)	2,56	Encim, ki katalizira pretvorbo ATP-ja v nastanek cAMP [52].	Glušost, osteoblastom, avtizem [52, 61].
GCSH (protein H znotraj glicin vezočega sistema)	2,55	Glicin vezoči sistem razgrajuje glicin, in je zgrajen iz štirih mitohondrijskih proteinov [52].	Ne-ketonska hiperglicinemija, glicinska encefalopatija [52].
FBN2 (fibrilin 2)	2,35	Komponenta kalcij vezočih mikrofibril v vezivnem tkivu [52].	Arahnodaktilija, sindrom Marden-Walker, Marfanov sindrom [52, 62].
SCN2A (Alfa 2 podenota natrijevega napetostnega kanalčka)	2,31	Natrijevi napetostni kanalčki uravnavajo akcijski potencial v možganih, mišicah in nevroendokrinih celicah s prenosom natrijevega iona [52].	Avtizem, epileptični napadi [52, 63].

SCN2B (Beta 2 podenota natrijevega napetostnega kanalčka)	2,30	Natrijevi napetostni kanalčki uravnavajo akcijski potencial v možganih, mišicah in nevroendokrinih celicah s prenosom natrijevega iona [52].	Brugada sindrom, atrijska fibrilacija [52].
WDR63 (domena 63 WD ponovitve)	2,26	Strukturni motiv 40 aminokislin, udeleženi pri prenosu signala, regulaciji transkripcije, interakciji medproteini, apoptozi... [64].	Hematometra [52].
OMD (osteomodulin)	2,08	Vključen v procesu mineralizacije kosti, pritrja osteoblaste preko integrina [52, 65, 66].	Hallermann-Streiff sindrom, makularna distrofija [52].
IGKV1-12 (variabilni del težke verige imunoglobulina 1-12)	2,03	Sodeluje pri prepoznavi antigena. Ob vezavi gena se sproži klonska ekspanzija limfocitov B, ki proizvajajo ustrezna protitelesa [52].	Ni podatkov
IGHM (konstanti del težke verige imunoglobulina Mu]	2,02	Del imunoglobulina, ki ima vlogo prepoznave antigena. Ob vezavi antigena se sproži klonska ekspanzija limfocitov B, ki proizvajajo ustrezna protitelesa [52].	Agamoglobulinemija, bolezen težkih verig, hipogamaglobulinemija, krioglobulinemija [52].
ZFP90 (cinkov prst 90)	2,01	Tip cinkovega prsta, ki so samostojne proteinske domene, ki služijo za stabilizacijo drugih proteinov in kot interaktorji, ki vežejo RNA, DNA in proteine. Sodelujejo pri regulaciji transkripcije. ZPF90 je ključen transkripcijski faktor, ki uravnava delovanje HMC [52, 67].	Paraplegija, optična atrofija, nevropatija, anemija [52, 68].
ZNF676 (cinkov prst 676)	2,01	Tip cinkovega prsta, ki so samostojne proteinske domene, ki služijo za stabilizacijo drugih proteinov in kot interaktorji, ki vežejo RNA, DNA in proteine. Sodelujejo pri regulaciji transkripcije. ZNF676 sodeluje pri regulaciji homeostaze telomer [52, 67, 69].	Angioimunoblastni T-celični limfom [70].

4.3.1. Geni z nižjim izražanjem med staranjem osteoblastov med generacijama G3 in G4

Podrobneje smo raziskali gene iz preglednice III, katerih izražanje se je znižalo med generacijama primarnih osteoblastov G3 in G4, njihovo funkcijo, udeležena bolezenska stanja ter njihovo morebitno vpletenost v mehanizme celičnega staranja, mehanizme staranja kosti ali ostale vidike staranja.

- **MATRIKSNA METALOPROTEINAZA 13 in 3 (MMP13 in MMP3)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: -4,41 (MMP13), -2,06 (MMP3).

Matriksne metaloproteinaze so encimi, ki razgrajujejo ekstracelularni matriks (npr. kolagen, fibronektin, laminin, hrustančne proteoglikane). Udeležene so pri reprodukciji, embrionalnem razvoju, remodelaciji tkiva in celjenju ran. MMP13 je povezana z razgradnjo hrustanca, embrionalnim razvojem kosti, mineralizacijo in popravljanjem poškodb kosti ter aktivacijo in razgradnjo regulatornih proteinov (TGFB1, CTGF).

Povezani sta z nekaterimi kostnimi boleznimi kot je artritis, sodelujeta pa tudi pri iniciaciji nastanka in metastaziranju tumorskih celic [52]. Pri bolnikih z osteoartritisom so odkrili preveliko izražanje miRNA206, ki v hondrocitih povzroči preveliko izražanje MMP13 in posledično vodi v patološke procese [71]. Spremenjeno izražanje je povezano tudi z nastankom, invazivnostjo in napredovanjem kolorektalnega raka [72].

- **PIROFOSFATAZA/FOSFODIESTERAZA (ENPP1)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: -2,98

ENPP1 je encim (transmembranski glikoprotein), ki veže različne substrate, kot sta npr. fosfodiesteraska vez in pirofosfatna vez v nukleotidu. Ima pomembno vlogo pri uravnavanju koncentracije pirofosfata in sodeluje pri mineralizaciji kosti in kalcifikaciji mehkega tkiva. Regulira tudi purinergično signaliziranje in modulira občutljivost na inzulin, zaradi česar so nekateri polimorfizmi tega gena povezani s pojavom sladkorne bolezni tipa 2 [52, 73].

ENPP1 deluje kot represor patološke kalcifikacije, pri osteoartritisu je izražanje tega gena znižano zato povzroči kalcifikacijo sklepov [74]. Ena izmed mutacij tega gena pa je povezana s povečanim tveganjem za koronarno srčno bolezen [75].

- **AKTIVATOR PLAZMINOGENA (PLAT)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: -2,92

PLAT pretvori neaktivni proencim plazminogen v plazmin, ki deluje kot fibrinolitični encim. Encim je povezan z migracijo celic ter remodelacijo. Njegovo znižano izražanje ima lahko za posledico hipofibrinolizo in posledično trombozo in pljučni embolizem, zvišano pa hiperfibrinolizo, ki ima za posledico povečano krvavenje [52].

- **ALFA 1 VERIGA KOLAGENA TIP A XI (COL11A1)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: -2,46

COL11A1 kodira eno izmed dveh verig kolagena tipa XI, ki se večinoma nahaja v hrustancu, tetivah, skeletnih mišicah, maternici, pljučih in neopiteliju možganov [53]. Spremembe funkcije ali količine tega proteina lahko pomembno vplivajo na strukturo vezivnega tkiva. Mutacije tega gena so povezane s Sticklerjevim sindromom, ki prizadane kosti in sluh, Marshallovim sindromom, ki prizadane vid, sluh in povzroči ektodermalne abnormalnosti, ter fibrohondrogenozo, ki se kaže v spremenjenih oblikah kosti [52]. Določeni SNP-ji tega gena naj bi imeli vpliv na razvoj osteoartritisa preko vpliva na WNT/ β -katenin signalno pot [76].

- **VARIABILNI DEL TEŽKE VERIGE IMUNOGLOBULINA 1-18 (IGHV1-18)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: -2,39

Mutacije ali spremenjeno izražanje tega gena lahko vodijo v spremenjeno funkcijo imunoglobulinov. BCR igrajo vlogo pri razvoju kronične limfocitne levkemije, zato bi lahko imunogeneske analize ter somatske mutacije teh receptorjev lahko uporabili za prognostiko in karakterizacijo te bolezni [77].

- **CINKOV PRST 675 (ZNF675)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: -2,37

Cinkovi prsti so samostojne proteinske domene s cinkovim ionom za stabilizacijo, vežejo DNA, RNA, nekateri pa tudi služijo kot mediatorji protein-protein interakcij in uravnavajo transkripcijo [52, 67]. Delujejo v povezavi s faktorji, povezani s tumorsko nekroznimi receptorji (TRAF), ki uravnavajo prenos signala [52, 78].

- **CENTROMERNI PROTEIN F (CENPF)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: -2, 36

CENPF je del jedrnega matriksa povezan z nastankom centromerno-kinetohornega kompleksa, ki pri mitozu omogoča segregacijo kromosomov na dve hčerinski celici z vezavo mikrotubulov, regulira pa tudi recikliranje plazemske membrane s povezavo med reciklirnimi vezikli in mikrotubuli in regulira DNA sintezo. Nepritrjen kinetohor je signal za mitotsko kontrolno točko, zato je to tudi pomemben del kontrole celičnega cikla. Nefunkcionalen protein CENPF je povezan z nastankom nekaterih vrst rakov (rak prostate, hepatocelularni rak, rak mehurja) [52, 79, 80, 81].

- **ALFA 8 PODENOTA INTEGRINA (ITGA8)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: -2,30

Integrini so transmembranski receptorski mehanski proteini, ki pritrjujejo citoskelet na zunajcelični matriks in tako sodelujejo pri adheziji in migraciji celic, interakciji med celicami, preurejanju citoskeleta in prenosu signala [52, 82]. Ta gen kodira protein ITGA8 ki ima pomembno vlogo pri celjenju ran, organogenezi in regulaciji migracije MMC v epitelijske strukture, kar je predvsem pomembno pri tvorbi ledvic, zato so mutacije v tem genu povezane z ledvičnimi boleznimi [52].

- **PODENOTA 27 MEDIATORSKEGA KOMPLEKSA (MED27)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: -2,26

Mediator je kompleks proteinov, ki uravnava transkripcijo od RNA polimeraze II odvisnih genov (snRNA, miRNA). Interagira z RNA polimerazo II in transkripcijskimi dejavniki, in tako deluje kot represor ali aktivator transkripcije [52, 83]. MED27 se možno izraža v celicah adrenalnega kortikalnega tumorja, inhibicija te podenote inducira apoptozo tumorskih celic adrenalnega kortikalnega raka in zmanjša njegovo metastaziranje, invazijo in proliferacijo. Povezana je z regulacijo ekspresije proteinov WNT/ β -katenin signalne poti [68].

- **BETA PODENOTA KALIJEVEGA NAPETOSTNEGA KANALČKA (KCNAB1)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: -2,23

Kalijevi kanalčki predstavljajo najbolj kompleksno skupino napetostno-odvisnih kanalčkov, saj sodelujejo pri različnih celičnih procesih kot npr. regulacija izločanja neurotransmiterjev in hormonov, bitje srca, izločanje inzulina, transport elektrolitov, krčenje gladkih mišičnih celic, volumen celic, regulacija apoptoze, regulacija rasti in diferenciacije celic [52, 57].

- **ČLAN DRUŽINE SHISA PROTEINOV 3 (SHISA3)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: -2,21

SHISA 3 je eden od devetih SHISA proteinov, ki so transmembranski adaptorji, podobni transkripcijskim faktorjem, ki uravnavajo delovanje WNT/ β -katenin in FGF signalne poti z inhibicijo post-translacijskih modifikacij in prenosa receptorjev teh poti na površino celice in razgradnjo β -katenina in tako deluje tudi kot tumor supresor [52, 58, 84].

- **PRENAŠALEC ORGANSKIH KATIONOV (SLC22A3)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: -2,013

Spada v družino prenašalcev organskih kationov v jetrih, ledvicah, črevesju in drugih organih v obliki integralnega membranskega proteina. Pomembno vpliva na prenos neurotransmiterjev in nevrotoksinov v možganih, zato je povezan z nekaterimi možganskimi obolenji. Okrnjena funkcija tega prenašalca, bi lahko povzročila obolenja organov, kjer se nahaja in opravlja svojo funkcijo [52].

4.3.2. Geni z višjim izražanjem med staranjem osteoblastov med generacijama G3 in G4

Podrobneje smo raziskali gene iz preglednice III, katerih izražanje se je zvišalo med generacijama primarnih osteoblastov G3 in G4, njihovo funkcijo, udeležena bolezenska stanja ter njihovo morebitno vpletenost v mehanizme celičnega staranja, mehanizme staranja kosti ali ostale vidike staranja.

- **ADENILAT CIKLAZA 1 (ADCY1)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: 2,56

Adenilat ciklaze so encimi, ki so znotraj plazemske membrane in ob stimulaciji (npr. z vezavo hormona na receptor) katalizirajo pretvorbo ATP-ja v cAMP in pirofosfat. CAMP deluje kot sekundarni prenašalec pri prenosu signala, saj se poveže s transkripcijskimi faktorji ali drugimi encimi. Zaradi pomembnosti pri prenosu signala je povezana z nekaterimi boleznimi kot so hipertenzija in sladkorna bolezen [52, 85]. Adenilat ciklaza 1 sodeluje pri razvoju možganov in se tam tudi primarno izraža. Povečano izražanje lahko povzroči neodzivnost na stimulacijo nevronov, zato je povezana z nekaterimi procesi v centralnem živčevju in obolenji (avtizem, gluhost). Preko kalmodulina se odziva na koncentracije kalcija, opisana pa je tudi povezava z nastankom osteoblastoma [52, 61].

- **PROTEIN H ZNOTRAJ GLICIN VEZOČEGA SISTEMA (GCSH)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: 2,56

Glicin vezoči sistem je odgovoren za razgradnjo glicina in je sestavljen iz štirih mitohondrijskih proteinov (P, H, T in L) [52]. Glicin je najbolj zastopana aminokislina v kolagenu, uporablja se za sintezo porfirinov in purinov in je inhibitorni nevrottransmitter. Mutacije v genu za protein H lahko povzročijo hiperglicinemijo [52, 86].

- **FIBRILIN 2 (FBN2)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: 2,35

Fibrilin 2 je ekstracelularni glikoprotein in ima dve vlogi. Kot strukturni protein je del kalcij vezočih mikrofibril in je udeležen pri sestavljanju elastičnih vlaken. Pomemben je za razvoj vezivnega tkiva, zato mutacije gena za protein lahko povzročijo nekatera obolenja vezivnega tkiva npr. arahnodaktilija, sindrom Marden-Walker, Marfanov sindrom.

Fibrilin 2 deluje pa tudi kot regulator kostne resorpcije, pomemben je pri proliferaciji osteoprogenitornih celic in diferenciaciji osteoblastov z uravnavanjem TGF- β in BMP, ki so del signalne poti za diferenciacijo osteoblastov in stimulirajo sproščanje RANKL. Motnje te signalne poti imajo lahko za posledico metastaziranje tumorja in osteoartritis [52, 62, 87].

- **ALFA 2 IN BETA 2 PODENOTI NATRIJEVEGA NAPETOSTNEGA KANALČKA (SCN2A in SCN2B)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: 2,31 (SCN2A), 2,30 (SCN2B)

Natrijevi kanalčki s prenosom natrijevih ionov skozi membrano uravnavajo akcijski potencial in s tem prenos električnih signalov med celicami. Sestavljeni so iz alfa in beta podenot, katerih mutacije se odražajo kot kanalopatije, ki imajo lahko za posledico hiper ali hipo ekscitacijo, in vodijo v bolezni možganov, mišic in srca [52, 63].

