

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA PRIJATELJ

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2008

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



TANJA PRIJATELJ

**ANALIZA IZRAŽANJA GENOV IBSP, COL15A1 IN WISP-1 V
OSTEOPOROTIČNEM KOSTNEM TKIVU**

**ANALYSIS EXPRESSION OF GENES IBSP, COL15A1 AND WISP-1
IN OSTEOPOROTIC BONE TISSUE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani na Katedri za klinično biokemijo.

Zahvale:

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorju asist. Zoranu Troštu, mag. farm. za strokovno pomoč pri delu v laboratoriju in pri pisanju diplomske naloge, za številne nasvete, nove izkušnje in pridobljeno znanje ter za izkazano zaupanje. Za koristne namige in praktične nasvete gre zahvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo.

Iskrena hvala moji družini, ki me je podpirala in spodbujala med celotnim študijem.

Izjava:

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Janje Marc, mag. farm. in somentorstvom asist. Zorana Trošta, mag. farm.

Ljubljana, december 2008

Tanja Prijatelj

Predsednik komisije: prof. dr. Slavko Pečar

Članica komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin

VSEBINA

1 UVOD.....	1
1.1 KOSTNA REMODELACIJA	1
1.2 OSTEOPOROZA	2
1.2.1 Dejavniki tveganja za razvoj osteoporoze	3
1.2.2 Merjenje mineralne kostne gostote.....	4
1.3 GENETSKI DEJAVNIKI PRI OSTEOPOROZI.....	5
1.3.1 Identifikacija kandidatnih genov pri osteoporozi.....	5
1.3.2 Raziskani kandidatni geni.....	7
1.3.3 Funkcijska genomika.....	8
1.3.3.1 IBSP.....	9
1.3.3.2 COL15A1	11
1.3.3.3 WISP-1	13
1.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	15
1.4.1 Uporaba PCR v realnem času.....	16
1.4.2 Načini detekcije pri PCR v realnem času	18
1.4.2.1 Nespecifični načini detekcije.....	18
1.4.2.2 Specifični načini detekcije.....	20
2 NAMEN DELA.....	23
3 MATERIALI IN METODE	24
3.1 OPIS PREISKOVANCEV IN VZORCEV KOSTNEGA TKIVA.....	24
3.2 PRIPRAVA HUMANEGA STANDARDA	24
3.2.1 Izolacija RNA	25
3.2.2 Reverzna transkripcija.....	27
3.3 IZBOR HIŠNIH GENOV.....	30
3.4 MERITVE IZRAŽANJA GENOV	33
3.4.1 Meritve izražanja hišnih genov PPIA in RPLP	34
3.4.2 Meritve izražanja kandidatnih genov IBSP in COL15A1	36
3.4.3 Meritve izražanja kandidatnega gena WISP-1	38
3.5 NORMALIZACIJA IZRAŽANJA GENOV.....	40
3.6 STATISTIČNE METODE	41
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	42

4.1 OPTIMIZACIJA REAKCIJE PCR V REALNEM ČASU	42
4.2 IZBOR DVEH HIŠNIH GENOV	43
4.1.1 Metode za izbor hišnih genov.....	45
4.1.1.1 Uporaba algoritma NormFinder®	45
4.1.1.2 Uporaba algoritma geNorm®	46
4.1.1.3 Metoda razlik Ct.....	47
4.1.1.4 Metoda z izračunom razlik Ct glede na povprečni Ct.....	47
4.1.1.5 Metoda razlik relativnih količin	48
4.1.1.6 Metoda absolutne deviacije od mediane.....	49
4.3 KVANTITATIVNA ANALIZA IZRAŽANJA PREUČEVANIH GENOV	50
4.3.1 Standardne krivulje.....	50
4.3.1.1 Standardni krivulji za hišna gena: PPIA in RPLP	50
4.3.1.2 Standardne krivulje za kandidatne gene: IBSP, COL15A1 in WISP-1.....	51
4.3.2 Analiza reakcij PCR v realnem času	54
4.3.3 Analiza talilne krivulje	55
4.4 NORMALIZACIJA IZMERJENIH VREDNOSTI PREUČEVANIH GENOV	56
4.5 KLINIČNI POMEN IZRAŽANJA GENOV IBSP, COL15A1 IN WISP-1	57
4.5.1 Analiza izražanja genov v kostnem tkivu.....	57
4.5.2 Analiza izražanja genov v neosteoporotičnem in osteoporotičnem kostnem tkivu	59
4.5.3 Povezanost izražanja genov z MKG, Z- in T-vrednostjo	61
5 SKLEP.....	65
6 LITERATURA	67
7 PRILOGE	71
7.1 Priloga 1: Opis preiskovank in bolnikov	71
7.2 Priloga 2: Vrednosti Ct, C in Povp. C za posamezen gen	72
7.3 Priloga 3: Normalizirane vrednosti mRNA kandidatnih genov	75

POVZETEK

Študije, ki temeljijo na genetiki osteoporoze, imajo pomembno vlogo v klinični praksi. Z genetskimi označevalci bi lahko že v mladosti ugotavljali tveganje za razvoj osteoporotičnih zlomov. Geni, ki regulirajo MKG in lomljivost kosti, so potencialne tarče za sintezo novih učinkovin, ki bi jih lahko uporabili za terapijo osteoporoze. Malo je znanega o vlogi posameznih genov pri osteoporozi, čeprav naj bi genetski dejavniki odgovarjali za 80 % vpliv na kostno maso. Dosedanje raziskave dokazujejo, da številni geni z majhnim individualnim vplivom sodelujejo pri uravnavanju fenotipov ter s tem tudi k pojavnosti osteoporoze.

V predhodni analizi rezultatov pridobljenih z uporabo genskih mikromrež so bili odkriti trije geni, ki so se različno izražali v osteoblastih iz osteoporotičnega in zdravega kostnega tkiva. Izražanje genov IBSP in WISP-1 je bilo znižano v osteoporotičnem kostnem tkivu, izražanje gena COL15A1 pa je bilo zvišano v osteoporotičnem kostnem tkivu.

Namen našega dela je bil potrditi rezultate dobljene s pomočjo genskih mikromrež. Izražanje genov smo izmerili s PCR v realnem času v kostnem tkivu 71 bolnikov in poskušali potrditi vpletenost genov IBSP, COL15A1 in WISP-1 v patogenezo osteoporoze. Z metodo PCR v realnem času smo izmerili mRNA treh izbranih genov. Za zaznavo produktov smo za gena IBSP in COL15A1 uporabili fluorescentno barvilo ter za gen WISP-1 s fluorofori označene sekvenčno specifične sonde. S pomočjo standardnih krivulj za posamezen gen, ki smo jih izračunali s predhodno pripravljenim humanim standardom, smo izračunali relativne koncentracije mRNA posameznega gena v vzorcih. Vsak gen za vsak posamezen vzorec smo potem normalizirali na hišna gena PPIA in RPLP, ter na povprečje njunih koncentracij mRNA v posameznem vzorcu. Hišna gena RPLP in PPIA smo izbrali s pomočjo različnih statističnih metod izmed 12-ih hišnih genov.

Na koncu smo statistično ovrednotili klinični pomen izražanja genov IBSP, COL15A1 in WISP-1. Ugotovili smo statistično značilno razliko v izražanju gena IBSP med neosteoporotičnim in osteoporotičnim kostnim tkivom v predelu kolka ter mejno statistično značilno razliko v izražanju gena IBSP v predelu vratu stegenice. IBSP se je bolj izražal v osteoporotičnem kostnem tkivu. S statističnimi testi nismo ugotovili nobene razlike v izražanju genov COL15A1 in WISP-1.

Z našo raziskavo smo tako naredili korak naprej pri ugotavljanju patogeneze osteoporoze ter pripomogli k razvoju novih rešitev pri diagnostiki obolenj kostnega tkiva.

ABSTRACT

Studies, based on the genetics of osteoporosis, play an important role in clinical practice. Testing for genetic markers in early youth could help determine the risk of developing osteoporotic fractures in later life. Genes that regulate BMD and bone fragility are potential targets for the synthesis of new drugs, which could be used for the treatment of osteoporosis. Not much is known concerning the role of individual genes in the development of osteoporosis, even though genetic factors are assumed to have an influence of 80% on bone density. Existing research shows that numerous genes with only minor individual influence also contribute to the regulation of phenotypes and thus to the occurrence of osteoporosis.

A preliminary study using gene microarrays discovered three genes, which were expressed differently in osteoblasts from osteoporotic as opposed to osteoblasts from healthy bone tissue. The expression of the IBSP and WISP-1 genes was down-regulated in osteoporotic bone tissue, while the expression of the COL15A1 gene in osteoporotic bone tissue was up-regulated.

The purpose of our work was to confirm the results, which were attained with the help of gene microarrays. Thus, we used realtime PCR to measure the expression of genes in the bone tissue of 71 patients, attempting to confirm the involvement of the IBSP, COL15A1 and WISP-1 genes in the pathogenesis of osteoporosis. Using the realtime PCR method, we measured the mRNA of the 3 selected genes. For product detection, we used fluorescent dye for the IBSP and COL15A1 genes and fluorophore-marked sequence-specific probes for the WISP-1 gene. Using standard curves for each individual gene, calculated with a previously prepared human standard, we determined the relative concentrations of mRNA of the individual gene in the samples. We then normalized each individual gene from each individual sample according to the housekeeping genes PPIA and RPLP, as well as to the mean value of their concentrations in the individual sample. With the help of various statistical methods, we selected RPLP and PPIA from among 12 housekeeping genes.

Finally, we statistically evaluated the clinical significance of the IBSP, COL15A1 and WISP-1 gene expression. We discovered a statistically significant difference in the IBSP gene expression in nonosteoporotic as opposed to osteoporotic bone tissue in the region of the entire hip and a marginally significant statistical difference of the IBSP gene

expression in the region of the femoral neck. IBSP was upregulated in the osteoporotic bone tissue. Statistical tests showed no difference in the COL15A1 gene and WISP-1 gene expression.

Our study represents a further step in researching the pathogenesis of osteoporosis, as well as a contribution to the development of new solutions for diagnosing the illnesses of bone tissue.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACTB	β -aktin
AK	aminokislina
ANOVA	analiza variance
BGLAP	kostni Gla protein
B2M	β -2-mikroglobulin
C	koncentracija
cDNA	komplementarna DNA
COL15A1	alfa 1 veriga v kolagenu XV
COL1A1	alfa 1 veriga v kolagenu I
Ct	cikel pri katerem je presežen prag fluorescence
DEXA	dvoenergetska rentgenska absorpciometrija
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	zmes deoksinukleotid trifosfatov
E	učinkovitost verižne reakcije s polimerazo
FRET	fluorescenčna resonančna energija
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GUSB	β -glukoronidaza
HKG	hišni geni
HPRT1	hipoksantin fosforiboziltransferaza 1
IBSP	integrin-vezoči sialoprotein
IL6	interlevkin-6
ITM	indeks telesne mase
MKG	mineralna kostna gostota
MKG_kolk	mineralna kostna gostota v predelu celotnega kolka
MKG_lv	mineralna kostna gostota v predelu ledvenih vretenc
MKG_vs	mineralna gostota kosti v predelu vratu stegenice
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PPIA	peptidil prolil izomeraza A
PTH	parathormon
RNaza	ribonukleaza

RNA	ribonukleinska kislina
RPLP	ribosomalni protein
SD	standardna deviacija
T_kolk	T-vrednost v predelu celotnega kolka
T_vs	T-vrednost v predelu vratu stegenice
T_lv	T-vrednost v predelu ledvenih vretenc
TBP	TATA-vezavni protein
TGFB	transformirajoči rastni dejavnik β
Tm	temperatura taljenja
TUBB	β -tubulin
UBC	ubikvitin C
UDG	uracil DNA glikozilaza
VDR	receptor vitamina D
Z_kolk	Z-vrednost v predelu celotnega kolka
Z_vs	Z-vrednost v predelu vratu stegenice
Z_lv	Z-vrednost v predelu ledvenih vretenc
WISP-1	protein 1 WNT1 sprožljive signalne poti
YWHAZ	tirozin 3-monooksigenazni/triptofan 5-monooksigenazni aktivacijski protein, zeta polipeptid
18S rRNA	18S ribosomalna RNA

1 UVOD

1.1 KOSTNA REMODELACIJA

Živa kost se nenehno spreminja, razgrajuje in na novo nastaja. To nenehno razgrajevanje in nalaganje kostnine imenujemo kostna premena ali remodelacija.

Odvija se na površini trabekularne kosti, pri kortikalni kosti pa endostalno ter v Haversovih kanalih. Bistveno vlogo pri uravnavanju kostne remodelacije igrajo parathormon (PTH), kalcitonin in vitamin D₃ (hormon D), ki zagotavljajo stalno raven kalcija v plazmi. Drugi hormoni, ki vplivajo na tvorbo in razgradnjo kosti, so rastni hormon, androgeni in estrogeni ter ščitnični hormoni. Pri uravnavanju kostne remodelacije imajo posebno vlogo tudi lokalni dejavniki in tkivni hormoni (citokini in prostaglandini). Lokalni dejavniki omogočajo tesno sklopitev procesa resorpcije in tvorbe kostnine (1).

Ciklus kostne remodelacije obsega več faz (1, 2):

1. Faza aktivacije: sploščeni osteoblasti se skrčijo in razgalijo kostno površino. Od števila aktiviranih mest na kostni površini (BRU, *angl.* bone remodeling unit) sta odvisna obseg in hitrost remodelacije.
2. Faza pridobivanja osteoklastov: začetek aktivacije kostne remodelacije se kaže s prisotnostjo večjedernih osteoklastov.
3. Faza kostne resorpcije: osteoklasti izdolbejo Howshipove lakune.
4. Faza preobrata: je čas med koncem resorpcije ter začetkom tvorbe nove kostnine. Osteoklasti se odmaknejo in za seboj puščajo prazne Howshipove lakune, na dnu katerih fagociti najprej naložijo cementno plast.
5. Faza pridobivanja osteoblastov in tvorbe novega osteoida: aktivni, izoprizmatski osteoblasti zapolnijo Howshipovo lakuno z osteoidom, ki ga tvori v lamele razporejen kolagen. Količina novo nastale nemineralizirane kosti je odvisna od števila in aktivnosti osteoblastov.
6. Faza mineralizacije: se začne nekaj dni po nastanku novega osteoida. Pri mineralizaciji sodeluje alkalna fosfataza, ki jo osteoblasti tvorijo in izločajo v

ekstracelularno tekočino, pospešujejo pa jo drugi proteini organskega matriksa (osteokalcin, osteonektin).

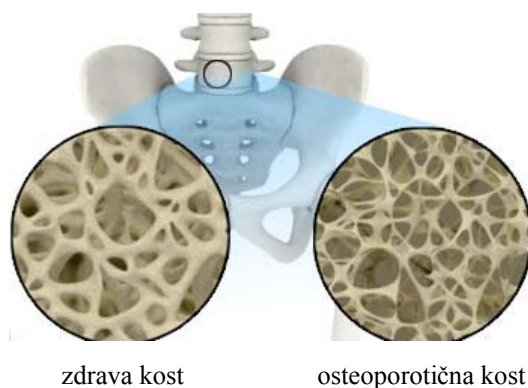
7. Faza mirovanja: površino novonastale kosti prekrijejo sploščeni osteoblasti. Večina kostnine se nahaja v tej fazi.

Proces tvorbe nove kosti traja približno tri mesece, osteoklastična razgradnja pa le nekaj dni. V tem času naj bi se domnevno zamenjalo $0,05 \text{ mm}^3$ kostnine (1).

Procesa sta pri odraslem človeku usklajena in ne povzročata spremembe kostne mase. Pri starejših ljudeh pa je prav neravnotežje med razgradnjo in izgradnjo kostnine, ki vodi v izgubo kostne mase, vzrok za pojav osteoporoze (2).

1.2 OSTEOPOROZA

Osteoporoza je sistemska, degenerativna skeletna bolezen, za katero je značilna nizka mineralna kostna gostota (MKG, *angl.* bone mineral density), mikroarhitekturne spremembe kostnega tkiva pa vodijo k večji krhkosti kosti in posledično k večjemu tveganju za osteoporotični zlom (3).



Slika 1: Zdrava in osteoporotična kost (4).

Osteoporotični zlomi se v večjem številu začnejo pojavljati po 60. letu starosti. Zlom zapestja je najzgodnejši, sledi mu zlom hrbteničnega vretenca, ki je najštevilčnejši, po 70. letu starosti pa se pojavljajo zlomi kolkov, ki predstavljajo najresnejšo posledico osteoporoze. Incidenca zlomov se pri moških in ženskah s starostjo veča eksponentno. Še posebej opazna pa postaja zaradi daljšanja povprečne življenjske dobe (5). Osteoporoza je do 70. leta starosti 6-krat pogostejša pri ženskah, predvsem po menopavzi, saj letno izgubijo 1-3 % MKG, v prvih 5-8 letih po menopavzi pa je lahko izguba MKG 3-5 %, po

70. letu je pogosta tudi pri moških, ki letno izgubijo približno 0,3 % MKG, vendar je razmerje še vedno 2:1 v prid ženskam. V Sloveniji si kolk letno zlomi približno 1000 žensk, starejših od 60 let. Med starejšimi ljudmi je osteoporoza ena najbolj razširjenih kroničnih bolezni (3).

1.2.1 Dejavniki tveganja za razvoj osteoporoze

Dejavniki tveganja za osteoporozo so vsi dejavniki, ki zavirajo tvorbo kostnine v obdobju rasti, ali pa pospešujejo njeno razgradnjo v kasnejših življenjskih obdobjih. Nizka MKG je sočasno eden najpomembnejših dejavnikov tveganja za zlom (6).

Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze, na katere ne moremo vplivati, so:

- genetski dejavniki (ženske majhne postave, svetle polti in las, bela in azijska rasa),
- starost v obdobju menopavze (zgodnja menopavza, odstranitev jajčnikov),
- starost (zmanjšanje izločanja nekaterih rastnih dejavnikov, zmanjšana absorpcija kalcija),
- bolezni prebavil (motena absorpcija kalcija),
- kronična ledvična odpoved,
- stanje po presaditvi organov,
- imobilizacija zaradi bolezni ali poškodb (zmanjšanje kostne mase zaradi telesne neaktivnosti).

Dejavniki tveganja za osteoporozo, ki se jim lahko izognemo ali lahko nanje vplivamo, so:

- telesna neaktivnost (obremenitev kosti spodbuja delovanje osteoblastov in osteocitov),
- prehrana (premajhna vsebnost kalcija in vitamina D v hrani, prekomerno beljakovinska in vlakninska hrana zavirata absorpcijo kalcija iz črevesja),
- redno uživanje večjih količin alkoholnih pijač (alkohol zavira absorpcijo kalcija iz črevesja, prizadeta je tvorba vitamina D zaradi oviranega delovanja ledvic, moteno je delovanje osteoblastov),
- kajenje (kadilke so nagnjene k zgodnejši menopavzi, estrogeni se pod vplivom nikotina pretvorijo v neaktivno obliko),
- kofein (povečuje izločanje kalcija z urinom),

- premalo sončne svetlobe (zmerno izpostavljanje sončnim žarkom lahko zagotovi primerno količino vitamina D za zdrave kosti),
- nizka telesna teža (premajhna telesna teža vpliva na zmanjšano sintezo hormonov, ki so potrebni za ohranjanje kostnine),
- zdravila (dolgotrajno zdravljenje z glukokortikoidi pri bronhialni astmi, revmatičnih obolenjih in drugih avtoimunskih obolenjih, dolgotrajna uporaba heparina in zdravljenje z metotreksatom, lahko povzročijo hitro prehajanje hrane skozi črevo, kar onemogoči zadostno absorpcijo kalcija, antikonvulzivi pa spodbujajo delovanje encimov, ki razgrajujejo vitamin D ...) (3, 7).

Dokazano je, da imajo genetski dejavniki močan vpliv na MKG in druge fenotipske značilnosti osteoporoze, zato je veliko študij dejavnikov tveganja za razvoj osteoporoze posvečenih prav proučevanju genetskim dejavnikom (8).

1.2.2 Merjenje mineralne kostne gostote

Osteoporoza predstavlja zmanjšanje kostne mase za več kot 2,5 standardni deviaciji (SD) od največje kostne mase v odrasli dobi. Diagnozo osteoporoze lahko pred osteoporotičnim zlomom določimo samo z aparaturo za merjenje mineralne kostne gostote (1). Metode merjenja mineralne kostne gostote delimo na invazivne in neinvazivne. Najpogosteje se uporabljajo neinvazivne metode, kamor spadajo dvoenergetska rentgenska absorpciometrija (DEXA, *angl.* Dual Energy X-ray Absorptiometry), kvantitativna računalniška tomografija (QCT, *angl.* Quantitated Computed Tomography) in kvantitativni ultrazvok (QUS, *angl.* Quantitative Ultrasound). Med invazivne metode spada skeletna scintigrafija (1, 8).

DEXA zabeleži površinsko MKG (g/cm^2) in se rutinsko meri na ledvenih vretencih (L1-L4 ali L2-L4), kolku (vrat stegenice, trohanter ali Wardov trikotnik) in zapestju (9).

Svetovna zdravstvena organizacija je uporabila MKG za definiranje specifičnih diagnostičnih kategorij. MKG je normalizirana glede na dva kriterija – na zdravo mlado odraslo osebo (T-vrednost) in glede na enako starost (Z-vrednost).

- T-vrednost: predstavlja kostno gostoto, ki se primerja z gostoto, normalno pričakovano v zdravih mladih osebah istega spola, starih od 25 do 35 let. T-vrednost predstavlja

število enot – standardnih deviacij – kjer je kostna gostota nad ali pod normalno vrednostjo (10).

Svetovna zdravstvena organizacija priporoča oceno stanja kosti in definicijo osteoporoze na osnovi neinvazivnega merjenja MKG in prisotnosti zlomov: oseba ima normalno MKG, če je njena T-vrednost na mestu merjenja nad -1,0, T-vrednost, ki je med -1,0 in -2,5 na vsaj enem mestu merjenja, se definira kot osteopenija; T-vrednost pod -2,5 na vsaj enem mestu merjenja pa kot osteoporoza. Napredovana osteoporoza je prisotna takrat, ko je oseba utrpela enega ali več osteoporotičnih zlomov, ne glede na vrednost MKG (9).

- Z-vrednost: predstavlja število standardnih deviacij pod ali nad vrednostjo MKG, ki je normalno pričakovana pri osebi istih let, spola, teže in rase. Pomaga pri diagnozi sekundarne osteoporoze (10).

1.3 GENETSKI DEJAVNIKI PRI OSTEOPOROZI

Osteoporoza ima kompleksno etiologijo in velja za večfaktorsko poligensko bolezen, pri kateri so genetske determinante uravnane s hormonskimi, okoljskimi in prehrabnenimi dejavniki. Številni specifični geni so vpleteni v razvoj osteoporoze in igrajo pomembno vlogo pri patogenezi osteoporoze (11).

Proučevanje dvojčkov v študijah družin kaže, da je od 60 do 85% variance pri kostni gostoti genetsko določene, prav tako pa je bilo pokazano, da tudi drugi dejavniki tveganja za osteoporotične zlome, kakršni so kvantitativne ultrazvočne lastnosti kosti, stegenska kostna geometrija in razpon označevalcev kostne remodelacije, vsebujejo močno dedno komponento. Več študij je prav tako pokazalo, da družinska zgodovina zlomov predstavlja dejavnik tveganja, ki je neodvisen od MKG, kar torej lahko pomeni, da vsebuje deden dejavnik (8).

1.3.1 Identifikacija kandidatnih genov pri osteoporozi

Pri iskanju in identifikaciji genov, ki vplivajo na razvoj osteoporoze, se uporabljajo številni pristopi. Najpogosteje uporabljeni pristopi so modelni organizmi, asociacijske študije, študije vezanega dedovanja in študije kandidatnih genov (12).

Modelni organizmi: te študije se že dolgo uporabljajo za identifikacijo genov, odgovornih za razvoj kompleksnih bolezni. Pri študijah se uporabljajo miši z nizko in visoko MKG. Miši z nasprotnimi fenotipi prvotno parijo med seboj. Prva generacija potomcev ima povprečno MKG zaradi dedovanja enega alela od starša z nizko in enega alela od starša z visoko MKG. V drugi generaciji zaradi rekombinacije med starševskimi kromosomi pride do različnih vrednosti MKG, kot posledica parjenja med brati in sestrami. Analiza genoma temelji na drugi generaciji, ki omogoči lokalizacijo genetskih variant, ki regulirajo MKG (12).

Asociacijske študije: te študije največkrat obsegajo identifikacijo polimorfizmov kandidatnega gena in sorodne alele v povezavi z MKG ali osteoporotičnimi zlomi v populacijskih študijah ali naključnih kontrolnih študijah. Identifikaciji polimorfizma v določenem kandidatnem genu sledi analiza, ki določi povezanost posameznega alela pri tem polimorfizmu. Asociacijske študije lahko primerjajo paciente z osteoporozo z zdravimi osebami; populacijske študije pa lahko vključuje osebe z različnimi vrednostmi MKG. Klasične asociacijske študije vključujejo izbiro kandidatnih genov, ki imajo znan učinek na kostni metabolizem ali aktivnost kostnih celic. Geni, ki so pri redkih monogenških boleznih mutirani, so se prav tako izkazali kot vir polimorfizmov, ki uravnavajo MKG v normalni populaciji. Ni nujno, da povezava med kandidatnim genom in MKG pomeni, da je ta gen odgovoren za opazovan fenotip, saj lahko obstaja vezno neravnovesje z bližnjim vzročnim genom (13). Prednost asociacijskih študij je enostavna izvedba ter identifikacija genov z majhnim vplivom (12). Slabost študij je, da so lahko tudi pomanjkljive, zaradi učinkov zamenljivih dejavnikov, genetske heterogenosti in populacijske stratifikacije (13).

Študije vezanega dedovanja: ta vrsta analiz se že dolgo uporablja za identifikacijo genov, odgovornih za redke monogenške bolezni, kot sta osteopetroza in sklerestoza. Pri osteoporozi študije vezanega dedovanja vključujejo genotipizacijo polimorfnih mikrosatelitnih označevalcev po celotnem genomu ter povezanost genetskih označevalcev z dednostjo fenotipa za izbrano lastnost (MKG) med družinskimi člani. Prednost študij vezanega dedovanja je, da lahko identificirajo nove molekularne poti, ki regulirajo kostni metabolizem. Zaradi manjše sposobnosti identifikacije genov z majhnim individualnim vplivom pa so manj primerne pri poligenških boleznih (12, 13).

1.3.2 Raziskani kandidatni geni

Številni geni so bili prvotno identificirani kot možni kandidatni geni, ki uravnavajo MKG in tveganje za osteoporotični zlom. Kandidatni gen predstavlja tisti gen, katerega produkt bi, glede na poznavanje preučevane bolezni, lahko vplival na potek bolezni. Geni so bili nato izbrani glede na vpliv, ki ga imajo na citokine in rastne faktorje (IL6, TGFB), odgovorne za uravnavanje kostne remodelacije; glede na kodiranje komponent kostnega matriksa (COL1A1, BGLAP); glede na kodiranje receptorjev za kalcotropne hormone (VDR, PTH) (13). Posamezni najpogosteje preučevani kandidatni geni, ki so vpleteni v regulacijo kostne mase ali osteoporotične zlome so predstavljeni v preglednici I (12).

Preglednica I: Nekateri najpogosteje preučevani kandidatni geni, ki so jih povezali z MKG in drugimi z osteoporozo povezanimi fenotipi (12).

Hormoni in receptorji	Regulatorni dejavniki osteoblastov
androgeni receptor (AR)	Alox 12 in Alox 15 (ALOX12 in ALOX15)
aromataza (CYP19A1)	kostni morfogeni protein 2 (BMP2)
receptor za kalcitonin (CALCR)	kostni morfogeni protein 4 (BMP4)
estrogenski receptor α (ESR1)	jederni vezavni dejavnik A1 (RUNX2)
estrogenski receptor β (ESR2)	inzulinu podobni rastni dejavnik 1 (IGF1)
paratiroidni receptor tipa 1 (PTH1R)	sklerostin (SOST)
paratiroidni hormon (PTH)	transformirajoči rastni dejavnik β (TGFB)
receptor vitamina D (VDR)	LDL-receptorju soroden protein 5 in 6 (LRP5 in LRP6)
Citokini in receptorji	Z osteoklasti povezani geni
interlevkin-1 α in β (IL1A in IL1B)	katepsin K (CTSK)
antagonist interlevkin-1 receptorja (IL1-RA)	kloridni kanal 7 (CLCN7)
interlevkin-6 (IL6)	osteoprotegerin (OPG)
dejavnik tumorske nekroze (TNF)	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (RANK)
receptor dejavnika tumorske nekroze (TNFR2)	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (RANKL)
Ostali	Sestavine kostnega matriksa in encimi za razgradnjo
apolipoprotein E (APOE)	α 2-HS-glikoprotein (AHSG)
metilen tetrahidrofolatna reduktaza (MTHFR)	kolagen tipa 1 α I (COL1A1)
HLA razred II (HLA-D)	osteokalcin (BGLAP)

Različne študije so številne polimorfizme kandidatnih genov že povezale z razvojem osteoporoze. Vendar pa za mnoge kandidatne gene zveza z MKG in drugimi, z

osteoporozo povezanimi fenotipi, še ni bila dokazana, v nekaterih primerih pa so mehanizmi genov, ki so v povezavi z MKG, še premalo raziskani. Le nekaj polimorfizmov genov je bilo bolj raziskanih (VDR, COL1A1, ESR in CYP19A1), zato na tem področju ostaja še veliko dela pri identifikaciji genetskih variant, ki so povezane z osteoporotičnimi fenotipi, in katere bodo predstavljale uporabno diagnostično orodje in molekularne tarče za terapevtsko manipulacijo (12).

