

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA MALAVAŠIČ

**SINTEZA mRNA *LPL* V MAKROFAGIH NEDROBNOCELIČNEGA
PLJUČNEGA RAKAVEGA TKIVA**

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE

Ljubljana, 2011

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



TINA MALAVAŠIČ

**SINTEZA mRNA *LPL* V MAKROFAGIH NEDROBNOCELIČNEGA
PLJUČNEGA RAKAVEGA TKIVA**

**SINTESES OF mRNA *LPL* IN MACROPHAGES NON-SMALL CELL
LUNG CANCER TISSUE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Darka Černetu, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem.

Izolacijo RNA iz tkiva, reverzno transkripcijo, PCR v realnem času in agarozno gelsko elektroforezo sem opravila na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo. Tkivo je bilo odvzeto v Ljubljanskem Univerzitetnem kliničnem centru pod vodstvom prof. dr. Mihe Soka, dr. med.. Tkivo je bilo nato pregledano na Golniku pod vodstvom doc. dr. Kerna, dr. med. Pripravo rezin in fiksacijo so opravili na Inštitutu za anatomijo Medicinske fakultete v Ljubljani pod vodstvom asist. dr. Vike Smerdu, dr. vet. med.. Čiščenje in označevanje sond ter fluorescenčno *in situ* hibridizacijo sem izvedla v Specializiranem hematološkem laboratoriju, KO za hematologijo, UKC Ljubljana.

Zahvale

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Darku Černetu in somentorici doc. dr. Heleni Podgornik za strokovno pomoč in dragocene nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Posebna zahvala Inštitutu za anatomijo Medicinske fakultete v Ljubljani za pripravo rezin tkiva. Posebna zahvala Specializiranemu hematološkemu laboratoriju UKC Ljubljana za pomoč kljub obsežnemu rutinskemu delu. Zahvaljujem se zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za pomoč pri delu v laboratoriju. Posebna zahvala doc. dr. Izidorju Kernu za opravljene dodatne imunohistokemijske preiskave tkiva. Zahvaljujem se tudi družini in prijateljem.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Darka Černetu, mag. farm., spec. med. biokem in somentorice doc. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem.

Ljubljana, 2011

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Simon Žakelj, mag. farm.

VSEBINSKO KAZALO

VSEBINSKO KAZALO	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	IV
SEZNAM SLIK.....	VII
SEZNAM PREGLEDNIC.....	IX
SEZNAM PREGLEDNIC.....	IX
1 UVOD	1
1.1 NE-DROBNOCELIČNI PLJUČNI RAK	1
1.2 PRESKRBA RAKAVEGA TKIVA S CELIČNIMI GRADNIKI IN Z ENERGIJO	5
1.2.1 <i>Lipoprotein lipaza</i>	8
1.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	9
1.4 FLUORESCENČNA IN SITU HIBRIDIZACIJA.....	11
1.4.1 <i>Fluorescenčni mikroskop</i>	13
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 IZOLACIJA CELOKUPNE RNA IZ PLJUČNEGA TKIVA	17
3.2 PREPIS RNA V KOMPLEMENTARNO DNA Z REVERZNO TRANSKRIPCIO	19
3.3 SINTEZA OLIGONUKLEOTIDOV KOMPLEMENTARNIH MRNA LPL	21
3.4 ANALIZA KAKOVOSTI SINTETIZIRANIH KOMPLEMENTARNIH OLIGONUKLEOTIDOV	23
3.5 MERJENJE KONCENTRACIJE NEOZNAČENIH KOMPLEMENTARNIH OLIGONUKLEOTIDOV Z NANODROP-OM.....	25
3.6 PRIPRAVA HISTOLOŠKIH REZIN TKIVA ZA ANALIZO FISH	26
3.7 ČIŠČENJE KOMPLEMENTARNIH OLIGONUKLEOTIDOV.....	28
3.8 MERJENJE KONCENTRACIJE OČIŠČENIH NEOZNAČENIH IN OZNAČENIH KOMPLEMENTARNIH OLIGONUKLEOTIDOV S SPEKTROFOTOMETROM LAMBDA 20 BIO	30
3.9 OZNAČEVANJE KOMPLEMENTARNIH OLIGONUKLEOTIDOV VZDOLŽ VERIGE	31
3.10 OZNAČEVANJE KOMPLEMENTARNIH OLIGONUKLEOTIDOV S TVORBO REPKA NA 3` KONCU	34

3.11	FLUORESCENČNA IN SITU HIBRIDIZACIJA.....	35
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	40
4.1	ZBIRANJE VZORCEV IN PRIPRAVA ZMRZNJENIH REZIN	40
4.2	SINTEZA KOMPLEMENTARNIH OLIGONUKLEOTIDOV	42
4.3	ČIŠČENJE KOMPLEMENTARNIH OLIGONUKLEOTIDOV.....	45
4.4	FLUORESCENČNA IN SITU HIBRIDIZACIJA.....	46
4.4.1	<i>Vzdolžno označevanje komplementarnih oligonukleotidov</i>	<i>46</i>
4.4.2	<i>Označevanje oligonukleotidov s tvorbo 3`repa</i>	<i>52</i>
4.5	SKLADNOST NAŠIH REZULTATOV S PREDHODNIMI MERITVAMI.....	57
5	SKLEP.....	58
6	LITERATURA.....	59
7	PRILOGA.....	62

POVZETEK

Ne-drobnocelični pljučni rak (NSCLC) je najpogostejša oblika pljučnega raka. Zaradi nenadzorovane hitre celične delitve rakavo tkivo potrebuje veliko energije in celičnih gradnikov, ki jih lahko dobi iz intravaskularnih maščob. Pri tem sodeluje lipoprotein lipaza (LPL), katere aktivnost je v NSCLC tkivu dokazano zvečana. Zvečana aktivnost LPL v NSCLC tkivu napoveduje krajše preživetje bolnika. V diplomskem delu smo nameravali opredeliti celico, ki v NSCLC tkivu sintetizira mRNA *LPL*. Naša hipoteza je bila, da makrofag sintetizira LPL tako v NSCLC tkivu, kot tudi v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika.

Da bi hipotezo dokazali, smo razvili postopek *in situ* hibridizacije za zaznavo mRNA *LPL* (FISH). Za sintezo oligonukleotidov komplementarnih mRNA *LPL* smo inovativno uporabili komercialne postopke izolacije mRNA *LPL* iz tkiva, jo prepisali v cDNA in pomnožili tri različne segmente cDNA s PCR v realnem času (blizu 3'UTR in 5'UTR konca in na sredini mRNA). Kakovost sintetiziranih oligonukleotidov smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Sintetizirane oligonukleotide smo fluorescenčno označili z dvema različnima postopkoma. Označene oligonukleotide smo nato v histoloških rezinah NSCLC tkiva hibridizirali z mRNA *LPL* in dobljene rezultate ovrednotili s fluorescenčnim mikroskopom. Postopek FISH smo dodatno optimizirali tako, da smo povečali koncentracijo pepsina in anhidrida očetne kisline ter zamenjali raztopino formaldehida s paraformaldehidom. Ugotovili smo, da razviti postopek zaznavo mRNA *LPL* v rakavem in normalnem tkivu.

Z razvitim postopkom smo analizirali tkiva 5 bolnikov z NSCLC. Na osnovi števila in razporeditve celic v tkivu lahko z veliko verjetnostjo zaključimo, da makrofag sintetizira mRNA *LPL* tako v NSCLC tkivu, kot tudi v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu. Istočasna izvedba FISH z imunohistokemičnim označevanjem makrofagov s protitelesi anti – CD14 FITC ni uspela, zaradi obvezne uporabe intenzivne pepsinizacije v postopku FISH, ki razgrajuje antigen CD14. Tumorske celice ne sintetizirajo mRNA *LPL*.

Potrjena domneva nam omogoča nadaljnje proučevanje mehanizmov zvečane aktivnosti LPL v rakavem tkivu na celičnem nivoju, predvsem z namenom odkrivanja novih načinov zdravljenja bolezni. Razvit in optimiziran postopek FISH je novo raziskovalno orodje, ki nam omogoča zaznavo izražanja različnih genov v različnih tkivih.

ABSTRACT

Non-small cell lung cancer is the most common form of lung cancer. Cancerous tissue needs a lot of energy and cellular elements because of the uncontrolled growth. They get energy from the intravascular fat. One of the mechanisms of degradation is with lipoprotein lipase, which activity is increased in non-small cell lung cancer. Increased activity of the lipoprotein lipase in non-small cell lung cancer tissue predicts shorter survival of the patient. We want to identify the cell that synthesizes mRNA *LPL* in NSCLC tissue. Our hypothesis was that macrophage synthesizes *LPL* in NSCLC tissues and in the adjacent non – cancer tissue of the same patient.

To prove the hypothesis, we developed a procedure *in situ* hybridization to detect mRNA *LPL*. We used an innovative commercial procedures of isolation of mRNA from tissue, transcription cDNA and multiplied it with real-time PCR (near 3`UTR and 5`UTR end, and on the middle mRNA), for the synthesis of oligonucleotides complementary mRNA *LPL*. The quality of synthesized oligonucleotides was tested by agarose gel electrophoresis. We used two different procedures for labeling. Labeled oligonucleotides were then hybridized into the mRNA of *LPL* in histological slices of non-small cell lung cancer tissue. We evaluated the results by fluorescence microscope. FISH procedure was further optimized. We increased the concentration of pepsin and acetic anhydride and replaced solution of formaldehyde for paraformaldehyde. We found that the developed procedure allows the study of mRNA *LPL* in cancerous and normal tissues.

With the developed procedure, we analyzed the tissues of five patients with NSCLC. Based on the number and distribution of cells in the tissue, we assume that the cells that synthesize mRNA *LPL* in cancer and non – cancer tissue, are macrophages. The simultaneous execution of FISH with immunohistochemical labeling of macrophages with anti - CD14 FITC failed because of mandatory application of intensive pepsinisation in the FISH procedure, which breaks down the antigen CD-14. The tumor cells do not synthesize *LPL* mRNA.

Confirmed assumption allows us to further explore mechanisms augmented *LPL* activity in cancerous tissue at the cellular level, particularly with the discovery of finding new ways to treat the illness. Developed and optimized FISH procedure is a new research tool that allows us to detect other genes on mRNA in different tissues.

SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Pomen / razlaga okrajšave
Apo CI	Apolipoprotein C1
Apo-CII	apolipoprotein C2
bp	Bazni pari
cDNA	Komplementarna DNA
CHP	Celični hibridizacijski pufer
CoA	Koencim A
DEPC	Dietilpirokarbonat
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
DNAze	Deoksiribonukleaze
dNTP	Deoksinukleotid trifosfati
DoL	Indeks označevanja (angl. Degree of Labeling)
FAD ⁺	Flavin adenin dinukleotid, oksidirana oblika
FADH ₂	Flavin adenin dinukleotid, reducirana oblika
FISH	Fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija
HDL	lipoprotein visoke gostote
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IDL	lipoprotein srednje gostote
LDL	lipoprotein nizke gostote
LPL	lipoprotein lipaza
mRNA <i>LPL</i>	zapis za LPL na mRNA
NK	Nukleinska kislina
NSCLC	nedrobnocelični pljučni rak
PBS	Fosfatni pufer
PBS	Spiralni pifer
PCR	Verižna reakcija s polimerazo
PMK	Proste maščobne kisline
qPCR	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo
RNA	Ribonukleinska kislina
RNAze	Ribonukleaze
ROX	Karboksi-X-rodamin, fluorescenčno barvilo
rRNA	Ribosomalna RNA
RT – qPCR	Reverzna transkripcija z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času

SCLC	Drobnocelični pljučni rak
SDS-PAGE	natrijev dodecil sulfat - poliakrilamidna gelska elektroforeza
SSC	Standardni natrijev citrat
ST	Sobna temperatura
TAE	Pufer, ki vsebuje tris baze, očetno kislino in EDTA
TAM	S tumorjem povezani makrofagi (angl. Tumor-associated macrophages)
TNM	Klasifikacija malignih tumorjev
tRNA	Transportna RNA
UNG	uracil – DNA N – glikozilazo
VLDL	lipoprotein zelo nizke gostote
XC	Ksilen cianol

SEZNAM SLIK

<i>Slika 1: Pogostost in smrtnost posameznih vrst raka pri moškem in ženski v ZDA (2).....</i>	1
<i>Slika 2: Histološki videz posamezne vrste nedrobnoceličnega pljučnega raka v primerjavi z normalnim pljučnim tkivom (3)</i>	2
<i>Slika 3: metabolizem lipoproteinov: CETP - prenašalni protein za holesterolne estre; FC – prosti holesterol; HDL – lipoprotein visoke gostote; HL – jeterna lipaza; HSPG - heparin sulfat proteoglikan; IDL – lipoprotein srednje gostote; LCAT – lecitin:holesterol aciltransferaza; LDL – lipoprotein nizke gostote; LDL-R – receptor za lipoprotein nizke gostote; LPL – lipoprotein lipaza; LRP - LDL-receptor povezani protein; PUP – prenašalni protein za fosfolipide; VLDL – lipoprotein zelo nizke gostote; A, B-48, B-100, C in E so apolipoproteini (8)</i>	7
<i>Slika 4: Položaj gena LPL na 8. kromosomu (28)</i>	8
<i>Slika 5: Princip postopka fluorescenčna in situ hibridizacija (29)</i>	13
<i>Slika 6: Slike preparata pri uporabi različnih barvnih filtrov mikroskopa: Levo zgoraj: DAPI; Desno zgoraj: FITC; Levo spodaj: Spectrum Gold; Desno spodaj: sestavljena slika.</i>	14
<i>Slika 7: Shematski prikaz izolacija celokupne RNA iz tkiva (32)</i>	19
<i>Slika 8: tekočinski most pri merjenju koncentracije z NanoDropom 1000 (30).....</i>	26
<i>Slika 9: Spektrofotometer Lambda 20 BIO (31)</i>	31
<i>Slika 10: Princip vezave barvila ULS (33)</i>	32
<i>Slika 11: Parafinski rezini, analiza prisotnosti makrofagov s protitelesom anti-CD163. Leva slika: Bolnik 3, normalno pljučno tkivo, 100× povečava; Desna slika: Bolnik 2, normalno pljučno tkivo, 1000×povečava</i>	41
<i>Slika 12: Parafinski rezini, analiza prisotnosti makrofagov s protitelesom anti-CD163. Leva slika: Bolnik 2, tumorsko pljučno tkivo, 100× povečava; Desna slika: Bolnik 4, tumorsko pljučno tkivo, 1000× povečava</i>	42
<i>Slika 13: Rezultat agarozne gelske elektroforeze</i>	43
<i>Slika 14: Rezultat po standardnem postopku FISH z vzdolžnim predoznačevanjem sonde. (A) Bolnik 1, sonda 71/ 1, tumorsko tkivo, 600 × povečava (B) Bolnik 2, sonda 71/1, tumorsko tkivo, 600 × povečava (C) Bolnik 3, sonda 69/1, tumorsko tkivo, 600 × povečava, (D) Bolnik 4, sonda 69/1, tumorsko tkivo, 1000 × povečava; (E): Bolnik 5, sonda 69/1, normalno tkivo, 1000 × povečava; (F): Bolnik 5, sonda 69/1, tumorsko tkivo, 1000 × povečava.....</i>	49

Slika 15: Rezultat po standardnem postopku FISH, 600 × povečava. Leva slika: 1. bolnik, PCR produkt 67/5, normalno tkivo,; Desna slika: 2. bolnik, PCR produkt 71/1, tumorsko tkivo.	50
Slika 16: Rezultat standardnega postopka FISH, Bolnik 1, nedenaturirana sonda 69/1 označena vzdolž verige , 600 × povečava: Leva slika: normalno tkivo; Desna slika: tumorsko tkivo.	51
Slika 17: Spremenjen postopek FISH - hibridizacija na sobni temperaturi: Bolnik 2, nedenaturirana sonda 67/5 označena vzdolž verige, normalno tkivo, 1000 × povečava;.....	51
Slika 18: Spremenjen postopek FISH - brez pepsinizacije. Bolnik 1, sonda 67/5 označena vzdolž verige, normalno tkivo, inkubacija s protitelesi anti - CD14-FITC, 1000 × povečava.	52
Slika 19: Rezultat standardnega postopka FISH, mešanica vseh sond označenih z vezavo fluorescenčno označenega (rodamin) protitelesa na 3' rep predhodno vezane sonde. bolnik 1; Leva slika: normalno tkivo, 1000 × povečava; Desna slika: tumorsko tkivo, 600 × povečava.	53
Slika 20: Rezultat standardnega postopka FISH, mešanica vseh sond označenih z vezavo fluorescenčno označenega (rodamin) protitelesa na 3' rep predhodno vezane sonde. Tumorsko tkivo: (A) Bolnik 2, 1000 × povečava;(B): Bolnik 3, 1000 × povečava; (C) Bolnik 4, 1000 × povečava; (D) Bolnik 5, 1000 × povečava	54
Slika 21: Rezultat standardnega postopka FISH; mešanica vseh sond označenih z vezavo fluorescenčno označenega (rodamin) protitelesa na 3' rep predhodno vezane sonde, brez terminalne transferaze. Leva slika: Bolnik 2, , normalno tkivo, 600 × povečava; Desna slika: Bolnik 2, tumorsko tkivo 1000 × povečava.	55
Slika 22: Postopek FISH brez inkubacije s protitelesom anti-digoksinogenin-rodamin, mešanica vseh sond označenih z vezavo fluorescenčno označenega (rodamin) protitelesa na 3' rep predhodno vezane sonde. Leva slika: Bolnik 2, normalno tkivo, 600 × povečava; Desna slika: Bolnik 2, tumorsko tkivo, 600 × povečava.	56
Slika 23: Leva slika prikazuje tumorsko tkivo po inkubaciji z anti – CD 163, 100 × povečava; Desna slika: rdeči signali po standardnem postopku FISH v tumorskem tkivu, 400 × povečava	56
Slika 24: Nukleotidno zaporedje treh različnih odsekov za LPL: posamezni eksoni so označeni z različnimi barvami, podčrtani deli pa označujejo posamezne oligonukleotide, ki smo jih sintetizirali.	62

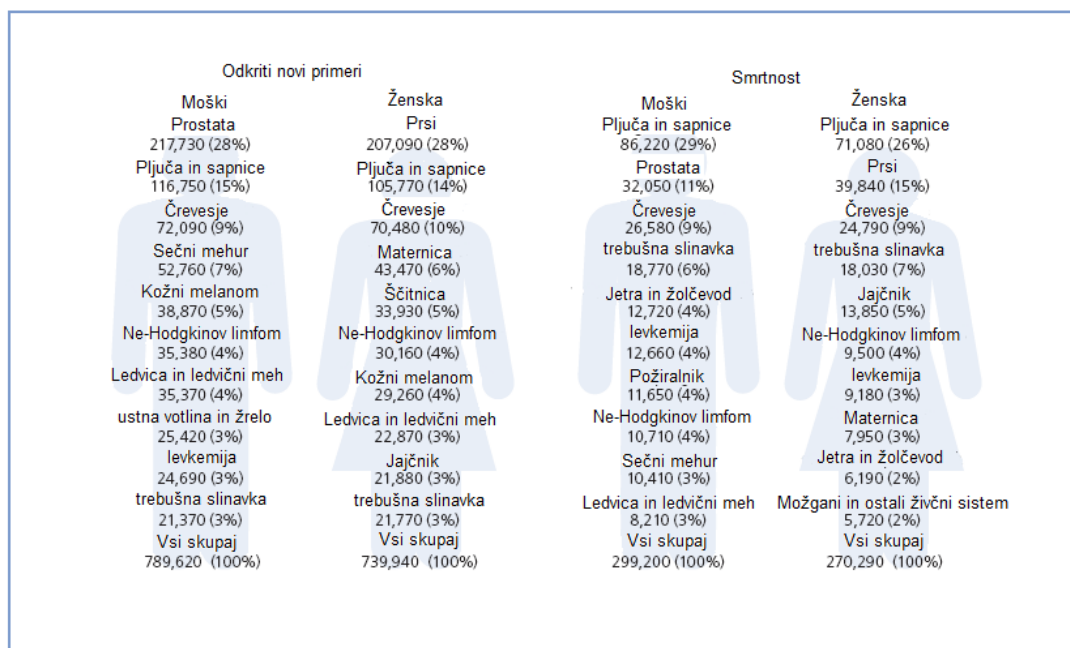
SEZNAM PREGLEDNIC

<i>Preglednica I: TNM klasifikacija (3)</i>	3
<i>Preglednica II: Mountain klasifikacija obsega NSCLC (3)</i>	4
<i>Preglednica III: preživelost tekom petih let na osnovi Mountain klasifikacija NSCLC (3)</i>	4
<i>Preglednica IV: Lastnosti in sestava lipoproteinov (18)</i>	6
<i>Preglednica V: Sestava reakcijske zmesi v postopku reverzne transkripcije mRNA v cDNA</i> .	20
<i>Preglednica VI: Predeli mRNA LPL za sintezo komplementarnih oligonukleotidov in njihova dolžina</i>	22
<i>Preglednica VII: Sestava reakcijske zmesi za qPCR</i>	23
<i>Preglednica VIII: Izkoristek po čiščenju glede na velikost oligonukleotidov</i>	28
<i>Preglednica IX: izkoristek po čiščenju glede na elucijski volumen</i>	29
<i>Preglednica X: Lastnosti FISHBright™550 Orange</i>	32
<i>Preglednica XI: Primer reakcijske mešanice za ULS označevanje</i>	33
<i>Preglednica XII: Klinične značilnosti bolnikov z NSCLC</i>	41
<i>Preglednica XIII: Izmerjene koncentracije pred čiščenjem s kolonami na NanoDropu</i>	44
<i>Preglednica XIV: Izmerjene koncentracije komplementarnih oligonukleotidov po čiščenju s kolonami</i>	45
<i>Preglednica XV: Izmerjene absorbance pri 260nm in 550nm z Lambda 20 BIO</i>	47
<i>Preglednica XVI: Izračunani indeksi označevanja</i>	48

1 UVOD

1.1 Ne-drobnocelični pljučni rak

Pljučni rak je drugi po pogostosti pri obeh spolih, vendar je smrtnost pri obeh spolih na prvem mestu (Slika 1). Ne-drobnocelični rak pljuč (angl. Non – small cell lung cancer; NSCLC) je najpogostejša oblika pljučnega raka. Zanj je značilna hitra rast malignih celic. Tumorske celice se širijo v okolico, preraščajo normalno tkivo, s krvjo ter po mezgovnicah pa se širijo tudi v oddaljene dele telesa, kjer nastanejo novi tumorji, ki jih imenujemo zasevki ali metastaze (1).