- **DOMENA 63 WD PONOVIŠČE (WDR63)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: 2,26

WD ponovitve so pogosti proteinski strukturni motivi, ki delujejo kot adaptorji za protein-protein in protein-DNA interakcije in tako sodelujejo pri različnih pomembnih funkcijah kot so interakcija med proteini, apoptoza, regulacija transkripcije, RNA procesiranje, sestava citoskeleta, znotrajcelični transport, remodelacija kromatina, kontrola celičnega cikla in transdukcija signala. Primer takega kompleksa so G proteini, ki sodelujejo pri prenosu signalov v celico [64, 88, 89]. WD 63 je udeležena pri diferenciaciji MMC v osteoblaste s spodbujanjem mineralizacije in aktivacijo transkripcijskih faktorjev OSX in RUNX2, ki sta osrednja pri osteogeni diferenciaciji [90]. Spremembe izražanja genov za te ponovitve in spremembe njihovih funkcij lahko vplivajo na motnje v teh procesih.

- **OSTEOMODULIN (OMD)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: 2,08

Osteomodulin (imenovan tudi osteoadherin proteoglikan) je del ekstracelularnega matriksa (ECM) in sodeluje pri organizaciji le-tega (spremeni obliko kolagena, vpliva na mineralizacijo kosti in sodeluje pri vzdrževanju ravnotežja med delovanjem osteoblastov in osteoklastov pri kostni remodelaciji, saj se pri resorpciji kosti sprosti iz matriksa. Pritrja osteoblaste na ECM z integrini, In vitro pospeši diferenciacijo osteoblastov in zmanjša njihovo proliferacijo in migracijo [52, 65, 66]. Okrnjena funkcija tega proteina lahko vodi do obolenj, pri katerih je okrnjena rast, kot je Hallermann-Streiff sindrom [52].

- **VARIABILNI DEL TEŽKE VERIGE IMUNOGLOBULINA 1-12 (IGKV1-12) IN KONSTANTI DEL TEŽKE VERIGE IMUNOGLOBULINA MU (IGHM)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: 2,03 (IGKV1-12), 2,02 (IGHM)

Sta del imunoglobulinov, ki sodelujejo pri prepoznavi antigena in humoralni imunosti. Mutacije ali spremenjeno izražanje bi lahko vodilo v spremenjeno funkcijo imunoglobulinov, spremenjeno izražanje IGHM je povezano z agamoglobulinemijo, boleznijo težkih verig, hipogamaglobulinemijo in krioglobulinemijo [52].

- **CINKOV PRST 90 (ZFP90) IN CINKOV PRST 676 (ZNF676)**

Spremenjeno izražanje med G4 in G3: 2,01 (ZFP90), 2,01 (ZNF676)

ZFP90 je pomemben transkripcijski faktor, ki uravnava delovanje KMC. ZFP90 z delovanjem na transkripcijski faktor Hoxa9, uravnava ravnotežje med samobnavljanjem in diferenciacijo KMC [68]. ZNF676 sodeluje pri vzdrževanju dolžine telomer na dva načina: S svojo zmožnostjo interakcije RNA/proteini vpliva na ekspresijo teh genov, lahko pa stabilizira G-kvadrupleks strukturo na koncu telomer in tako onemogoča podaljševanje s telomerozo [69].

4.3.3. Spremembe v izražanju nekodirajočih RNA

Poleg transkriptov, ki kodirajo proteine, so bili med geni, katerih izražanje se spreminja med generacijama G4 in G3, tudi geni za različne vrste nekodirajočih RNA:

- miRNA: mikro RNA, ki so kratke nekodirajoče RNA, ki so vključene v post-transkripcijski regulaciji izražanja genov.
- lncRNA: dolge nekodirajoče RNA, katerih funkcija še ni točno poznana, nekatere so udeležene pri karcinogenezi, ne kodirajo proteina, lahko pa so citoplazemske ali jedrne.
- SnoRNA/SNORA: majhne nukleolarne RNA, ki sodelujejo pri modifikaciji in procesiranju RNA [52, 91, 92].

Večinoma funkcija in morebitne povezane bolezni s specifičnimi vrstami teh RNA niso poznane.

V preglednici II so zbrane miRNA, lncRNA in snoRNA, katerih izražanje se med generacijama G4 in G3 spreminja za več kot 2-krat. Veliko jih je povezanih z nastankom raka, nekaj pa je potencialno povezanih tudi s kostmi:

-miRNA 488 (-2,16) : Inhibira proliferacijo in invazijo osteosarkoma [93]. Pri osteoartritisu negativno regulira delovanje MMP-13 indirektno preko prenašalca cinka (ZIP8) in tako zmanjša razgradnjo hrustanca [94].

-miRNA 4328 (2,18): Vloga pri osteogeni diferenciaciji in s silo inducirani formaciji kosti z delovanjem na ekspresijo genov, udeleženih pri teh procesih [95].

Preglednica IV: Podatki o RNA, katerih izražanje se zniža ali zviša za več kot 2-krat med generacijama primarnih osteoblastov G3 in G4.

RNA	RAZMERJE FLUORESCENCE G4/G3	FUNKCIJA, TARČE	POVEZANE BOLEZNI
LncRNA 1388	-2,89	Ni podatkov	Ni podatkov
MiRNA 3170	-2,74	Ni podatkov	Rak maternice, zmanjšana ekspresija pri karcinomu Merklvih celic [52, 96].
MiRNA 518a-1	-2,70	Ni podatkov	Ni podatkov
MiRNA 378d-1	-2,69	Ni podatkov	Ni podatkov
SNORA 14A	-2,68	Pseudorudilacija 18S ribosomske RNA [52].	Ni podatkov
LncRNA 1614	-2,66	Ni podatkov	Ni podatkov
MiRNA 548o-2	-2,58	Ni podatkov	Ni podatkov
LncRNA 1436	-2,41	Ni podatkov	Ni podatkov
MiRNA 516a-1	-2,34	Ni podatkov	Ni podatkov
SNORA 70E	-2,32	Ni podatkov	Ni podatkov
SUMO1P3 lncRNA	-2,28	Ni podatkov	Rak želodca, rak mehurja, rak dojk [52, 97]

SNORA 11	-2,24	Psevdouridilacija rRNA in snRNA [52]	Bartterjev sindrom, povečano izražanje pri ameloblastomu [52, 98].
SNAR-D	-2,20	Ni podatkov	Ni podatkov
LncRNA 1068	-2,19	Ni podatkov	Ni podatkov
MiRNA 200C	-2,19	Ni podatkov	Rak endometrija, rak želodca, pljučni rak, rak jajčnikov, zmanjšano izražanje pri kolorektalnem raku, vloga pri nastanka in metastaziranju glioma [52, 99, 100].
SNORD114-29	-2,18	Ni podatkov	Ni podatkov
MiRNA 488	-2,16	Tarče: akvaporin 3, prenašalec cinka ZIP8 (in preko njega na MM-13) [93, 94].	Panična motnja, povečano izražanje inhibira proliferacijo in invazijo osteosarkoma, potencialni prognostični marker pri raku dojke, zmanjša razgradnjo hrustanca pri osteoartritisu [52, 93, 94, 101].
MiRNA 3941	-2,14	Tarče: IGF-2, IGBP1 [102, 103]	Zmanjšano izražanje pri akutni pljučnici, inhibira progresijo adenokarcinoma pljuč

			preko delovanja na IGBP1 [102, 103].
MiRNA 4520-2	-2,12	Ni podatkov	Ni podatkov
MiRNA 892A	-2,10	Negativni regulator izražanja citokroma CYP1A1, regulacija ekspresije CD226 [104, 105].	Promocija hepatocelularnega raka z vplivanjem na izražanje CD226 [105].
MiRNA 495	-2,10	Negativni regulator izražanja protoonkogene UBE2C [106].	Epitelijski rak jajčnikov, mišična distrofija, Pri pljučnem raku zmanjša izražanje protoonkogene UBE2C [52, 106].
MiRNA 548T	-2,06	Ni podatkov	Povečano izražanje povezano s ponovitvijo raka dojka [107].
KCNQ1OT1	-2,06	Interagira s kromatinom, regulira transkripcijo genov preko epigenetskih modifikacij [108].	Beckwith-Wiedemann sindrom, kolorektalni rak, ledvični rak, akutni miokardni infarkt [52, 108].
LncRNA 889	-2,06	Ni podatkov	Ni podatkov

MiRNA 4524a	-2,02	Negativni regulator izražanja laktat dehidrogenaze [109].	V rakavih celicah (npr. kolorektalni rak) regulira glikolizo preko zmanjšanja izražanja laktat dehidrogenaze [109].
RORA-AS1	-2,00	Ni podatka	Ni podatka
MiRNA 921	3,91	Deluje kot tumor-supresor [110].	Supresija metastaziranja tumorja pri raku mehurja [110].
LncRNA 1111	2,67	Ni podatkov	Ni podatkov
MiRNA 310c-1	2,63	Ni podatkov	Ni podatkov
MiRNA 548AK	2,51	Tarče: IFNL1, IL-29 (citokina udeležena pri antivirusni obrambi), jedrni hormonski receptorji [111, 112].	Panencefalitis [111].
MiRNA 1224	2,47	Tarča: Transkripcijski faktor SP-1 [113].	Keratokonius [113].
MiRNA 3908	2,43	Tarča: Adiponektinski receptor 1 [114,115].	Rak dojk, glioblastom [114, 115].

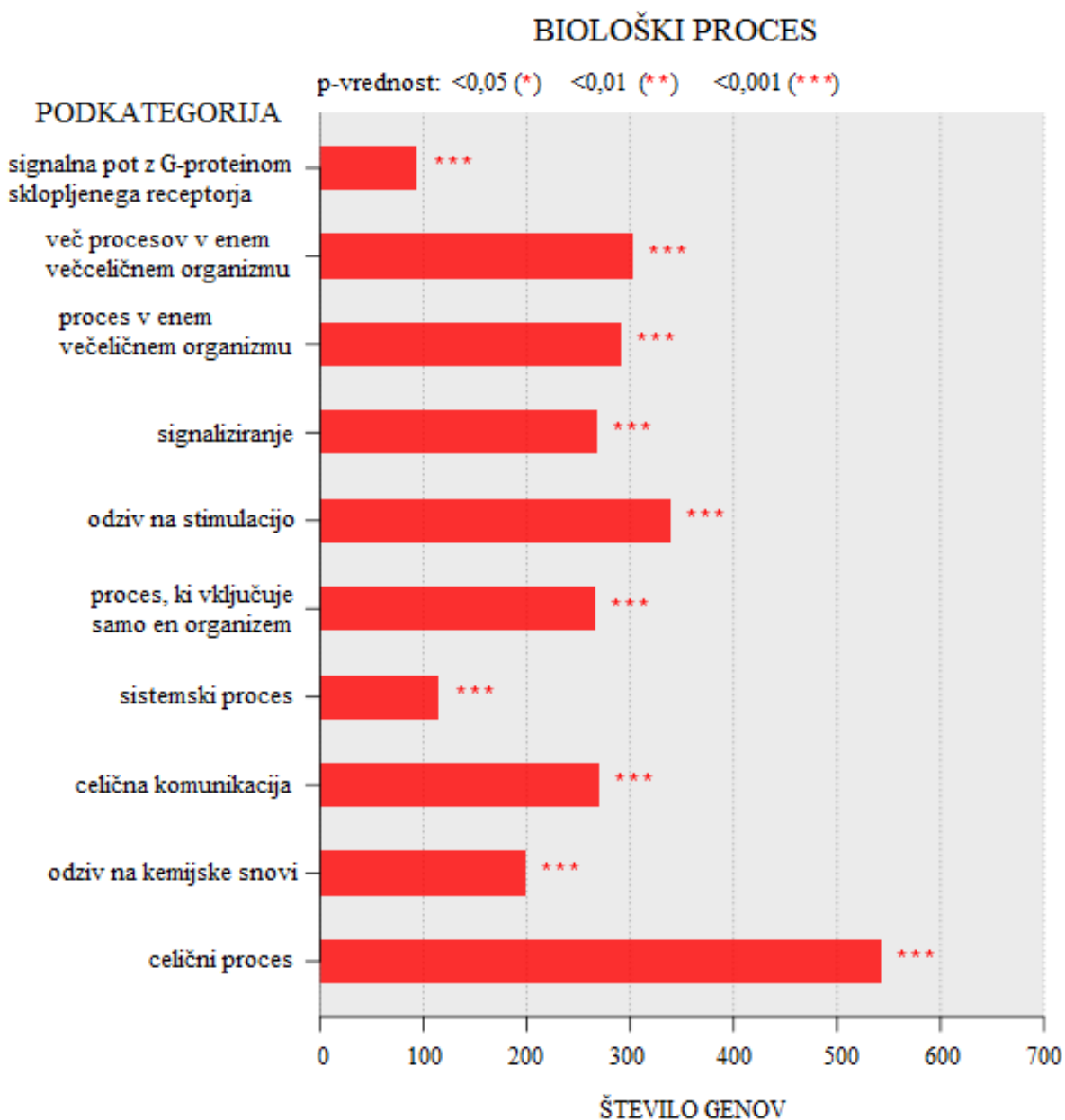
			.
LncRNA 2539	2,30	Ni podatkov	Želodčni adenokarcinom, sistemski lupus eritematozus, karcinom skvamatskih celic [52].
LncRNA 1643	2,24	Ni podatkov	Ni podatkov
MiRNA 548A1	2,24	Ni podatkov	Ni podatkov
MiRNA 4279	2,19	Ni podatkov	Ni podatkov
MiRNA 4328	2,18	Celična proliferacija, vloga pri osteogenski diferenciaciji in s silo inducirani formaciji kosti [95].	Metastaziranje, progresija tumorja [95].
LncRNA 645	2,14	Ni podatkov	Rak endometrija [116].
SNORD18B	2,13	Ni podatkov	Ni podatkov
MiRNA 649	2,13	Ni podatkov	Okužba s herpes simpleks virusom tipa 1 [117].
MiRNA 4661	2,09	Post-transkripcijska regulacija IL-10 [118].	Avtoimunske bolezni (sistemski lupus eritematozus, astma) [118].
MiRNA 431	2,04	Post-transkripcijsko regulira izražanje	Avtizem [52].

		efektorja TFG- β signaliziranja in je tako udeležena pri ohranjanju miogenske kapacitete skeletnih mišic [119].	
MAPT-AS1 (MAPT protismiselna nekodirajoča RNA)	2,03	Regulator izražanja MAPT gena (z mikrotubuli povezan protein Tau) [120, 121]	Parkinsonova bolezen, rak dojke [52, 120, 121].
RPS15AP10 (pseudogen gena ribosomskega proteina S15a, lncRNA)	2,03	Ni podatkov	Ni podatkov
MicroRNA 4718	2,02	Ni podatkov	Ni podatkov
LncRNA	2,00	Ni podatkov	Ni podatkov

4.4. GO ANALIZA PROFILA IZRAŽENIH GENOV V PRIMARNIH OSTEOLASTIH

GO analiza izhaja iz klasifikacije genov po genski ontologiji [122]. Uporablja se pri interpretaciji rezultatov izražanja genov, ko so nekateri bolj ali manj izraženi med različnimi vzorci. V tej klasifikaciji so geni razdeljeni glede na različne kategorije: biološki proces (širši proces, ki je dosežen z sodelovanjem večjega števila molekularnih funkcij večjega števila produktov), molekularna funkcija (proces oz. aktivnost, ki ga izvaja produkt, običajno z direktni interakcijami z drugimi molekulami) in celično komponento (lokacija kjer se ta produkt nahaja in izvaja svojo funkcijo). Za vsake element (določen biološki proces, molekularno funkcijo ali celično komponento) v GO bazi so določeni geni, ki sestavljajo ta element.