Študije, ki temeljijo na genetiki osteoporoze, imajo v klinični praksi pomembno vlogo. Genetski označevalci bi se lahko uporabili kot diagnostično orodje pri posameznikih, saj bi z njimi lahko ugotavljali tveganje za razvoj osteoporotičnih zlomov dosti pred kliničnimi znaki. Že zdaj vemo, da MKG T-vrednost $-2,5$, ki se uporablja kot meja za začetek zdravljenja osteoporoze, identificira le majhno število posameznikov, ki dejansko trpijo za zlomi. Genetski označevalci kostne lomljivosti ali izgube kostne mase, bi se poleg denziometričnih meritev lahko uporabljali za ciljno terapijo pri osebah s povečanim tveganjem za zlome (14).

Pri odkrivanju kandidatnih genov, ki vplivajo na razvoj osteoporoze, so vse bolj pomembne na celotni genom razširjene asociacijske študije, ki omogočajo analizo več tisoč polimorfizmov naenkrat, študije s katerimi se preučujejo interakcije med geni ter interakcije med geni in okoljem, ter funkcijska genomika, ki se ukvarja s strukturo, izražanjem in funkcijo genov (13).

1.3.3 Funkcijska genomika

Funkcijska genomika je področje molekularne biologije, ki poskuša uporabiti obsežno količino podatkov, pridobljenih z genomskimi projekti (kot so projekti za sekvenciranje genoma), za opis genske (in proteinske) funkcionalnosti in interakcij. Funkcijska genomika vključuje s funkcionalnostjo povezane vidike samega genoma, kakršna je analiza mutacij in polimorfizmov (na primer SNP), kakor tudi meritve molekularnih dejavnosti. Funkcijska genomika večinoma uporablja multiple tehnike za merjenje genskih produktov, kot so mRNA ali proteini v biološkem vzorcu (15).

Eden izmed novejših tehnoloških pristopov pa je uporaba DNA mikromrež za mRNA, ki se ukvarja s študijami izražanja genov. Pri tem se raziskuje razlike v izražanju genov v tkivih posameznikov z ali brez fenotipa, ki nas zanima (normalna, zvečana ali zmanjšana MKG).

Študije genetike, kjer se raziskujejo odnosi med geni in osteoporozo ter sorodnimi značilnostmi na ravni DNA, nam ne morejo razjasniti kako geni vplivajo na posamezno bolezen. Študije funkcijske genomike pa pojasnjujejo posredne biokemijske procese bolezni. Cilj funkcijske genomike torej ni samo določitev vseh genov in njihovih funkcij, temveč tudi razumeti, kako komponente skupno tvorijo delovanje celic in organizmov.

DNA mikromreže in tehnologija proteomike, ki sistematično in kvantitativno določata izražanje mRNA in proteinov osnovnih funkcij v celicah, tkivih ali organizmu na ravni genoma in proteoma, sta pomembna vidika funkcijske genomike. Tehnologija mikromrež dovoljuje sočasno spremljanje izražanja več tisoč genov. Mikromreže se tako uporabljajo tudi za študije izražanja genov pri osteoporozni (16).

Na Katedri za klinično biokemijo so z analizo osteoblastov iz zdravega in osteoporotičnega kostnega tkiva z uporabo genskih mikromrež odkrili več sto različno izraženih genov. Med slednjimi se nahajajo tudi IBSP, COL15A1 in WISP-1.

1.3.3.1 IBSP

Uradna oznaka: IBSP

Uradno imenovanje: integrin-vezoči sialoprotein (kostni sialoprotein)

Ostale oznake: BNSP, BSP, BSP-II, SP-II

Ostala imenovanja: kostni sialoprotein II, kostni sialoprotein

Kromosom: 4 Lokacija: 4q21-q25

Protein, ki ga kodira gen IBSP, je glavni strukturni protein nekolagenskega dela kostnega tkiva. Sestavlja približno 12 % proteinov nekolagenskega tipa v človeški kosti. Izražanje kostnega sialoproteina je omejeno na mineralizirana tkiva, kot so kosti, mineraliziran hrustanec in zobovina (17). Sintetizirajo ga osteoblasti, osteociti in osteoklasti, vključno s hipertrofičnimi hondrociti. Zunajskeletno ga sintetizirajo samo trofoblasi (18).

Gen IBSP sestavlja približno 15kb parov. Vsebuje 7 eksonov, ki so ločeni s 6 introni (18). Protein je sestavljen iz 301 aminokislina (19). Kostni sialoprotein je bil najprej izoliran iz kortikalne kosti kot 23-kDa dolg glikopeptid z visoko vsebnostjo sialične kisline. Nativni kostni sialoprotein ima glede na SDS-PAGE analizo molekulska masa 60-80 kDa, kar je precejšen odklon od napovedne teže približno 33kDa (glede na zaporedje cDNA) (20).

Kostni sialoprotein je zunajcelični nekolagenski fosforilirani kisli glikoprotein, ki je vpleten v kostno mineralizacijo in remodelacijo (17). Je član družine proteinov SIBLING (*angl.* Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein) pri katerih je bil dokazan vpliv na diferenciacijo celic. Podvržen je številnim posttranslacijskim modifikacijam, in sicer N- in O- glikozilaciji, sulfataciji tirozina ter fosforilaciji serina in treonina. Domneva se, da ti postranslacijski dodatki posredujejo v interakcijah med zunajceličnim matriksom in celico, na primer, fosforilacija lahko vpliva na celično povezanost (21).

Sestavljata ga dve domeni, bogati s poliglutaminsko kislino, ter celično prepoznavno zaporedje za integrin vezavni tripeptid (RGD; arginin-glicin-asparaginska kislina). Prva domena se nahaja na N-koncu, ki se konča s šestimi fosfoserini, druga je na C-koncu s fosfoserinom 154. Ti fosfoserini skupaj z domeno, bogato s poliglutaminsko kislino, sodelujejo pri interakciji s Ca^{2+} ioni in hidroksiapatitom. Iz nedavnih študij tvorbe hidroksiapatitnih jeder sklepajo, da je domena poliglutaminske kisline kostnega sialoproteina odgovorna za formacijo kalcij-fosfatnih kristalov (17). S tripeptidom RGD se kostni sialoprotein veže na $\alpha\beta$ -integrinski receptor kostnih celic in z nanomolarno afiniteto na matriksno metaloproteinazo-2 (22). Defosforilirana oblika kostnega sialoproteina z osteoklastično na tartrat-odporno kislinsko fosfatazo nima zmožnosti za spodbujanje od RGD odvisne povezanosti osteoklastov (17).

Nekolagenski fosfoproteini zunajceličnega matriksa sodelujejo v številnih bioloških funkcijah med tvorbo kostnega tkiva. Izražanje kostnega sialoproteina je zvišano med tvorbo nove kosti in njenim obnavljanjem. To vključuje kalcifikacijo kosti, kostno resorpcijo, kostno remodelacijo in diferenciacijo kostnih celic (17). Najvišja koncentracija kostnega sialoproteina je zato odkrita na mestih, kjer je kost na novo sintetizirana ali remodelirana (19). Zato se kostni sialoprotein pogosto uporablja kot označevalec diferenciacije osteoblastov, čeprav je vloga proteina v funkciji osteoblastov nejasna. Kostni sialoprotein lahko služi kot z matriksom povezan signal, ki neposredno zviša diferenciacijo osteoblastov, kar se kaže kot povečana produkcija mineraliziranega matriksa. Pomanjkanje kostnega sialoproteina oslabi rast kosti in mineralizacijo, hkrati z zmanjšano kostno tvorbo (23).

Izražanje kostnega sialoproteina je povezano z zorenjem osteoblastov in je povečano z dejavniki, ki sprožijo diferenciacijo osteoblastov, vključno z glukokortikoidi in kostnimi morfogenimi proteini, ki podpirajo kostno tvorbo, zmanjšano pa z dejavniki, ki pospešujejo kostno resorpcijo kot je 1,25-dihidroksi vitamin D_3 . Izražanje kostnega sialoproteina v

osteoblastih je povezano s procesom diferenciacije, ki vodi v mineralizacijo preko inaktivacije Rho GTPaze. Prav tako zaledronska kislina preko inaktivacije Rho GTPaze poveča izražanje kostnega sialoproteina v osteoblastih (24).

Izražanje kostnega sialoproteina je povečano tudi v določenih karcinomih, ki metastazirajo pretežno v kosteh: rak prostate, rak dojke, pljučni rak, tumor ščitnice, prav tako pa tudi multipli mielom in nevroblastom. Kostne metastaze raka na prostati ter raka na dojki izražajo značilno več kostnega sialoproteina kot visceralne metastaze. Protein je klinično pomemben kot prognostični serumski označevalec za kostne metastaze. Pacientke s primarnim rakom na dojki, katere so imele preoperativno povišano raven kostnega sialoproteina, imajo večje tveganje za tvorbo kostnih metastaz v prvih letih po operaciji (19). V tumorjih je izražanje kostnega sialoproteina povezano s tvorbo mineralnih mikrokristalov in z metastazami tumorskih celic v kosti (17).

1.3.3.2 COL15A1

Uradna oznaka: COL15A1

Uradno imenovanje: alfa 1 veriga v kolagenu XV

Ostala imenovanja: alfa 1 tip XV kolagen, kolagen XV alf-1 polipeptid, kolagen tipa XV proteoglikan

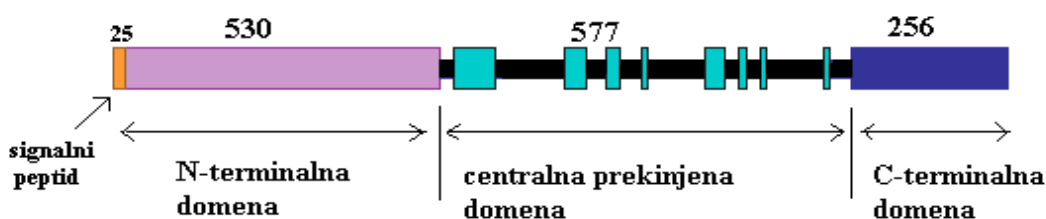
Kromosom: 9 Lokacija: 9q21-q22

Gen kodira alfa verigo kolagena XV, člana družine kolagenov FACIT (*angl.* Fibril-Associated Collagens with Interrupted Helices). Velik je približno 145 kb parov in vsebuje 42 eksonov (25). Znotraj družine kolagenov je približno 20 različnih tipov, ki jih kodira najmanj 38 genov. Kolagena tipa XV in XVIII sta del poddružine multipleksinov (multiple domene s trojno vijačnico in prekinitvami) (26). Za omenjena kolagena je značilna prisotnost večih nekolagenskih domen (27). Kolagen XV je homotrimer, ki je sestavljen iz treh $\alpha 1$ kolagenskih verig (28).

Kolagen tipa XV je velika makromolekula, pomembna zaradi kolagenske domene z večjimi prekinitvami in številnimi hondroitin sulfatnimi in heparan sulfatnimi legami verig glikozaminoglikanov. Prisoten je v večini predelov bazalne membrane, kjer je tesno povezan s fibrilami kolagenov. Največ kolagena XV je v placenti in popkovini. Z uporabo

svetlobne mikroskopije so našli kolagen XV še v mišičnih, endotelijskih, živčnih ter maščobnih conah (Je eden izmed redkih kolagenov, saj ga je v popkovini, ki je bogata s kolagenom, manj kot $1-2 \cdot 10^{-4} \%$).

Verigo kolagena XV sestavlja 1363 aminokislin (AK), trimer pa je verjetno sestavljen iz identičnih polipeptidov brez znanih različic, ki so posledica alternativnega izrezovanja. Na začetku vsebuje 25 AK dolg signalni peptid. N-terminalna domena iz 530 AK se začne z N-terminalnim modulom trombospondina-1, ki je prisoten v številnih fibrilarnih in nefibrilarnih kolagenih, kateri sledi specifični segment iz približno 315 AK, ki vsebuje veliko potencialnih vezavnih mest za glikozaminoglikan. Dodatno zaporedje je locirano, z večjimi prekinitvami, znotraj 577 AK dolge prekinjene regije kolagena. Centralno kolagensko zaporedje je sestavljeno iz 9 kolagenskih poddomen, ki so ločene z 8 nekolagenskimi poddomenami. Najdaljšo kolagensko poddomeno sestavlja 114 AK. Na C-terminalni strani verige je neglikozilirana domena iz 256 AK (25, 27, 29).



Slika 2: Linearna struktura $\alpha 1$ verige kolagena XV; signalni peptid (oranžno); nekolagenska N-terminalna domena, ki vsebuje zaporedje trombospondina (vijolično); nekolagenska C-terminalna domena (temno modro), centralni kolagenski del iz 9 kolagenskih poddomen (črno) in 8 nekolagenskih poddomen (svetlo modro) (27).

Funkcija proteina je še neznan. Zato so Eklund in sodelavci v študiji preučevali ničelno mutacijo gena Col15a1 v miši. Kljub popolni odsotnosti kolagena tipa XV, se je miš normalno razvijala in razmnoževala, vendar pa so pri treh mesecih starosti opazili napredujoče histološke spremembe, značilne za mišične bolezni. Ultrastrukturalna analiza je razkrila propadle kapilare in degeneracijo endotelijskih celic v srčni in v skeletnih mišicah. Pomanjkanju kolagena tipa XV so po povzročenem kardiovaskularnem naporu sledile poškodbe srca. Ugotovili so, da kolagen tipa XV deluje kot strukturna komponenta, potrebna za stabilizacijo celic z okoliškim povezovalnim tkivom, vsaj v skeletnih mišičnih celicah in kapilarnem ožilju (28).

Restin, C-terminalni peptid, ki ga dobimo po proteolitični razgradnji kolagena tipa XV, zavira angiogenezo, zmanjša rast tumorja, prav tako pa tudi zavira različne morfološke dogodke, kot sta migracija endotelijskih celic in tumorogeneza (26, 27).

1.3.3.3 WISP-1

Uradna oznaka: WISP1

Uradno imenovanje: protein 1 WNT1-sprožljive signalne poti

Ostale oznake: CCN4, WISP1c, WISP1i, WISP1tc

Ostala imenovanja: WNT1 inducirani izločeni protein 1, WNT-1 inducirajoč signalni protein 1

Kromosom: 8 Lokacija: 8q24.1-q24.3

Gen kodira protein, ki je član poddružine WNT1 signalne poti. Wnt (*angl.* wingless-type MMTV integration site family) predstavlja veliko skupino izločenih signalnih proteinov, ki so vpleteni v celično proliferacijo, diferenciacijo in morfogenezo (so posredniki različnih razvojnih procesov) (30). Dokazano je bilo, da ima nedavna identifikacija kritične vloge Wnt signalne poti v regulaciji funkcije osteoblastov pomembno vlogo pri določanju kostne mase in moči (31).

WISP-1 (Wnt-1-induced secreted protein) se na ravni AK v 83% ujema z mišjim proteinom. Protein sestavlja 367 AK. Alternativno izrezovanje gena omogoča nastanek dveh različnih transkriptov, WISP-1v in WISP-1vx (32).

WISP-1 je član družine rastnih faktorjev CCN, ki vključuje tudi: CTGF (*angl.* connective tissue growth factor), Cyr61 (protein 61 bogat s cisteinom), NOV (*angl.* nephroblastoma overexpressed), WISP-2 in WISP-3. Za člane družine CCN so značilne štiri ohranjene domene, bogate s cisteinom: vezna domena inzulinu podobnega rastnega faktorja, domena von Willebrand faktor C, domena trombospondin-1 in C-terminalna domena, ki domnevno vsebuje cisteinski vozle (33).

Člani družine CCN so vpleteni v razvojne procese hondrogeneze, osteogeneze in angiogeneze. Ti proteini stimulirajo mitozo, adhezijo, apoptozo, produkcijo zunajceličnega matriksa, ustavitev rasti in migracijo multiplih celičnih tipov. Prav tako se lahko ti proteini vežejo in aktivirajo celično površino integrinov in na ta način povzročijo znotrajcelično

signaliziranje, vključno z aktivacijo kinaz in transkripcijo genov. CCN proteini so lokalizirani na površini celic ali v zunajceličnem matriksu v povezavi s heparan sulfatnimi proteoglikani in izkazujejo močno afiniteto do heparina (33). Eksperimentalni dokazi kažejo na to, da so člani družine CCN vpleteni v skeletogenezo in celjenje kosti (34).

WISP-1 je tarča signalne poti Wnt/ β -katenin, njegovo izražanje pa je uravnavano z β -kateninom. Delovanje in uporabnost WISP-1 se uravnava z njegovimi interakcijami z dekorinom in biglikanom, dvema zunajceličnima, z matriksom povezana proteoglikanoma, ki se nahajata predvsem v kosteh in hrustancu (30). Kodiran protein se veže na dekorin in biglikan in morda preprečuje njuno inhibično aktivnost v proliferaciji tumorskih celic. Prav tako zmanjša apoptozo preko proteina p53 in odgovor na poškodbo DNA preko aktivacije Akt kinaze (32). V študiji so pokazali, da je vezava WISP-1 omejena na stromo tumorja in na celice s fenotipom fibroblastov. Možno je, da WISP-1 sodeluje pri napredovanju tumorja, saj lahko, ko se veže na dekorin in biglikan, prepreči njuno inhibično aktivnost na celično proliferacijo tumorja. Z omejevanjem varovalne vloge dekorina in biglikana, bi lahko WISP-1 zagotovil napredovanje tumorogeneze. Pospeševanje rasti bi WISP-1 dodelilo ključno vlogo pri razvoju raka (35). WISP-1 in biglikan sta povečana pri neinfarktiranem srčnem mišici *in vivo*, zaradi pozitivne amplifikacije signalizacije WISP-1. WISP-1 poveča hipertrofijo kardiomiocitov, proliferacijo fibroblastov in izražanje zunajceličnega matriksa *in vitro*. Ti rezultati kažejo na to, da WISP-1 igra kritično vlogo v remodelaciji po poškodbi miokarda (36).

Izražanje WISP-1 je bilo analizirano v celicah strome kostnega tkiva s PCR v realnem času. Rezultati so pokazali, da je WISP-1 modulator proliferacije in osteogene diferenciacije, obenem pa naj bi bil regulator signaliziranja TGF- β 1 v celicah, podobnih osteoblastom (37).

V celičnih linijah mišjih hondrocitov je WISP-1 povečal proliferacijo in gostotno nasičenje vendar zmanjšal prisotnost hondrocitov. Ti podatki nakazujejo, da bi WISP-1 lahko igral pomembno regulativno vlogo pri homeostazi kosti in hrustanca. Med drugim so pokazali tudi povezanost polimorfizma gena WISP-1 z radiografskimi značilnostmi skleroze hrbtenice. Genotipizacija WISP-1 bi bila koristna pri preprečevanju in upravljanju osteoartritisa hrbtenice. WISP-1 bi bil primerna molekularna tarča pri razvoju novih diagnostičnih označevalcev, kakor tudi potencialno terapevtsko prijemališče pri osteoartritisu (30).

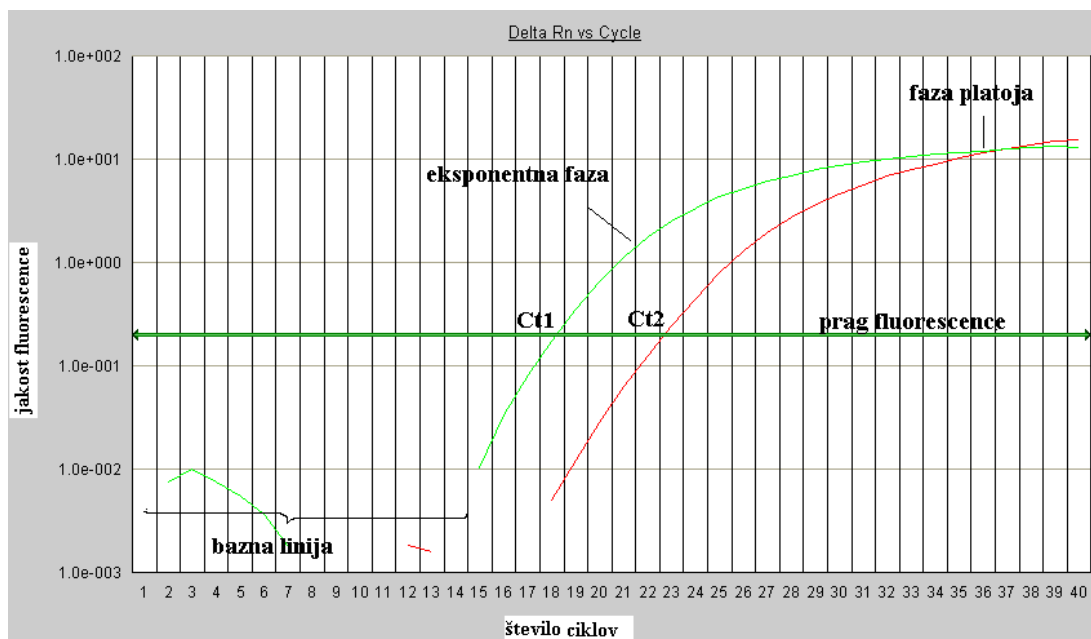
Mezenhimske celice peritumoralne strome različnih vrst rakov prekomerno izražajo WISP-1, le-ta pa je domnevno določen kot parakrini efektor tumorogeneze. WISP-1, izražen v normalnih fibroblastih, deluje na avtokrini način pri pospešitvi celične rasti, poveča gostotno nasičenje, inducira morfološko transformacijo in pospešuje tumorogenezo. Čeprav je WISP-1 vpleten v napredovanje tumorja, je njegova funkcija v normalnih bioloških procesih še neznana (34).

WISP-1 naj bi bil vpleten tudi v razvoj in napredovanje primarnega pljučnega raka, saj njegovo prekomerno izražanje kaže na to, da deluje kot onkoprotein. Nivo izražanja bi lahko služil kot prognostični označevalec, ter tudi kot potencialna terapevtska tarča. WISP-1 je močno izražen pri raku dojke in raku debelega črevesja (38).

1.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (*angl.* Real Time Polymerase Chain Reaction), oziroma kvantitativni ali kinetični PCR, je laboratorijska tehnika, ki temelji na verižni reakciji s polimerazo (PCR) in se uporablja za kvantifikacijo tarčne DNA molekule. Omogoča tako detekcijo kot kvantifikacijo specifičnega zaporedja DNA v vzorcu (39).

Tehnologija PCR v realnem času temelji na detekciji fluorescentnega signala, ki nastane v sorazmerju s pomnoževanjem tarčne DNA. Povečanje signala fluorescence je zabeleženo med analizo in je sorazmerno količini DNA sintetizirane med enim ciklom pomnoževanja (40). Kontinuirano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu nam omogoči, da izmerimo količino produkta PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazi. To naredimo tako, da na osnovi izmerjenih podatkov narišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence vzorca od števila ciklov (slika 4). Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto intenziteto fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Ko preseže ta prag (C_t , *angl.* threshold cycle), za vsak vzorec določimo cikel. C_t je določen v eksponentni fazi PCR reakcije in je obratnosorazmeren začetnemu številu kopij tarčne DNA. Razlika C_t med dvema vzorcema pomeni, da je razlika v količini matrice 2-kratna. S primerjavo vrednosti C_t vzorcev z vrednostmi C_t standardov z znanim številom kopij matrice, lahko določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu. Priprava tovrstnih standardov je zahtevna, zato zlasti pri merjenju izražanja genov, kjer nam pogosto zadostuje le podatek o razliki med vzorci, rezultate večkrat podamo samo relativno (41).



Slika 3: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času.

Teoretično obstaja kvantitativen odnos med količino začetnega vzorca in količino produkta PCR v vsakem ciklu. PCR v realnem času zaznava povečanje pomnoženih produktov med samo reakcijo. Podatki so potem izmerjeni v eksponentni fazi PCR, ki je optimalna točka za analizo podatkov. Tradicionalne metode PCR-ja uporabljajo agarozno gelsko elektroforezo ali ostale post-PCR detekcijske metode, ki pa niso tako natančne, saj poteka zaznavanje produktov šele po končanem pomnoževanju v plato fazi. PCR v realnem času omogoča lažjo, hitrejšo in bolj natančno kvantifikacijo DNA in RNA v primerjavi s prejšnjimi metodami (42).

1.4.1 Uporaba PCR v realnem času

PCR v realnem času ponuja številne možnosti uporabe v molekularni biologiji, laboratorijski diagnostiki in farmaciji.

Najpogosteje se uporablja za:

- meritve izražanja genov in ugotavljanje sprememb v izražanju genov,
- kvantifikacijo DNA in RNA,
- virusno kvantifikacijo,
- detekcijo patogenov,

- genotipizacijo,
- učinkovitost terapije z zdravili, napovedovanje prognoze, ugotavljanje rezistence na zdravila,
- ugotavljanje poškodb DNA - zmanjšanje ali povečanje števila kopij posameznih genov, točkaste mutacije (zamenjave, delecije, insercije), kromosomske inverzije in translokacije (41, 42).

Prednosti uporabe PCR v realnem času pred tradicionalnim PCR: (41, 42)

- PCR v realnem času zbira podatke v eksponentni razvojni fazi, medtem ko tradicionalni PCR meri v končni točki (plato) – kar pomeni večjo zanesljivost podatkov,
- povečanje fluorescentnega signala reporterja je neposredno sorazmerno številu pomnoženih fragmentov,
- široko dinamično območje za detekcijo (7-8 log₁₀ kopij matrice) omogoča analizo vzorcev z zelo različnimi koncentracijami tarčnih molekul,
- visoka občutljivost (< 5 kopij matrice) in ponovljivost (< 2 % koeficienta variacije za Ct),
- ni naknadne obdelave podatkov PCR, kar skrajša čas analize in zmanjša možnost kontaminacije.

Sposobnost zbiranja podatkov PCR v realnem času med eksponentno fazo predstavlja idealno tehniko za študije izražanja genov (42). Analiza genskega izražanja nam je lahko v pomoč pri preučevanju različnih kompleksnih bioloških procesov. Iz sprememb v izražanju genov je mogoče sklepati na njihovo vlogo pri razvoju bolezni, kar lahko pripomore k razvoju novih diagnostičnih testov in zdravil. Spremljanje genskega izražanja ima pomembno vlogo pri razvoju novih zdravil tako pri odkrivanju novih tarč za zdravila, kot pri preverjanju učinkovitosti in toksičnosti učinkovin. V tem smislu je pomembna kombinacija tehnologije DNA mikromrež in PCR v realnem času. S tehnologijo mikromrež namreč lahko naenkrat pregledamo več tisoč genov in identificiramo potencialno zanimive gene, katerih izražanje nato natančneje ovrednotimo s PCR v realnem času (41).

1.4.2 Načini detekcije pri PCR v realnem času

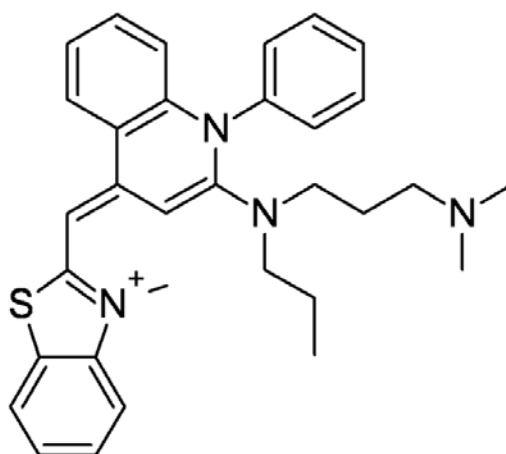
Načinov za detekcijo produktov s PCR v realnem času je več, lahko pa jih razdelimo v dve skupini glede na to, ali z njimi zaznamo samo specifični produkt, ali pa zaznamo tudi morebitno prisotne nespecifične produkte.

1.4.2.1 Nespecifični načini detekcije

DNA vezavna barvila:

DNA vezavna barvila (SYBR Green I, BOXTO) spadajo med nespecifične načine detekcije in oddajajo fluorescenco, ko se vežejo v nastajajočo dvoverižno DNA. V stopnji prileganja je DNA enoverižna, barvilo je prosto in ne fluorescira. Medtem, ko se produkt PCR kopiči med pomnoževanjem, se lahko veže več barvila ter oddaja fluorescenco. Intenziteta fluorescence se sorazmerno povečuje s količino nastale dvoverižne DNA (40, 42). Osnovni zahtevi za DNA vezavna barvila pri uporabi v PCR v realnem času sta, da barvila povečajo fluorescenco, ko je vezano v dvoverižno DNA ter, da ne inhibirajo PCR (42).

➤ *SYBR Green I*



Slika 4: SYBR Green I (43).

Barvilo SYBR Green I (slika 4) spada med nespecifične načine detekcije, ki se interkelarno veže v dvoverižno DNA, medtem ko se tarčno zaporedje podvaja med PCR (42). Nevezano

barvilo oddaja malo fluorescence, med podaljševanjem pa se povečuje količina barvila, vezanega v nastajajočo dvoverižno DNA. Rezultat je povečanje signala fluorescence, vidno med polimerizacijo. Med denaturacijo signal zopet pade (40).

Kako deluje barvilo SYBR Green I (Slika 5)

Večstopenski proces:

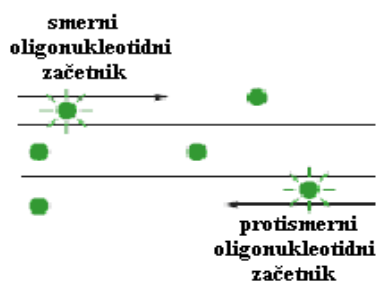
1. Začetek reakcije: SYBR Green I fluorescira, ko je vezan v dvoverižno DNA.