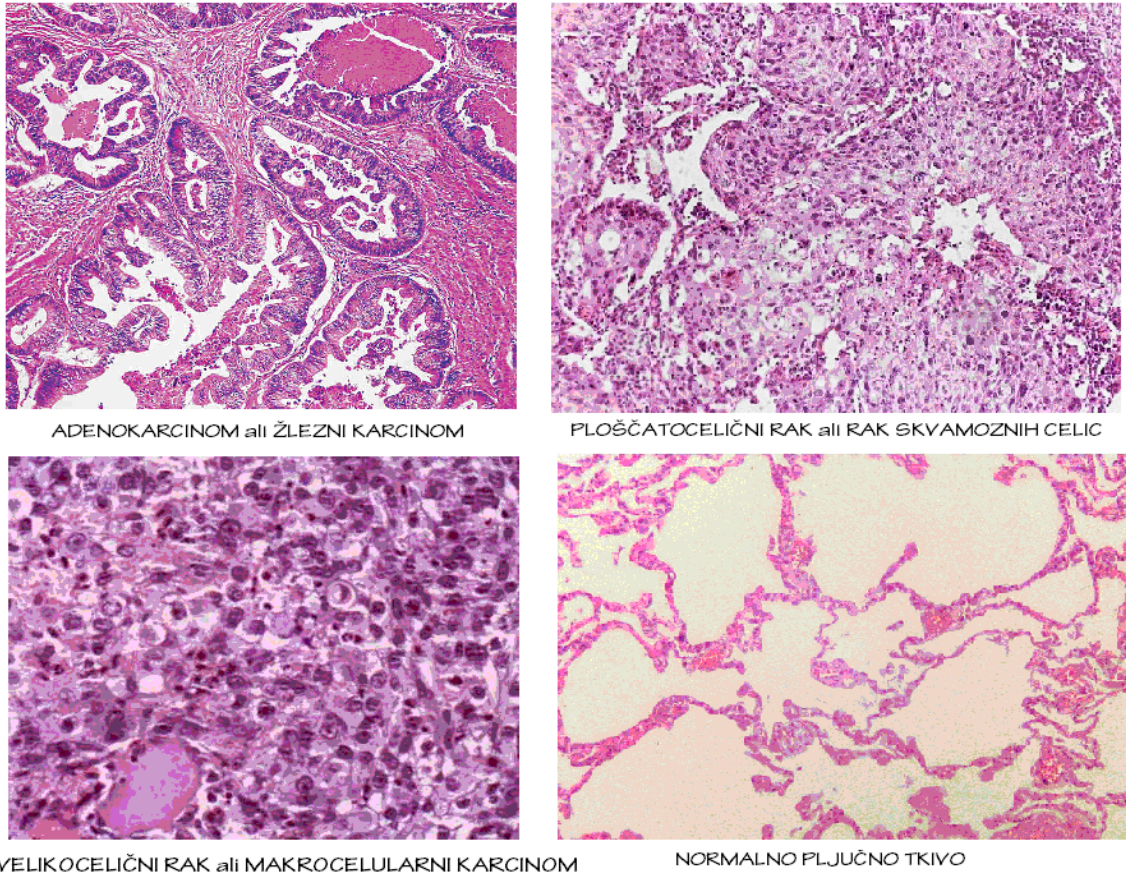


Slika 1: Pogostost in smrtnost posameznih vrst raka pri moškem in ženski v ZDA (2).

Glede na vrsto celic in način širjenja ločimo (Slika 2):

- ploščatocelični karcinom ali karcinom skvamoznih celic;
- velikocelični karcinom ali makrocelularni karcinom; in
- adenokarcinom ali žlezni karcinom.

Ploščatocelični karcinom raste najpočasneje in se razširi v oddaljene dele telesa. Najpogosteje ga najdemo pri moških (2). Adenokarcinom je najpogostejša oblika raka pri nekadilcih in ga najpogosteje najdemo na periferiji pljuč, medtem ko ostali dve vrsti NSCLC najdemo pretežno v osredju pljuč (3).



Slika 2: Histološki videz posamezne vrste nedrobnoceličnega pljučnega raka v primerjavi z normalnim pljučnim tkivom (3)

Včasih pljučni rak ne kaže nobenih simptomov in ga odkrijejo naključno. V primeru, ko se klinični znaki in simptomi pojavijo, pa so kašelj, ki ne preneha, oteženo dihanje, bolečina v prsnem košu, sledi krvi v sputumu, hripavost, izguba apetita, hujšanje in utrujenost (2).

Dejavniki tveganja, ki prispevajo k razvoju pljučnega raka, so aktivno ali pasivno kajenje, izpostavljenost azbestu, arzenu, beriliju, klormetil etru, kadmiju, kromovim in nikljevim spojinam, radonu, kremenčevemu prahu, vinilkloridu itd. (2). Še vedno pa velja, da je prehrana bogata z betakarotenom povezana z nizko pojavnostjo pljučnega raka (4). Pri 85 % NSCLC in 98 % drobnoceličnega pljučnega raka (angl. Small – cell lung cancer; SCLC) je vzrok kajenje. Med 20-imi karcinogenimi snovmi prisotnimi v tobačnem dimu so najbolj poznani policiklični aromatski ogljikovodiki in nikotinov derivat nitrozo aminoketon, ki povzročajo mutacije DNA. Karcinogene snovi tobaka reagirajo s citokromi P450. Nastanejo reaktivni metaboliti, ki povzročajo mutacije (5).

NSCLC lahko opredelimo po več klasifikacijah. TNM klasifikacija opisuje obseg rakave bolezni v telesu bolnika (preglednica I).

T opisuje velikost tumorja in vraščenost v bližnje tkivo; N opisuje metastaze v bezgavke; M opisuje oddaljene metastaze (3).

Preglednica I: TNM klasifikacija (3)

TX	Primarni tumor; ne moremo opredeliti, ali so prisotne maligne celice v sputumu ali bronhoalveolarnem izpirku
Tis	Karcinom <i>in situ</i>
T0	Ni dokazanega primarnega tumorja
T1	Tumor je manjši od 3 cm, obkrožen s pljuči ali visceralno poprsnico, brez invazije v glavni sapnici
T2	Tumor večji kot 3 cm, razširitev v glavni sapnici, obstruktivni pnevmonitis, ki ne obsega še celotnih pljuč
T3	Invazija na steno prsnega koša, prepono, osrčnik, obstruktivni pnevmonitis celotnih pljuč
T4	Invazija na srce, žile, sapnik, požiralnik, vretenca, maligni plevralni izliv
NX	Metastaze na bezgavkah ne moremo oceniti
N0	Bezgavke niso prizadete
N1	Metastaze peribronhialnih bezgavk
N2	Metastaze mediastinalnih in subcarinalnih bezgavk
N3	Metastaze drugih bezgavk
MX	Oddaljene metastaze ne moremo oceniti
M0	Brez oddaljenih metastaz
M1	Oddaljene metastaze so prisotne

Clifton Mountain je na osnovi TNM klasifikacije razdelil pljučne tumorje glede podobnosti v poteku zdravljenja in prognoze (preglednica II in III) (3).

Preglednica II: Mountain klasifikacija obsega NSCLC (3)

Faza 0	Tis N0 M0
Faza IA	T1 N0 M0
Faza IB	T2 N0 M0
Faza IIA	T1 N1 M0
Faza IIB	T2 N1 M0
	T3 N0 M0
Faza IIIA	T1 N2 M0
	T2 N2 M0
	T3 N1 M0
	T3 N2 M0
Faza IIIB	katerikoli T N3 M0
	T4 katerikoli N M0
Faza IV	katerikoli T katerikoli N M1

Preglednica III: preživetost tekom petih let na osnovi Mountain klasifikacija NSCLC (3)

Faza	Preživetje v %				
	1. leto	2. leto	3. leto	4. leto	5. leto
IA	82 %	79 %	71 %	67 %	61 %
IB	72 %	54 %	46 %	41 %	38 %
IIA	79 %	49 %	38 %	34 %	34 %
IIB	59 %	41 %	33 %	26 %	24 %
IIIA	50 %	25 %	18 %	14 %	13 %
IIIB	34 %	13 %	7 %	6 %	5 %
IV	19 %	6 %	2 %	2 %	1 %

Dejavniki, ki so povezani s slabo prognozo, so prisotnost simptomov, veliki tumorji (večji od 3 cm), ne-ploščatocelična histologija, metastaze v več bezgavkah, invazija žil (3).

Za diagnostiko in opredelitev ne-drobnoceličnega pljučnega raka lahko uporabljamo analizo krvi in urina, pregled tkiva, rentgensko slikanje prsnega koša, slikanje z računalniško tomografijo ali CT slikanje, PET slikanje, pregled citologije sputuma, kjer patolog išče tumorsko spremenjene celice, aspiracijska biopsija s tanko iglo ali ABTI, pri

kateri odstranimo tkivo s pomočjo tanke igle in bronhoskopija, pri kateri bronhoskop ustavimo skozi nos ali usta v sapnik ali pljuča. Bronhoskop ima lahko tudi orodje za odstranjevanje tkiva, ki se ga nato preveri pod mikroskopom. Izmed možnih postopkov, ki jih lahko uporabimo za diagnozo, je tudi torakoskopija, pri kateri naredimo majhen rez in vstavimo torakoskop v prsni koš. Torakoskop je lahko tudi opremljen z orodjem za odstranitev tkiva, ki ga nato pregledamo pod mikroskopom (2,3).

Cilj zdravljenja je odstranitev pljučnega rakavo spremenjenega tkiva z operacijo ali obsevanjem. Od obsega bolezni je odvisno, kakšen pristop k zdravljenju bomo izbrali.

Pri operaciji je običajno potrebno odstraniti reženj pljuč, redkeje odstranimo celo pljučno krilo. Z obsevanjem poizkušamo zmanjšati tumor. Kemoterapija je primernejša za drobnocelični pljučni rak (1,2).

1.2 Preskrba rakavega tkiva s celičnimi gradniki in z energijo

Rakavo tkivo zaradi burne rasti in celične delitve potrebuje veliko energije in celičnih gradnikov. Veliko energije in celičnih gradnikov rakave celice dobijo iz maščob. Za preskrbo rakavega tkiva z maščobami oziroma višjimi maščobnimi kislinami poskrbijo različni mehanizmi. Ločimo eksogene in endogene mehanizme preskrbe rakavega tkiva z maščobami oziroma višjimi maščobnimi kislinami. Pod eksogene mehanizme spadajo lipoproteinska lipaza, apolipoprotein E, LDL receptor in receptorji čistilci. Pod endogene mehanizme pa spadajo ATP citrat liaza, Acil-CoA, Spot 14 in sintaza višjih maščobnih kislin (20). Lipidi in lipoproteini pa se morajo predhodno razgraditi.

Eksogeni mehanizmi preskrbe rakavega tkiva z maščobami oziroma višjimi maščobnimi kislinami so tesno povezane z intravaskularno presnovo lipoproteinov.

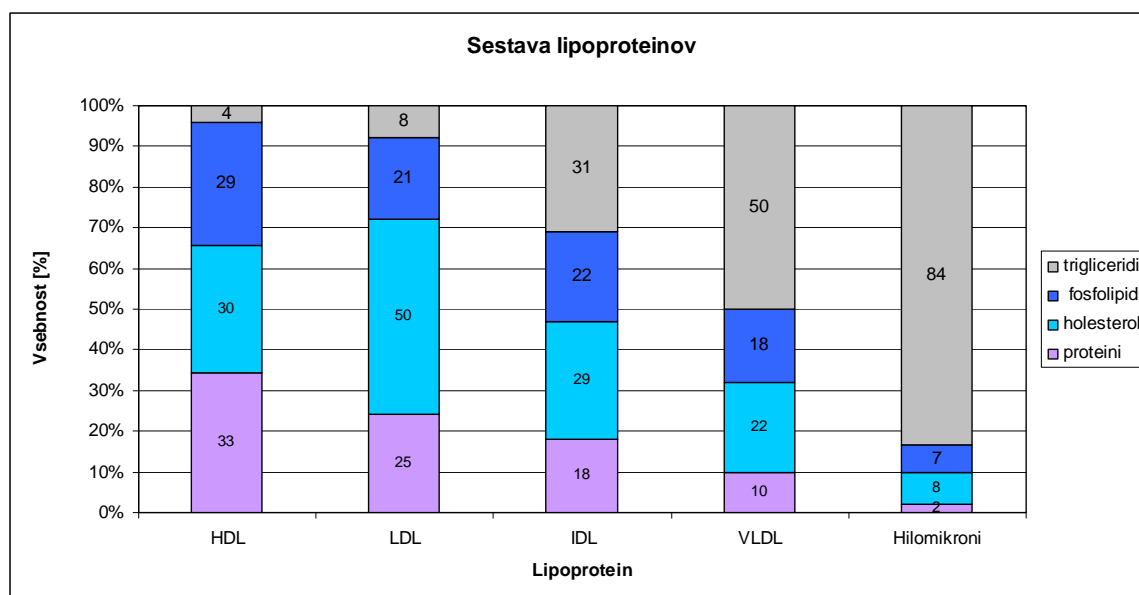
Lipoproteini so topni kompleksi lipidov in proteinov (apolipoproteinov), ki omogočajo transport lipidov po krvi (18). So makromolekule, globularne oblike, sestavljene iz holesterola, trigliceridov, apolipoproteinov in drugih hidrofobnih spojin (vitamini, zdravila) (preglednica IV in grafikon I). Po gostoti jih ločimo na hilomikrone (najmanjša gostota), lipoprotein zelo nizke gostote (angl. Very low density lipoprotein; VLDL), lipoprotein srednje gostote (angl. Intermediate density lipoprotein; IDL), lipoprotein nizke gostote (angl. Low density lipoprotein; LDL) in lipoprotein visoke gostote (angl. High density lipoprotein; HDL).

Hilomikroni prenašajo trigliceride od črevesja do jeter, skeletnih mišic in adipocitov. VLDL prenaša triacilgliceride od jeter do adipocitov. IDL v krvi zelo redko zaznamo.

LDL prenaša holesterol od jeter do perifernih celic. HDL zbira odvečni holesterol iz celic in ga vrača nazaj v jetra (19).

Preglednica IV: Lastnosti in sestava lipoproteinov (18)

Lipoprotein	Gostota [kg/L]	Premer [nm]	Sestava			
			%	%	%	%
			proteinov	holesterola	fosfolipidov	trigliceridov
HDL	> 1,063	5-15	33	30	29	4
LDL	1,019- 1,063	18-28	25	50	21	8
IDL	1,006- 1,019	25-50	18	29	22	31
VLDL	0,95- 1,006	30-80	10	22	18	50
Hilomikroni	< 0,95	100- 1000	< 2	8	7	84



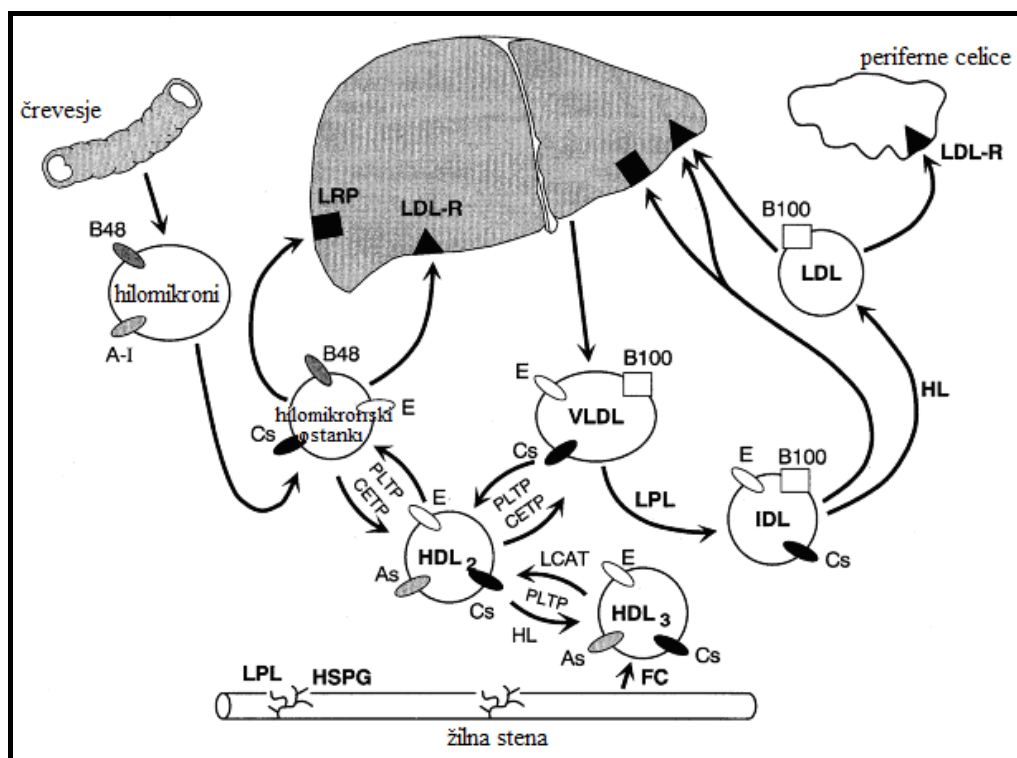
Grafikon 1: Sestava lipoproteinov (18)

Lipidi se v tankem črevesju po delovanju encimov (pankreatična lipaza, fosfolipaza, holesterol-esteraza) absorbirajo v črevesne celice (Slika 3). Tu iz glicerola in maščobnih

kislin nastanejo trigliceridi, ki se skupaj s holesterolom, fosfolipidi in proteini, v obliki hilomikronov prenesejo v kri. Po krvi potujejo v maščobno tkivo. Kadar pa se pojavi potreba po energiji, jih lipoproteinska lipaza s pomočjo koencima apo CII razgradi na proste maščobne kisline in glicerol. Maščobne kisline se prenesejo v jetra in mišično tkivo, kjer se delno oksidirajo. V jetrih se iz maščobnih kislin, glicerola, holesterola, fosfolipidov in apolipoproteinov sintetizira VLDL. VLDL se izloči v kri, kjer ga lipoproteinska lipaza iz žilne stene pretvori v IDL, ki prehaja v LDL (9).

LDL z endocitozo preko LDL receptorja prenaša holesterol v periferne celice in jih oskrbuje z maščobami in ostalimi v maščobah topnimi spojinami, ki jih celica potrebuje za svoj obstoj in normalno delovanje.

Pomembno vlogo med lipoproteini ima tudi HDL. HDL se sintetizira v jetrih in v tankem črevesju. Njegova naloga je prenos odvečnega holesterola s pomočjo lecitin:holesterol aciltransferaze in koencima apo AI iz celic v jetra (9).