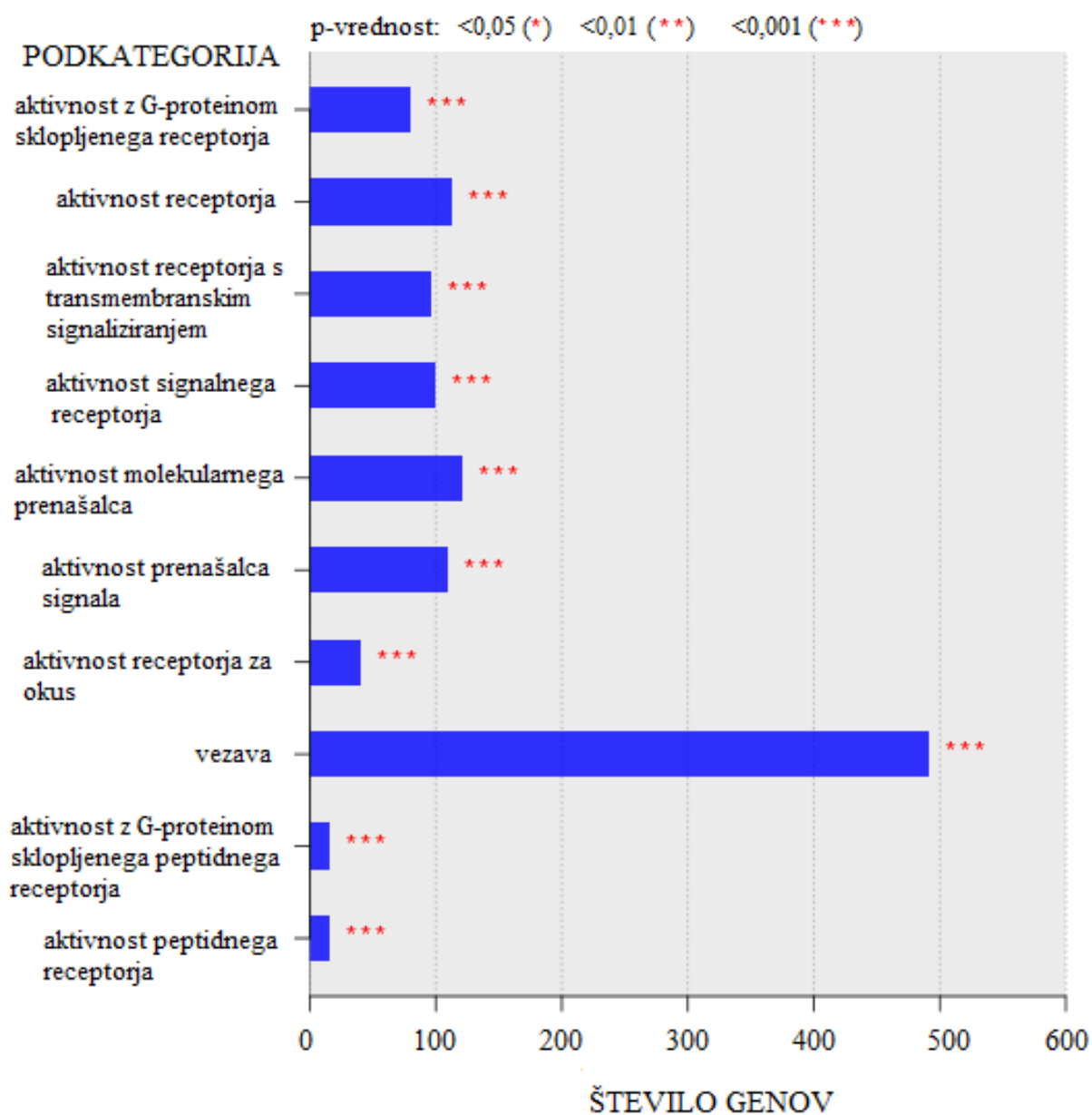
Ko analiziramo kateri geni iz določenega elementa so prisotni v večjem razmerju glede na celoten transkriptom lahko sklepamo, da naš eksperimentalni faktor vpliva na ta element. GO analiza poda tudi statistično vrednotenje teh razmerij. Na slikah 5, 6 in 7 je prikazanih 10 elementov z najvišjo spremembo za vsako kategorijo [122, 123].



Slika 5: Rezultati GO analize kategorije biološki proces.

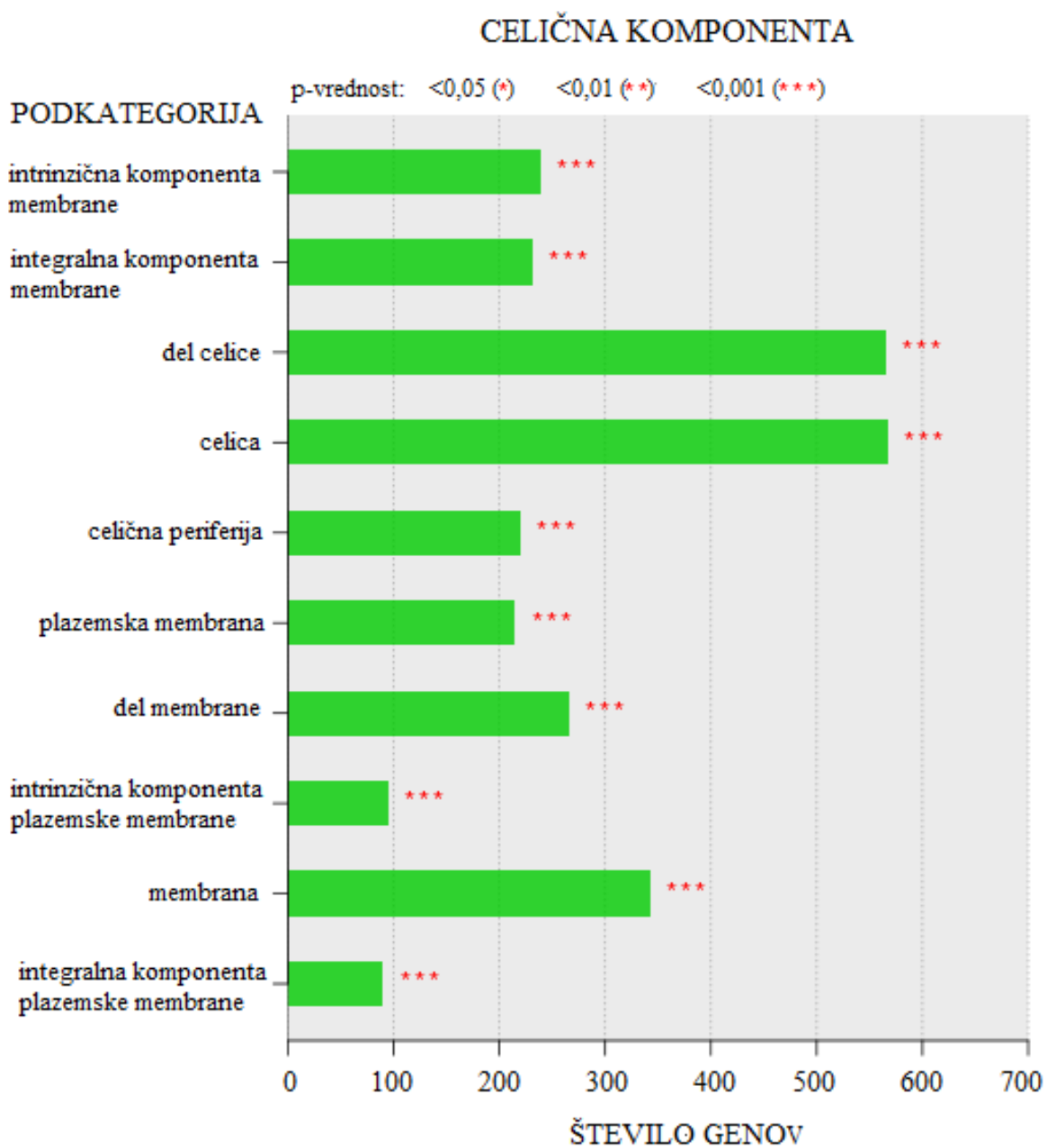
Med biološkimi procesi (slika 5) lahko opazimo povečan vpliv na signalizacijo (npr. preko z G-proteinom sklopljenih receptorjev) pogosti pa so tudi geni, ki sodelujejo pri odzivu na stimulacijo, celični komunikaciji in odzivu na kemijske snovi. Prevladujejo celični procesi nad sistemskimi.

MOLEKULARNA FUNKCIJA



Slika 6: Rezultati GO analize kategorije molekularna funkcija.

Med molekularnimi funkcijami (slika 6) so najbolj zastopani geni, ki so udeleženi pri vezavi molekul na druge. Opazimo tudi povečan vpliv genov, katerih produkti imajo aktivnosti molekularnih prenašalcev, podkategorije teh pa so različne vrste receptorjev (z G-proteinom sklopljeni, receptorji s transmembranskim signaliziranjem, signalni receptorji, peptidni receptorji).



Slika 7: Rezultati GO analize kategorije celična komponenta.

Med celičnimi komponentami (slika 7) opazimo povečan vpliv genov, katerih produkti so del celice. Najbolj zastopani so deli celice in sicer intrinzične ali integralne komponente membrane.

5. RAZPRAVA

5.1. IZOLACIJA, MERJENJE KONCENTRACIJE IN KONTROLA KAKOVOSTI RNA

Pri izolaciji RNA so bile koncentracije ter čistosti vseh treh vzorcev (G0, G3 in G4) dovolj ustrezne za nadaljno analizo, večjih razlik pri koncentracij in čistosti ni bilo, izolacija je bila pri vseh treh vzorcih metodološko primerljiva. Pri kontroli kakovosti pred analizo z mikromrežami za določanje integritete RNA so ugotovili, da je RNA pridobljena iz G0 generacije osteoblastov razgrajena in zato neprimerna za analizo. Čeprav smo vzorce poslali pod ustreznimi in zahtevanimi pogoji, je vseeno prišlo do razgradnje. Možen vzrok je razgradnja z RNAzami že takoj po izolaciji, kljub temu da smo vzorec takoj shranili na -80°C. Lahko bi prišlo do razgradnje med shranjevanjem, čeprav je po navodilih proizvajalca kompleta za izolacijo RNA pod pogojem da je ustrezno shranjena, ta stabilna eno leto po izolaciji. Možna pa je tudi razgradnja RNA med pripravo na transport ali transportom samim.

5.2. SPREMENJENO IZRAŽANJE GENOV V POVEZAVI S CELIČNIM STARANJEM

Ob pregledu produktov genov, katerih izražanje se je med generacijama spremenilo za 2-krat, smo želeli ugotoviti, ali so kateri povezani z že znanimi mehanizmi celičnega staranja (iniciacija staranja, antagonistične karakteristike, integralne karakteristike).

GO analiza v kategoriji bioloških procesov je pokazala, da je največ različno izraženih genov tistih, katerih produkti sodelujejo v celični komunikaciji, signaliziranju, odzivu na stimulacijo iz okolja in odzivu na kemične snovi (Graf 1). Podobno kažejo rezultati tudi GO analize kategorije molekularnih funkcij (Graf 2), pri kateri je najbolj zastopana podkategorija aktivnosti receptorjev (z G-proteinom sklopljenih, transmembranskih in peptidnih) in vezave, ki omogoča interakcijo med molekulami. GO analiza je pokazala, da so v kategoriji celičnih komponent (graf 3), najbolj zastopani deli celice in membrane (intrinzične in integralne komponente), kar je skladno z rezultati GO analize bioloških procesov in molekularnih procesov. To bi lahko pomenilo, da je glavna komponenta, katere spremembe se najbolj odražajo na staranju celic, ravno plazemska membrana.

Ugotovili smo, da se spreminja izražanje nekaterih genov, ki so udeleženi tudi pri drugih opisanih komponentah staranja, ki v GO analizi niso bili med najbolj zastopanimi (spremembe proteostaze, organizacije celičnega matriksa, organizacije strukture kromosomov, nadzora celičnega cikla, ohranjanja dolžine telomer, funkcije in ohranjanja matičnih celic in v mitohondrijskem delovanju). Primeri takih genov so navedeni spodaj. Veliko je genov za nekodirajoče RNA, nekaj genov pa bi lahko bilo povezanih tudi z imunološkim in nevroendokrinim vidikom staranja.

Spremembe celičnega signaliziranja, spremembe odziva na stimulacijo in celični transport

Celično signaliziranje je pomemben del funkcije celic, v procesu katerega se prenašajo signali med celicami in znotraj celicam s pomočjo različnih prenašalcev, med katerimi so med najbolj pomembnimi celični receptorji, del celičnega signaliziranja pa je tudi odziv na stimulacijo iz okolja in odziv na kemične snovi.

Rezultati GO analize (slika 5, slika 6) kažejo, da pride pri staranju celic do sprememb pri izražanju genov za komponente teh receptorjev in ostalih komponent signaliziranja, povezanih z receptorji, ki prenesejo signale do drugih celic oz. do jedra celice.