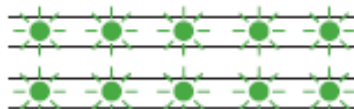
2. Denaturacija: ko se DNA denaturira, se SYBR Green I sprosti in fluorescence se občutno zmanjša.



3. Polimerizacija: oligonukleotidni začetniki se prilegajo na tarčno DNA; pod vplivom DNA polimeraze se podaljšujejo. Prične se kopičenje PCR produkta.



4. Konec polimerizacije: ko se polimerizacija konča, se SYBR Green I veže v dvoverižno DNA, kar se zazna kot povečanje fluorescence.



Slika 5: Shema vezave barvila SYBR Green I med PCR (42).

Prednosti in slabosti barvila SYBR Green I

Lahko se uporablja za kontrolo pomnoževanja kateregakoli zaporedja dvoverižne DNA. SYBR Green I je cenejše od specifičnih fluorescentnih sond in uporabno za analizo različnih genov. Glavna slabost barvila SYBR Green I je, da lahko povzroči lažno pozitivne signale; ker se SYBR Green I veže na vse dvoverižne DNA, se lahko veže tudi v nespecifična zaporedja dvoverižne DNA (42). Zaradi manjše specifičnosti v primerjavi z ostalimi načini detekcije, z njim tako ne zaznamo samo zelenih, specifičnih produktov, ampak vsako dvoverižno DNA, ki je prisotna v zmesi. Zaradi tega je zelo pomembna optimizacija reakcijskih pogojev, s katero zmanjšamo nastanek nespecifičnih produktov in dimerov oligonukleotidnih začetnikov (41).

Analiza talilne krivulje:

Vsak del dvoverižne DNA ima svojo temperaturo taljenja (T_m), pri kateri je 50 % DNA v enoverižni obliki. Temperatura je odvisna od dolžine DNA, vrste zaporedja, vsebnosti baznih parov G:C ter Watson-Crick parjenja. Pri uporabi DNA vezavnih barvil pride po segrevanju produkta PCR do nenadnega upada fluorescence, ki ga označimo kot T_m (zaradi disociacije DNA verig in sprostitve barvila). T_m produkta je definirana kot temperatura, pri kateri se pojavi najbolj strm upad signala, kar nato lahko identificiramo kot najvišjo točko v negativnem odvodu talilne krivulje. Površina pod krivuljo (AUC) je sorazmerna količini produkta. Talilne krivulje predstavljajo odvisnost temperature od fluorescence. Detekcija se lahko izvede z DNA vezavnimi barvili, vendar ne s fluorofori označenimi sekvenčno specifičnimi sondami, ker omenjene sonde ne omogočajo analize talilne krivulje. Talilne krivulje se uporabljajo za genotipizacijo, ločitev enobaznih neujemanj med tarčnim zaporedjem in sondo, ter najpogosteje, za karakterizacijo produkta (44).

1.4.2.2 Specifični načini detekcije

Sistemi za PCR v realnem času so bili izboljšani z uvedbo s fluorofori označenih sekvenčno specifičnih sond, ki uporabljajo 5' nukleazno aktivnost Taq DNA polimeraze. Uporaba teh sond je omogočila razvoj metode za zaznavanje zgolj specifičnih produktov podvajanja (42).

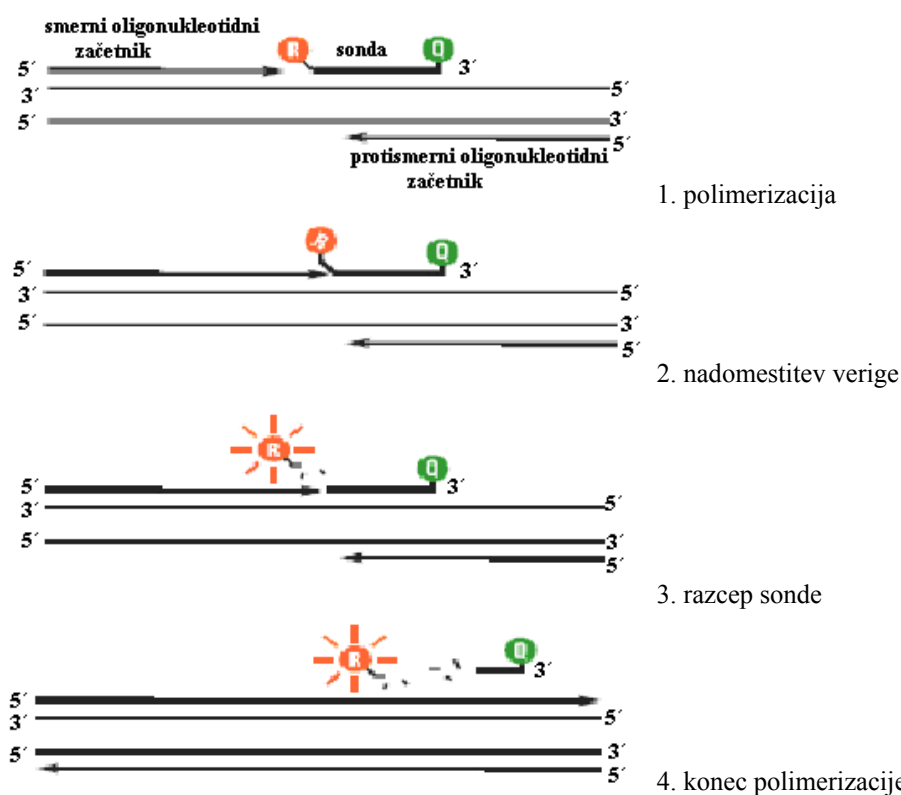
Hidrolizirajoče sonde:

Hidrolizirajoče sonde, kamor spada tudi tehnologija »TaqMan«, fluorescirajo na osnovi hidrolize sonde pri detekciji akumulacije PCR produkta. 5' nukleazna sposobnost DNA polimeraze omogoča hidrolizo sonde, ko je ta vezana na tarčno zaporedje. Hidroliza omogoči, da se razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem poveča in tako je onemogočeno prestrezanje fluorescence. Fluorescenca reporterskega barvila zato sorazmerno s količino produkta PCR naraste (40, 41).

➤ »TaqMan« sonde

Kako delujejo »TaqMan« sonde (slika 6)

Tehnologija »TaqMan« sond izkorišča 5' nukleazno aktivnost DNA polimeraze, ki med procesom PCR sondo razgradi. Oligonukleotidna sonda je sestavljena iz fluorescentnega reporterskega barvila (6-FAM, 6-karboksifluorescein) na 5' koncu in dušilca (MGB, *angl.* minor groove binder) na 3' koncu. Ko je sonda intaktna, neposredna bližina dušilca zmanjša fluorescenco reporterja s prenosom fluorescenčne resonančne energije (FRET) skozi prostor. Sonde so načrtovane tako, da se vežejo na notranje regije PCR produkta. Med PCR, ko polimeraza podvaja tarčno sekvenco na kateri je vezana sonda, 5' eksonukleazna aktivnost polimeraze razgradi sondo (povzroči hidrolizo na tarčno zaporedje vezane sonde v stopnji podaljševanja). Ta razcep sonde loči reportersko barvilo od dušilca, zato se fluorescenca reporterja poveča. Odstranitev sonde od tarčnega niza dovoljuje nadaljevanje podaljševanja oligonukleotidnega začetnika do konca tarčnega zaporedja, zato vključitev sonde ne inhibira procesa PCR. Z vsakim ciklom se cepijo od svojih sond dodatne molekule reporterskega barvila. To povzroči povečanje intenzitete fluorescence sorazmerno s količino proizvedenega produkta PCR. Akumulacija PCR produkta se zazna neposredno s spremljanjem povečanja fluorescence reporterja samo, če je tarčno zaporedje komplementarno sondi in se pomnožuje med PCR (45).



Slika 6: 5' → 3' nukleazna aktivnost v sistemu DNA polimeraze med PCR. R = reporter, Q = dušilec (45).

Prednosti »TaqMan« sond:

- za proizvodjanje signala fluorescence je potrebna specifična vezava med sondo in tarčnim zaporedjem,
- sonde so lahko označene z različnimi, ločljivimi reporterskimi barvili, ki dovolijo pomnoževanje dveh različnih sekvenc v isti reakcijski zmesi,
- post-PCR procesiranje ni potrebno, kar skrajša analizo dela in zniža materialne stroške.

Glavna slabost sond je sinteza različnih sond za zaporedje, ki ga želimo pomnožiti (42).

Hibridizacijske sonde:

Uporabljamo dve sekvenčno specifični sondi, ki sta označeni ena z donorskim, druga pa z akceptorskim fluoroforom. V stopnji prileganja se zaporedno vežeta na odsek, ki ga pomnožujemo. Bližina obeh sond omogoči prenos energije zaradi ekscitacije donorskega fluorofora na 3' koncu prve sonde, na akceptorski fluorofor na 5' koncu druge sonde. Ta oddaja svetlobo z daljšo valovno dolžino, ki jo merimo in je sorazmerna s količino produkta PCR. So zelo specifične, ker signal nastane samo ob vezavi obeh sond na pravilno tarčno zaporedje (40, 41).

Tako hibridizacijske kot hidrolizirajoče sonde spadajo med specifične načine detekcije. S fluorofori označene sonde se specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo. Za meritev signala izkoriščamo princip fluorescenčnega resonančnega prenosa energije (FRET, *angl.* fluorescence resonance energy transfer) iz donorske na akceptorsko molekulo. Kadar sta dva fluorofora, katerih ekscitacijski in emisijski spekter se prekrivata, dovolj blizu, ekscitacija donorskega barvila povzroči emisijo svetlobe, ki ekscitira akceptorsko barvilo, to pa posledično oddaja svetlobo drugačne valovne dolžine (41).

2 NAMEN DELA

Novejši pristop k preučevanju genetskega ozadja poligenških bolezni, med katere sodi tudi osteoporoza, predstavljajo vsegenomske študije z genskimi mikromrežami. Ker te omogočajo le semikvantitativne meritve, je potrebno rezultate potrditi z občutljivejšo metodo.

Na Katedri za klinično biokemijo so s predhodno analizo genskih mikromrež odkrili več kot sto genov, ki so se različno izražali v osteoblastih iz osteoporotičnega in zdravega kostnega tkiva. Odkrili so znatno razliko v izražanju genov IBSP, COL15A1 in WISP-1.

V diplomski nalogi nameravamo ovrednotiti sledeče hipoteze:

- Izražanje gena IBSP, ki kodira zapis za kostni sialoprotein, je znižano v osteoporotičnem kostnem tkivu.
- Izražanje gena COL15A1, ki kodira zapis za alfa 1 verigo v kolagenu XV, je zvišano v osteoporotičnem kostnem tkivu.
- Izražanje gena WISP-1, ki kodira zapis za protein 1 WNT1-sprožljive signalne poti, je znižano v osteoporotičnem kostnem tkivu.

Namen našega dela je potrditi dobljene rezultate na večjem številu vzorcev ($n = 71$), ter s tem oceniti vpletenost genov v patogenezo osteoporoze. Uporabili bomo metodo PCR v realnem času. Pripravili bomo tudi humani standard iz vzorca trabekularne kostnine. Izolirano RNA iz vzorca bomo z reverzno transkripcijo prepisali v cDNA. Humani standard bomo uporabili za izračun standardnih krivulj, iz katerih bomo nato določili relativne koncentracije mRNA posameznih genov.

Na koncu bomo statistično ovrednotili dobljene vrednosti, normalizirane na povprečje koncentracij mRNA hišnih genov PPIA in RPLP za posamezen vzorec. Statistično bomo ocenili izražanje genov v preiskovanih vzorcih, ter ugotavljali povezanost genov v povezavi s fenotipom osteoporoze, MKG. Statistično bomo ovrednotili vpliv na MKG, Z- in T-vrednost, ter ugotavljali povezavo izražanja le-teh z MKG, Z- in T-vrednostjo v posameznem predelu merjenja (celotni kolk, vrat stegenice, ledvena vretenca).

Pričakujemo, da bomo ugotovili statistično značilno razliko v izražanju genov IBSP, COL15A1 in WISP-1, ter potrdili morebitno vpletenost teh genov v patogenezo osteoporoze.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 OPIS PREISKOVANCEV IN VZORCEV KOSTNEGA TKIVA

A) Izražanje kandidatnih genov IBSP, COL15A1 in WISP-1 smo določili v kostnem tkivu 71 bolnikov (23 moških in 48 žensk). Povprečna starost bolnikov je bila $67,9 \pm 11,0$ let. Bolniki so bili operirani zaradi osteoartritisa ali zloma kolka z namenom vstavitve umetnega kolka. Vzorci trabekularne kostnine so bili odvzeti iz vratu stegenice in proksimalnega dela stegenice, takoj zamrznjeni v tekočem dušiku in do izolacije RNA shranjeni pri -80°C . RNA je bila izolirana s trenjem v tekočem dušiku in ekstrakcijo v Trizol-u (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA) po navodilih proizvajalca. Za oceno velikosti in integritete RNA je bila narejena elektroforeza izolata na 2 % agaroznem gelu. 10 ng totalne RNA je bilo uporabljeno za sintezo cDNA z High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, ZDA). Vzorci cDNA so bili do uporabe zamrznjeni pri -20°C . Meritve MKG na ledvenih vretencih (L1-L4), vratu stegenice in celotnem kolku so bile opravljene z DEXA (Hologic QDR 1000). Meritve MKG pri bolnikih z osteoartritisom so bile narejene pred operacijo, pri bolnikih z zlomom kolka pa neposredno po operaciji. Podatki za posameznega bolnika so navedeni v prilogi 1, preglednica XXXII.

B) Pri izboru hišnih genov smo uporabili vzorce 7-ih bolnic, ki so bile operirane zaradi okvare kolka. Vzorci so bili odvzeti iz vratu stegenice in proksimalnega dela stegenice, takoj zamrznjeni v tekočem dušiku in tam hranjeni do izolacije RNA. RNA je bila izolirana s trenjem v tekočem dušiku, ekstrakcijo v QIAzol-u nato pa izolirana z reagenčnim kompletom RNeasy Lipid Tissue Mini Kit. MKG je bila določena z meritvijo v petnici z ultrazvokom. Podatki za posamezno bolnico so navedeni v prilogi 1, preglednica XXXI.

3.2 PRIPRAVA HUMANEGA STANDARDA

Za pripravo humanega standarda smo uporabili vzorec kostnega tkiva, pridobljen od bolnice, operirane zaradi vstavitve umetnega kolka (totalna artroplastika) v Ortopedski

bolnišnici Valdortra, Ankaran. Vzorec trabekularnega kostnega tkiva je bil odvzet iz vratu stegenice in proksimalnega dela stegenice in potopljen v RNA stabilizacijski reagent RNA later[®]. Shranjen je bil 24 ur pri 4°C, nato pa do uporabe zamrznjen pri -20°C.

Najprej smo odlili RNA stabilizacijski reagent RNA later[®]. Kost smo nato zdrobili v tekočem dušiku in po približno 200 mg vzorca dodali v 1,5 mL epruvete, kamor smo predhodno že odpipetirali 1 mL QIAzol-a, stehali količino danega vzorca, nato pa vsebino homogenizirali z ultrazvokom. Do izolacije RNA so bili vzorci shranjeni pri -70°C.

3.2.1 Izolacija RNA

Za izolacijo smo uporabili komplet RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemčija).

Postopek izolacije:

1. Homogenizirane vzorce, ki so bili shranjeni v QIAzol-u, smo najprej 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi (15-25°C).
2. Nato smo dodali 200 μ L kloroforma in intenzivno stresali 15 sekund.
3. Pri sobni temperaturi smo nato inkubirali 2-3 minute.
4. Vzorce smo nato centrifugirali pri 12000 * g 15 minut pri 4°C.
5. Zgornjo, vodno fazo (600 μ L), kjer se nahaja RNA, smo prenesli v novo epruveto, dodali 600 μ L 70 % etanola ter zmešali. DNA delce, ki so ostali v srednji fazi, ter proteine v spodnji, organski fazi, smo zavrgli.
6. Vzorec smo prenesli na RNeasy kolono v 2 mL mikrocentrifugirki in centrifugirali pri ≥ 8000 * g 15 sekund pri sobni temperaturi. Eluat smo zavrgli, kolono pa vstavili nazaj v mikrocentrifugirko.
7. Dodali smo 700 μ L pufra RW1 na RNeasy kolono in centrifugirali pri ≥ 8000 * g 15 sekund pri sobni temperaturi. S tem pufrom smo spirali membrano. Ponovno smo eluat zavrgli.
8. Nato smo dodali 500 μ L pufra RPE na RNeasy kolono in centrifugirali pri ≥ 8000 * g 15 sekund pri sobni temperaturi. S tem pufrom smo prav tako spirali membrano, eluat smo zavrgli.

9. Še enkrat smo dodali 500 μ L pufra RPE na RNeasy kolono in centrifugirali pri $\geq 8000 \times g$ 2 minuti pri sobni temperaturi, da se je odstranil ves etanol na koloni.
10. RNeasy kolono smo prestavili v novo 2 mL epruveto in centrifugirali pri maksimalni hitrosti ($16000 \times g$) 1 minuto, da se je eliminiral še preostali pufer RPE. Mikrocentrifugirko smo zavrgli.
11. RNeasy kolono smo prestavili v novo 1,5 mL zbiralno epruveto ter na sredino membrane dodali 2 krat po 30 μ L ultra čiste vode (brez RNaz) in centrifugirali pri $\geq 8000 \times g$ 1 minuto pri sobni temperaturi. RNA, ki je bila v eluatu, je očiščena in uporabna za nadaljnje delo.

Opozorilo:

Potrebno je uporabiti primerno količino začetnega materiala (200-300 mg), da se ne preseže kapacitete RNeasy kolone (maksimalna vezavna kapaciteta je 100 μ g RNA) in da se tako zagotovi optimalna količina ter čistost RNA!

Reagenti in kemikalije:

- RNA later[®] Solu. (Ambion, Austin, TX)
- QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, Hilden, Nemčija)
- kloroform (MERCK, Whitehouse Station, NJ, ZDA)
- raztopina za izpiranje: pufer RW1 (QIAGEN, Hilden, Nemčija)
- raztopina za izpiranje: pufer RPE (pred uporabo ga je potrebno razredčiti z etanolom 96-100 %) (QIAGEN, Hilden, Nemčija)
- avtoklavirana ultra čista voda (brez RNaz)
- 70 % etanol
- raztopina RNase Free (GENE CHOICE, Frederick Maryland, ZDA)

Aparature in pribor:

- 4710 Ultrasonic Homogenizer (COLE-PARMER INSTRUMENT CO, Chicago, ZDA)
- polavtomatski pipeti 20-200 μ L, 100-1000 μ L (EPPENDORF, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirani nastavki za pipete
- terilnica, spatula, pinceta
- 2 ml avtoklavirane mikrocentrifugirke (QIAGEN, Hilden, Nemčija)

- RNeasy Mini Spin kolona (QIAGEN, Hilden, Nemčija)
- avtoklavirane zbiralne epruvete 1,5 mL, 2 mL
- centrifuga 5415R (EPPENDORF, Hamburg, Nemčija)
- vibracijski stresalnik (Biosan, Riga, Latvija)
- tehtnica Europe 60 (GIBERTINI, Novate Milanese, Italija)

Vsakemu vzorcu v posamezni epruveti smo izmerili koncentracijo RNA na NanoDropu[®] (THERMO SCIENTIFIC, Waltham, MA, ZDA), z Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA) pa smo ugotavljali kvaliteto izolirane RNA.

3.2.2 Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija je postopek, kjer se enoverižna RNA reverzno prepíše v komplementarno DNA (cDNA) z uporabo celotne celične RNA, encimom reverzne transkriptaze, naključnimi heksameri, dNTP-ji in inhibitorjem RNaz. cDNA se potem lahko uporabi za PCR v realnem času. RNA, ki smo jo izolirali iz kostnega tkiva, smo s postopkom reverzne transkripcije prepisali v cDNA. Količina začetnega materiala je lahko med 1 pg do največ 5 µg celokupne mase RNA. Iz povprečja koncentracij RNA, ki smo jih izmerili na NanoDropu[®], smo izračunali volumen raztopine RNA, ki smo ga potrebovali za reakcijo, po sledeči enačbi:

$$V = m / C$$

m - največja dovoljena masa za reverzno transkripcijo (ng)

C - povprečje koncentracij izmerjenih na NanoDropu[®] (ng/µL)

V - volumen raztopine RNA, ki ga potrebujemo za reakcijo (µL)

Izračunani volumen raztopine RNA za reverzno transkripcijo je bil **3,26 µL**.

Priprava reakcijskih zmesi :

Za pripravo reakcijskih zmesi smo uporabili SuperScript[™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA).

Reakcijske zmesi za reverzno transkripcijo smo pripravili v komori za izolacijo RNA. Količine dodanih reagentov smo pomnožili s 6, saj smo glede na število preiskovanih

vzorcev (n = 71) morali oceniti potrebno količino humanega standarda. Najprej smo pripravili reakcijsko zmes 1.

Preglednica II: Sestava reakcijske zmesi 1.

reagenti	volumen (μL)	* 6 (μL)
naključni heksameri (50 ng/ μL)	1,00	6,00
dNTP (10 nM)	1,00	6,00
vzorec (RNA)	3,26	19,56
ultra čista voda	4,74	28,44
	$\Sigma = 10,00 \mu\text{L}$	$\Sigma = 60,00 \mu\text{L}$

Zmes 1 smo nato inkubirali pri 65°C za 5 minut, da smo denaturirali sekundarne strukture RNA, nato pa smo jo takoj postavili na led za več kot 1 minuto, da so se naključni heksameri lahko prilegali na RNA.

Preglednica III: Sestava reakcijske zmesi 2.

reagenti	volumen (μL)	* 6 (μL)
10 * RT pufer	2	12
MgCl ₂ (25 mM)	4	24
DTT (0,1 M)	2	12
RNaseOUT™ (40 U/ μL)	1	6
SuperScript™ III RT (200 U/ μL)	1	6
	$\Sigma = 10 \mu\text{L}$	$\Sigma = 60 \mu\text{L}$

Potek reverzne transkripcije

Reakcijsko zmes 2 smo dodali reakcijski zmesi 1 ter tako pripravljeno zmes najprej inkubirali 10 min pri 25°C nato pa jo vstavili v ciklični termosta. Na podlagi programa, ki smo ga predhodno vnesli, je ciklični termosta v določenih časovnih intervalih spreminjal temperaturo in s tem omogočil prepis RNA v cDNA.

Preglednica IV: Program reakcije reverzne transkripcije.

	temperatura (°C)	trajanje
prileganje	25	10 min
podaljševanje (sinteza cDNA)	50	50 min
konec reakcije (inaktivacija encima RT)	85	5 min
ohladitev na ledu, nato dodatek 6 µL RNase H v zmes		
inkubacija (odstranitev RNA)	37	20 min

Koncentracija standarda, ki smo ga pripravili, je bila 250 ng/µL. Nato smo si pripravili alikvote s koncentracijo 20 ng/µL.

Reagenti:

- naključni heksameri (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA)
- zmes deoksinukleotid trifosfatov dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA)
- reverzna transkriptaza - SuperScript™ III RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA)
- inhibitor RNaz - RNaseOUT™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA)
- pufer - RT buffer (200mM HCl, 500mM KCl) (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA)
- MgCl₂ (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA)
- DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA)
- *E. coli* RNase H (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA)
- avtoklavirana ultra čista voda

Pribor in aparature:

- 500 µL epruvete, sterilizirane z avtoklavanjem
- polavtomatske pipete 0,1-2,5 µL, 2-20 µL, 20-200 µL (EPPENDORF, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirani nastavki za pipete
- avtoklav A-21 (Kambič, Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija)
- vibracijski stresalnik (Biosan, Riga, Latvija)
- komora za delo z DNA - DNA/RNA UV-cleaner UVC/T-M-AR (Biosan, Riga, Latvija)
- ciklični termostat Biometra® (Personal Cycler, Goettingen, Nemčija)

Opozorila:

- Prostor, ki ga uporabimo za trenje kosti v tekočem dušiku, pred pričetkom dela skrbno očistimo z raztopino RNase Free, prav tako vse potrebne pripomočke (terilnico, spatulo, pinceto), saj RNA zelo hitro hidrolizira!
- Pred pripravo reakcijske zmesi za reverzno transkripcijo, očistimo delovno površino v komori za PCR ter ves pribor, ki ga bomo uporabili (polavtomatske pipete, stojala za epruvete, vsebnike z nastavki ter stekleničke z epruветami) z raztopino RNase Free in prižgemo UV-luč ($\lambda = 254 \text{ nm}$) za 25 minut! Tudi epruvete z ostalimi reagenti, ki jih kasneje vnašamo v komoro, predhodno očistimo z raztopino RNase Free. Tako se izognemo prehitri hidrolizi RNA. Izognemo pa se tudi kontaminaciji in s tem lažno pozitivnim rezultatom!
- Vedno uporabljamo sveže rokavice in haljo pri trenju kosti v tekočem dušiku ter pri pripravi reakcijske zmesi za reverzno transkripcijo!

3.3 IZBOR HIŠNIH GENOV

S PCR v realnem času smo v 7-ih vzorcih izmerili koncentracijo mRNA hišnih genov: PPIA, RPLP, UBC, B2M, GAPDH, TBP, YWHAZ, TUBB, GUSB, ACTB, HPRT1 in 18S rRNA. Za zaznavo nastalega produkta PCR smo uporabili fluorescentno barvilo SYBR[®] GreenER[™].

Priprava reakcijskih zmesi

Izbranim 12 hišnim genom smo določili njihovo izražanje v 7-ih vzorcih. Reakcijo smo izvedli na mikrotitrski plošči z 96 vdolbinicami. Trije vzorci (vzorec 3, 7, 17) so imeli normalno MKG (T-vrednost ≥ -1), štiri vzorci (vzorec 2, 11, 14, 15) pa so imeli znižano MKG (T-vrednost $\leq -2,1$). Za vsak HKG smo tako izvedli 7 PCR reakcij za vsak posamezen vzorec.

Preglednica V: Sestava reakcijske zmesi za posamezen HKG.

reagenti	volumen (μL)
SYBR [®] GreenER [™] Super Mix	12,5
oligonukleotidni začetniki za posamezen HKG (C=200nM)	1,0
vzorec (cDNA)	0,8
ultra čista voda	10,7
	$\Sigma = 25,0 \mu\text{L}$

Potek PCR v realnem času:

V vsako vdolbinico na mikrotitrski plošči smo dodali po 25 μL reakcijske zmesi, katero smo predhodno pripravili v komori za PCR. Po končanem pipetiranju na mikrotitrsko ploščo, smo le-to pokrili z optično lepljivo prevleko, nato pa vstavili v centrifugo, da smo zmešali reakcijsko mešanico ter se znebili morebitnih prisotnih mehurčkov, saj le-ti motijo PCR. Po centrifugiranju (10000 obratov/min, 2 min) smo ploščo dodatno prekrili z gumijasto zaščito, nato pa jo vstavili v aparat ABI Prism 7000 SDS, kjer smo predhodno nastavili program, ki je prikazan v preglednici VI. Na podlagi programa je aparat v določenih časovnih intervalih spreminjal temperaturo in s tem omogočil pomnožitev zelenega HKG.

Preglednica VI: Program PCR v realnem času za HKG.

ciklični termostat	temperature in časi			
	začetni program			vsak od 40-ih ciklov
			denaturacija	prileganje & podaljševanje
ABI Prism 7000 SDS	2 min 50°C (aktivacija UDG)	10 min 95°C (UDG inaktivacija in aktivacija DNA polimeraze)	15 s 95°C	1 min 60°C

Reagenti:

- SYBR[®] GreenER[™] qPCR SuperMix for ABI Prism[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA)
- oligonukleotidni začetniki PPIA (TATAA Biocenter, Gotenborg, Sweden)
- oligonukleotidni začetniki RPLP (TATAA Biocenter, Gotenborg, Sweden)
- oligonukleotidni začetniki UBC (TATAA Biocenter, Gotenborg, Sweden)
- oligonukleotidni začetniki B2M (TATAA Biocenter, Gotenborg, Sweden)
- oligonukleotidni začetniki GAPDH (TATAA Biocenter, Gotenborg, Sweden)

- oligonukleotidni začetniki TBP (TATAA Biocenter Gotenborg, Sweden)
- oligonukleotidni začetniki YWHAZ (TATAA Biocenter, Gotenborg, Sweden)
- oligonukleotidni začetniki TUBB (TATAA Biocenter, Gotenborg, Sweden)
- oligonukleotidni začetniki GUSB (TATAA Biocenter, Gotenborg, Sweden)
- oligonukleotidni začetniki ACTB (TATAA Biocenter, Gotenborg, Sweden)
- oligonukleotidni začetniki HPRT1 (TATAA Biocenter, Gotenborg, Sweden)
- oligonukleotidni začetniki 18S rRNA (TATAA Biocenter, Gotenborg, Sweden)
- avtoklavirana ultra čista voda

Pribor in aparature:

- komora za delo z DNA - DNA/RNA UV-cleaner UVC/T-M-AR (Biosan, Riga, Latvija)
- mikrotitrna plošča z 96 vdolbinicami - 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode 128 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA)
- vibracijski stresalnik (Biosan, Riga, Latvija)
- polavtomatske pipete 0,1-2,5 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L (EPPENDORF, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirani nastavki za pipete
- avtoklavirane epruvete 0,5 mL, 1,5 mL
- centrifuga CENTRIC 322A (Tehtnica, Slovenija)

Opozorila:

- Pred pripravo reakcijske zmesi za HKG očistimo delovno površino v komori za PCR ter ves pribor, ki ga bomo uporabili (polavtomatske pipete, stojala za epruvete, vsebnike z nastavki ter stekleničke z epruvetami) s 3 % hipokloritom in prižgemo UV-luč ($\lambda = 254$ nm) za 15 minut! Tudi epruvete z ostalimi reagenti, ki jih kasneje vnašamo v komoro, predhodno očistimo s 3 % hipokloritom. Tako se izognemo kontaminaciji in s tem lažno pozitivnim rezultatom!
- Vedno uporabljamo sveže rokavice in haljo, namenjeno pripravi reakcijske zmesi za PCR v realnem času!
- SYBR[®]GreenER[™] qPCR SuperMix varujemo pred neposredno svetlobo, ker lahko pride do zmanjšanja intenzitete fluorescentnega signala!