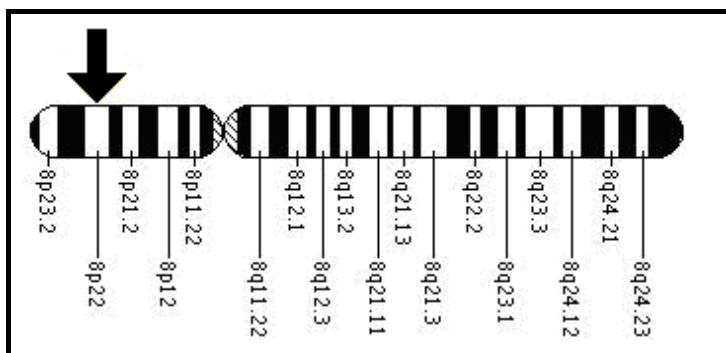


Slika 3: metabolizem lipoproteinov: CETP - prenašalni protein za holesterolne estre; FC – prosti holesterol; HDL – lipoprotein visoke gostote; HL – jeterna lipaza; HSPG - heparin sulfat proteoglikan; IDL – lipoprotein srednje gostote; LCAT – lecitin:holesterol aciltransferaza; LDL – lipoprotein nizke gostote; LDL-R – receptor za lipoprotein nizke gostote; LPL – lipoprotein lipaza; LRP - LDL-receptor povezani protein; PUP – prenašalni protein za fosfolipide; VLDL – lipoprotein zelo nizke gostote; A, B-48, B-100, C in E so apolipoproteini (8)

1.2.1 Lipoprotein lipaza

Lipoprotein lipaza (LPL; EC 3.1.1.34) ima pomembno vlogo v intravaskularni presnovi lipoproteinov. Encim hidrolizira trigliceride v hilomikronih in VLDL v dve prosti višji maščobni kislini in 2-monoacilglicerol. Nekovalentno je vezan na površino kapilarnih endotelijskih celic.

Katalitično lahko deluje tudi na holesterolne estre in lipofilne vitamine (vitamin A in E). Kot kofaktor potrebuje Apo-CII, ki so ga na površini HDL in VLDL odkrili leta 1966 (6, 27). Disfunkcija LPL vodi v hipertrigliceridemijo (6). Poleg svoje hidrolitičnega dejavnosti, lahko LPL interagira z lipoproteini, jih zasidra v žilno steno in tako olajša sprejemanje lipoproteinskih delcev. LPL deluje kot ligand za heparin sulfat proteoglikan, gp330, apoE receptor 2, LDL receptor, VLDL receptor in LDL sorodne receptorje. LPL je glikoprotein (8, 27). Molekulska masa LPL v SDS-PAGE je 60 000. Gen za LPL najdemo na 8. kromosomu in je velik približno 30 kb (Slika 4). Razdeljen je v 10 eksonov in 9 intronov (7).



Slika 4: Položaj gena *LPL* na 8. kromosomu (28)

mRNA *LPL* so našli v človeškem maščobnem tkivu, mišicah, nadledvični žlezi, ledvici, črevesju in jetrih novorojenčka. mRNA *LPL* pri ljudeh je zelo homologna z mRNA *LPL* miši, podgane in krave (7).

LPL se sintetizira v parenhimskih celicah srca, skeletnih mišic, belem in rjavem maščobnem tkivu. Našli so jo tudi v pljučih, mlečni žlezi, vranici, možganih, ledvicah in makrofagih. V tkivih z nizko aktivnostjo LPL (pljuča, vranica in jetra) encim sintetizirajo celice, kot so makrofagi v pljučih in vranici ter Kupfferjeve celice v jetrih. LPL je izražena prehodno v jetrih zarodka, vendar ne v jetrih odraslih. Po sintezi se LPL zasidra na površino endotelijskih celic z interakcijo s heparin sulfat proteoglikanom in / ali z glikozil fosfatdilinositolom (8).

Encim LPL najdemo v obliki dimera in monomera. Aktivna nekovalentna homodimerna oblika je sestavljena iz dveh nekovalentno povezanih podenot, ki sta glikozilirani. Na vsako podenoto sta vezana dva oligosaharida prekoaminskega konca. Kristalno strukturo pankreatične lipaze so določili z X-žarki in njene koordinate uporabili za domnevno tridimenzionalno strukturo LPL. Terciarni strukturi LPL so določili dve domeni: večjiaminski terminalni del in manjši karboksilni terminalni del, ki sta povezani s prilagodljivim peptidom. Vezavno mesto za receptorje in lipoproteine najdemo na karboksilnem terminalnem koncu. Naaminski domeni najdemo katalitično mesto. Aaminski terminalni del ima dve konformacijski obliki, od katerih je odvisna katalitična aktivnost. Odprta konformacija pomeni aktivno obliko encima in zaprta pomeni neaktivno obliko encima (27).

Monomerna oblika encima LPL nastane ob razpadu dimerne oblike. Monomerna oblika ima 6000 krat manjšo afiniteto za heparin sulfat proteoglikane kot dimerne oblike. Vzrok temu so številne domene za vezanje heparina, ki se nahajajo na obeh podenotah encima (27).

Preliminarne raziskave so pokazale da:

- v rakavem tkivu izražanje gena za LPL neposredno določa aktivnost LPL, zvišana aktivnost LPL v rakavem tkivu pa napoveduje krajše preživetje bolnika (močnejše kot stadij bolezni);
- izražanje gena LPL je 3,8 – krat višje v ne – rakavem pljučnem tkivu kot v NSCLC tkivu. ($p < 0,0001$). Izražanje gena je bilo višje v ne – rakavem pljučnem tkivu pri 38 od 42 bolnikov (90 %);
- stopnja raka ne korelira z izražanjem gena v NSCLC tkivu;
- ni razlike med izražanjem gena za LPL med ploščatoceličnim karcinomom in adenokarcinomom; in
- izražanje gena za LPL v NSCLC tkivu ne korelira s starostjo, spolom, kadilskim statusom, leti kajenja, indeksom telesne teže, izgubo teže, koncentracijo lipidov v serumu. Velja za rakavo in ne – rakavo pljučno tkivo.

1.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času ali kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) je laboratorijska tehnika, ki temelji na PCR.

PCR postopek je zasnoval Kary Mullis v začetku 80. letih prejšnjega stoletja. Metoda je bila prvič uradno predstavljena oktobra 1985, najprej pa so jo uporabili za diagnostiko

srpastocelične anemije. Velik preboj je prišel z izolacijo termostabilne DNA polimeraze, ki je omogočila avtomatizacijo PCR. Vpliv metode je bil tako velik, da je Kary Mullis prejel Nobelovo nagrado za kemijo leta 1993, niti 10 let po uvedbi metode (12).

Komponente, ki jih mora vsebovati reakcijska mešanica so:

- voda;
- PCR pufer;
- $MgCl_2$;
- dNTP;
- smerni in protismerni oligonukleotid začetnik;
- tarčna DNA; in
- polimeraza.

Voda je prisotna, da zagotovi medij za potek reakcije. Večina uporablja sterilno deionizirano vodo. Nezadostna čistoča vode lahko povzroči morebitne težave, zato mnogi uporabljajo vodo s čistočo namenjeno HPLC analizam (12).

PCR pufer poskrbi za optimalen pH. Večina komercialno pripravljenih PCR pufrov že vsebuje magnezijev klorid ($MgCl_2$), ki predstavlja zalogo magnezijevih ionov (Mg^{2+}). Magnezijevi ioni so kofaktor za encime tipa II, med katere spadata tudi endonukleaza in polimeraza, slednja se uporablja pri PCR reakciji. Standardna končna koncentracija $MgCl_2$ je 1,5 mM. Včasih je potrebna sprememba koncentracije z namenom optimizacije PCR reakcije. V tem primeru je potrebno izbrati pufer brez $MgCl_2$ in ga nato dodati (12).

Deoksinukleotid trifosfati (dNTP) so gradniki za sintezo komplementarne verige. dNTP pa so tudi energetsko bogate molekule. So edini vir energije, ki jo potrebujemo za uspešen potek PCR reakcije. Energijo predstavljata β in γ fosfat posameznega dNTP. Medtem ko lahko pufer in $MgCl_2$ kontinuirano odtajamo in zamrznemo, pa z dNTP ni tako. Da se temu izognemo, lahko dNTP alikvotiramo na delovne volumne (12).

Pomembna je tudi kvaliteta in količina tarčne DNA. V reakciji uporabljena DNA mora biti čista in nekontaminirana z drugimi nukleinskimi kislinami (12).

V začetku PCR metode so uporabljali Klenowo ali T4 DNA polimerazo. Med denaturacijo DNA, pri temperaturi 94 ali 95 °C, je bila ta DNA polimeraza uničena. Zato so morali encim dodajati po vsakem denaturacijskem koraku postopka PCR. Izolacija termostabilne DNA polimeraze je omogočila avtomatizacijo PCR. Termostabilno DNA polimerazo so izolirali iz termofilnih organizmov. To so organizmi, ki živijo celoten ali

del življenjskega cikla v temperaturnem območju 50 do 60 °C. Največkrat uporabljena je Taq DNA polimeraza, ki so jo izolirali iz bakterije *Thermus aquaticus* (12).

Začetni oligonukleotidi omogočajo pomnoževanje točno določenega dela tarčne DNA.

PCR reakcija se sestoji iz treh korakov:

- Denaturacija (94 °C);
- Prileganje začetnih oligonukleotidov (56 °C); in
- Podaljševanje verige s polimerazo (72 °C).

Denaturacija poteka pri temperaturi 94 °C, pri kateri dobimo tarčno DNA v enoverižni obliki (12).

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času je zelo podobna s tradicionalnemu PCR. Največja razlika je v tem, da pri qPCR merimo količino PCR produkta po vsakem ciklu, medtem ko ga pri klasičnem PCR postopku merimo le v končni točki. Končni produkt pri vsakem ciklu qPCR merimo s fluorescenco. Fluorescenčna barva se veže direktno na DNA ali indirektno prek hibridizacijske sonde in fluorescenco izmerimo ob vsakem ciklu. Signal je sorazmeren koncentraciji DNA. Točka, v kateri je fluorescenca prvič zaznana nad bazno linijo, se imenuje prag cikla (C_t) (13).

PCR v realnem času se lahko uporablja v različne diagnostične in osnovne raziskovalne namene. V diagnostiki lahko metodo uporabimo za odkrivanje nukleinskih kislin v primeru nalezljivih bolezni, raka in genetskih nepravilnosti. V raziskovalne namene uporabljajo to metodo predvsem za zagotavljanje kvantitativne meritve pri prepisovanju genov (13).

1.4 Fluorescenčna *in situ* hibridizacija

Hibridizacija je parjenje dveh enoverižnih nukleinskih kislin po principu komplementarnosti. Predstavlja osnovno tehniko, ki omogoča vpogled v razumevanje organizacije dednega materiala in mehanizme regulacije izražanja genov (14). Fluorescenčna *in situ* hibridizacija (FISH) je tehnika, ki jo je razvil Christoph Lengauer in se uporablja za odkrivanje in lokalizacijo prisotnosti ali odsotnosti določenega zaporedja DNA (15).

Fluorescenca je pojav, ko ima emitirana svetloba daljšo valovno dolžino od vpadne. Do pojava pride takrat, kadar vzbujeni elektroni prehajajo preko več energetskih nivojev in se nato postopoma vračajo na nižja energetska stanja (23). Emisija traja med pikosekundami in nanosekundami (22). Fluorescirajo lahko samo t.i. fluorofori. Med

anorganskimi molekulami lahko fluorescirajo nestehiometrično sestavljene mreže, npr. preveč kationov ali premalo anionov v katere so vgrajene minimalne količine tujih snovi, kot na primer mangan, kobalt, krom, baker, kositer. Take anorganske snovi imenujemo luminifore – večinoma gre za okside, sulfide, selenide, fluoride in sulfate elementov druge skupine periodnega sistema. Med organskimi spojinami močno fluorescirajo aromatske spojine (benzen, aromatski aldehidi, fenoli), spojine s konjugirani dvojnimi vezmi in redke spojine z alifatskimi skupinami (23).

Na fluorescenco vplivajo različni dejavniki:

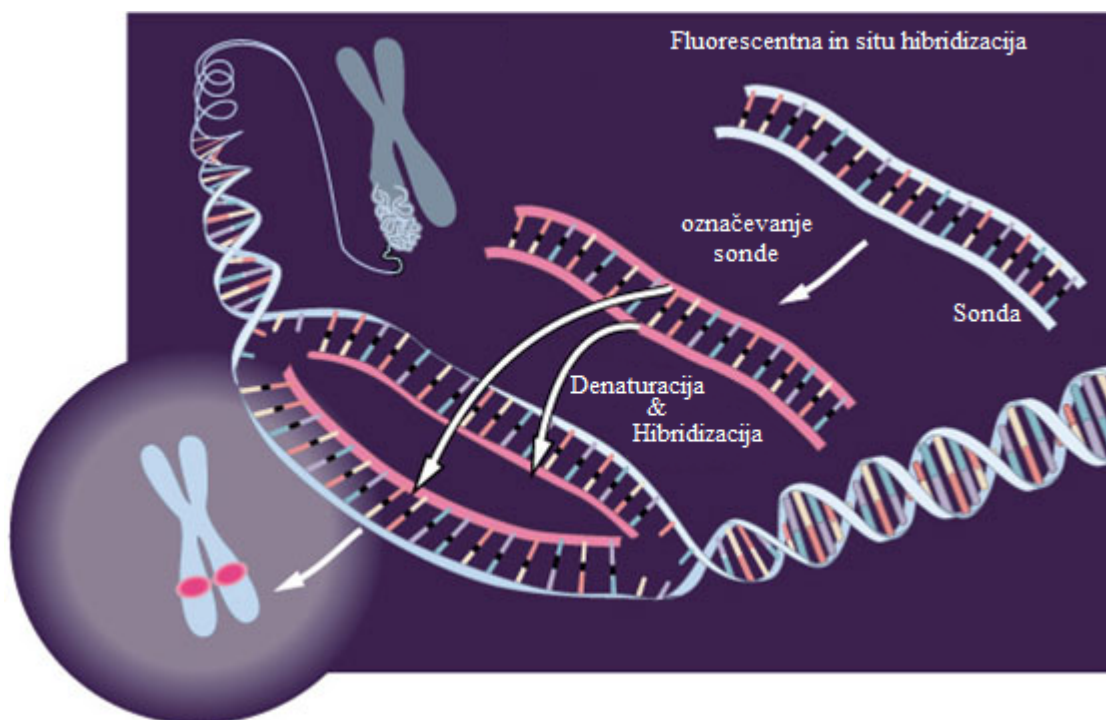
- temperatura: nihanje temperature vpliva na globalno in lokalno gibanje ter dinamiko fluoroforov v mediju (22). Pri večini molekul z zviševanjem temperature fluorescenca pada (23);
- prisotnost težkih kovin: fluorescenca molekul pada v topilih, ki vsebujejo težke kovine, ker te absorbirajo vpadno ali emitirano svetlobo (23);
- pH vrednost: če je mogoče, moramo meritve izvajati pri pH, pri katerem je intenziteta fluorescence konstantna, četudi je občutljivost meritve nekoliko manjša. Na pH so zlasti občutljive aromatske spojine (23);
- raztopljeni kisik: raztopljeni kisik v raztopini pogosto zniža fluorescenco snovi, ker se lahko fluorofor oksidira (23); in
- stabilnost raztopine: po določenem času obsevanja intenziteta fluorescence pada, zato moramo izvesti meritve zelo hitro in raztopino čim manj izpostavljati svetlobi (23).

Pomemben korak postopka FISH je sinteza sonde. Sonde morajo biti dovolj dolge, da zagotovijo specifičnost. Sonde velike okoli 50 nukleotidov in s 50 % vsebnostjo CG so navadno najboljše. Če pa uporabimo daljše sonde, povečamo specifičnost (17).

Postopki *in situ* hibridizacije lahko uporabljajo radioaktivno in neradioaktivno označene sonde. Mednje spadajo tudi fluorescenčno označene sonde, ki jih uporabljamo tudi pri FISH. Z uporabo neradioaktivno označenih sond se lahko izognemo nevšečnostim, ki so povezane z uporabo radioaktivno označenih izotopov (organizacija, zaščita, odpadki in stroški). Z uporabo neradioaktivno označenih sond se obenem izognemo radioavtografskim postopkom, ki so dolgotrajni in dragi. Neradioaktivno označene sonde lahko hranimo mesece ali leta (16).

Sonde se v postopku hibridizacije vežejo na vzorec. Po postopku hibridizacije je potrebno odstraniti nevezane sonde. Preparate nato pregledamo s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa (Slika 5) (15).

FISH se rutinsko uporablja za ugotavljanje pripojenih in pridobljenih kromosomskih nepravilnosti. Ugotavljamo lahko morebitne vzroke otrokovega zaostanka v razvoju kot na primer: Prader-Willi in Angelman sindrom, sindrom delecije 22q13, Downov sindrom itd. V medicini se FISH rutinsko uporablja za diagnostiko, napoved poteka in vrednotenje remisije bolezni pri raku (15). Njena uporaba je najbolj razširjena v hematologiji.

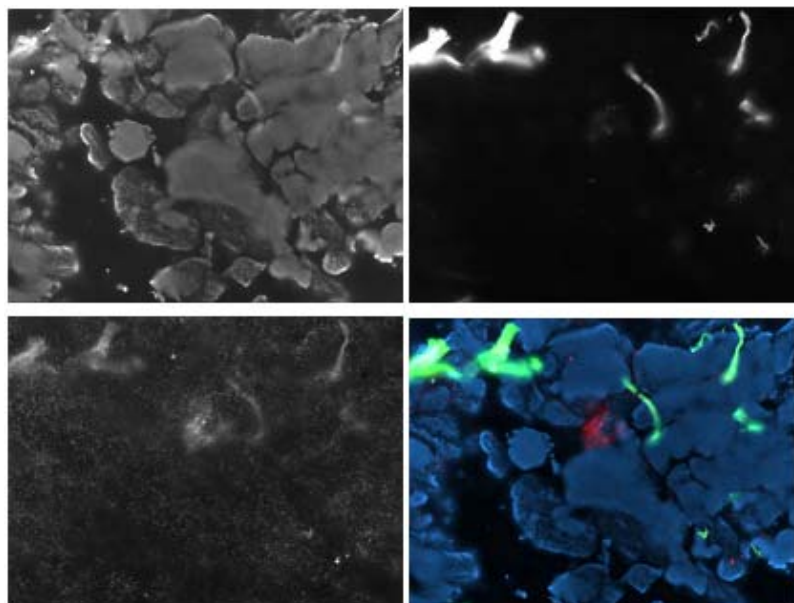


Slika 5: Princip postopka fluorescenčna in situ hibridizacija (29)

1.4.1 Fluorescenčni mikroskop

Fluorescenčni mikroskop je optični mikroskop, ki se ga uporablja za raziskavo organskih in anorganskih molekul s pomočjo fenomena fluorescence in fosforescence. Osnovne komponente, ki jih mikroskop mora vsebovati, so: vir svetlobe, ekscitacijski filter, dikromatsko ogledalo in emisijski filter. Potrebujemo močan vir svetlobe, ki zagotovi ustrezno ekscitacijsko valovno dolžino. Uporabimo lahko ksenonovo ali živosrebrno žarnico. Filtre in dikromatsko ogledalo se izbere na podlagi ekscitacijskega in emisijskega spektra fluorofora, s katerim označimo vzorec. Večbarvno sliko sestavimo iz več enobarvnih slik (21, 24). Vse slike, ki smo prikazali v diplomu, so posnete z digitalno kamero, ki posname črno-belo sliko. Nato s pomočjo programske opreme svetlinam

določimo barvo (ki običajno ustreza barvilu vezanega fluorokroma). Večbarvno sliko nato sestavimo iz več enobarvnih, kot prikazuje Slika 6.



Slika 6: Slike preparata pri uporabi različnih barvnih filtrov mikroskopa: Levo zgoraj: DAPI; Desno zgoraj: FITC; Levo spodaj: Spectrum Gold; Desno spodaj: sestavljena slika.

Z barvilom DAPI prikažemo jedra celic, zelena prikazuje izrazito avtofluorescenco. Rdeča barva pa predstavlja mRNA *LPL*.

Pri opazovanju tkiv je pogosta avtofluorescenca. To je fluorescenca molekul, ki niso fluorofori (25). Avtofluorescenca večinoma pripisujemo molekulam, kot so flavin, porfirin, NAD(P)H, kolagen, riboflavin, folna kislina, piridoksin, tirozin, triptofan in v rastlinah klorofil. Te snovi v fiksiranih in dehidriranih tkivih večinoma izločijo topila, v zmrznjenih rezinah pa se lahko ohranijo. Vedno najdemo nekaj avtofluorescence, katero lahko omejimo z uporabo izbranih filtrov in z uporabo nizkoenergetske živo-srebrne žarnice (25, 26).

Lipofuksin je naravna avtofluorescenčna snov, ki se obdrži celo v parafinskih rezinah. Problematična je lahko v določenih velikih nevronih in centralnem živčnem sistemu. Je rjavo barvilo, ki se s Sudan črnim in PAS reakcijo obarva rdeče. Ekscitira UV-modro in emitira zeleno-rumeno-oranžno. Izrazit je v nevronih ter gladkih celicah srčne mišice. Je produkt razgradnje eritrocitov. Pogosto se pojavi kot majhne znotrajcelične strukture, ki močno fluorescirajo pri svetlobi valovnih dolžin med 360 nm in 647 nm. Pri

UV svetlobi naj bi avtofluoresciral oranžno svetlobo, pri zeleni ali rumeni svetlobi naj bi ekscitiral modro svetlobo, pri rdeči svetlobi pa zeleno svetlobo.

