

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARJANA BARLIČ

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARJANA BARLIČ

**UGOTAVLJANJE IZRAŽANJA GENOV PTN IN CXCL-2 V
OSTEOPOROTIČNEM KOSTNEM TKIVU**

**EXPRESSION ANALYSIS OF PTN AND CXCL-2 GENES IN OSTEOPOROTIC
BONE TISSUE**

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc, mag. farm. in somentorstvom asist. Zorana Trošta, mag. farm.

Zahvale:

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Janji Marc, mag. farm. za izkazano zaupanje in strokovne nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Iskrena hvala somentorju asist. Zoranu Troštu, mag. farm. za strokovno vodstvo pri delu v laboratoriju, vrednotenju rezultatov in pisanju diplomske naloge ter za iskren odnos in izkazano zaupanje.

Hvala tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo za prijazen odnos in pomoč.

Izjava:

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

Marjana Barlič

Ljubljana, 2009

VSEBINA

VSEBINA	I
----------------------	----------

SEZNAM PREGLEDNIC	III
--------------------------------	------------

SEZNAM SLIK	IV
--------------------------	-----------

POVZETEK	V
-----------------------	----------

ABSTRACT	VI
-----------------------	-----------

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
-----------------------------------	-------------

1 UVOD	1
---------------------	----------

1.1 SPLOŠNO O OSTEOPOROZI	1
--	----------

1.1.1 NASTANEK OSTEOPOROZE	1
----------------------------------	---

1.1.2 DIAGNOSTIKA	2
-------------------------	---

1.1.3 DEFINICIJA OSTEOPOROZE	2
------------------------------------	---

1.1.4 DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OSTEOPOROZO	3
---	---

<i>1.1.4.1 Zunanji dejavniki</i>	3
--	---

<i>1.1.4.2 Genetski dejavniki</i>	3
---	---

1.2 ŠTUDIJE GENETIKE OSTEOPOROZE	4
---	----------

1.2.1 MODELNI ORGANIZMI	4
-------------------------------	---

1.2.2 ŠTUDIJE VEZANEGA DEDOVANJA	5
--	---

1.2.3 ASOCIACIJSKE ŠTUDIJE	5
----------------------------------	---

1.2.4 ŠTUDIJE GENSKEGA IZRAŽANJA	6
--	---

<i>1.2.4.1 Omejitve konvencionalnih študij genskega izražanja</i>	6
---	---

<i>1.2.4.2 Mikromreže</i>	6
---------------------------------	---

<i>1.2.4.3 PCR v realnem času</i>	8
---	---

1.3 VLOGA KEMOKINA CXCL2 IN RASTNEGA FAKTORJA PLEIOTROPIN V	
--	--

TELESU	10
---------------------	-----------

1.3.1 KEMOKIN CXCL2	10
---------------------------	----

<i>1.3.1.1 Zgradba CXCL2</i>	10
------------------------------------	----

<i>1.3.1.2 Receptorji</i>	11
---------------------------------	----

<i>1.3.1.3 Fiziološke funkcije</i>	11
--	----

1.3.2 PLEIOTROPIN	14
-------------------------	----

<i>1.3.2.1 Zgradba Pleiotropina</i>	14
---	----

<i>1.3.2.2 Receptorji</i>	14
---------------------------------	----

<i>1.3.2.3 Fiziološke funkcije</i>	15
--	----

2 NAMEN DELA	19
---------------------------	-----------

3 MATERIALI IN METODE	20
------------------------------------	-----------

3.1 PREISKOVANCI	20
-------------------------------	-----------

3.2 PRIPRAVA VZORCEV	20
-----------------------------------	-----------

3.2.1 ODVZEM VZORCEV	20
----------------------------	----

3.2.2 IZOLACIJA RNA	20
3.2.3 SINTEZA cDNA	21
3.3 PRIPRAVA HUMANEGA STANDARDA.....	21
3.3.1 IZOLACIJA RNA.....	21
3.3.1.1 Določanje koncentracije in integritete RNA	22
3.3.2 REVERZNA TRANSKRIPCIJA	23
3.4 PCR V REALNEM ČASU	24
3.4.1 PCR V REALNEM ČASU Z UPORABO TAQMAN® SONDE IN SYBR GREENER.....	24
3.4.2 POGOJI POMNOŽEVANJA	26
3.4.2.1 Nastavitev temperaturnega programa.....	26
3.4.2.2 Sestava reakcijskih zmesi	27
3.5 IZBOR HIŠNIH GENOV	30
3.5.1 POGOJI POMNOŽEVANJA	31
3.5.2 METODE ZA IZBOR HIŠNIH GENOV	32
3.5.2.1 Razlike Ct vrednosti za pare kontrola-bolnik.....	32
3.5.2.2 Metoda absolutne deviacije od mediane (MAD)	32
3.5.2.3 Normfinder	32
3.5.2.4 GeNorm	33
3.5.2.5 Normalizacija relativne količine mRNA enega gena na povprečje relativnih količin mRNA ostalih genov v vzorcu	33
3.5.2.6 Razlike relativnih količin mRNA	33
3.6 METODA STANDARDNE PREMICE	34
3.7 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	35
<u>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</u>	<u>36</u>
4.1 PRIPRAVA HUMANEGA STANDARDA.....	36
4.2 IZBOR HIŠNIH GENOV	37
4.3 OPTIMIZACIJA REAKCIJE PCR V REALNEM ČASU	38
4.4 MERJENJE IZRAŽANJA GENOV <i>CXCL2</i> IN <i>PTN</i> V VZORCIH KOSTNEGA TKIVA.....	42
4.5 OCENA IZRAŽANJA GENOV <i>CXCL2</i> IN <i>PTN</i> V OSTEOPOROZNEM IN NEOSTEOPOROZNEM TKIVU	47
4.6 OCENA IZRAŽANJA GENOV <i>CXCL2</i> IN <i>PTN</i> V OSTEOPOROZNEM IN ZDRAVEM TKIVU.....	48
4.7 OCENA IZRAŽANJA GENOV <i>CXCL2</i> IN <i>PTN</i> PRI BOLNIKI Z ZLOMOM IN BREZ ZLOMA.....	50
4.8 ANALIZA POVEZANOSTI IZRAŽANJA GENOV <i>CXCL2</i> IN <i>PTN</i> S KOSTNO GOSTOTO.....	51
4.9 KLINIČNI POMEN MERITEV IZRAŽANJA GENA <i>CXCL2</i> V KOSTNEM TKIVU ...	53
4.10 KLINIČNI POMEN MERITEV IZRAŽANJA GENA <i>PTN</i> V KOSTNEM TKIVU ...	54
<u>5 SKLEP.....</u>	<u>56</u>
<u>6 LITERATURA</u>	<u>57</u>

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Reagenti vključeni v reagenčni komplet RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (36)	23
Preglednica II: Sestavine kompleta SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (38)	24
Preglednica III: Temperaturni program za detekcijo s Taqman® sondo	26
Preglednica IV: Temperaturni program za detekcijo s SYBR® GreenER™	27
Preglednica V: Sestava reagenčnih kompletov za pomnoževanje gena <i>cxcl2</i> (39, 41)	28
Preglednica VI: Reakcijske zmesi za standarde za pomnoževanje gena <i>cxcl2</i>	28
Preglednica VII: Sestava reagenčnega kompleta za pomnoževanje genov <i>ptn</i> , <i>ppia</i> in <i>rplp</i> (40)	28
Preglednica VIII: Reakcijske zmesi za standarde za gen <i>ptn</i>	29
Preglednica IX: Reakcijske zmesi za standarde za hišna gena <i>ppia</i> in <i>rplp</i>	29
Preglednica X: Seznam genov, za katere oligonukleotidni začetniki so vsebovani v kompletu Human Endogenous Control Gene Panel in njihova polna imena (42)	31
Preglednica XI: Temperaturni program za pomnoževanje hišnih genov	32
Preglednica XII: Rangiranje kandidatnih genov glede na izračune pri posameznem postopku izbora genov z najstabilnejšim izražanjem	38
Preglednica XIII: Kombinacije koncentracij (nmol/L) oligonukleotidnih začetnikov	41
Preglednica XIV: Izračunane količine mRNA za gene <i>cxcl2</i> , <i>ptn</i> , <i>ppia</i> in <i>rplp</i> ter normalizirane količine mRNA genov <i>cxcl2</i> in <i>ptn</i>	45
Preglednica XV: Ugotavljanje povezanosti normaliziranega izražanja gena <i>cxcl2</i> z MKG in T-vrednostjo	52
Preglednica XVI: Ugotavljanje povezanosti normaliziranega izražanja gena <i>ptn</i> z MKG in T-vrednostjo	52

SEZNAM SLIK

Slika 1: Analiza izražanja genov z mikromrežami.....	7
Slika 2: Diagram odvisnosti ΔR_n od števila ciklov (ΔR_n je razlika med fluorescenco produkta in fluorescenco bazne linije) pri uporabi PCR v realnem času, kot ga izriše računalnik s pomočjo ustrezne programske opreme.....	8
Slika 3: Princip metode TaqMan® (39)	25
Slika 4: Talilni diagrami za gena <i>cxcl2</i> (vijolično, modro) in <i>ptn</i> (rdeče, zeleno)	39
Slika 5: Talilni diagrami za gen <i>cxcl2</i> pri temperaturi prileganja 62 °C ter volumnih oligonukleotidnih začetnikov 1 μ L (rdeče, zeleno) in 0,75 μ L (vijolično, modro) 40	
Slika 6: Talilni diagrami za gen <i>cxcl2</i> pri temperaturi 60 °C in volumnih oligonukleotidnih začetnikov 0,75 μ L (zeleno, rdeče-zgoraj), 0,5 μ L (modro, vijolično), 0,25 μ L (rdeče, zeleno-v sredini) in 0,10 μ L (rdeče, zeleno-spodaj).....	41
Slika 7: Talilni diagrami za gen <i>cxcl2</i> pri 60 °C in kombinacijah koncentracij smernih in protismernih oligonukleotidnih začetnikov, ki jih opisuje preglednica 14	42
Slika 8: Grafični prikaz standardne premice za gen <i>ppia</i>	44
Slika 9: Grafični prikaz standardne premice za gen <i>rplp</i>	44
Slika 10: Grafični prikaz standardne premice za gen <i>ptn</i>	44
Slika 11: Grafični prikaz standardne premice za gen <i>cxcl2</i>	45
Slika 12: Primerjava izražanja gena <i>cxcl2</i> v osteoporoznem in neosteoporoznem tkivu....	47
Slika 13: Primerjava izražanja gena <i>ptn</i> v osteoporoznem in neosteoporoznem kostnem tkivu.....	48
Slika 14: Primerjava izražanja gena <i>cxcl2</i> v osteoporoznem in zdravem tkivu	49
Slika 15: Primerjava izražanja gena <i>ptn</i> v osteoporoznem in zdravem tkivu.....	49
Slika 16: Primerjava izražanja gena <i>cxcl2</i> med vzorci bolnikov z osteoporoznim zlomom in tistih, ki zloma niso utrpeli.	50
Slika 17: Primerjava izražanja gena <i>ptn</i> med vzorci bolnikov z zlomom vratu stegenice in tistih, ki zloma niso utrpeli	51

POVZETEK

Osteoporoza je sistemska degenerativna skeletna bolezen, za katero so značilne zmanjšana mineralna kostna gostota, spremembe v mikroarhitekturi kosti in posledično zvečano tveganje za zlome, predvsem zapestja, vretenc in kolkov. Na razvoj osteoporoze vplivajo številni dejavniki, tako zunanji kot tudi genetski. Namen naše študije je bil ugotoviti izražanje genov *cxcl2* in *ptn* v humanem kostnem tkivu. Z vsegenomsko analizo z uporabo mikromrež je bilo ugotovljeno različno izražanje teh dveh genov v osteoblastih izoliranih iz osteoporoznega in zdravega kostnega tkiva. Te rezultate smo želeli potrditi z metodo PCR v realnem času. Študijo smo izvedli na 71-ih vzorcih kostnega tkiva bolnikov, ki so jim opravili zamenjavo kolčnega sklepa ali artroplastiko zaradi osteoartritisa (n = 49) ali zloma vratu stegenice (n = 22). Za oba gena smo izvedli primerjavo izražanja med osteoporoznim in neosteoporoznim tkivom, med osteoporoznim in zdravim tkivom ter med tkivom bolnikov, ki so bili operirani zaradi osteoporoznega zloma, in tistih, ki zloma niso utrpeli, saj je zlom še vedno najboljši kazalec poroznosti kostnega tkiva.

Pri genu *cxcl2* nismo ugotovili značilne razlike v izražanju med osteoporoznim in neosteoporoznim tkivom. Pri primerjavi osteoporoznega in zdravega tkiva smo ugotovili značilno ($p = 0,038$) višje izražanje gena v tkivu, ki je bilo osteoporozno glede na T-vrednost v vratu stegenice in mejno značilno ($p = 0,094$) višje izražanje v tkivu, ki je bilo osteoporozno glede na T-vrednost v predelu celotnega kolka. Pri primerjavi izražanja gena *cxcl2* med bolniki z zlomom in tistimi brez zloma smo ugotovili značilno ($p = 0,011$) višje izražanje na predelu z zlomom vratu stegenice. Z metodo korelacije smo ugotovili značilno povezanost izražanja gena *cxcl2* z MKG in T-vrednostjo na predelu vratu stegenice ($p = 0,017$ oz. $p = 0,004$) ter mejno značilno povezanost izražanja z MKG ($p = 0,092$), ne pa s T-vrednostjo v predelu celotnega kolka.

Pri genu za pleiotropin (*ptn*) nismo ugotovili značilne razlike v izražanju med osteoporoznim in neosteoporoznim niti med osteoporoznim in zdravim tkivom. Pri primerjavi izražanja glede na prisotnost oz. odsotnost zloma pa smo ugotovili značilno ($p = 0,002$) nižje izražanje gena za pleiotropin pri vzorcih odvzetih bolnikom z zlomom vratu stegenice. Z metodo korelacije nismo ugotovili značilne povezanosti med izražanjem gena in MKG oz. T-vrednostjo. Rezultati naše študije izražanja genov *ptn* in *cxcl2* v kostnem tkivu nakazujejo vpletenost obeh genov v razvoj osteoporoze, zato predlagamo gena *ptn* in *cxcl2* za nadaljne študije osteoporoze na nivoju DNA.

ABSTRACT

Osteoporosis is a systemic degenerative skeletal disorder, characterised by decreased bone mineral density (BMD), microarchitectural bone alterations and consequently by increased risk of wrist, vertebral and hip fractures. The development of osteoporosis is affected by a number of factors, both environmental and genetic. The purpose of this study was to determine expression levels of *cxcl2* and *ptn* genes in human bone tissue. Using whole genome microarray, different expression levels of these two genes in osteoblasts of osteoporotic and normal bone tissue were observed. We decided to confirm the results obtained with microarrays using the real-time PCR method. We conducted the study on 71 samples from patients having undergone arthroplasty due to osteoarthritis (n = 49) or femoral neck fracture (n = 22). We decided to make three different comparisons of expression levels for these two genes. First comparison was made between osteoporotic and non-osteoporotic bone tissue, second comparison was made between osteoporotic and normal bone tissue and third comparison was made between samples extracted from patients, who had been operated due to a femoral neck fracture and samples from patients who had not suffered fracture, which is currently the best indicator of bone tissue porosity. At the end we were looking for significant correlation between gene expression level and BMD or T-score.

We observed no significant difference in expression level of *cxcl2* gene between osteoporotic and non-osteoporotic bone tissue. When comparing the expression level of *cxcl2* gene between osteoporotic and normal bone tissue, we observed a significantly ($p = 0,038$) higher expression level of *cxcl2* gene in samples that were osteoporotic in regard to the T-score in femoral neck region. Similar trend was observed in samples that were osteoporotic in regard to the T-score in hip region, but the difference was not significant. We also observed a significantly ($p = 0,011$) higher expression level of *cxcl2* gene in samples extracted from patients who had been operated due to a femoral neck fracture compared to those who had not suffered the fracture, and a significant correlation between *cxcl2* gene expression level and BMD and T-score in the femoral neck region ($p = 0,017$ and $p = 0,004$).

In the case of *ptn* gene, we observed no significant difference in gene expression level between osteoporotic and non-osteoporotic or between osteoporotic and normal bone tissue. We also observed no significant correlation between *ptn* gene expression level and

BMD or T-score, but we did observe significantly ($p = 0,002$) lower gene expression level in samples extracted from patients with femoral neck fracture compared to those extracted from patients, who had not suffered the fracture.

The results of gene expression analysis of *ptn* and *cxcl2* genes in bone tissue indicate the involvement of both genes in osteoporosis development, therefore we recommend these two genes for further studies of osteoporosis on DNA level.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

OKRAJŠAVA	RAZLAGA
18S rRNA	18S ribosomalna RNA (ang. 18S ribosomal RNA)
ALK	kinaza anaplastičnega limfoma (ang. Anaplastic lymphoma kinase)
BMP-2	protein kostne morfogeneze 2 (ang. Bone morphogenetic protein 2)
cDNA	komplementarna DNA (ang. complementary DNA)
CSF-1	spodbujevalni dejavnik rasti kolonij 1 (ang. Colony stimulating factor 1)
CXCL2	kemokin 2, vsebuječ motiv CXC (ang. Chemokine (CXC-motif) ligand 2)
<i>cxcl2</i>	gen za kemokin CXCL2
CXCR	receptor za CXC-kemokine
DAG	diacil glicerol
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dCTP	deoksicitidin trifosfat
dGTP	deoksigvanozin trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
dTTP	deoksitimidin trifosfat
DXA	dvoenergijska rentgenska absorpciometrija (ang. dual energy X-ray absorptiometry)
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (ang. glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase)
GRO- β	z rastjo povezan onkogen beta (ang. Growth-related oncogene beta)
HARP	peptid za regulacijo heparinske afinitete (ang. Heparin affinity regulatory peptide)
HB-GAM	heparin-vezavni rastni dejavnik (ang. Heparin-binding growth-associated molecule)
HBNF	heparin-vezavni nevrilite stimulirajoči dejavnik (ang. Heparin-binding neurite-promoting factor)
IL-1	interlevkin 1
IL-6	interlevkin 6
IL-17	interlevkin 17
IP ₃	inozitol-3-fosfat
I- κ B	inhibitorni protein κ B
LPS	lipopolisaharid
MIP-2	makrofagni vnetni protein 2 (ang. Macrophage inflammatory protein 2)
MKG	mineralna kostna gostota
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (ang. messenger RNA)

NFκB	jedrni dejavnik κB (ang. Nuclear factor kappa-B)
OSF-1	za osteoblaste specifičen faktor 1 (ang. Osteoblast specific factor 1)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PIP ₂	fosfatidilinozitol-4,5-difosfat
PPIA	ciklofilin A (ang. Peptidyl-prolyl isomerase A)
<i>ptn</i>	gen za pleiotropin
PTP	protein-tirozin-fosfataza (ang. Protein tyrosine phosphatase)
QCT	kvantitativna računalniška tomografija (ang. quantitative computed tomography)
QTL	lokus, ki vsebuje gene, kateri kodirajo kvantitativne lastnosti (ang. quantitative trait locus)
RIN	parameter integritete RNA (ang. RNA integrity number)
RNA	ribonukleinska kislina (ang. ribonucleic acid)
RPLP	60S kisli ribosomalni protein P0 (ang. Large ribosomal protein P0)
RPTPζ	receptorski tip protein-tirozin-fosfataze ζ (ang. Protein tyrosine phosphatase receptor-type ζ)
RSD	relativni standardni odklon (ang. relative standard deviation)
SD	standardni odklon (ang. standard deviation)
SZO	Svetovna zdravstvena organizacija
SYN-3	sindekan 3 (ang. Syndecan 3)
TGF-β	transformirajoči rastni dejavnik beta (ang. Transforming growth factor beta)
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze alfa (ang. Tumor necrosis factor alpha)
UDG	uracil-DNA-glikozilaza
VCAM-1	molekula za adhezijo žilnih celic (ang. Vascular cell adhesion molecule 1)

1 UVOD

1.1 SPLOŠNO O OSTEOPOROZI

Osteoporoza je najpogostejša presnovna bolezen kosti, za katero so značilne zmanjšana mineralna kostna gostota (MKG), spremembe v mikroarhitekturi kosti in posledično povečano tveganje za zlome, predvsem zapestja, vretenc in kolcev. Osteoporoza je predvsem bolezen starih žensk. Do 70. leta starosti je šestkrat pogostejša pri ženskah, po 70. letu je pogosta tudi pri moških, vendar je pri ženskah še vedno dvakrat pogostejša (1).

1.1.1 Nastanek osteoporoze

Kost je tkivo, ki se obnavlja vse življenje. V mehanizmu obnavljanja kosti sta vključena dva tipa celic: osteoblasti, katerih glavna naloga je izgradnja kostnega tkiva, in osteoklasti, ki kost razgrajujejo. Razvoj in funkcijo osteoblastov in osteoklastov kontrolirajo rastni faktorji, lokalno sproščeni citokini, kakor tudi nekateri sistemski hormoni (2). V dobi odraščanja oz. nekako do 25. leta prevladuje tvorba kosti, po dosegu maksimalne kostne mase sta procesa izgradnje in razgradnje kosti nekaj časa uravnotežena, nato pa se po približno 35. letu starosti ravnotežje premakne v prid razgradnje kosti, posledica katere je osteoporoza. V določeni starosti po 35. letu je kostna masa odvisna od maksimalne kostne mase dosežene v obdobju odraščanja in s starostjo povezane izgube kostne mase, ki se pospeši zlasti po menopavzi (1). V obdobju po menopavzi je pri ženskah izguba kostne mase pospešena predvsem zaradi upada nivoja estrogenov in posledičnega zvišanja nivoja citokinov, predvsem IL-1, TNF- α in IL-6, ki spodbujajo delovanje osteoklastov (3). V tem obdobju se poveča tudi aktivnost osteoblastov, vendar ne do tolikšne mere, da bi bila sposobna kompenzirati upad kostne mase. Pomanjkanje estrogena pri obeh spolih vpliva predvsem na izgubo trabekularnega dela kosti (2). Razgradnja kosti zaradi procesa staranja dodatno prispeva k upadanju kostne mase in je posledica zmanjšane aktivnosti rastnih faktorjev, zmanjšane absorpcije kalcija iz črevesa in zmanjšane tvorbe vitamina D₃, kar vodi v znižan serumski nivo kalcija. Posledično se zviša nivo parathormona, ki zopet pospeši razgradnjo kostnega tkiva. V starosti pa se zmanjša tudi aktivnost osteoblastov, kar dodatno prispeva k izgubi kostne mase (2).