3.4 MERITVE IZRAŽANJA GENOV

PCR v realnem času je laboratorijska tehnika, ki temelji na verižni reakciji s polimerazo in se uporablja za kvantifikacijo tarčnega DNA produkta. Proces pomnoževanja se spremlja direktno z uporabo fluorescentnih barvil ali s fluorofori označenih sekvenčno specifičnih sond. V našem primeru smo za zaznavanje produkta hišnih genov PPIA in RPLP, ter kandidatnih genov IBSP in COL15A1 uporabili fluorescentno barvilo SYBR[®] GreenER[™], za gen WISP-1 pa smo uporabili TaqMan[®] sonde.

Pri PCR v realnem času smo uporabili SYBR[®] GreenER[™] qPCR SuperMix for ABI Prism[®]. To je že pripravljen reagent, ki vsebuje Taq DNA polimerazo, fluorescentno barvilo SYBR[®] GreenER[™], 1 μ M referenčnega barvila ROX, MgCl₂, dNTP-je (z dUTP namesto dTTP), UDG (uracil DNA glikozilaza) ter stabilizatorje.

Taq DNA polimeraza v barvilu je kemijsko modificirana in ima blokirano polimerazno aktivnost pri sobnih temperaturah. Aktivnost polimeraze se vzpostavi po 10 minutni inkubaciji pri 95°C, ki jo izvedemo neposredno pred začetkom PCR. UDG in dUTP preprečita ponovno podvajanje prenosljivih produktov PCR med reakcijami. UDG se inaktivira pri visokih temperaturah med PCR v realnem času (med aktivacijo DNA polimeraze) in dovoli pomnoževanje prave tarčne sekvence. ROX normalizira signal fluorescence na inštrumentu in zagotavlja stalno bazno linijo.

Reagenti:

- SYBR[®] GreenER[™] qPCR SuperMix for ABI Prism[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA)
- TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA)
- oligonukleotidni začetniki PPIA (TATAA Biocenter, Gotenborg, Švedska)
- oligonukleotidni začetniki RPLP (TATAA Biocenter, Gotenborg, Švedska)
- TaqMan[®] sonde za gen WISP-1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA)
- IBSP smerni oligonukleotidni začetniki (Operon, Cologne, Nemčija)
- IBSP protismerni oligonukleotidni začetniki (Operon, Cologne, Nemčija)
- COL15A1 smerni oligonukleotidni začetniki (Operon, Cologne, Nemčija)
- COL15A1protismerni oligonukleotidni začetniki (Operon, Cologne, Nemčija)
- avtoklavirana ultra čista voda

Pribor in aparature:

- komora za delo z DNA - DNA/RNA UV-cleaner UVC/T-M-AR (Biosan, Riga, Latvija)
- 96 – mikrotitrna plošča - 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode 128 (Applied Biosystems, Foster City, CA)
- vibracijski stresalnik (Biosan, Riga, Latvija)
- polavtomatske pipete 0,1-2,5 μL , 2-20 μL , 20-200 μL (EPPENDORF, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirani nastavki za pipete
- avtoklavirane epruvete 0,5 mL, 1,5 mL
- ciklični termostat - ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA)
- Vortex-2 Genie (Scientific Industries, Bohemia, New York, ZDA)
- centrifuga CENTRIC 322A (Tehtnica, Slovenija)

3.4.1 Meritve izražanja hišnih genov PPIA in RPLP

Priprava reakcijskih zmesi

Najprej smo pripravili reakcijske zmesi za standardno krivuljo za posamezen hišni gen, nato pa smo pripravili reakcijske zmesi še za posamezne preiskovane vzorce. Reakcijo smo izvedli na mikrotitrski plošči s 96 vdolbincami.

Za standardno krivuljo smo uporabili predhodno pripravljen humani standard (poglavje 3.2). Dali smo ga toliko, da smo dobili koncentracije 100 ng/ μL , 50 ng/ μL , 20 ng/ μL in 10 ng/ μL . Vsako reakcijo smo izvedli v dvojniku. Reakcijske zmesi za gena PPIA in RPLP za posamezne koncentracije humanega standarda prikazuje preglednica VIII.

Izvedli smo reakcije še za posamezne vzorce na večjih mikrotitrskih ploščah. Vsako reakcijo smo izvedli v dvojniku za posamezen vzorec. Sestavo reakcijske zmesi za posamezen vzorec prikazuje preglednica VIII.

Preglednica VII: Reakcijske zmesi za HKG (PPIA in RPLP) za posamezne koncentracije humanega standarda.

reagenti	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)
SYBR® GreenER™ Super Mix	12,5	12,5	12,5	12,5
humani standard (20 ng/μL)	5,0	2,5	1,0	0,5
oligonukleotidni začetniki PPIA (200nM)	1,0	1,0	1,0	1,0
ultra čista voda	6,5	9,0	10,5	11,0
	$\Sigma = 25,0 \mu\text{L}$	$\Sigma = 25,0 \mu\text{L}$	$\Sigma = 25,0 \mu\text{L}$	$\Sigma = 25,0 \mu\text{L}$
reagenti	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)
SYBR® GreenER™ Super Mix	12,5	12,5	12,5	12,5
humani standard (20 ng/μL)	5,0	2,5	1,0	0,5
oligonukleotidni začetniki RPLP (200nM)	1,0	1,0	1,0	1,0
ultra čista voda	6,5	9,0	10,5	11,0
	$\Sigma = 25,0 \mu\text{L}$	$\Sigma = 25,0 \mu\text{L}$	$\Sigma = 25,0 \mu\text{L}$	$\Sigma = 25,0 \mu\text{L}$

Preglednica VIII: Sestava reakcijskih zmesi za posamezen vzorec za hišna gena PPIA in RPLP.

reagenti	volumen (μL)
SYBR® GreenER™ Super Mix	12,5
oligonukleotidni začetniki za posamezen HKG (C=200nM)	1,0
vzorec (cDNA)	2,0
ultra čista voda	9,5
	$\Sigma = 25 \mu\text{L}$

Potek PCR v realnem času

V vsako vdolbinico na plošči smo dodali po 25 μL reakcijske zmesi tako za standardne krivulje kot za preiskovane vzorce. Po končanem pipetiranju smo mikrotitrsko ploščo pokrili z optično lepljivo prevleko, nato pa vstavili v centrifugo. Centrifugirali smo 2 min pri 10000 obratov/min, da smo premešali reakcijske mešanice ter se znebili morebitnih mehurčkov. Ploščo smo potem še dodatno prekrili z gumijasto zaščito in jo vstavili v ciklični termostat ABI Prism 7000 SDS, kjer smo predhodno nastavili program prikazan v preglednici IX.

Preglednica IX: Program PCR v realnem času za standardne krivulje in za vzorce za HKG.

temperature in časi					
ciklični termostat			vsak od 40-ih ciklov		
	začetni program		denaturacija	prileganje & podaljševanje	analiza talilne krivulje
ABI Prism 7000 SDS	2 min 50°C (aktivacija UDG)	10 min 95°C (UDG inaktivacija in aktivacija DNA polimeraze)	15 s 95°C	1 min 60°C	20 min 60-95°C

Po končani PCR reakciji smo naredili še analizo talilne krivulje, ki nam pokaže T_m produkta, kjer lahko vidimo ali je prišlo do tvorjenja nespecifičnih produktov ter dimerov oligonukleotidnih začetnikov.

3.4.2 Meritve izražanja kandidatnih genov IBSP in COL15A1

Preglednica X: Zaporedje in lastnosti oligonukleotidnih začetnikov IBSP in COL15A1.

Oligonukleotidni začetnik	Zaporedje	Dolžina (bp)	T_m (°C)	GC (%)
IBSP (smerni)	5'-AATGGCCTGTGCTTCTCAATG-3'	22	60,81	45
IBSP (protismerni)	5'-TTCGGATGAGTCACTACTGCC-3'	22	64,54	54
COL15A1 (smerni)	5'-CCTCGCCCAAAGAAGCAAA-3'	19	60,16	52
COL15A1 (protismerni)	5'-GATGCTCATGTTGGTGGTTTCC-3'	22	62,67	50

Priprava reakcijskih zmesi

Ko smo dobili rezultate za hišna gena PPIA in RPLP, smo na enak način izračunali še standardne krivulje za kandidatna gena IBSP ter COL15A1. Standardno krivuljo smo prav tako izračunali s pomočjo humanega standarda, le da smo tokrat imeli še dodatno koncentracijo 200 ng/ μ L. Reakcijske zmesi za standardne krivulje genov IBSP in COL15A1 prikazujeta preglednica XI in XII. Vse reakcije smo izvedli v dvojniku.

Nato smo pripravili še reakcijske zmesi za posamezne preiskovane vzorce, kar prikazuje preglednica XIII. Vse reakcije smo izvedli v dvojniku. Po pipetiranju smo ploščo pokrili ter vstavili v centrifugo, kjer smo ploščo centrifugirali (10000 obratov/min, 2 min), da smo zmešali reakcijsko mešanico in se znebili morebitnih prisotnih mehurčkov. Ploščo smo prekrili še z gumijasto zaščito, nato pa jo vstavili v ciklični termostat, kjer smo spet predhodno nastavili program reakcije, ki ga prikazuje preglednica XIV.

Preglednica XI: Reakcijske zmesi za gen IBSP za posamezne koncentracije humanega standarda.

reagenti	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)
SYBR® GreenER™ Super Mix	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
humani standard (20 ng/μL)	10,0	5,0	2,5	1,0	0,5
smerni oligonukleotidni začetniki IBSP (200nM)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
protismerni oligonukleotidni začetniki IBSP (200 nM)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
ultra čista voda	0,5	5,5	8,0	9,5	10,0
	∑ = 25,0 μL	∑ = 25,0 μL	∑ = 25,0 μL	∑ = 25,0 μL	∑ = 25,0 μL

Preglednica XII: Reakcijske zmesi za gen COL15A1 za posamezne koncentracije humanega standarda.

reagenti	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)
SYBR® GreenER™ Super Mix	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
humani standard (20 ng/μL)	10,0	5,0	2,5	1,0	0,5
smerni oligonukleotidni začetniki COL15A1 (200nM)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
protismerni oligonukleotidni začetniki COL15A1 (200nM)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
ultra čista voda	0,5	5,5	8,0	9,5	10,0
	∑ = 25,0 μL	∑ = 25,0 μL	∑ = 25,0 μL	∑ = 25,0 μL	∑ = 25,0 μL

Preglednica XIII: Sestava reakcijskih zmesi za posamezen vzorec za gena IBSP in COL15A1.

reagenti	volumen (μL)	reagenti	volumen (μL)
SYBR® GreenER™ Super Mix	12,5	SYBR® GreenER™ Super Mix	12,5
smerni oligonukleotidni začetniki IBSP (200nM)	1,0	smerni oligonukleotidni začetniki COL15A1 (200nM)	1,0
protismerni oligonukleotidni začetniki IBSP (200 nM)	1,0	protismerni oligonukleotidni začetniki COL15A1 (200nM)	1,0
vzorec (cDNA)	2,0	vzorec (cDNA)	2,0
ultra čista voda	9,5	ultra čista voda	9,5
	∑ = 25,0 μL		∑ = 25,0 μL

Preglednica XIV: Program PCR reakcije za standardne krivulje in za vzorce za gena IBSP in COL15A1.

	temperature in časi				
ciklični termostat	vsak od 40-ih ciklov				analiza talilne krivulje
	začetni program	denaturacija	prileganje & podaljševanje		
ABI Prism 7000 SDS	2 min 50°C (aktivacija UDG)	10 min 95°C (UDG inaktivacija in aktivacija DNA polimeraze)	15 s 95°C	1 min 60°C	20 min 60-95°C

Na koncu smo naredili še analizo talilne krivulje za kandidatna gena IBSP in COL15A1, saj smo želeli preveriti ali je prišlo do nastanka specifičnega produkta.

3.4.3 Meritve izražanja kandidatnega gena WISP-1

Za detekcijo namnoženega odseka gena WISP-1 smo uporabili TaqMan[®] sonde. To so sekvenčno specifične sonde označene z reporterskim barvilom na 5' koncu in dušilcem na 3' koncu. Sonde se vežejo na cDNA, če je prisotno tarčno zaporedje gena WISP-1 in se med PCR, ko polimeraza podvaja tarčno zaporedje, razgradijo zaradi 5' eksonukleazne aktivnosti polimeraze. Fluorescenca reporterja se ob tem poveča sorazmerno s količino nastalega produkta. Nukleotidno zaporedje TaqMan[®] sonde za gen WISP-1 : CATACTCATTAAGGCAGGGAAGA

Priprava reakcijskih zmesi

V komori za PCR smo pripravili reakcijske zmesi najprej za standardno krivuljo, kar prikazuje preglednica XV nato pa še za posamezne vzorce kar pa prikazuje preglednica XVI. Za standardno krivuljo smo uporabili humani standard. Dali smo ga toliko, da smo dobili koncentracije 200 ng/μL, 100 ng/μL, 50 ng/μL, 20 ng/μL in 10 ng/μL. Vsako reakcijo smo izvedli v dvojniku.

V vsako vdolbinico na mikrotitrski plošči smo dodali po 25 μL reakcijske zmesi tako za standardne krivulje kot za posamezne preiskovane vzorce. Po končanem pipetiranju na mikrotitrsko ploščo, smo ploščo pokrili z optično lepljivo prevleko, jo centrifugirali (10000 obratov/min, 2 min), da smo premešali reakcijsko mešanico in se znebili morebitno prisotnih mehurčkov, nato pa jo prekrili še z gumijasto zaščito, ter vstavili v ciklični

termostat ABI Prism 7000 SDS, kjer smo predhodno nastavili program reakcije, ki jo prikazuje preglednica XVII. Potrebno je bilo nastaviti tudi standardni način ter volumen posamezne reakcije 25 μL . Pri tem nismo izvedli analize talilne krivulje, ker sonde tega ne omogočajo.

Preglednica XV: Reakcijske zmesi za gen WISP-1 za posamezne koncentracije humanega standarda.

reagenti	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)
TaqMan [®] Gene Expression Master Mix	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50
humani standard (20 ng/ μL)	10,00	5,00	2,50	1,00	0,50
TaqMan [®] sonde za WISP-1	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
ultra čista voda	1,25	6,25	8,75	10,25	10,75
	$\Sigma = 25,00$ μL	$\Sigma =$ 25,00 μL	$\Sigma =$ 25,00 μL	$\Sigma =$ 25,00 μL	$\Sigma =$ 25,00 μL

Preglednica XVI: Sestava reakcijskih zmesi za posamezen vzorec za gen WISP-1.

reagenti	volumen (μL)
TaqMan [®] Gene Expression Master Mix	12,50
TaqMan [®] sonde za WISP-1	1,25
vzorec (cDNA)	2,00
ultra čista voda	9,25
	$\Sigma = 25,00$ μL

Preglednica XVII: Program PCR v realnem času za standardne krivulje in za vzorce za gen WISP-

1.

temperature in časi				
ciklični termostat	začetni program		vsak od 40-ih ciklov	
			denaturacija	prileganje & podaljševanje
ABI Prism 7000 SDS	2 min 50°C (aktivacija UDG)	10 min 95°C (UDG inaktivacija in aktivacija DNA polimeraze)	15 s 95°C	1 min 60°C

Opozorila:

- Pred pripravo reakcijskih zmesi očistimo delovno površino v komori za PCR ter ves pribor, ki ga bomo uporabili (polavtomatske pipete, stojala za epruvete, vsebnike z nastavki ter stekleničke z epruветami) s 3 % hipokloritom in prižgemo

UV-luč ($\lambda = 254 \text{ nm}$) za 15 minut! Tudi epruvete z ostalimi reagenti, ki jih kasneje vnašamo v komoro, predhodno očistimo s 3 % hipokloritom. Tako se izognemo kontaminaciji in s tem lažno pozitivnim rezultatom!

- Vedno uporabljamo sveže rokavice in haljo, namenjeno pripravi reakcijskih zmesi za PCR v realnem času!
- SYBR[®]GreenER[™] qPCR SuperMix varujemo pred neposredno svetlobo, ker lahko pride do zmanjšanja intenzitete fluorescentnega signala!
- Vse TaqMan[®] Gene Expression Assay varujemo pred neposredno svetlobo, ker izpostavljanje svetlobi lahko vpliva na fluorescentne sonde!

3.5 NORMALIZACIJA IZRAŽANJA GENOV

Normalizacija izražanja genov se uporablja za popravilo spremembe med vzorci. Začetni material, pridobljen od različnih posameznikov, se ponavadi razlikuje glede na maso odvzetega tkiva ali število celic, RNA integriteto ali količino, ali pa se razlike pojavijo v samem eksperimentalnem postopku. Pod idealnimi pogoji je mogoče vsebnost mRNA standardizirati glede na število celic, kadar pa se uporablja celotne tkivne vzorce, pa ta tip normalizacije ni možen (40).

Kritični korak pri PCR v realnem času je normalizacija rezultatov, da se izravna razlike v čistosti in koncentraciji vzorcev. Te razlike se lahko izenači z normalizacijo na notranji standard, kar so nukleinske kisline že prisotne v posameznem vzorcu. Največkrat se kot notranje standarde pri PCR v realnem času uporablja endogene referenčne gene imenovani hišni geni. Idealni hišni gen naj bi se izražal nespremenjeno, ne glede na eksperimentalne pogoje, ter ne glede na različna tkiva ali tipe celic, faze razvoja ali obdelavo vzorcev. Ker ni univerzalnega gena, ki bi bil glede na zgoraj našteje kriterije najustrenejši, je potrebno, če se gen uporabi za normalizacijo, stabilnost izražanja referenčnega gena potrditi za vsak specifično zahtevan eksperiment. Najprimernejši način za normalizacijo predstavlja uporaba več hišnih genov, ki so najbolj primerni za preiskovane tarčne celice oziroma tkivo.

V našem primeru smo za normalizacijo uporabili hišna gena PPIA in RPLP, ki smo ju izbrali glede na stabilnost izražanja v preučevanih vzorcih (poglavje 4.2). Vzorce smo

normalizirali na povprečno koncentracijo mRNA obeh hišnih genov posameznega vzorca. Dobljene vrednosti predstavljajo najprimernejše rezultate za interpretacijo.

3.6 STATISTIČNE METODE

Klinični pomen izražanja kandidatnih genov IBSP, COL15A1 ter WISP-1, smo ovrednotili s pomočjo sledečih statističnih testov:

1. Za ugotavljanje razlik v izražanju genov med neosteoporotičnim, osteopeničnim in osteoporotičnim kostnim tkivom v posameznem predelu merjenja (celotni kolk, vrat stegenice in ledvena vretenca) smo uporabili Kruskal-Wallisov test.
2. Za ugotavljanje razlik v izražanju genov med samo neosteoporotičnim kostnim tkivom in osteoporotičnim kostnim tkivom v posameznem predelu merjenja (celotni kolk, vrat stegenice in ledvena vretenca) smo uporabili neparametričen test Mann-Whitney.
3. Za ugotavljanje povezanosti med izražanjem genov v posameznem predelu merjenja ter MKG, Z- in T-vrednostjo smo uporabili neparametrični Spearmanov koeficient korelacije.

Pri vseh testih smo kot statistično značilno opredelili vrednost $p \leq 0,05$. Vrednosti $0,05 \leq p \leq 0,1$ pa smo opredelili kot mejno statistično značilne.

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc., ZDA).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

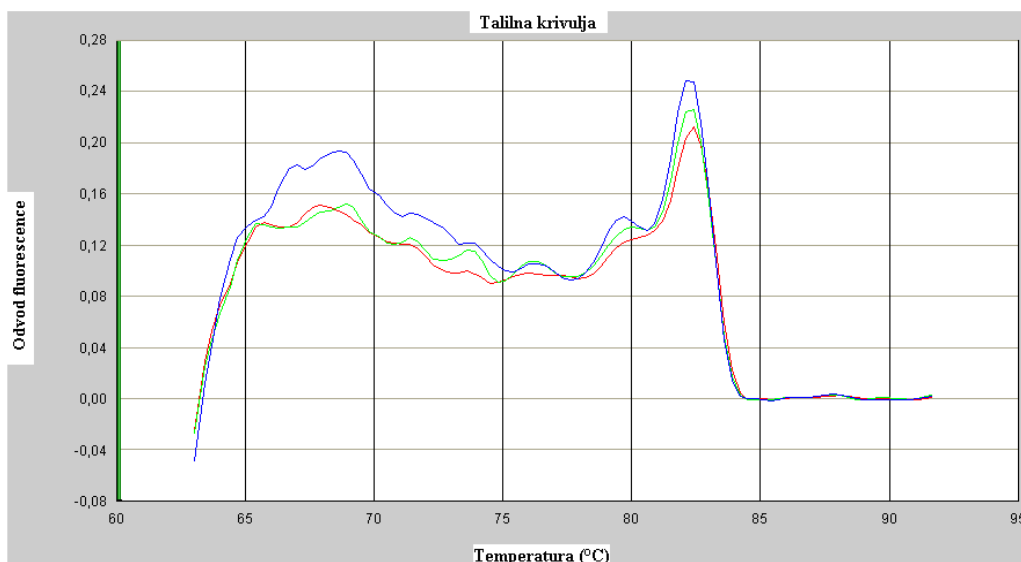
4.1 OPTIMIZACIJA REAKCIJE PCR V REALNEM ČASU

Optimizacija PCR v realnem času je ključ do boljše občutljivosti, specifičnosti, ponovljivosti in širšega linearnega dinamičnega območja. Optimalne pogoje je za pomnoževanje posameznega gena potrebno določiti eksperimentalno. Potem lahko preučevane gene kvantitativno ovrednotimo.

Sestava reakcijskih zmesi PCR je bila že predhodno optimizirana, tako da sestave nismo spreminjali. Pri delu smo upoštevali splošna navodila proizvajalca SYBR[®] GreenER[™] qPCR SuperMix for ABI Prism[®] ter TaqMan[®] Gene Expression Master Mix in navodila za aparat ABI Prism 7000 SDS.

Spreminjali smo zgolj temperaturo prileganja ter podaljševanja, saj mora biti temperatura nekaj stopinj nižja od T_m oligonukleotidnih začetnikov, da se le-ti lahko uspešno prilegajo ter, da pri tem ne pride do nastanka nespecifičnih produktov, kot so njihovi dimeri.

Hišna gena PPIA in RPLP sta bila že predhodno validirana. S strani proizvajalca je bila priporočena optimalna temperatura prileganja in podaljševanja oligonukleotidnih začetnikov, ki je znašala 60°C. Za ostale kandidatne gene IBSP, COL15A1 ter WISP-1 smo predhodno naredili več PCR reakcij, kjer smo spreminjali temperaturo prileganja in podaljševanja oligonukleotidnih začetnikov. Želeli smo doseči optimalne pogoje, kjer bi dobili pomnoževanje samo zelenega produkta, ne da bi pri tem prišlo do nastanka nespecifičnih produktov. Za kandidatna gena IBSP in COL15A1 smo kot najoptimalnejšo temperaturo določili $T = 60^\circ\text{C}$. Z načrtovanimi oligonukleotidnimi začetniki za gen WISP-1 po več reakcijah pri različnih temperaturah (57°C, 58,5°C, 60°C, 62°C) prileganja in podaljševanja nismo dobili specifičnega produkta. Iz analize talilne krivulje za gen WISP-1 (slika 7) sta razvidna dva vrhova pri $T = 82,5^\circ\text{C}$ in pri $T = 79,5^\circ\text{C}$. Ugotovili smo, da se pri PCR v realnem času ni pomnoževal samo zeleni tarčni produkt, ampak je prišlo do nastanka nespecifičnih produktov, najverjetneje dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Dimeri se ponavadi talijo pri nižji temperaturi kot zeleni produkt, zato ne pride do značilnega vrha samo tarčnega produkta, ampak so prisotni dodatni nespecifični vrhovi kot v tem primeru. Zato smo se odločili za validirane s fluorofori označene sonde, ki naj bi bile specifične za odsek, ki ga želimo pomnožiti.



Slika 7: Prikaz talilne krivulje za kandidatni gen WISP-1 pri uporabi načrtovanih oligonukleotidnih začetnikov. Med PCR je v stopnjah prileganja in podaljševanja temperatura znašala 57°C. Različne barve prikazujejo talilno krivuljo za gen WISP-1 različnih vzorcev.

4.2 IZBOR DVEH HIŠNIH GENOV

Hišni geni (HKG, *angl.* housekeeping genes) so geni, ki se konstantno izražajo v osteoblastih. Ti geni kodirajo proteine, ki v vsaki celici zagotavljajo osnovne, nujne funkcije za preživetje. Njihovo izražanje je neodvisno od bolezni celic, tkiv. HKG se domnevno izražajo enako v vseh celicah in tkivih, vendar pa obstajajo razlike, predvsem med celično rastjo in razvojem organizma. Ponavadi so to metaboli (GAPDH) ali strukturni (β -aktin, α -tubulin) geni, lahko so tudi podenote ribosomov (18S rRNA, 28S rRNA) (46, 47).

Geni, ki imajo minimalno variacijo v količini mRNA med različnimi tipi celic in biološkimi pogoji, zagotavljajo stabilno kontrolo za relativno kvantifikacijo (48). HKG se uporabljajo kot referenčni geni za normalizacijo pri PCR v realnem času, ob predpostavki, da se stabilno izražajo v tarčnih celicah. HKG normalizirajo raven mRNA in omogočajo primerjavo med vzorci. Vendar pa se lahko raven izražanja HKG med celicami zelo spreminja. Če se HKG uporabijo kot referenca pri relativni kvantifikaciji, je potrebno izbrati gen katerega raven izražanja med preučevanimi tipi celic in pod različnimi eksperimentalnimi pogoji ostaja konstantna. Zato je izbira pravih HKG pri študijah izražanja genov kritičnega pomena (46, 47).

Dva hišna gena smo izbrali, ker predstavlja uporaba več hišnih genov najprimernejši način za normalizacijo. Izbrati je potrebno gena, ki sta najbolj primerna za preiskovano tkivo, v našem primeru kostno tkivo. S PCR v realnem času smo izmerili koncentracijo mRNA kandidatnih hišnih genov v 7-ih vzorcih. Za zaznavo produktov smo uporabili fluorescentno barvilo (poglavje 3.3).

Pri izboru dveh hišnih genov, izmed skupno dvanajstih, smo uporabili dva računalniška programa in sicer NormFinder[®] (49) ter geNorm[®] (50). Za ovrednotenje podatkov pa smo uporabili Microsoft Excel 2003.

Po končani reakciji PCR v realnem času, smo dobili sledeče podatke (vrednosti Ct) za vsak posamezen hišni gen, ki jih prikazuje preglednica XVIII.

Preglednica XVIII: Vrednosti Ct za posamezen hišni gen pri izbranih 7-ih vzorcih.. Z rdečo barvo so označene vrednosti, ki predstavljajo gene z najmanjšo SD.

	UBC	B2M	GAPDH	TBP	PPIA	RPLP	YWHAZ	TUBB	GUSB	ACTB	HPRT1	18S
vzorec 2	19,96	17,35	17,46	24,19	20,29	20,6	20,03	25,29	23,24	14,55	23,91	6,26
vzorec 3	20,33	17,78	17,39	24,15	19,99	20,4	20,15	24,97	23,12	14,67	23,99	6,24
vzorec 7	19,19	17,75	18,68	24,44	20,38	20,8	20,64	23,08	24,21	15,96	25,39	6,17
vzorec 11	19,01	18,35	17,4	24,17	19,99	20,2	19,82	21,92	23,53	14,61	24,09	6,38
vzorec 14	19,57	17,56	17,84	24,59	19,86	20,5	20,06	25,11	23,19	14,94	24,09	6,23
vzorec 15	20,15	17,73	17,77	23,79	19,49	20	19,81	24,61	23,02	14,38	23,82	6,34
vzorec 17	20,34	18,46	18,73	24,96	20,36	21	21,95	24,96	23,87	15,68	25	6,93
povp. Ct	19,79	17,85	17,9	24,33	20,05	20,5	20,35	24,28	23,45	14,97	24,33	6,36
SD	0,543	0,405	0,580	0,375	0,321	0,350	0,758	1,276	0,441	0,610	0,611	0,260

Z računanjem standardne deviacije Ct-jev smo ugotavljali, kateri izmed kandidatov za hišni gen se najbolj stabilno izraža v preiskovanih vzorcih. Manjša kot je SD, večja je stabilnost izražanja (preiskovanega) gena oz. manj se koncentracija mRNA spreminja med zdravim in osteoporotičnim kostnim tkivom. Najmanjša SD Ct-jev je bila pri genih PPIA, RPLP in 18S rRNA.

Iz vrednosti Ct smo izračunali relativne količine, ki jih prikazuje preglednica XIX. Kjer je Ct najmanjši, pomeni, da je količina DNA največja, zato smo opredelili relativno količino kot 1.