Nekateri primeri takih proteinov so fosfodiesteraza (zmanjšano izražanje), ki deluje kot transmembranski protein in regulira purinergično signaliziranje in signaliziranje inzulinskega receptorja (in tako modulira odziv na koncentracijo inzulina), aktivator plazminogena (zmanjšano izražanje), ki je regulator signalne poti trombocitov, cinkov prst 675 (zmanjšano izražanje), ki je neg. regulator TNF signalne poti, neg. regulator JAK kaskade in neg. regulator IL-1 signalne poti, integrin (zmanjšano izražanje), ki je pozitiven regulator TGB- β signalne poti in je del integrinskega signaliziranja, je pa tudi pomemben del adhezije celice na celico in s tem komunikacije med celicami, shisa protein 3 (zmanjšano izražanje), ki uravnava delovanje WNT/ β -katenin in FGF signalne poti in adenilat ciklaza 1 (povečano izražanje), ki sodeluje pri cAMP signaliziranju [52, 75, 82, 84, 85, 122].

Nekateri primeri proteinov in komponent proteinov, ki so udeleženi pri odzivu na stimulacijo oz. okolje, in katerih genih se različno izražajo so metaloproteinaza 13 (zmanjšano izražanje), ki se odziva na mehansko stimulacijo, metaloproteinaza 3 (zmanjšano izražanje), ki sodeluje pri odzivu na koncentracije NO, aminokislinsko stimulacijo in oksidativni stres, aktivator plazminogena (zmanjšano izražanje), ki sodeluje pri odzivu na hipoksijo in peptidne hormone, adenilat ciklaza 1 (povečano izražanje), ki se odziva na koncentracijo kalcija, fibrilin 2 (povečano izražanje), ki se odziva na rastne faktorje in podenoti natrijevega napetostnega kanalček (povečano izražanje), ki se odzivata na osmotski stres [52, 61, 63, 122]. Celica se lahko ob neustreznem zaznavanju stimulansov in svoje okolice neustrezno odzove in nima komunikacije s svojo okolico, na stresorje kot je oksidativni stres se lahko neustrezno zaščiti in zato pride do okvar njene funkcije, kar je lahko del mehanizma staranja.

Pri receptorskem signaliziranju imajo lahko vpliv na funkcijo preveč ali premalo izražene komponente celičnega signaliziranja, saj pri zmanjšani funkciji pride do premajhne stimulacije celic, celica nima komunikacije z okolico, se neustrezno zaščiti, ne zaznava ustrezno hranil in tako lahko pride do okvar funkcije in prezgodnje senescence. Pri povečani pa se lahko razvije rezistenca na stimulant npr. inzulin (polimorfizem v genu za fosfodiesterazo je povezan z razvojem sladkorne bolezni tipa 2) [73].

S procesom signaliziranja je povezan tudi celični transport, preko katerega se iz celice dovajajo potrebne snovi (npr. elektroliti) in preko katerega se celica znebi nepotrebnih snovi. Tudi v tej kategoriji je bilo nekaj produktov genov, katerih izražanje se spreminja npr. fosfodiesteraza (zmanjšano izražanje), ki je neg. regulator importa glukoze, podenota kalijevega kanalčka (zmanjšano izražanje), centromerni protein (zmanjšano izražanje), ki sodeluje pri transportu proteinov, prenašalec organskih kationov (zmanjšano izražanje) in podenoti natrijevega kanalčka (povečano izražanje) [52, 57, 63, 122]. Spremenjeno izražanje podenot teh proteinov ima lahko za posledico neustrezno delovanje teh prenašalcev, zaradi česar celica ne dobi ustreznih elektrolitov in ostalih hranil in so okrnjene tudi vse signalne poti in procesi pri katerih so udeleženi, ali pa se le-ti kopičijo v celici in so lahko toksični, kar lahko prispeva k staranju celic, kot npr. kopičenje metabolitov (npr. motnje v delovanju kalijevega kanalčka lahko vplivajo na izločanje inzulina, nevrottransmitterjev, regulacijo rasti, apoptoze in diferenciacije celic) [8, 52, 57].

Spremembe proteostaze

Pri genih s spremenjenim izražanjem je bilo tudi nekaj, ki so udeleženi pri proteostazi. Pri opisanih genih jih je nekaj, ki sodelujejo pri proteolizi npr. metaoloproteinaza 13 in 3 (zmanjšano izražanje), aktivator plazminogena (zmanjšano izražanje), podenota 27 mediatorskega kompleksa (zmanjšano izražanje), ki je del ubikvinacije proteinov in glicin vezoči protein (povečano izražanje) [52, 86, 122]. Posledice spremenjenega izražanja genov za te proteine lahko vodijo v motnje proteostaze, ki lahko vodijo v nefunkcionalne proteine, kopičenje poškodovanih proteinov in proteinskih agregatov, ki lahko poškodujejo organele in vplivajo na povečan oksidativni stres, ki je pomemben vidik staranja, proteinski agregati pa se lahko tudi povečajo v večje, kar lahko vodi do degeneracije tkiv [8].

Spremembe organizacije celičnega matriksa in citoskeleta

Organizacija celičnega matriksa je del kontrolnega procesa celične viabilnosti, ki je v procesu staranja lahko okvarjena. Primeri produktov genov katerih se izražanje spreminja in so udeleženi v teh procesih so metaloproteinazi 3 in 13 (zmanjšano izražanje), integrin (zmanjšano izražanje), ki omogoča pritrditev citoskeleta na zunajcelični matriks in fibrilin 2 (povečano izražanje), ki sodeluje pri razgradnji zunajceličnega matriksa [52, 62, 82, 122]. Spremenjena funkcija teh proteinov, zaradi njihovega spremenjenega izražanja ali spremenjenega izražanja katere od teh podenot, lahko vodijo v motnje vezivnega tkiva, preurejanja citoskeleta, adhezije in migracije celic in komunikacije med celicami ter tudi potencialno dostop prenašalcev do celic s čimer je moteno tudi signaliziranje, kar pa je lahko tudi mehanizem staranja. Nepravilno urejen citoskelet znotraj celice ali pa spremenjena organizacija znotraj jedra, lahko vodi do povečane občutljivosti DNA na poškodbe, kar lahko povzroči prezgodnjo senescenco. Lahko bi to prispevalo tudi k metastaziranju rakavih celic (npr. spremenjeno izražanje metaloproteinaz je povezano z metastaziranjem tumorjev) [8, 52].

Spremembe v organizaciji, strukturi kromosomov, nadzoru celičnega cikla in ohranjanju dolžine telomer

Ugotovili smo, da so nekateri geni, katerih produkti so udeleženi pri teh procesih različno izraženi npr. centromerni protein (zmanjšano izražanje), ki nadzoruje celični cikel in deluje pri organizaciji kromosomov pri mitozii, WD ponovitev 63 (povečano izražanje), ki sodeluje pri remodelaciji kromatina in kontrolira celični cikel in cinkov prst 676 (povečano izražanje), ki vpliva na vzdrževanju dolžine telomer [52, 64, 69, 88, 89].

Spremembe v organizaciji ali strukturi kromosomov, napake v kontrolnih točkah celičnega cikla in spremembe v ohranjanju dolžine telomer lahko vodijo do poškodb DNA, kopičenja mutacij, različnih genetskih motenj, prezgodnje senescence in apoptozo celic, kar je značilno za starostne spremembe celic (npr. povečano izražanje cinkovega prsta 676 lahko vodi do prezgodnje senescence zaradi prekratkih telomer, saj vpliva na ekspresijo genov za podaljševanje telomer in stabilizira strukturo na koncu telomer, ki onemogoča podaljševanje s telomerozo) [69]. Motnje v procesih nadzora celičnega cikla in strukturi kromosomov imajo lahko za posledico poškodbe DNA, ki pa so eden izmed dejavnikov krajšanja telomer, zato lahko pri celicah z okvarjenimi temi funkcijami pride do prezgodnje senescence.

Spremembe v funkciji in ohranjanju matičnih celic

Ohranjanje funkcije in populacije matičnih celic je nujno za regeneracijo tkiva in za diferenciacijo v celice, ki so potrebne. Geni nekaterih proteinov, ki so povezani s temi procesi so bili različno izraženi npr. podenota 27 mediatorskega kompleksa (zmanjšano izražanje), ki sodeluje pri ohranjanju populacije matičnih celic, WD ponovitve 63 (povečano izražanje), ki je udeležena pri diferenciaciji MMC v osteoblaste in cinkov prst 90 (povečano izražanje), ki uravnava ravnotežje med samoobnavljanjem in diferenciacijo MMC [90, 68, 122]. Spremembe teh procesov lahko vodijo v neustrezno regeneracijo tkiv in neustrezno delovanje sistemov, v katerih so celice, v katere diferencirajo matične celice, udeležene (MMC diferencirajo v osteoblaste, hondrocite, miocite in adipocite), kar so lahko tudi nekateri vidiki staranja celic in organizma.

Spremembe v povezavi z mitohondrijskim delovanjem

Spremenjeno mitohondrijsko delovanje vodi v neustrezno zagotavljanje energije za delovanje celice in povzroči povečano produkcijo ROS in s tem povečan obseg oksidativnega stresa, lahko pa tudi pride do iztekanja nekaterih mitohondrijsko specifičnih encimov v citosol, kar lahko preko indukcije stresa povzroči prezgodnjo apoptozo. Ti mehanizmi pa so vsi vpleteni v staranje celic. V naboru genov, katerih izražanje se spreminja je tudi gen za metaloproteinazo 3 (zmanjšano izražanje), ki sodeluje tudi pri regulaciji inducirane celične smrti v odvisnosti od oksidativnega stresa in prenašalec organskih kationov (zmanjšano izražanje), ki je udeležen v procesu mitofagije kot odziva na mitohondrijsko depolarizacijo [8, 122].

Spremembe povezane s širšimi vidiki staranja

Med spremenjeno izraženi geni so bili tudi geni, ki kodirajo različne komponente imunskega sistema (variabilni del težke verige imunoglobulinov 1-18, katerega izražanje se je znižalo, in variabilni del težke verige imunoglobulina 1-12, katerega izražanje se je zvišalo med generacijama). Te spremembe lahko vodijo v okrnjeno delovanje imunskega sistema, kar je potencialno povezano z imunološko teorijo staranja. Prav tako pa se je spremenilo izražanje genov, ki vplivajo na delovanje neuroendokrinega sistema (npr. zmanjšano izražanje gena za kalijeve kanalčke in gena za prenašalec organskih kationov, kar vpliva na izločanje neurotransmitorjev) [52, 57]. Te spremembe lahko vodijo v motnje nekaterih osnovnih funkcij, kar je potencialno povezano z neuroendokrino teorijo staranja. Ugotovili smo tudi nekaj sprememb izražanja genov, ki so povezani z nekaterimi starostnimi boleznimi kot so kardiovaskularne bolezni, rak, osteoporoza in sladkorna bolezen.

Spremembe v izražanju RNA

V naboru genov, ki se različno izražajo je tudi veliko število genov, ki kodirajo različne tipe RNA. Gre predvsem za gene za miRNA, ki sodelujejo pri post-transkripcijski regulaciji izražanja genov. Lahko bi bilo spremenjeno izražanje nekaterih od različno izraženih genov posledica različnega izražanja genov za nekatere od teh miRNA.

Dve izmed različno izraženih miRNA bi bile lahko udeležene pri mehanizmu staranja kosti: miRNA 488 (znižano izražanje), ki inhibira proliferacijo in invazijo osteosarkoma in miRNA 4328 (zvišano izražanje), ki ima vlogo pri osteogeni diferenciaciji in s silo inducirani formaciji kosti [94, 95].

Veliko različno izraženih tipov RNA je povezanih z nekaterimi tipi raka, večina tarč, funkcij in povezanih bolezni pa ni poznanih. Nepravilno delovanje miRNA ali pa njihovo prekomerno izražanje lahko tudi inducira senescenco.

5.3. SPREMENJENO IZRAŽANJE GENOV V POVEZAVI Z DELOVANJEM IN STAROSTNIMI SPREMENBAMI KOSTI

V povezavi s kostmi je različno izraženih nekaj genov, katerih produkti so udeleženi pri delovanju osteoblastov, osteoklastov, mineralizaciji kosti in razvoju kosti in tudi signalnih poteh v kostnih celicah, spremembe v njihovih funkcijah pa bi lahko vodile v kostne bolezni (npr. osteoporoza) in starostne spremembe kosti. Primer takih proteinov so metaloproteinazi 3 in 13, ki razgrajujeta ekstracelularni matriks, vključno s kolagenom, in se različno izražata, kar bi lahko vplivalo na strukturo kosti in interakcije in migracije kostnih celic, zmanjšano izražanje fosfodiesteraze, ki je represor patološke kalcifikacije in njeno spremenjeno izražanje lahko vodi do kalcifikacije sklepov pri osteoartritisu, povečano izražanje WD ponovitve 63, ki je udeležena pri diferenciaciji MMC v osteoblaste in povečano izražanje osteomodulina, ki pospeši diferenciacijo osteoblastov [52, 66, 74, 90, 122].

Pomembni so tudi geni, katerih produkti so udeleženi pri najpomembnejših signalnih poteh v kostnih celicah ali na njih vplivajo:

- Vplivi na RANK/RANKL/OPG signalno pot: Povečano izražanje gena za fibrilin 2, ki z uravnavanjem TGF- β in BMP stimulira sproščanje RANKL in s tem spodbuja osteoklastogenezo [87].
- Vplivi na WNT/ β -katenin signalno pot: Zmanjšano izražanje gena za podenoto kolagena tipa XI (določeni SNP-ji tega proteina naj bi imeli preko vpliva na to pot vpliv na razvoj osteoartritisa), zmanjšano izražanje gena za podenoto mediatorskega kompleksa 27, ki je povezan z regulacijo izražanja proteinov te signalne poti, zmanjšano izražanje gena za shisa protein 3, ki inhibira to signalno pot z inhibicijo prenosa receptorjev te signalne poti na površino in z razgradnjo β -katenina [52, 58, 76, 68, 85].

Motnje v teh sistemih in znotraj in zunaj celičnih komponentah lahko vodijo do nedelovanja teh sistemov, neustrezne gradbe kosti in spremenjenega ravnotežja med aktivnostjo osteoblastov in osteoklastov, katerega vzdrževanje je nujno v normalnem procesu kostne remodelacije. Primer proteina, ki vpliva na to ravnotežje je osteomodulin, ki se ob resorpciji kosti sprosti iz matriksa in vpliva na ravnotežje med delovanjem osteoblastov in osteoklastov [66]. Pomembno je vedeti da so preko signalne poti RANK/RANKL/OPG in nekaterih citokinov osteoblasti in osteoklasti med seboj povezani, zato vsaka motnja v delovanju ene vrst celic vpliva tudi na druge.