1.1.2 Diagnostika

Najhujši zaplet osteoporoze je osteoporozni zlom. Osteoporoza pred pojavom zloma nima kliničnih znakov, zato temelji diagnoza bolezni na ugotavljanju znižanja MKG. Metode za merjenje MKG delimo na invazivne in neinvazivne. Med neinvazivnimi metodami se največ uporablja dvoenergijska rentgenska absorpciometrija (DXA). S to metodo se v praksi meri MKG ledvenih vretenc, kolka in vratu stegenice. Kadar želimo ločeno podatke o količini kortikalne in trabekularne kosti, je metoda izbora kvantitativna računalniška tomografija (QCT). Problem te metode je visoka doza sevanja, zato preiskavo v praksi le redko uporabljamo (1).

Pri interpretaciji meritev MKG sta pomembna dva indeksa: T-vrednost (T-score) in Z-vrednost (Z-score). T-vrednost predstavlja število standardnih odklonov nad ali pod povprečno vrednostjo MKG zdravih mladih oseb istega spola (4). Z-vrednost predstavlja število standardnih odklonov nad ali pod povprečno vrednostjo MKG populacije, ki je enake starosti, spola in rase. T-vrednost bi naj imela večjo interpretacijsko vrednost (3, 4). Za diagnozo osteoporoze ob jasnem osteoporoznem zlomu merjenje MKG ni potrebno (4). Kadar z drugimi metodami ne moremo opredeliti stanja, npr. ločiti osteoporoze od drugih bolezni kosti, uporabimo invazivno tehniko kostne biopsije (1).

1.1.3 Definicija osteoporoze

Glede na opredelitev SZO (Svetovna zdravstvena organizacija) ločimo:

-osteoporozo: kadar je MKG za 2,5 ali več kot 2,5 standardna odklona (SD) pod povprečno vrednostjo zdravih mladih oseb (T-vrednost -2,5 ali manj),

-osteopenijo: ko je T-vrednost med -1,0 in -2,5,

-hudo osteoporozo: kadar je poleg T-vrednosti -2,5 ali manj, prisoten še zlom zaradi zmanjšane trdnosti kosti.

O normalni kostni gostoti govorimo, kadar je T-vrednost večja od -1,0 (4).

1.1.4 Dejavniki tveganja za osteoporozo

Osteoporozo je kompleksna bolezen, ki jo povzroča veliko dejavnikov, od genetskih dejavnikov do zunanjih, kakor tudi njihove interakcije.

1.1.4.1 Zunanji dejavniki

Najpomembnejši dejavnik tveganja za osteoporozo je starost. Pri ženskah se v pomenopavzalnem obdobju mineralna kostna gostota zmanjšuje za približno 1-2 % letno, kar je dvakrat hitreje kot pri moških podobne starosti. Nedavne raziskave so pokazale, da se izgubljanje kostnine po 70. letu pri obeh spolih nadaljuje ali celo pospeši (5).

Hrana, ki ne vsebuje dovolj kalcija, in majhna telesna aktivnost prav tako botrujeta nastanku osteoporoze. Ugotovili so, da imajo prebivalci tistih območij, kjer zaužijejo izrazito malo mleka in mlečnih izdelkov, značilno več zlomov kolka in zapestja kot prebivalci drugih območij, ki uživajo zadostne količine kalcija (1).

Telesna neaktivnost pospeši razgradnjo kosti. Učinkovita je samo telesna vadba, ki aktivira mišičje in obteži skelet vsaj s težo telesa (1).

Pitje alkohola tudi pospeši razvoj osteoporoze. Alkohol deluje neposredno na kostne celice in ne samo prek okvare jeter in malabsorpcije. Tudi kajenje pripomore k hitrejšemu razvoju osteoporoze (1).

Osteoporozo lahko povzročijo tudi nekatera zdravila. Dolgotrajna uporaba velikih odmerkov kortikosteroidov je povezana s hitrim izgubljanjem kostnine in z zlomi. Med drugimi zdravili za katera obstaja sum, da prispevajo k izgubljanju kostnine, so heparin, antikonvulzivi, večji odmerki ščitničnih hormonov in antacidi, ki vsebujejo aluminij (5).

1.1.4.2 Genetski dejavniki

Genetski dejavniki igrajo pomembno vlogo pri osteoporozi in z njo povezanimi fenotipi. Genetski vplivi na MKG in ostale fenotipe, povezane z osteoporozo, so po naravi poligenski in posredovani z vplivom različnih variant genov, od katerih ima vsaka neznaten učinek, in njihovimi interakcijami z vplivi okolja (6).

1.2 ŠTUDIJE GENETIKE OSTEOPOROZE

Študije na dvojčkih in družinah so pokazale, da je 50 - 85 % variabilnosti MKG genetsko določene. Podobne študije so ugotovile velik genetski vpliv na ostale determinante rizičnosti zloma: geometrija vratu stegenice, kostna remodelacija in zmanjšana kvaliteta kosti (7). Najbolj raziskani geni, ki vplivajo na MKG, so gen za receptor vitamina D, gen za estrogenski receptor alfa in gen za kolagen 1A1. Ti geni igrajo vlogo pri regulaciji MKG, vendar so njihovi učinki neznatni in skupaj predstavljajo manj kot 5 % dednega prispevka k MKG. Vpliv genov na posamezen fenotip je različen, torej niso vsi geni, ki vplivajo na MKG, nujno pomembni tudi pri zlomu (2). Dodatno se lahko študije ostalih bolezni kosti, kot so osteoartritis in metabolni kostni sindromi, izkažejo za koristne pri odkrivanju genov, ki sovpadajo z osteoporozo. Za identifikacijo genov, ki so za to odgovorni, obstajajo različni pristopi. Ti vključujejo: modelne organizme, študije vezanega dedovanja, asociacijske študije in študije genskega izražanja (2, 7).

1.2.1 Modelni organizmi

Modelni organizmi so nam v veliko pomoč pri študijah genetike. Študije se večinoma izvajajo na miših in nam lahko nudijo pomembne informacije, vendar pa moramo biti zelo previdni pri ekstrapolaciji rezultatov na človeško kost, saj obstajajo med vrstama številne razlike. Ena glavnih razlik je v telesni drži miši in ljudi, zaradi česar se lahko zelo razlikujejo vzorci biomehanskega bremena kosti. Druga, zelo pomembna razlika, je, da se kortikalna kost glodalcev redko remodelira. Še ena pomembna razlika pa je, da človeške odrasle kosti ne rastejo v dolžino, medtem ko so epifize glodalcev odprte in kost raste v dolžino tudi v odraslem obdobju (8).

Uporaba testnih živali v študijah genetike ima številne prednosti. Z optimalno kontrolo okolja lahko zmanjšamo vpliv negenskih faktorjev na fenotip na minimum. Ustvarimo lahko veliko število potomcev, kar nam omogoči odlično statistično moč. Prednost je tudi v krajši življenjski dobi živali.

Največja pomanjkljivost teh študij pa je, da geni oz. področja, ki regulirajo MKG pri živalih, mogoče nimajo vpliva na regulacijo MKG pri ljudeh (7).

Obstajajo različni pristopi h genetski modifikaciji miši, ki se uporabljajo za identifikacijo aktivnosti genov v razvoju kosti in postnatalni skeletni homeostazi. Ti so: prekomerno

izražanje tarčnih genov, globalni ali tkivno specifični izbris gena, zamenjava gena z mutirano varianto in inducibilni modeli.

1.2.2 Študije vezanega dedovanja

Vežano dedovanje se nanaša na pojav, ko se geni, ki ležijo blizu skupaj, tudi skupaj dedujejo. Študije vezanega dedovanja se uporablja za identifikacijo kromosomskih regij, znotraj katerih se nahajajo geni, ki regulirajo kvantitativne lastnosti (ang. quantitative trait loci, QTL). Lokusi, ki regulirajo MKG pri ljudeh, so spolno specifični. Ugotovljeno je bilo tudi, da obstajajo za fenotipa hitrost upadanja kostne mase in maksimalna kostna masa različni QTL. Prednost študij vezanega dedovanja je, da ponujajo iskanje novih molekularnih poti, ki regulirajo kostni metabolizem. Slabost teh študij pri kompleksnih boleznih pa je, da imajo relativno majhno statistično moč za zaznavo genov, ki imajo majhne učinke na preučevano lastnost, četudi uporabimo velike vzorce z nekaj tisoč osebki. Na splošno si rezultati, pridobljeni z različnimi študijami, večkrat nasprotujejo kot pa se ujemajo, verjetno zato, ker vključujejo različne populacije ter zaradi različnih kriterijev za vključevanje oseb v študijo. Zaradi teh razlogov in lažjega dostopa do kliničnih vzorcev se vedno več uporablja asociacijske študije (6, 7).

1.2.3 Asociacijske študije

Asociacijske študije se široko uporabljajo na področju genetike osteoporoze. Te študije običajno vključujejo povezavo polimorfizmov točno določenih kandidatnih genov z MKG ali drugimi fenotipi (npr. osteoporozni zlom). Klasične asociacijske študije vključujejo kandidatni gen, za katerega je znano, da ima učinke na metabolizem kosti. Geni, ki so mutirani pri redkih monogenih boleznih kosti, so se prav tako izkazali za bogat vir polimorfizmov, ki regulirajo MKG v normalni populaciji. Asociacijske študije kandidatnih genov so relativno lahko izvedljive in imajo lahko zadostno moč za zaznavo majhnih alelnih efektov. Njihovo uporabnost pa lahko zmanjšajo učinki negenskih vplivov na fenotip, genetska heterogenost in populacijska razslojenost. Poleg tega asociacija med kandidatnim genom in fenotipom ne pomeni nujno, da je ta gen v vzročni povezavi z opazovanim učinkom, saj lahko obstaja vežano dedovanje z blizu ležečim genom, ki je vzrok za učinek. Nedavno je postalo možno izvajanje asociacijskih študij na bazi celotnega

genoma z analizo velikega števila blizu ležečih mononukleotidnih polimorfizmov, naključno raztresenih po genomu. Takšne študije imenujemo vsegenomske asociacijske študije (6, 7).

1.2.4 Študije genskega izražanja

V zadnjih dvajsetih letih je bilo narejenih ogromno raziskav, ki so preučevale izražanje genov vpletenih v metabolizem kosti, še posebej v povezavi z osteoporozo. Te študije so se osredotočile predvsem na tri področja: iskanje razlik v izražanju genov med zdravimi in bolnimi tkivi, določanje učinkov številnih podedovanih regulatorjev (hormoni, receptorji itd.) in določanje učinkov zdravil, ki so v uporabi za zdravljenje osteoporoze (9).

1.2.4.1 Omejitve konvencionalnih študij genskega izražanja

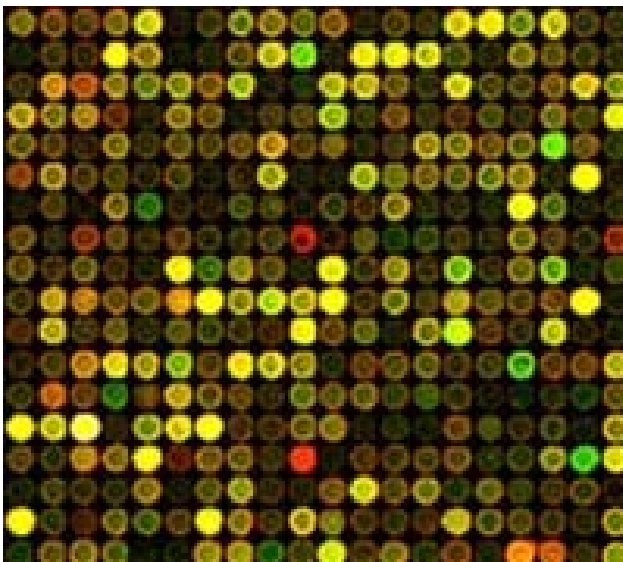
Konvencionalne študije genskega izražanja (Northern in Southern blot) so dale pomembne informacije o možnih mehanizmih sprožitve in razvoja osteoporoze. Potrdile so, da ima osteoporozna kompleksen način regulacije, ki vključuje veliko število kandidatnih genov. Glavna omejitev konvencionalnih metod je, da lahko sočasno preiskujejo le majhno število genov in zato ne morejo določiti velikega števila genov, ki prispevajo k neki lastnosti. To je problem, ker številni celični tipi in tkiva prispevajo k variiranju MKG in bi zato lahko bila pomembna pri razvoju ali preprečevanju osteoporoze. Velika omejitev je tudi ta, da konvencionalne metode zahtevajo relativno veliko količino RNA. Ta količina pa seveda narašča sorazmerno s številom preiskovanih genov. Problem pride do izraza predvsem, kadar se študije izvajajo na biopsijah kostnega tkiva zaradi majhne vsebnosti RNA v primerjavi s kulturami osteoblastov. Tehnika mikromrež nam omogoča, da prebrodimo to težavo in identificiramo gene povezane s kostmi, ki lahko prispevajo k variaciji MKG in osteoporozi (9).

1.2.4.2 Mikromreže

Mikromreže predstavljajo miniaturiziran postopek Northern blot, pri katerem oligonukleotidne sonde fiksiramo ali direktno sintetiziramo na sintetično podlago (stekleno ploščo ali plastično membrano). Celokupno RNA ali RNA, ki nas zanima, z reverzno

transkripcijo prepisemo v cDNA in označimo z radioaktivnimi, fluorescenčnimi ali drugimi označevalci. Nato cDNA hibridiziramo na mikromrežo. Po hibridizaciji pridobimo podatke s pomočjo čitalca slik ali laserskega skenerja in jih analiziramo s primernim računalniškim programom. Tehnologija mikromrež nam omogoča pregled genskega izražanja za desetine tisočev genov hkrati. Je zelo primerna, kadar želimo hitro raziskati veliko število genov ali kadar imamo na razpolago majhne količine vzorca. Mikromreže lahko uporabimo za analizo genskega izražanja v nekem vzorcu ali kadar primerjamo izražanje gena v dveh različnih celičnih tipih ali dveh vzorcih tkiva (npr. zdravo in bolno tkivo).

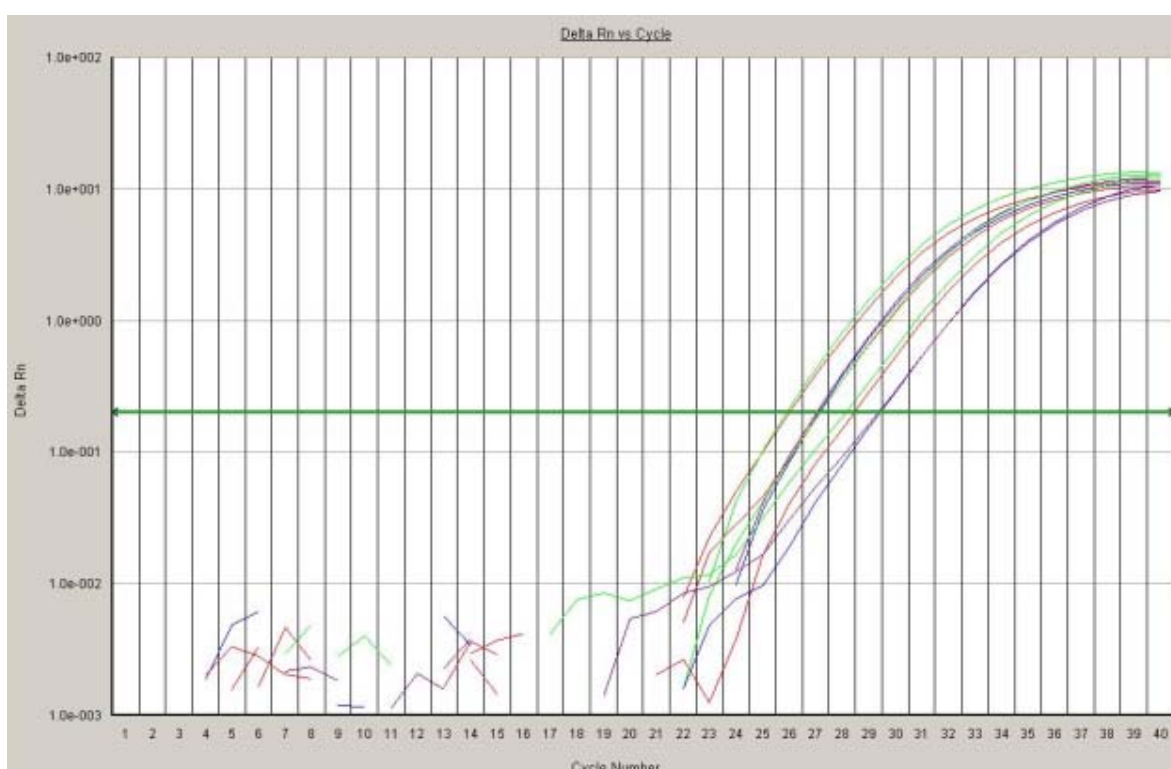
Do danes je bila večina študij kostnega metabolizma in osteogeneze izvajanih z mikromrežami opravljenih z uporabo celičnih kultur človeškega in mišjega izvora. Problem celičnih kultur je, da celice niso v povezavi z ostalimi tkivi, kar nam lahko da popačene rezultate. S tem je namreč eliminiran vpliv genov in ostalih faktorjev, ki se ne izražajo v izbranem tkivu, vendar kljub temu prispevajo k razvoju bolezni. Poleg tega na rezultate dobljene z mikromrežami vplivajo vsi koraki v postopku priprave vzorca za analizo z mikromrežami. Zaradi teh pomanjkljivosti in nizke občutljivosti in specifičnosti mikromrež rezultate teh praviloma potrdimo s tehniko PCR v realnem času, ki je trenutno najbolj občutljiva in specifična metoda za kvantifikacijo RNA (9).



Slika 1: Analiza izražanja genov z mikromrežami

1.2.4.3 PCR v realnem času

Kinetični PCR oz. Tehnologija verižne reakcije s polimerazo v realnem času je metoda, ki nam omogoča detekcijo in kvantifikacijo nukleinskih kislin, kot tudi zaznavanje strukturnih sprememb genov. Je nadgradnja klasičnega PCR, kjer poteka detekcija produktov po končanem pomnoževanju. Najpomembnejša prednost PCR v realnem času pred konvencionalnim PCR je kontinuirano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu. To pomeni, da lahko izmerimo količino produkta PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazi, ko se količina produkta v vsakem ciklu približno podvoji in je izkoristek reakcije največji.



Slika 2: Diagram odvisnosti ΔRn od števila ciklov (ΔRn je razlika med fluorescenco produkta in fluorescenco bazne linije) pri uporabi PCR v realnem času, kot ga izriše računalnik s pomočjo ustrezne programske opreme

Načine detekcije produktov PCR v grobem razdelimo na specifične in nespecifične. Za nespecifični način detekcije se uporabljajo fluorescenčna barvila, ki se nespecifično vgradijo v dvoverižno DNA, kar pomeni, da zaznamo vsako dvoverižno DNA prisotno v zmesi. Danes se za nespecifično detekcijo DNA največ uporablja SYBR Green I in njegove različice. Prost ima nezaznavno fluorescenco, vezan pa ob ekscitaciji močno

fluorescira. Količina fluorescence je torej sorazmerna s količino produkta (10). Barvilo se veže v mali žleb dvovijačne DNA, medtem ko se na enovijačno DNA ne veže. Problemi, povezani z nespecifično detekcijo produktov, so: pomnoževanje zahteva kasnejše dokazovanje specifičnosti reakcije s talilnim diagramom, daljši odseki DNA dajejo močnejši signal (kar lahko v kombinaciji z drugimi faktorji povzroči zasičenje CDC kamere), večje koncentracije barvila lahko inhibirajo reakcijo PCR (11).

Pri specifičnem načinu detekcije pa uporabljamo s fluorofori označene oligonukleotide, ki se specifično vežejo na odsek, ki ga želimo pomnožiti. Merjenje signala omogoča fluorescenčni resonančni prenos energije (ang. fluorescence resonance energy transfer-FRET). Ekscitacija donorskega barvila povzroči emisijo svetlobe, ki jo akceptorska molekula absorbira, sama pa ne fluorescira. V tem primeru imenujemo akceptorsko molekulo dušilec. Druga možnost pa je, da emitirana svetloba donorskega barvila ekscitira akceptorsko molekulo in ta oddaja svetlobo druge valovne dolžine, ki jo merimo. Za takšen prenos energije je nujno potrebno, da se emisijski spekter donorja prekriva z ekscitacijskim spektrom akceptorja. Glede na način delovanja ločimo hidrolizirajoče sonde, hibridizacijske sonde in molekularna svetila (10, 11).

Pri analizi genskega izražanja je potrebno kontrolirati razlike v začetni količini materiala in razlike v učinkovitosti reakcije reverzne transkripcije med vzorci tkiv ali celic. To je mogoče doseči z relativnim podajanjem izražanja izbranega genskega transkripta. Tega se najpogosteje podaja relativno glede na 18S rRNA, GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza) ali β -aktin. Številni avtorji odsvetujejo uporabo GAPDH, saj je njegovo izražanje lahko zvečano v delečih se celicah. Tudi uporaba 18S rRNA iz večih razlogov ni priporočljiva. Kot prvo gre za ribosomalno RNA, ki ni vedno reprezentativna za frakcijo celične mRNA. Druga pomankljivost je v tem, da na njeno izražanje vplivajo razni biološki faktorji in zdravila. Problem je tudi v njeni veliki količini ter v tem, da ni prisotna v prečiščenih mRNA vzorcih. Iz tega razloga se danes za normalizacijo uporabljajo različni hišni geni oz. kombinacije le-teh. Zanje se zahteva, da njihovo izražanje ostane konstantno pod načrtovanimi eksperimentalnimi pogoji. Morajo se izražati konstantno v različnih časovnih točkah pri isti osebi, kot tudi med različnimi osebami v tarčni celici ali tkivu. Že večkrat je bilo ugotovljeno, da lahko tudi izražanje hišnega gena v nekem tkivu variira pod določenimi pogoji. Zato je pred uporabo hišnega gena kot normalizatorja le-tega potrebno predhodno validirati. Za izbiro najboljše endogene kontrole si lahko pomagamo z različnimi algoritmi: GeNorm, NormFinder in qBasePlus (11, 12).