Primer izračuna za gen UBC, vzorec 2 po enačbi:

$$(1+E) = 2^n; n = Ct(\min) - Ct(vz2); n = 19,01 - 19,96 = -0,95; 2^{-0,95} = 0,518.$$

Z računanjem SD relativnih vrednosti posameznega gena v 7-ih vzorcih smo ugotovili najmanjšo SD pri genih 18S rRNA, PPIA in RPLP.

Preglednica XIX: Relativne vrednosti za posamezen hišni gen pri izbranih 7-ih vzorcih. Z rdečo barvo so označene vrednosti, ki predstavljajo gene z najmanjšo SD.

	UBC	B2M	GAPDH	TBP	PPIA	RPLP	YWHAZ	TUBB	GUSB	ACTB	HPRT1	18S
vzorec 2	0,518	1	0,953	0,758	0,574	0,66	0,859	0,097	0,859	0,889	0,94	0,94
vzorec 3	0,401	0,742	1	0,779	0,707	0,79	0,79	0,121	0,933	0,818	0,889	0,95
vzorec 7	0,883	0,758	0,409	0,637	0,54	0,57	0,563	0,448	0,438	0,334	0,337	1
vzorec 11	1	0,5	0,993	0,768	0,707	0,91	0,993	1	0,702	0,853	0,829	0,86
vzorec 14	0,678	0,865	0,732	0,574	0,774	0,71	0,841	0,11	0,889	0,678	0,829	0,96
vzorec 15	0,454	0,768	0,768	1	1	1	1	0,155	1	1	1	0,89
vzorec 17	0,398	0,463	0,395	0,444	0,547	0,51	0,227	0,122	0,555	0,406	0,441	0,59
SD	0,242	0,190	0,260	0,177	0,163	0,180	0,274	0,335	0,209	0,252	0,257	0,140

4.1.1 Metode za izbor hišnih genov

4.1.1.1 Uporaba algoritma NormFinder®

NormFinder® je algoritem, ki med več kandidati identificira optimalni gen za normalizacijo. Kandidatne gene za normalizacijo razvrsti na podlagi njihovega stabilnega izražanja v danih vzorcih in eksperimentalnem modelu (49).

Preglednica XX: Prikaz izračuna stabilnostne vrednosti za posamezen gen. Z modro je označen gen z najboljšo stabilnostno vrednostjo.

Ime gena	Stabilnostna vrednost	Najboljši gen
UBC	0,389	
B2M	0,314	
GAPDH	0,230	
TBP	0,106	
PPIA	0,180	
RPLP	0,017	RPLP
YWHAZ	0,302	
TUBB	0,912	
GUSB	0,241	
ACTB	0,266	
HPRT1	0,291	
18S rRNA	0,165	

NormFinder[®] za vsak posamezen gen določi stabilnostno vrednost, ki predstavlja neposredno merilo za ocenjeno variiranje izražanja. To pa uporabniku omogoča oceno systemske napake, ki nastane ob uporabi gena za normalizacijo. Ct vrednosti, ki smo jih dobili pri PCR v realnem času, se ne sme uporabiti neposredno. Podatke je namreč potrebno spremeniti v linearno skalo. V program NormFinder[®] smo zato vnesli relativne količine iz preglednice XIX.

Programom NormFinder[®] je kot najustreznejši gen za normalizacijo določil RPLP, sledili so mu TBP, 18S rRNA in PPIA.

4.1.1.2 Uporaba algoritma geNorm[®]

geNorm[®] je zbirka algoritmov za program Microsoft Excel, namenjenih določanju najbolj stabilnega referenčnega (hišnega) gena iz podskupine kandidatnih referenčnih genov v danih vzorcih. Iz slednjih se nato izračuna faktor normalizacije izražanja genov za posamezen vzorec, ki temelji na geometrijski sredini števila referenčnih genov, ki jih določi uporabnik. Po končani analizi geNorm[®] sestavi seznam genov, ki bi bili optimalni za referenco pri normalizaciji izražanja genov. geNorm[®] izračuna stabilnost izražanja genov - merilo M, kot povprečje variacij v parih za posamezen gen z vsemi ostalimi testiranimi referenčnimi geni (50).

Preglednica XXI: Izračun vrednosti M za posamezen hišni gen s programom geNorm[®].

	UBC	B2M	GAPDH	TBP	PPIA	RPLP	YWHAZ	TUBB	GUSB	ACTB	HPRT1	18S
vzorec 2	0,518	1,00E+00	0,953	0,758	0,574	0,664	0,858	0,097	0,858	0,889	0,939	0,939
vzorec 3	0,401	0,742	1,00E+00	0,779	0,707	0,790	0,790	0,121	0,933	0,818	0,889	0,953
vzorec 7	0,882	0,758	0,409	0,637	0,539	0,574	0,563	0,447	0,438	0,334	0,337	1,00E+00
vzorec 11	1,00E+00	0,5	0,993	0,768	0,707	0,914	0,993	1,00E+00	0,702	0,853	0,829	0,864
vzorec 14	0,678	0,865	0,732	0,574	0,774	0,707	0,841	0,109	0,889	0,678	0,829	0,959
vzorec 15	0,453	0,768	0,768	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,155	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0,889
vzorec 17	0,398	0,463	0,395	0,444	0,547	0,507	0,227	0,122	0,555	0,406	0,441	0,590
M < 1,5	0,746	0,615	0,536	0,482	0,510	0,459	0,632	1,351	0,515	0,537	0,551	0,519

Program geNorm[®] je kot najbolj stabilen gen določil TBP gen z M vrednostjo 0,482, sledili so mu geni RPLP, 18S rRNA in PPIA.

4.1.1.3 Metoda razlik Ct

Pri tej metodi smo med posameznimi vzorci primerjali dobljene Ct-je. Vsak vzorec osteoporotičnih bolnic (vzorci 2, 11, 14, 15) smo primerjali z vzorcem zdravih oseb (vzorci 3, 7, 17), tako, da smo računali razliko med vrednostmi Ct-jev. To pomeni, da smo za vsak možen par izračunali razliko Ct. Na koncu smo za vsak gen izračunali SD dobljenih razlik. Glede na izračunano SD smo dobili 3 gene, ki se najbolj stabilno izražajo; kot najboljši gen z najmanjšo SD je bil določen 18S rRNA, sledila sta mu RPLP ter PPIA.

Preglednica XXII: Izračun razlik Ct med pari vzorcev. Z rdečo barvo so označene vrednosti, ki predstavljajo gene z najmanjšo SD. Z oranžno so označene mediane genov, ki smo jih uporabili pri izračunu mediane absolutnih deviacij med pari vzorcev (4.1.1.6).

vzorci	UBC	B2M	GAPDH	TBP	PPIA	RPLP	YWHAZ	TUBB	GUSB	ACTB	HPRT1	18S
2,3	-0,37	-0,43	0,05	0,04	0,3	0,25	-0,12	0,32	0,12	-0,12	-0,08	0,02
2,7	0,77	-0,4	-1,22	-0,3	-0,09	-0,21	-0,61	2,21	-0,97	-1,41	-1,48	0,09
2,17	-0,38	-1,16	-1,27	-0,8	-0,07	-0,39	-1,92	0,33	-0,63	-1,13	-1,09	-0,67
11,3	-1,32	0,57	0,01	0,02	0	-0,21	-0,33	-3,05	0,41	-0,06	0,1	0,14
11,7	-0,18	0,6	-1,28	-0,3	-0,39	-0,67	-0,82	-1,16	-0,68	-1,35	-1,3	0,21
11,17	-1,33	-0,11	-1,33	-0,8	-0,37	-0,85	-2,13	-3,04	-0,37	-1,07	-0,91	-0,55
14,3	-0,76	-0,22	0,45	0,44	-0,13	0,16	-0,09	0,14	0,07	0,27	0,1	-0,01
14,7	0,38	-0,19	-1,02	0,15	-0,52	-0,3	-0,58	2,03	-1,02	-1,02	-1,3	0,06
14,17	-0,77	-0,9	-0,89	-0,4	-0,5	-0,48	-1,89	0,15	-0,68	-0,74	-0,91	-0,7
15,3	-0,18	-0,05	0,38	-0,4	0,5	-0,34	-0,34	-0,36	-0,1	-0,29	-0,17	0,1
15,7	0,96	-0,02	-1,09	-0,7	-0,89	-0,8	-0,83	1,53	-1,19	-1,58	-1,57	0,17
15,17	-0,19	-0,73	-0,96	-1,2	-0,87	-0,98	-2,14	-0,35	-0,85	-1,3	-1,18	-0,59
SD	0,725	0,526	0,690	0,460	0,422	0,381	0,803	1,695	0,512	0,616	0,628	0,360
mediana	0,37	0,21	0,89	0,32	0,38	0,37	0,72	-0,15	0,66	0,88	0,91	-0,04

4.1.1.4 Metoda z izračunom razlik Ct glede na povprečni Ct

Pri tej metodi smo dobljene vrednosti razlik Ct delili s povprečnim Ct (vrednosti povpr. Ct so v preglednici XVIII) za posamezen hišni gen (preglednica XXIII). Na koncu smo ponovno izračunali SD za posamezen hišni gen in določili gene, pri katerih je SD najmanjša, kar pomeni, da se najbolj stabilno izražajo v naših vzorcih.

Ugotovili smo, da se najmanjša SD pojavlja pri genih: TBP, PPIA in RPLP.

Preglednica XXIII: Izračun razlik Ct glede na povprečni Ct. Z rdečo barvo so označene vrednosti, ki predstavljajo gene z najmanjšo SD.

vzorci	UBC	B2M	GAPDH	TBP	PPIA	RPLP	YWHAZ	TUBB	GUSB	ACTB	HPRT1	18S
2,3	-0,02	-0,02	0,0028	0,002	0,015	0,012	-0,006	0,013	0,005	-0,01	-0,003	0,003
2,7	0,039	-0,02	-0,0682	-0,01	-0,004	-0,01	-0,03	0,091	-0,04	-0,09	-0,061	0,014
2,17	-0,02	-0,06	-0,071	-0,03	-0,003	-0,019	-0,094	0,014	-0,03	-0,08	-0,045	-0,11
11,3	-0,07	0,032	0,0006	8E-04	0	-0,01	-0,016	-0,13	0,017	-0	0,004	0,022
11,7	-0,01	0,034	-0,0715	-0,01	-0,019	-0,033	-0,04	-0,05	-0,03	-0,09	-0,053	0,033
11,2	-0,07	-0,01	-0,0743	-0,03	-0,018	-0,042	-0,105	-0,13	-0,02	-0,07	-0,037	-0,09
14,3	-0,04	-0,01	0,0251	0,018	-0,006	0,008	-0,004	0,006	0,003	0,018	0,004	-0
14,7	0,019	-0,01	-0,057	0,006	-0,026	-0,015	-0,029	0,084	-0,04	-0,07	-0,053	0,009
14,2	-0,04	-0,05	-0,0497	-0,02	-0,025	-0,024	-0,093	0,006	-0,03	-0,05	-0,037	-0,11
15,3	-0,01	-0	0,0212	-0,01	0,025	-0,017	-0,017	-0,01	-0	-0,02	-0,007	0,016
15,7	0,049	-0	-0,0609	-0,03	-0,044	-0,04	-0,041	0,063	-0,05	-0,11	-0,065	0,027
15,2	-0,01	-0,04	-0,0536	-0,05	-0,043	-0,049	-0,105	-0,01	-0,04	-0,09	-0,049	-0,09
SD	0,037	0,029	0,0386	0,019	0,021	0,019	0,0394	0,070	0,022	0,041	0,026	0,057

4.1.1.5 Metoda razlik relativnih količin

Pri tej metodi smo, tako kot pri metodi razlik Ct, medsebojno odštevali relativne vrednosti Ct zdravih ter osteoporotičnih tkiv iz preglednice XIX. Rezultati so predstavljeni v preglednici XXIV.

Preglednica XXIV: Izračun razlik relativnih količin med pari vzorcev. Z rdečo barvo so označene vrednosti, ki predstavljajo gene z najmanjšo SD.

vzorci	UBC	B2M	GAPDH	TBP	PPIA	RPLP	YWHAZ	TUBB	GUSB	ACTB	HPRT1	18S
2,3	0,117	0,258	-0,047	-0,02	-0,13	-0,13	0,0685	-0,02	-0,08	0,071	0,051	-0,01
2,7	-0,37	0,242	0,5437	0,121	0,035	0,09	0,296	-0,35	0,418	0,554	0,603	-0,06
2,17	0,12	0,537	0,5576	0,313	0,027	0,157	0,6317	-0,02	0,302	0,483	0,498	0,349
11,3	0,599	-0,24	-0,007	-0,01	0	0,124	0,2031	0,879	-0,23	0,035	-0,06	-0,09
11,7	0,117	-0,26	0,5841	0,131	0,167	0,339	0,4306	0,552	0,264	0,518	0,493	-0,14
11,2	0,602	0,037	0,5981	0,324	0,16	0,407	0,7662	0,878	0,147	0,447	0,388	0,274
14,3	0,278	0,122	-0,268	-0,2	0,067	-0,08	0,0509	-0,01	-0,04	-0,14	-0,06	0,007
14,7	-0,2	0,107	0,3231	-0,06	0,234	0,133	0,2784	-0,34	0,451	0,344	0,493	-0,04
14,2	0,281	0,401	0,337	0,13	0,227	0,2	0,614	-0,01	0,334	0,272	0,388	0,369
15,3	0,053	0,026	-0,232	0,221	0,293	0,21	0,21	0,034	0,067	0,182	0,111	-0,06
15,7	-0,43	0,011	0,3595	0,363	0,46	0,426	0,4375	-0,29	0,562	0,666	0,663	-0,11
15,2	0,056	0,305	0,3734	0,556	0,453	0,493	0,7731	0,033	0,445	0,594	0,559	0,298
SD	0,325	0,238	0,317	0,213	0,180	0,193	0,254	0,430	0,247	0,253	0,262	0,195

Kot kriterij smo, kot poprej, uporabili SD in ugotovili, da ima najmanjšo SD gen PPIA, sledi mu gen RPLP ter gen 18S rRNA.

4.1.1.6 Metoda absolutne deviacije od mediane

Pri tej metodi smo računali absolutne deviacije od mediane posameznega gena. To smo naredili tako, da smo za vsak par od razlik Ct odšteli vrednost mediane iz preglednice XXII za posamezen vzorec.

Preglednica XXV: Izračun mediane absolutnih deviacij (MAD) med pari vzorcev. Z rdečo barvo so označene vrednosti, ki predstavljajo gene z najmanjšo MAD.

vzorci	UBC	B2M	GAPDH	TBP	PPIA	RPLP	YWHAZ	TUBB	GUSB	ACTB	HPRT1	18S
2,3	0,01	0,22	0,96	0,36	0,68	0,62	0,60	0,17	0,77	0,76	0,83	0,02
2,7	1,15	0,19	0,33	0,06	0,29	0,15	0,11	2,06	0,32	0,53	0,57	0,05
2,17	0,01	0,90	0,38	0,46	0,31	0,03	1,21	0,18	0,02	0,25	0,18	0,71
11,3	0,94	0,78	0,90	0,34	0,38	0,16	0,39	3,20	1,07	0,82	1,01	0,10
11,7	0,19	0,81	0,39	0,04	0,01	0,30	0,11	1,31	0,02	0,47	0,39	0,17
11,17	0,96	0,10	0,44	0,48	0,01	0,48	1,42	3,19	0,32	0,19	0,00	0,59
14,3	0,39	0,02	1,34	0,76	0,25	0,53	0,63	0,01	0,73	1,15	1,01	0,05
14,7	0,75	0,02	0,05	0,46	0,14	0,06	0,13	1,88	0,36	0,14	0,39	0,02
14,17	0,40	0,70	0,00	0,06	0,12	0,12	1,18	0,00	0,02	0,14	0,00	0,74
15,3	0,19	0,16	1,27	0,04	0,12	0,03	0,38	0,51	0,56	0,59	0,74	0,06
15,7	1,34	0,19	0,02	0,34	0,51	0,44	0,12	1,38	0,54	0,70	0,66	0,13
15,17	0,40	0,70	0,00	0,06	0,12	0,12	1,18	0,00	0,02	0,14	0,00	0,74
MAD	0,40	0,21	0,39	0,34	0,20	0,16	0,49	0,91	0,34	0,50	0,48	0,12

Po tej metodi smo najmanjšo mediano absolutne deviacije dobili za gene 18S rRNA, RPLP in PPIA.

S pomočjo metod smo izbrali dva hišna gena, ki sta se najbolj stabilno izražala v preiskovanih vzorcih. Glede na vse metode, ki smo jih uporabili za identifikacijo najboljšega hišnega gena, so se najbolj stabilno izražali geni TBP, PPIA, RPLP in 18S rRNA, najmanj stabilno pa geni UBC, YWHAZ, ACTB in TUBB. Z upoštevanjem izračunanih vrednosti smo izbrali gena PPIA in RPLP, ki sta se najbolj stabilno izražala v naših preiskovanih vzorcih in bi ju lahko uporabili kot referenčna gena pri normalizaciji kandidatnih genov.

Gen 18S rRNA je bil tudi eden izmed možnih genov za normalizacijo in se je glede na rezultate dokaj stabilno izražal v naših vzorcih, vendar ga nismo izbrali za normalizacijo. Ribosomalne RNA imajo namreč določene pomanjkljivosti, ki omejujejo njihovo uporabo

kot referenčno RNA - odsotne so v čistih vzorcih mRNA, nimajo poli(A) repa in se ne prepisejo pri metodi oligo(dT) reverzne transkripcije, prisotne so v veliko večji meri kot tarčna mRNA ter se sintetizirajo z drugačno RNA polimerazo kot mRNA.

4.3 KVANTITATIVNA ANALIZA IZRAŽANJA PREUČEVANIH GENOV

4.3.1 Standardne krivulje

Za kvantitativno analizo je potrebna priprava standardnih (umeritvenih) krivulj. Proces pomnoževanja se opazuje s fluorescenčnimi DNA vezavnimi barvili ali s sekvenčno specifičnimi sondami.

Standardno krivuljo se določi z odvisnostjo Ct vrednosti od logaritemskih vrednosti koncentracij. To območje koncentracij naj bi pokrivalo pričakovane neznane vrednosti območja koncentracij preiskovanih vzorcev. Standardne krivulje se uporabljajo za ugotavljanje merilnega območja, za izračun učinkovitosti reakcije (*E*, *angl.* Efficiency) iz naklona krivulje (*angl.* slope) in za pomoč pri kvantifikaciji.

Za vsak posamezen gen smo izračunali standardno krivuljo. Uporabili smo predhodno pripravljen humani standard (poglavje 3.2). Iz dobljenih enačb standardnih krivulj za posamezne gene smo izračunali relativne koncentracije mRNA iz dobljenih Ct preiskovanih vzorcev. Za vsako kombinacijo gen/vzorec smo opravili po dve meritvi. Standardna krivulja je ustrezna, če je *E* med 90-100%. *E* se izračuna po enačbi:

$$E = 10^{(-1/\text{naklon})} - 1$$

To ustreza naklonu krivulje med -3,1 in -3,6. Če je $R^2 > 0,98$, kaže na stabilno in zanesljivo analizo. Številne spremenljivke lahko vplivajo na učinkovitost PCR reakcije. Dejavniki vpliva so lahko dolžina fragmenta, prisotnost inhibitorjev (fenol, etanol, hemoglobin, heparin), sekundarnih struktur ter zasnova oligonukleotidnih začetnikov in sond. Standardne krivulje predstavljajo dobro oceno učinkovitosti PCR reakcije.

4.3.1.1 Standardni krivulji za hišna gena: **PPIA** in **RPLP**

Iz dobljenih Ct-jev (preglednica XXVI) smo v računalniškem programu Microsoft Excel izračunali standardno krivuljo za hišna gena PPIA in RPLP.

Preglednica XXVI: Ct-ji za hišna gena PPIA in RPLP pri različnih koncentracijah standarda.

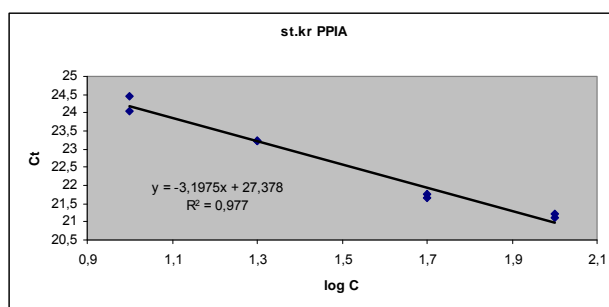
C (ng/ μ L)	log C	Ct (PPIA)	Ct (RPLP)
100	2	21,2	20,03
100	2	21,1	19,91
50	1,69897	21,75	20,61
50	1,69897	21,65	20,75
20	1,30103	23,23	22,41
20	1,30103	23,23	22,65
10	1	24,45	23,02
10	1	24,04	23,02

Enačba standardne krivulje, ki smo jo dobili za hišni gen PPIA (slika 8):

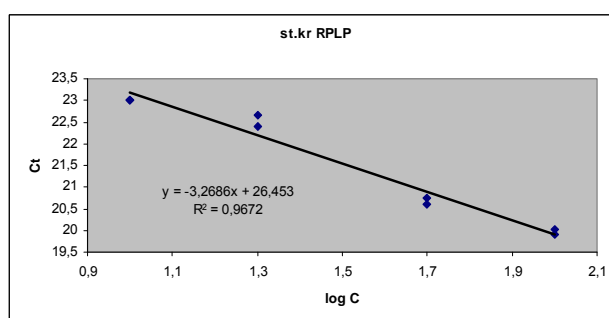
$$y = -3,1975x + 27,378 \text{ ter } R^2 = 0,977,$$

za hišni gen RPLP (slika 9):

$$y = -3,2686x + 26,453 \text{ ter } R^2 = 0,9672,$$



Slika 8: Graf standardne krivulje za hišni gen PPIA.



Slika 9: Graf standardne krivulje za hišni gen RPLP.

4.3.1.2 Standardne krivulje za kandidatne gene: IBSP, COL15A1 in WISP-1

Tudi za gene IBSP, COL15A1 in WISP-1 smo v računalniškem programu Microsoft Excel iz dobljenih Ct-jev (Preglednica XXVII) izračunali enačbe standardnih krivulj za posamezen preiskovani gen.

Enačba standardne krivulje za kandidatni gen IBSP (slika 11):

$$y = -3,0035x + 30,345 \text{ ter } R^2 = 0,9918,$$

za kandidatni gen COL15A1 (slika 12):

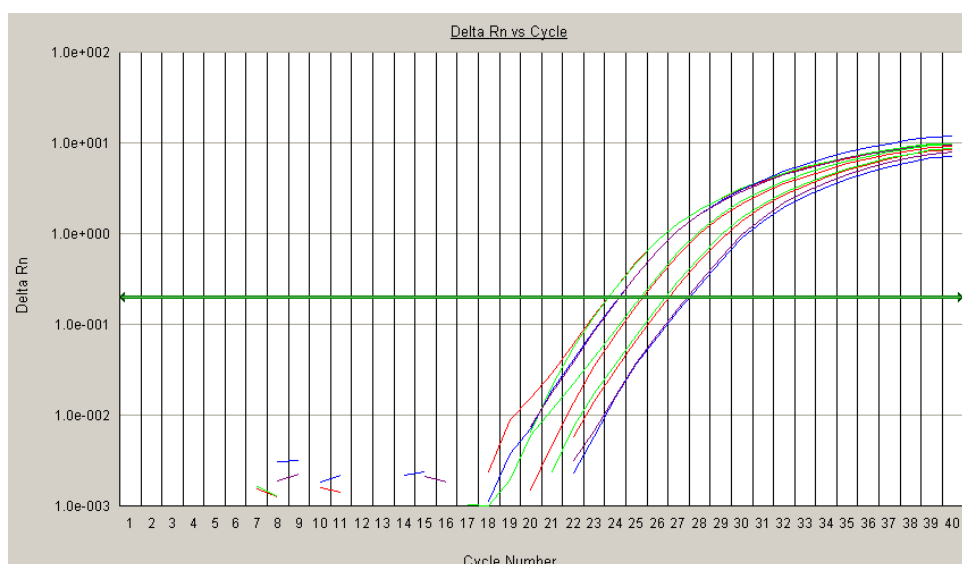
$$y = -3,5847x + 31,525 \text{ ter } R^2 = 0,9986,$$

za kandidatni gen WISP-1 (slika 13):

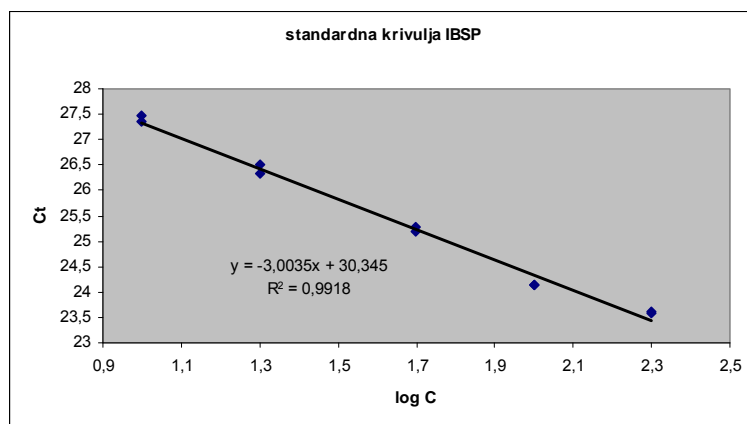
$$y = -3,4434x + 40,703 \text{ ter } R^2 = 0,9608.$$

Preglednica XXVII: Ct-ji za gene IBSP, COL15A1 in WISP-1 pri različnih koncentracijah standarda.

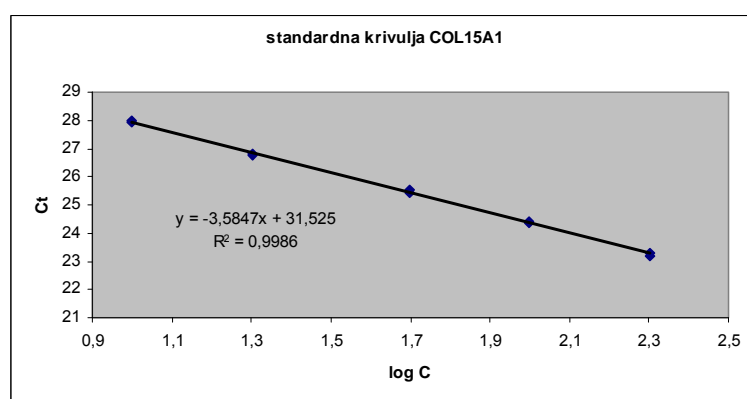
C (ng/ μ L)	log C	Ct (IBSP)	Ct (COL15A1)	Ct (WISP-1)
200	2,30103	23,59	23,31	33,23
200	2,30103	23,6	23,19	32,59
100	2	24,14	24,37	33,36
100	2	24,15	24,42	33,87
50	1,69897	25,28	25,51	35,27
50	1,69897	25,18	25,41	34,41
20	1,30103	26,5	26,84	36,63
20	1,30103	26,33	26,74	36,08
10	1	27,47	27,94	37,36
10	1	27,35	28,01	37,06



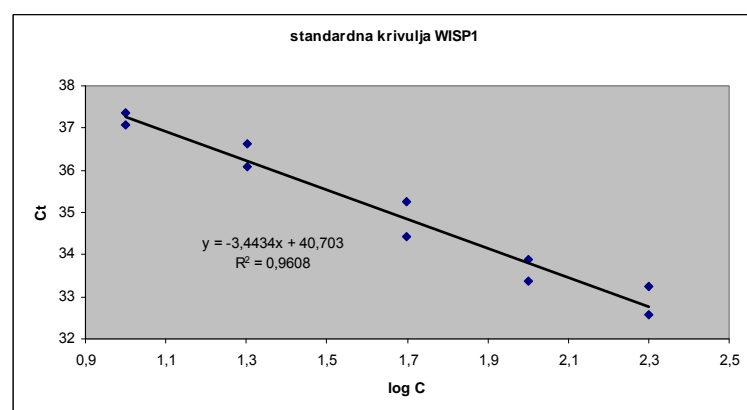
Slika 10: Prikaz jakosti fluorescenčnega signala v odvisnosti od koncentracij za gen IBSP.



Slika 11: Graf standardne krivulje za gen kandidatni IBSP.



Slika 12: Graf standardne krivulje za kandidatni gen COL15A1.



Slika 13: Graf standardne krivulje za kandidatni gen WISP-1.

Dobljene standardne krivulje imajo E med -3,0 in -3,6, ter $R^2 \geq 0,96$, kar pomeni, da sta E in R^2 ustrezna in da je PCR v realnem času primerna metoda za kvantifikacijo izbranih hišnih ter kandidatnih genov.

4.3.2 Analiza reakcij PCR v realnem času

Za normalizacijo koncentracij mRNA kandidatnih genov, je potrebno s hišnimi geni opraviti PCR reakcije za vse preiskovane vzorce. Za vsak vzorec smo po končani reakciji PCR v realnem času dobili po dve vrednosti Ct-jev za vsak gen, iz katerih smo nato iz dobljenih standardnih krivulj za posamezen kandidatni in hišni gen izračunali koncentracije mRNA produkta. Dobljeni Ct-ji za posamezen gen, ter iz njih preračunane koncentracije mRNA, so navedeni v prilogi 2. V preglednici XXXIII se nahajajo vrednosti Ct ter povprečne koncentracije mRNA za gen PPIA, v preglednici XXXIV pa za gen RPLP. V prilogi 2 tako preglednica XXXV prikazuje dobljene Ct vrednosti ter povprečne koncentracije mRNA za gen IBSP, preglednica XXXVI za gen COL15A1 ter preglednica XXXVII za gen WISP-1.