5.4. SPREMEMBE, KI VPLIVAJO NA KVALITETO CELIČNEGA MODELA

Opisane komponente celičnega staranja lahko vplivajo tudi na kvaliteto celičnih modelov, ki jih uporabljamo v biomedicinskih raziskavah. Spremenjeno signaliziranje, okrnjen transport in spremembe v odzivih na stimulacijo lahko vplivajo na odziv takih celic na okoljske dejavnike npr. komponente celičnega medija, ki jih uporabljamo za gojenje celic in tudi privzem hranil v celice (npr. glukoze). Lahko pa bi tudi povzročile neustrezen odziv celic na stres, zaradi katerega bi lahko celice odmrle. Okrnjena proteoliza in posledično poškodovani proteini lahko poškodujejo celice, kar bi tudi lahko vplivalo na njihovo število. Nekaj vpliva bi lahko imele spremembe v adhezijskih molekulah, ki bi vplivale na pritrdjanje celic na podlago gojilne posode. Spremembe mitohondrijskega delovanja bi lahko vodile v motnje zagotavljanja energije za te celice. Spremembe v organizaciji ali strukturi kromosomov, napake v kontrolnih točkah celičnega cikla in spremembe v ohranjanju dolžine telomer bi lahko vodile do prezgodnje senescence in s tem številom celic, ki jih imamo na razpolago. Vse te spremembe bi lahko potencialno vodile do drugačnega obnašanja, funkcij in število celic, ki bi lahko pomembno vplivale na interpretacije rezultatov. Eden izmed primerov vpliva na kostni celični model, ki smo ga odkrili pri analizi izražanja genov je osteomodulin (zmanjšano izražanje), za katerega je znano da *in vitro* pospeši diferencijo osteoblastov in zmanjša njihovo migracijo preko integrinov.

6. SKLEP

Namen naše magistrske naloge je bil ugotavljanje spreminjanja izražanja genov med različnimi generacijami primarnih osteoblastov, zato smo jih morali pripraviti in vzgojiti v laboratoriju, izolirati RNA, poslati vzorce na analizo z mikromrežami ter analizirati rezultate.

Pri pripravi primarnih osteoblastov smo ves čas spremljali celice in jim ustrezno menjavali celični medij, celice so se razvijale ustrezno in imele značilno morfologijo osteoblastov, znakov kontaminacije ni bilo. Pri izolaciji RNA s silika kolonami smo dobili dovolj visoke koncentracije in ustrezne čistosti za analizo z mikromrežami. Pri kontroli kakovosti pred mikromreži pa so ugotovili da integriteta RNA generacije 0 (G0) ni ustrezna, saj je le-ta razgrajena, kar bi bila lahko posledica razgradnje RNA tik po izolaciji, med shranjevanjem ali med transportom.

Rezultati analize izražanja genov med generacijama G4 in G3 z mikromrežami in GO analiza so pokazali, da so produkti, katerih geni se različno izražajo, v največji meri udeleženi v vezavi, signaliziranju, celični komunikaciji in odzivu na stimulacijo in so večinoma del celične membrane npr. metaloproteinaza 13, ki se odziva na mehansko stimulacijo, fosfodiesteraza, ki deluje kot transmembranski protein in regulira purinergično signaliziranje in signaliziranje inzulinskega receptorja in metaloproteinaza 3, ki se odziva na oksidativni stres, izražanje katerih se je med generacijama znižalo. Pri pregledu genov smo ugotovili tudi, da jih je nekaj povezanih z ostalimi mehanizmi celičnega staranja kot so spremembe proteostaze (podenota 27 mediatorskega kompleksa, ki je del ubikvinacije proteinov), organizacije celičnega matriksa (integrin, ki omogoča pritrdjanje citoskeleta na zunajcelični matriks), organizacije strukture kromosomov (centromerni protein), nadzoru celičnega cikla (WD ponovitev 63), ohranjanju dolžine telomer (cinkov prst 676), v funkciji in ohranjanju matičnih celic (cinkov prst 90, ki uravnava ravnotežje med samobnavljanjem in diferenciacijo MMC) in z delovanjem mitohondrijev in oksidativnim stresom (prenašalec organskih kationov).

Pri staranju osteoblastov sta se pomembna znižala gena za metaloproteinazo 13 (4-krat) in fosfodiesterazo (2,38-krat), ki sta udeleženi pri različnih procesih celičnega staranja in staranja kosti. Metaloproteinaza 13 se odziva na mehansko stimulacijo, sodeluje pri proteolizi, saj je udeležena pri razgradnji ekstracelularnega matriksa, znana pa je tudi povezava z nastankom osteoartritisa [71].

Fosfodiesteraza pa sodeluje pri signaliziranju, celičnem transportu in ima vlogo pri mineralizaciji kosti [73].

Pri staranju osteoblastov se je pomembno zvišal gen za adenilat ciklazo 1 (2,56-krat), je udeležena pri signaliziranju in odzivu na koncentracijo kalcija, povezana pa je tudi z nastankom osteoblastoma [61].

Nekaj produktov, katerih geni so se drugače izražali je bilo tudi kostno specifičnih oz. povezanih s procesi v kosteh, in so večinoma udeleženi pri osteoblastni in osteoklastni diferenciaciji in vplivajo na signalne poti teh celic (npr. osteomodulin, katerega izražanje se je zvišalo, in sodeluje pri diferenciaciji in pritrjanju osteoblastov na podlago preko integrinov) [65, 66]. Vse te spremembe lahko povzročijo porušeno ravnotežje med osteoblasti in osteoklasti in s tem normalnega procesa kostne remodelacije.

Veliko je bilo tudi različno izraženih genov za nekodirajoče RNA, katerih podatke smo zbrali, in ugotovili, da so večinoma udeležene pri procesu karcinogeneze, dve pa bi bile lahko tudi udeležene pri staranju celic kosti (miRNA 488 in 4328).

Vsi opisani mehanizmi celičnega staranja lahko vplivajo tudi na kvaliteto celičnih modelov v raziskavah. Spremenjeno signaliziranje in odziv na stimulacijo lahko vplivata na privzem hranil iz celičnega medija, spremembe v ohranjanju dolžine telomer in kontroli celičnega cikla pa lahko vodijo do poškodb DNA, prezgodnje senescence teh celic in njihove upočasnjene rasti, kar lahko vpliva na število celic in vpliv na interpretacijo rezultatov.

Da bi imeli boljši vpogled v potek staranja osteoblastov bi lahko naš eksperiment nadgradili tako, da bi merili izražanje genov med večjim številom različnih generacij in izmerili še dolžino telomer ter izražanje genov, katerih produkti so udeleženi pri ohranjanju njihove dolžine in tako bolje razumeli ozadje staranja celic in povezali kronološko starost z biološko. V prihodnje bi se bilo smiselno osredotočiti na posamezen protein ali nekodirajočo RNA, katerih gen se različno izraža med generacijama in s ciljanimi eksperimenti bolje razumeti in opredeliti njegovo vpletenost v mehanizme celičnega staranja in staranja kosti in morebitne udeležene signalne poti.

Namen naše naloge je bil izpolnjen. Uspešno smo gojili različne generacije primarnih osteoblastov in jim izolirali RNA, pri analizi izražanja genov pa smo pridobili veliko informacij o celičnem staranju in staranju kosti in ta stanja bolje razumemo. Dobili smo tudi nekaj vpogleda v biološke procese, ki bi bili pri tem udeleženi, predvsem pa so nam rezultati te magistrske naloge dali veliko informacij, ki lahko služijo kot podlaga ali izhodišče za nadaljnja razmišljanja in raziskovanja.

7. LITERATURA

1. Jin K: Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease* 2010; 1(2): 72-74.
2. Rosa VDL, de Oliveira-Junior JR: The Role of Telomeres in Aging and Carcinogenesis: A Brief Overview. *Journal of Clinical Epigenetics* 2018; 4(1:4): 1-3.
3. De Magalhães JP, Curado J, Church GM: Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics* 2009; 25(7): 875, 878-880.
4. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE: *Clinical Chemistry: Principles, techniques, correlations*, 7. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfija, 2013: 514-516, 705.
5. Mc Auley MT, Guimera AM, Hodgson D, McDonald N, Mooney KM, Morgan AE, Proctor CJ: Modelling the molecular mechanisms of aging. *BioScience Reports* 2017; 37: 1-3, 8-13.
6. Sergiev PV, Dontsova OA, Berezkin GV: Theories of Aging: An Ever-Evolving Field. *Acta Naturae* 2015; 7(1), 9-16.
7. Yu KR, Kang KS: Aging-Related Genes in Mesenchymal Stem Cells: A Mini Review. *Gerontology* 2013; 59: 557, 559, 561-562.
8. DiLoreto R, Murphy CT: The cell biology of aging. *Molecular Biology of the Cell* 2015; 26: 4524-4527.
9. Kranjc T, Ostanek B, Marc J: Bone microRNAs and Ageing. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2017; 18(3): 1-7.
10. Cong YS, Wright WE, Shay JW: Human Telomerase and Its Regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2002; 66(3): 407-412.
11. Li D, Yuan Q, Wang W: The Role of Telomeres in Musculoskeletal Diseases. *The Journal of International Medical Research* 2012; 40: 1242-1246.
12. Carneiro MC, de Castro IP, Ferreira MG: Telomeres in aging and disease: lessons from zebrafish. *Disease Models & Mechanisms* 2016; 9: 737-745.
13. Kong CM, Lee XW, Wang X: Telomere shortening in human diseases. *The FEBS Journal* 2013; 280: 3180-3183, 3186.

14. Capkova Frydrychova R, Mason JM: Telomeres: Their Structure and Maintenance. *The Mechanism of DNA Replication* 2013; 10: 423, 425, 427, 428, 431, 433.
15. Nielsen BR, Linneberg A, Bendix L, Harboe M, Christensen K, Schwarz P: Association between leukocyte telomere length and bone mineral density in women 25-93 years of age. *Experimental Gerontology* 2015; 66: 25-26, 28-30.
16. Price LH, Kao HT, Burgers DE, Carpenter LL, Tyrka AR: Telomeres and Early-Life Stress: An Overview. *Biological Psychiatry* 2013; 73(1): 1-5.
17. Boskey AL, Coleman R: Aging and Bone. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2010; 89 (12): 1333-1341.
18. Sanders JL, Newman AB: Telomere Length in Epidemiology: A Biomarker of Aging, Age-Related Disease, Both, or Neither?. *Epidemiologic Reviews* 2013; 35: 112-114, 123.
19. Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, Alonso DF: Telomere structure and telomerase in health and disease (Review). *International Journal of Oncology* 2012; 41: 1561-1568.
20. Maestroni L, Matmati S, Coulon S: Solving the Telomere Replication Problem. *Genes* 2017; 8: 1-2.
21. De Lange T: How Telomeres Solve the End-Protection Problem, *Science* 2009; 326(5955): 1.
22. Levy MZ: Telomere end-replication problem and cell aging. *Journal of Molecular Biology* 1992; 225(4): 951, 952.
23. Lu W, Zhang Yi, Liu D, Songyang Z, Wan M: Telomeres - Structure, Function and Regulation. *Experimental Cell Research* 2013; 319(2): 133-140.
24. Sandin S, Rhodes D: Telomerase structure. *Current Opinion in Structural Biology* 2014; 25: 104-105.
25. Gardner M, Bann D, Wiley L et al: Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Experimental Gerontology* 2014; 51: 15, 22, 23.
26. Blasco Ma: Telomere length, stem cells and aging, *Nature Chemical Biology*; 3(10):

27. Tang NLS, Woo J, Suen EWC, Liao CD, Leung JCS, Leung PC: The effect of telomere length, a marker of biological aging, on bone mineral density in elderly population. *Osteoporosis International* 2010; 21: 89-91, 95-96.
28. Liu H, Liu Q, Ge Y, Zhao Q, Zheng X, Zhao Y: hTERT promotes cell adhesion and migration independent of telomerase activity. *Scientific reports* 2016; 6: 1.
29. Shankar RK, Giri N, Lodish MB, Sinaii N, Reynolds JC, Savage SA, Stratakis CA, Alter BP: Bone Mineral Density in Patients with Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. *Pediatric Residency* 2017; 82(3): 459, 464.
30. Štiblar Martinčič D, Cvetko E, Cör A, Marš T, Legan M: Anatomija, histologija, fiziologija, 2. izdaja, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2008: 35-39.
31. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P: *Interna medicina*, 4. izdaja, *Littera picta*, Ljubljana, 2011: 973-974, 991-995.
32. Koeppen BM, Stanton BA: *Berne & Levy Physiology*, 6. izdaja, Elsevier, Filadelfija, 2008: 702-703.
33. Mencej Bedrač S, Zupan J, Kocjan T, Mlakar V, Preželj J, Marc J, Ostanek B: Zdravljenje osteoporoze danes in jutri. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63: 279-280.
34. Khurana JS: *Bone Pathology*, 2. izdaja, Humana Press, New York, 2009: 1-4, 6-8, 11-13, 35.
35. Eriksen EF: Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2010; 11: 219-221.
36. Mencej Bedrač S, Ostanek B, Mlakar V, Zupan J, Kocjan T, Preželj J, Marc J: Sodobni pogled na nastanek osteoporoze. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63: 2, 4-8.
37. Marshall WJ, Bangert SK: *Clinical Chemistry*, 5. izdaja, Elsevier, London, 2004: 279-281.
38. Bernabei R, Martone AM, Ortolani E, Landi F, Marzetti E: Screening, diagnosis and treatment of osteoporosis: a brief review. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 2014; 11(3): 201-202.
39. Ferdous HS, Afsana F, Qureshi NK, Rouf RSB: Osteoporosis: A Review. *Birdem Medical Journey* 2015; 5(1): 30-31.