1.3 VLOGA KEMOKINA CXCL2 IN RASTNEGA FAKTORJA PLEIOTROPIN V TELESU

S študijami genskega izražanja med drugim odkrivamo gene, ki se različno izražajo v bolnem in zdravem tkivu. Primerjava izražanja nekega gena v npr. osteoporoznem in zdravem tkivu lahko nakaže vpletenost tega gena v razvoj bolezni. Pri razlagi pa nam lahko zelo pomagajo odkritja v zvezi z delovanjem proteina, ki ga gen kodira in poznavanje regulacije izražanja gena z drugimi regulatornimi proteini v kosteh. Kostna remodelacija je namreč kompleksen proces, reguliran s številnimi mehanizmi, ki se med seboj prepletajo. V naši študiji bomo preučevali izražanje genov *cxcl2* in *ptn* v osteoporoznem kostnem tkivu in rezultate študije poskusili utemeljiti z dosedanjimi odkritji vloge teh dveh genov in proteinov, ki jih kodirata, v telesu.

1.3.1 Kemokin CXCL2

CXCL2 je ELR+ CXC-kemokin, ki so ga prvič identificirali leta 1991 (13). Poznan je tudi pod imeni: GRO- β (ang. Growth-related oncogene beta) in MIP-2 α (ang. Macrophage inflammatory protein 2-alpha). Kemokini so majhni kemoatraktni peptidi, ki so si strukturno podobni. Glede na število aminokislin med štirimi konzervativnimi cisteinskimi ostanki jih delimo v štiri skupine: CC, CXC, CX3C in C (14). Pri CXC-kemokinih sta prvi in drugi ter tretji in četrti cistein ločena z eno aminokislino. Med prvim in tretjim ter med drugim in četrtim cisteinskim ostankom se tvorita disulfidna mostova, ki stabilizirata terciarno strukturo molekule. Nekaj CXC-kemokinov ima v svoji zgradbi neposredno pred prvim cisteinom ELR-motiv, ki pomeni zaporedje aminokislin glutamin-levcin-arginin. Glede na prisotnost tega zaporedja ločimo CXC-kemokine na ELR+ in ELR- kemokine. To aminokislinsko zaporedje omogoča vezavo kemokinov na kemokinski receptor CXCR2. Že majhne modifikacije ELR-motiva vodijo do tega, da proteini nimajo učinka ali da je učinek njihovega delovanja celo antagonističen (15).

1.3.1.1 Zgradba CXCL2

CXCL2 je homodimer sestavljen iz šestih antiparalelnih beta verig in para alfa vijačnic. Vsak monomer ima N-terminalno zanko, tri beta verige in C-terminalni alfa heliks.

Struktura celotnega proteina je torej podlaga iz šestih beta verig in na vrhu tega leži par antiparalelnih alfa heliksov. V vsakem monomeru sta po dva disulfidna mostova: Cys9-Cys35, ki povezuje N-terminalno zanko z zanko, ki povezuje prvo in drugo beta verigo in Cys11-Cys51, ki povezuje N-terminalno zanko s tretjo beta verigo (16).

Gen *cxcl2* je lociran v genomu na 4q21. Sestavljen je iz 4 eksonov, treh intronov in 3' regije, ki se ne prevaja in je iz približno 700bp, ki se končajo na poliadenilacijskem mestu. Na 3' neprevedeni regiji ima gen *cxcl2* 11 ATTTA ponovitev. Te ponovitve povezujejo z nestabilnostjo mRNA (17).

1.3.1.2 Receptorji

Kemokinski receptorji so sestavljeni iz sedmih hidrofobnih, transmembranskih domen, N-terminalnega dela na zunanji strani celice, treh ekstracelularnih in treh intracelularnih zank ter C-terminalnega dela znotraj citoplazemskega predelka. Poimenovali so jih CXCR1-CXCR7 (13).

Prenos signala preko kemokinskega receptorja poteka preko aktivacije fosfolipaz C β 1 in C β 2 z G-proteinom. To povzroči hidrolizo fosfatidilinozitol-4,5-difosfata (PIP₂) in s tem tvorbo inozitol-trifosfata (IP₃) in diacilglicerola (DAG). IP₃ in DAG povečata znotrajcelično koncentracijo kalcija in vodita do aktivacije proteinkinaze C. V nadaljevanju se sprožijo znotrajcelične signalne kaskade, ki končno vodijo do specifičnih reakcij ciljnih celic, kot so spremembe zunanje oblike, migracija ter sproščanje encimov (15).

Visoko konzervativni N-terminalni ELR (Glu6-Leu7-Arg8) in GPH (Gly32-Pro33-His34) zaporedji sta verjetno pomembni za afiniteto do receptorja in specifičnost vezave na receptor (16). Struktura iz beta verig, ki povezuje oba konca, verjetno igra vlogo v stabilizaciji CXCR in zagotavljanju, da so konci v pravi konformaciji (13).

1.3.1.3 Fiziološke funkcije

Študije izražanja razkrivajo tkivno specifično regulacijo CXCL2, kot tudi regulacijo z različnimi inducirajočimi snovmi, vključno z IL-1, TNF- α , lipopolisaharidi (LPS) in IL-17 (17, 18, 23). IL-1 in TNF- α povzročita indukcijo transkripcije MIP-2 mRNA (MIP-2 je analog človeškega CXCL2 pri glodalcih), vendar pa noben od teh dveh citokinov ni

sposoben občutno spremeniti števila celic z zaznavnim MIP-2 proteinom, kar pomeni, da sta transkripcija in translacija MIP-2 neodvisno regulirani (19). Citokini stimulirajo transkripcijo gena *cxcl2* preko mesta NF κ B (17, 18). Izražanje gena *cxcl2* preko IL-1 je regulirano s potjo, ki je odvisna od tirozinske fosforilacije. Zaporedje dogodkov po vezavi IL-1 na receptor je sledeče: stimulacija tirozin kinazne aktivnosti; aktivacija proteina NF- κ B; vezava proteina NF- κ B na NF- κ B.1 mesto v promotorski regiji gena; aktivacija transkripcije.

NF- κ B protein je v citoplazmi v obliki kompleksa z I- κ B, ki ni sposoben vezave na DNA. Preko fosforilacije podenote I- κ B, ki povzroči disociacijo te podenote iz kompleksa, se tvori aktivna oblika proteina NF- κ B, ki pa se lahko veže na DNA v jedru (20).

CXC-kemokini so vpleteni v številne fiziološke procese, kot so: migracija in sprostitvev levkocitov, vnetni procesi, angiogeneza in rast tumorjev (16). Kemokini sodelujejo pri procesih privabljanja monocitov, vključno z monocitnim zadržanjem in migracijo. CXCL2 deluje kot kemokin za adhezijo monocitov na VCAM-1 (ang. Vascular cell adhesion molecule-1) v prisotnosti P-selektina. CXCL2 ne posreduje kemotakse monocitov (14).

CXC-kemokini so tudi močni aktivatorji nevtrofilne kemotakse, spreminjanja oblike in sprostitve encimov iz granul. MIP-2 inducira selektivno, hitro in od doze odvisno akumulacijo nevtrofilcev na mestu vnetja. L- in P-selektin prispevata k akumulaciji nevtrofilcev v odgovoru na MIP-2 (21).

Sigrid P. Matzer in sodelavci so primerjali tvorbo MIP-2 v zdravih miših in v odgovoru na akutno bakterijsko infekcijo. Ugotovili so, da je MIP-2 glavni CXC-kemokin, vpleten v migracijo polimorfonuklearnih nevtrofilcev na mesto vnetja. Rezultati so pokazali konstitutivno izražanje MIP-2 mRNA v kostnem mozgu normalnih miši, ne pa v ostalih organih kot so vranica, pljuča ali jetra. Indukcija sinteze MIP-2 je bila v povezavi z resnostjo infekcije. V tej študiji so pokazali, da MIP-2 sintetizirajo nevtrofilci in da je njegovo izražanje regulirano delno med dozorevanjem kostnega mozga. MIP-2 so zaznali samo v granulocitih s površinskim markerjem Gr-1, ki se primarno izraža na zrelih granulocitih. Predlagali so model, v katerem se MIP-2 mRNA konstitutivno izraža v kostnem mozgu s subpopulacijo nevtrofilcev, ki se sprostijo v periferijo s sintetiziranim MIP-2 proteinom. Predvideva se, da MIP-2 obstaja v perifernih, Gr-1 pozitivnih granulocitih kot vnaprej shranjen kemokin (19).

Meiheng Yang in sodelavci so preučevali izražanje genov med hitro diferenciacijo osteoklastov povzročeno z injekcijami CSF-1 (ang. Colony stimulating factor 1) v CSF-1 deficitarnih podganah. Diferencirani osteoklasti so se pojavili drugi dan po stimulaciji, dosegli vrh četrty dan, potem pa so se šesti dan že nekoliko znižali, saj so imeli za pritrđitev manjšo površino kosti. Izražanje so preučevali z mikromrežami visoke gostote v obdobju 0, 2, 4 in 6 dni odkar so se prvič pojavili diferencirani osteoklasti. Osteoklaste so šteli na dveh mestih: v metafizi proksimalne golenice oz. distalne stegnenice, takoj pod spojem hrustanec-kost in pa nekoliko nižje, torej proti diafizi, vendar še vedno v metafiznem delu. Za mikromreže so od vsake živali izolirali RNA iz metafize in diafize stegnenice in golenice. Po stimulaciji osteoklastogeneze je izražanje gena *cxcl2* pričelo upadati (22).

Judit I. Pulai in sodelavci so ugotovili, da fragmentirani fibronektin, ki je komponenta poškodovanega ekstracelularnega matriksa artritčnega hrustanca, lahko s signalizacijo preko $\alpha_5\beta_1$ integrina povzroči zvišano izražanje citokinov in kemokinov, med drugim tudi gena *cxcl2* v normalnih človeških artikularnih hondrocitih gležnja. To napeljuje na domnevo, da bi bile lahko komponente poškodovanega matriksa tudi v drugih tkivih sposobne izzvati privabljanje in aktivacijo levkocitov na mesto vnetja in poškodbe. Znana je tudi indukcija IL-6, IL-8 in članov družine GRO (CXCL1-3) po stimulaciji hondrocitov z IL-1 β , TNF- α , in LPS. Poleg tega se tudi kemokinski receptorji izražajo v hondrocitih. Iz ugotovitev sledi, da obstaja potencial za številne citokinske in kemokinske avtokrine ali parakrine zanke v artikularnem hrustancu, ki so stimulirane med razvojem artritisa (23).

CXC-kemokini imajo ogromen terapevtski potencial kot agonisti in antagonisti celičnega odziva. Vsi ELR+ kemokini, vključno z GRO-kemokini kamor spada CXCL2, spodbujajo angiogenezo *in vivo*. CXCL2 je tudi hemoregulatorni kemokin, ki zelo poveča hematopoezno aktivnost. Dostopen je pod imenom Garnocestim kot imunomodulator. Uporablja se ga pred hematopoezno transplantacijo za mobilizacijo perifernih krvnih prekursorških celic in za zmanjšanje pojavljanja, trajanja ali resnosti s kemoterapijo inducirane citopenije (13).

1.3.2 Pleiotropin

1.3.2.1 Zgradba Pleiotropina

Pleiotropin je 18 kDa velik heparin-vezavni rastni faktor, ki so ga prvič izolirali iz možganov podgan (24). Poznan je tudi pod imeni: HB-GAM (ang. Heparin-binding growth-associated molecule), HARP (ang. Heparin affinity regulatory peptide), HBNF (ang. Heparin-binding neurite-promoting factor) in OSF-1 (ang. Osteoblast specific factor 1) (24). Skupaj s heparin-vezavnim midkinom tvori lastno citokinsko skupino, ki je funkcionalno sicer podobna skupini fibroblastnih rastnih faktorjev, ne pa tudi strukturno. Vsebuje velik delež bazičnih aminokislin, ki se nahajajo predvsem na N- in C-terminalnem delu. To omogoča izredno dobro vezavo na heparin in zunajcelični matriks. Dodatna posebnost pleiotropina je 10 ohranjenih cisteinskih ostankov, ki dajejo proteinu preko tvorbe disulfidnih mostov trdno strukturo in obliko (25). Sestavljen je iz dveh domen povezanih z disulfidnimi mostovi in vsaka od njiju ima svojo prostorsko zgradbo v obliki treh antiparalelnih β -verig (26).

Človeški gen za pleiotropin leži na kromosomu 7q33 in je sestavljen iz 5 eksonov in 4 intronov (27).

1.3.2.2 Receptorji

Do danes so opisali številne receptorje za pleiotropin in sicer: SYN-3 (ang. Syndecan-3), ALK (ang. Anaplastic lymphoma kinase) in RPTP ζ (ang. Protein tyrosine phosphatase receptor-type ζ) (24).

SYN receptorji so membranski receptorji. Citosolni del lahko veže kinazni kompleks, ki vsebuje kinaze c-SRC in FYN, kakor tudi c-SRC substrat kortaktin. Z vezavo pleiotropina na receptor se ta kompleks aktivira in preko regulatornega vpliva na citoskelet spremeni morfologijo in mobilnost celic (26).

Pleiotropin z receptorjem ALK (veže se na ekstracelularno domeno receptorja) igra pomembno vlogo pri normalnem razvoju živčnega sistema (25). Preko fosforilacije ALK

lahko pospešuje fosforilacijo anti-apoptičnega proteina AKT-1 (ang. Thymoma viral proto-oncogene 1) in tako npr. inducira rast nevronalnih tumorskih celic (26).

Protein-tirozin-fosfataze (PTP) defosforilirajo substrate in s tem nasprotujejo delovanju tirozinskih kinaz. Tirozinska fosforilacija znotrajceličnih substratov je eden od načinov regulacije celične proliferacije in diferenciacije. Za nekaj PTP-jev predvidevajo, da igrajo vlogo pri kostni remodelaciji, ena izmed njih je RPTP ζ , katero zavira pleiotropin. RPTP ζ se izraža v diferenciranih osteoblastih in vpliva na tvorbo kosti pri miših. S poskusi so ugotovili, da je pri RPTP ζ deficitarnih miših zmanjšan volumen trabekularnih kosti pri starosti 50 tednov, povzroči pa ga zmanjšana hitrost tvorbe kosti. Nato so ugotovili, da imajo RPTP ζ deficitarni osteoblasti zmanjšan potencial za tvorbo osteocitom podobnih celičnih podaljškov (28).

Preko zaviranja RPTP ζ vodi pleiotropin tudi k povečani tirozinski fosforilaciji β -katenina. Na ta način pleiotropin domnevno modulira WNT/ β -katenin signalno transdukcijsko pot. Preko te fosforilacije je lahko vzpostavljena tudi povezava med β -kateninom in N-kadherinom. Nastali kompleks vpliva na medcelično adhezijo in vodi preko prestrukturiranja citoskeleta verjetno do povečane celične migracije (24, 26).

Pleiotropin preko vezave na RPTP ζ regulira tudi serinsko fosforilacijo in celično distribucijo β -aducina. Fosforilacija serinov v β -aducinu zmanjša afiniteto β -aducina do spektrina in aktina in povzroči razpad kompleksov aktin/spektrin/ β -aducin potrebnih za stabilnost citoskeleta. Pleiotropin določa celično lokacijo fosforiliranega β -aducina in zveča možnost, da β -aducin funkcionira pri podpori strukture heterokromatina in centriolov med mitozo (29).

1.3.2.3 Fiziološke funkcije

Pleiotropin ima pomembno vlogo predvsem v obdobju embrionalnega razvoja. Vpleten je v številne razvojne procese. Stimulira celično delitev nevronov, rast aksonov, kakor tudi tvorbo sinaps. Pleiotropin je mitogen za fibroblaste, endotelijske in epiteljske celice (25). V zelo velikih koncentracijah se ga lahko dokaže v razvijajočem se hrustancu v obdobju prenatalnega razvoja kostnega tkiva. Nedavno je bilo predlagano, da ima pleiotropin številne vloge pri tvorbi kosti, ki so odvisne od njegove koncentracije, stopnje razvoja in interakcij z drugimi faktorji. Zelo verjetne vloge pleiotropina so: olajševanje pritrjevanja

osteoblastov, zvečanje gibljivosti kostnih celic, zvečanje proliferacije osteoblastov in tvorbe kolagena ter zaviranje BMP (ang. Bone morphogenetic protein) osteoinduktivnega učinka (30).

V postnatalnem obdobju je izražanje gena *ptn* v glavnem močno znižano, vendar pa ostajajo tkiva, v katerih se *ptn* gen tudi po rojstvu še izraža v zaznavnih količinah. V postnatalnem obdobju zaznamo pleiotropin le še v možganih in kosteh. Se pa izražanje gena *ptn* lahko zelo poviša pri določenih bolezenskih stanjih tudi v kasnejšem življenjskem obdobju (24). Nekateri študije so pokazale, da igra pleiotropin odločilno vlogo pri angiogenezi določenih tumorjev (31). Velike količine pleiotropina so zaznali tudi v novo nastali kosti med celjenjem zloma (32).

Izražanje gena *ptn* je torej regulirano časovno in glede na celični tip. Verjetno je regulirano preko večih faktorjev. Edini znani citokin, ki zviša izražanje gena *ptn*, je trombocitni rastni dejavnik (PDGF). Tvorijo ga monociti, trombociti, limfociti ali fibroblasti in bi lahko induciral izražanje gena *ptn* v različnih celičnih tipih (32). Za TGF- β (ang. transforming growth factor-beta) pa je znano, da zavira transkripcijo gena *ptn* v kultiviranih mišjih osteoblastih (33).

Vpliv pleiotropina na rast in razvoj kosti so opisale številne študije, katerih rezultati pa si včasih nasprotujejo. Veliko raziskovalcev se je ukvarjalo predvsem z vplivom prekomernega izražanja gena *ptn* na kosti. Hashimoto-Gotoh in sodelavci so primerjali porast kostne mase pri transgenih miših s prekomernim izražanjem gena *ptn* in sicer pri samcih in pri samicah. Ugotovili so, da se porast zgodi samo pri samicah, če ga ocenjujemo po treh kriterijih: MKG, hitrost tvorbe kosti in vsebnost mineralov v kosteh (34).

S prekomernim izražanjem gena *ptn* so se ukvarjali tudi Li in sodelavci. Ugotavljali so vpliv prekomernega izražanja na razvoj dolgih kosti in na celjenje zlomov pri miših. Omenjeni avtorji so ugotovili, da prekomerno izražanje gena *ptn* dolgoročno povzroči hitrejšo rast kosti v dolžino, zvečano tvorbo in hitrejše dozorevanje kosti. Poleg tega so ugotovili zvečano mineralno gostoto in zvečano krhkost kosti v poznem življenjskem obdobju živali, ko je kost že tako bolj občutljiva za zlome. Ugotovili so tudi, da pleiotropin, prisoten v velikih količinah že pred zlomom, lahko zadrži indukcijo tvorbe kosti z BMP-2 (ang. Bone morphogenetic protein 2), kar vodi v upočasnjeno celjenje zloma (30).

Rahul S. Tare in sodelavci so preverjali učinke tarčnega prekomernega izražanja gena *ptn* na razvoj kosti po rojstvu. Želeli so ugotoviti, kako po eni strani inhibicija osteoindukcije, po drugi strani pa stimulacija osteogene diferenciacije vplivata na razvoj kosti v celoti. Ugotovili so večjo vsebnost kalcija pri transgenih miših, predvsem pri samcih. Celokupna hitrost rasti kosti je bila manjša pri transgenih miših in rast kosti se je nadaljevala dlje časa. Kljub temu je bila končna dolžina kosti transgenih miši manjša ali podobna kontrolam. Avtorji so zaključili, da so fiziološke koncentracije pleiotropina tiste, ki so optimalne za razvoj kosti, saj omogočajo ravnovesje med inhibitorynimi in stimulatorynimi učinki. Manjša hitrost rasti transgenov v fazi najhitrejše rasti kosti bi po mnenju avtorjev bila lahko posledica zaviranja osteoindukcije, ki ni bila uravnotežena s stimulacijo osteodiferenciacije, ker je bil nivo pleiotropina nad fiziološkim optimumom. Iz tega se ponuja možnost terapevtske uporabe pleiotropina pri stanjih, kjer je izražanje gena *ptn* pod fiziološkim optimumom (31).

Lehmann in sodelavci so ugotavljali, ali bo imelo pomanjkanje pleiotropina negativni učinek na tvorbo kostnega tkiva, glede na to, da zvišano izražanje gena *ptn* pospeši tvorbo kosti. Ugotovili so, da pomanjkanje pleiotropina ne vpliva na tvorbo kosti *in vivo*.

V študiji s *ptn*-gen deficitarnimi mišmi so omenjeni raziskovalci ugotovili, da imajo le-te normalni skeletni razvoj in ne izkazujejo nobenih defektov v diferenciaciji ali funkciji celičnih tipov, ki sodelujejo v endohondralni osifikaciji ali kostni remodelaciji. Avtorji niso ugotovili značilne razlike v MKG, razlike v velikosti ali obliki skeleta, razlike v debelini kortikalne kosti, razlike v hitrosti tvorbe kosti in razlike v trabekularni kostni remodelaciji med *ptn*-gen deficitarnimi mišmi in mišmi z normalnim genotipom (35).