Elastin in kolagen ekscitirata pod vplivom UV in emitirata zeleno-rumeno svetlobo. Skoraj vse arterijske žile imajo elastično membrano, ki daje avtofluorescenco. Poznana je tudi s fiksativi spodbujena fluorescenca. Aldehidni fiksativi reagirajo z amini in proteini, ki posledično tvorijo fluorescenčne molekule. Glutaraldehyd daje slabše rezultate kot formaldehyd. Avtofluorescenca je večja, če je fiksacija daljša in če poteka pri višji temperaturi. Temu se izognemo tako, da ne uporabimo aldehydov. Učinek aldehydov lahko zmanjšamo tudi z zmanjšanjem števila $-CHO$ in $-OH$ skupin v fiksativu z natrijevim boratom, glicinom ali lizinom (26).

2 NAMEN DELA

Preliminarne raziskave napovedujejo dvakrat večjo aktivnost LPL pri nedrobnoceličnem pljučem rakavem tkivu v primerjavi z okoljskim navidezno zdravim pljučnim tkivom. Povečana aktivnost LPL v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu napoveduje krajše preživetje bolnika po operaciji.

Namen našega dela je opredeliti celico, ki v NSCLC tkivu in v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu sintetizira LPL. Dokazati želimo hipotezo, da je makrofag edina celica, ki sintetizira LPL v NSCLC tkivu in v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu.

Da bi hipotezo dokazali, bomo vpeljali postopek FISH za prepoznavo mRNA *LPL* v histoloških rezinah NSCLC tkiva in v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu. Sintetizirali bomo oligonukleotide komplementarne mRNA *LPL*, jih označili s fluorescenčnim barvilom in jih v histoloških rezinah hibridizirali z mRNA *LPL*. Po odstranitvi nevezanih fluorescenčno označenih oligonukleotidov bomo emitiramo svetlobo opazovali s fluorescenčnim mikroskopom. Tako naredimo vidne mRNA *LPL* v določenih celicah. Celico, ki sintetizira LPL, bomo opredelili histološko ali z istočasnim imunokemičnim označevanjem z nekim drugim fluorescenčnim barvilom. Analizirali bomo tkiva več bolnikov z različnimi histološkimi tipi NSCLC.

Pričakujemo, da bomo domnevo potrdili. Potrjena domneva nam bo omogočila nadaljnje proučevanje mehanizmov zvečane aktivnosti LPL v rakavem tkivu na celičnem nivoju, predvsem z namenom odkrivanja novih načinov zdravljenja bolezni. Razvit in optimiziran postopek FISH je novo raziskovalno orodje, ki nam omogoča zaznavo mRNA tudi drugih genov v različnih tkivih.

3 MATERIALI IN METODE

Za uvedbo postopka FISH najprej izoliramo celokupno mRNA iz pljučnega tkiva. Izolirano mRNA prepíšemo z reverzno transkripcijo v cDNA. Nato s pomočjo specifičnih oligonukleotidov in uporabo qPCR pomnožimo tri različne segmente mRNA *LPL*. S tem dobimo tri različne dvoverižne oligonukleotide s sestavo komplementarno mRNA *LPL* in sicer dolžin 143, 134 in 144 baz. Ustreznost sinteze preverimo s kontinuiranim merjenjem fluorescence v qPCR, količino sintetiziranih oligonukleotida pa izmerimo spektrofotometrično. Kakovosti sintetiziranih komplementarnih oligonukleotidov opredelimo z agarozno gelsko elektroforezo. Po predhodnem očiščenju PCR produkta komplementarne oligonukleotide fluorescenčno označimo. Količino označenega komplementarnega oligonukleotida izmerimo spektrofotometrično in izračunamo indeks označevanja. S postopkom FISH hibridiziramo fluorescenčno označene oligonukleotide na histoloških rezinah NSCLC in rezultate pogledamo s fluorescenčnim mikroskopom.

3.1 Izolacija celokupne RNA iz pljučnega tkiva

Za izolacijo RNA iz tkiva uporabimo RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemčija). Tehnologija omogoča selektivno vezavo RNA na silikagelno membrano. Vzorec je potrebno predhodno lizirati in homogenizirati v prisotnosti gvanidin izotiocianata, ki inaktivira RNAze. Etanol dodajamo, da zagotovimo primerno okolje za optimalno vezavo RNA na membrano in s spiralnimi pufri nato odstranjujemo primesi. Visoko kvalitetno RNA nato speremo z vodo.

Potrebni reagenti:

Pri tem postopku potrebujemo naslednje reagente:

- tekoči dušik shranjen v vakuumsko izolirani posodi Apollo (Messer, Sulzbach, Nemčija);
- 70 % etanol, ki ga pripravimo iz absolutnega etanola (Merck Schuchardt, Darmstadt, Nemčija);
- RLT pufer (QIAGEN, Hilden, Nemčija), ki mu moramo pred uporabo dodati še β – merkaptetoetanol (Sigma-Aldrich[®], Misuri, ZDA). Na 1 mL RLT pufra damo 10 μ L β – merkaptetoetanol;
- RW1, spiralni pufer (QIAGEN, Hilden, Nemčija);
- RPE, spiralni pufer (QIAGEN, Hilden, Nemčija);

- voda brez RNA, HyClone HyPure™ Molecular Biology Grade Water (Thermo Scientific, Waltham, ZDA);
- kolona (QIAGEN, Hilden, Nemčija); in
- zbiralne epruvete (QIAGEN, Hilden, Nemčija).

Potrebne aparature in pribor:

- rokavice (Kimberly – Clark, Dallas, Texas, ZDA);
- 1,5 mL avtoklavirane epruvete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- pipete;
- avtoklavirani nastavki za pipete;
- digestorij Variolab Mobilien W90 (Waldner, Wangen, Nemčija);
- tehnica Atilon (Acculab, Sartorius Group, Texas, ZDA);
- ultrazvočni homogenizator (Cole Parmer, Illinois, ZDA);
- RNA komora, DNA/RNA UV-cleaner UVC/T-M-AR (Biosan, Riga, Latvija);
- stresalnik (Biosan, Riga, Latvija);
- RNaseZap® (Ambion® Inc., Austin, ZDA);
- terilnica in pestilo (Haldenwanger, Bayern, Nemčija); in
- centrifuga, Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

Princip delovanja ultrazvočnega homogenizatorja:

Ultrazvočni homogenizator deluje na osnovi generatorja in piezoelektričnega pretvornika. Generator pretvarja električno napetost v visoko frekvenčno električno energijo, ki jo piezoelektrični pretvornik prevede v mehanske vibracije. Te se nato le še okrepijo, kar ustvari številne mikroskopske mehurčke. Mehurčki se razširijo in počijo. Ta pojav imenujemo kavitacija, ki omogoča homogenizacijo.

Opis postopka:

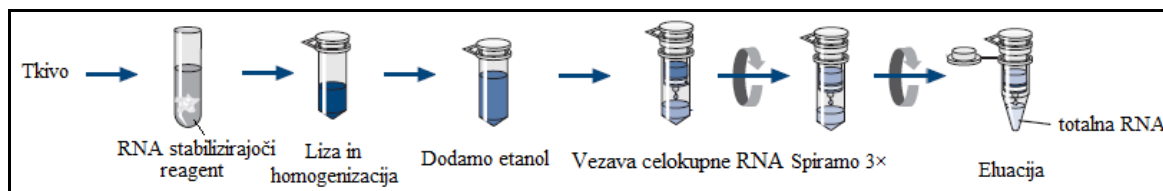
Pred delom očistimo RNA komoro in pripravimo 70 % etanol. Pufri RLT moramo dodati β – merkaptoetanol. V 1,5 mL epruveto damo 600 μ L RLT pufra in jo stehtamo. Pripravimo terilnico, pestilo in tekoči dušik. Tekoči dušik damo v terilnico in vanj prenesemo tkivo, ki ga s pestilom zdrobimo do prahu. Med procesom moramo stalno dodajati tekoči dušik. Ko imamo tkivo dovolj zdrobljeno, ga prenesemo v epruveto z RLT pufrom in jo stehtamo. Dodamo 20-30 mg tkiva.

Z etanolom in vodo očistimo ultrazvočni homogenizator in z njim homogeniziramo tkivo in RLT pufri in nato centrifugiramo 4 minute, pri 12000 \times g in pri temperaturi 23 °C (Slika 7). Po centrifugiranju supernatant odpipetiramo v svežo 1,5 mL epruveto in

dodamo 600 μL 70 % etanola in premešamo. 700 μL tekočine prenesemo na kolono z zbiralno epruveto. Centrifugiramo 30 sekund, pri $8000 \times g$ in $23\text{ }^\circ\text{C}$. Eluat zavržemo in na kolono damo ponovno 700 μL vzorca. Centrifugiramo 30 sekund, pri $8000 \times g$ in $23\text{ }^\circ\text{C}$. Po centrifugiranju zamenjamo zbiralno epruvetko in na kolono damo 700 μL pufra RW1 in centrifugiramo 30 sekund, pri $8000 \times g$ in $23\text{ }^\circ\text{C}$.

Zamenjamo zbiralno epruvetko in na kolono damo 500 μL pufra RPE in centrifugiramo 30 sekund, pri $8000 \times g$ in $23\text{ }^\circ\text{C}$. Odlijemo eluat, na kolono damo 500 μL pufra RPE in centrifugiramo 3 minute, pri $8000 \times g$ in $23\text{ }^\circ\text{C}$.

Zamenjamo zbiralno epruveto s svežo in na sredino kolone pipetiramo 50 μL vode brez RNA. Centrifugiramo 1 minuto, pri $8000 \times g$ in $23\text{ }^\circ\text{C}$. Eluat damo po centrifugiranju ponovno na kolono in ponovno centrifugiramo 1 minuto, pri $8000 \times g$ in $23\text{ }^\circ\text{C}$. S tem izboljšamo izkoristek. Eluat shranimo v primerno označeni epiči v zamrzovalniku.



Slika 7: Shematski prikaz izolacija celokupne RNA iz tkiva (32)

3.2 Prepis RNA v komplementarno DNA z reverzno transkripcijo

Za prepis RNA v cDNA uporabimo SuperScript[®] VILO[™] cDNA Synthesis Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). V procesu sodeluje encim reverzna ali obratna transkriptaza, ki omogoča prepis RNA v komplementarno DNA (cDNA). Postopek ima veliko učinkovitost sinteze cDNA in ga lahko uporabljamo pri velikih in majhnih začetnih koncentracijah RNA (do 2,5 μg celotne RNA v reakcijskem volumnu 20 μL).

Potrebni reagenti:

Potrebujemo SuperScript[®] VILO[™] cDNA Synthesis Kit, ki vsebuje 10X SuperScript[®] Enzyme Mix in 5X VILO[™] Reaction Mix.

10X SuperScript[®] Enzyme Mix vsebuje SuperScript[®] III reverzno transkriptazo, RNaseOUT[™] rekombinanten inhibitor ribonukleaz in katalitični protein. Reverzna transkriptaza ima zmanjšano RNaza aktivnost H in povečano termično stabilnost. Encim se lahko uporablja za sintezo cDNA pri temperaturi od 42 do $60\text{ }^\circ\text{C}$. Ker omenjeni encim

ni inhibiran s strani rRNA in tRNA, se lahko za sintezo cDNA uporablja celokupna RNA. RNaseOUT™ rekombinanten inhibitor ribonukleaz varuje tarčno RNA pred razgradnjo, ki bi jo lahko povzročila kontaminacija našega vzorca z endogenimi in eksogenimi ribonukleazami.

5X VILO™ Reaction Mix pa vsebuje naključne oligonukleotide začetnike, MgCl₂, dNTP in pufer, ki omogočajo optimalne pogoje za potek reakcije.

Potrebne aparature in pribor:

- rokavice (Kimberly – Clark, Dallas, Texas, ZDA);
- 500 µL avtoklavirane epruvete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- pipete;
- avtoklavirani nastavki za pipete;
- RNaseZap® (Ambion® Inc., Austin, ZDA);
- aparat za suho segrevanje in hlajenje CH-100 (Riga, Latvija);
- RNA komora, DNA/RNA UV-cleaner UVC/T-M-AR (Biosan, Riga, Latvija);
- stresalnik in centrifuga (Biosan, Riga, Latvija); in
- ciklični termostat, Primus 96 Plus Thermal Cycler, MWG AG Biotech (AG Biotech, San Juan Bautista, CA, ZDA).

Opis postopka:

Zaradi možne razgradnje RNA v vzorcu z RNAzami je potrebno delo v RNA komori, ki jo predhodno očistimo in najmanj 30 minut obsevamo z UV svetlobo. Reagenti so zelo nestabilni in dragi, zato jih imamo ves čas uporabe na ledu.

Vzorec inkubiramo 5 minut pri 65 °C. Po končani inkubaciji dodamo reagenta, kot prikazuje Preglednica V, zmešamo in centrifugiramo.

Preglednica V: Sestava reakcijske zmesi v postopku reverzne transkripcije mRNA v cDNA

Komponenta reakcijske zmesi	Volumski del v reakcijski zmesi
Vzorec	42 µL
10X SuperScript® Enzyme Mix	6 µL
5X VILO™ Reaction Mix	12 µL
Končni volumen reakcijske zmesi	60 µL

Na ledu prenesemo reakcijsko zmes do cikličnega termostata, ki poskrbi, da reakcija reverzne transkripcije pravilno poteka. Uporabimo daljši inkubacijski čas, da dobimo večjo količino cDNA in sicer 120 minut pri 42 °C.

Priporočila o izvedbi postopka:

Ker je RNA bolj občutljiva na razgradnjo kot DNA, in ker so RNAze bolj odporne kot DNAze, je potrebna previdnost pri delu z vzorcem. Da preprečimo kontaminacijo z eksogenimi in endogenimi RNAzami, delamo v čisti RNA komori. Med delom moramo večkrat zamenjati rokavice. Ker so reagenti zelo nestabilni, dragi in ni priporočeno večkratno odtajanje in ponovno zamrzovanje, hranimo reagente takrat, ko jih ne uporabljamo, na ledu.

3.3 Sinteza oligonukleotidov komplementarnih mRNA *LPL*

Za sintezo oligonukleotidov komplementarnih mRNA *LPL* uporabimo oligonukleotidne začetnike (Applied biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Komplementarne oligonukleotide sintetiziramo na 3' koncu, 5' koncu in v sredini mRNA *LPL*. Tako dobimo 3 različne komplementarne oligonukleotide dolžin 143, 134 in 144 baznih parov (bp) (Preglednica VI). Natančna sestava komplementarnih oligonukleotidov je podana v Prilogi.

Komplementarne oligonukleotide pomnožimo z qPCR. Za ta postopek uporabljamo FastStart Universal Probe Master (ROX, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, ZDA). Uspešnost pomnoževanja spremljamo z merjenjem porasta fluorescence v qPCR. Verižna reakcija s polimerazo je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin (NK). Omogoča pomnoževanje točno določenega fragmenta NK. Začetni oligonukleotidi z zaporedjem, ki je komplementarno tarčni regiji, omogočajo kontinuirano in selektivno sintezo točno določenega fragmenta NK.

Potrebni reagenti:

Reakcijska mešanica mora vsebovati:

- pufer: FastStart Universal Probe Master (ROX, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, ZDA);
- MgCl₂: FastStart Universal Probe Master (ROX, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, ZDA);
- dNTP: FastStart Universal Probe Master (ROX, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, ZDA);
- oligonukleotidne začetnike Hs01012567_m1, Hs01012569_m1 in Hs01012571_m1 (Applied biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornija, ZDA):

imamo smerni in protismerne oligonukleotide začetnike, s katerimi omejimo odseke za pomnožitev. Natančnejši podatki o tarčnih genih so v preglednici VI;

- matrica: v našem primeru je matrica cDNA, ki smo jo sintetizirali s postopkom reverzne transkripcije iz RNA;
- Taq DNA polimeraza: FastStart Universal Probe Master (ROX, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, ZDA): encim je kemijsko modificirana oblika rekombinantnega encima taq DNA polimeraza, kateri ni aktiven pri temperaturah pod 75 °C. Encim ima aktivnost samo pri višjih temperaturah, pri katerih se začetni oligonukleotidi ne vežejo nespecifično. Encim je popolnoma aktiviran pri pre-inkubacijskem koraku (95 °C, 10min); in
- avtoklavirana ultra čista voda.

***Preglednica VI:** Predeli mRNA LPL za sintezo komplementarnih oligonukleotidov in njihova dolžina*

Kataloška oznaka reagentov	Dolžina oligonukleotida	Položaj na mRNA (Ekson)
Hs01012567_m1	143 bp	2/3
Hs01012569_m1	134 bp	5/6
Hs01012571_m1	144 bp	8/9

Potrebne aparature in pribor:

- rokavice (Kimberly – Clark, Dallas, Texas, ZDA);
- 500 µL avtoklavirane epruvete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- 2,5 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL pipete;
- avtoklavirani nastavki za pipete;
- PCR komora, DNA/RNA UV-cleaner UVC/T-M-AR (Biosan, Riga, Latvija);
- stresalnik za 1,5 mL epruvete (Biosan, Riga, Latvija);
- stresalnik za mikrotitersko ploščo, Vortex-2-Genie (Scientific Industries, New York, ZDA);
- ABI PRISM 7000 (Life Technologies Coreporation, Carlsbad, Californial, ZDA);
- centrifuga CENTRIC 322A (Tehtnica, Železniki, Slovenija); in
- mikrotiterska ploščica z 96 vdolbinicami (Applied Biosystems, Foster City, California, ZDA).

Opis postopka:

Da preprečimo kontaminacijo reakcijske mešanice med njeno pripravo, uporabljamo PCR komoro. PCR komoro očistimo z 10 % etanolom, delovno površino pa še s 3 % hipokloridom. Potem obsevamo PCR komoro z UV svetlobo najmanj 30 minut. V vsako vdolbinico mikrotitrne plošče damo:

Preglednica VII: Sestava reakcijske zmesi za qPCR

Komponenta reakcijske mešanice	Volumski del v reakcijski mešanici
FastStart Universal Probe Master (ROX)	12,5 µL
Tarčni gen*	0,75 µL
Ultra dH ₂ O	10,75 µL
Vzorec ali voda	1 µL
Skupni volumen reakcijske mešanice	25 µL

*oligonukleotidni začetniki za enega od treh komplementarnih oligonukleotidov (Hs01012567_m1, Hs01012569_m1, Hs01012571_m1)

V dve vdolbinici mikrotitrne plošče damo ultra čisto dH₂O, to predstavlja slepo probo. V ostale pa damo vzorce. Na mikrotitrsko ploščo damo prozorno folijo. Pri tem pazimo, da se jo dotikamo samo ob belem robu. Mikrotitrsko ploščo pretresemo na stresalniku in centrifugiramo. Pri tem želimo vsebino reakcijske zmesi v vdolbinicah zbrati na dnu. Po centrifugiranju preverimo ali imamo v vdolbinicah mehurčke. Teh se moramo znebiti, ker lahko motijo nadaljnjo analizo. Odstranimo jih z rahlim udarjanjem ob pult in nato mikrotitrsko ploščo ponovno centrifugiramo 2 minuti pri 1900 obratih/minuto.

Nato mikrotitrsko ploščo vstavimo v aparat ABI prism in pravilno nastavimo program za potek PCR reakcije. Postopek praviloma poteka od 90 minut do 120 minut. Aparat sam regulira primerne temperature za potek reakcije.

Po končanem postopku moramo vzorec shraniti. Preden lahko odpipetiramo iz mikrotitrne ploščice moramo odstraniti prozorno folijo. Vzorce primerno označimo in shranimo v zamrzovalniku.

3.4 Analiza kakovosti sintetiziranih komplementarnih oligonukleotidov

V postopku preverimo ali imamo sintetizirane komplementarne oligonukleotide pričakovane dolžine in ali je odsotna nezaželena fragmentiranost sintetiziranih komplementarnih oligonukleotidov. Gre za potovanje negativno nabitih oligonukleotidov

proti pozitivno nabiti elektrodi, anodi. Večji oligonukleotidi skozi gel potujejo počasneje, manjši pa hitreje. Lahko pripravimo gele z različno vsebnostjo agaroze. Če povečamo koncentracijo agaroze, se hitrost potovanja molekul NK zmanjša, s tem omogočimo ločitev manjših molekul. Na elektroforezno ločbo vpliva tudi napetost, večja kot je, hitreje potuje vzorec. Pri previsoki napetosti bi se gel lahko preveč segrel, in bi se v končni fazi lahko začel topiti. Hitrost potovanja molekul vzorca je zato sorazmerna z uporabljenimi močjo električnega polja le pri nizkih napetostih, pri višjih napetostih pa se večji fragmenti začnejo gibati relativno hitro in je njihovo ločevanje slabše. Neuporabljene žepke elektroforeze lahko uporabimo tudi kasneje, če gel pravilno shranimo v hladilniku.