40. Anatomy bone remodeling, dostopno na: <http://heritance.me/anatomy-bone-remodeling>, dostopano: 2018
41. Pignolo RJ, Suda RK, McMillan EA, Shen J, Lee SH, Choi Y, Wright AC, Johnson FB: Defects in telomere maintenance molecules impair osteoblast differentiation and promote osteoporosis. *Aging Cell* 2008; 7(1): 1-6.
42. Valdes AM, Richards JB, Gardner JP, Swaminathan R, Kimura M, Xiaobin L, Aviv A, Spector TD: Telomere length in leukocytes correlates with bone mineral density and is shorter in women with osteoporosis. *Osteoporosis International* 2007; 18(9): 1203.
43. Yevgeniy Grigoryev: Introduction to DNA microarrays, dostopno na: <https://bitesizebio.com/7206/introduction-to-dna-microarrays/>, dostopano: 2018
44. Tarca AL, Romero R, Draghici S: Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2006; 195(2): 373-375.
45. Slonim DK, Yanai I: Getting Started in Gene Expression Microarray Analysis. *PLoS Computational Biology* 2009; 5(10): 1.
46. Zhao S, Fung-Leung WP, Bittner A, Ngo K, Liu X: Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells. *PLOS ONE* 2014; 9(1): 1, 3, 4, 6, 10-12.
47. Miller MB, Tang YW: Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 2009; 22(4): 612, 614, 615.
48. Dadkhah K, Anijdan SHM, Karimi M, Abolfazli MK, Rezaei F, Adel F, Ataei G: DNA microarray, types and its application in medicine. *Scholars Academic Journal of Biosciences* 2015; 3(7): 598, 599.
49. Yevgeniy Grigoryev: How DNA microarrays are built, dostopno na: <https://bitesizebio.com/7463/how-dna-microarraysare-built>, dostopano: 2018
50. Bumgarner R: DNA Microarrays: Types, Applications and their future. *Current Protocols in Molecular Biology* 2013; 3.
51. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/902113>, dostopano: 2018
52. <https://www.genecards.org/>, dostopano: 2018

53. Luo YY, Karsdal MA: Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin: Structure , Functions and Biomarkers, Academic Press, Cambridge, 2016: 77-80.
54. He H, Dai J, Yang X, Wang X, Sun F, Zhu Y: Silencing of MED27 inhibits adrenal cortical carcinogenesis by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway and the epithelial-mesenchymal transition process. *The Journal of Biological Chemistry* 2017; 20.
55. Ding J, Sha L, Huang M, Cai Q, Li J: MicroRNA-18a inhibits cell growth and induces apoptosis in osteosarcoma by targeting MED27. *International Journal of Oncology* 2018; 53(1): 329
56. Tang R, Xu X, Yang W, Yu W, Hou S, Xuan Y, Tang Z, Zhao S, Chen Y, Xiao X, Huang W, Guo W, Li M, Deng W: MED27 promotes melanoma growth by targeting AKT/MAPK and NF- κ B/iNOS signaling pathways. *Cancer Letters* 2016; 373(1): 77.
57. Grizel AV, Glukhov GS, Sokolova OS: Mechanisms of Activation of Voltage-Gated Potassium Channels. *Acta Naturae* 2014; 6(4): 10.
58. Chen CC, Chen HY, Su KY, Hong QS, Yan BS, Chen CH, Pan SH, Chang YL, Wang CJ, Hung PF, Yuan S, Chang GC, Chen JJ, Yang PC, Yang YC, Yu SL: Shisa3 is associated with prolonged survival through promoting β -catenin degradation in lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2014; 190(4): 433.
59. Shen Z, Zhou C, Jinyun Li J, Ye D, Deng H, Cao B, Hao W, Lin L, Zhang Y: SHISA3 Promoter Methylation Is a Potential Diagnostic and Prognostic Biomarker for Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *BioMed Research International* 2017: 1.
60. Tsai MH, Chen WC, Yu SL, Chen CC, Jao TM, Huang CY, Tzeng ST, Yen SJ, Yang YC: DNA Hypermethylation of SHISA3 in Colorectal Cancer: An Independent Predictor of Poor Prognosis. *Annals of Surgical Oncology* 2015; 3:1.
61. Sethna F, Feng W, Ding Q, Robison AJ, Feng Y, Wang H: Enhanced expression of ADCY1 underlies aberrant neuronal signalling and behaviour in a syndromic autism model. *Nature Communications* 2017.
62. Nistala H, Lee-Arteaga S, Smaldone S, Siciliano G, Ramirez F: Extracellular Microfibrils Control Osteoblast-supported Osteoclastogenesis by Restricting TGF β Stimulation of RANKL Production. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285(44): 34126, 34127.

63. Ahern CA, Payandeh J, Bosmans F, Chanda B: The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *The Journal of General Physiology* 2016; 147(1):1.
64. Li D, Roberts R: WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2001; 58(14): 2085.
65. Tashima T, Nagatoishi S, Sagara H, Ohnuma S, Tsumoto K: Osteomodulin regulates diameter and alters shape of collagen fibrils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; 463(3): 292.
66. Rehn AP, Cerny R, Sugars RV, Kaukua N, Wendel M: Osteoadherin is upregulated by mature osteoblasts and enhances their in vitro differentiation and mineralization. *Calcified Tissue International* 2008; 82(6): 454, 461.
67. Laity JH, Lee BM, Wright Pe: Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diveristy. *Current Opinion in Structural Biology*; 11(1): 39, 41.
68. Liu T, Kong W, Tang X, Xu M, Wang Q, Zhang B, Hu L, Chen H: The transcription factor Zfp90 regulates the self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. *Cell Death & Disease* 2018; 677: 1, 8, 9.
69. Mangino M et al: Genome-wide meta-analysis points to CTC1 and ZNF676 as genes regulating telomere homeostasis in humans. *Human Molecular Genetics* 2012; 21(24): 5385, 5389.
70. Donner I, Katainen R, Kassinen E, Aavikko M, Sipilä LJ, Pukkala E, Aaltonen LA6. Candidate susceptibility variants in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Familial Cancer* 2018.
71. Ni Z, Shang X, Niu L: Expression of miR-206 in Human Knee Articular Chondrocytes and Effects of miR-206 on Proliferation and Apoptosis of Articular Chondrocytes. *The American Journal of the Medical Sciences* 2018; 355: 240.
72. Wernicke AK, Churin Y, Sheridan D, Windhorst A, Tschuschner A, Gatternlöhner S, Roderfeld M, Roeb E: Matrix metalloproteinase-13 refines pathological staging of precancerous colorectal lesions. *Oncotarget* 2016; 7(45): 73552, 73555.

73. Marchenko IV, Dubovyk YI, Matlai OI, Biesiedina AA, Kniazkova PV, Harbuzova YA: The analysis of association between ENPP1 K121Q polymorphism and risk factors of type 2 diabetes mellitus in ukrainian population]. *Wiadomości lekarskie* 2018; 71(4): 815.
74. Jin Y, Cong Q, Gvozdenovic-Jeremic J, Zhang Y, Terkeltaub R, Yang Y: Enpp1 inhibits ectopic joint calcification and maintains articular chondrocytes by repressing Hedgehog signaling. *Development* 2018.
75. Di JY, DAI ML, Zhang ZX: ENPP1 K121Q (rs1044498C>A) genetic polymorphism confers a high risk of susceptibility to coronary heart disease: A PRISMA-compliant article. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97(27).
76. Fernández-Torres J, Zamudio-Cuevas Y, López-Reyes A, Garrido-Rodríguez D2, Martínez-Flores K, Lozada CA, Muñóz-Valle JF, Oregon-Romero E, Martínez-Nava GA: Gene-gene interactions of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in knee osteoarthritis. *Molecular Biology Reports* 2018.
77. Kostareli E, Gounari M, Agathangelidis A, Stamatopoulos K: Immunoglobulin Gene Repertoire in Chronic Lymphocytic Leukemia: Insight into Antigen Selection and Microenvironmental Interactions. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 2012; 4(1).
78. Bradley JR, Pober JS: Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 2001; 20(44): 6482.
79. Li P, You S, Nguyen C, Wang Y, Kim J, Sirohi D, Ziembiec A, Luthringer D, Lin SC, Daskivich T, Wu J, Freeman MR, Saouaf R, Li D, Kim HL: Genes involved in prostate cancer progression determine MRI visibility. *Theranostics* 2018; 8(7): 1752.
80. Li S, Li X, Xu A, Zhang B, He X, Chen H, Huang J: Screening and clinical evaluation of dominant peptides of centromere protein F antigen for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Molecular Medicine Reports* 2018; 17(3): 4720.
81. Li S, Liu X, Liu T, Meng X, Yin X, Fang C, Huang D, Cao Y, Weng H, Zeng X, Wang X: Identification of Biomarkers Correlated with the TNM Staging and Overall Survival of Patients with Bladder Cancer. *Frontiers in Physiology* 2017; 8: 947.

82. LaFlamme SE, Mathew-Steiner S, Singh N, Collelo-Borges D, Nieves B: Integrin and microtubule crosstalk in the regulation of cellular processes. *Cellular and molecular Life Sciences* 2018.
83. Conaway RC, Conaway JW: Function and Regulation of the Mediator Complex. *Current Opinion in Genetics & Development* 2011; 21(2): 1.
84. <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR026910>, dostopano: 2018
85. Steer ML: Adenyl cyclase. *Annals of Surgery* 1975; 182(5): 603.
86. Bhagavan NV, Ha CE: *Essentials of Medical Biochemistry*, 1. izdaja, Academic Press, 1. izdaja, Massachusetts, 2011: 20.
87. Chen G, Deng C, Li YP: Chuxia Deng, Yi-Ping Li: TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *International Journal of Biological Sciences* 2012; 8(2): 272-274.
88. Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ: The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences* 1999; 24(5): 181.
89. Jain BP, Pandey S: WD40 Repeat Proteins: Signalling Scaffold with Diverse Functions. *The Protein Journal* 2018; 37(5): 391, 398.
90. Diao S, Yang DM, Dong R, Wang LP, Wang Js, Du J, Wang SL, Fan Z: Enriched trimethylation of lysine 4 of histone H3 of WDR63 enhanced osteogenic differentiation potentials of stem cells from apical papilla. *Journal of Endodontics* 2015; 41(2):
91. Cech TR, Steitz JA: The Noncoding RNA Revolution-Trashing Old Rules to Forge New Ones. *Cell* 2014; 157: 78,79.
92. Guo W, Dong Z, Shi Y, Liu S, Liang J, Guo Y, Guo X, Shen S, Wang G: Methylation-mediated downregulation of long noncoding RNA LOC100130476 in gastric cardia adenocarcinoma. *Clinical & Experimental Metastasis* 2016; 33(5): 497.
93. Qiu J, Zhang Y, Chen H, Guo Z: MicroRNA-488 inhibits proliferation, invasion and EMT in osteosarcoma cell lines by targeting aquaporin 3. *International Journal of Oncology* 2018; 54(4):1493.

94. Song J, Kim D, Lee CH, Lee MS, Chun CH, Jin EJ: MicroRNA-488 regulates zinc transporter SLC39A8/ZIP8 during pathogenesis of osteoarthritis. *Journal of Biomedical Science* 2013; 20(1): 1, 3-6.
95. Chang M, Lin H, Wang J, Han G: Integrated miRNA and mRNA expression profiling of tension force-induced bone formation in periodontal ligament cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 2015;51(8):797,807.
96. Ning MS, Kim AS, Prasad N, Levy SE, Zhang H, Andl T: Charecterization of the Merkel Cell Carcinoma miRNome. *Journal of Skin Cancer* 2014.
97. Liu J, Song Z, Feng C, Lu Y, Zhou Y, Lin Y, Dong C: The long non-coding RNA SUMO1P3 facilitates breast cancer progression by negatively regulating miR-320a. *American Journal of Translational Research* 2017; 9(12): 5594.
98. Davanian H, Balasiddaiah A, Heymann R, Sundström M, Redenström P, Silfverberg M, Brodin D, Sällberg M, Lindskog S, Kruger Weiner C, Chen M: Ameloblastoma RNA profiling uncovers a distinct non-coding RNA signature. *Oncotarget* 2017; 8(3): 4530
99. Karimi Mazraehshah M, Tavangar SM, Saidijam M, Amini R, Bahreini F, Karimi Dermani F, Najafi R: Anticancer effects of miR-200c in colorectal cancer through BMI1. *Journal of Cellular Biochemistry* 2018: 1.
100. Peng L, Fu J, Ming Y: The miR-200 family: multiple effects on gliomas. *Cancer Management and Research* 2018; 10: 1987.
101. Masuda T, Shinden Y, Noda M, Ueo H, Hu Q, Yoshikawa Y, Tsuruda Y, Kuroda Y, Ito S, Eguchi H, Ohno S, Mimori K4: Circulating Pre-microRNA-488 in Peripheral Blood Is a Potential Biomarker for Predicting Recurrence in Breast Cancer. *Anticancer Research* 2018; 38(8): 4515.
102. Fei S, Cao L, Pan L: microRNA-3941 targets IGF2 to control LPS-induced acute pneumonia in A549 cells. *Molecular Biology Reports* 2018; 17(3): 4019.
103. Fei S, Cao L, Pan L: microRNA-3941 targets IGF2 to control LPS-induced acute pneumonia in A549 cells. *Molecular Medicine Reports* 2018; 17(3): 4019.
104. Choi YM, AN S, Lee EM, Kim K, Choi SJ, Jang HH, An IS, Bae S: CYP1A1 is a target of miR-892a-mediated post-transcriptional repression. *International Journal of Oncology* 2012; 41(1): 331.

105. Jia B, Tan L, Jin Z, Jaio Y, Fu Y, Liu Y: MiR-892a Promotes Hepatocellular Carcinoma Cells Proliferation and Invasion Through Targeting CD226. *Journal of Cellular Biochemistry* 2017; 118(6): 1489.
106. Guo J, Jin D, Wu Y, Yang L, Du J, Gong K, Chen W, Dai J, Miao S, Xi S: The miR 495-UBE2C-ABCG2/ERCC1 axis reverses cisplatin resistance by downregulating drug resistance genes in cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cells. *EBioMedicine* 2018: 1.
107. Emmadi R, Canestrari E, Arbieva ZH, Mu W, Dai Y, Frasor J, Wiley E: Correlative Analysis of miRNA Expression and Oncotype Dx Recurrence Score in Estrogen Receptor Positive Breast Carcinomas. *PloS One* 2015; 10(12): 1.
108. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=63830>, dostopano: 2018
109. Wang J, Wang H, Liu A, Fang C, Hao J, Wang Z: Lactate dehydrogenase A negatively regulated by miRNAs promotes aerobic glycolysis and is increased in colorectal cancer. *Oncotarget* 2014; 6(23): 19456.
110. Ostenfeld MS et al: Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Research* 2014; 74(20): 5758.
111. Genc GC, Dursun A, Celik SK, Calik M, Kokturk F, Piskin IE: IL28B, IL29 and micro-RNA 548 in subacute sclerosing panencephalitis as a rare disease. *Gene* 2018: 1.
112. Kandhavelu J, Palanivel S, Kandhavelu M: Aberrantly Binding microRNAs and their Interactions with Nuclear Hormone Receptors. *MicroRNA* 2017; 6(3): 200.
113. Çağıl N, Uğurlu N, Şahan CY, Sevli S: Lack of MIR143, MIR145, MIR184, MIR1224, and MIR29b1 mutations in keratoconus pathogenesis. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2017; 47(5): 1669.
114. Li Y, Shan F, Chen J: Lipid raft-mediated miR-3908 inhibition of migration of breast cancer cell line MCF-7 by regulating the interactions between AdipoR1 and Flotillin-1. *World Journal of Clinical Oncology* 2017; 15(1): 69.