Primer izračuna povprečne koncentracije mRNA hišnega gena PPIA za **vzorec 32**:

standardna krivulja za gen PPIA: $y = -3,1975x + 27,378$; $R^2=0,977$

$Ct_1 = 17,26$ $17,26 = -3,1975x_1 + 27,378$; $x_1 = 3,1643$; $\log x_1 = C_1$; $C_1 = 1459,98$

$Ct_2 = 17,20$ $17,20 = -3,1975x_2 + 27,378$; $x_2 = 3,1831$; $\log x_2 = C_2$; $C_2 = 1524,45$

Povp. C = $(C_1 + C_2)/2 = 1492,21$

Primer izračuna povprečne koncentracije mRNA kandidatnega gena IBSP za **vzorec 32**:

standardna krivulja za gen IBSP: $y = -3,0035x + 30,345$; $R^2 = 0,9918$

$Ct_1 = 22,54$ $22,54 = -3,0035x_1 + 30,345$; $x_1 = 2,598$; $\log x_1 = C_1$; $C_1 = 396,858$

$Ct_2 = 23,09$ $23,09 = -3,0035x_2 + 30,345$; $x_2 = 2,415$; $\log x_2 = C_2$; $C_2 = 260,325$

Povp. C = $(C_1 + C_2)/2 = 328,591$

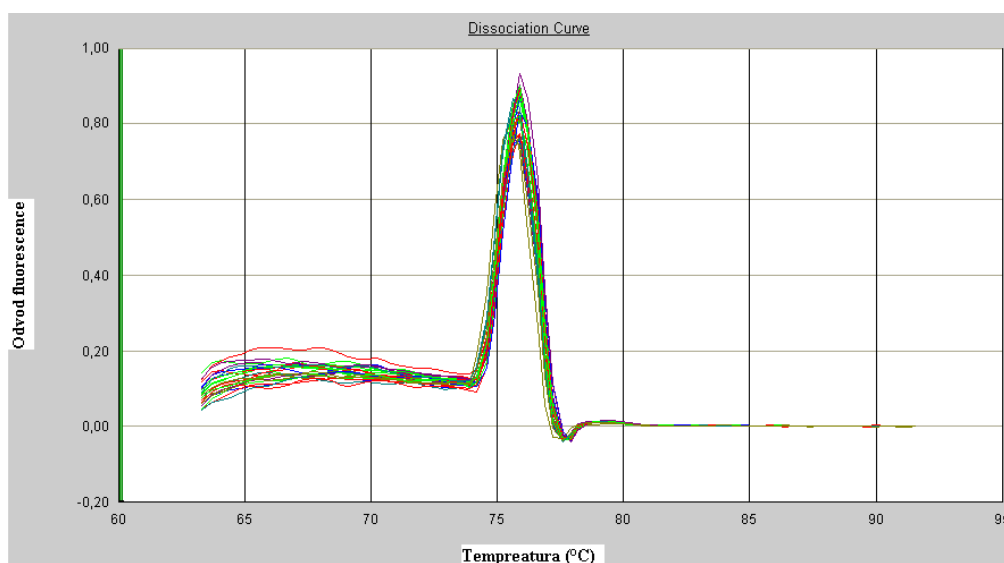
Na enak način smo izračunali koncentracije mRNA tudi za ostale preiskovane vzorce.

Vzorci pod pragom fluorescence niso bili kvantificirani. Predvidevamo, da je bilo v vzorcu premalo začetne cDNA oziroma, da je bila prisotna cDNA že preveč uničena ali pa se geni pri teh preiskovancih izražajo v premajhni meri (vzorec 64 za gen COL15A1 in 44 za gen WISP-1).

4.3.3 Analiza talilne krivulje

Z analizo talilne krivulje smo preverjali, ali je prišlo do pomnoževanja želenega tarčnega produkta, saj imajo različno dolgi produkti PCR različne temperature taljenja. Preverili smo ali dobimo samo en specifičen produkt ali pa so morda prisotni tudi nespecifični produkti.

Slika 14 prikazuje primer talilne krivulje za gen IBSP. Iz slike je lepo razviden samo en značilen vrh pri $T = 76^{\circ}\text{C}$ in zato lahko sklepamo, da so načrtovani oligonukleotidni začetniki za kandidatni gen IBSP zelo specifični, saj je prišlo do nastanka samo želenega produkta. To smo ugotovili tudi za gen COL15A1 z značilnim vrhom pri $T = 80^{\circ}\text{C}$.



Slika 14: Prikaz talilnih krivulj za kandidatni gen IBSP. Med PCR je v stopnjah prileganja in podaljševanja temperatura znašala 60°C . Različne barve prikazujejo talilno krivuljo gena IBSP različnih vzorcev.

Ker je pri genu WISP-1 z načrtovanimi oligonukleotidnimi začetniki prihajalo do tvorjenja nespecifičnih produktov (slika 7), ne glede na spreminjanje temperature prileganja in podaljševanja, smo se odločili, da bomo za gen WISP-1 uporabili s fluorofori označene sekvenčno specifične sonde. Tako za gen WISP-1 nismo ugotavljali prisotnost nespecifičnih produktov, saj naj bi bile sonde specifične samo za gen, ki ga pomnožujemo, omenjene sonde pa ne omogočajo analize talilne krivulje.

Analizo talilnih krivulj smo naredili tudi za hišna gena PPIA in RPLP. Iz analize talilnih krivulj smo ugotovili, da pri genih PPIA in RPLP prav tako ni prišlo do nastanka nespecifičnih produktov ali dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Za gen PPIA smo

ugotovili značilen vrh pri $T = 76,5^{\circ}\text{C}$, za gen RPLP pa značilen vrh pri $T = 81,5^{\circ}\text{C}$. Tako pri genu PPIA kot pri genu RPLP, ni bilo drugih opaznih vrhov, ki bi predstavljali nastanek nespecifičnih produktov (dimerov oligonukleotidnih začetnikov) med PCR.

Tako smo potrdili, da so naši oligonukleotidni začetniki specifični, ter da so pogoji reakcije primerni, saj je prišlo samo do nastanka želenega produkta.

4.4 NORMALIZACIJA IZMERJENIH VREDNOSTI PREUČEVANIH GENOV

Kritični korak pri PCR v realnem času je normalizacija dobljenih rezultatov, da se izravna razlike v čistosti in koncentraciji vzorcev. Največkrat se za normalizacijo uporabi endogene referenčne gene imenovani hišni geni. Normalizirane vrednosti lahko potem med vzorci neposredno primerjamo.

V našem primeru smo za normalizacijo uporabili gena PPIA in RPLP, ki smo ju izbrali glede na stabilnost izražanja v preučevanih vzorcih (4.2), vsak vzorec pa smo normalizirali tudi na povprečje koncentracij mRNA obeh hišnih genov PPIA in RPLP. Ko smo dobili vse vrednosti za hišna gena RPLP in PPIA, ter za kandidatne gene IBSP, COL15A1 in WISP-1, smo naredili normalizacijo. Slednjo smo izvedli tako, da smo vrednosti povprečnih koncentracij mRNA, ki smo jih dobili za posamezen vzorec, med seboj delili.

Npr., za **vzorec 32** smo delili vrednost (Povp. C), ki smo jo dobili od gena IBSP, z vrednostjo, ki smo jo dobili za hišni gen PPIA:

$$328,591/1492,21 = \mathbf{0,2202}$$

Na enak način smo izračunali vrednosti tudi za ostale preiskovane vzorce.

Dobljene normalizirane vrednosti so prikazane v prilogi 3 v preglednici XXXVIII za kandidatni gen IBSP, v preglednici XXXIX za gen COL15A1 ter preglednici XL za gen WISP-1.

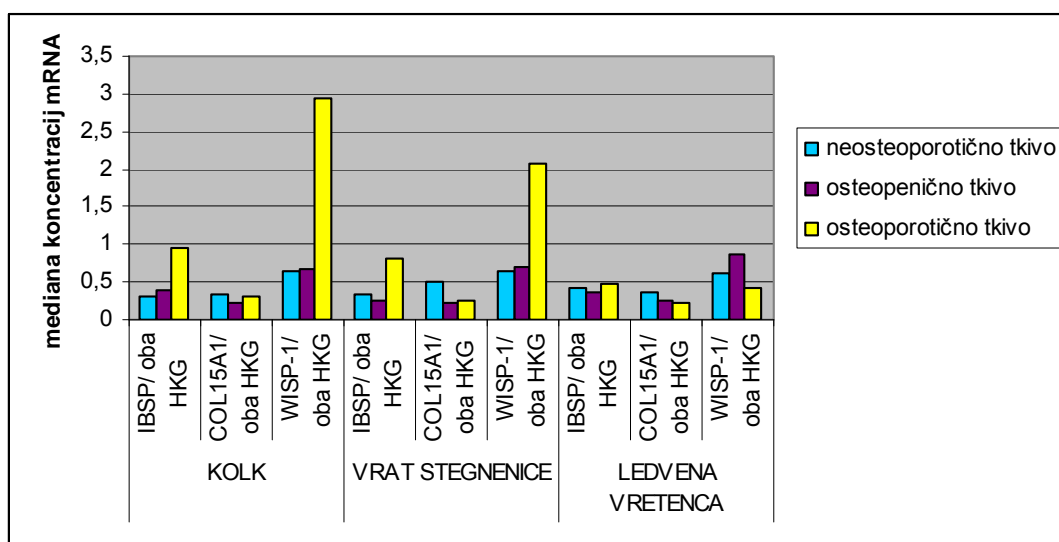
4.5 KLINIČNI POMEN IZRAŽANJA GENOV IBSP, COL15A1 IN WISP-1

4.5.1 Analiza izražanja genov v kostnem tkivu

Klinični pomen izražanja genov IBSP, COL15A1 in WISP-1 smo ugotavljali, ker smo hoteli ugotoviti ali se geni različno izražajo v neosteoporotičnem, osteopeničnem in osteoporotičnem kostnem tkivu.

MKG je bila določena v predelu celotnega kolka, v predelu ledvenih vretenc in v predelu vratu stegenice. Na podlagi meritev smo bolnike razdelili v tri skupine, za vsak predel merjenja. Prvo skupino so sestavljali bolniki, ki so imeli na mestu merjenja neosteoporotično kostno tkivo (T-vrednost nad -1,0), v drugi skupini so bili bolniki z osteopeničnim kostnim tkivom na mestu merjenja (T-vrednost med -1,0 in -2,5), v tretji skupini pa bolniki z osteoporotičnim kostnim tkivom na mestu merjenja (T-vrednost pod -2,5). Mestno specifično klasifikacijo smo naredili, ker najnovejše raziskave kažejo različno patogenezo osteoporoze v predelu kolka, vratu stegenice in ledvenih vretencih.

Pri ugotavljanju razlik v izražanju genov IBSP, COL15A1 in WISP-1 med skupinami na posameznem predelu merjenja smo dobili rezultate, ki so predstavljeni v preglednici XXVIII.



Slika 15: Grafični prikaz median koncentracij mRNA na posameznem predelu merjenja za gene IBSP, COL15A1 in WISP-1. Z modro je označeno neosteoporotično, z vijolično osteopenično in z rumeno osteoporotično kostno tkivo na mestu merjenja.

Preglednica XXVIII: Izračun median koncentracij mRNA po skupinah za gene IBSP, COL15A1 in WISP-1 na posameznem predelu merjenja in rezultati testa Kruskal-Wallis.

	KOLK			VRAT STEGNETICE			LEDVENA VRETENCA		
	IBSP/ PPIA	IBSP/ RPLP	IBSP/ oba HKG	IBSP/ PPIA	IBSP/ RPLP	IBSP/ oba HKG	IBSP/ PPIA	IBSP/ RPLP	IBSP/ oba HKG
neosteoporotično tkivo	0,234	0,398	0,297	0,307	0,588	0,347	0,357	0,483	0,406
osteopenično tkivo	0,368	0,442	0,398	0,234	0,307	0,247	0,286	0,424	0,367
osteoporotično tkivo	0,695	1,433	0,947	0,650	1,128	0,825	0,363	0,653	0,469
p (K-W)	0,113	0,094	0,098	0,173	0,122	0,131	0,872	0,976	0,921
	COL15A1/ PPIA	COL15A1/ RPLP	COL15A1/ oba HKG	COL15A1/ PPIA	COL15A1/ RPLP	COL15A1/ oba HKG	COL15A1/ PPIA	COL15A1/ RPLP	COL15A1/ oba HKG
neosteoporotično tkivo	0,292	0,411	0,331	0,441	0,575	0,499	0,340	0,382	0,362
osteopenično tkivo	0,178	0,276	0,217	0,180	0,266	0,215	0,194	0,310	0,253
osteoporotično tkivo	0,261	0,377	0,308	0,219	0,295	0,246	0,217	0,262	0,227
p (K-W)	0,885	0,798	0,832	0,753	0,625	0,620	0,721	0,628	0,738
	WISP-1/ PPIA	WISP-1/ RPLP	WISP-1/ oba HKG	WISP-1/ PPIA	WISP-1/ RPLP	WISP-1/ oba HKG	WISP-1/ PPIA	WISP-1/ RPLP	WISP-1/ oba HKG
neosteoporotično tkivo	0,614	0,673	0,642	0,562	0,673	0,642	0,583	0,684	0,623
osteopenično tkivo	0,553	0,828	0,669	0,553	0,942	0,697	0,698	1,035	0,862
osteoporotično tkivo	2,436	3,697	2,949	1,596	2,933	2,065	0,428	0,415	0,421
p (K-W)	0,329	0,372	0,330	0,565	0,565	0,561	0,864	0,751	0,799

Vrednost $p \leq 0,05$ pomeni statistično značilno razliko, vrednost $0,05 \leq p \leq 0,1$ pa mejno statistično značilno razliko.

Med kostnim tkivom bolnikov brez osteoporoze, z osteopenijo in z osteoporozo na posameznem predelu merjenja smo ugotovili mejno statistično značilno razliko v izražanju gena IBSP v predelu celotnega kolka ($p = 0,098$), pri koncentracijah, ki so bile normalizirane na povprečje koncentracij mRNA obeh hišnih genov (PPIA in RPLP). Prav tako je bilo opaziti nižjo vrednost parametra p ($p = 0,131$) v predelu vratu stegenice. V predelu ledvenih vretenc nismo ugotovili statistično značilne razlike v izražanju gena IBSP med neosteoporotičnim, osteopeničnim in osteoporotičnim kostnim tkivom. Rezultati nakazujejo različno patogenezo osteoporoze v predelu ledvenih vretenc kot v predelu kolka in vratu stegenice. Zavrnilo smo hipotezo, ki smo jo postavili in sicer, da je izražanje gena IBSP, ki kodira zapis za kostni sialoprotein, znižano v osteoporotičnem kostnem tkivu. Po izračunu median normaliziranih koncentracij mRNA, smo ugotovili povišane koncentracije gena IBSP v osteoporotičnem kostnem tkivu v predelu kolka in vratu stegenice. To je v nasprotju s postavljeno hipotezo, saj naj bi se IBSP, glede na rezultate, dobljene s pomočjo genskih mikromrež, manj izražal v osteoporotičnem kostnem tkivu. Razlika v rezultatih je mogoče v tem, ker smo z genskimi mikromrežami analizirali samo osteoblaste, v našem primeru pa analiziramo celotno kostno tkivo.

Ugotovili smo, da ni nobene značilne razlike v izražanju genov COL15A1 in WISP-1 med neosteoporotičnim, osteopeničnim in osteoporotičnim kostnim tkivom v predelu kolka, vratu stegenice in ledvenih vretenc. Z računanjem mediane koncentracij mRNA posameznih skupin, smo ugotovili rahlo povečano izražanje gena COL15A1 pri bolnikih z neosteoporotičnim kostnim tkivom, vendar razlika ni bila statistično značilna. Rezultati kažejo na to, da gen COL15A1 ne igra pomembne vloge v patogenezi osteoporoze. Prav tako smo ugotovili povišano izražanje gena WISP-1 v osteoporotičnem kostnem tkivu vendar razlika ni bila statistično značilna. Hipoteze, da je izražanje gena COL15A1, ki kodira zapis za alfa 1 verigo v kolagenu XV, povišano v osteoporotičnem kostnem tkivu ne moremo potrditi. Tudi hipoteze, da je izražanje gena WISP-1, ki kodira za protein 1 WNT1-sprožljive signalne poti, ne moremo potrditi. Hipoteze, ki smo jih postavili, so temeljile na podatkih, ki smo jih pridobili s pomočjo genskih mikromrež.

Geni, ki smo jih izbrali za analizo s PCR v realnem času, so se glede na analizo z mikromrežami najbolj različno izražali. Prav tako smo upoštevali morebitno vpletenost genov, ki kodirajo zapis za proteine, v kostni metabolizem. Na podlagi vseh podatkov so bili izbrani trije geni IBSP, COL15A1 in WISP-1. Razlika v izražanju gena COL15A1 med osteoporoznim in kontrolnim vzorcem glede na analize mikromrež je bila 8,2-kratna. Gen IBSP se je v osteoporoznem vzorcu 8,4-krat manj izražal, gen COL15A1 pa 8,2-krat bolj. Oba sodita v skupino 100 najbolj različno izraženih genov. Gen WISP-1 se je v osteoporoznem vzorcu tudi manj izražal, vendar le 1,6-krat manj. Nanj smo postali pozorni zaradi njegove vloge pri WNT signaliziranju, saj naj bi WNT signalna pot sodelovala pri razvoju in ohranjanju kostnine. Prav zaradi tega smo se odločili za potrditev teh rezultatov s PCR v realnem času, kar je v skladu s priporočili na tem področju (51).

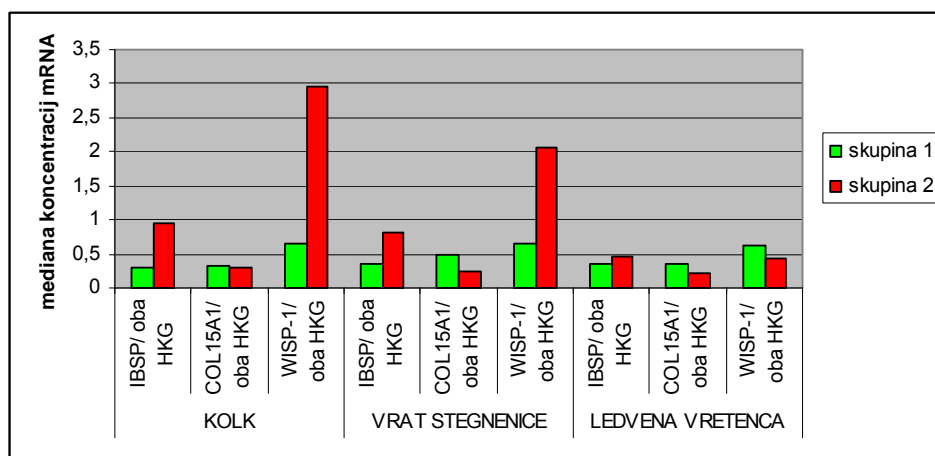
4.5.2 Analiza izražanja genov v neosteoporotičnem in osteoporotičnem kostnem tkivu

Z Mann-Whitney testom smo ugotavljali razliko v izražanju genov IBSP, COL15A1 in WISP-1 s primerjavo skrajnih fenotipov, saj tako lažje zaznamo razliko v izražanju genov na posameznem predelu merjenja. Primerjali smo samo bolnike z neosteoporotičnim in osteoporotičnim kostnim tkivom v predelu kolka, vratu stegenice in ledvenih vretenc. Rezultati so predstavljeni v preglednici XXIX.

Preglednica XXIX: Izračun median koncentracij mRNA genov IBSP, COL15A1 in WISP-1 med skupinama na predelu kolka, vratu stegenice in ledvenih vretenc, ter rezultati testa Mann-Whitney. Skupina 1 = neosteoporotično kostno tkivo, skupina 2 = osteoporotično kostno tkivo.

	KOLK								
	IBSP/ PPIA	IBSP/ RPLP	IBSP/ obaHKG	COL15A1/ PPIA	COL15A1/ RPLP	COL15A1/ oba HKG	WISP-1/ PPIA	WISP-1/ RPLP	WISP-1/ oba HKG
skupina 1	0,234	0,398	0,297	0,293	0,411	0,331	0,614	0,673	0,642
skupina 2	0,695	1,433	0,947	0,261	0,377	0,308	2,436	3,697	2,949
p (M-W)	0,041	0,041	0,036	0,851	0,706	0,802	0,143	0,169	0,134
	VRAT STEGNENICE								
	IBSP/ PPIA	IBSP/ RPLP	IBSP/ obaHKG	COL15A1/ PPIA	COL15A1/ RPLP	COL15A1/ oba HKG	WISP-1/ PPIA	WISP-1/ RPLP	WISP-1/ oba HKG
skupina 1	0,307	0,588	0,347	0,441	0,575	0,499	0,562	0,673	0,642
skupina 2	0,650	1,128	0,825	0,219	0,295	0,246	1,596	2,933	2,065
p (M-W)	0,133	0,101	0,096	0,524	0,735	0,579	0,273	0,299	0,249
	LEDVENA VRETENCA								
	IBSP/ PPIA	IBSP/ RPLP	IBSP/ obaHKG	COL15A1/ PPIA	COL15A1/ RPLP	COL15A1/ oba HKG	WISP-1/ PPIA	WISP-1/ RPLP	WISP-1/ oba HKG
skupina 1	0,357	0,483	0,358	0,340	0,382	0,362	0,583	0,684	0,623
skupina 2	0,364	0,653	0,469	0,217	0,262	0,227	0,427	0,415	0,427
p (M-W)	0,802	0,900	0,802	0,409	0,342	0,468	0,979	0,751	0,916

Vrednost $p \leq 0,05$ pomeni statistično značilno razliko, vrednost $0,05 \leq p \leq 0,1$ pa mejno statistično značilno razliko.



Slika 16: Grafični prikaz median koncentracij skupine 1 in 2 v predelu kolka, vratu stegenice in ledvenih vretencih za gene IBSP, COL15A1 in WISP-1. Z zeleno je označena skupina 1 (neosteoporotično kostno tkivo), z rdečo pa skupina 2 (osteoporotično kostno tkivo).

Ugotovili smo statistično značilno razliko v izražanju gena IBSP pri normalizaciji na povprečne koncentracij mRNA obeh hišnih genov (PPIA in RPLP) v predelu celotnega kolka ($p = 0,036$), kar kaže na različno izražanje gena v neosteoporotičnem in

osteoporotičnem kostnem tkivu. Mejno statistično razliko v izražanju gena IBSP smo ugotovili v predelu vratu stegenice ($p = 0,096$). V predelu ledvenih vretenc ni bilo razlike v izražanju gena IBSP, kar kaže na različno patogenezo osteoporoze v predelu ledvenih vretenc v primerjavi s celotnim kolkom in vratom stegenice. Po izračunu median povprečnih koncentracij mRNA gena IBSP skupin, smo ugotovili povišano izražanje gena v osteoporotičnem kostnem tkivu v predelu celotnega kolka in vratu stegenice. Višja koncentracija mRNA nakazuje vpletenost gena IBSP v procese, ki sodelujejo pri osteoporozi.

S primerjavo izražanja genov COL15A1 in WISP-1 pri bolnikih brez in z osteoporozo nismo ugotovili nobene statistične razlike v izražanju genov v predelu celotnega kolka, vratu stegenice in ledvenih vretenc. Opazili smo samo nižjo vrednost parametra p za gen WISP-1 v predelu kolka ($p = 0,134$) in v predelu vratu stegenice ($p = 0,249$), vendar ne v predelu ledvenih vretenc ($p = 0,916$). Po izračunu median koncentracij mRNA skupin smo opazili povečano izražanje gena WISP-1 v osteoporotičnem kostnem tkivu, vendar razlika ni bila statistično značilna.

4.5.3 Povezanost izražanja genov z MKG, Z- in T-vrednostjo

Za ugotavljanje povezanosti med izražanjem genov IBSP, COL15A1 in WISP-1 ter MKG, Z-vrednostjo in T-vrednostjo, na predelu celotnega kolka, vratu stegenice in ledvenih vretenc, smo uporabili analizo korelacije po Spearmanu. Ugotavljali smo soodvisnost parametrov in ne razlik, kot smo to naredili pri analizi z Mann-Whitney testom.

Korelacija med IBSP genom in posameznimi skupinami (MKG, Z- in T-vrednost) je bila šibka, vendar v predelu vratu stegenice statistično značilna ($0,020 \leq p \leq 0,028$), v predelu celotnega kolka pa mejno statistično značilna v povezavi z MKG ($p = 0,061$) in statistično značilna v povezavi z Z- in T-vrednostjo ($0,026 \leq p \leq 0,048$). V predelu ledvenih vretenc nismo odkrili nobene povezave med izražanjem gena IBSP ter MKG, Z- in T-vrednostjo ($0,463 \leq p \leq 0,610$).

Korelacija med COL15A1 genom in vrednostmi MKG, Z- in T-vrednostjo je bila šibka in statistično neznačilna ($p \geq 0,602$).

Povezava med normaliziranimi vrednostmi gena WISP-1 in T-vrednostjo v predelu vratu stegenice je bila šibka ($s \geq -0,246$) vendar statistično značilna ($p = 0,047$), pri

normalizaciji na povprečje koncentracij mRNA obeh hišnih genov (PPIA in RPLP). Drugje ni bilo mogoče najti povezave.

Preglednica XXX: Izračun neparametričnega Spearmanovega koeficienta ter ugotavljanje povezave izražanja genov IBSP, COL15A1 in WISP-1 z MKG, Z- in T-vrednostjo v predelu kolka, vratu stegenice in ledvenih vretencih.

		MKG kolk	Z kolk	T kolk	MKG vs	Z vs	T vs	MKG lv	Z lv	T lv
IBSP/ PPIA	s	-0,225	-0,243	-0,267	-0,281	-0,266	-0,277	-0,057	-0,045	-0,076
	p	0,056	0,050	0,028	0,020	0,031	0,023	0,640	0,718	0,531
IBSP/ RPLP	s	-0,232	-0,239	-0,269	-0,284	-0,272	-0,269	-0,085	-0,072	-0,096
	p	0,057	0,054	0,027	0,019	0,027	0,027	0,488	0,564	0,428
IBSP/ oba HKG	s	-0,228	-0,245	-0,270	-0,282	-0,270	-0,274	-0,076	-0,063	-0,089
	p	0,061	0,048	0,026	0,020	0,028	0,025	0,549	0,610	0,463
COL15A1/ PPIA	s	0,008	0,029	-0,002	-0,015	0,018	-0,067	0,031	0,067	0,028
	p	0,950	0,816	0,989	0,906	0,884	0,591	0,800	0,590	0,820
COL15A1/ RPLP	s	0,005	0,045	-0,002	-0,019	0,015	-0,070	0,023	0,053	0,027
	p	0,968	0,720	0,984	0,876	0,904	0,578	0,849	0,671	0,823
COL15A1/ oba HKG	s	0,008	0,036	-0,002	-0,014	0,018	-0,065	0,022	0,056	0,021
	p	0,951	0,776	0,988	0,910	0,885	0,602	0,859	0,652	0,865
WISP-1/ PPIA	s	-0,147	-0,094	-0,144	-0,191	-0,135	-0,249	-0,097	-0,010	-0,104
	p	0,234	0,456	0,246	0,123	0,283	0,044	0,431	0,935	0,339
WISP-1/ RPLP	s	-0,143	-0,079	-0,136	-0,184	-0,120	-0,235	-0,085	0,006	-0,089
	p	0,247	0,531	0,271	0,135	0,341	0,057	0,490	0,963	0,465
WISP-1/ oba HKG	s	-0,148	-0,092	-0,145	-0,189	-0,129	-0,246	-0,092	-0,006	-0,100
	p	0,231	0,468	0,241	0,125	0,306	0,047	0,454	0,963	0,413

Vrednost s je neparametrični Spearmanov koeficient korelacije.

Vrednost p \leq 0,05 pomeni statistično značilno razliko, vrednost $0,05 \leq p \leq 0,1$ pa mejno statistično značilno razliko.

Glede na vse statistične teste, ki smo jih opravili za preiskovani kandidatni gen IBSP, smo ugotovili, da je izražanje gena povišano pri osteoporozi. Dobljeni rezultati se razlikujejo od naše hipoteze, da je izražanje gena IBSP, ki kodira zapis za kostni sialoprotein, znižano v osteoporotičnem kostnem tkivu, katero smo osnovali na predhodnih rezultatih pridobljenih s pomočjo mikromrež. Ker gen IBSP sodeluje predvsem pri mineralizaciji, bi bilo mogoče razložiti povišano izražanje gena v osteoblastih zaradi povečane aktivnosti teh celic, kar je pri osteoporozi prisotno. Pri osteoporozi sta povečana oba procesa, kostna tvorba in kostna razgradnja, vendar tvorba kostnine ne dosega kostne razgradnje.

Gordon in sodelavci so ugotovili, da je izražanje kostnega sialoproteina povezano z zorenjem osteoblastov in je povečano z dejavniki, ki sprožijo diferenciacijo osteoblastov, vključno z glukokortikoidi in kostnimi morfogenimi proteini, ki podpirajo kostno tvorbo, zmanjšano pa z dejavniki, ki pospešujejo kostno resorpcijo (24).

Izražanje kostnega sialoproteina je omejeno na mineralizirana tkiva. V študiji so ugotovili, da je izražanje kostnega sialoproteina zvišano med tvorbo nove kosti, kostno resorpcijo, kostno remodelacijo in diferenciacijo kostnih celic (17). Ker naši rezultati nakazujejo povišano izražanje gena IBSP v osteoporotičnem kostnem tkivu lahko kostni sialoprotein sodeluje tudi pri drugih procesih v kosti ne samo pri mineralizaciji kostnega tkiva.