Potrebni reagenti:

- TAE; pufer, ki vsebuje tris baze, očetno kislino in EDTA;
- agaroz A7431 (Wide range/Standard 3:1, Sigma Aldrich[®], Misuri, ZDA);
- Sybr[®] Safe, obarva gel (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, ZDA);
- PCR markerji dolžin 1000, 750, 500, 300, 150 in 50 bp (Promega, Madison, Wisconsin, ZDA); in
- XC, ksilen cianol (Promega, Madison, Wisconsin, ZDA).

Potrebne aparature in pribor:

- nitrilne rokavice (Kimberly – Clark, Dallas, Texas, ZDA);
- navadne rokavice (Kimberly – Clark, Dallas, Texas, ZDA);
- čistilni sistem za vodo, Purelab classic (ELGA, Massachusetts, ZDA);
- mikrovalovna pečica, OptiQuick compact (Moulinex, Pariz, Francija);
- erlenmajerica;
- urno steklo;
- tehtnica Exacta 300 EB (Tehtnica, Železniki, Slovenija);
- parafilm (Menasha, Chicago, ZDA);
- aparatura za poslikavo gela, G:BOX (Syngene, Cambridge, UK); in
- aparatura za uravnavanje električnega toka, električne napetosti in časa za potek elektroforeze, PowerPac Basic (BIO-RAD, Kalifornija, ZDA).

Opis postopka:

Pripravimo 1 × TAE. Z merilnim valjem odmerimo 20 mL 50 × TAE in prenesemo v 1000 mL merilni valj ter dolijemo vodo do oznake. V erlenmajerico zatehtamo 1,5 g agaroze in dodamo 75 mL 1 × TAE. Ker se agaroz slabo topi, si pomagamo s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Še prej pa moramo stehati erlenmajerico, da bomo

lahko potem dodali vodo, ki med segrevanjem v mikrovalovni pečici odpari. Da malo omilimo izparevanje, pokrijemo erlenmajerico z urnim steklom.

V digestoriju gelu dodamo barvilo Sybr® Safe in gel vlijemo v model, vstavimo glavniček ter počakamo 20 minut, da se gel strdi. Po dodatku Sybr® Safe se gela dotikamo samo z vijoličnimi nitrilnimi zaščitnimi rokavicami.

V elektroforezno kadičko damo $1 \times$ TAE pufer. Ko se agarozni gel strdi, ga damo v kadičko in gel popolnoma prekrijemo z $1 \times$ TAE pufrom. Na parafilm nakapamo $3 \mu\text{L}$ XC kapljice. V eno XC kapljico vmešamo $3 \mu\text{L}$ vode in damo v žepček gela. V drugo XC kapljico damo $3 \mu\text{L}$ PCR markerjev in damo v 2. žepček gela in nato damo v naslednje XC kapljice $2 \mu\text{L}$ vzorca in damo v naslednje žepke gela.

Kadičko pokrijemo in nastavimo električni tok na 400 mA, električno napetost na 100 V in čas na 20 minut.

Po končanem postopku elektroforeze lahko gel tudi poslikamo.

3.5 Merjenje koncentracije neoznačenih komplementarnih oligonukleotidov z Nanodrop-om

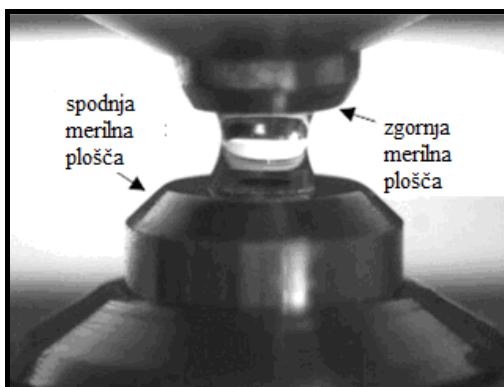
NanoDrop je spektrofotometer, ki omogoča merjenje koncentracije v $1 \mu\text{L}$ vzorca z visoko točnostjo in natančnostjo. Absorbanco lahko merimo v območju valovnih dolžin od 220 do 750 nm. NanoDrop omogoča merjenje visokih koncentracij brez redčenja (tudi do 50-krat višje koncentracije vzorca kot pri merjenju s standardnim spektrofotometrom).

Potrebni reagenti, pripomočki in aparature:

- pipeta (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- pipetni nastavki (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- RNase Zap® (Ambion® Inc., Austin, ZDA);
- destilirana voda; in
- spektrofotometer NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Delaware, ZDA).

Opis postopka:

Z vodo moramo najprej izmeriti slepo probo. Pipetiramo $1 \mu\text{L}$ vode na konec vlaknastega optičnega kabla. Sekundarno optično vlakno nato počasi približamo primarnemu z vzorcem, kar povzroči tvorbo tekočinskega mostu med optičnima vlaknoma (Slika 8). Razmik med optičnima vlaknoma je med 0,2 mm in 1 mm. Ksenonova žarnica zagotovi vir svetlobe, ki jo spektrofotometer pošlje skozi tekočinski most.



Slika 8: tekočinski most pri merjenju koncentracije z NanoDropom 1000 (30)

Ko izmerimo slepo probo, izmerimo še koncentracije v vzorcih. Poleg koncentracije nukleinskih kislin v vzorcu dobimo tudi dve dodatni razmerji. Prvo je razmerje $\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$, drugo je razmerje $\frac{A_{260nm}}{A_{230nm}}$. Razmerje $\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$ mora biti v območju 1,8-2,2. V primeru, da je razmerje pod 1,8 so v vzorcu prisotni proteini, fenoli in druge kontaminacije, ki absorbirajo pri valovni dolžini 280nm. Razmerje $\frac{A_{260nm}}{A_{230nm}}$ nam pove nekaj o čistosti nukleinskih kislin. Referenčno območje za to razmerje je od 1,8-2,2. V primeru, da razmerje pade pod 1,8, to nakazuje na prisotnost kontaminacije vzorca.

3.6 Priprava histoloških rezin tkiva za analizo FISH

Med operacijo je bilo tkivo odvzeto bolniku z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Odvzeto je bilo rakavo spremenjeno tkivo in normalno tkivo – odvzeto nekaj centimetrov stran od rakavega tkiva istega bolnika. Tkivo razrežemo na pol in prvo polovico damo v raztopino 4 % paraformaldehida. Tako pripravljeno tkivo najkasneje v 24-ih urah prenesemo na Golnik, kjer potrdijo ustreznost tkiva. Drugo polovico tkiva zamrznemo v tekočem dušiku in v najkrajšem možnem času prenesemo na Inštitut za anatomijo.

Potrebni reagenti:

- 4 % paraformaldehid (Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA);
- metanol (Merck Schuchardt OHG, Darmstadt, Nemčija);
- PBS, spiralni pufer;
- 30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 95 % in 100 % etanol pripravimo iz absolutnega alkohola (Kemika, Zagreb, Hrvaška); in

- silikagel (Merck Schuchardt OHG, Darmstadt, Nemčija).

10 × PBS, za pripravo 500mL raztopine zatehtamo:

- 40 g NaCl (Merck Schuchardt OHG, Darmstadt, Nemčija);
- 7,12 g Na₂HP0₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška);
- 1 g KCl (Kemika, Zagreb, Hrvaška); in
- 1 g KH₂P0₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška).

Kontrola pH vrednosti ni potrebna, saj znaša pH vrednost raztopine med 6,8-7,0. Raztopini dodamo DEPC, hranimo v hladilniku ali zamrzovalniku.

1 × PBS:

50 mL 10 × PBS vzamemo iz zamrzovalnika ali hladilnika en dan pred poizkusom. Dodamo 450 mL MQ vodo. Inkubiramo z DEPC in avtoklaviramo.

Potrebne aparature in pribor:

- shranjevanje v tekočem dušiku, AIR LIQUID ARPEGE 70 (LabEchange, Burladingen, Nemčija);
- lepilo Jung Tissue Freezing medium (Biocompare, Kalifornija, ZDA);
- kovinsko držalo (Reichert – Jung, New York, ZDA);
- kriostat 2800 FRIGOCUTN (Reichert – Jung, New York, ZDA);
- mikrovalovna pečica (BOSCH, Stuttgart, Nemčija);
- kivete s pokrovom;
- predmetna stekelca, sterilna; in
- suhi sterilizator VBS-1 (Termo-Medicinski aparati, Zagreb, Hrvaška).

Opis postopka:

Tkivo vzamemo iz tekočega dušika in ga pritrdimo na kovinsko držalo s pomočjo lepila Jung Tissue Freezing medium. Da se izognemo kontaminaciji, očistimo kriostat z metanolom in uporabljamo sterilna stekelca. Stekelca steriliziramo tako, da jih naložimo v čašo, jo ovijemo s folijo in vse skupaj damo v suhi sterilizator. Steriliziramo lahko 8 ur na 180 °C ali čez noč na 160 °C.

Nato kovinsko držalo vpnemo v kriostat in začnemo z rezanjem. Rezine debeline 10 μm naneseemo na sterilno predmetno stekelce. Nato je potrebna fiksacija in dehidracija. Fiksiramo s 4 % paraformaldehidom 20 minut. Paraformaldehid je že pripravljen, vzamemo ga iz zamrzovalnika in ga odtajamo v mikrovalovni pečici in ga nato damo za

nekaj minut v hladilnik. Ohlajen paraformaldehid je nato primeren za postopke fiksacije. S postopkom fiksacije ustavimo avtolitične procese ter ohrani morfološke in kemijske lastnosti celic.

Nato spiramo s PBS, 3×5 minut. Na koncu sledi dehidracija z etanolnimi raztopinami naraščajoče koncentracije. Začeli smo s 30 %, 50%, 70 %, 85 %, 95 % in končali s 100 % etanolom. V vsakem etanolu je preparat po 2 minuti. Posušimo na zraku in nato zložimo v shranjevalno škatlo in v papirnato brisačo zavijemo silikagel in ga damo v škatlo. Nato je sledil prenos v Specializiran hematološki laboratorij, Kliničnega oddelka za hematologijo, UKC Ljubljana, kjer stekelca shranimo v zamrzovalniku.

3.7 Čiščenje komplementarnih oligonukleotidov

Ker imamo v reakcijski mešanici poleg komplementarnih oligonukleotidov tudi druge primesi (oligonukleotidni začetniki, dNTP itd.), ki bi lahko motile nadaljnje postopke, moramo PCR produkt predhodno očistiti.

Uporabimo Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA). S tem postopkom lahko očistimo oligonukleotide velike od 100 bp do 10 kb. Princip temelji na vezavi oligonukleotida v prisotnosti kaotropičnih soli na membrano. Ostale komponente vzorca nato speremo s kolone in na koncu eluiramo oligonukleotid z DEPC vodo v sterilno zbiralno epruveto. Na kolono se lahko veže največ 40 μ g oligonukleotida in s kolono lahko očistimo največ 1mL vzorca. S tem postopkom odstranimo večino nukleotidov in ≥ 90 % začetnih oligonukleotidov.

Kot je iz preglednice VIII razvidno, je glede na velikost našega oligonukleotida izkoristek 85 %. Iz preglednici IX pa je razvidno, da je glede na naš volumen spiralnega pufra izkoristek 98 – 100 %.

Preglednica VIII: Izkoristek po čiščenju glede na velikost oligonukleotidov

Velikost sonde	Izkoristek po čiščenju
100 bp	85 %
200 bp	87 %
500 bp	91 %
1000 bp	92 %
1500 bp	92 %
3199 bp	87 %

Preglednica IX: izkoristek po čiščenju glede na elucijski volumen

Elucijski volumen	Izkoristek po čiščenju
10 μL	35 %
15 μL	98 %
25 μL	98 %
50 μL	100 %
75 μL	100 %
100 μL	100 %

Potrebni reagenti:

- kolona (Promega, Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA);
- pufer, ki veže oligonukleotid na membrano, vezavni pufer (Promega, Wisconsin, ZDA);
- spiralni pufer (Promega, Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA);
- DEPC voda (Ambion, Austin, ZDA);
- 10 % hipoklorid; in
- RNase Zap čistilni robčki (Ambion, Austin, ZDA).

Dietilpirokarbonat, dietil dikarbonat (po IUPACu) in dietil oksiformat so imena iste spojine, ki jo lahko skrajšamo v DEPC. DEPC se dodaja vodi za inaktivacijo RNAz. DEPC vodo uporabimo v laboratoriju, da zmanjšamo tveganje razgradnje RNA z RNAzami.

Do inaktivacije pride s kovalentno modifikacijo histidinskih ostankov. DEPC se ne sme uporabljati s TRIS pufrom ali HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina), ker inaktivirata DEPC. Najpogosteje pripravljamo 0,1 % raztopine DEPC v vodi, pustimo 1 uro pri 37 °C in jo nato avtoklaviramo, da inaktiviramo sledi DEPC. Čeprav višje koncentracije DEPC lahko inhibirajo večje količine RNAz, lahko neodstranjen DEPC inaktivira biokemijske reakcije, npr. in vitro translacijo.

Potrebne aparature in pripomočki:

- rokavice duoShield (PFT Corporation, Malezija);
- rokavice, debelejše za čiščenje s hipokloridom (WRP, Ehsan, Malezija);
- centrifuga Biofuge pico (Heraeus, Hanau, Nemčija); in
- laminarna komora LFVP12 (IskraPIO, Šentjernej, Slovenija).

Opis postopka:

Delo poteka v laminarni komori, da bi se lahko izognili kontaminaciji vzorca. Očistimo celotno laminarno komoro z 10 % hipokloritom in RNase Zap čistilnimi robčki. Nato sestavimo kolono in 2 mL zbiralno epruveto. Zmešamo vzorec in enako količino vezavnega pufra in damo na kolono. Inkubiramo 1 minuto pri sobni temperaturi. Nato centrifugiramo 1 minuto pri $16000 \times g$ (13000 obratov/minuto) pri sobni temperaturi. Zavržemo zbiralno epruveto skupaj s filtratom in na kolono damo novo 2 mL zbiralno epruveto. Na kolono naneseemo 700 μL spiralnega pufra in centrifugiramo 1 minuto pri $16000 \times g$ (13000 obratov/minuto) pri sobni temperaturi. Zavržemo zbiralno epruveto skupaj s filtratom in na kolono damo novo 2 mL zbiralno epruveto. Na kolono naneseemo 500 μL spiralnega pufra in centrifugiramo 5 minut pri $16000 \times g$ (13000 obratov/minuto) pri sobni temperaturi. Zavržemo filtrat, na kolono damo novo 2 mL zbiralno epruveto in centrifugiramo 1 minuto pri $16000 \times g$ (13000 obratov/minuto) pri sobni temperaturi. Zavržemo filtrat in na kolono damo sterilno 1,5 mL epruveto, ki jo primerno označimo. Na sredino kolone damo 50 μL DEPC vode. Inkubiramo 1 minuto pri sobni temperaturi in centrifugiramo 1 minuto pri $16000 \times g$ (13000 obratov/minuto) pri sobni temperaturi. Zavržemo kolono, 1,5 mL epruveto pa shranimo za nadaljnjo analizo.

3.8 Merjenje koncentracije očiščenih neoznačenih in označenih komplementarnih oligonukleotidov s spektrofotometrom Lambda 20 BIO

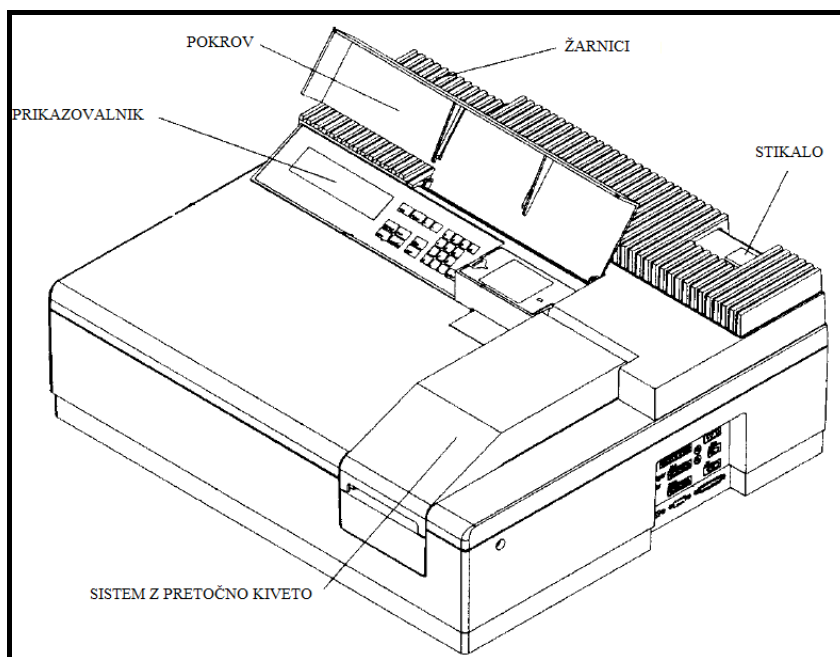
Spektrofotometer se uporablja za UV-VIS rutinske analize. Kot vir svetlobe imamo devterijevo in halogensko žarnico. Devterijeva žarnica se uporablja za meritve v UV območju, halogenska žarnica pa se uporablja za meritve v vidnem in bližnjem UV območju. Aparat ima pretočno kiveto, ki je stalno vstavljena v prostor za kivete in dovoljuje večje število meritev na časovno enoto. Pomanjkljivosti teh kivet, zlasti tistih z majhnim volumnom je, da kljub spiranju ostane v kiveti še nekaj predhodnega vzorca, kar lahko povzroča napake pri meritvi. Temu pojavu pravimo vpliv predhodnega vzorca.

Potrebni reagenti, pripomočki, aparature:

- DEPC voda (Ambion[®] Inc., Austin, ZDA);
- 70 % etanol;
- NaOH; in
- spektrofotometer Lambda 20 BIO (PerkinElmer, Massachusetts, ZDA) (Slika 9).

Opis postopka:

Sistem cevk moramo predhodno očistiti. To naredimo tako, da skozi sistem cevi spustimo naslednje raztopine: DEPC voda, 70 % etanol, DEPC voda, NaOH in DEPC voda. Nato v kiveto posrkamo vodo za slepo probo in nato vzorec. Paziti moramo, da v merilnem območju pretočne kivete ni nobenega mehurčka in da imamo samo tekočino, kateri želimo meriti absorbanco. Vzorec predhodno razredčimo v razmerju 1:10 (5 μ L vzorca v 45 μ L DEPC vode).



Slika 9: Spektrofotometer Lambda 20 BIO (31)

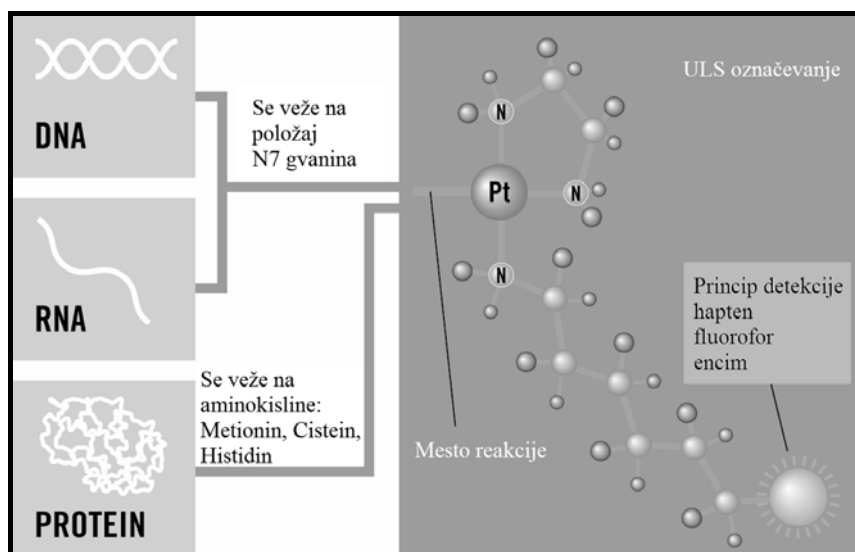
3.9 Označevanje komplementarnih oligonukleotidov vzdolž verige

Za označevanje sond uporabimo FISHBright[™] Nucleic acid Labeling Kit (Kreatech, Amsterdam, Nizozemska). Reagenti nam omogočajo ne-encimsko označevanje FISH sond. Barvilo, ki ga v tem postopku uporabimo, je FISHBright[™] 550 Orange (preglednica X).

Preglednica X: Lastnosti FISHBright™550 Orange

Ime	ULS barva/hapten	Abs (nm)	Em (nm)	Ekstinkcijski koeficient
FISHBright™550 Red/Orange	ULS-RHO	553	576	95 000

Označevanje omogoča stabilna vezava platine na biomolekule. Molekula ULS je kompleks platine, ki se veže na položaj N7 v gvaninu DNA in RNA (Slika 10). V beljakovinah se barvilo veže na dušik ali žveplo metionina, cisteina ali histidina.



Slika 10: Princip vezave barvila ULS (33)

Za uspešno označevanje sonde moramo imeti vzorec brez dvovalentnih kationov (Mg^{2+} itd.), soli in drugih izpiralnih pufrov, ki lahko motijo učinkovitost označevanja. Označevanje je učinkovito pri koncentracijah nukleinskih kislin nad 50×10^6 ng/L. Velikost sonde mora biti med 100 in 300 bp.