S poskusi na transgenih miših se je med drugim tudi pokazalo, da je izguba kostne mase kot posledica pomanjkanja estrogena lahko kompenzirana s prekomernim izražanjem gena *ptn* (33). Masuda in sodelavci so ugotovili, da je bila kostna masa miši s prekomerno ekspresijo gena *ptn* po ovariektomiji primerljiva s kostno maso miši z normalnim genotipom. Omenjeni avtorji so tudi zaključili, da bi bil pleiotropin lahko ena od determinant kostne mase, ki kontrolirajo tvorbo kosti na mestih kostne remodelacije skozi aktivacijo osteoblastov in ne preko zaviranja osteoklastov (33).

Nekateri avtorji so se ukvarjali tudi z vprašanjem, ali pleiotropin sodeluje pri procesu celjenja zlomov kosti. Petersen in sodelavci so v študiji na podganah ugotovili, da se nivo angiogenega peptida pleiotropina poveča pri celjenju zlomov kosti. V omenjeni študiji so avtorji izbrali pleiotropin za potencialnega kandidata za angiogeni peptid in določali

njegovo prisotnost v modelu zloma na nivoju proteinov in mRNA. Ugotovili so visok nivo pleiotropina v novo tvorjeni kosti pri celjenju zloma. Pleiotropin so zaznali v osteoblastih in fibroblastih v okolici novonastalih krvnih žil, v endotelijskih celicah in hondrocitih, ki so bili v neposredni bližini novo tvorjene kosti (32).

2 NAMEN DELA

Na Fakulteti za farmacijo v Laboratoriju za klinično biokemijo so z vsegenomsko analizo s pomočjo mikromrež ugotovili različno izražanje nekaterih genov v osteoblastih izoliranih iz osteoporoznega in zdravega kostnega tkiva. Za gen *ptn* so ugotovili 4,1 krat nižje izražanje v osteoblastih izoliranih iz osteoporoznega tkiva, za gen *cxcl2* pa 3,2 krat nižje izražanje v osteoblastih izoliranih iz zdravega tkiva.

Glede na priporočila, da je rezultate mikromrež potrebno potrditi še s kvantitativno metodo izražanja genov, smo se odločili, da omenjene izsledke potrdimo z metodo PCR v realnem času. V ta namen bomo najprej iz vzorca kostnega tkiva izolirali celokupno RNA in jo s postopkom reverzne transkripcije prepisali v komplementarno DNA. To bomo uporabili kot standard, s pomočjo katerega bomo izdelali standardne premice za gene *cxcl2*, *ptn* in hišne gene, ki jih bomo uporabili za normalizacijo. Hišne gene bomo izbrali iz kompleta dvanajstih genov na podlagi analize s programi GeNorm in Normfinder ter nekaterih postopkov po lastnem izboru.

S pomočjo standardnih premic bomo nato izračunali količine mRNA genov v vseh vzorcih. Količine mRNA genov *cxcl2* in *ptn* bomo podali relativno glede na povprečje količin izbranih hišnih genov. S statistično analizo bomo skušali ugotoviti, ali se gena *ptn* in *cxcl2* različno izražata v osteoporoznem in neosteoporoznem kostnem tkivu. Primerjali bomo tudi izražanje teh dveh genov med osteoporoznim in zdravim tkivom ter med tkivom bolnikov z zlomom vratu stegenice in tistih, ki zloma niso utrpeli. Z metodo korelacije bomo ugotavljali povezanost med izražanjem izbranih genov in MKG oz T-vrednostjo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

Študijo smo izvedli na 71-ih vzorcih kostnega tkiva bolnikov, ki so bili operirani v SB Celje zaradi osteoartritisa ali zloma vratu stegenice.

Bolnikom je bila izmerjena mineralna kostna gostota z metodo DXA (Hologic QDR 1000). Merili so jo na vratu stegenice, celotnem kolku in ledvenih vretencih (L1-L4). Merjenje MKG so bolnikom z osteoartritisom izvedli preoperativno, bolnikom z zlomom vratu stegenice pa takoj po operaciji. Diagnoza osteoartritisa je bila postavljena na podlagi kliničnih in radiografskih kriterijev glede na Harris hip score.

Normalnih kontrol nismo mogli vključiti v študijo zaradi nedostopnosti kostnih biopsij zdravega tkiva.

Študijo je odobrila etična komisija in od vseh udeležencev v študiji smo dobili informativni pristanek.

3.2 PRIPRAVA VZORCEV

3.2.1 Odvzem vzorcev

S kirurškim postopkom so v bolnišnici izvedli femoralno osteotomijo, pri kateri so odstranili glavo in vrat stegenice. Trabekularno kostno tkivo so odvzeli iz vratu in proksimalnega dela stegenice. Vzorce kosti so nemudoma zamrznili v tekočem dušiku in jih hranili pri -80 °C do izolacije RNA. Izolacijo RNA in sintezo komplementarne DNA so izvedli v Laboratoriju za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

3.2.2 Izolacija RNA

Zamrznjene biopte (povprečna masa tkiva je znašala 0,2 g/vzorec) so zdrobili v tekočem dušiku in izolirali celokupno RNA z uporabo reagenta Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA) po navodilih proizvajalca. Pelete s celokupno RNA so raztopili v vodi brez RNaz. Za kvantifikacijo in oceno čistosti izolata so merili absorbanco pri 260 in 280 nm, velikost in integriteto RNA pa so določili z agarozno gelsko elektroforezo.

3.2.3 Sinteza cDNA

Za pripravo komplementarne DNA (cDNA) so uporabili 10 ng celokupne RNA. Reakcijo so izvedli z uporabo reagenčnega kompleta High capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) po navodilih proizvajalca. cDNA so hranili pri temperaturi -20 °C do procesiranja vzorcev.

3.3 PRIPRAVA HUMANEGA STANDARDA

Za pripravo standarda smo uporabili vzorec humanega kostnega tkiva. Iz vzorca smo izolirali celokupno RNA, iz izolata pa s postopkom reverzne transkripcije sintetizirali cDNA.

3.3.1 Izolacija RNA

V digestoriju smo najprej ves potreben pribor (pincete, lancete, pestila, terilnice in spatule), ki smo ga predhodno avtoklavirali, ohladili s tekočim dušikom. Namen hlajenja s tekočim dušikom je inhibirati prisotne RNaze. Vse delovne površine smo pred tem dobro očistili s čistilom RNaze free. Vzorci kosti so bili shranjeni v RNA later® RNA Stabilization Reagent-u in tekočem dušiku. V terilnici smo jih v tekočem dušiku zdrobili in zbrali v plastične epruvete (masa vzorca je znašala 200 - 350 mg/epruveto) z 1 mL reagenta QIAzol. Vsak vzorec smo po dodatku reagenta homogenizirali z ultrazvočnim homogenizatorjem. Homogenizirane vzorce smo inkubirali pri sobni temperaturi 5 minut. Po inkubaciji smo vsakemu vzorcu dodali 200 µL kloroforma, intenzivno stresali 15 sekund in nato zmes inkubirali pri sobni temperaturi 2 minuti. Nato smo vzorce postavili na led in jih prenesli v namensko čisto komoro. Od tu dalje smo postopali po navodilih proizvajalca. Za izolacijo RNA smo uporabili RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemčija) (36). Kolono smo na koncu sprali dvakrat s po 30µL vode brez RNaz in centrifugirali eno minuto pri 10000 rpm. S postopkom izolacije, ki smo ga opisali, ter uporabo omenjenega kompleta za izolacijo, smo izolirali molekule RNA daljše od 200 nukleotidov.

Izolirano RNA smo nato shranili pri -20 °C v vodi brez RNaz.

3.3.1.1 Določanje koncentracije in integritete RNA

Koncentracijo in čistost RNA smo določili z napravo Nanodrop® spectrophotometer 1000. Izbrani spektrofotometer meri absorbanco vzorca pri treh valovnih dolžinah: 260 nm, 280 nm in 230 nm. Na podlagi izpisanih razmerij absorbanca A260/A280 in A260/A230 smo nato ocenili čistost vzorca (37). Integriteto RNA smo preverili z napravo Agilent 2100 bioanalyzer. Naprava izvede kapilarno elektroforezo na mikročipu in nam izpiše parameter integritete RNA, RIN (ang. RNA integrity number).

Materiali in oprema:

- polavtomatske pipete: 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL
- avtoklavirani nastavki za pipete
- pincete, lancete, spatule
- terilnica, pestilo
- plastično stojalo za epruvete
- zaščitne rokavice za prelivanje tekočega dušika
- bombažne rokavice za zaščito pred podhladitvijo
- rokavice iz lateksa (Kimberly Clark, brez smukca)
- mikrocentrifugirke (Eppendorf): 2 mL
- kolone za separacijo: RNeasy Mini Spin (vključene v RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemčija))
- zbiralne tubice: 1,5 mL, 2 mL (vključene v RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemčija))
- naprava za izvedbo kapilarne elektroforeze: Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent technologies, Palo Alto, CA, ZDA)
- mikročip Labchip 7500 (Caliper Technologies, Mountain View, CA, ZDA)
- centrifuga Eppendorf 5415R
- vibracijski stresalnik Combi-Spin (BIOSAN)
- spektrofotometer: Nanodrop® spectrophotometer 1000
- ultrazvočni homogenizator: Ultrasonic homogenizator 4710 (Series)
- tehnica Europe 60 (Gibertini)

Reagenti in kemikalije:

-čistilo RNaze free (GENE CHOICE)

-tekoči dušik

-kloroform

-etanol (70 % in 96 - 100 %)

-reagenčni komplet RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN): sestavo kompleta predstavlja preglednica I.

Preglednica I: Reagenti vključeni v reagenčni komplet RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (36)

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN)	QIAzol Lysis Reagent (50 mL)
	pufer RW1 (45 mL)
	pufer RPE, koncentrat (11 mL)
	voda brez RNaz (10 mL)

3.3.2 Reverzna transkripcija

Združili smo vse alikvote RNA izolirane iz vzorca za standard in izračunali povprečno koncentracijo celokupne RNA v zmesi. Nato smo izračunali volumen vzorca, ki je ustrezal 5 µg RNA. Toliko znaša maksimalna količina RNA, ki jo lahko uporabimo za eno reakcijo reverzne transkripcije. Za sintezo cDNA smo uporabili SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA). Postopek smo izvedli po navodilih proizvajalca (38). Za začetnike smo uporabili naključne heksamere, ki se vežejo na vse RNA molekule, vključno z ribosomalnimi. Reverzno transkripcijo smo izvedli s cikličnim termostatom Biometra®. Program, ki smo ga nastavili, je vključeval tri korake: 10 minut na 25 °C - prileganje začetnikov, 50 minut na 50 °C - podaljševanje verige in 5 minut na 85 °C - uničenje encimov. Na koncu smo dodali še RNazo H in inkubirali 20 minut na 37 °C, da se razgradi RNA v zmesi.

Materiali in oprema:

-avtoklavirane plastične epruvete (Sarstedt): 0,5 mL

-polavtomatske pipete: 0,1 - 2,5 µL, 2 - 20 µL, 20 - 200 µL

-avtoklavirani nastavki za pipete

-rokavice iz lateksa (Kimberly Clark, brez smukca)

- komora za delo z RNA (Biosan)
- ciklični termostat Biometra® (Personal cycler)
- centrifuga Eppendorf 5415R
- avtoklav A-21, pogoji uporabe (program steklo): nadtlak 0,22 MPa, 134 °C, 10 minut (Kambič Laboratorijska oprema)

Reagenti in kemikalije:

-komplet za sintezo cDNA: SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (38); sestavine kompleta so opisane v preglednici II.

Preglednica II: Sestavine kompleta SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (38)

SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR	0.1 M DTT (ditiotreititol)
	10 mM zmes dNTP (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
	SuperScript™ II RT (50 U/μL)
	RNaseOUT™ rekombinantni inhibitor ribonukleaz (40 U/μL)
	<i>E. coli</i> RNaza H (2 U/μL)
	10X RT pufer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]
	25 mM MgCl ₂
	DEPC tretirana voda
	naključni heksameri (50 ng/μL)

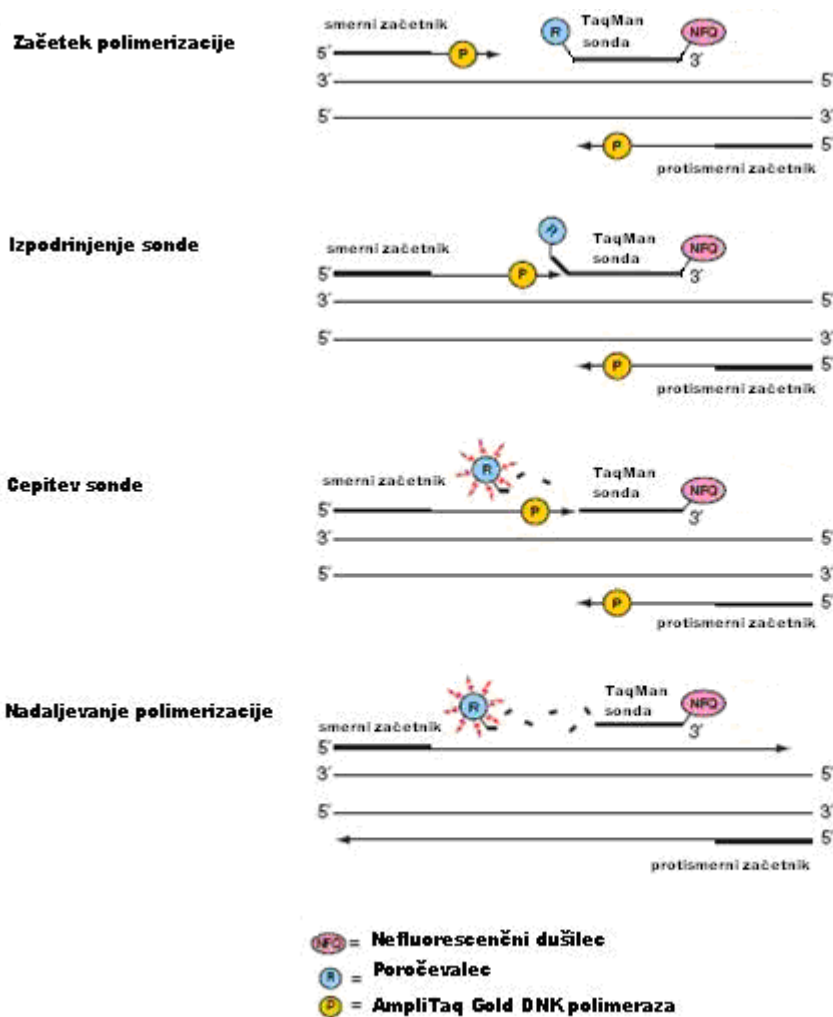
S postopkom reverzne transkripcije in sledečim redčenjem smo izdelali humani standard s končno koncentracijo 20 ng/μL.

3.4 PCR V REALNEM ČASU

3.4.1 PCR v realnem času z uporabo Taqman® sonde in SYBR GreenER

Pri delu smo za detekcijo pomnožene cDNA gena *cxc12* uporabili hidrolizirajočo sondo TaqMan®. To je 18 - 20 bp dolg oligonukleotid, ki ima na 5' koncu vezano poročevalsko barvilo (v našem primeru 6FAM™), na 3' koncu pa nefluorescenčni dušilec (ang. nonfluorescent quencher, NFQ). Hidrolizirajoča sonda izkorišča 5'-3'eksonukleazno

aktivnost DNA polimeraze, ki se uporablja za pomnoževanje nukleinskih kislin. V stopnji podaljševanja verige encim DNA polimeraza zaradi svoje eksonukleazne aktivnosti cepi sondo na 5' koncu, kar vodi v ločitev poročevalskega barvila od dušilca. Posledica cepitve sonde je porast fluorescence poročevalskega barvila. Akumulacijo produkta zaznamo torej direktno z merjenjem porasta fluorescence poročevalca v vsakem ciklu (39).



Slika 3: Princip metode TaqMan® (39)

Za detekcijo pomnožene cDNA gena za pleiotropin in izbranih hišnih genov *ppia* in *rplp* smo uporabili nespecifični način detekcije z barvilom SYBR® GreenER™. To barvilo daje v primerjavi s SYBR® Green barvilom močnejši signal in značilno zmanjša inhibicijo reakcije PCR (40).

3.4.2 Pogoji pomnoževanja

Glede na to, da je metoda PCR izredno občutljiva in da količina produkta v vsakem ciklu eksponentno naraste, je potrebno čimbolj zmanjšati možnost kontaminacije. Molekule DNA so namreč lahko prisotne na koži, delovnih površinah in laboratorijskem priboru. Zato poteka delo v namenski čisti komori. Pred pričetkom dela najprej vse notranje površine delovne komore, kot tudi aparature (stresalnik s centrifugo) in pribor (pipete, stojala, nosilce nastavkov za pipete) očistimo s 3 % raztopino hipoklorita. Nato vse omenjeno izpostavimo UV svetlobi za 15 minut.

3.4.2.1 Nastavitev temperaturnega programa

Reakcija PCR običajno poteka v treh stopnjah: segrevanje na 94 - 95 °C, s čimer razklenemo verigi DNA, ohlajanje na 40 - 60 °C, pri čemer pride do prileganja oligonukleotidnih začetnikov na enoverižne DNA in zopet segrevanje na 72 °C, ki je optimalna temperatura za delovanje termostabilne DNA polimeraze. Encim se veže na oligonukleotidni začetnik in v smeri od 5' konca proti 3' koncu sintetizira komplementarno verigo DNA (10).

Mi smo temperaturi prileganja začetnikov ter podaljševanja verige pri obeh načinih detekcije združili v eno stopnjo, ki je potekala pri 60 °C. Temperaturna programa, ki smo ju nastavili, opisujeta preglednici III in IV.

Preglednica III: Temperaturni program za detekcijo s Taqman® sondo

TEMPERATURA (°C)	ČAS	PROCES	
50	2 min	aktivacija encima uracil-DNA glikozilaze (UDG)	
95	10 min	inaktivacija UDG, aktivacija AmpliTaq Gold® DNA polimeraze	
95	15 s	denaturacija DNA	40 ciklov
60	1 min	prileganje začetnikov in sond, izgradnja komplementarne verige	

Preglednica IV: Temperaturni program za detekcijo s SYBR® GreenER™

TEMPERATURA (°C)	ČAS	PROCES	
50	2 min	aktivacija encima uracil-DNA glikozilaze (UDG)	
95	10 min	inaktivacija UDG, aktivacija AmpliTaq Gold® DNA polimeraze	
95	15 s	denaturacija DNA	40 ciklov
60	1 min	prileganje začetnikov, izgradnja komplementarne verige	
60 - 95	20 min	disociacija	

Med dvajsetminutnim segrevanjem od 60 °C na 95 °C aparat izriše talilni diagram, na podlagi katerega analiziramo specifičnost reakcije.

Encim uracil-DNA glikozilaza (UDG) hidrolizira uracil-glikozidne vezi v eno in dvovijačnih DNA, ki vsebujejo deoksiuridin. Pri tem nastanejo v DNA nepirimidinska mesta, ki blokirajo pomnoževanje z DNA polimerazami in tako je preprečen prenos DNA molekul med reakcijami (39).

AmpliTaq Gold® DNA polimeraza je kemično modificirana AmpliTaq® DNA polimeraza, ki nima encimske aktivnosti pri sobni temperaturi. Termalni inkubacijski korak, ki je potreben za aktivacijo encima, zagotovi, da je encim aktiven samo pri temperaturah, pri katerih je DNA v celoti denaturirana (39).

3.4.2.2 Sestava reakcijskih zmesi

S pomočjo vnaprej pripravljenih mešanic smo v vsako vdolbinico na mikrotitrski plošči vnesli po 25 µL reakcijske zmesi. Vse reakcije smo izvedli v dvojniku. Reagente za izvedbo reakcije z obema načinoma detekcije predstavljata preglednici V in VII.

Preglednica V: Sestava reagenčnih kompletov za pomnoževanje gena *cxcl2* (39, 41)

TaqMan Gene Expression Master Mix	AmpliTaq Gold® DNA polimeraza
	uracil-DNA glikozilaza (UDG)
	dNTP-ji z dUTP
	pasivno referenčno barvilo ROX™
	optimiziran reakcijski pufer
TaqMan gene expression Assay:	TaqMan® sonda (poročevalec 6FAM™, NFQ)
	oligonukleotidni začetniki (smerni in protismerni)

V vsako reakcijo smo odmerili po 12,5 µL TaqMan Gene Expression Master Mix-a, 1,25 µL TaqMan gene expression Assay-a, 2 µL raztopine vzorčne cDNA in 9,25 µL ultra čiste vode. Reakcijske zmesi za standarde so opisane v preglednici VI.

Preglednica VI: Reakcijske zmesi za standarde za pomnoževanje gena *cxcl2*

Količina standarda (ng)	Volumen standardne cDNA (µL)	Volumen vode (µL)	Volumen TaqMan Gene Expression Master Mix-a (µL)	Volumen TaqMan Gene Expression Assay-a (µL)	Skupni volumen (µL)
200	10	1,25	12,5	1,25	25
100	5	6,25	12,5	1,25	25
50	2,5	8,75	12,5	1,25	25
20	1	10,25	12,5	1,25	25
10	0,5	10,75	12,5	1,25	25

Preglednica VII: Sestava reagenčnega kompleta za pomnoževanje genov *ptn*, *ppia* in *rplp* (40)

SYBR GreenER™ qPCR SuperMix	Hot-start Taq DNA polimeraza
	SYBR GreenER™
	pasivno referenčno barvilo ROX™ (1µM)
	MgCl ₂
	dNTP-ji (dUTP namesto dTTP)
	uracil-DNA glikozilaza (UDG)
	stabilizatorji

V vsako reakcijo smo dodali po 12,5 μL SYBR GreenER™ qPCR SuperMix-a, po 1 μL smernih in protismernih začetnikov za gen *ptn*, 2 μL vzorčne raztopine cDNA in 8,5 μL ultra čiste vode.

Reakcijska zmes za hišna gena *ppia* in *rplp* je bila sestavljena iz 12,5 μL SYBR GreenER™ qPCR SuperMix-a, 1 μL oligonukleotidnih začetnikov (raztopina je vsebovala smerne in protismerne začetnike), 2 μL raztopine cDNA in 7,5 μL ultra čiste vode. Reakcijske zmesi za standarde opisujeta preglednici VIII in IX.