V študiji so ugotavljali izražanje kostnega sialoproteina pri ženskah, ki po menopavzi, ko se izgubljanje kostne mase poveča, le-to zmanjšujejo z nadomestno hormonsko terapijo. Biokemični označevalci kostnega metabolizma so dobro korelirali s spremembami v kostni histomorfometriji in osteodenzimetriji. Kostni sialoprotein se skoraj izključno nahaja v mineraliziranih tkivih in zato velja za potencialni označevalec kostne remodelacije. Kostni sialoprotein v serumu se je izkazal za koristnega pri kvantitativnem spremljanju kostnega odgovora na nadomestno hormonsko terapijo v zdravih postmenopavzalnih ženskah. Izkazal se je kot zelo občutljiv označevalec kostne remodelacije in glede na dobljene podatke v študiji domnevajo, da količina proteina odraža prevlado procesa sorodnega s kostno resorpcijo (52).

Odkrili so tudi povečanje izražanje gena IBSP v oboleli pulpi pacientov z zobno gnilobo (53). Pri zobni gnilobi pride do bakterijske razgradnje zobovine, ki pa je eno od mineraliziranih tkiv, kjer se nahaja kostni sialoprotein. Morda propadanje zobovine poveča izražanje gena IBSP, prav tako je lahko propadanje kostnega tkiva razlog za povečano izražanje IBSP.

S statističnimi testi nismo odkrili razlike v izražanju gena COL15A1 med neosteoporotičnim, osteopeničnim in osteoporotičnim kostnim tkivom. Iz dobljenih rezultatov ne moremo ugotoviti ali gen COL15A1 vpliva na kostno tkivo ter na procese v njem.

Stromalne celice, pridobljene iz adipoznega in kostnega tkiva, kažejo podobno zmožnost osteogenske diferenciacije *in vitro*, vendar pa ni jasno, če uporabljajo skupni mehanizem diferenciacije. Cilj študije je bil raziskati osteogeno diferenciacijo omenjenih celic osredotočenim na izražanje genov, povezanih z zunajceličnim matriksom, ki igrajo ključno vlogo pri osteogenezi in regulaciji kostnega tkiva *in vivo*. Profili genskega izražanja so bili karakterizirani z uporabo mikromrež, pri čemer je bilo zmanjšanje izražanja gena COL15A1 ugotovljeno samo v osteogenih stromalnih celicah adipoznega tkiva, ne pa tudi v celicah kostnega tkiva (54).

Povezave med genom COL15A1 in osteoporozo ter kostnimi celicami ni bilo mogoče najti v nobeni drugi študiji.

Rezultati statističnih testov ne nakazujejo vpletenosti WISP-1 gena v patogenezo osteoporoze. Odkrili nismo nobene statistično značilne razlike v izražanju gena WISP-1. Po izračunu median koncentracij mRNA je bilo opaziti povečano izražanje gena WISP-1 v osteoporotičnem kostnem tkivu, vendar razlika ni bila statistično značilna. To je v nasprotju z našo hipotezo, da je izražanje gena WISP-1, ki kodira zapis za protein 1 WNT1-sprožljive signalne poti, znižano v osteoporotičnem kostnem tkivu. Ugotovili smo samo statistično značilno povezavo med normaliziranimi vrednostmi gena WISP-1 s T-vrednostjo v predelu kolka.

Mehanična obremenitev osteoblastov povzroči naglo prehodno akumulacijo aktivnega β -katenina, temu pa sledi povišano izražanje WISP-1 in COX2 (55). S tem bi bilo morda mogoče razložiti povečano izražanje WISP-1 v osteoporotičnem kostnem tkivu, saj so osteoporotične kosti zaradi izgube kostne gostote mehansko bolj obremenjene, z največjo obremenitvijo na predelu kolka in vratu stegenice, kjer je izražanje WISP-1 tudi najvišje.

5 SKLEP

Namen našega dela je bila analiza izražanja kandidatnih genov IBSP, COL15A1 in WISP-1 v zdravem in osteoporotičnem kostnem tkivu. Želeli smo potrditi rezultate, pridobljeni s pomočjo genskih mikromrež in oblikovali hipotezo: izražanje genov IBSP in WISP-1 je znižano, izražanje gena COL15A1 je zvišano v osteoporotičnem kostnem tkivu.

Z metodo PCR v realnem času, ki smo jo predhodno optimizirali, smo izmerili mRNA preučevanih genov v kostnem tkivu 71 preiskovancev. Za zaznavo produktov PCR v realnem času smo uporabili fluorescentno barvilo (gena IBSP in COL15A1), ter s fluorofori označene sekvenčno specifične sonde za gen WISP-1. S pomočjo standardnih krivulj za posamezen gen, ki smo jih izračunali s predhodno pripravljenim humanim standardom, smo izračunali relativne koncentracije mRNA posameznega gena. Te vrednosti smo potem normalizirali na dva hišna gena PPIA in RPLP, ki smo ju izbrali s pomočjo različnih statističnih metod izmed 12-ih hišnih genov. Vrednosti pa smo na koncu normalizirali na povprečno koncentracijo mRNA obeh hišnih genov v posameznem vzorcu.

Klinični pomen izražanja kandidatnih genov IBSP, COL15A1 in WISP-1 smo ocenili na podlagi statistične analize ter ugotovili:

- mejno statistično značilno razliko v izražanju gena IBSP med neosteoporotičnim, osteopeničnim in osteoporotičnim kostnim tkivom v predelu celotnega kolka ($p = 0,098$). Gen IBSP se je bolj izražal v osteoporotičnem kostnem tkivu.
- statistično značilno razliko v izražanju gena IBSP med neosteoporotičnim in osteoporotičnim kostnim tkivom v predelu celotnega kolka ($p = 0,036$) in mejno statistično značilno razliko v izražanju ($p = 0,096$) v predelu vratu stegenice, ne pa tudi v predelu ledvenih vretenc. Gen IBSP se je bolj izražal v osteoporotičnem kostnem tkivu.
- nobene statistično značilne razlike v izražanju genov COL15A1 in WISP-1 med neosteoporotičnim, osteopeničnim in osteoporotičnim kostnim tkivom v predelu celotnega kolka, vratu stegenice in ledvenih vretenc.
- nobene statistično značilne razlike v izražanju genov COL15A1 in WISP-1 med neosteoporotičnim in osteoporotičnim kostnim tkivom v predelu celotnega kolka, vratu stegenice in ledvenih vretenc.

- šibko korelacijo med IBSP genom in MKG, Z- in T-vrednostjo, vendar je bila v predelu celotnega kolka in vratu stegenice statistično značilna, razen korelacija izražanja gena v predelu kolka v povezavi z MKG, ki je bila mejno statistično značilna.
- šibko in neznačilno korelacijo med COL15A1 genom in MKG, Z- in T-vrednostjo.
- šibko korelacijo med WISP-1 genom in T-vrednostjo, vendar je bila statistično značilna v predelu vratu stegenice.

Rezultati nakazujejo, da igra gen IBSP pomembno vlogo pri kostni remodelaciji. Izražanje genov COL15A1 in WISP-1 je bilo neznačilno v preiskovanih vzorcih. Rezultate analize bi bilo smiselno vključiti v analizo z večjim številom bolnikov, saj lahko pri večji populaciji lažje dokažemo vpletenost posameznega gena v patogenezo osteoporoze.

6 LITERATURA

1. Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 898-933
2. Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Clifford JR: Osteoporosis, 3. izdaja, Elsevier Academic Press, London, 2008
3. www.zzv-nm.si/media/osteoporoza.pdf, sep. 2008
4. http://hcd2.bupa.co.uk/fact_sheets/html/osteoporosis.html, sep. 2008
5. <http://vestnik.szd.si/st2-s1/st2-s1-41-44.html>, sep. 2008
6. Kocjančič A: Osteoporoza: diagnostika in zdravljenje. Farm Vest 1999; 50: 1-6
7. www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=1704, sep. 2008
8. Ralston SH: Genetics of osteoporosis. Proceedings of the Nutrition Society 2007; 66: 158-165
9. www.chrislangton.co.uk/clip/html/Aspects%20of%20Osteoporosis/bone_densitometry.html, okt. 2008
10. <http://lesann.tripod.com/dexa%20scans.html>, okt. 2008
11. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabro A, Becherini L, Martini G, Nuti R: Estrogen Receptor Gene Polymorphisms and the Genetics of Osteoporosis. Am J Epidemiol 2005; 161: 307-320
12. Ralston SH, Crombrughe B: Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. Genes & Dev. 2006; 20: 2492-2506
13. Williams FMK, Spector TD: Recent advances in the genetics of osteoporosis. J Musculoskelet Neuronal Interact 2006; 6(1): 27-35
14. Ralston HS: Genetic Control of Susceptibility to Osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87(6): 2460-2466
15. http://en.wikipedia.org/wiki/Functional_genomics, nov. 2008
16. Liu YJ, Shen H, Xiao P, Xiong DH, Li LH, Recker RR, Deng HW: Molecular Genetic Studies of Gene Identification for Osteoporsis. 2004
17. Saad FA, Salih E, Wunderlich L, Flückiger R, Glimcher MJ: Prokaryotic expression of bone sialoprotein and identification of casein kinase II phosphorylation sites. Elsevier Academic Press, London, 2005: 443-447
18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=147563>, okt. 2008

19. Wuttke M, Müller S, Nitsche DP, Paulsson M, Hanisch FG, Maurer P: Structural Characterization of Human Recombinant and Bone-derived Bone Sialoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; Vol. 276, No. 39: 36839-36839
20. <http://en.wikipedia.org/wiki/IBSP>, maj 2008
21. Wazen RM, Tye CE, Goldberg HA, Hunter GK, Smith CE, Nanci A: In Vivo Functional Analysis of Polyglutamic Acid Domains in Recombinant Bone Sialoprotein. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2007; 55(1): 35-42
22. Karadag A, Fisher LW: Bone Sialoprotein Enhances Migration of Bone Marrow Stromal Cells Through Matrices by Bridging MMP-2 to $\alpha\beta$ -Integrin. *American Society for Bone and Mineral Research* 2006
23. Gordon JAR, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunterand GK, Goldberg HA: Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization *in vitro*. *Epub* 2007; 41(3): 462-473
24. Chaplet M, Detry C, Deroanne C, Fisher LW, Castronovo V, Bellahcene A: Zoledronic acid up-regulates bone sialoprotein expression in osteoblastic cells through Rho GTPase inhibition. *Biochem. J.* 2004; 384: 591-598
25. HäGG PM, Muona A, Liétard J, Kivirikko S, Pihlajaniemi T: Complete Exon-Intron Organization of the Human Gene for the $\alpha 1$ Chain of Type XV Collagen (COL15A1) and Comparison with the Homologous Col18a1 Gene. *The journal of Biological Chemistry* 1998; Vol. 273, No. 28: 17824-17831
26. Saika S, Okada Y, Miyamoto T, Yamanaka O, Ohnishi Y, Yamanaka A, Ooshima A: Protein expression pattern of collagen type XV in mouse cornea. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004; 242: 432-436
27. Ortega N, Werb Z: New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *Journal of Cell Science* 2002; 115: 4201-4214
28. Eklund L, Piihola J, Komulainen J, Sormunen R, Ongvarrasopone C, Fässler R, Muona A, Ilves M, Ruskoaho H, Takala TES, Pihlajaniemi T: Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(3): 1194-1199
29. Myers JC, Amenta PS, Dion AS, Sciancalepore JP, Nagaswami C, Weisel JW, Yurchenco PD: The molecular structure of human tissue type XV presents a unique conformation among the collagens. *Biochem. J.* 2007; 404: 535-544

30. Urano T, Narusawa K, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in the WISP1 gene with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Metab* 2007; 25: 253-258
31. Raisz LG: Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 3318-3325
32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=603398>, okt. 2008
33. Brigstock DR: The CCN family: a new stimulus package. *Journal of Endocrinology* 2003; 178: 169-175
34. French DM, Kaul RJ, D'Souza AL, Crowley CW, Bao M, Frantz GD, Filvaroff EH, Desnoyers L: WISP-1 Is an Osteoblastic Regulator Expressed During Skeletal Development and Fracture Repair. *American Journal of Pathology* 2004; 165: 855-867
35. Desnoyers L, Arnott D, Pennica D: WISP-1 Binds to Decorin in Biglycan. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; Vol. 276, No. 50: 47599-47607
36. Colston JT, de la Rosa SD, Koehler M, Gonzales K, Mestral R, Freeman GL, Bailey SR, Chandrasekar B: Wnt-induced secreted protein-1 is a prohypertrophic and profibrotic growth factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293(3): H1839-46
37. Inkson AC, Ono M, Kuznetsov AS, Fisher WL, Gehron Robery P, Young FM: TGF- β 1 and WISP-1/CCN-4 can regulate each other's activity to cooperatively control osteoblast function. *J Cell Biochem.* 2008; 104(5): 1865-78
38. Chen PP, Li WJ, Zhao S, Li DY, Feng LY, Shi XL, Koeffler P, Tong XJ, Xie D: Expression of Cyr61, Ctgf and WISP-1 Correlates with Clinical Features of Lung Cancer. *PLoS ONE* 2007; 2(6): e534
39. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N: The real-time polymerase chain reaction. Elsevier Academic Press, London, 2006: 95-125
40. Wong MI, Medrano JF: Real-time PCR for mRNA quantification. *BioTechniques* 2005; Vol. 39, No. 1
41. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2004; 55: 215-220
42. <http://www3.appliedbiosystems.com/>, avg. 2008
43. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F: Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(12): e103

44. Wilhelm J, Pingoud A: Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem* 2003; 4:1120-1128
45. TaqMan Gene Expression assays
<http://www3.appliedbiosystems.com/>, sep. 2008
46. http://everything2.com/?node_id=1513423, avg. 2008
47. Roche Applied Science: Selection of Housekeeping Genes
<https://www.roche-applied-science.com/index.jsp>, sep. 2008
48. Szabo A, Perou CM, Karaca M, Perreard L, Quackenbush JF, Bernard PS: Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biology* 2004; 5: R59
49. <http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.html>, avg. 2008
50. <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>, avg. 2008
51. Morey SJ, Ryan CJ, Van Dolah MF: Microarray validation: factor influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol. Proced. Online* 2006; 8(1): 175-193
52. Störk S, Störk C, Angerer P, Kothny W, Schmitt P, Wehr U, von Schacky C, Rambeck W: Bone sialoprotein is a specific biochemical marker of bone metabolism in postmenopausal women: a randomized 1-year study. *Osteoporos Int.* 2000; 11(9): 790-6
53. McLachlan LJ, Smith JA, Bujalska JI, Cooper RP: Gene Expression profiling of pulpal tissue reveals the molecular complexity of dental caries. Elsevier Academic Press, London 2005; 1741; 271-281
54. Egusa H, Iida K, Kobayashi M, Lin TY, Zhu M, Zuk PA, Wang CJ, Thakor DK, Hedrick MH, Nishimura I: Downregulation of extracellular matrix-related gene clusters during osteogenic differentiation of human bone marrow- and adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 2007; 13(10): 2589-600
55. Case N, Ma M, Sen B, Xie Z, Gross TS, Rubin J: β -katenin levels influence rapid mechanical responses in osteoblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 2008

7 PRILOGE

7.1 Priloga 1: Opis preiskovank in bolnikov

Preglednica XXXI: Opis preiskovank (letnica rojstva, starost, mena, starostna mena, T-vrednost, Stiffness, gostota, višina, masa, ITM).

Št. vzorca	Letnik	Starost	Mena	Star.mena	T-vrednost	Stiffness	Gostota	Višina	Masa	ITM
2	1933	73	44	1977	-2,6	59,5	0,300	166	83	30,1
3	1937	70	59	1996	0,2	107,5	0,604	159	88	34,8
7	1931	75	51	1982	-0,8	88,9	0,486	153	69	29,5
11	1930	77	45	1975	-2,1	67,7	0,352	170	70	24,2
14	1935	71	48	1983	-2,4	62,7	0,320	168	83	29,4
15	1933	73	54	1987	-2,4	61,9	0,315	166	84	30,5
17	1928	79	45	1973	-0,3	97,6	0,541	159	59	23,3

Preglednica XXXII: Opis bolnikov (spol, starost, telesna teža, telesna višina, ITM, MKG_kolk, Z_kolk, T_kolk, MKG_vs, Z_vs, T_vs, MKG_lv, Z_lv, T_lv, D_cel (0-bolniki brez osteoporozo, 1-bolniki z osteopenijo, 2-bolniki z osteoporozo)).

št. vzorca	spol	starost	tel. teža	tel. v.	ITM	MKG kolk	Z kolk	T kolk	MKG vs	Z vs	T vs	MKG lv	Z lv	T lv	D cel
32	Z	59	75	164	27,9	1,118	2,19	1,19	1,017	2,78	1,23	1,027	1,16	-0,18	0
35	Z	73	65	153	27,8	0,764	0,03	-1,76	0,608	-0,46	-2,86	1,047	2,23	0	2
36	M	68	75	185	21,9	0,851	-0,63	-1,7	0,722	-0,46	-2,34	1,156	1,44	0,59	1
37	Z	75	62	162	23,6	0,686	-0,46	-2,41	0,58	-0,58	-3,15	0,805	0,18	-2,2	2
38	Z	71	74	162	28,2	0,772	0,02	-1,69	0,647	-0,14	-2,47	0,988	1,62	-0,54	1
39	Z	80	54	160	21,1	0,672	-0,21	-2,52	0,594	-0,12	-3,01	0,777	0,24	-2,45	2
40	M	63	79	172	26,7	0,906	-0,34	-1,27	0,714	-0,76	-2,41	1,083	0,62	-0,07	1
41	Z	68	60	153	25,6	0,443	-2,9	-4,44	0,374	-3,06	-5,2	0,438	-3,57	-5,54	2
42	Z	74	70	168	24,8	0,742	-0,06	-1,94	0,611	-0,34	-2,84	0,797	0,04	-2,27	2
43	Z	81	64	163	24,1	0,726	0,29	-2,08	0,6	-0,01	-2,95	0,736	-0,11	-2,83	2
44	Z	75	63	151	27,6	0,541	-1,65	-3,62	0,474	-1,58	-4,16	0,583	-1,83	-4,22	2
45	M	77	64	168	22,7	0,79	-0,91	-2,17	0,635	-0,92	-3,13	0,813	-1,45	-2,53	2
46	Z	74	69	163	25,97	0,789	0,37	-1,55	0,648	0,06	-2,47	0,989	1,81	-0,53	1
48	Z	64	48	162	18,29	0,65	-1,42	-2,71	0,554	-1,52	-3,41	0,721	-1,27	-2,97	2
49	Z	78	75	162	28,58	0,735	0,16	-2	0,648	0,29	-2,46	0,903	1,25	-1,31	1
51	Z	70	70	174	23,12	0,929	1,27	-0,38	0,92	2,52	0,25	1,205	3,54	1,44	0
52	M	84	70	182	21,13	0,866	-0,17	-1,58	0,769	0,58	-1,91	0,929	-0,18	-1,47	1
53	M	77	80	192	21,7	0,682	-1,75	-3	0,573	-1,49	-3,69	0,89	-0,74	-1,82	2
54	Z	44	84	171	28,73	*	*	*	*	*	*	1,173	1,55	1,15	0
55	M	71	77	177	24,58	1,114	1,45	0,33	0,87	0,99	-0,99	1,387	3,61	2,69	0
56	Z	57	84	171	28,73	1,001	1,13	0,21	0,77	0,2	-1,24	1,074	1,48	0,25	1
60	Z	74	75	162	28,58	0,979	1,93	0,03	0,757	1,14	-1,38	1,159	3,34	1,01	1
61	Z	39	83	164	30,86	1,321	3,03	2,88	1,189	3,35	2,94	1,367	3,09	2,91	0
62	Z	50	60	159	23,73	0,844	-0,57	-1,09	0,683	-1,16	-2,11	0,943	-0,25	-0,95	1
63	Z	59	78	163	29,36	0,959	0,89	-0,13	0,801	0,64	-0,94	0,763	-1,21	-2,58	2
64	Z	71	76	157	30,83	0,861	0,77	-0,95	0,672	0,12	-2,22	*	*	-2,02	1
66	M	55	100	174	33,03	1,245	2,1	1,33	1,084	2,32	0,96	1,001	-0,34	-0,82	0
67	Z	66	72	155	29,97	0,763	-0,35	-1,76	0,734	0,4	-1,61	0,755	-0,82	-2,65	2
68	M	69	59	161	22,76	0,728	-0,44	-2,05	0,672	0	-2,23	0,792	-0,26	-2,31	1
69	M	57	68	168	24,09	1,067	0,78	-0,04	0,955	1,21	-0,22	0,92	-1,02	-1,56	1
70	M	73	65	150	28,89	1,053	1,03	-0,14	0,745	-0,06	-2,13	0,86	-1,12	-2,1	1
71	M	64	73	163	27,48	1,001	0,41	-0,55	0,925	1,19	-0,5	1,07	0,53	-0,19	0
72	Z	75	90	158	36,05	0,838	0,83	-1,14	0,707	0,7	-1,88	1,18	3,6	1,21	1
73	Z	72	92	173	30,74	0,95	1,59	-0,21	0,738	0,84	-1,56	1,13	2,99	0,76	1
74	M	55	84	169	29,41	1,079	0,82	0,05	0,925	0,85	-0,49	1,003	-0,32	-0,8	0
75	Z	51	78	169	27,31	0,912	0,06	-0,52	0,891	0,99	-0,03	1,045	0,76	-0,02	0
76	Z	66	85	166	30,85	0,995	1,56	0,16	0,924	2,28	0,29	1,073	2,05	0,24	0
77	Z	66	109	158	43,66	1,009	1,7	0,28	0,879	1,86	-0,16	1,183	3,07	1,24	0
78	M	78	69	164	25,65	0,853	-0,41	-1,69	0,723	-0,07	-2,33	1,033	0,59	-0,53	1
79	Z	75	82	157	33,27	0,826	0,71	-1,24	0,788	1,49	-1,07	0,916	1,18	-1,2	1
81	M	68	80	173	26,73	0,885	-0,37	-1,44	0,82	0,43	-1,45	1,294	2,69	1,84	1
82	Z	72	70	160	27,34	0,781	0,16	-1,61	0,586	-0,69	-3,08	0,645	-1,44	-3,66	2
83	M	61	64	165	23,51	0,854	-0,77	-1,67	0,643	-1,46	-3,06	0,858	-1,46	-2,12	2
84	Z	66	82	166	29,76	0,96	1,03	-0,38	0,678	-0,16	-2,17	0,854	0,07	-1,75	1

št. vzorca	spol	starost	tel. teža	tel. v.	ITM	MKG kolk	Z kolk	T kolk	MKG vs	Z vs	T vs	MKG lv	Z lv	T lv	D cel
85	M	45	100	169	35,01	1,284	2,18	1,63	0,874	0,02	-0,96	1,223	1,42	1,2	0
86	Z	68	47	145	22,35	*	*	*	*	*	*	0,819	-0,1	-2,07	1
87	Z	61	58	165	21,3	0,65	-1,55	-2,71	0,536	-1,86	-3,59	0,733	-1,33	-2,86	2
88	Z	71	77	160	30,08	0,851	0,74	-1,03	0,842	1,86	-0,53	0,797	-0,05	-2,27	1
89	Z	66	59	157	25,0	0,793	-0,08	-1,52	0,653	-0,38	-2,42	0,942	0,9	-0,96	1
90	Z	53	60	155	24,97	0,61	-2,35	-3,04	0,511	-2,67	-3,84	*	*	*	2
91	Z	67	80	166	29,03	0,782	-0,13	-1,61	0,669	-0,17	-2,26	1,073	2,14	0,23	1
92	Z	72	75	164	27,89	0,869	0,94	-0,88	0,804	1,52	-0,91	0,79	-0,09	-2,34	1
93	M	50	105	180	32,41	1,233	2,72	2,15	0,986	1,93	0,92	1,129	1,51	0,74	0
94	Z	69	73	161	28,16	0,928	1,2	-0,39	0,697	0,23	-1,98	1,167	3,13	1,09	1
95	M	47	72	178	22,72	0,847	-1,13	-1,73	0,616	-2,24	-3,3	0,831	-2,09	-2,36	2
96	M	65	84	174	27,74	1,121	1,38	0,38	0,957	1,57	-0,2	1,098	0,84	0,06	0
97	M	72	80	156	32,87	1,064	1,09	-0,06	0,949	1,76	-0,27	1,207	2,01	1,05	0
99	M	39	91	175	29,71	1,183	1,27	0,85	0,984	0,78	0,04	0,867	-1,95	-2,04	1
101	Z	80	50	155	20,81	0,663	-0,26	-2,6	0,569	-0,35	-3,26	0,674	-0,69	-3,39	2
103	M	80	73	163	27,48	1,011	0,85	-0,47	0,828	0,95	-1,37	1,025	0,57	-0,6	1
104	Z	73	76	163	28,6	1,101	2,93	1,05	1,062	4,17	*	0,884	0,83	-1,48	1
105	Z	77	62	160	24,22	0,743	0,17	-1,93	0,725	0,99	-1,7	0,863	0,83	-1,67	1
106	Z	73	52	150	23,11	0,641	-0,9	-2,78	0,588	-0,57	-3,07	0,908	1,05	-1,26	2
107	Z	72	56	155	23,31	0,739	-0,13	-1,96	0,606	-0,44	-2,89	0,902	0,95	-1,32	2
108	Z	72	67	156	27,53	*	*	*	*	*	*	1,076	2,49	0,26	0
109	M	66	83	177	26,49	0,926	-0,12	-1,12	0,766	-0,16	-1,94	0,9	-0,95	-1,73	1
110	Z	80	70	170	24,22	0,808	0,93	-1,39	0,752	1,47	-1,42	0,915	1,5	-1,2	1
111	Z	85	65	163	24,46	0,76	*	-1,79	0,663	*	-2,32	0,879	*	-1,53	1
112	Z	85	60	157	24,34	0,474	-1,55	-4,17	0,481	-1	-4,13	0,726	-0,05	-2,92	2
113	Z	91	57	160	22,27	0,648	*	-2,73	0,525	*	-3,69	0,967	*	-0,73	2
114	Z	77	58	155	24,14	0,572	-1,27	-3,36	0,519	-1,06	-3,75	0,627	-1,31	-3,82	2

*Ni podatka.

7.2 Priloga 2: Vrednosti Ct, C in Povp. C za posamezen gen

Preglednica XXXIII: Vrednosti za hišni gen PPIA (Ct, C in povprečna C (Povp. C)).

št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C	
vz 32	17,26 17,2	1459,98 1524,45	1492,21	vz 54	18,5 18,36	597,78 661,19	629,489	vz 76	19,09 19,08	390,863 393,688	392,276	vz 95	17,7 17,84	1063,51 961,514	1012,51	
vz 35	18,61 18,72	552,258 510,2	531,229	vz 55	21,34 21,66	77,33 61,415	69,3725	vz 77	18,48 18,14	606,456 774,697	690,577	vz 96	18,36 18,07	661,193 814,75	737,971	
vz 36	19,2 19,19	361,096 363,706	362,401	vz 56	18,17 18,32	758,14 680,52	719,328	vz 78	19,44 19,28	303,784 340,882	322,333	vz 97	17,47 17,47	1255,08 1255,08	1255,08	
vz 37	19,72 19,68	248,311 255,568	251,939	vz 60	19,43 19,4	305,98 312,66	309,32	vz 79	17,83 17,93	968,463 901,174	934,818	vz 99	22,05 22,2	46,3769 41,6284	44,0027	
vz 38	29,33 28,53	0,2452 0,43623	0,34072	vz 61	20,21 20,6	174,48 131,76	153,121	vz 81	17,57 17,61	1167,88 1134,71	1151,29	vz 101	19,08 18,89	393,688 451,413	422,551	
vz 39	20,15 20,4	182,186 152,17	167,178	vz 62	18,71 18,72	513,89 510,2	512,044	vz 82	17,64 17,59	1110,46 1151,18	1130,82	vz 103	17,29 16,75	1428,78 2107,88	1768,33	
vz 40	18,61 18,82	552,26 474,75	513,505	vz 63	17,44 17,33	1282,5 1388,2	1335,35	vz 83	24,35 24,31	8,85095 9,10961	8,98028	vz 104	27,37 27,79	1,00578 0,74327	0,87453	
vz 41	20,58 20,62	133,67 129,88	131,773	vz 64	27,67 27,93	0,81036 0,67199	0,74118	vz 84	18,25 17,92	715,699 907,687	811,693	vz 105	17,48 17,58	1246,07 1159,5	1202,78	
vz 42	18,46 18,35	615,25 665,97	640,613	vz 66	18,1 18,14	797,337 774,697	786,017	vz 85	17,98 17,72	869,303 1048,3	958,801	vz 106	16,62 16,64	2314,75 2281,65	2298,2	
vz 43	18,15 17,9	769,14 920,85	844,996	vz 67	19,42 19,29	308,191 338,436	323,313	vz 86	16,41 16,44	2692,65 2635,1	2663,88	vz 107	17,44 17,46	1282,49 1264,15	1273,32	
vz 44	18,65 18,84	536,58 467,96	502,27	vz 68	21,89 21,69	52,0404 60,1021	56,0713	vz 87	17,69 17,65	1071,19 1102,5	1086,84	vz 108	18,94 19,72	435,448 248,311	341,88	
vz 45	19,78 19,8	237,81 234,41	236,11	vz 69	17,3 17,42	1418,53 1301,09	1359,81	vz 88	17,95 17,9	888,288 920,854	904,571	vz 109	16,96 16,98	1812,05 1786,14	1799,1	
vz 46	24,12 23,49	10,445 16,442	13,4436	vz 70	17,57 17,68	1167,88 1078,93	1123,4	vz 89	18,57 18,52	568,397 589,236	578,817	vz 110	18,13 17,95	780,296 888,288	834,292	
vz 48	19,41 19,47	310,42 297,29	303,855	vz 71	18,42 18,27	633,233 705,465	669,349	vz 90	17,08 17,12	1662,04 1614,85	1638,44	vz 111	16,56 16,58	2416,95 2382,39	2399,67	
vz 49	18,41 18,41	637,81 637,81	637,81	vz 72	18,75 18,88	499,296 454,675	476,986	vz 91	22,94 23,08	24,432 22,089	23,2605	vz 112	18,49 18,49	602,104 602,104	602,104	
vz 51	18,77 18,95	492,16 432,32	462,24	vz 73	17,56 17,42	1176,32 1301,09	1238,7	vz 92	22,12 22,24	44,0971 40,4464	42,2718	vz 113	18,32 18,41	680,516 637,81	659,163	
vz 52	23,65 23,8	14,652 13,152	13,9023	vz 74	19,35 19,45	324,124 301,604	312,864	vz 93	20,25 20,45	169,528 146,789	158,158	vz 114	17,4 17,63	1319,97 1118,49	1219,23	
		vz 53	18,16 18,3	763,62 690,39	727,004	vz 75	18,97 19,12	426,142 382,51	404,326	vz 94	19,27 19,17	343,345 368,982	356,164			

Preglednica XXXIV: Vrednosti za hišni gen RPLP (Ct, C in povprečna C (Povp. C)).