Potrebni reagenti:

- DEPC voda (Ambion® Inc., Austin, ZDA);
- ULS barvilo (Kreatech, Amsterdam, Nizozemska);
- $10 \times$ označevalna raztopina (Kreatech, Amsterdam, Nizozemska); in
- kolone KREApure za čiščenje po označevanju (Kreatech, Amsterdam, Nizozemska).

Potrebne aparature in pripomočki:

- rokavice duoShield (PFT Corporation, Malezija);
- centrifuga Biofuge pico (Heraeus, Hanau, Nemčija);
- laminarna komora LFVP12 (IskraPIO, Šentjernej, Slovenija);

- vodna kopel VKNP (Thermoproc, Črnuče, Slovenija);
- stresalnik (Vibromix, Tehtnica, Slovenija); in
- parafilm (Menasha, Chicago, ZDA).

Opis postopka:

Centrifugiramo vse potrebne reagente, da se raztopina zbere na dnu epruvete. Vzamemo 1 μg nukleinske kisline in dodamo 2 μL ULS barvila na 1 μg NK. Dodamo 1/10 končnega volumna označevalne raztopine (preglednica XI).

Preglednica XI: Primer reakcijske mešanice za ULS označevanje

Reagent	Volumen
Vzorec v DEPC vodi	16 μL
ULS barvilo	2 μL
10 \times označevalna raztopina	2 μL
Končni volumen	20 μL

Reakcijsko mešanico inkubiramo 30 minut pri 85 °C. Po končani inkubaciji postavimo vzorec na led. Pred čiščenjem s pomočjo kolon KREApure reakcijsko mešanico še centrifugiramo, da zberemo vsebino na dnu epruvete.

Čiščenje s kolonami KREApure:

Resuspendiramo kolono s stresalnikom. Odpremo pokrovček in odstranimo dno kolone. Kolono postavimo na 2 mL zbiralno epruveto. Centrifugiramo 1 minuto pri 20800 \times g (14 000 obratov/minuto). Zavržemo filtrat in ponovno uporabimo zbiralno epruveto. Speremo kolono s 300 μL DEPC vode. Centrifugiramo in zavržemo zbiralno epruveto skupaj s filtratom. Dodamo ULS označeno sondo na kolono. Centrifugiramo 1 minuto pri 20800 \times g (14 000 obratov/minuto). Zbiralno epruveto primerno označimo in shranimo. Še preden vzorec zamrznemo izmerimo indeks označevanja (DoL). DoL izmerimo po spodnji formuli:

$$X = 10^6 \text{ ng (NK)/L} = \frac{A_{260} \times 50 \times \text{redčenje}}{\text{dolžina kivete [cm]}}$$

$$Y = 10^6 \text{ pmol (barvilo)/L} = \frac{A_{550} \times \text{redčenje}}{\text{dolžina kivete [cm]} \times \epsilon(\text{barvilo}) \times 10^{-6}}$$

$$\text{DoL} = \frac{340 \times Y \times 100\%}{X \times 1000}$$

Enačba 1: Enačbe za izračun indeksa označevanja (DoL) (33)

Po priporočilih proizvajalca naj bi bile vrednosti DoL za cDNA med 1,0 – 3,6 %.

3.10 Označevanje komplementarnih oligonukleotidov s tvorbo repka na 3` koncu

Komplementarne oligonukleotide naredimo vidne s fluorescenčnim označevanjem. Pri tej metodi naprej sintetiziramo rep na 3`koncu komplementarnega oligonukleotida. Mednje se vgradi tudi dUTP z digoksigeninom. Nato po postopku hibridizacije, v katerem komplementaren oligonukleotid z repom hibridizira na mRNA *LPL* v histoloških rezinah, dodamo fluorescenčno označeno protitelo.

Za označevanje uporabimo DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd Generation (Roche, Mannheim, Nemčija).

Potrebni reagenti:

- 1 mM DIG – 11 – dUTP (Roche, Mannheim, Nemčija);
- Mešanica dNTP-jev (Roche, Mannheim, Nemčija);
- reakcijski pufer (Roche, Mannheim, Nemčija);
- raztopina CoCl_2 (Roche, Mannheim, Nemčija);
- terminalna transferaza (Roche, Mannheim, Nemčija);
- DEPC voda (Ambion[®] Inc., Austin, ZDA);
- EDTA; in
- protitelo anti-digoksigenin-rodamin (Roche, Mannheim, Nemčija).

Potrebni aparature in pripomočki:

- sterilne črne epruvete;
- rokavice (Kimberly – Clark, Dallas, Texas, ZDA);
- pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- nastavki za pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- Minispin (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- stresalnik (Tehtnica, Železniki, Slovenija); in
- parafilm (Menasha, Chicago, ZDA).

Opis postopka:

- zmešamo 9 volumskih delov 1 mM DIG-11-dUTP in 1 volumski del mešanice dNTP. Tako dobimo označevalno mešanico;
- damo 100 pmol komplementarnega oligonukleotida v DEPC vodo do končnega volumna 10 μL ;

- dodamo sledeče reagente na led:

Reagent	Volumen
Reakcijski pufer	4 μ L
Raztopina CoCl_2	4 μ L
Označevalna mešanica	1 μ L
Terminalna transferaza	1 μ L

- zmešamo in centrifugiramo za nekaj sekund;
- inkubiramo 15 minut pri 37 °C. Nato položimo na led;
- reakcijo ustavimo z dodatkom 2 μ L 0,2 M EDTA (pH 8,0);
- sondo po predhodni denaturaciji nanesemo na prej pripravljene rezine (postopek FISH) in pustimo hibridizirati čez noč;
- po končanem postopku hibridizacije speremo in dodamo protitelo anti-digoksinin-rodamin in inkubiramo 90 minut pri 37 °C. Protitelo je liofilizirano in ga je potrebno predhodno raztopiti v 1 mL DEPC vode in nato še razredčiti v razmerju 1:200. Nato ponovno speremo 2 minuti v PBT; in
- mikroskopiramo.

3.11 Fluorescenčna *in situ* hibridizacija

Fluorescenčna *in situ* hibridizacija ali FISH prepozna in označi tarčno nukleotidno zaporedje tako, da lahko preučujemo njegovo nahajališče ali spremembo. Označene sonde hibridiziramo na metafazne kromosome, jedrni interfazni kromatin ali v našem primeru na mRNA. Po spiranju pregledamo preparat s fluorescenčnim mikroskopom.

Potrebni reagenti:

- 100 %, 100 %, 95 %, 90 %, 85 %, 70 %, 70 %, 50 %, 30 % etanol (pripravljeno iz absolutnega etanola Sigma aldrich, Nemčija);
- 0,2 M HCl;
- DEPC voda (Ambion[®] Inc., Austin, ZDA);
- 1 \times PBS, fosfatni pufer;
- 2 \times SSC, standardni natrijev citrat;
- raztopina pepsina;
- raztopina paraformaldehida ali formaldehida za refiksacijo;

- NP – 40, nonil fenoksipolietoksiletanol;
- PBT;
- Trietanolamin (TEA) z anhidridom očetne kisline; in
- DAPI II Counterstain (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, Illinois, ZDA).

Priprava 20 × SSC:

- 175,3 g NaCl (Sigma-Aldrich, Nemčija); in
- 88,25 g Na₃C₆H₅O₇ × 2H₂O, natrijev citrat dihidrat (Kemika, Hrvaška).

Dolijemo vodo do 1 L, uravnamo pH vrednost na 6,3 z 1 M HCl ali 1 M NaOH in dopolnimo do oznake z DEPC vodo. Prefiltriramo preko 0,45 μm filtra. Hranimo pri sobni temperaturi in zavržemo po 6-ih mesecih ali prej, če postane raztopina motna.

Priprava 2 × SSC:

Zmešamo 100 mL 20 × SSC in 850 mL DEPC. Uravnamo pH vrednost na 7,0 ± 0,2 z 1 M NaOH ali 1 M HCl. Dopolnimo z DEPC vodo do 1000 mL.

Priprava 10 × PBS:

- 80 g NaCl (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 2 g KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 2 g KH₂PO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška); in
- 14,41 g Na₂HPO₄ × 2H₂O (Kemika, Zagreb, Hrvaška)

Zmešamo vse kemikalije in jih raztopimo v 1000 mL bučki. Naravnamo pH vrednost na 7,4 in prefiltriramo skozi 0,45 μm filter. Hranimo pri sobni temperaturi in zavržemo p 6 – ih mesecih ali prej, če postane raztopina motna.

Priprava 1 × PBS:

100 mL 10 × PBS zlijemo v 1000 mL bučo. Dolijemo DEPC ter preverimo pH vrednost. Če je potrebno jo naravnamo na 7,4.

Priprava raztopine formaldehida:

Raztopino pripravimo v 100 mL bučko. 5 mL 1 M MgCl₂ (Lekarna KC Ljubljana), 2,5 mL 37 % formaldehida (Sigma-Aldrich, Nemčija), do 100 mL dopolnimo z 2 x SSC.

Priprava raztopine paraformaldehida:

Zatehtamo 2 g paraformaldehida (Sigma chemical company, Missouri, ZDA) in ga

vsujemo v sterilno stekleničko. Dodamo 30 mL DEPC vode. Mešamo in segrevamo do 60 °C, raztopino ohladimo. Dodamo 2 kapljici 5 M NaOH, da se raztopina zbistri. Dodamo 5 mL 10 × PBS-a in dolijemo DEPC vodo do 50 mL. Raztopino nato prefiltriramo preko 0,45 µm filtra in shranimo v hladilniku.

Priprava spiralne raztopine po hibridizaciji NP-40:

V reagenčno steklenico pripravimo: 0,9 g detergenta NP – 40 (BDH Chemicals, Anglija), dodamo 60 mL 20 x SSC (pH=6,3) in 240 mL DEPC vode. Raztopino pustimo stati čez noč, da se detergent zanesljivo raztopi, nato prefiltriramo preko 0,2 µm filtra v prej sterilizirano reagenčno steklenico. Hranimo v hladilniku in zavržemo takoj, ko se pojavi motna usedlina.

Priprava PBT:

V 500 mL bučko pripravimo 2 mL BSA (Ortho-Clinical Diagnostics, ZDA) in 0,5 mL Tween 20 (Sigma-Aldrich, Nemčija). Dopolnimo do oznake z 1 x PBS pufrom. Raztopino pustimo stati čez noč, da se detergent zanesljivo raztopi, nato jo prefiltriramo preko 0,2 µm filtra v prej sterilizirano reagenčno steklenico. Hranimo v hladilniku.

Priprava 1 M HCl:

4,24 mL konc. HCl (36 %) (Kemika, Hrvaška) dodamo v 50 mL bučko z nekaj destilirane vode in dopolnimo do oznake.

Priprava 0,2 M HCl:

Zmešamo 15 mL 1 M HCl in 60 mL 1 × PBS.

Priprava raztopine pepsina:

Zmešamo 9,7 mL DEPC vode, 100 µL 1 M HCl, 200 µL pepsina.

Raztopina TEA z anhidridom očetne kisline:

1.34 mL TEA (Merch, Darmstadt, Nemčija) in dopolnimo so 100 mL oznake z DEPC vodo. Tik pred uporabo dodamo 500 µL anhidrida očetne kisline (Sigma Aldrich, Nemčija).

Potrebne aparature in pripomočki:

- sterilne kivete s pokrovom;
- sterilni merilni valj;
- sterilne bučke s pokrovom;
- čaša;
- pinceta;
- staničevina;
- pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- nastavki za pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- stresalnik (Tehtnica, Železniki, Slovenija);
- tesnilo FixoGum (Marabo, Bietigheim-Bissingen, Nemčija);
- krovno stekelce;
- stojalo;
- Molecular ThermoBrite™ StatSpin (Abbott, Abbott Park, Illinois, ZDA);
- mikroskop (Olympus BX 41, Pennsylvanija, ZDA); in
- vir svetlobe za ekscitacijo, Olympus U-RFL-T (Olympus, Pennsylvanija, ZDA).

Opis postopka:

- ogrevamo rezine na sobno temperaturo (Thermoproc, Črnuče, Slovenija);
- rehidriramo v padajočih koncentracijah etanolnih raztopin: 100 %, 95 %, 85 %, 70 %, 50 % in 30 % etanol. V vsakem 2 minuti, Sobna temperatura (ST);
- 0,2 M HCl 20 minut ST;
- DEPC voda, 3 minute ST;
- 1×PBS 3 minute ST;
- raztopina pepsina 20 minut pri 37 °C: na vsako stekelce kanemo 10 µL raztopine, damo stekelce v vlažno komoro in vse skupaj damo v inkubator;
- 2×SSC, 2 minuti, ST;
- 2×SSC, 2 minuti, ST;
- Formaldehidna raztopina, 10 minut, ST ali raztopina paraformaldehida, 2 minuti, ST;
- 2×SSC, 2 minuti, ST;
- 2×SSC, 2 minuti, ST;

- acetiliramo v raztopini TAE z anhidridom očetne kisline: TAE damo v kiveto, vanje damo stekelca. Damo jih na magnetno mešalo in dodamo anhidrid očetne kisline;
- 2×SSC, 2 minuti, ST;
- 2×SSC, 2 minuti, ST;
- 70 % EtOH, 2 minuti, ST;
- 90 % EtOH 2 minuti, ST;
- 100 % etanol, 2 minuti, ST;
- stekelca osušimo;
- naneseemo denaturirane označene sonde, prej jih pretreseemo in centrifugiramo. Ker imamo dvoverižne sonde, jih predhodno denaturiramo, da bo lahko kasneje hibridizacija potekla. Sonde pred denaturacijo zmešamo s CHP (celični hibridizacijski pufer). 1 μL označene sonde dodamo 11 μL CHP. Sonde denaturiramo tako, da jih damo v vodno kopel s temperaturo 85 °C za 10 minut;
- na stekelca naneseemo 10 μL označene sonde in pokrijemo s krovnim steklom ter zatesnimo s tesnilom FixoGum;
- damo jih v aparat, kateri regulira temperaturo pri kateri poteka hibridizacija 16 ur (čez noč) pri 37 °C;
- odstranimo krovno steklo;
- NP-40 73 °C, 4 minute;
- PBT, ST, 4 minute;
- dodamo 10 μL DAPI II, ki nam obarva jedra, kar omogoči lažje opazovanje;
- pokrijemo s krovnim steklom, ne smemo imeti nobenih mehurčkov, s staničevino odstranimo ostanke tesnila; in
- mikroskopiramo

Ker so sonde fluorescenčno označene, moramo imeti stekelca po nanosu sond čim manj izpostavljena dnevni svetlobi. Vidna svetloba zmanjša fluorescenčno sposobnost, sonde s časom zbledijo. Intenziteto fluorescence povečamo tako, da damo stekelca po postopku spiranja za nekaj minut v zamrzovalnik.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Predhodne raziskave so pokazale, da je aktivnost LPL v NSCLC tkivu večja kot v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu. Povečana aktivnost močno napoveduje krajše preživetje bolnikov (34). V raziskavi smo nameravali ugotoviti katera celica v NSCLC tkivu sintetizira LPL. Makrofagi dokazano sintetizirajo LPL. Tako na primer vemo, da v aterosklerotični žilni steni makrofag sintetizira velike količine LPL in da LPL pomembno prispeva k razvoju ateroskleroze (35). V literaturi nismo zasledili, da bi pred nami že bilo preučeno mesto sinteze LPL v NSCLC tkivu.

4.1 Zbiranje vzorcev in priprava zmrznjenih rezin

Zbrali smo rakava in zdrava pljučna tkiva 5-ih bolnikov z NSCLC tkivom. Preglednica XII prikazuje klinične značilnosti bolnikov z NSCLC. Del tkiva je bil zamrznjen v tekočem dušiku in transportiran na Inštitut za Anatomijo, Medicinske fakultete v Ljubljani, del pa je bil fiksiran v paraformaldehidu in transportiran v laboratorij za citologijo in patologijo na Golniku. Na Inštitutu za Anatomijo so pripravili zmrznjene rezine tkiva. Uporabili so njihov utečen postopek priprave zmrznjenih rezin. Skrajšali smo le postopek sušenja rezin na sobni temperaturi. Predvidoma bi morali po rezanju pustiti rezine na sobni temperaturi 30 minut. Ta postopek smo izpustili in se s tem poskusili izogniti možni kontaminaciji z RNAzami. Poleg rokavic iz blaga, s katerimi smo se zaščitili pred mrazom, smo uporabljali tudi plastične rokavice. Slednje zaradi možne kontaminacije vzorca z RNAzami. Kriostat smo predhodno očistili z metanolom. Zmrznjene rezine pljučnega tkiva smo nato transportirali v Specializirani hematološki laboratorij, KO za hematologijo, UKC Ljubljana, in jih shranili v zamrzovalniku.

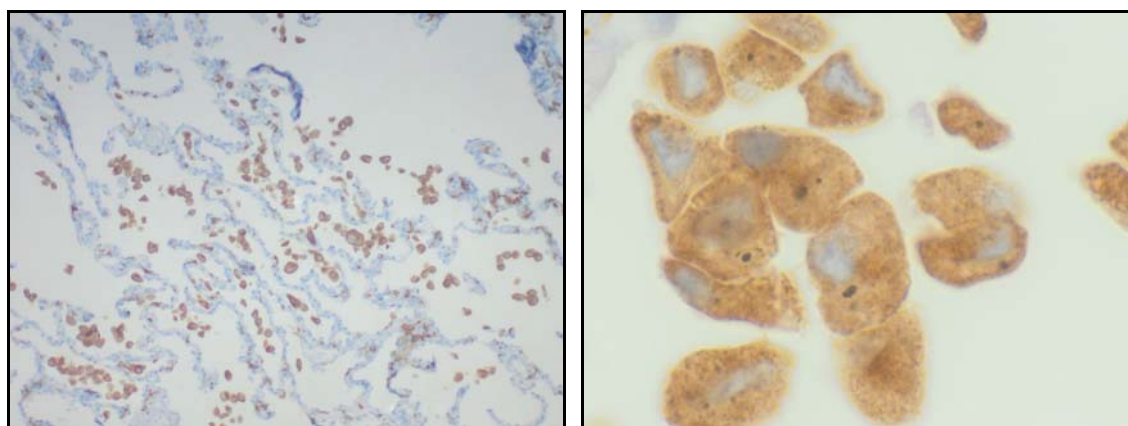
Na Golniku so iz fiksiranega tkiva pripravili parafinske rezine. Preparate smo pregledali s svetlobnim mikroskopom. Na podlagi teh slik je bil določen histološki tip NSCLC, ki je podan v preglednici XII.

Preglednica XII: Klinične značilnosti bolnikov z NSCLC

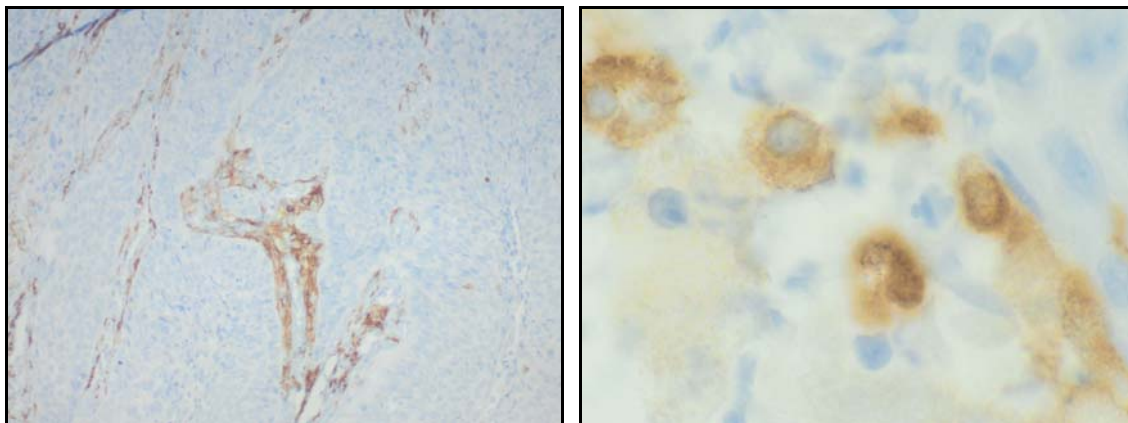
Bolnik	Spol	Starost	Tip NSCLC
1	moški	55 let	Ploščatocelični karcinom
2	moški	61 let	Ploščatocelični karcinom
3	moški	56 let	Adenokarcinom
4	moški	61 let	Ploščatocelični karcinom
5	moški	67 let	Adenokarcinom

V preiskavo smo vključili 5 bolnikov z NSCLC. Vsi bolniki so moškega spola, povprečna starost bolnikov je 60 let. Dva bolnika sta imela adenokarcinom, trije pa so imeli ploščatocelični karcinom.