Preglednica VIII: Reakcijske zmesi za standarde za gen *ptn*

Količina standarda (ng)	Volumen standardne cDNA (μL)	Volumen vode (μL)	Volumen SYBR GreenER™ qPCR SuperMix- a (μL)	Volumen oligonukleotidnih začetnikov (μL)	Skupni volumen (μL)
100	5	5,5	12,5	2	25
50	2.5	8	12,5	2	25
20	1	9,5	12,5	2	25
10	0.5	10	12,5	2	25

Preglednica IX: Reakcijske zmesi za standarde za hišna gena *ppia* in *rplp*

Količina standarda (ng)	Volumen standardne cDNA (μL)	Volumen vode (μL)	Volumen SYBR GreenER™ qPCR SuperMix- a (μL)	Volumen oligonukleotidnih začetnikov (μL)	Skupni volumen (μL)
100	5	6,5	12,5	1	25
50	2,5	9	12,5	1	25
20	1	10,5	12,5	1	25
10	0,5	11	12,5	1	25

Vzorci in reagenti smo pred uporabo dobro premešali. V plastičnih epruvetah smo si najprej pripravili mešanice s katerimi smo si olajšali delo, hkrati pa zmanjšali nihanja v volumnih dodanih komponent, ki bi nastala, če bi vsako komponento pipetirali posebej. Volumen vsake komponente v mešanici je bil enak volumnu te komponente za eno reakcijo pomnožen s številom reakcij na plošči, poleg tega pa smo dodali še prebitek komponente za eno reakcijo zaradi izgub pri pipetiranju.

Ploščo smo po nanosu vzorcev pokrili s plastično folijo, odstranili mehurčke in centrifugirali 2 minuti pri 1900 rpm. Vzorce smo pomnoževali z napravo ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems). S pomočjo programske opreme (SDS, ABI PRISM 7000, Applied biosystems, ZDA) nam računalnik izriše diagrame odvisnosti ΔR_n od števila ciklov. ΔR_n je razlika med fluorescenco produkta in fluorescenco bazne linije (39).

Aparature in pribor:

- polavtomatske pipete: 0,1 - 2,5 μ L, 2 - 20 μ L, 20 - 200 μ L, 100 - 1000 μ L (Eppendorf)
- avtoklavirani nastavki za pipete: 10 μ L, 200 μ L
- plastične epruvete: 0,5 mL, 1 mL
- zaščitne rokavice iz lateksa (Kimbery-Clark, brez smukca)
- centrifuga Centric 322 A (Tehtnica, Železniki)
- vibracijski stresalnik Combi-Spin (BIOSAN)
- mikrotitrne plošče ABI Prism™ 96-Well Optical Reaction Plate (Applied Biosystems)
- ciklični termostat ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems)
- avtoklav A-21, pogoji uporabe (program plastika): nadtlak 0,11 MPa, 121 °C, 20 minut (Kambič Laboratorijska oprema)

3.5 IZBOR HIŠNIH GENOV

S pomočjo metode PCR v realnem času smo določali izražanje dvanajstih kandidatnih hišnih genov v sedmih reprezentativnih vzorcih z ekstremnimi T-vrednostmi. Uporabili smo vzorce žensk, ki so bile operirane zaradi osteoartritisa. Bolnicam so v bolnišnici z ultrazvočno metodo izmerili MKG petnice, na podlagi katere smo vzorce označili kot bolne ali kontrole. Biopti so bili odvzeti med operacijo iz vratu stegenice in takoj zamrznjeni v tekočem dušiku, kjer so bili shranjeni do izolacije RNA. Izolacijo RNA in reverzno transkripcijo so izvedli v Laboratoriju za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo. Zamrznjene biopte so zdrobili v tekočem dušiku in izolirali celokupno RNA z uporabo reagenčnega kompleta RNeasy Lipid Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Nemčija). Za pripravo cDNA so uporabili 1,5 μ g celokupne RNA.

Pri delu smo uporabili komplet Human Endogenous Control Gene Panel (TATAA biocenter, CA, ZDA). Komplet vsebuje sete oligonukleotidnih začetnikov za najpogosteje

uporabljane hišne gene za normalizacijo. Seznam genov v setu prikazuje preglednica X. Komplet vsebuje poleg oligonukleotidnih začetnikov za vse gene še GenEx light programsko opremo, ki vsebuje programa NormFinder in GeNorm za izbor optimalnih hišnih genov (42). Seti so validirani za uporabo mešanic za qPCR, ki vsebujejo barvilo SYBR Green I.

Preglednica X: Seznam genov, za katere oligonukleotidni začetniki so vsebovani v kompletu Human Endogenous Control Gene Panel in njihova polna imena (42)

<i>Gen</i>	<i>Polno ime</i>
<i>gapdh</i>	gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (ang. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
<i>tubb</i>	beta tubulin (ang. Beta tubulin)
<i>ppia</i>	ciklofilin A (ang. Peptidylprolyl isomerase A)
<i>actb</i>	beta aktin (ang. Beta actin)
<i>ywhaz</i>	tirozin-3/triptofan-5-monooksigenazo aktivirajoči protein, zeta polipeptid (ang. Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide)
<i>18s rrna</i>	18S ribosomalna RNA (ang. 18S ribosomal RNA)
<i>b2m</i>	beta-2-mikroglobulin
<i>ubc</i>	ubikvitin C
<i>tbp</i>	TATA-vezavni protein (ang. TATA box-binding protein)
<i>pplp</i>	60S kisli ribosomalni protein P0 (ang. Large ribosomal protein P0)
<i>gusb</i>	beta-glukuronidaza (ang. Beta glucuronidase)
<i>hprt1</i>	Hipoksantin/gvanin-fosforiboziltransferaza 1 (ang. Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1)

3.5.1 Pogoji pomnoževanja

Reakcijo PCR smo izvedli z uporabo reagenčne zmesi SYBR GreenER™ qPCR SuperMix. Sestavo zmesi opisuje preglednica VII (poglavje 3.4.2.2). V vsako reakcijo smo dodali 12,5 µL reagenčne zmesi, 1 µL oligonukleotidnih začetnikov (raztopina je vsebovala smerne in protismerne začetnike), 0,8 µL cDNA in 10,7 µL ultra čiste vode. Vse reakcije smo izvedli v enojniku. Pri delu smo si pomagali z vnaprej pripravljenimi mešanicami komponent reakcijske zmesi. Temperaturni program za izvedbo reakcije prikazuje preglednica XI.

Preglednica XI: Temperaturni program za pomnoževanje hišnih genov

TEMPERATURA (°C)	ČAS	PROCES	
50	2 min	aktivacija encima uracil-DNA glikozilaze (UDG)	
95	10 min	inaktivacija UDG, aktivacija AmpliTaq Gold® DNA polimeraze	
95	15 s	denaturacija DNA	40 ciklov
60	1 min	prileganje začetnikov, izgradnja komplementarne verige	

3.5.2 Metode za izbor hišnih genov

Izmed dvanajstih kandidatnih hišnih genov smo nato na podlagi izračunov izbrali za normalizacijo tista dva, pri katerih je bilo izražanje med vzorci najbolj stabilno. Uporabili smo različne pristope za izbor najboljših hišnih genov in sicer:

3.5.2.1 Razlike Ct vrednosti za pare kontrola-bolnik

Izračunali smo razlike Ct vrednosti za vse pare kontrola-bolnik ter povprečje in standardni odklon razlik za vsak gen. Nato smo rangirali povprečja in standardne odklone in za vsak gen podali vsoto rangov. V zadnji stopnji smo rangirali še vsoto rangov.

3.5.2.2 Metoda absolutne deviacije od mediane (MAD)

Metoda je izpeljana iz normalizacije mikromrež (43). Razlikam Ct vrednosti za pare kontrola-bolnik smo odšteli mediano razlik parov za vsak gen. Nato smo izračunali absolutne vrednosti teh razlik in mediano absolutnih vrednosti. Mediane absolutnih vrednosti smo nato rangirali. Najmanjša vrednost mediane je pomenila najboljši gen.

3.5.2.3 Normfinder

Program Normfinder temelji na matematičnem modelu, ki omogoča ugotavljanje celokupne variacije kandidatnih genov za normalizacijo, kot tudi variacije med podskupinami vzorcev (npr. bolni in zdravi) v setu. Izračuna stabilnostno mero za vsak

gen, ki je direktna mera za preiskovano variacijo izražanja, kar nam omogoči oceno sistematične napake, ki bi nastala ob uporabi tega gena (44).

3.5.2.4 *GeNorm*

GeNorm je program, ki nam za vsak gen izračuna mero stabilnosti M . Nižja je vrednost M , bolj je stabilno izražanje gena. S postopnim izločanjem gena z najmanjšo stabilnostjo se izbor genov postopoma zoži na dva najstabilnejša gena (12).

3.5.2.5 *Normalizacija relativne količine mRNA enega gena na povprečje relativnih količin mRNA ostalih genov v vzorcu*

Uporabili smo relativne količine mRNA za posamezne vzorce za vsak gen, ki smo jih izračunali po enačbi (45):

$$\text{relativna količina} = 2^{(Ct_{\min} - Ct_{vz})} \quad \dots(1)$$

Ct_{\min} predstavlja najmanjši Ct gena in s tem največjo količino mRNA tega gena med vsemi vzorci, Ct_{vz} pa se nanaša na Ct vrednost gena v določenem vzorcu.

Obravnavali smo vsak vzorec posebej. En gen nam je služil kot gen, ki ga določamo (GOI, ang. gene of interest), povprečje količin mRNA ostalih genov za ta vzorec pa kot hišni gen. Izračunali smo razmerja GOI/povprečje količin mRNA ostalih genov. Nato smo izračunali relativni standardni odklon (RSD) razmerij za vsak gen in ga rangirali. Najmanjši RSD je pomenil najboljši gen za normalizacijo.

3.5.2.6 *Razlike relativnih količin mRNA*

Izračunali smo razlike relativnih količin mRNA za pare kontrola-bolnik. Nato smo izračunali SD razlik in povprečje absolutnih razlik. Rangirali smo povprečja in SD. Sešteli smo range za SD in povprečje za vsak gen ter rangirali vsoto rangov.

3.6 METODA STANDARDNE PREMICE

Metoda standardne premice zahteva izdelavo standardnih premic za preiskovani gen, kot tudi za hišne gene, ki jih uporabimo za normalizacijo. Kot standard lahko uporabimo katerikoli vzorec, pomembno je le, da izraža tako preiskovani gen kot tudi vse izbrane hišne gene (46). V našem primeru smo za standard uporabili celokupno RNA izolirano iz humanega kostnega tkiva. Iz izolata smo s postopkom reverzne transkripcije sintetizirali cDNA. Standardne premice smo izdelali na podlagi štirih ali petih različnih koncentracij standardne cDNA. Vse reakcije smo izvedli v dvojniku. Po končanem eksperimentu smo podatke prenesli v Microsoft Excell-ovo datoteko, kjer smo jih nadalje obdelali. Z izbiro opcije »chart« smo narisali graf, ki je ponazarjal odvisnost vrednosti Ct standarda od desetiškega logaritma vrednosti količine standardne cDNA. Nato smo z izbiro opcije »add trendline-linear« izvedli prilaganje podatkov premici. Program nam je nato izpisal enačbo premice in Pearsonov koeficient korelacije. Na podlagi dobljenih podatkov smo preverili učinkovitost reakcije PCR (E) po enačbi (46):

$$E = 10^{\frac{-1}{k}} - 1 \quad \dots(2)$$

kjer k predstavlja naklon standardne premice.

Zaželjeno je, da se čimbolj približamo 100 % učinkovitosti, kar pomeni, da se količina produkta v vsakem ciklu natančno podvoji. V primeru 100 % učinkovitosti bi znašal naklon standardne premice -3,3219. Dogovorili smo se, da bodo ustrezne premice tiste, katerih naklon bo med -3,1 in -3,6, kar predstavlja 90 - 110 % učinkovitost reakcije (11). Vrednosti Ct za vzorce, ki jih nismo delali na isti plošči kot standarde, katerih krivuljo smo uporabili, smo morali zato prirediti. V ta namen smo na vsako ploščo nanesti vzorec 75 in nato vrednosti ostalih vzorcev korigirali za razliko Ct vzorca 75 na plošči, na kateri je bila standardna premica, in plošči, na kateri je bil iskani vzorec. Količine mRNA vseh preiskovanih genov v vzorcih smo izračunali po enačbi (46):

$$vzorec(ng) = 10^{\left(\frac{C_{T,vzorec} - n}{k}\right)} \quad \dots(3)$$

Ct v enačbi predstavlja korigiran Ct vzorca, n predstavlja presek standardne premice z ordinato, k pa naklon premice. Ker smo vse vzorce delali v dvojniku, je sledilo povprečenje količin za vsak vzorec. Na koncu smo količine mRNA za gena *cxcl2* in *ptn* normalizirali na povprečno količino mRNA hišnih genov (HG) za ta vzorec (46):

$$vzorec(HG1, HG2) = \frac{2 \times vzorec(ng)}{HG1(ng) + HG2(ng)} \quad \dots(4)$$

3.7 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Po priporočilih SZO T-vrednost $> -1,0$ pomeni normalno MKG na predelu merjenja, T-vrednost $< -2,5$ na enem predelu merjenja pa pomeni osteoporozo ne glede na T-vrednost v ostalih predelih merjenja. Na podlagi te opredelitve smo vzorce tkiva razdelili na osteoporozne (T-vrednost $< -2,5$), neosteoporozne (T-vrednost $> -2,5$) in zdrave (T-vrednost $> -1,0$) glede na posamezen predel merjenja T-vrednosti. T-vrednost je bila bolnikom izmerjena v predelu vratu stegenice, celotnega kolka in ledvenih vretenc (L1-L4). Odločili smo se za primerjavo izražanja preiskovanih genov med osteoporoznim in neosteoporoznim tkivom ter med osteoporoznim tkivom in zdravim tkivom. Nato smo vzorce razdelili v dve skupini glede na vzrok za operacijo bolnikov. Primerjali smo izražanje preučevanih genov med vzorci bolnikov, ki so bili operirani zaradi zloma in vzorci bolnikov, ki niso bili operirani zaradi zloma. Podskupine se v nobenem primeru niso porazdeljevale normalno, zato smo se poslužili neparametričnega testa Mann Whitney za dva neodvisna vzorca. Z metodo korelacije po Spearmanu smo ugotavljali povezanost med izražanjem izbranega gena in MKG ter povezanost med izražanjem gena in T-vrednostjo na vsakem predelu merjenja.

Pri vseh analizah smo vrednosti $p \leq 0,05$ opredelili kot statistično značilne, vrednosti $0,05 < p \leq 0,1$ pa smo opredelili kot mejno statistično značilne.

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program SPSS 11.0 for Windows (SPSS Inc., ZDA).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PRIPRAVA HUMANEGA STANDARDA

Za pripravo standarda smo uporabili vzorec humanega kostnega tkiva. Postopek priprave standarda je obsegal izolacijo celokupne RNA iz kostnega tkiva in reverzno transkripcijo izolirane RNA v cDNA. Želeli smo dobiti standard ustrezne kvalitete, ki bo izražal vse preiskovane gene.

Del vzorca za standard je bil shranjen v tekočem dušiku, del pa v RNA later® RNA Stabilization Reagent-u, zato smo morali potrditi tudi ustreznost obeh medijev za shranjevanje vzorca. Vsak del vzorca smo izolirali v več serijah. Koncentracije in oceno čistosti izolatov smo podali na podlagi izpisa aparature Nanodrop® spectrophotometer 1000. Koncentracije so bile sledeče: 1819,7 ng/μL in 2221,5 ng/μL za seriji vzorca shranjenega v tekočem dušiku, ter 1485,6 ng/μL, 1810,6 ng/μL, 1199,9 ng/μL, 1299,5 ng/μL, 1195,3 ng/μL in 1241,6 ng/μL za serije vzorca shranjenega v RNA later® RNA Stabilization Reagent-u. Koncentracije so bile v vseh primerih večje od 1000 ng/μL, kar je za izolacijo iz kostnega tkiva zadovoljivo. Na podlagi razmerij absorbanc A260/A280 in A260/A230 smo nato ocenili čistost vzorca. Vrednosti razmerja A260/A280 so se gibale okoli vrednosti 2,0, kar pomeni, da izolat ne vsebuje večjih količin kontaminantov (proteinov, fenola), ki močno absorbirajo pri 280 nm (37). Vrednosti razmerja A260/A230 so bile višje od 1,8, kar zopet potrjuje odsotnost večjih količin kontaminantov (topila), ki absorbirajo pri 230 nm (37). Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da med izolacijo RNA ni prišlo do prenosa večjih količin proteinov in topil, ki smo jih uporabili pri postopku izolacije.

Na podlagi izpisa naprave Agilent 2100 bioanalyzer, ki vzorcu RNA izmeri parameter integritete RNA (RIN), smo podali oceno integritete RNA. RIN lahko doseže maksimalno vrednost 10,0, ki pomeni, da vzorec ni fragmentiran. V našem primeru je RIN v povprečju znašal 6,6. Glede na to, da imamo opravka z vzorci izoliranimi iz kostnega tkiva, bi bilo nesmiselno pričakovati višje vrednosti, saj je odvzem vzorcev težaven, tako da se že v času odvzema RNA lahko razgradi s prisotnimi RNazami. Ta rezultat torej pomeni, da je integriteta izolirane RNA še zadovoljiva in da med odvzemom vzorca, postopkom izolacije RNA in hranjenjem vzorca ni prišlo do večje razgradnje RNA z RNazami.

Na podlagi rezultatov torej lahko zagotovimo, da je bil izolat RNA ustrezne kvalitete, zato smo ga uporabili za postopek reverzne transkripcije. Koncentracije RNA in vrednosti RIN so bile v primeru uporabe obeh medijev primerljive, zato smo vse serije vzorca združili in izračunali povprečno koncentracijo RNA v zmesi, ki je znašala 1534,2 ng/ μ L. Masa celokupne RNA v vseh vzorcih je znašala 650,5 μ g, volumen izolata, ki ustreza 5 μ g RNA, pa 3,3 μ L. Glede na količino standarda, ki smo ga potrebovali, smo vzeli šestkratni volumen izolata RNA, ki ustreza 5 μ g, torej 19,6 μ L.

Nato smo s postopkom reverzne transkripcije izvedli prepis RNA v cDNA in izračunali koncentracijo standarda, ki je znašala 20 ng/ μ L. S pomočjo metode PCR v realnem času smo ugotovili, da se v standardnem vzorcu izražata oba preiskovana gena, kot tudi hišna gena *ppia* in *rplp*, ki smo ju uporabili za normalizacijo.

Glede na to, da je bil standard pripravljen iz izolata RNA ustrezne integritete in čistosti in ker so se v njem izražali vsi geni preučevani v poskusu, smo potrdili ustreznost standarda za poskus.

4.2 IZBOR HIŠNIH GENOV

Pri analizi izražanja genov lahko pride do razlik v začetni količini celokupne RNA dodane v reakcijo reverzne transkripcije ter do različne uspešnosti reakcije reverzne transkripcije. Zaradi tega je smiselno podajati rezultate analize izražanja genov relativno glede na hišne gene.

V postopku izbora hišnih genov smo izmed dvanajstih kandidatnih genov izbrali za normalizacijo dva gena z najbolj stabilnim izražanjem. Pomnoževanje kandidatnih genov smo izvedli na sedmih reprezentativnih vzorcih žensk z ekstremnimi T-vrednostmi, operiranih zaradi osteoartritisa. Povprečna starost žensk v skupini je znašala $74 \pm 2,78$ let. Vzorci 3, 7 in 17 so bili odvzeti ženskam, ki so imele T-vrednost $> -1,0$, kar izključuje osteoporozo in so nam služili kot kontrole, vzorci 2, 11, 14 in 15 pa ženskam, ki so imele T-vrednost $< -2,1$, kar nakazuje osteoporozo in smo jih zato označili kot bolne.

Najboljša gena smo izbrali na podlagi različnih načinov izračunov, ki so opisani v poglavju 3.5.2. Rezultate pri posameznem načinu računanja podaja preglednica XII. V preglednici najvišji rang v vseh stolpcih z izjemo zadnjega predstavlja najbolj stabilen gen.

Preglednica XII: Rangiranje kandidatnih genov glede na izračune pri posameznem postopku izbora genov z najstabilnejšim izražanjem

Hišni Geni	Ime postopka							
	Razlike Ct vrednosti	MAD	Normfinder	GeNorm	Normalizacija enega gena na ostale	Razlike relativnih količin	Skupni rang	Novi rang
<i>ubc</i>	5	5	2	2	2	5	21	9
<i>b2m</i>	8	9	8	4	3	8	40	6
<i>gapdh</i>	3	6	6	7	5	4	31	7
<i>tbp</i>	10	8	11	11	11	9	60	4
<i>ppia</i>	11	10	9	10	9	12	61	3
<i>rplp</i>	8	11	12	12	12	9	64	1
<i>ywhaz</i>	1	3	7	3	4	1	19	11
<i>tubb</i>	6	1	1	1	1	1	11	12
<i>gusb</i>	6	7	4	9	8	7	41	5
<i>actb</i>	4	2	5	6	7	5	29	8
<i>hpri1</i>	2	4	3	5	6	1	21	9
<i>18s rrna</i>	11	12	10	8	10	11	62	2

V stolpcu »skupni rang« je predstavljena vsota rangov za vsak gen. Gen z najvišjo vsoto rangov predstavlja gen z najstabilnejšim izražanjem. V stolpcu »novi rang« pa smo rangirali skupno vsoto rangov. Najnižji rang smo tokrat pripisali najbolj stabilnemu genu, torej tistemu z najvišjo vsoto rangov.