št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C	
vz 32	17,21 17,88	672,69 419,6	546,146	vz 54	17,64 17,89	496,89 416,65	456,773	vz 76	18,27 18,35	318,8 301,33	310,065	vz 95	16,75 16,58	930,142 1048,48	989,31	
vz 35	18,44 18,54	282,82 263,58	273,2	vz 55	20,56 20,24	63,52 79,582	71,5511	vz 77	18,05 18,12	372,242 354,331	363,287	vz 96	17,22 17,42	667,97 580,188	624,079	
vz 36	18,34 18,82	303,46 216,4	259,929	vz 56	17,48 17,65	556,18 493,4	524,789	vz 78	18,66 18,6	242,215 252,672	247,444	vz 97	16,41 16,5	1181,87 1109,26	1145,57	
vz 37	19,36 19,38	147,93 145,86	146,89	vz 60	18,65 18,88	243,93 207,44	225,684	vz 79	17,01 17,12	774,47 716,722	745,596	vz 99	21,23 20,92	39,6216 49,2917	44,4566	
vz 38	27,57 25,91	0,4553 1,466	0,96062	vz 61	19,2 19,81	165,57 107,74	136,656	vz 81	16,79 16,88	904,298 848,744	876,521	vz 101	18,55 18,38	261,731 295,029	278,38	
vz 39	20,32 20,81	75,221 53,263	64,242	vz 62	18,57 18,49	258,07 273,03	265,55	vz 82	16,9 16,77	836,87 917,129	876,999	vz 103	16,29 16,58	1286,12 1048,48	1167,3	
vz 40	18,25 18,28	323,32 316,56	319,943	vz 63	16,58 16,81	1048,48 891,647	970,062	vz 83	23,57 23,14	7,6213 10,3177	8,96951	vz 104	27,21 27,59	0,58668 0,44889	0,51779	
vz 41	19,83 20,04	106,23 91,623	98,9266	vz 64	27,8 27,54	0,38717 0,46499	0,42608	vz 84	18,19 18,11	337,282 356,836	347,059	vz 105	16,61 16,68	1026,55 977,159	1001,86	
vz 42	18,45 18,45	280,83 280,83	280,833	vz 66	17,4 17,36	588,42 605,236	596,828	vz 85	17,19 17,11	682,237 721,789	702,013	vz 106	16,14 16,25	1429,46 1322,88	1376,17	
vz 43	17,31 17,2	626,93 677,45	652,191	vz 67	18,64 18,61	245,652 250,899	248,275	vz 86	16,51 16,44	1101,48 1157,15	1129,32	vz 107	16,49 16,57	1117,1 1055,89	1086,5	
vz 44	18,05 18,08	372,24 364,46	368,35	vz 68	20,99 21,11	46,92 43,1166	45,0183	vz 87	16,49 16,46	1117,1 1140,96	1129,03	vz 108	18,21 18,33	332,564 305,606	319,085	
vz 45	18,98 18,89	193,33 205,99	199,657	vz 69	16,63 16,53	1012,19 1086,07	1049,13	vz 88	17,37 17,31	600,988 626,934	613,961	vz 109	16,26 16,33	1313,59 1250,39	1281,99	
vz 46	21,8 20,86	26,518 51,42	38,969	vz 70	17,02 16,99	769,033 785,459	777,246	vz 89	17,72 17,65	469,663 493,403	481,533	vz 110	17,6 17,07	511,092 742,417	626,755	
vz 48	18,18 18,18	339,67 339,67	339,667	vz 71	17,58 17,72	518,344 469,663	494,003	vz 90	16,73 16,52	943,34 1093,74	1018,54	vz 111	16,15 16,17	1419,43 1399,57	1409,5	
vz 49	17,63 17,69	500,4 479,69	490,049	vz 72	17,9 17,72	413,73 469,663	441,696	vz 91	22,21 22,31	19,8659 18,5146	19,1903	vz 112	17,49 17,18	552,271 687,06	619,666	
vz 51	18,19 18,88	337,28 207,44	272,362	vz 73	16,63 16,86	1012,19 860,787	936,489	vz 92	21,02 20,91	45,9388 49,6401	47,7895	vz 113	18,6 18,6	252,672 252,672	252,672	
vz 52	22,18 22	20,29 23,033	21,6618	vz 74	18,71 18,94	233,832 198,855	216,344	vz 93	19,56 19,73	128,485 113,984	121,235	vz 114	17,12 16,72	716,722 950,008	833,365	
			vz 53	17,98 17,79	391,06 447,07	419,061	vz 75	18,58 18,34	256,257 303,461	279,859	vz 94	18,41 18,47	288,859 276,905	282,882		

Preglednica XXXV: Vrednosti za kandidatni gen IBSP (Ct, C in povprečna C (Povp. C)).

št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C	
vz 32	22,54 23,09	396,858 260,325	328,591	vz 54	25,43 25,53	43,2936 40,0986	41,6961	vz 76	27,63 27,43	8,0158 9,344	8,6799	vz 95	23,33 23,26	216,58 228,51	222,55	
vz 35	22,17 22,33	527,017 466,18	496,598	vz 55	25,11 25,88	55,3307 30,6619	42,9963	vz 77	25,16 25,36	53,25 45,68	49,465	vz 96	20,04 20,33	2697,7 2159,9	2428,8	
vz 36	19,57 19,57	3867,95 3867,95	3867,95	vz 56	24,27 24,3	105,351 102,956	104,154	vz 78	23,13 23,26	252,46 228,51	240,49	vz 97	21,54 21,49	854,24 887,62	870,93	
vz 37	21,71 21,84	749,858 678,729	714,294	vz 60	21,56 21,5	841,242 880,841	861,042	vz 79	22,33 22,23	466,18 503,32	484,75	vz 99	25,58 26,93	38,591 13,709	26,15	
vz 38	28,37 28,19	4,54534 5,21791	4,88162	vz 61	25,8 25,78	32,6013 33,105	32,8531	vz 81	25,18 25,2	52,44 51,642	52,041	vz 101	23,7 23,86	163,09 144,26	153,67	
vz 39	21,29 22,27	1034,7 488,124	761,414	vz 62	24,86 24,39	67,0197 96,0919	81,5558	vz 82	25,31 25,34	47,465 46,386	46,926	vz 103	24,85 24,83	67,536 68,579	68,057	
vz 40	26,06 26,04	26,7097 27,1224	26,916	vz 63	24,88 25,03	66 58,8304	62,4152	vz 83	24,54 24,3	85,654 102,96	94,305	vz 104	35,78 35,91	0,0155 0,014	0,0148	
vz 41	23,28 23,21	225,038 237,444	231,241	vz 64	32,46 32,83	0,19762 0,14881	0,17321	vz 84	20,96 20,79	1332,6 1518,1	1425,3	vz 105	25,73 25,49	34,399 41,347	37,873	
vz 42	23,64 23,46	170,764 196,031	183,398	vz 66	24,55 24,53	84,9994 86,3127	85,656	vz 85	19,69 19,69	3528 3528	3528	vz 106	21,94 21,83	628,64 683,95	656,3	
vz 43	21,08 21,04	1215,44 1253,29	1234,37	vz 67	23,38 23,46	208,43 196,031	202,231	vz 86	21,83 21,81	683,95 694,52	689,24	vz 107	23,87 23,75	143,16 156,95	150,06	
vz 44	22,01 21,83	595,793 683,952	639,873	vz 68	27,4 27,73	9,56143 7,42422	8,49282	vz 87	23,02 22,99	274,68 281,07	277,87	vz 108	25,98 25,87	28,399 30,898	29,648	
vz 45	25,06 24,95	57,4928 62,5515	60,0222	vz 69	22,56 22,39	390,819 445,222	418,021	vz 88	22,12 22,07	547,61 569,01	558,31	vz 109	22,67 22,68	359,21 356,47	357,84	
vz 46	28,4 28,13	4,44199 5,46353	4,95276	vz 70	23,4 23,37	205,259 210,035	207,647	vz 89	25,12 23,72	54,908 160,61	107,76	vz 110	26,04 25,65	27,122 36,574	31,848	
vz 48	25,28 25,4	48,5698 44,3009	46,4353	vz 71	22,29 22,51	480,697 406,091	443,394	vz 90	20,26 20,21	2279 2368,1	2323,6	vz 111	21,32 21,18	1011,2 1125,7	1068,5	
vz 49	23,98 23,83	131,581 147,617	139,599	vz 72	23,22 23,35	235,631 213,28	224,455	vz 91	23,52 23,62	187,22 173,4	180,31	vz 112	21,03 20,79	1262,9 1518,1	1390,5	
vz 51	20,69 20,99	1639,02 1302,27	1470,64	vz 73	22,09 22,91	560,351 298,845	429,598	vz 92	27,05 27,14	12,504 11,67	12,087	vz 113	22,42 22,14	435,1 539,28	487,19	
vz 52	27,3 27,5	10,3233 8,85581	9,58954	vz 74	22,91 23,06	298,845 266,381	282,613	vz 93	27,78 28,15	7,145 5,3804	6,2627	vz 114	21,71 21,61	749,86 809,61	779,73	
			vz 53	22,41 22,22	438,448 507,198	472,823	vz 75	26,25 26,11	23,089 25,705	24,397	vz 94	25,49 24,79	41,347 70,715	56,031		

Preglednica XXXVI: Vrednosti za kandidatni gen COL15A1 (Ct, C in povprečna C (Povp. C)).

št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C
vz 32	21,31 21,38	707,312 676,213	691,762	vz 54	24,54 24,22	88,8299 109,101	98,9653	vz 77	27,02 27,2	18,061 16,089	17,075	vz 96	21,16 21,15	778,85 783,87	781,36
vz 35	24,83 24,76	73,7326 77,1236	75,4281	vz 55	25,29 25,18	54,8702 58,8874	56,8788	vz 78	23,76 23,52	146,61 171,04	158,82	vz 97	21,95 21,81	468,89 513,01	490,95
vz 36	23,1 23,14	224,009 218,327	221,168	vz 56	24,19 24,38	111,223 98,4449	104,834	vz 79	23,61 23,71	161,43 151,39	156,41	vz 99	26,05 26,28	33,676 29,051	31,364
vz 37	25,67 25,64	42,9863 43,8227	43,4045	vz 60	22,26 22,05	384,234 439,722	411,978	vz 81	24,93 25	69,145 66,105	67,625	vz 101	24,27 23,92	105,65 132,29	118,97
vz 38	28,79 28,69	5,79382 6,17819	5,986	vz 61	26,38 26,46	27,2437 25,8791	26,5614	vz 82	23,83 24,03	140,16 123,26	131,71	vz 103	26,07 25,64	33,246 43,823	38,535
vz 39	23,33 23,44	193,243 180,061	186,652	vz 62	24,91 24,83	70,0394 73,7326	71,886	vz 83	27,86 28,24	10,529 8,2489	9,3891	vz 104	32,2 32,18	0,6482 0,6566	0,6524
vz 40	26,91 26,39	19,3828 27,0693	23,226	vz 63	25,05 24,93	64,0159 69,1454	66,5807	vz 84	23,33 23,76	193,24 146,61	169,92	vz 105	24,54 24,69	88,83 80,67	84,75
vz 41	26,22 26,41	30,1926 26,7238	28,4582	vz 66	24,85 24,86	72,7915 72,3254	72,5584	vz 85	20,77 20,79	1000,6 987,81	994,19	vz 106	23,11 23,04	222,58 232,81	227,69
vz 42	25,66 25,74	43,2634 41,0963	42,1798	vz 67	25,22 25,14	57,3937 60,4201	58,9069	vz 86	20,57 20,47	1137,7 1213,2	1175,5	vz 107	24,26 24,19	106,33 111,22	108,78
vz 43	21,53 21,6	614,1 587,099	600,599	vz 68	27,23 27,56	15,7815 12,767	14,2743	vz 87	23,6 23,95	162,47 129,76	146,12	vz 108	25,51 25,29	47,639 54,87	51,255
vz 44	24,13 24	115,594 125,661	120,627	vz 69	24,72 24,9	79,1308 70,4908	74,8108	vz 88	21,68 21,55	557,69 606,26	581,98	vz 109	23,56 23,49	166,7 174,37	170,54
vz 45	24,16 24,31	113,388 102,972	108,18	vz 70	25,07 25	63,1988 66,1053	64,652	vz 89	21,92 22,22	478,02 394,23	436,13	vz 110	26,35 26,26	27,774 29,427	28,6
vz 46	28,41 27,53	7,39556 13,0154	10,2055	vz 71	23,38 23,26	187,136 202,131	194,633	vz 90	21,05 21,04	835,87 841,26	838,57	vz 111	22,1 22,09	425,82 428,57	427,2
vz 48	25,01 24,96	65,682 67,8257	66,7539	vz 72	24,81 24,93	74,686 69,1454	71,9157	vz 91	26,42 26,65	26,553 22,906	24,729	vz 112	24,23 23,93	108,4 131,44	119,92
vz 49	23,31 23,46	195,742 177,762	186,752	vz 73	24,2 24,25	110,511 107,018	108,765	vz 92	26,19 26,02	30,78 34,332	32,556	vz 113	22,7 23,13	289,64 219,73	254,68
vz 51	22,13 22,01	417,697 451,166	434,431	vz 74	23,62 23,64	160,4 158,353	159,377	vz 93	25,03 24,81	64,844 74,686	69,765	vz 114	22,15 22,02	412,36 448,28	430,32
			vz 52	27,25 26,76	15,58 21,3432	18,4616	vz 75	26,32 26,09	28,3142 32,8221	30,5681	vz 94	24,48 24,11	92,32 117,09	104,7	
			vz 53	23,02 23,2	235,822 210,073	222,947	vz 76	26,6 26,72	23,653 21,899	22,776	vz 95	24,14 24,06	114,85 120,91	117,88	

Preglednica XXXVII: Vrednosti za kandidatni gen WISP-1 (Ct, C in povprečna C (Povp. C)).

št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C	št. vzorca	Ct	C	Povp. C
vz 32	29,12 28,86	2311,14 2750	2530,57	vz 55	31,29 31,22	541,546 567,498	554,522	vz 77	33,1 33,21	161,43 149,98	155,71	vz 96	28,67 29,23	3122,6 2147,2	2634,9
vz 35	30,45 30,59	949,687 864,814	907,25	vz 56	30,76 30,89	771,886 707,619	739,752	vz 78	33,18 32,85	153,02 190,81	171,92	vz 97	30,93 30,61	688,94 853,33	771,13
vz 36	28,53 28,54	3429,01 3406,16	3417,58	vz 60	28,92 27,7	2641,85 5973,23	4307,54	vz 79	32,14 33,25	306,75 146,03	226,39	vz 99	33,67 34,62	110,27 58,421	84,346
vz 37	31,89 31,8	362,568 385,058	373,813	vz 61	34,08 34,59	83,8281 59,6047	71,7164	vz 81	34,98 34,25	45,922 74,82	60,371	vz 101	30,29 30,37	1056,9 1001,9	1029,4
vz 38	34,17 34,05	78,9319 85,5268	82,2293	vz 62	34,04 33,65	86,1006 111,755	98,9277	vz 82	33,08 33,64	163,61 112,5	138,06	vz 103	34,95 34,53	46,852 62,045	54,449
vz 39	29,06 28,96	2405,75 2572,13	2488,94	vz 63	32,04 32,66	327,965 216,657	272,311	vz 83	29,96 29,74	1317,9 1526,8	1422,3	vz 104	29,72 29,79	1547,3 1476,6	1511,9
vz 40	33,12 32,98	159,288 174,921	167,105	vz 64	33,45 32,99	127,746 173,755	150,751	vz 84	30,65 30,05	830,8 1240,9	1035,9	vz 105	33,87 33,38	96,466 133,87	115,17
vz 41	31,9 31,86	360,151 369,914	365,033	vz 66	34,43 34,86	66,3355 49,7587	58,0471	vz 85	30,02 28,99	1266,1 2521	1893,6	vz 106	30,52 30,53	906,26 900,22	903,24
vz 42	33,45 32,87	127,746 188,272	158,009	vz 67	32,25 32,59	284,998 227,04	256,019	vz 86	29,44 29,45	1865,9 1853,5	1859,7	vz 107	34,28 34,58	73,334 60,005	66,669
vz 43	28,17 28,1	4362,31 4571,36	4466,83	vz 68	33,15 33,24	156,125 147,006	151,565	vz 87	32,07 32,16	321,45 302,68	312,06	vz 108	34,37 34,37	69,051 69,051	69,051
vz 45	33,87 34,58	96,4664 60,0046	78,2355	vz 69	33,72 33,23	106,644 147,992	127,318	vz 88	31,41 31,36	499,79 516,78	508,28	vz 109	30,01 29,89	1274,6 1381,1	1327,8
vz 46	32,63 33,28	221,047 143,126	182,087	vz 70	33,33 32,3	138,42 275,626	207,023	vz 89	30,2 30,63	1122,5 841,99	508,28	vz 110	34,46 34	65,018 88,435	76,726
vz 48	33,34 33,6	137,497 115,554	126,526	vz 71	32,87 33,3	188,272 141,224	164,748	vz 90	28,45 28,22	3617,4 4218,9	3918,2	vz 111	30,09 29,82	1208,2 1447,2	1327,7
vz 49	32,89 32,63	185,771 221,047	203,409	vz 72	32,04 32,79	327,965 198,618	263,292	vz 91	28,76 29,2	2940,2 2190,8	2565,5	vz 112	32,72 32,14	208,14 306,75	257,44
vz 51	28,44 28,77	3641,71 2920,59	3281,15	vz 73	33,44 32,95	128,603 178,465	153,534	vz 92	30,57 30,68	876,46 814,3	845,38	vz 113	28,51 27,65	3475,2 6176,3	4825,8
vz 52	28,56 28,64	3360,91 3185,84	3273,37	vz 74	32,76 32,74	202,643 205,371	204,007	vz 93	35,71 35,29	28,185 37,324	32,755	vz 114	27,96 28,56	5020 3360,9	4190,4
vz 53	29 29,16	2504,24 2250,14	2377,19	vz 75	34,63 35,12	58,0315 41,8179	49,9247	vz 94	34,3 33,67	72,36 110,27	91,315				
vz 54	34,01 34,01	87,8453 87,8453	87,8453	vz 76	34,27 34,26	73,826 74,322	74,074	vz 95	31,89 32,03	362,57 330,17	346,37				

7.3 Priloga 3: Normalizirane vrednosti mRNA kandidatnih genov

Preglednica XXXVIII: Normalizirane vrednosti vzorcev za kandidatni gen IBSP (IBSP/PPIA, IBSP/RPLP, IBSP/oba HKG).

št. vzorca	IBSP/PPIA	IBSP/RPLP	IBSP/obaHKG	št. vzorca	IBSP/PPIA	IBSP/RPLP	IBSP/obaHKG	št. vzorca	IBSP/PPIA	IBSP/RPLP	IBSP/obaHKG
32	0,2202	0,6017	0,3224	63	0,0467	0,0643	0,0541	89	0,1862	0,2238	0,2032
35	0,9348	1,8177	1,2347	64	0,2337	0,4065	0,2968	90	1,4181	2,2813	1,749
36	10,673	14,881	12,431	66	0,109	0,1435	0,1239	91	7,7518	9,3959	8,495
37	2,8352	4,8628	3,5819	67	0,6255	0,8145	0,7076	92	0,2859	0,2529	0,2684
38	14,327	5,0817	7,5025	68	0,1515	0,1887	0,168	93	0,0396	0,0517	0,0448
39	4,5545	11,852	6,5804	69	0,3074	0,3984	0,3471	94	0,1573	0,1981	0,1754
40	0,0524	0,0841	0,0646	70	0,1848	0,2672	0,2185	95	0,2198	0,2249	0,2223
41	1,7548	2,3375	2,0047	71	0,6624	0,8976	0,7623	96	3,2912	3,8919	3,5664
42	0,2863	0,653	0,3981	72	0,4706	0,5082	0,4886	97	0,6939	0,7603	0,7256
43	1,4608	1,8926	1,6489	73	0,3468	0,4587	0,395	99	0,5943	0,5882	0,5912
44	1,274	1,7371	1,4699	74	0,9033	1,3063	1,0681	101	0,3637	0,552	0,4385
45	0,2542	0,3006	0,2755	75	0,0603	0,0872	0,0713	103	0,0385	0,0583	0,0464
46	0,3684	0,1271	0,189	76	0,0221	0,028	0,0247	104	0,0169	0,0285	0,0212
48	0,1528	0,1367	0,1443	77	0,0716	0,1362	0,0939	105	0,0315	0,0378	0,0344
49	0,2189	0,2849	0,2475	78	0,7461	0,9719	0,8442	106	0,2856	0,4769	0,3572
51	3,1816	5,3996	4,0039	79	0,5186	0,6502	0,5769	107	0,1178	0,1381	0,1272
52	0,6898	0,4427	0,5393	81	0,0452	0,0594	0,0513	108	0,0867	0,0929	0,0897
53	0,6504	1,1283	0,8251	82	0,0415	0,0535	0,0467	109	0,1989	0,2791	0,2323
54	0,0662	0,0913	0,0768	83	10,501	10,514	10,508	110	0,0382	0,0508	0,0436
55	0,6198	0,6009	0,6102	84	1,756	4,1068	2,4601	111	0,4453	0,758	0,561
56	0,1448	0,1985	0,1674	85	3,6796	5,0255	4,2485	112	2,3094	2,2439	2,2762
60	2,7837	3,8153	3,2188	86	0,2587	0,6103	0,3634	113	0,7391	1,9281	1,0686
61	0,2146	0,2404	0,2267	87	0,2557	0,2461	0,2508	114	0,6395	0,9356	0,7598
		62	0,1593	0,3071	0,2098	88	0,6172	0,9094	0,7353		

Preglednica XXXIX: Normalizirane vrednosti vzorcev za kandidatni gen COL15A1 (COL15A1/PPIA, COL15A1/RPLP, COL15A1/oba HKG).

št. vzorca	COL15A1 /PPIA	COL15A1 /RPLP	COL15A1 /oba HKG	št. vzorca	COL15A1 /PPIA	COL15A1 /RPLP	COL15A1 /oba HKG	št. vzorca	COL15A1 /PPIA	COL15A1 /RPLP	COL15A1 /oba HKG
32	0,4636	1,2666	0,6787	63	0,0499	0,0686	0,0578	89	0,7535	0,9057	0,8226
35	0,142	0,2761	0,1875	66	0,0923	0,1216	0,1049	90	0,5118	0,8233	0,6312
36	0,6103	0,8509	0,7108	67	0,1822	0,2373	0,2061	91	1,0631	1,2886	1,1651
37	0,1723	0,2955	0,2177	68	0,2546	0,3171	0,2824	92	0,7702	0,6812	0,723
38	17,569	6,2314	9,1998	69	0,055	0,0713	0,0621	93	0,4411	0,5755	0,4994
39	1,1165	2,9055	1,6131	70	0,0576	0,0832	0,068	94	0,294	0,3701	0,3277
40	0,0452	0,0726	0,0557	71	0,2908	0,394	0,3346	95	0,1164	0,1192	0,1178
41	0,216	0,2877	0,2467	72	0,1508	0,1628	0,1566	96	1,0588	1,252	1,1473
42	0,0658	0,1502	0,0916	73	0,0878	0,1161	0,1	97	0,3912	0,4286	0,409
43	0,7108	0,9209	0,8023	74	0,5094	0,7367	0,6023	99	0,7128	0,7055	0,7091
44	0,2402	0,3275	0,2771	75	0,0679	0,1057	0,0963	101	0,2816	0,4274	0,3395
45	0,4582	0,5418	0,4965	76	0,0581	0,0735	0,0649	103	0,0218	0,033	0,0263
46	0,7591	0,2619	0,3894	77	0,0247	0,047	0,0324	104	0,746	1,2599	0,9371
48	0,2197	0,1965	0,2075	78	0,4927	0,6419	0,5575	105	0,0705	0,0846	0,0769
49	0,2928	0,3811	0,3312	79	0,1673	0,2098	0,1862	106	0,0991	0,1655	0,1239
51	0,7351	1,0084	1,1828	81	0,0587	0,0772	0,0667	107	0,0854	0,1001	0,0922
52	1,328	0,8523	1,0382	82	0,1165	0,1502	0,1312	108	0,1499	0,1606	0,1551
53	0,3067	0,532	0,3891	83	1,0455	1,0468	1,0462	109	0,0948	0,133	0,1107
54	0,1572	0,2167	0,1822	84	0,2093	0,4896	0,2933	110	0,0343	0,0456	0,0392
55	0,8199	0,7949	0,8072	85	1,0369	1,4162	1,1972	111	0,178	0,3031	0,2243
56	0,1457	0,1998	0,1685	86	0,4413	1,0409	0,6198	112	0,1992	0,1935	0,1963
60	1,3319	1,8255	1,5401	87	0,1344	0,1294	0,1319	113	0,3864	1,008	0,5586
61	0,1735	0,1944	0,1833	88	0,6434	0,9479	0,7665	114	0,3529	0,5164	0,4193
62	0,1404	0,2707	0,1849								

Preglednica XL: Normalizirane vrednosti vzorcev za kandidatni gen WISP-1 (WISP-1/PPIA, WISP-1/RPLP, WISP-1/oba HKG).

št. vzorca	WISP-1/PPIA	WISP-1/RPLP	WISP-1/oba HKG	št. vzorca	WISP-1/PPIA	WISP-1/RPLP	WISP-1/oba HKG	št. vzorca	WISP-1/PPIA	WISP-1/RPLP	WISP-1/oba HKG
32	1,6959	4,6335	2,483	64	203,39	353,81	258,3	90	2,3914	3,8468	2,9493
35	1,7078	3,3208	2,2556	66	0,0738	0,0973	0,084	91	110,29	133,69	120,87
36	9,4304	13,148	10,983	67	0,7919	1,0312	0,8958	92	19,999	17,69	18,773
37	1,4837	2,5448	1,8745	68	2,7031	3,3667	2,9986	93	0,2071	0,2702	0,2345
38	241,34	85,6	126,38	69	0,0936	0,1214	0,1057	94	0,2564	0,3228	0,2858
39	14,888	38,743	21,51	70	0,1843	0,2664	0,2178	95	0,3421	0,3501	0,3461
40	0,3254	0,5223	0,401	71	0,2461	0,3335	0,2832	96	3,5705	4,2221	3,869
41	2,7702	3,6899	3,1646	72	0,552	0,5961	0,5732	97	0,6144	0,6731	0,6424
42	0,2467	0,5626	0,343	73	0,1239	0,1639	0,1412	99	1,9168	1,8973	1,907
43	5,2862	6,849	5,967	74	0,6521	0,943	0,771	101	2,4362	3,6978	2,9372
45	0,3314	0,3918	0,3591	75	0,111	0,1726	0,1351	103	0,0308	0,0466	0,0371
46	13,545	4,6726	6,9482	76	0,1888	0,2389	0,2109	104	1728,9	2920	2171,8
48	0,4164	0,3725	0,3932	77	0,2255	0,4286	0,2955	105	0,0958	0,115	0,1045
49	0,3189	0,4151	0,3607	78	0,5333	0,6948	0,6034	106	0,393	0,6563	0,4916
51	7,0984	12,047	8,9331	79	0,2422	0,3036	0,2694	107	0,0524	0,0614	0,0565
52	235,45	151,11	184,08	81	0,0524	0,0689	0,0595	108	0,202	0,2164	0,2089
53	3,2698	5,6727	4,1484	82	0,1221	0,1574	0,1375	109	0,738	1,0357	0,8619
54	0,1396	0,1923	0,1617	83	158,38	158,57	158,48	110	0,092	0,1224	0,105
55	7,9934	7,75	7,8698	84	1,2762	2,9847	1,7879	111	0,5533	0,942	0,6971
56	1,0284	1,4096	1,1892	85	1,9749	2,6973	2,2803	112	0,4276	0,4155	0,4214
60	13,926	19,087	16,103	86	0,6981	1,6468	0,9806	113	7,321	19,099	10,585
61	0,4684	0,5248	0,495	87	0,2871	0,2764	0,2817	114	3,437	5,0283	4,0831
		62	0,1932	0,3725	0,2544	88	0,5619	0,8279	0,6694		
		63	0,2039	0,2807	0,2362	89	1,697	2,0398	1,8527		