Da bi potrdili prisotnost makrofagov v tkivih, so na parafinskih preparatih izvedli tudi dodatne imunohistokemijske preiskave. Rezine so (na Golniku) inkubirali s protitelesi anti - CD163, ki prepoznajo specifičen makrofagni antigen CD163. Preparate smo nato pogledali s svetlobnim mikroskopom. Makrofagi se po inkubaciji s protitelesi in kemični reakciji obarvajo rjavo. Spodnje slike prikazujejo rezultate imunohistokemijskega obarvanja tumorskega in normalnega tkiva s protitelesom anti - CD163. Ključno je, da smo v vseh tkivih, ki smo jih pri kasnejših poskusih uporabili, ugotovili infiltracijo z makrofagi. Ta je bila praviloma izrazitejša v normalnem tkivu kot v NSCLC tkivu. Primer analize prikazujeta sliki 11 in 12.



Slika 11: Parafinski rezini, analiza prisotnosti makrofagov s protitelesom anti-CD163. Leva slika: Bolnik 3, normalno pljučno tkivo, 100× povečava; Desna slika: Bolnik 2, normalno pljučno tkivo, 1000×povečava



Slika 12: Parafinski rezini, analiza prisotnosti makrofagov s protitelesom anti-CD163. Leva slika: Bolnik 2, tumorsko pljučno tkivo, 100× povečava; Desna slika: Bolnik 4, tumorsko pljučno tkivo, 1000× povečava

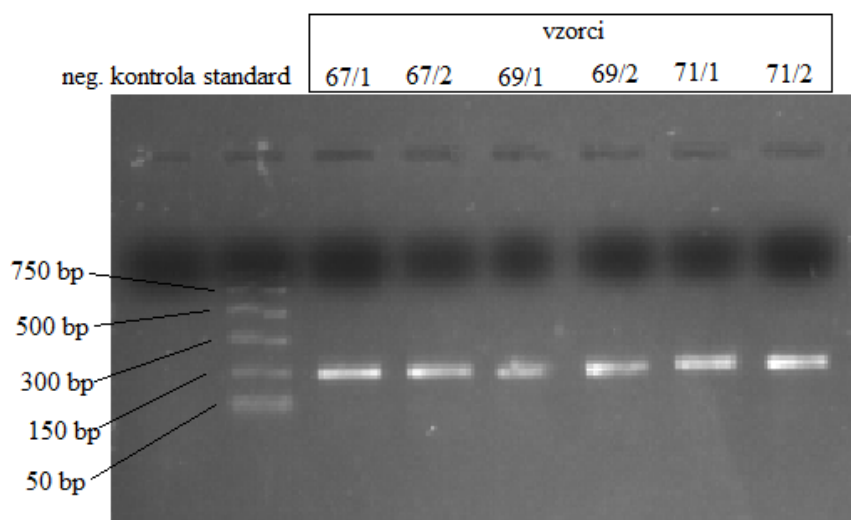
4.2 Sinteza komplementarnih oligonukleotidov

Za sintezo oligonukleotidov komplementarnih mRNA *LPL* smo inovativno uporabili komercialne postopke izolacije RNA in RT – qPCR, kar v literaturi še ni opisano. Izolirali smo celokupno RNA iz tkiva. Postopek, ki smo ga uporabili je bil optimiziran s strani proizvajalca. Proizvajalec opozarja na morebitne težave pri lizi pljučnega tkiva. Uporaba RLT pufra je nujna za pospešitev homogenizacije tkiva in izboljšanje izkoristka RNA, preprečitev DNA kontaminacije ali tvorbi precipitativ, ki bi zamašili kolono za izolacijo RNA. Izhodiščno tkivo je bilo shranjeno v tekočem dušiku. S tem smo se izognili razpadu samega tkiva in razpadu RNA. Problematična je bila široka razširjenost RNAz. RNAze so zelo stabilne in ne potrebujejo kofaktorjev za svoje delovanje. Na vsem uporabljenem materialu moramo inaktivirati RNAze. Zato smo vse nadaljnje opisane postopke izvajali v RNA komori, ki smo jo predhodno obsevali 30 minut z UV svetlobo. Uporabili smo sterilne pipetne nastavke, epruvete in rokavice, ki smo jih večkrat menjevali.

Po končanem postopku izolacije RNA iz tkiva, smo RNA prepisali v cDNA s postopkom reverzne transkripcije. Priporočeno je, da prepis naredimo takoj po izolaciji mRNA, saj je cDNA bolj stabilna od mRNA. V uporabljenih reagentih reverzna transkriptaza ni inhibirana s strani rRNA ali tRNA, predhodna izolacija mRNA iz celokupne RNA ni potrebna. Za večji izkoristek prepisa v cDNA, smo podaljšali inkubacijski čas na 120 minut pri 42 °C. Puffer z naključnimi oligonukleotidnimi začetniki, MgCl₂ in dNTP-ji, so v razmerju, ki omogoča optimalen potek RT - qPCR. Vzorec smo po končanem postopku shranili v zamrzovalniku.

Za sintezo posameznih komplementarnih oligonukleotidov smo uporabili postopek qPCR. Sintetizirali smo oligonukleotide komplementarne na treh področjih, da bi s tem zmanjšali verjetnost negativnih rezultatov. Razgradnja mRNA *LPL* poteka predvsem na 3' UTR regiji. Sama reakcijska mešanica vsebuje uracil – DNA N – glikozilazo (UNG), ki prepreči vpliv predhodnih kontaminacij v reakciji PCR. Mednje spadajo molekule z vgrajenim dUTP. Odstranimo jih s kombinacijo UNG in visoke temperature (95 °C), ki je prisotna pri denaturacijskem koraku qPCR. UNG odstrani molekule uracila s cepitvijo N – glikozidne vezi. Delo je zaradi možne kontaminacije potekalo v PCR komori, ki je bila predhodno obsevana vsaj 30 minut z UV svetlobo. Uporabljali smo sterilne pipetne nastavke, epruvete in rokavice, ki smo jih večkrat menjavali. Po končanem postopku smo reakcijske mešanice iz posameznih vdolbinic mikrotiterske ploščice odpipetirali v sterilne epruvete in jih shranili v zamrzovalniku.

Velikosti sintetiziranih komplementarnih oligonukleotidov smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Tipičen primer analize prikazuje Slika 13. Čeprav vzorca po končanem postopku ne bomo uporabljali za nadaljnje postopke, moramo še vedno preprečiti kontaminacijo z RNAzami. V primeru, da bi do kontaminacije prišlo, bi agarozna elektroforeza pokazala fragmentiranost našega vzorca. Zato smo uporabljali sterilne pipetne nastavke in epruvete. Poleg navadnih rokavic je potrebna tudi uporaba nitrilnih rokavic. Čeprav je Sybr Safe varnejši od etidijevega bromida, ki se je včasih uporabljal za barvanje gela, smo preventivno še vedno uporabili nitrilne rokavice.



Slika 13: Rezultat agarozne gelske elektroforeze

Kot prikazuje Slika 13, smo dobili nefragmentirane oligonukleotide pravilne velikosti približno 150 bp. Negativna kontrola, ki nas opozarja na kontaminacijo reagentov, je bila

v našem primeru negativna. Zaključimo lahko, da reagenti ne vsebujejo nukleinskih kislin. Standard dodamo z namenom očitanja približne velikosti komplementarnih oligonukleotidov.

Poleg kakovosti sintetiziranih komplementarnih oligonukleotidov smo izmerili tudi koncentracijo oligonukleotidov. Koncentracijo smo izmerili z NanoDropom ND1000. Rezultati meritev so podani v Preglednici XIII. Za merjenje koncentracije smo upoštevali navodila in priporočila proizvajalca aparata. Poleg koncentracije smo merili tudi razmerij absorbanč $\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$ in $\frac{A_{260nm}}{A_{230nm}}$. Po priporočilih morata biti obe razmerji med 1,8 – 2,2.

Preglednica XIII: Izmerjene koncentracije pred čiščenjem s kolonami na NanoDropu

Oznaka raztopin	$\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$	$\frac{A_{260nm}}{A_{230nm}}$	Koncentracija [ng/ μ L]
67/1	2,03	1,19	457,8
67/2	2,04	1,19	426,2
67/3	2,06	1,22	476,2
67/4	2,05	1,20	464,3
67/5	2,06	1,21	477,1
69/1	2,03	1,19	447,2
69/2	2,03	1,19	447,4
69/3	2,04	1,21	474,7
69/4	2,04	1,23	478,5
69/5	2,04	1,21	483,1
71/1	2,02	1,19	455,8
71/2	2,01	1,19	439,3
71/3	2,04	1,23	487,8
71/4	2,03	1,22	477,7
71/5	2,04	1,19	479,9

Iz preglednice XIII je razvidno, da so vrednosti razmerje absorbanč $\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$ padle v referenčni interval. Iz tega sklepamo, da v vzorcu ni kontaminacij, ki absorbirajo pri ali blizu 280 nm. Pri 280 nm absorbirajo proteini, fenoli in druge kontaminacije. Pri razmerju absorbanč $\frac{A_{260nm}}{A_{230nm}}$, pa so bile vrednosti bistveno pod referenčnim območjem, kar nakazuje na prisotnost določenih molekul, ki močno absorbirajo pri ali blizu 230 nm, kot so EDTA, soli pufru. Povečano absorbanco pri 230 nm pripisujemo tudi gvanidin tiocianatu, ki je nujno potreben za inaktivacijo RNAz v postopku izolacije RNA iz tkiva. Dobljene meritve ne odražajo resnične koncentracije naših komplementarnih oligonukleotidov v

vzorcu, ker imamo poleg oligonukleotidov prisotne tudi dNTP in začetne oligonukleotide, ki absorbirajo pri 260 nm in s tem dajejo lažno večjo koncentracijo oligonukleotidov v vzorcu. Iz navedenega lahko zaključimo, da izbrani je izbrani postopek primeren za sintezo oligonukleotidov komplementarnih mRNA *LPL*. Potreben pa je postopek čiščenja.

4.3 Čiščenje komplementarnih oligonukleotidov

Sledil je postopek čiščenja komplementarnih oligonukleotidov. Za ta postopek smo se odločili, da bi odstranili vse primesi, ki smo jih v prejšnjih postopkih dodajali. Predvidevamo, da imamo poleg naših komplementarnih oligonukleotidov v raztopini tudi začetne oligonukleotide, dNTP, različne soli in pufre, ki so ostali predvsem iz postopka qPCR. Za nadaljnje postopke so problematični predvsem dvovalentni kationi (Mg^{2+}), Tris-HCl, EDTA, magnezijev acetat, NaCl in pufri, ki lahko motijo učinkovitost označevanja. Postopek čiščenja nam omogoča vezava oligonukleotidov v prisotnosti kaotopičnih soli na kolono. Pri postopku čiščenja smo se držali priporočil proizvajalca. Da bi preprečili kontaminacijo z RNazami, smo uporabljali sterilne pipetne nastavke, epruvete in rokavice, ki smo jih večkrat menjavali. Celotno delovno površino in aparature, ki smo jih v tem postopku uporabljali, smo očistili z RNase Zap robčki.

Po čiščenju smo ponovno izmerili koncentracijo komplementarnih oligonukleotidov, tokrat s spektrofotometrom Lambda 20 BIO. Pri merjenju smo upoštevali priporočila proizvajalca. Rezultat izmerjenih absorbanc prikazuje Preglednica XIV.

Preglednica XIV: Izmerjene koncentracije komplementarnih oligonukleotidov po čiščenju s kolonami

Oznaka raztopin	A_{260nm}	A_{280nm}	$\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$	Redčenje	Koncentracija [$\mu g/mL$]
67/1	0,0587	0,0307	1,9117	10	29,345
67/2	0,0656	0,0290	2,2623	10	32,815
67/1+67/2	0,1648	0,0788	2,0904	10	82,395
67/5	0,1824	0,0945	1,9308	10	91,210
69/1	0,1137	0,0562	2,0233	10	56,875
69/2	0,0724	0,0315	2,2973	10	36,205
69/4	0,2154	0,1117	1,9293	10	107,71
71/1	0,0852	0,0420	2,0271	10	42,620
71/1 2. čiščenje	0,1423	0,0764	1,8626	10	71,160
71/2	0,0653	0,0257	2,5413	10	32,630
71/4	0,2162	0,1071	2,0181	10	108,08

Po čiščenju so bile izmerjene koncentracije posledično nižje. Sklepamo, da smo s tem postopkom odstranili dNTP in začetne oligonukleotide.

4.4 Fluorescenčna *in situ* hibridizacija

Kot izhodišče smo uporabili utečen postopek FISH, ki ga uporabljajo v Specializiranem hematološkem laboratoriju, KO za hematologijo, UKC Ljubljana. Ker smo imeli dehidrirane zmrznjene rezine, smo jih morali predhodno odtaliti in rehidrirati v etanolih padajoče koncentracije. Sledila je raztopina za zmanjšanje avtofluorescence. Pri pepsinizaciji smo povečali koncentracijo pepsina, da bi s tem olajšali prehajanje do intracelularne mRNA *LPL* v histoloških rezinah za fluorescenčno označene komplementarne oligonukleotide. Na začetku smo za refiksacijo uporabljali formaldehid. Ker smo iz literature (36) ugotovili, da formaldehid domnevno povečuje avtofluorescenco, smo ga zamenjali s paraformaldehidom. Vključili smo tudi acetiliranje (37), s katerim blokiramo polarne in nabite skupine tkiva, ki bi lahko povzročile nespecifično vezavo fluorescenčno označenih sond. Slednje naredimo tako, da raztopini TEA v DEPC vodi tik pred uporabo dodamo anhidrid očetne kisline. Zelo pomembno je, da dodamo anhidrid očetne kisline tik pred uporabo, saj je razpolovna doba anhidrida očetne kisline zelo kratka. Za postopek acetilacije smo uporabili navodila, ki jih uporabljajo na Inštitutu za Anatomijo, MF v Ljubljani. Podvojili smo koncentracijo dodane anhidrid očetne kisline, ker smo med delom ugotovili, da tako dobimo boljše rezultate. Ostale raztopine, ki jih uporabljamo (SSC, PBS in DEPC voda) pripomorejo k spiranju rezin. Ker imamo fluorescenčno označene sonde dvoverižne, jih moramo pred hibridizacijo denaturirati. Navodila za denaturacijo fluorescenčno označene sonde so bila priložena pri navodilih za fluorescenčno označevanje oligonukleotidov vzdolž verige. Denaturirane sonde smo nato hibridizirali z mRNA *LPL* v predhodno obdelanih zmrznjenih rezinah.

4.4.1 Vzdolžno označevanje komplementarnih oligonukleotidov

Da smo sonde naredili vidne v postopku FISH, smo jih morali najprej fluorescenčno označiti. Ker za postopek potrebujemo oligonukleotide s koncentracijo $50 \times 10^6 \mu\text{g/L}$, smo v nadaljnjih postopkih uporabili le nekatere raztopine sintetiziranih komplementarnih oligonukleotidov. Primerne raztopine so v Preglednici XIV označene s poudarjenim tiskom. Pri postopku označevanja očiščenih komplementarnih oligonukleotidov smo upoštevali priporočila proizvajalca reagentov za označevanje. Po

označevanju smo nevezano barvilo odstranili s priloženimi kolonami proizvajalca. Tudi pri odstranjevanju nevezanega barvila smo upoštevali priporočila proizvajalca. Zaradi možne kontaminacije z RNAzami smo uporabljali sterilne pipetne nastavke, epruvete in rokavice, ki smo jih večkrat menjavali. Delo je potekalo v laminarni komori, ki smo jo predhodno očistili z RNase Zap robčki in etanolom. Vse aparate, ki smo jih uporabljali, smo očistili z RNase Zap robčki. Po končanem označevanju in odstranjevanju nevezanega barvila smo uspešnost označevanja ugotovili z merjenjem absorbanc pri 260 nm in 550 nm. Rezultat izmerjenih absorbanc prikazuje Preglednica XV. Izmerjene absorbance potrebujemo za izračun indeksa označevanja (DoL).

Preglednica XV: Izmerjene absorbance pri 260nm in 550nm z Lambda 20 BIO

Oznaka raztopin	Čiščenje	Redčenje	A _{260nm}	A _{550nm}
67/1+67/2	Da	10	0,8603	0,0870
67/1+67/2 2. označevanje	Da	10	0,6732	0,0691
67/5	Da	10	0,3182	0,0539
69/1	Ne	10	0,2545	0,0734
69/1	Da	10	0,3823	0,0582
69/4	Da	10	0,2386	0,0269
71/1	Da	10	0,3324	0,0641
71/1	Ne	10	0,3339	0,0413
71/4	Da	10	0,3602	0,0357

Pri absorbanci 260 nm absorbirajo nukleinske kisline. Pri 550 nm pa je absorpcijski maksimum rodamina. Rodamin je fluorescenčno barvilo, ki smo ga uporabili v postopku označevanja komplementarnih oligonukleotidov. Ker nam sami rezultati absorbanc ne povedo veliko, iz njih izračunamo indeks označevanja ali DoL. Indeks označevanja nam pove delež barvila glede na komplementarne oligonukleotide. Izračunane vrednosti DoL podaja Preglednica XVI.

Preglednica XVI: Izračunani indeksi označevanja

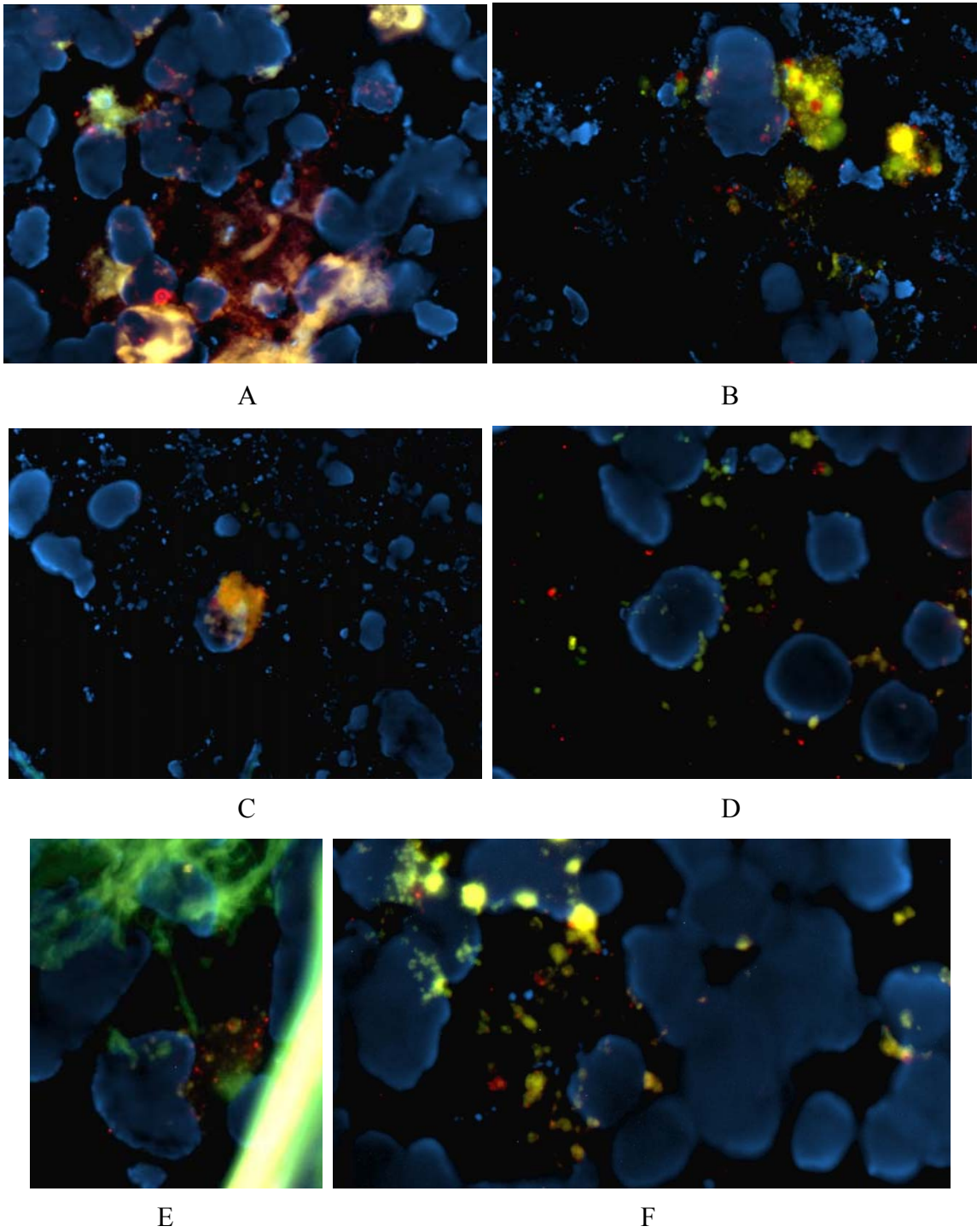
Oznaka Razt.	Čišč.*	ϵ barve	ϵ nukleinske kisline	Koncentracija nukleinske kisline [$\times 10^6$ ng/L]	Koncentracija barvila [$\times 10^6$ pmol/L]	DoL [%]
67/1+67/2	Da	95000	50	430	9,2	0,7
67/1+67/2_2.ozn.	Da	95000	50	337	7,3	0,7
67/5	Da	95000	50	159	5,7	1,2
69/1	Ne	95000	50	127	7,6	2,0
69/1	Da	95000	50	191	5,6	1,0
69/4	Da	95000	50	119	2,8	0,8
71/1	Da	95000	50	166	6,7	1,4
71/1	Ne	95000	50	167	4,3	0,9
71/4	Da	95000	50	180	3,8	0,7

*Da – vrednost v raztopinah katerim smo odstranili primesi; *Ne – vrednost v raztopinah, ki jih nismo očistili; ϵ – molarni ekstinkcijski koeficient; DoL – indeks označevanja.