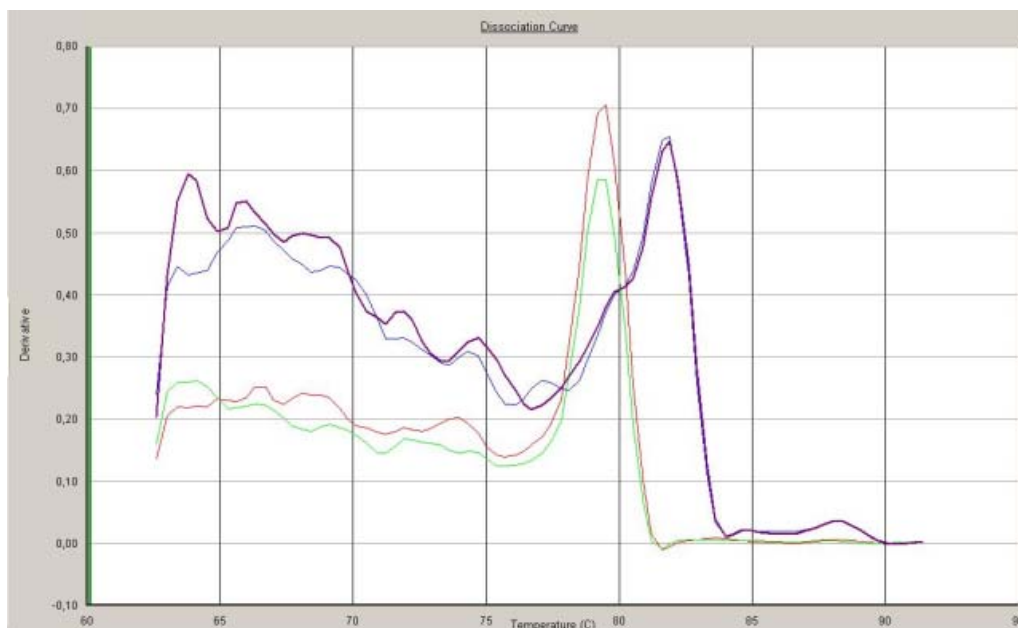
Iz rezultatov je razvidno, da sta najnižje rangirana gena *rplp* in gen za 18S rRNA. Gena za 18S rRNA nismo izbrali za normalizacijo, ker je 18S rRNA v raztopini celokupne RNA prisotna v veliko večji količini kot katerakoli tipična mRNA. Zato bi bilo potrebno celokupno RNA redčiti, da bi dobili 18S rRNA v koncentraciji, pri kateri bi bila njena vrednost Ct dovolj blizu vrednosti Ct ostalih genov za vzorec (47). Druga pomankljivost 18S rRNA je v tem, da na njeno izražanje vplivajo razni biološki faktorji in zdravila (11). Iz teh razlogov smo kot drugi gen za normalizacijo izbrali gen *ppia*, ki je imel tretji najvišji skupni rang.

4.3 OPTIMIZACIJA REAKCIJE PCR V REALNEM ČASU

Na začetku laboratorijskega dela smo za pomnoževanje cDNA genov *cxcl2*, *ptn*, *ppia* in *rplp* uporabili SYBRGreenER™qPCRSuperMix, ki vsebuje: Hot-start Taq DNA polimerazo, SYBR GreenER™, pasivno referenčno barvilo ROX™, MgCl₂, dNTP-je,

UDG in stabilizatorje. Sestave zmesi nismo spreminjali, saj je bila po zagotovitvi proizvajalca že predhodno optimizirana. SYBR GreenER™ je barvilo, ki se nespecifično interkalarno veže v mali žleb dvovijačne DNA. Pri uporabi tega barvila za detekcijo produktov pomnoževanja je zelo pomembno, da se pomnožuje samo iskani produkt, saj bi nam sočasno pomnoževanje drugih produktov dalo lažno višjo ali lažno nižjo količino mRNA določenega gena.

Reakcijo smo izvajali pri 60 °C. Na podlagi talilnih diagramov smo ugotovili, da je reakcija specifična za gen *ptn* in oba hišna gena, ne pa za gen *cxcl2*, ki je izkazoval v diagramu več vrhov (slika 4).

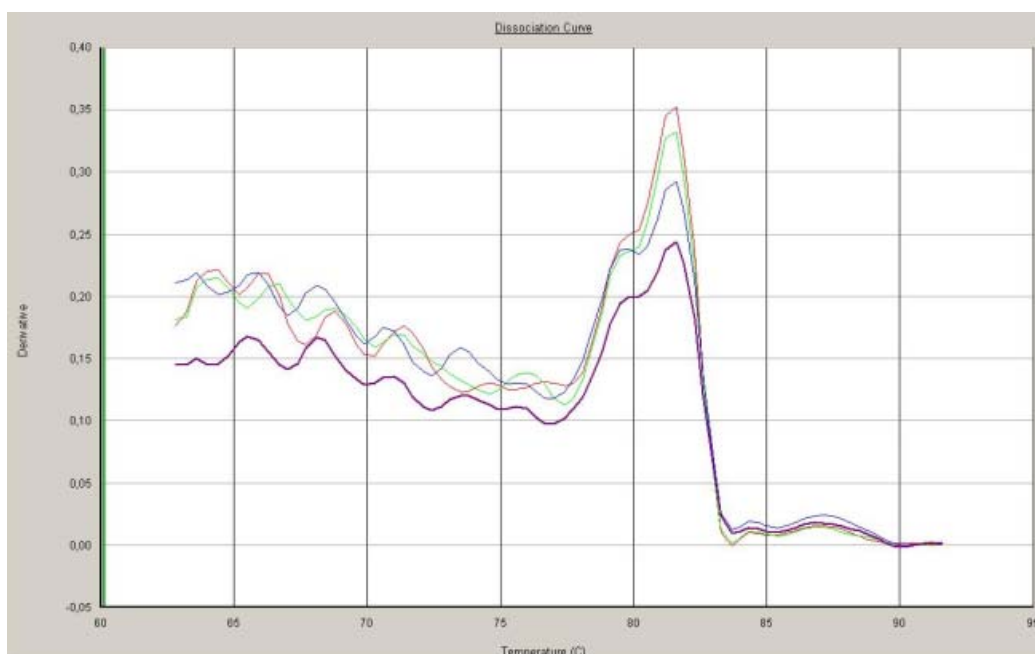


Slika 4: Talilni diagrami za gena *cxcl2* (vijolično, modro) in *ptn* (rdeče, zeleno)

Nespecifični produkti pomnoževanja so lahko posledica slabo zasnovanih oligonukleotidnih začetnikov, ki se v takem primeru ne vežejo le na odsek DNA, ki ga želimo pomnožiti, pač pa tudi na odseke DNA genov, ki niso predmet raziskave. Te DNA molekule so lahko prisotne že v vzorcu ali pa so posledica kontaminacije vzorca. Vzrok za kontaminacijo je najpogosteje površno delo in nezadostna čistost aparatov in pribora. Lahko pa nastajajo tudi dimeri oligonukleotidnih začetnikov (48, 49). Stranskih produktov v primeru gena *cxcl2* je bilo očitno več. Gen *cxcl2* je imel verjetno temperaturo tališča (T_m) okoli 82 °C, saj je bil vrh pri tej temperaturi najvišji. Poleg gena *cxcl2* smo videli na diagramu še en daljši produkt s T_m približno 88 °C, enega pri približno 79 °C in še nekaj

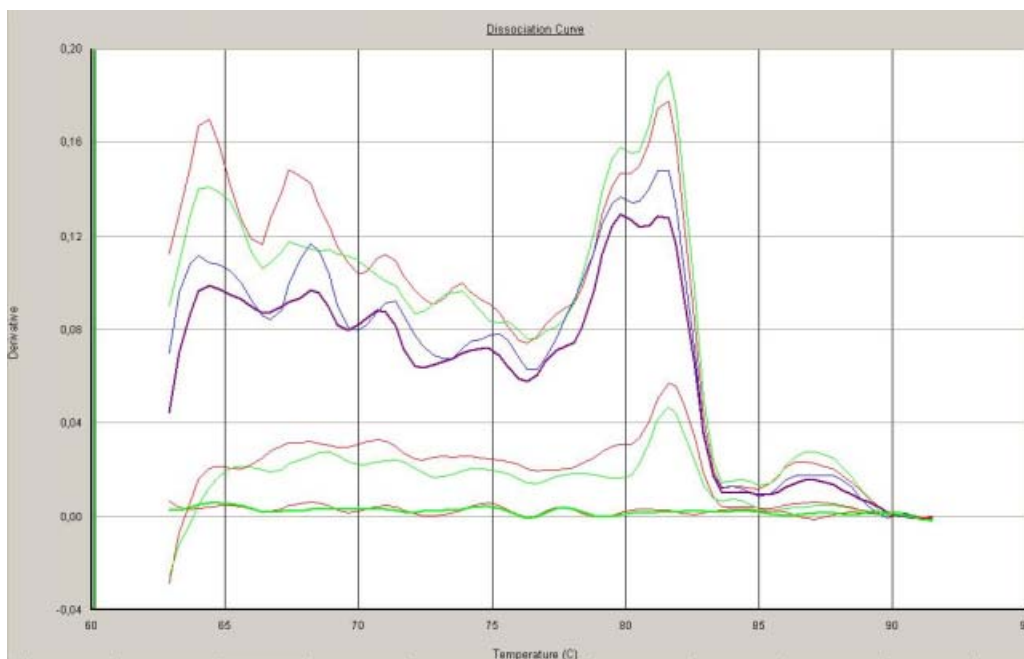
vrhov pri nižji temperaturi. Glede na to, da imajo dimeri oligonukleotidnih začetnikov običajno T_m okoli 72 - 78 °C (49), bi mogoče lahko vrh pri 79 °C pripisali dimerom.

Pri reakciji nastale stranske produkte smo poskusili odpraviti z zvišanjem temperature prileganja in znižanjem koncentracije oligonukleotidnih začetnikov. Pri višji temperaturi prileganja naj bi se oligonukleotidni začetniki težje prilegali na zaporedja, ki jim niso popolnoma komplementarna. Nižanja koncentracije obeh oligonukleotidnih začetnikov ob nespremenjeni koncentraciji vzorca pa smo se lotili zato, ker je možnost tvorbe dimerov večja, če je koncentracija oligonukleotidnih začetnikov velika glede na koncentracijo vzorca v reakcijski zmesi. Kljub zvišani temperaturi prileganja (62 °C) in uporabi različnih volumnov oligonukleotidnih začetnikov (1 μL in 0,75 μL) je bilo na talilnem diagramu ponovno vidnih več vrhov (slika 5).



Slika 5: Talilni diagrami za gen *cxcl2* pri temperaturi prileganja 62 °C ter volumnih oligonukleotidnih začetnikov 1 μL (rdeče, zeleno) in 0,75 μL (vijolično, modro)

Nato smo temperaturo prileganja spustili nazaj na 60 °C in zopet poskusili z različnimi volumni oligonukleotidnih začetnikov: 0,75 μL ; 0,5 μL ; 0,25 μL in 0,10 μL . Volumna 0,25 μL in 0,10 μL sta bila očitno premajhna, saj fluorescenca produkta ni presegla bazne linije. Rezultati pri 0,75 μL in 0,5 μL pa niso bili boljši od prvotnih (slika 6).



Slika 6: Talilni diagrami za gen *cxc12* pri temperaturi 60 °C in volumnih oligonukleotidnih začetnikov 0,75 μ L (zeleno, rdeče-zgoraj), 0,5 μ L (modro, vijolično), 0,25 μ L (rdeče, zeleno-v sredini) in 0,10 μ L (rdeče, zeleno-spodaj)

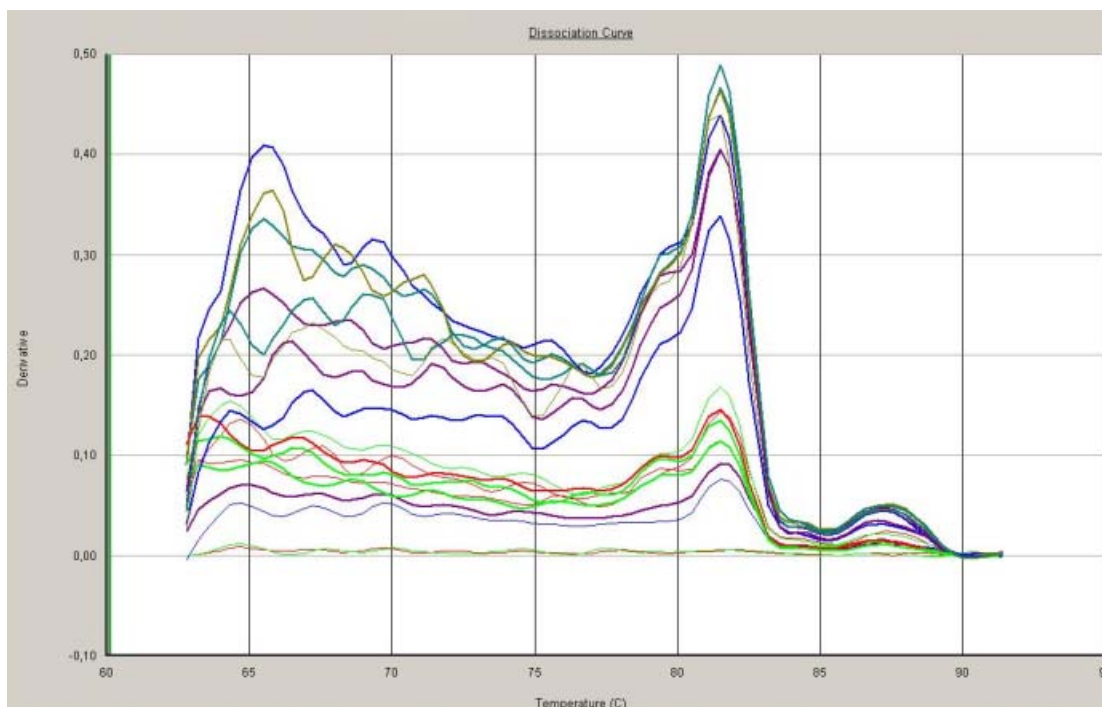
Nato smo posumili, da je mogoče za nastanek stranskih produktov v večji meri odgovoren le en oligonukleotidni začetnik (smerni ali protismerni). Poskusili smo z različnimi kombinacijami koncentracij smernih in protismernih oligonukleotidnih začetnikov. Kombinacije, ki prikazujejo končne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov v reakcijski zmesi, so opisane v preglednici XIII. Prva koncentracija se vedno nanaša na smerni oligonukleotidni začetnik. Koncentraciji 50 nmol/L je ustrezal volumen oligonukleotidnega začetnika 0,25 μ L, koncentraciji 300 nmol/L volumen 1,5 μ L, koncentraciji 900 nmol/L pa volumen 4,5 μ L.

Preglednica XIII: Kombinacije koncentracij (nmol/L) oligonukleotidnih začetnikov

50/50	50/300	50/900
300/50	300/300	300/900
900/50	900/300	900/900

Rezultati so bili nekoliko boljši pri kombinaciji 300 nmol/L protismernega oligonukleotidnega začetnika z 900 nmol/L in 300 nmol/L smernega oligonukleotidnega začetnika, vendar nam stranskih produktov kljub temu ni uspelo odpraviti (slika 7). Zato

smo se odločili, da bomo gen *cxcl2* detektirali na drug način in sicer s pomočjo TaqMan® sonde.



Slika 7: Talilni diagrami za gen *cxcl2* pri 60 °C in kombinacijah koncentracij smernih in protismernih oligonukleotidnih začetnikov, ki jih opisuje preglednica 14

Hidrolizirajoča sonda TaqMan® omogoča specifični način detekcije produkta. Talilnega diagrama v primeru uporabe hidrolizirajoče sonde ni možno izvesti, saj ne gre za reverzibilno vezavo, pač pa se sonda med podaljševanjem verige razgradi. Dimeri oligonukleotidnih začetnikov ne motijo detekcije, da bi detektirali stranske produkte, pa bi se na njihovo DNA morala vezati tako sonda kot tudi oligonukleotidni začetniki, kar pa je malo verjetno.

4.4 MERJENJE IZRAŽANJA GENOV *CXCL2* IN *PTN* V VZORCIH KOSTNEGA TKIVA

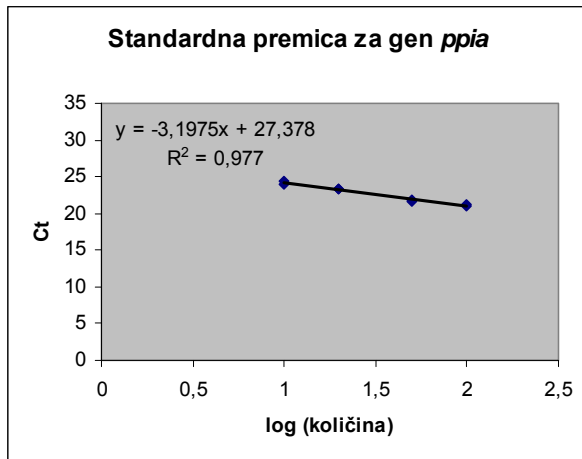
V diplomskem delu smo želeli rezultate izražanja genov *ptn* in *cxcl2*, dobljene z mikromrežami, potrditi z metodo PCR v realnem času. Izražanje genov *ptn* in *cxcl2* z mikromrežami Whole Human Genome Microarrays (4x44K, Agilent, Santa Clara, ZDA) so ugotavljali na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo. Za analizo so

uporabili RNA izolirano iz osteoblastov osteoporoznega in zdravega kostnega tkiva odvzetega iz vratu stegenice. Tkivo so razdelili v osteoporozno in zdravo na podlagi meritev MKG petnice. Ugotovili so, da se gen *ptn* v osteoblastih, izoliranih iz osteoporoznega tkiva, izraža 4,1 krat manj kot v osteoblastih izoliranih iz zdravega tkiva. Za gen *cxcl2* so ugotovili 3,2 krat višje izražanje v osteoblastih izoliranih iz osteoporoznega tkiva.

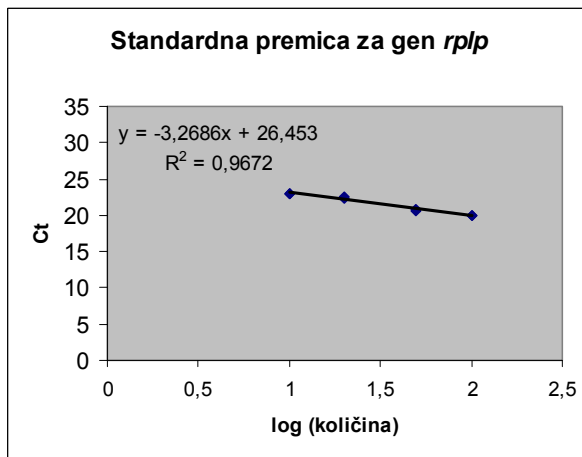
Z metodo PCR v realnem času smo ugotavljali izražanje teh dveh genov v vzorcih, ki niso bili izolirani iz osteoblastov, temveč iz biopsij kostnega tkiva. Biopete, ki so jih nadalje obdelali v Laboratoriju za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo, smo dobili iz SB Celje. Za analizo smo uporabili 71 vzorcev odvzetih bolnikom, ki so bili operirani zaradi osteoartritisa ali zloma vratu stegenice. Bolnikom je bila v bolnišnici postavljena diagnoza osteoartritisa ali osteoporoze na podlagi vzroka za operacijo.

Devetinštiridesetim bolnikom so opravili zamenjavo kolčnega sklepa ali artroplastiko zaradi osteoartritisa. Med njimi je bilo 32 žensk in 17 moških starih 39 - 80 let. Povprečna starost v skupini je znašala $64,9 \pm 10,7$ let. Druga skupina dvaindvajsetih bolnikov je bila operirana zaradi zloma vratu stegenice. V skupini je bilo 16 žensk in 6 moških starih 53 - 91 let. Povprečna starost v tej skupini je znašala $74,5 \pm 8,6$ let.

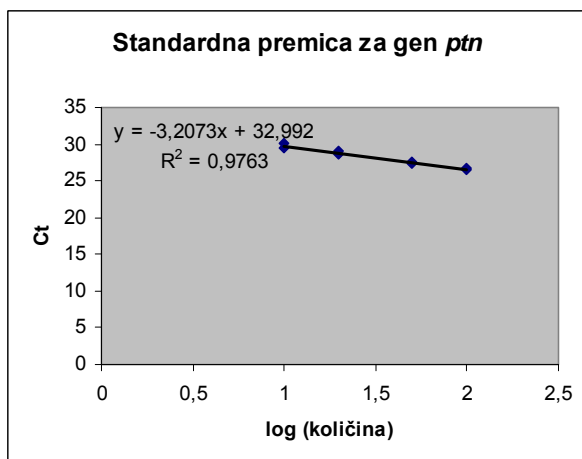
Za izračun količin mRNA preiskovanih genov v vzorcih smo uporabili metodo standardne premice (poglavje 3.6). Metoda zahteva izdelavo standardnih premic za preiskovane gene, zato smo predhodno pripravili standard iz humanega kostnega tkiva (poglavji 3.3 in 4.1), v katerem sta se izražala gena *cxcl2* in *ptn* in hišna gena *ppia* in *rplp*, ki smo ju na podlagi različnih postopkov izbrali za najprimernejša hišna gena za normalizacijo (poglavje 4.2). S pomočjo različnih koncentracij standarda smo izdelali standardne premice za vse omenjene gene. Dogovorili smo se, da bodo ustrezne premice tiste, pri katerih bo naklon med -3,1 in -3,6, kar predstavlja 90 - 110 % učinkovitost reakcije. Učinkovitost reakcije lahko zmanjšajo prisotni inhibitorji reakcije, tvorba sekundarnih struktur, predolgi odseki DNA, ki jo pomnožujemo, ter slabo zasnovani oligonukleotidni začetniki. Enačbe premic za izračun količin mRNA omenjenih genov opisujejo slike 8 do 11. Iz enačb je razvidno, da so nakloni vseh premic v dogovorjenem območju.