115. Liu X, Chen J, Zhang J: AdipoR1-mediated miR-3908 inhibits glioblastoma tumorigenicity through downregulation of STAT2 associated with the AMPK/SIRT1 pathway. *Oncology Reports* 2017; 37(6): 3387.
116. Chen BJ, Byrne FL, Takenaka K, Modesitt SC, Olzomer EM, Mills JD, Farrell R, Hoehn KL, Janitz M: Transcriptome landscape of long intergenic non-coding RNAs in endometrial cancer. *Gynecologic Oncology* 2017; 147(3):645.
117. Zhang Y, Dai J, Tang J, Zhou L, Zhou M: MicroRNA-649 promotes HSV-1 replication by directly targeting MALT1. *Journal of Medical Virology* 2017;89(6):1069.
118. Quinn SR, O'Neill LA: The role of microRNAs in the control and mechanism of action of IL-10. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2014;380: 145.
119. Lee KP, Shin YJ, Panda AC, Abdelmohsen K, Kim JY, Lee SM, Bahn YJ, Choi JY, Kwon ES, Baek SJ, Kim SY, Gorospe M, Kwon KS: miR-431 promotes differentiation and regeneration of old skeletal muscle by targeting Smad4. *Genes & Development* 2015; 29(15): 1605.
120. Coupland KG, Kim WS, Halliday GM, Hallupp, Dobson-Stone, Kwok JB: Role of the Long Non-Coding RNA MAPT-AS1 in Regulation of Microtubule Associated Protein Tau (MAPT) Expression in Parkinson's Disease. *PLoS One* 2016; 11(6): 1.
121. Wang D1, Li J2, Cai F3, Xu Z4, Li L5, Zhu H6, Liu W7, Xu Q8, Cao J9, Sun J10, Tang J11: Overexpression of MAPT-AS1 is associated with better patient survival in breast cancer. *Biochemistry and Cell Biology* 2018: 1.
122. <http://www.geneontology.org>, dostopano: 2018.
123. <http://geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>, dostopano: 2018.
124. Garcia-Esparcia P, Schlüter A, Carmona M, Moreno J, Ansoleaga B, Torrejón-Escribano B, Gustincich S, Pujol A, Ferrer I: Functional genomics reveals dysregulation of cortical olfactory receptors in Parkinson disease: novel putative chemoreceptors in the human brain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2013; 72(6): 524.
125. Rodríguez DM et al: Krüppel-Like Factor 10 participates in cervical cancer immunoediting through transcriptional regulation of Pregnancy-Specific Beta-1 Glycoproteins. *Scientific reports* 2018; 8: 1.

126. <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=23207909&showAllSites=true>, dostopano: 2018
127. Halder A, Kumar P, Jain M, Iyer VK: Copy number variations in testicular maturation arrest. *Andrology* 2017; 5(3): 460.
128. Han JA, Kim JY, Kim JI: Analysis of Gene Expression in Cyclooxygenase-2-Overexpressed Human Osteosarcoma Cell Lines. *Genomics & Informatics* 2014; 12(4): 247.
129. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UFD9>, dostopano: 2018.
130. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000240021-TEX35/pathology>, dostopano: 2018
131. Mithani SK, Smith IM, Califano JA: Use of integrative epigenetic and cytogenetic analyses to identify novel tumor-suppressor genes in malignant melanoma. *Melanoma research* 2001; 21(4): 298.
131. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9C0K3M>, dostopano: 2018.
132. Bing Y, Tian M, Li G, Jiang B, Ma Z, Li L, Wang L, Wang H, Xiu D: Down-regulated of PCDH10 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97(35): 1.
133. Walker LC, Pearson JF, Wiggins GA, Giles GG, Hopper JL, Southey MC: Increased genomic burden of germline copy number variants is associated with early onset breast cancer: Australian breast cancer family registry, *Breast Cancer Research* 2017; 19(1):1.
134. Truebestein L, Leonard TA: Coiled-coils: The long and short of it. *Bioessays* 2016; 38(9): 903-904.
135. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9NV79>, dostopano: 2018.
136. González-Fernández R, Morales M, Avila J, Martín-Vasallo P: Changes in leukocyte gene expression profiles induced by antineoplastic chemotherapy. *Oncology Letters* 2012; 3(6): 1341.

137. Zandian A, Wingård L, Nilsson H, Sjöstedt E, Johansson D, Just D, Hellström C, Uhlén M, Schwenk JM, Häggmark-Månberg A, Norbeck O, Owe-Larsson B, Nilsson P, Persson MAA: Untargeted screening for novel autoantibodies with prognostic value in first-episode psychosis. *Translational Psychiatry* 2017; 7(7): 1.
138. Yotova I, Hsu E, Do C, Gaba A, Sczabolc M, Dekan S, Kenner L, Wenzl R, Tycko B: Epigenetic Alterations Affecting Transcription Factors and Signaling Pathways in Stromal Cells of Endometriosis. *PLoS One* 2017; 12(1): 1.
139. Li WH, Zhou ZJ, Huang TH, Guo K, Chen W, Wang Y, Zhang H, Song YC, Chang DM: Detection of OSR2, VAV3, and PPFIA3 Methylation in the Serum of Patients with Gastric Cancer. *Disease Markers* 2016: 1.
140. Huyton T, Göttmann W, Bade-Döding C, Paine A, Blasczyk R: The T/NK cell co-stimulatory molecule SECTM1 is an IFN "early response gene" that is negatively regulated by LPS in human monocytic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011; 1810(12): 1294.
141. Liu SL, Zheng AJ, Ding L: Association between KIR gene polymorphisms and type 1 diabetes mellitus (T1DM) susceptibility: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017; 52: 1.
142. Sala Elpidio LN, de Alencar JB, Tsuneto PY, Alves HV, Trento Toretta M, It Taura SK, Laguila Visentainer JE, Sell AM: Killer-cell immunoglobulin-like receptors associated with polycystic ovary syndrome. *Journal of Reproductive Immunology* 2018; 130: 1.
143. Lv W, Duan Q, Wang L, Gong Z, Yang F, Song Y: Expression of B-cell-associated genes in peripheral blood mononuclear cells of patients with symptomatic pulmonary embolism. *Molecular Medicine Reports* 2015; 11(3): 2299.
144. Kimkong I, Tangkijvanich P, Hirankarn N: Association of interferon-alpha gene polymorphisms with chronic hepatitis B virus infection. *International Journal of Immunogenetics* 2013; 40(6): 476.
145. Poggi A, van der Lee S, Capellari S, Puopolo M, Ladogana A, De Pascali E, Lia D, Formato A, Bartoletti-Stella A, Parchi P, van Duijn C, Pocchiari M: Age at onset of genetic (E200K) and sporadic Creutzfeldt-Jakob diseases is modulated by the CYP4X1 gene. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2018: 1.

146. National Cancer Institute: NCI Dictionary of Cancer Terms, dostopno na: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/somatomedin>, dostopano: 2018.
147. Dominguez R, Holmes KC: Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics* 2011;40: 169.
148. Beauchemin N, Arabzadeh A: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 2013,32(3-4): 643.
149. Offermans NSM, Ketcham SM, van den Brandt PA, Weijnenberg MP, Simons CCJM: Alcohol intake, ADH1B and ADH1C genotypes, and the risk of colorectal cancer by sex and subsite in the Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 2018; 39(3):375.
150. Wang P, Zhang L, Huang C, Huang P, Zhang J: Distinct Prognostic Values of Alcohol Dehydrogenase Family Members for Non-Small Cell Lung Cancer. *Medical Science Monitor* 2018;24:3578.
151. Mandell KJ, Parkos CA: The JAM family of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005; 57(6): 857.
152. Breiman A, López Robles MD, de Carné Trécesson S, Echasserieau K, Bernardeau K, Drickamer K, Imberty A, Barillé-Nion S, Altare F, Le Pendu J: Carcinoma-associated fucosylated antigens are markers of the epithelial state and can contribute to cell adhesion through CLEC17A (Prolectin). *OncoTarget* 2016; 7(12): 14064.
153. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9QYZ0>, dostopano: 2018
154. Rogers MA, Langbein L, Praetzel-Wunder S, Winter H, Schweizer J: Human hair keratin-associated proteins (KAPSs). *International Review of Cytology* 2016; 251: 209, 248.

PRILOGA A: OPISI IN POVEZANE BOLEZNI GENOV, KATERIH IZRAŽANJE JE NIŽJE V GENERACIJI PRIMARNIH OSTEOLASTOV G4 KOT G3.

GEN	G4/ G3	FUNKCIJA IN PROCESI	POVEZANE BOLEZNI IN STANJA
MMP13 (matriksna metaloproteinaza 13)	-4,41	Encim, ki razgrajuje ekstracelularni matriks (kolagen, fibronektin). Procesi: Embrionalen razvoj, reprodukcija, remodelacija tkiva, celjenje ran, razgradnja hrustanca, razvoj kosti, mineralizacija kosti, popravilo kosti, aktivacija in razgradnja regulatornih proteinov (TGFB1, CTGF) [52].	Artritis, metastaziranje tumorjev, osteoartritis, različni tipi displazij [52]
EPYC (epifkan)	-3,54	Proteoglikan, ki regulira fibrilogenezo preko interakcije s kolagenom in drugimi ekstracelularnimi proteini [52].	Bolezni oči (Distrofija roženice, stromalna distrofija, kratkovidnost) [52].
FLG (filagrin)	-3,25	Protein, ki agregira keratinske filamente v epidermisu [52].	Kožne bolezni (ihtioza, atopični dermatitis) [52].

ENPP1 (pirofosfataza/fosfodiesteraza)	-2,98	Encim (transmembranski glikoprotein), ki veže veliko substratov, npr. fosfodiestrsko vez in pirofosfatno vez nukleotidov. Uravnava koncentracije pirofosfata, hidrolizira ATP, sodeluje pri mineralizaciji kosti in kalcifikaciji mehkega tkiva, modulira občutljivost na inzulin [52].	Sladkorna bolezen tipa 2, osifikacija zadnjega vzdolžnega ligamenta torakalnih segmentov, avtosomna dominantna genodermatoza [52].
TAS2R50 (receptor za okus)	-2,97	Receptor, ki preko G-proteina prenaša signal za okus [52].	Določeni SNP-ji so povezani s povečanim tveganjem za miokardni infarkt [Shiffman]. Manjše izražanje pri Parkinsonovi bolezni [124]
PLAT (aktivator plazminogena)	-2,92	Serinska proteinaza, ki pretvori plazminogen v plazmid, ki je fibrinolitičen encim. Udeležen je pri migraciji celic in remodelaciji tkiva [52].	Povečano izražanje povezano z hiperfibrinolizo (krvavenje), zmanjšano pa z hipofibrinolizo (tromboza, embolizem). Trombofilija, pljučni embolizem, koronarna tromboza [52].
COL11A1 (alfa 1 veriga kolagena tipa XI)	-2,46	Ta gen kodira eno izmed dveh alfa verig kolagena tipa XI. Kolagen je glavni protein vezivnega tkiva, ki mu daje oporo. [52].	Sticklerjev sindrom, Marshallov sindrom [52].

IGHV1-18 (variabilni del težke verige imunoglobulina 1-18)	-2,39	Sodeluje pri prepoznavi antigena. Ob vezavi gena se sproži klonaska ekspanzija limfocitov B, ki proizvajajo ustrezna protitelesa [52].	Kronična limfocitna levkemija [77].
ZNF675 (cinkov prst 675)	-2,37	Tip cinkovega prsta, ki so samostojne proteinske domene, ki služijo za stabilizacijo drugih proteinov in kot interaktorji, ki vežejo RNA, DNA in proteine [52, 67].	Bolezni oči, ki lahko prizadanejo tudi kosti [52].
CENPF (centromerni protein F)	-2,36	Protein, ki je del centromerno-kinetohornega kompleksa, sodeluje pri segregaciji kromosomov pri mitozii [52].	Strommov sindrom, črevesna atrezija, bolezen presadka proti gostitelju, mikrocefalija [52].
ITGA8 (Alfa 8 podenota integrina)	-2,30	Heterodimerni transmembranski receptorski proteini. Regulirajo adhezijo celic, preurejanju citoskeleta, aktivacija signalnih poti [52].	Renalna ageneza, Fraserjev sindrom [52].
MYH8 (težka veriga 8 miozina)	-2,29	Del motoričnega proteina miozina ki ima funkcijo pri krčenju skeletnih mišic. Ima tudi ATPazno encimsko aktivnost [52].	Akutni neoplastični sindrom, artrogripoza Fremant-Sheldon sindrom, akutna T-celična levkemija [52].

PSG5 (Nosečnostno specifičen beta-1 glikoprotein 5)	-2,28	Proizvaja ga maternica, spadajo v družino imunoglobulinov, sodelujejo pri interakcijah žilne celične površine [52].	Povečana ekspresija povezana z rakom na materničnem vratu [125].
MED27 (Podenota 27 mediatorskega kompleksa)	-2,26	Podenota CRSP kompleksa, tudi ščitničnega hormonskega receptorja. Regulacija transkripcije od RNA-polimeraze II odvisnih genov [52].	Rak na možganih, adrenalni kortikalni rak, osteosarkom, melanom [52, 68].
KCNAB1 (Beta podenota kalijevega napetostnega kanalčka)	-2,23	Regulirajo izločanje neurotransmitorjev, bitje srca, sekrecija inzulina, ekscitacijo nevronov, epitelijski elektrolitski transport, krčenje gladkih mišic, volumen celic [52].	Epizodna ataksija, epilepsija, nastanek tumorjev [52, 57].
CTAGE1 (kožni antigen povezan z T celičnim limfomom 1)	-2,22	Tumorski antigen [52].	Kožni T celični limfom [52].
SHISA3 (Član družine SHISA proteinov)	-2,21	Modulacija WNT/ β -katenin in FGF (fibroblastni rastni dejavnik), tumor supresor [52, 58, 84].	Rak grla, kolorektalni rak, pljučni rak [52, 58, 84].
TSPY2 (testis specifičen protein povezan z Y kromosomom)	-2,21	Naj bi bil vključen pri spermatogenezi, razvoju gonad [126].	Pridobitev gena TSPY2 pri ustavitvi razvoja testistov [127]

HIST1H2AI (Član družine histonskih klastrov 1 H2A)	-2,16	Jedrni proteini, ki se ovijejo okrog DNA in tvorijo nukleosome in tako kondenzirajo DNA v jedru [52].	Nižje izražanje pri osteosarkomu [128]
GK3P (Psevdomogen glicerol kinaze 3)	-2,14	Encim, ki regulira metabolizem glicerola [52].	Ni podatkov
RIMBP3C (RIMS vezoči protein 3C)	-2,12	Del mikrotubulne strukture, pomembne pri spermatogenezi [129].	Ni podatkov
LACC1 (Domena lakaze)	-2,12	Oksidoreduktaza, ki sodeluje pri oksidaciji maščobnih kislin, aktivaciji inflamatorja [52].	Ulcerozni kolitis, Crohnova bolezen, artritis, revmatoidni artritis, kolitis [52].
TEX35 (protein 35, ki se izraža v testisih)	-2,11	Se izraža predvsem v testih v citoplazmi [130].	Ni podatkov
SH3GLIP2 (psevdomogen 2 endofilina A2)	-2,10	Ni podatkov	Ni podatkov
PRAMEF11 (član družine PRAME proteinov 11)	-2,09	PRAME proteini se izražajo v melanomu, v normalnem tkivu ne razen v testisih. Deluje kot represor receptorja retinojske kisline [52].	Preko represije ustavitve celičnega cikla, diferenciacije in apoptoze sodeluje pri nastanku raka (melanom, levkemija, hematološki raki [52].

PLCXD1 (domena fosfolipaze C)	-2,08	Fosfolipaza C hidrolizira fosfolipide v maščobne kisline [52].	Tumor supresorski gen pri malignem melanomu [131]
MMP3 (matriksna metaloproteinaza 3)	-2,06	Encim, ki razgrajuje ekstracelularni matriks (kolagen, fibronektin, laminin, hrustančni proteoglikani). Procesi: Embrionalen razvoj, reprodukcija, remodelacija tkiva, celjenje ran [52].	Artritis, metastaziranja raka, koronarna srčna bolezen, sinovitis, bolezen limfnih vozlov [52].
CSH1 (hormon horionski somatomotropin 1)	-2,03	Spada med somatotropine/prolaktine, ki nadzorujejo rast. Izraža se večinoma v placenti [52]	Testikularni tumor, horiokarcinom, kongenitalna alveolarna kapilarna displazija [52]
ACTR3C (Aktinu sorodni protein 3 homolog C)	-2,02	Udeležen pri nukleaciji aktina [132].	Supresija metastazije pljučnega adenokarcinoma [131].
PCDH10 (protokadherin 10)	-2,02	Kadherini so odgovorni za povezave med celicami. Protokadherin 10 je nevronskega receptora, udeležen pri nastanku celičnih povezav v možganih [52].	Epileptična encefalopatija, deluje kot tumor supresor v nekaterih vrstah raka [52, 132].
OR4P4 (receptor za signale vonja 4P4)	-2,02	Z G-proteinom sklopljen receptor v nosu, ki se odziva na molekule, ki povzročijo signal vonja [GeneCards].	Manj kopij tega gena poveča tveganje za raka dojke [133].

HOXD13 (del družine homebox proteinov)	-2,02	Homebox proteini so družina transkripcijskih faktorjev, ki imajo pomembno vlogo pri morfogenezi. Nahajajo se v obliki klastrov na različnih kromosomih [52].	Delecije, ki imajo za posledico odstranitev celotnega HOXD klastra imajo za posledice abnormalnosti udov in genitalij. [52].
KIAA2022 (nevrit ekstenzijski in migracijski faktor)	-2,02	Udeležen v rasti nevrinov z regulacijo adhezije med celicami preko N-kadherin signalne poti [52].	Mentalna retardacija, epilepsija, pielonefritis [52].
RP9 (faktor spajanja pre-mRNA)	-2,02	V jedru udeležen pri spajanju pre-mRNA [52]	Retinitis pigmentosa [52].
SLC22A3 (prenašalec 3 družine 22)	-2,01	Prenašalec organskih kationov v jetrih, ledvicah, črevesju in drugih organih. Pomemben pri prenosu nevtrantmiterjev in nevrotoksinov v možganih [52].	Cerebralna paraliza, sladkorna bolezen tipa 1, zloraba amfetamina, ekstragonadalni seminom [52].
RNF126P1 (pseudogen proteina prstanca 126)	-2,01	Ni podatkov	Ni podatkov
OR1F2P (receptor za signalne vonja 1F2P)	-2,01	Z G-proteinom sklopljen receptor v nosu, ki se odziva na molekule, ki povzročijo signal vonja [52].	Ni podatkov

PRILOGA B: OPISI IN POVEZANE BOLEZNI GENOV, KATERIH IZRAŽANJE JE VIŠJE V GENERACIJI PRIMARNIH OSTEOLASTOV G4 KOT G3.

GEN	G4/G3	FUNKCIJA IN PROCESI	POVEZANE BOLEZNI IN STANJA
CCDC144A (zvita proteinska domena 144A)	2,89	Strukturni proteinski motiv, ki vključuje 2 alfa heliksa [134]	Ni podatkov
PCMTD2 (domena 2 L-izoaspartat O-metiltransferaze)	2,76	L-izoaspartat O-metiltransferaza katalizira metilsko esterifikacijo L-izoaspartila in D-aspartila, sodeluje pri odstranjevanju poškodovanih proteinov [135].	Spremenjeno izražanje kot odziv na kemoterapijo pri zdravljenju raka [136]
OR2A14 (receptor za signalne vonja 2A14)	2,63	Z G-proteinom sklopljen receptor v nosu, ki se odziva na molekule, ki povzročijo signal vonja [52].	Ni podatkov
PAGE2 (član 2 družine PAGE proteinov, s prostato povezan antigen 2)	2,62	PAGE proteini se izražajo v tumorjih [52].	Shizofrenija [137]
ADCY1 (adenilat ciklaza 1)	2,56	Encim, ki katalizira pretvorbo ATP-ja v nastanek cAMP [52].	Gluhost, osteoblastom, avtizem [52, 61].
GCSH (protein H znotraj glicin vezočega sistema)	2,55	Glicin vezoči sistem razgrajuje glicin, in je zgrajen iz štirih mitohondrijskih proteinov [52].	Ne-ketonska hiperglicinemija, glicinska encefalopatija [52].
OPN1LW (opsin 1)	2,51	Opsin je z G-proteinom sklopljen receptor, ki je del pigmenta, ki absorbira svetlobo [52].	Barvna svetloba, retinitis pigmentosa [52].
OSR2 (transkripcijski faktor)	2,46	Transkripcijski faktor [52].	Orofacilna shiza, endometrioza [52, 138, 139].
FBN2 (fibrilin 2)	2,35	Komponenta kalcij vezočih mikrofibril v vezivnem tkivu [52].	Arahnodaktilija, sindrom Marden-Walker, Marfanov sindrom [52, 62].
SECTM1 (tip 1a sekretorni in	2,35	Udeležen v hematopoetskih in	Ulceroglandularna tularemija, imunoska

transmembranski protein)		imunskih procesih [52, 140].	toleranca rakavih celic [52, 140].
SCN2A (Alfa 2 podenota natrijevega napetostnega kanalčka)	2,31	Natrijevi napetostni kanalčki uravnavajo akcijski potencial v možganih, mišicah in nevroendokrinih celicah s prenosom natrijevega iona [52].	Avtizem, epileptični napadi [52, 63].
KIR3DS1 (imunoglobulinu podoben receptor naravnih celic ubijalk)	2,30	Sodelujejo pri celični imunosti s citotoksičnimi lastnostmi [52].	Retionpatija, sindrom policističnih jajčnikov , sladkorna bolezen tipa 1 [52, 141, 142].
SCN2B (Beta 2 podenota natrijevega napetostnega kanalčka)	2,30	Natrijevi napetostni kanalčki uravnavajo akcijski potencial v možganih, mišicah in nevroendokrinih celicah s prenosom natrijevega [52].	Brugada sindrom, atrijska fibrilacija [52].
WDR63 (domena 63 WD ponovitve)	2,26	Strukturni motiv 40 aminokislin, udeleženi pri prenosu signala, regulaciji transkripcije, interakciji medproteini, apoptozi... [64, 88]	Hematometra [52]
IFNA5 (Interferon alfa 5)	2,25	Izločajo ga makrofagi, ima pa antivirusno funkcijo, stimulira produkcijo protein kinaze in oligoadenilat sintetaze [52].	Pljučni embolizem, Hepatitis B [143, 144]
CDRT15L2 (dupliciranem transkriptu 15 podoben protein 2)	2,24	Ni podatkov	Ni podatkov
CYP4X1 (član 1 družine 4, poddružine X citokrom P40)	2,22	Citokromi P450 so monoksigenaze ki katalizirajo reakcije metabolizma zdravil in sinteze holesterola, steroidov in ostalih lipidov [52].	Creutzfeld-Jakobova bolezen [145]
SBSPON (domena somatomedina B in trombospondina 1)	2,20	Domena hormona somatomedina, ki sodeluje pri rasti celic in trombospondina, ki je glikoprotein z	Peter Plus sindrom [52, 146].

		antiangiogeno funkcijo, sodeluje pri interakciji celica-celica in celica-matriks in tudi kot inhibitor tumorske rasti [52, 146]	
C11orf87 (odprti bralni okvir 87 kromosoma 11)	2,17	Ni podatkov	Ni podatkov
TAS2R4 (receptor za okus)	2,12	Z G-proteinom sklopljen receptor za okus, ki se izraža na celicah jezika in neba [52].	Ni podatkov
LOC100420587 (pseudogen gena za SHC vezoči in z delitvenim vretenom povezanim proteinom)	2,11	Pseudogen gena, ki sodeluje pri celični proliferaciji, rasti in diferenciaciji in pri signalnih poteh pri katerih je udeležen SHC protein [52].	Ni podatkov
TMOD4 (tropomodulin 4)	2,09	Blokira podaljšanje in depolimerizacijo aktinskih filamentov, ki je del citoskeleta in mehanizma za krčenje mišic [52, 147].	Ni podatka
LOC494127 (pseudogen gena za jedrni transkripcijski faktor Y)	2,09	Pseudogen gena za protein, ki regulira transkripcijo številnih genov [52].	Ni podatka
OMD (osteomodulin)	2,08	Vključen v procesu mineralizacije kosti, pritrja osteoblaste preko integrina [52, 65, 66].	Hallermann-Streiff sindrom, makularna distrofija [52].
CEACAMP10 (pseudogen gena za z karcinoembrionskim antigenom povezano adhezijsko molekulo)	2,07	Pseudogen gena za molekule, ki sodelujejo pri celični adheziji, znotrajceličnim signaliziranju in pri kancerogenezi in vnetja, angiogenezi in metastaziranju [148].	Ni podatka
EREG (epiregulin)	2,06	Sekretorni peptidni hormon, član epidermalnih rastnih dejavnikov. Sodeluje pri	Sodeluje pri progresiji različnih vrst raka npr. rak dojk, kolorektalni rak [52].

		vnetju, celjenju ran, zorenju oocite, proliferaciji celic [52].	
OR10G9 (receptor za signale vonja 10G9)	2,05	Z G-proteinom sklopljen receptor v nosu, ki se odziva na molekule, ki povzročijo signal vonja [52].	Ni podatkov
ADH1C (alkoholna dehidrogenaza 1C)	2,04	Encim, ki metabolizira etanol, retinol, hidroksterioide... [52].	Alkoholizem, Parkinsonova bolezen, zastrupitev z metanolom, rak grla, kolorektalni rak, pljučni rak [52, 149, 150].
IGKV1-12 (variabilni del težke verige imunoglobulina 1-12)	2,03	Sodeluje pri prepoznavi antigena. Ob vezavi gena se sproži klonska ekspanzija limfocitov B, ki proizvajajo ustrezna protitelesa [52].	Ni podatkov
IGHM (konstanti del težke verige imunoglobulina Mu]	2,02	Del imunoglobulina, ki ima vlogo prepoznavne antigena. Ob vezavi antigena se sproži klonska ekspanzija limfocitov B, ki proizvajajo ustrezna protitelesa [52].	Agamoglobulinemija, bolezen težkih verig, hipogamaglobulinemija, krioglobulinemija [52].
OR2M7 (receptor za signale vonja 2M7)	2,02	Z G-proteinom sklopljen receptor v nosu, ki se odziva na molekule, ki povzročijo signal vonja [52].	Ni podatkov
VSIG1 (adhezijska molekula JAM družine)	2,02	Superdružina imunoglobulinov, nahaja se na stikih epiteljskih in endotelijskih celic, na površini krvnih celic. Sodelujejo pri tvorbi tesnih stikov, angiogenezi, vezavi virusov, migraciji levkocitov in aktivaciji trombocitov [151]	Želodčni rak, rak jajčnikov [52].
OR2T1 (receptor za signalne vonja 2T1)	2,02	Z G-proteinom sklopljen receptor v nosu, ki se odziva na molekule, ki povzročijo signal vonja [52].	Ni podatkov

ADRA2A (adrenalni receptor alfa 2A)	2,01	Z G-proteinom sklopljen receptor, ki regulira prenos nevrotansmitterjev in simpatičnih živcev in adrenergičnih nevronov [52].	Tourettov sindrom, Hornerjev sindrom, motnja pozornosti in hiperaktivnosti [52].
ZFP90 (cinkov prst 90)	2,01	Tip cinkovega prsta, ki so samostojne proteinske domene, ki služijo za stabilizacijo drugih proteinov in kot interaktorji, ki vežejo RNA, DNA in proteine. Sodelujejo pri regulaciji transkripcije. ZPF90 je ključen transkripcijski faktor, ki uravnava delovanje KMC [52, 60].	Paraplegija, optična atrofija, nevropatija, anemija [52].
ZNF676 (cinkov prst 676)	2,01	Tip cinkovega prsta, ki so samostojne proteinske domene, ki služijo za stabilizacijo drugih proteinov in kot interaktorji, ki vežejo RNA, DNA in proteine. Sodelujejo pri regulaciji transkripcije. ZNF676 sodeluje pri regulaciji homeostaze telomer [52, 69].	Angioimunoblastni T-celični limfom [52].
DNAJA1P5 (Pseudogen gena za »heat shock« protein)	2,01	»Heat shock« proteini ščitijo proteine pred stresom, aktivirajo proteolizo nepravilno sestavljenih proteinov ter uravnavajo transport in zvižanje novih proteinov [52].	Ni podatkov
CLEC17A (domena lektina tipa C)	2,01	Receptor na površini celic, ki je udeležen v komunikaciji med celicami germinalnega centra z prepoznavo ogljikovih hidratov [52].	Progresija in metastaziranje tumorjev [152]
PRSS30P (pseudogen gena serinske proteaze 30)	2,00	Serinske proteaze so encimi z serinskimi ostanki v aktivnem mestu, ki katalizirajo razgradnjo proteinov [153].	Ni podatkov

MCTS1 (re-iniciacijski in sprostitveni faktor)	2,00	Sodeluje pri re-iniciaciji translacije, regulira celični cikel [52].	Razvoj limfoidnih tumorjev, raka dojk [52].
KRTAP4-2 (s keratinom povezan protein 4-2)	2,00	Tvorijo matriks keratinskih intermediarnih filamentov, omogočajo vzdrževati strukturo lasnih vlaken [52].	Trihotiodistrofija [154].