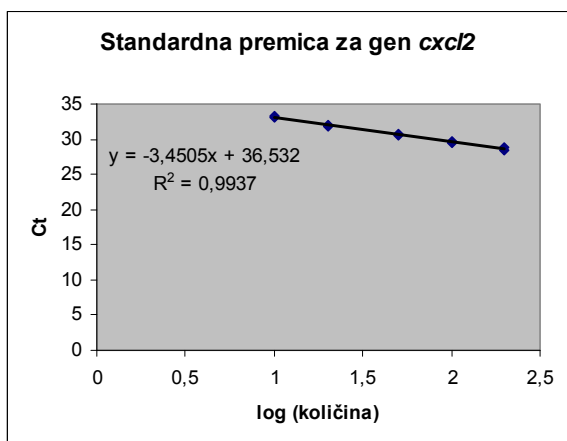
Slika 8: Grafični prikaz standardne premice za gen *ppia*



Slika 9: Grafični prikaz standardne premice za gen *rplp*



Slika 10: Grafični prikaz standardne premice za gen *ptn*



Slika 11: Grafični prikaz standardne premice za gen *cxcl2*

Po korigiranju vrednosti Ct za vsak gen smo po enačbi standardne premice izračunali količino mRNA tega gena v vzorcu. Količine mRNA genov *cxcl2* in *ptn* smo podali relativno glede na povprečno količino mRNA hišnih genov v istem vzorcu. Rezultate izračunov količin mRNA za vse gene in normaliziranih količin mRNA za preiskovana gena podaja preglednica XIV.

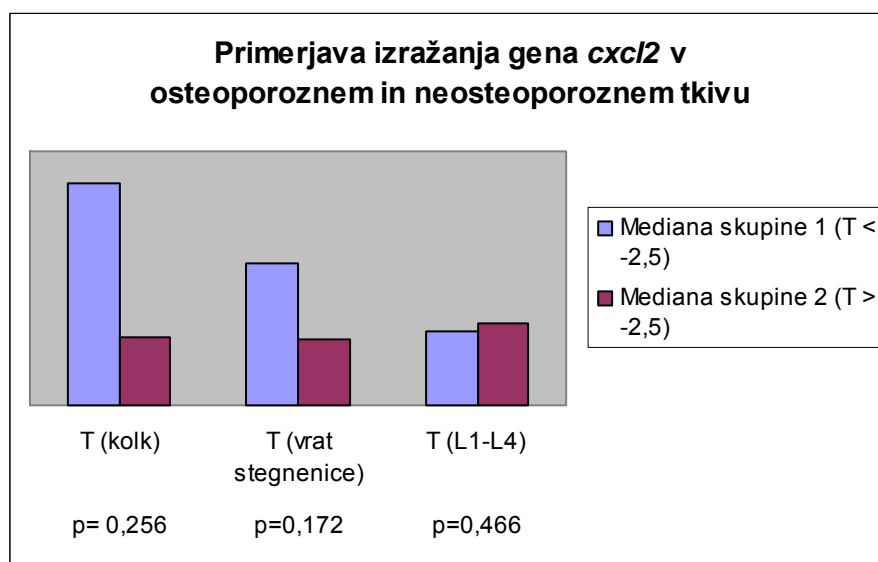
Preglednica XIV: Izračunane količine mRNA za gene *cxcl2*, *ptn*, *ppia* in *rplp* ter normalizirane količine mRNA genov *cxcl2* in *ptn*

Oznaka vzorca	Količina mRNA gena <i>cxcl2</i>	Količina mRNA gena <i>ptn</i>	Količina mRNA gena <i>ppia</i>	Količina mRNA gena <i>rplp</i>	Povprečna količina mRNA hišnih genov	Normalizirana količina mRNA gena <i>cxcl2</i>	Normalizirana količina mRNA gena <i>ptn</i>
32	464,25	176,45	1492,21	546,15	1019,18	0,456	0,173
37	588,76	30,41	251,94	146,89	199,42	2,952	0,152
41	40,84	175,50	131,77	98,93	115,35	0,354	1,521
54	136,20	127,46	629,49	456,77	543,13	0,251	0,235
42	3542,93	32,72	640,61	280,83	460,72	7,690	0,071
61	257,33	30,86	153,12	136,66	144,89	1,776	0,213
43	629,90	484,36	845,00	652,19	748,59	0,841	0,647
75	203,68	139,90	449,86	289,32	369,59	0,551	0,379
94	198,56	91,98	356,16	282,88	319,52	0,621	0,288
90	1860,68	337,14	1638,44	1018,54	1328,49	1,401	0,254
76	145,02	37,00	392,28	310,07	351,17	0,413	0,105
114	2724,41	931,02	1219,23	833,37	1026,29	2,655	0,907
101	1596,65	27,81	422,55	278,38	350,47	4,556	0,079
77	472,20	44,17	690,58	363,29	526,93	0,896	0,084
108	406,37	93,57	341,88	319,08	330,48	1,230	0,283
113	2014,55	179,99	659,16	252,67	455,92	4,419	0,395
44		266,96	507,72	367,05	437,39		0,610
36	241,65	2923,75	366,34	259,01	312,68	0,773	9,351
45	4062,12	8,25	238,67	198,96	218,81	18,564	0,038
63	1048,19	172,87	1349,85	966,65	1158,25	0,905	0,149

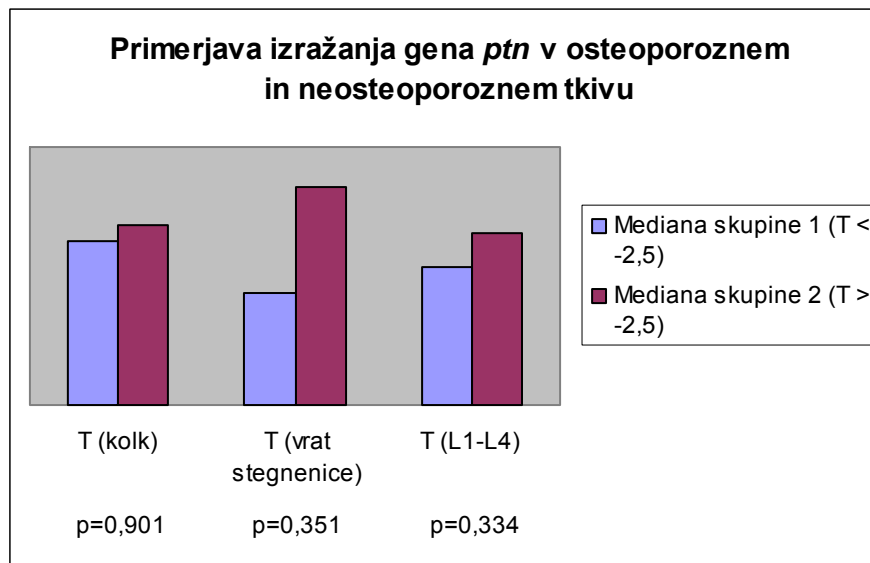
46	537,80	79,25	13,59	38,83	26,21	20,518	3,023
62	217,73	657,11	517,60	264,62	391,11	0,557	1,680
48	100,47	62,70	307,15	338,47	322,81	0,311	0,194
35	390,13	77,09	537,00	272,24	404,62	0,964	0,191
49	8611,61	22,48	644,74	488,33	566,53	15,201	0,040
38	25,24	46,01	0,34	0,96	0,65	38,775	70,696
51	134,24	4000,03	626,50	450,23	538,36	0,249	7,430
39	200,95	1601,33	169,00	64,02	116,51	1,725	13,744
55	96,89	564,72	70,13	71,30	70,71	1,370	7,986
52	2123,52	6,63	14,05	21,59	17,82	119,169	0,372
56	136,98	584,92	727,14	522,94	625,04	0,219	0,936
60	225,18	1672,09	312,68	224,90	268,79	0,838	6,221
53	4247,51	90,01	734,90	417,59	576,24	7,371	0,156
40	283,63	77,80	519,08	318,82	418,95	0,677	0,186
64	758,70	57,63	0,83	0,44	0,63	1197,557	90,970
73	1323,94	146,04	1380,00	970,06	1175,03	1,127	0,124
66	166,30	44,04	875,68	618,22	746,95	0,223	0,059
74	235,74	173,54	348,55	224,10	286,33	0,823	0,606
67	82,77	184,46	360,19	257,18	308,68	0,268	0,598
78	385,64	522,35	359,10	256,31	307,70	1,253	1,698
68	67,81	187,11	62,47	46,63	54,55	1,243	3,430
79	559,85	144,48	1041,45	772,33	906,89	0,617	0,159
69	105,00	122,04	1514,92	1086,74	1300,83	0,081	0,094
70	331,64	119,50	1251,55	805,11	1028,33	0,322	0,116
81	312,54	61,49	1282,62	907,94	1095,28	0,285	0,056
84	551,86	107,75	904,28	359,50	631,89	0,873	0,171
71	174,00	856,87	745,70	511,71	628,71	0,277	1,363
82	676,54	184,61	1259,81	908,44	1084,13	0,624	0,170
85	1027,60	806,39	1068,17	727,18	897,67	1,145	0,898
72	329,55	190,09	531,39	457,53	494,46	0,666	0,384
83	471,87	1212,16	10,00	9,29	9,65	48,910	125,641
86	1652,43	294,21	2925,30	1137,30	2031,30	0,813	0,145
96	133,37	6286,22	810,39	628,49	719,44	0,185	8,738
87	232,15	333,46	1193,50	1137,02	1165,26	0,199	0,286
97	280,62	844,86	1378,25	1153,66	1265,96	0,222	0,667
88	145,51	1649,51	993,34	618,30	805,82	0,181	2,047
99	167,48	42,36	48,32	44,77	46,55	3,598	0,910
89	359,20	240,52	635,62	484,94	560,28	0,641	0,429
91	899,21	727,64	25,54	19,33	22,43	40,081	32,434
92	121,10	61,30	46,42	48,13	47,27	2,562	1,297
111	1077,87	75,17	2635,17	1419,47	2027,32	0,532	0,037
93	16,29	38,70	173,68	122,09	147,89	0,110	0,262
112	2158,50	23,28	661,19	624,05	642,62	3,359	0,036
95	196,29	331,11	1111,88	996,30	1054,09	0,186	0,314
103	217,97	116,64	1984,28	1159,11	1571,69	0,139	0,074
104	778,94	16,15	0,98	0,51	0,75	1041,728	21,597
105	275,24	35,92	1349,67	994,82	1172,25	0,235	0,031
106	350,64	386,10	2578,86	1366,51	1972,68	0,178	0,196
107	122,70	142,43	1428,81	1078,87	1253,84	0,098	0,114
109	3755,76	35,16	2018,80	1272,99	1645,90	2,282	0,021
110	232,76	102,00	936,18	622,35	779,27	0,299	0,131

4.5 OCENA IZRAŽANJA GENOV *CXCL2* IN *PTN* V OSTEOPOROZNEM IN NEOSTEOPOROZNEM TKIVU

S pomočjo statistične analize smo ugotavljali, ali obstaja značilna razlika v izražanju genov *cxcl2* in *ptn* med tkivom, ki je glede na določen predel merjenja T-vrednosti osteoporozno in tkivom, ki je glede na isti predel merjenja neosteoporozno. Za vsak predel merjenja smo naredili dve skupini: v skupino 1 smo uvrstili vzorce bolnikov, ki so imeli na določenem predelu merjenja T-vrednost manjšo od -2,5 (osteoporozni), v skupino 2 pa vzorce bolnikov, ki so imeli na istem predelu merjenja T-vrednost večjo od -2,5 (neosteoporozni). Bolnikom je bila T-vrednost izmerjena v predelu vratu stegenice, celotnega kolka in ledvenih vretenc (L1-L4). Rezultate analize podajata sliki 12 in 13.



Slika 12: Primerjava izražanja gena *cxcl2* v osteoporoznem in neosteoporoznem tkivu



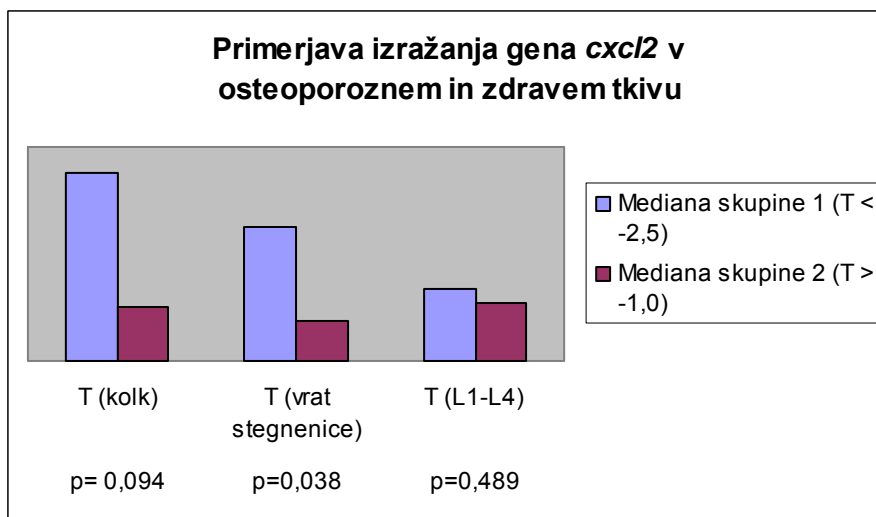
Slika 13: Primerjava izražanja gena *ptn* v osteoporoznem in neosteoporoznem kostnem tkivu

Za gen *cxcl2* nismo ugotovili značilne razlike v izražanju med osteoporoznim in neosteoporoznim kostnim tkivom. Z rezultatom Mann Whitneyevega testa nismo uspeli potrditi rezultatov dobljenih z mikromrežami, na katerih je bilo izražanje gena *cxcl2* višje v osteoplastih izoliranih iz osteoporoznega tkiva. Kljub temu mediane nakazujejo nekoliko višje izražanje gena *cxcl2* v tkivu, ki je osteoporozno glede na T-vrednost v predelu vratu stegenice in celotnega kolka.

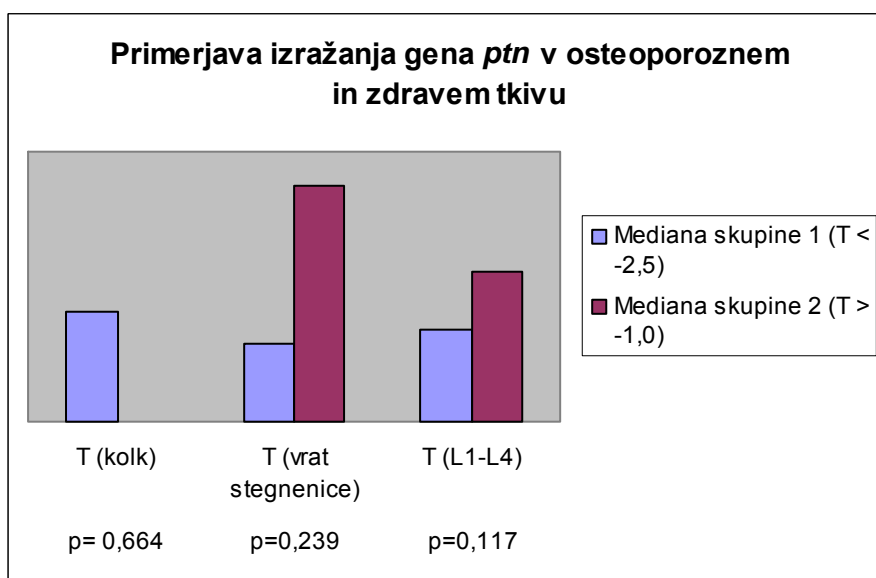
Tudi za gen *ptn* nismo ugotovili značilne razlike v izražanju med osteoporoznim in neosteoporoznim tkivom. Mediane v vseh predelih merjenja T-vrednosti nakazujejo nižje izražanje gena v osteoporoznem tkivu, kot je bilo to ugotovljeno z mikromrežami.

4.6 OCENA IZRAŽANJA GENOV *CXCL2* IN *PTN* V OSTEOPOROZNEM IN ZDRAVEM TKIVU

Pri nobenem od preiskovanih genov nismo ugotovili značilne razlike v izražanju med osteoporoznim in neosteoporoznim tkivom, zato smo se odločili za ugotavljanje razlike v izražanju med osteoporoznim in zdravim tkivom. Skupino 1 (osteoporozni) so v tem primeru predstavljali vzorci bolnikov, ki so imeli na določenem predelu merjenja T-vrednost manjšo od -2,5, skupino 2 (zdravi) pa vzorci bolnikov, ki so imeli na istem predelu merjenja T-vrednost večjo od -1,0. Izključili smo preiskovance z osteopenijo, torej tiste, ki so imeli T-vrednost na določenem predelu merjenja med -1,0 in -2,5. Rezultate analize predstavljata sliki 14 in 15.



Slika 14: Primerjava izražanja gena *cxcl2* v osteoporoznem in zdravem tkivu



Slika 15: Primerjava izražanja gena *ptn* v osteoporoznem in zdravem tkivu

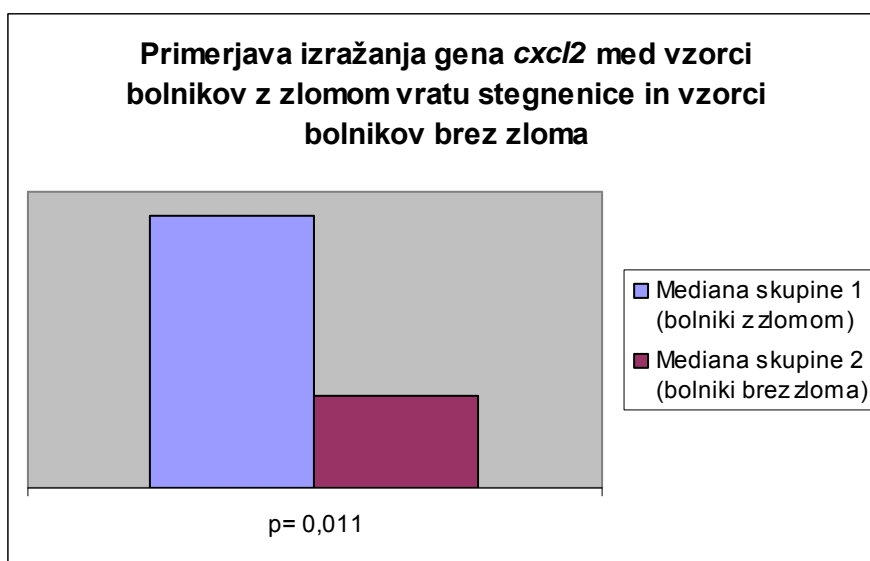
Za gen *cxcl2* smo ugotovili značilno ($p = 0,038$) razliko v izražanju med osteoporoznim in zdravim tkivom samo, če smo vzorce bolnikov razdelili glede na T-vrednost v vratu stegenice. To pomeni, da je razlika v izražanju povezana samo z MKG v vratu stegenice. Ker je vrat stegenice del kolka, se je mejna značilnost ($p = 0,094$) ohranila tudi v predelu celotnega kolka. Rezultati kažejo na to, da je izražanje gena *cxcl2* najbolj povezano z MKG in T-vrednostjo v tistih predelih skeleta, kjer smo merili izražanje (kostno tkivo vratu stegenice), manj pa s predelom celotnega kolka in nepovezano z ledvenimi vretenci.

Mediane so bile v vseh primerih višje pri osteoporoznih bolnikih. Dobljeni rezultati se skladajo z rezultati mikromrež.

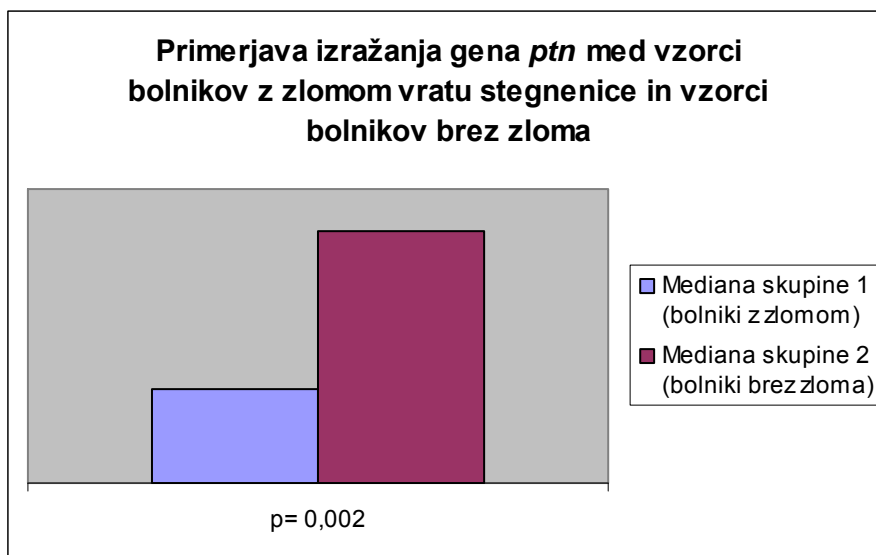
Za gen *ptn* nismo ugotovili značilne niti mejno značilne razlike v izražanju med osteoporoznim in zdravim tkivom. Z rezultati Mann Whitneyevega testa pri delitvi tkiva v osteoporozno in zdravo glede na posamezen predel merjenja T-vrednosti nam torej ni uspelo potrditi rezultatov dobljenih z mikromrežami.

4.7 OCENA IZRAŽANJA GENOV *CXCL2* IN *PTN* PRI BOLNIKIHZ ZLOMOM IN BREZ ZLOMA

Ker je osteoporozni zlom zanesljiv pokazatelj napredovale osteoporoze, smo primerjali še izražanje obeh genov med vzorci bolnikov, ki so bili operirani zaradi osteoporoznega zloma in tistih, ki niso bili operirani zaradi zloma. Rezultate analize podajata sliki 16 in 17.



Slika 16: Primerjava izražanja gena *cxcl2* med vzorci bolnikov z osteoporoznim zlomom in tistih, ki zloma niso utrpeli.



Slika 17: Primerjava izražanja gena *ptn* med vzorci bolnikov z zlomom vratu stegenice in tistih, ki zloma niso utrpeli

Pri primerjavi izražanja gena *cxcl2* med vzorci bolnikov z zlomom vratu stegenice in vzorci bolnikov brez zloma smo ugotovili značilno ($p = 0,011$) razliko v izražanju gena med skupinama. Mediana je bila višja pri skupini vzorcev, ki so bili odvzeti bolnikom z zlomom. To pomeni, da je izražanje gena *cxcl2* značilno višje pri bolnikih z zlomom kot pri tistih, ki zloma niso utrpeli. Rezultat se sklada z rezultatom mikromrež.

Pri genu *ptn* smo pri vzorcih bolnikov z zlomom ugotovili značilno ($p = 0,002$) nižje izražanje v primerjavi z vzorci bolnikov brez zloma. Ker je zlom zanesljiv kazalec napredovale osteoporoze, smo s tem potrdili rezultate mikromrež, kjer je bilo izražanje gena *ptn* nižje v osteoblastih izoliranih iz osteoporoznega tkiva.

4.8 ANALIZA POVEZANOSTI IZRAŽANJA GENOV *CXCL2* IN *PTN* S KOSTNO GOSTOTO

Z metodo korelacije po Spearmanu smo ugotavljali povezanost izražanja genov z MKG in T-vrednostjo na vsakem predelu merjenja T-vrednosti. Rezultate podajata preglednici XV in XVI, kjer se Spearmanov koeficient korelacije nanaša na povezanost normaliziranega izražanja gena in navedene spremenljivke.

Preglednica XV: Ugotavljanje povezanosti normaliziranega izražanja gena *cxcl2* z MKG in T-vrednostjo

	T (vrat stegenice)	MKG (vrat stegenice)	T (kolk)	MKG (kolk)	T (L1-L4)	MKG (L1-L4)
Spearmanov koeficient korelacije	-0,351	-0,290	-0,191	-0,208	-0,159	-0,171
p	0,004	0,017	0,122	0,092	0,193	0,163

Preglednica XVI: Ugotavljanje povezanosti normaliziranega izražanja gena *ptn* z MKG in T-vrednostjo

	T (vrat stegenice)	MKG (vrat stegenice)	T (kolk)	MKG (kolk)	T (L1-L4)	MKG (L1-L4)
Spearmanov koeficient korelacije	0,039	0,057	0,129	0,080	0,119	-0,044
p	0,754	0,645	0,293	0,518	0,327	0,715

Rezultati kažejo na značilno povezanost izražanja gena *cxcl2* z MKG in T-vrednostjo na predelu vratu stegenice ($p = 0,017$ oz. $p = 0,004$) ter mejno značilno povezanost izražanja z MKG (0,092), ne pa s T-vrednostjo na predelu celotnega kolka. Negativne vrednosti Spearmanovega koeficienta korelacije nam povedo, da se z višanjem izražanja gena *cxcl2*, vrednosti MKG in T-vrednosti za določen predel merjenja nižajo, kar se sklada s predhodnimi rezultati.

Rezultati ne kažejo značilne povezanosti med izražanjem gena *ptn* in T-vrednostjo ali MKG ne glede na predel merjenja T-vrednosti. Glede na rezultate mikromrež bi pričakovali pozitivno povezavo med izražanjem gena in T-vrednostjo ali MKG na posameznem predelu merjenja. Spearmanovi koeficienti korelacije so sicer izredno nizki, vendar pa so v vseh primerih razen zadnjega pozitivni, kar kaže na šibko povezanost spremenljivk.

4.9 KLINIČNI POMEN MERITEV IZRAŽANJA GENA *CXCL2* V KOSTNEM TKIVU

CXCL2 je kemokin, ki sodeluje pri vnetnih procesih na način, da privlači nevtrofilce na mesto vnetja (21). Med procesom vnetja se sproščajo mediatorji vnetja: histamin, polipeptidi, NO in citokini. Pomembna citokina v vnetnem procesu sta IL-1 in TNF- α , ki pa izkazujeta določene učinke tudi na kosti. Oba spodbujata osteoklastogenezo, inhibirata sintezo kolagena v osteoblastih in povečata degradacijo zunajceličnega matriksa, IL-1 pa tudi aktivira osteoklaste in podaljšuje njihovo življenjsko dobo (50). Med staranjem se nivo TNF- α in IL-1 zvišuje in omenjena citokina igrata direktno vlogo v patogenezi osteoporoze. Trenutna hipoteza o razvoju pomenopavzalne osteoporoze namreč predvideva, da se z upadom nivoja estrogenov zveča monocitno izločanje IL-1 in TNF- α , kot tudi nekaterih drugih dejavnikov, ki stimulirajo osteoklaste. Hkrati z zvečanjem aktivnosti osteoklastov naj bi se povečala tudi aktivnost osteoblastov, vendar ne do tolikšne mere, da bi kompenzirala upad kostne mase (3). Ugotovljeno je bilo tudi, da IL-1 in TNF- α stimulirata transkripcijo gena *cxcl2* (17, 19). Glede na to, da je večina vzorcev dobljenih od žensk v pomenopavzalnem obdobju, bi torej pričakovali, da bo izražanje gena *cxcl2* višje v osteoporoznem tkivu, kar tudi potrjujejo rezultati naše študije. Višje izražanje gena *cxcl2* v osteoporoznem tkivu nakazuje na to, da je vnetni proces pri teh bolnikih bolj intenziven in verjetno prispeva k razvoju bolezni. Glede na to, da upad nivoja estrogenov posredno zviša izražanje gena *cxcl2*, bi lahko v nadaljnjih študijah ugotavljali, ali v promotorski regiji gena *cxcl2* ležijo estrogen respozibilni elementi (ERE), preko katerih bi estrogeni lahko tudi direktno uravnavali izražanje tega gena.

Če primerjamo naše rezultate z rezultati študije, ki so jo izvedli Meiheng Yang in sodelavci (22), pa mogoče lahko odgovorimo na vprašanje, ali se izražanje gena *cxcl2* pri osteoporozi zviša v osteoblastih ali v osteoklastih. V študiji so povečali aktivnost osteoklastov preko s CSF-1 stimulirane osteoklastogeneze. Rezultat študije je bil upad izražanja gena *cxcl2* med naraščanjem števila osteoklastov. Izražanje gena *cxcl2* so ugotavljali v tkivu odvzetem iz metafize distalne stegenice oz. proksimalne golenice in ne v osteoklastih. Z večanjem števila osteoklastov se povečuje celokupno število celic, kar bi mogoče lahko bilo vzrok za navidezno upadanje izražanja gena *cxcl2*. Poleg tega so izražanje gena *cxcl2* ugotavljali v roku šestih dni, diferencirani osteoklasti pa so se pojavili šele drugi dan in vrh dosegli četrty dan po stimulaciji. Vprašanje je, ali so se bili osteoblasti v tako kratkem času sposobni odzvati na povečano aktivnost osteoklastov. V študiji torej ni

šlo za stanje, ki bi bilo primerljivo z dejanskim stanjem v kosteh pri osteoporozi. Mi smo študijo izvajali na bolnikih, ki so resnično oboleli za osteoporozo in pri njih ugotovili zvišano izražanje gena *cxcl2* v vzorcih izoliranih iz kostnega tkiva (izolirana je bila RNA vseh celic prisotnih v tkivu), poleg tega pa smo z mikromrežami ugotovili zvišano izražanje gena *cxcl2* tudi v osteoblastih izoliranih iz osteoporoznega tkiva.

4.10 KLINIČNI POMEN MERITEV IZRAŽANJA GENA *PTN* V KOSTNEM TKIVU

Pleiotropin je rastni faktor, ki igra pomembno vlogo predvsem v obdobju embrionalnega razvoja (25). V postnatalnem obdobju najdemo pleiotropin v zaznavnih količinah le še v možganih in kosteh, v drugih tkivih pa le ob določenih patoloških stanjih (24). V kosteh pleiotropin najverjetneje pospešuje proliferacijo osteoblastov in tvorbo kolagena, olajša pritrjevanje osteoblastov, povečal naj bi tudi gibljivost kostnih celic (30). Vpliv pleiotropina na kosti je odvisen od njegove koncentracije, stopnje razvoja organizma in interakcij z drugimi faktorji (30). V številnih študijah so preučevali vpliv izražanja gena za pleiotropin (*ptn*) na kosti, vendar si rezultati teh študij pogosto nasprotujejo.

V vseh študijah, kjer so preučevali vpliv prekomernega izražanja gena *ptn* pri miših, so ugotovili zvečano MKG ter v nekaterih primerih hitrejšo, v drugih pa počasnejšo rast kosti v dolžino (30, 31, 34). Poleg tega je bilo prekomerno izražanje gena *ptn* v eni izmed študij celo zmožno kompenzirati upad kostne mase, ki je bil posledica ovariektomije pri miših (33). Rezultati študij so bili v nekaterih primerih odvisni od spola preučevanih živali. Tako je prekomerno izražanje gena *ptn* v eni izmed študij povzročilo zvečanje MKG samo pri samicah miši (34), v drugi študiji pa je bila vsebnost kalcija kot posledica prekomernega izražanja gena *ptn* višja pri samcih (31). Glede na to, da je imelo prekomerno izražanje gena *ptn* v teh študijah izrazite učinke na rast kosti in MKG, so v študiji s *ptn*-gen deficitarnimi mišmi ugotavljali, ali ima odsotnost gena za pleiotropin obratne učinke na kosti. Rezultati so bili presenetljivi, saj niso ugotovili značilne razlike v MKG, razlike v velikosti ali obliki skeleta, razlike v debelini kortikalne kosti, razlike v hitrosti tvorbe kosti in razlike v trabekularni kostni remodelaciji med *ptn*-gen deficitarnimi mišmi in mišmi z normalnim genotipom (35).

V naši študiji smo ugotavljali izražanje gena *ptn* v humanem kostnem tkivu. Ugotovili smo značilno ($p = 0,002$) nižje izražanje gena pri bolnikih z zlomom vratu stegenice kot pri tistih, ki zloma niso utrpeli. Ta rezultat nakazuje vpletenost gena *ptn* v proces osteoporoze,

saj je zlom zanesljiv pokazatelj napredovale osteoporoze. Z metodo korelacije po Spearmanu nismo ugotovili povezanosti med izražanjem gena in MKG ali T-vrednostjo, zato je možno, da je pleiotropin eden izmed dejavnikov, ki zmanjšajo tveganje za zlom kosti, hkrati pa nimajo vpliva na MKG. Nepovezanost pojavnosti zlomov z nižano MKG nakazujejo vseštevilčnejše klinične študije, ki opozarjajo na vse manjšo verodostojnost oz. napovedno vrednost MKG za zlom (6). Glede na rezultate naše študije bi uvrstili gen *ptn* med kandidatne gene, ki so vpleteni v razvoj osteoporoze, vendar so signalne poti, v katerih naj bi pleiotropin sodeloval, še dokaj neznane. Domneva se, da pleiotropin preko zaviranja RPTP ζ vodi k povečani tirozinski fosforilaciji β -katenina in da na ta način modulira WNT/ β -katenin signalno transdukcijsko pot. Preko te poti je uravnavano izražanje nekaterih genov, ki direktno sodelujejo pri tvorbi kosti in indirektno preprečujejo kostno resorpcijo (6, 26).

5 SKLEP

V študiji smo ugotavljali izražanje genov *cxcl2* in *ptn* v humanem kostnem tkivu. Odločili smo se za primerjavo izražanja genov med osteoporoznim in neosteoporoznim tkivom ter med osteoporoznim in zdravim tkivom. Izražanje obeh genov smo primerjali tudi med vzorci tkiva bolnikov, ki so bili operirani zaradi zloma vratu stegenice in vzorci tkiva bolnikov, ki niso bili operirani zaradi zloma. Ugotavljali smo tudi povezanost izražanja genov z MKG in T-vrednostjo.

Pri primerjavi izražanja genov *cxcl2* in *ptn* med osteoporoznim in neosteoporoznim ter med osteoporoznim in zdravim tkivom smo ugotovili:

- da ni značilne razlike v izražanju gena *cxcl2* med osteoporoznim in neosteoporoznim tkivom
- da ni značilne razlike v izražanju gena *ptn* med osteoporoznim in neosteoporoznim tkivom
- značilno ($p = 0,038$) razliko v izražanju gena *cxcl2*, če smo vzorce bolnikov razdelili na osteoporozne in zdrave glede na T-vrednost v vratu stegenice, mejno značilno ($p = 0,094$) razliko v izražanju, če smo jih razdelili glede na T-vrednost celotnega kolka in nobene razlike v izražanju, če smo jih razdelili glede na T-vrednost ledvenih vretenc (L1-L4)
- da ni značilne razlike v izražanju gena *ptn* med osteoporoznim in zdravim tkivom

Pri primerjavi izražanja genov med vzorci tkiva bolnikov, ki so bili operirani zaradi zloma vratu stegenice in vzorci tkiva bolnikov, ki niso bili operirani zaradi zloma, smo ugotovili:

- značilno višje izražanje gena *cxcl2* v tkivu bolnikov z zlomom vratu stegenice
- značilno nižje izražanje gena *ptn* v tkivu bolnikov z zlomom vratu stegenice

Z metodo korelacije smo ugotovili:

- značilno povezanost izražanja gena *cxcl2* z MKG in T-vrednostjo na predelu vratu stegenice ($p = 0,017$ oz. $p = 0,004$) in mejno značilno ($p = 0,092$) povezanost izražanja gena z MKG na predelu celotnega kolka
- šibko in neznačilno povezanost izražanja gena *ptn* z MKG in T-vrednostjo.

Rezultati naše študije izražanja genov *ptn* in *cxcl2* v kostnem tkivu nakazujejo vpletenost obeh genov v razvoj osteoporoze, zato predlagamo gena *ptn* in *cxcl2* za nadaljne študije osteoporoze na nivoju DNA.

6 LITERATURA

1. Kocijančič A. Presnovne bolezni kosti. V: Kocijančič A, Mravlje S. Interna medicina. Druga izdaja, Ljubljana, EWO d.o.o in DZS, Ljubljana, 1998: 711-729
2. Shen H, Recker RR, Deng HW. Molecular and Genetic Mechanisms of Osteoporosis: Implication for Treatment. *Current Molecular Medicine* 2003 3: 737-757
3. <http://www.medenosrce.net/tiskaj.asp?id=138>
4. Krajnc M, Čokolič M. Osteoporoza in posodobljena uradna stališča Mednarodnega združenja za klinično denzitometrijo-ISCN (2005). *Strokovna revija ISIS*, 2007, 86-88
5. <http://www.mf.uni-lj.si/jama/jama97-2/html/osteopo.html>
6. Stuart H, Ralston, Benoit de Crombrughe. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes&Dev.* 2006 20: 2492-2506
7. Williams FMK, Spector TD. Recent advances in the genetics of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006 6(1): 27-35
8. Davey RA, MacLean HE, McManus JF, Findlay DM, Zajac JD. Genetically Modified Animal Models as Tools for Studying Bone and Mineral Metabolism. *Journal of bone and mineral research* 2004 19(6): 882-892
9. Dvornyk V, Recker RR, Deng HW. Gene expression studies of osteoporosis: implications for microarray research. *Osteoporos Int* 2003 14: 451-461
10. Arko B. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2004 55: 215-220
11. <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>
12. <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034/>
13. <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=20070779460&IA=US2007000436&DISPLAY=DESC>

14. Smith DF, Galkina E, Ley K, Huo Y. GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow. *AJP-Heart Circ Physiol* 2005 289: 1976-1984
15. Földi M. Chemokinexpression in kolorektalen Karzinomen Molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen an frisch etablierten Zellkulturen humaner Tumore. Inaugural-Dissertation. Institut für Molekulare Medizin und Zellforschung der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau: 15-24
16. Qian YQ, Johanson KO, McDewitt P. Nuclear Magnetic Resonance Solution Structure of Truncated Human GRO β [5-73] and its Structural Comparison with CXC Chemokine Family Members GRO α and IL-8. *J. Mol. Biol.* 1999 294: 1065-1072
17. Haskill S, Peace A, Morris J, Sporn SA, Anisowicz A, Lee SW, Smith T, Martin G, Ralph P, Sager R. Identification of three related human *GRO* genes encoding cytokine functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990 87: 7732-7736
18. Shen F, Uddy MJ, Plamondon P, Gaffen SL. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF- α -induced genes in bone cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2005 77: 388-399
19. Matzer PS, Baumann T, Lukacs NW, Röllinghoff M, Beuscher HU. Constitutive Expression of Macrophage-Inflammatory Protein 2 (MIP-2) mRNA in Bone Marrow Gives Rise to Peripheral Neutrophils with Preformed MIP-2 Protein. *The Journal of Immunology* 2001 167: 4635-4643
20. Joshi-Barve SSS, Rangnekar VV, Stephen FS, Rangnekar VM. Interleukin-1-inducible Expression of *gro-1* via NF- κ B Activation is dependent upon Tyrosine Kinase Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 1993 268(24): 18018-18029
21. Miotla JM, Ridger VC, Hellewell PG. Dominant role of L- and P-selectin in mediating CXC chemokine-induced neutrophil migration *in vivo*. *Br J Pharmacol* 2001 133(4): 550-556
22. Yang M, Mailhot G, MacKay CA, Mason-Savas A, Aubin J, Odgren PR. Chemokine and chemokine receptor expression during colony stimulating factor-1-induced osteoclast

differentiation in the toothless osteopetrotic rat: a key role for CCL9 (MIP-1) in osteoclastogenesis in vivo and in vitro. *Blood* 2006 107: 2262-2270

23. Pulai JI, Chen H, Im HJ, Kumar S, Hanning C, Hegde PS, Loeser RF. NF- κ B Mediates the Stimulation of Cytokine and Chemokine Expression by Human Articular Chondrocytes in Response to Fibronectin Fragments. *The journal of Immunology* 2005 174: 5781-5788

24. Behr K. Einfluss der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren Pleiotrophin und Midkine auf mesenchymale Stammzellen. Disertacija. Universität Ulm, Medizinische Fakultät, 2005: 12-15

25. Ulbricht U. Untersuchungen zur Expression und Funktion der Rezeptor-artigen Protein-Tyrosinphosphatase β / Protein-Tyrosinphosphatase ζ (RPTP β /PTP ζ) und ihres Liganden Pleiotrophin in humanen Glioblastomen. Disertacija. Universität Hamburg, Fachbereich Biologie, 2005: 15-18

26. Zöllner LD. Bedeutung Heparin-bindender Polypeptide sowie des WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges in der Regulation der Knochenmasse. Disertacija. Universität Ulm, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, 2008: 11-14

27. Li YS, Hoffman RM, Le Beau MM, Espinosa R, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Deuel TF. Characterization of the Human Pleiotrophin Gene. *The journal of biological chemistry* 1992 267(36): 26011-26016

28. Schinke T, Gebauer M, Schilling AF, Lamprianou S, Priemel M, Mueldner C, Neunaber C, Streichert T, Ignatius A, Harroch S, Amling M. The protein tyrosine phosphatase RPTPzeta is expressed in differentiated osteoblasts and affects bone formation in mice. *Bone* 2008 Mar;42(3):524-34

29. Pariser H, Herradon G, Ezquerra L, Perez-Pinera P, Deuel TF. Pleiotrophin regulates phosphorylation and the cellular distribution of β -adducin through activation of protein kinase C. *PNAS* 2005 102(35): 12407-12412

30. Li G, Bunn JR, Mushipe MT, He Q, Chen X. Effects of Pleiotrophin (za pleiotropin) Over-expression on Mouse Long Bone Development, Fracture Healing and Bone Repair. *Calcif Tissue Int* 2005 76: 299-306

31. Tare RS, Oreffo ROC, Sato K, Rauvala H, Clarke NMP, Roach HI. Effects of targeted overexpression of pleiotrophin on postnatal bone development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002 298: 324-332
32. Petersen W, Wildemann B, Pufe T, Raschke M, Schmidmaier G. The angiogenic peptide pleiotrophin (za pleiotropin/GB-GAM) is expressed in fracture healing: an immunohistochemical study in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 2004 124: 603-607
33. Masuda H, Tsujimura A, Yoshioka M, Arai Y, Kuboki Y, Mukai T, Nakamura T, Tsuji H, Nakagawa M, Hashimoto-Gotoh T. Bone Mass Loss Due to Estrogen Deficiency Is Compensated in Transgenic Mice Overexpressing Human Osteoblast Stimulating Factor-1. *Biochemical and biophysical research communications* 1997 238: 528-533
34. Hashimoto-Gotoh T, Ohnishi H, Tsujimura A, Tsunozuka H, Imai K, Masuda H, Nakamura T. Bone mass increase specific to the female in a line of transgenic mice overexpressing human osteoblast stimulating factor-1. *J Bone Miner Metab* 2004 22: 278-282
35. Lehmann W, Schinke T, Schilling AF, Catalá-Lehnen P, Gebauer M, Pogoda P, Gerstenfeld LC, Rueger JM, Einhorn TA, Amling M. Absence of mouse pleiotrophin does not affect bone formation in vivo. *Bone* 2004 35: 1247-1255
36. http://www1.qiagen.com/HB/RNeasyLipidTissueKit_EN
37. <http://www.isogen-lifescience.com/uploads/np/vg/npvgbo3MpvFskuu6oyRYow/nd-1000-users-manual.pdf>
38. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscript_firststrand_man.pdf
39. <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04371135.pdf>
40. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Nucleic-Acid-Amplification-and-Expression-Profilng/qRT-PCR/qPCR/SYBR-Green-qPCR-Detection.html>
41. <http://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catProductDetail&productID=4331348&catID=601266&backButton=true>
42. http://www.tataa.com/files/documents/manual_human.pdf

43. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* 2002 30(4):e15
44. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research* 2004 64: 5245-5250
45. Livak KJ, Schmittgen DT, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25 2001: 402-408
46. <http://www.uic.edu/depts/rrc/cgf/realtime/stdcurve.html>
47. Hashimoto JG, Beadles-Bohling AS, Wiren KM. Comparison of RiboGreen and 18S rRNA quantitation for normalizing real-time RT-PCR expression analysis. *Biotechniques* 2004 36(1): 54-6, 58-60
48. <http://51protocol.com/PCR/primer/20071009/37743.html>
49. http://www.stratagene.com/seminar_downloads/FastTrack_Basic_Troubleshooting.pdf
50. Ginaldi L, Di Benedetto MC, De Martinis M. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immun Ageing* 2005; 2: 14.