S fluorescenčnim barvilom smo označili očiščene in neočiščene komplementarne oligonukleotide. Želeli smo namreč ugotoviti ali pride do razlik po standardnem postopku FISH. Razlike v DoL med očiščenimi in neočiščenimi komplementarnimi oligonukleotidi ni bilo.

Po priporočilih proizvajalca naj bi bile vrednosti DoL med 1,0 % in 3,6 %. Iz Iz dobljenih rezultatov prikazanih v Preglednici XVI je razvidno, da je bilo označevanje uspešno pri raztopinah, ki smo v Preglednici XVI označeni z poudarjenim tiskom. Samo te označene oligonukleotide smo uporabili pri fluorescenčni *in situ* hibridizaciji. Vzroki za prenizke vrednosti DoL in s tem neuspešno označevanje bi lahko bili: razgradnja komplementarnih oligonukleotidov, prenizka koncentracija izhodiščnega komplementarnega oligonukleotida. Vzrok za prenizko vrednost DoL bi lahko bil tudi prekratka inkubacija vzorcev na ledu. V tem primeru se vse pare niso uspele kondenzirati. Opazili smo tudi, da so z vsakim označevanjem vrednosti DoL postopoma padale. To pripisujemo kratkotrajnemu izpostavljanju fluorescenčnega barvila vidni svetlobi ter večkratnemu odtajevanju in zamrzovanju reagentov.

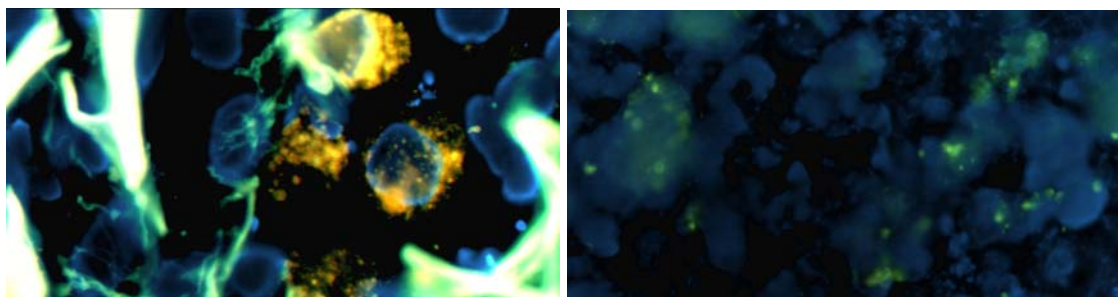
V procesu optimizacije postopka FISH smo najprej želeli preveriti, ali z lastno pripravljenimi oligonukleotidi dobimo pričakovane rezultate. Pri tem smo uporabili utečen postopek FISH, ki smo ga dopolnili s spremembami predstavljenimi v uvodu tega poglavja. Rezultate prvih analiz prikazuje Slika 14.



Slika 14: Rezultat po standardnem postopku FISH z vzdolžnim predoznačevanjem sonde. (A) Bolnik 1, sonda 71/1, tumorsko tkivo, 600 × povečava (B) Bolnik 2, sonda 71/1, tumorsko tkivo, 600 × povečava (C) Bolnik 3, sonda 69/1, tumorsko tkivo, 600 × povečava, (D) Bolnik 4, sonda 69/1, tumorsko tkivo, 1000 × povečava; (E): Bolnik 5, sonda 69/1, normalno tkivo, 1000 × povečava; (F): Bolnik 5, sonda 69/1, tumorsko tkivo, 1000 × povečava

Slika 14 prikazuje rezultat po standardnem postopku FISH. V tem primeru smo komplementarne oligonukleotide označevali naključno vzdolž verige. Na slikah so jedra obarvana modro. V citoplazmi nekaterih celic opazimo izrazito zeleno – rumeno avtofluorescenco in drobne rdeče signale. Rdeče signale daje z rodaminom označeni komplementarni oligonukleotidi. Rezultati v NSCLC in navidezno zdravem pljučnem tkivu se bistveno niso razlikovali. Rdeče signale smo dobili samo v celicah z izrazito avtofluorescenco.

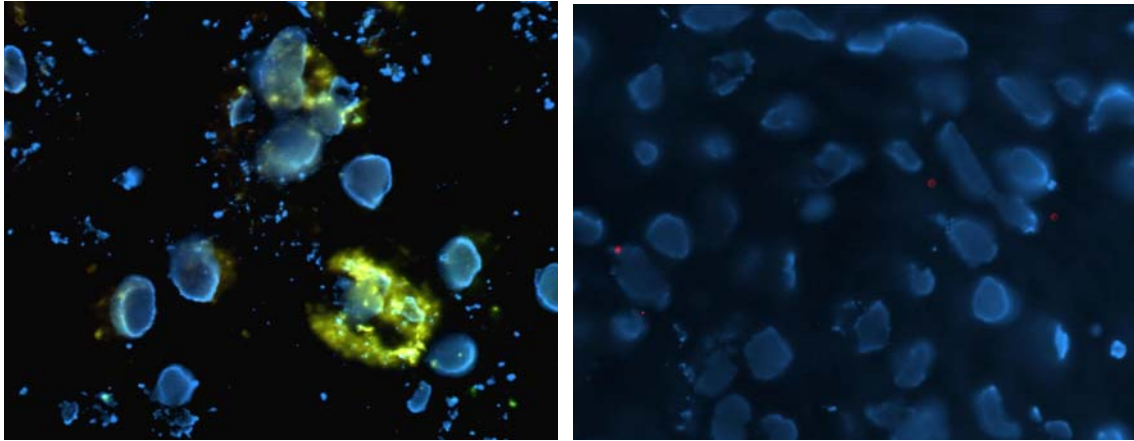
V nadaljevanju smo želeli preveriti specifičnost dobljenih signalov v postopku FISH. Postopek FISH smo izvedli tako, da smo označene očiščene komplementarne oligonukleotide zamenjali z neoznačenim očiščenim oligonukleotidom (PCR produkt). Dobljene rezultate prikazuje Slika 15. Pričakujemo, da rdečih signalov ne bomo videli.



Slika 15: Rezultat po standardnem postopku FISH, 600 × povečava. Leva slika: 1. bolnik, PCR produkt 67/5, normalno tkivo,; Desna slika: 2. bolnik, PCR produkt 71/1, tumorsko tkivo.

Dobljeni rezultati potrjujejo specifičnost našega postopka. Ker komplementarni oligonukleotidi niso bili fluorescenčno označeni, pri pregledu s fluorescenčnim mikroskopom rdečih signalov ne opazimo. Enake rezultate smo dobili pri vseh vzorcih normalnih in tumorskih tkiv.

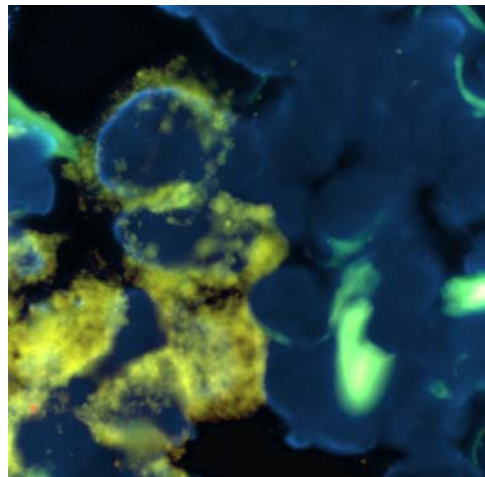
Dodatno smo želeli preveriti specifičnost našega postopka tudi tako, da smo nedenaturirano sondo hibridizirali čez noč (~18 ur) pri 37 °C. Dobljen rezultat prikazuje Slika 16:



Slika 16: Rezultat standardnega postopka FISH, Bolnik 1, nedenaturirana sonda 69/1 označena vzdolž verige, 600 × povečava: Leva slika: normalno tkivo; Desna slika: tumorsko tkivo.

Pričakovali smo sliko brez rdečih signalov. S postopkom denaturacije dobimo iz dvoverižne sonde enoverižno. Samo enoverižno sondo lahko hibridiziramo na mRNA *LPL*. Kljub temu, da sonde nismo denaturirali, smo dobili nekaj šibkih, slabše vidnih rdečih signalov. Iz rezultatov sklepamo na nespecifično vezavo komplementarnih oligonukleotidov na celice z visoko avtofluorescenco ali prisotnost enoverižnih komplementarnih oligonukleotidov v naših reagentih.

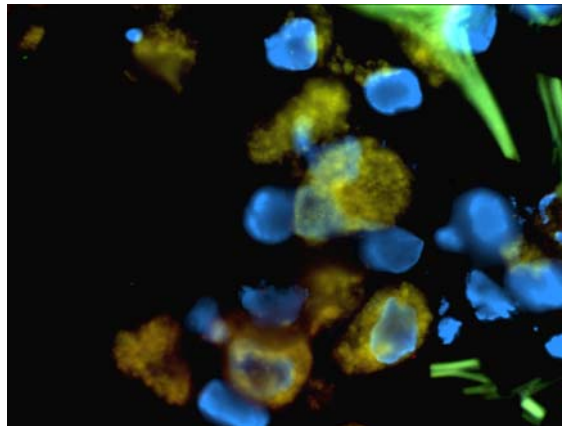
Dodatno smo želeli preveriti specifičnost naših komplementarnih oligonukleotidov tako, da smo nedenaturirano sondo hibridizirali na sobni temperaturi v vlažni komori v temi čez noč (~18 ur) (Slika 17).



Slika 17: Spremenjen postopek FISH - hibridizacija na sobni temperaturi: Bolnik 2, nedenaturirana sonda 67/5 označena vzdolž verige, normalno tkivo, 1000 × povečava;

Tudi pri tem postopku smo dobili posamezne rdeče signale. Čeprav postopek hibridizacije ne izvajamo pri idealni temperaturi (37 °C), do delne tvorbe hibridov še vedno pride. Rdeči signali so bili šibkejši in bilo jih je malo. Iz rezultatov sklepamo na prisotnost enoverižnih komplementarnih oligonukleotidov v naših reagentih.

Postopek FISH smo želeli razviti do te mere, da bi istočasno zaznali mRNA LPL in makrofage s protitelesi anti - CD14. Označevanje makrofagov s protitelesi ni združljivo s pepsinizacijo histoloških rezin v postopku FISH. Zato smo izvedli postopek FISH brez pepsinizacije in inkubirali s protitelesi anti - CD14. Rezultat prikazuje Slika 18.



Slika 18: Spremenjen postopek FISH - brez pepsinizacije. Bolnik 1, sonda 67/5 označena vzdolž verige, normalno tkivo, inkubacija s protitelesi anti - CD14-FITC, 1000 × povečava.

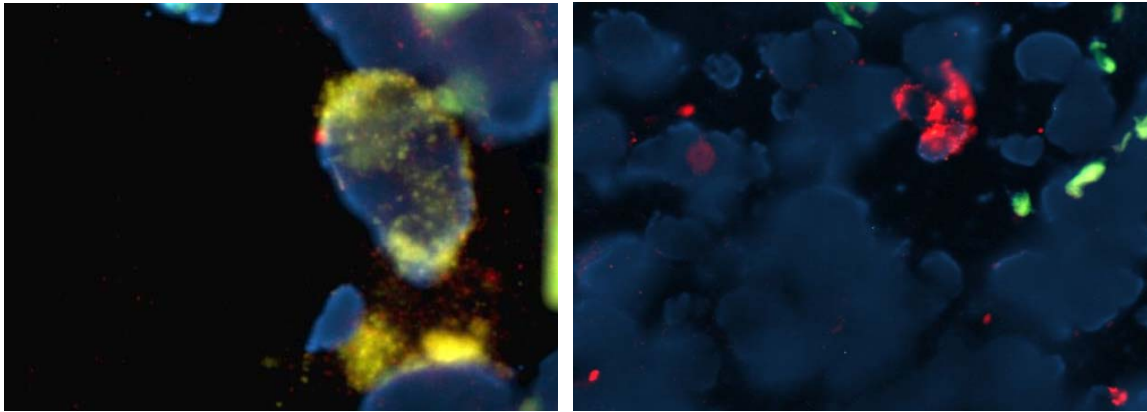
Kot je iz slike razvidno rdečih signalov nismo dobili. Tudi samo označevanje s anti - CD14 zaradi močne avtofluorescence celic, pri katerih smo rdeče signale sicer opazili, ni bilo uspešno.

4.4.2 Označevanje oligonukleotidov s tvorbo 3` repa

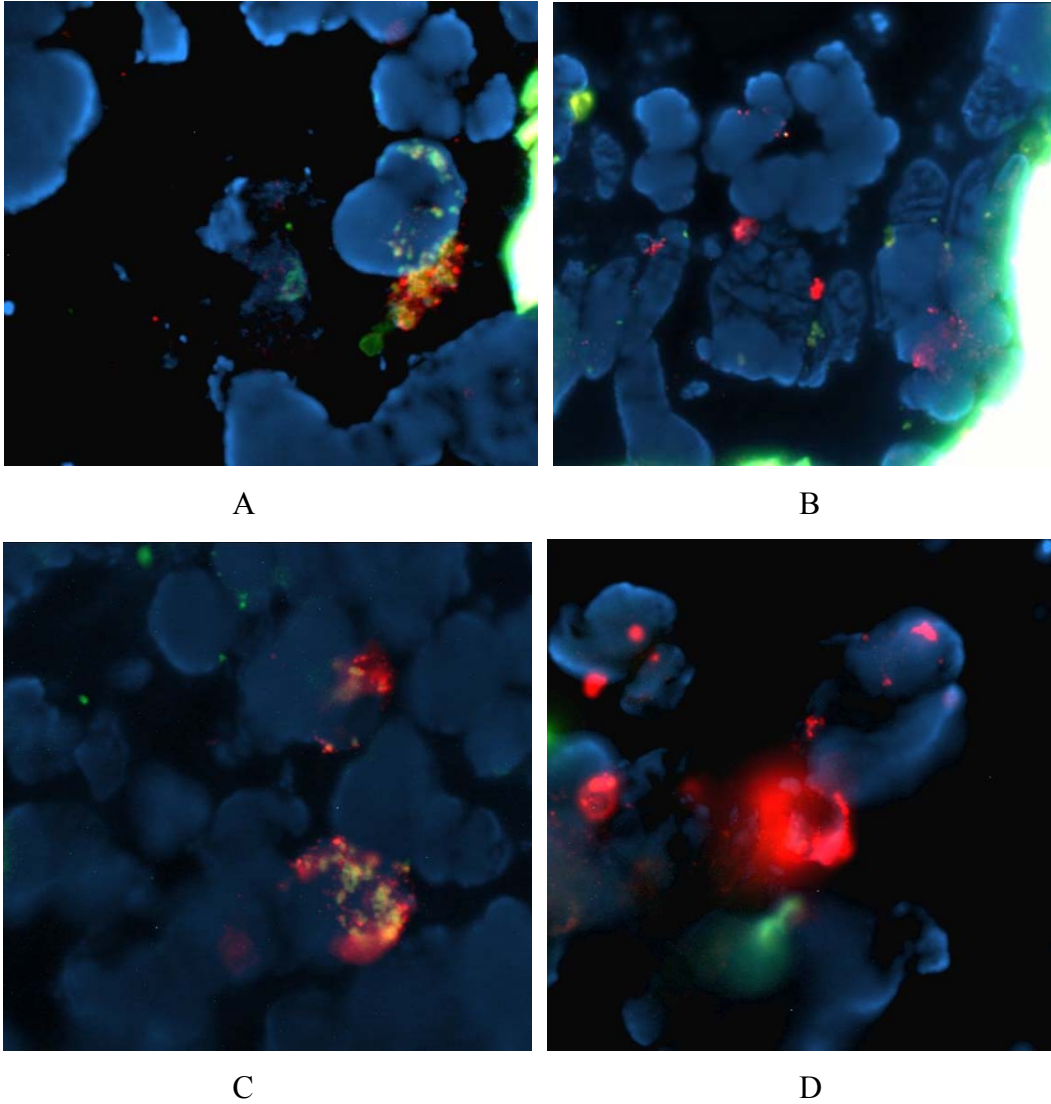
Poleg prej opisanega načina označevanja vzdolž celotnega komplementarnega oligonukleotida smo uporabili tudi označevanje s tvorbo repa na 3` koncu oligonukleotida. Pri tem smo upoštevali navodila proizvajalca. Postopek za optimalno označevanje zahteva zelo veliko množino oligonukleotidov. Ker je bila množina oligonukleotidov po čiščenju premajhna, smo se odločili uporabiti mešanico vseh preostalih očiščenih komplementarnih oligonukleotidov in jih koncentrirali s postopkom čiščenja preko kolon. Koncentrirali smo tako, da smo na kolono dali večji volumen vzorca od elucijskega volumna DEPC vode. Da bi preprečili kontaminacijo z RNAzami, smo

uporabljali sterilne pipetne nastavke, epruvete in rokavice, ki smo jih večkrat menjavali. Delovno površino in vse aparature, ki smo jih uporabljali smo očistili z RNase Zap robčki.

Komplementarne oligonukleotide smo označili s pomočjo tvorbe repa z digoksigeninom, na katerega se je nato vezalo fluorescenčno označeno protiteleso. Preparate smo vrednotili s fluorescenčnim mikroskopom. Najprej smo želeli preveriti ali z oligonukletidi dobimo pričakovane fluorescenčne signale. Postopek FISH smo izvedli enako kot v naključnem označevanju vzdolž verige le, da smo na koncu dodali postopek inkubacije s protitelesom anti – digoksigenin rodamin. Rezultati analiz prikazujeta sliki 19 in 20.



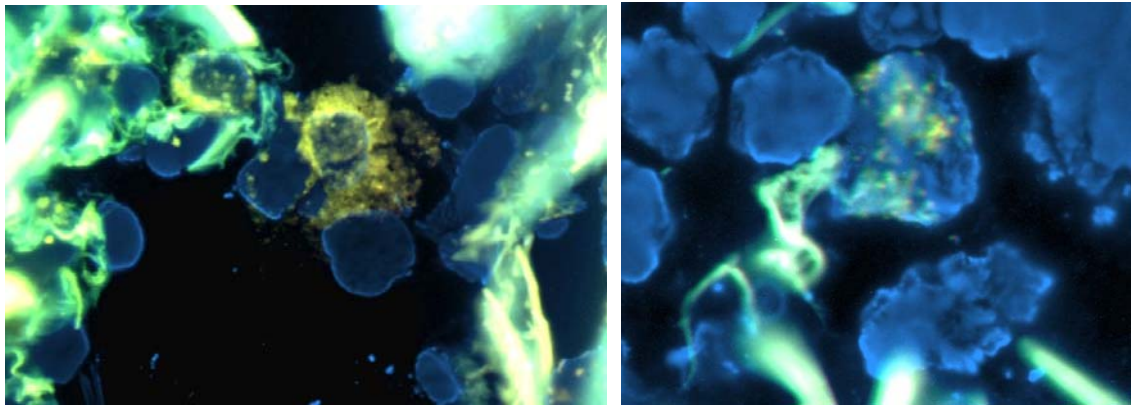
Slika 19: Rezultat standardnega postopka FISH, mešanica vseh sond označenih z vezavo fluorescenčno označenega (rodamin) protitelesa na 3' rep predhodno vezane sonde. bolnik 1; Leva slika: normalno tkivo, 1000 × povečava; Desna slika: tumorsko tkivo, 600 × povečava.



Slika 20: Rezultat standardnega postopka FISH, mešanica vseh sond označenih z vezavo fluorescenčno označenega (rodamin) protitelesa na 3' rep predhodno vezane sonde. Tumorsko tkivo: (A) Bolnik 2, 1000 × povečava; (B): Bolnik 3, 1000 × povečava; (C) Bolnik 4, 1000 × povečava; (D) Bolnik 5, 1000 × povečava

Pri normalnem tkivu se rezultati bistveno niso razlikovali med seboj. Izrazito rdečo fluorescenco smo dobili pri posameznih celicah v rezinah (Slika 19). Pri tem označevanju je bila avtofluorescenca manj izrazita, medtem ko so bili rdeči signali bolj izraziti. Vzrok za to je lahko mešanica vseh treh sond. Tako smo mRNA *LPL* označili na začetku, sredini in koncu. S tem smo izboljšali občutljivost postopka, saj se istočasno vežejo trije komplementarni oligonukleotidi na mRNA *LPL*.

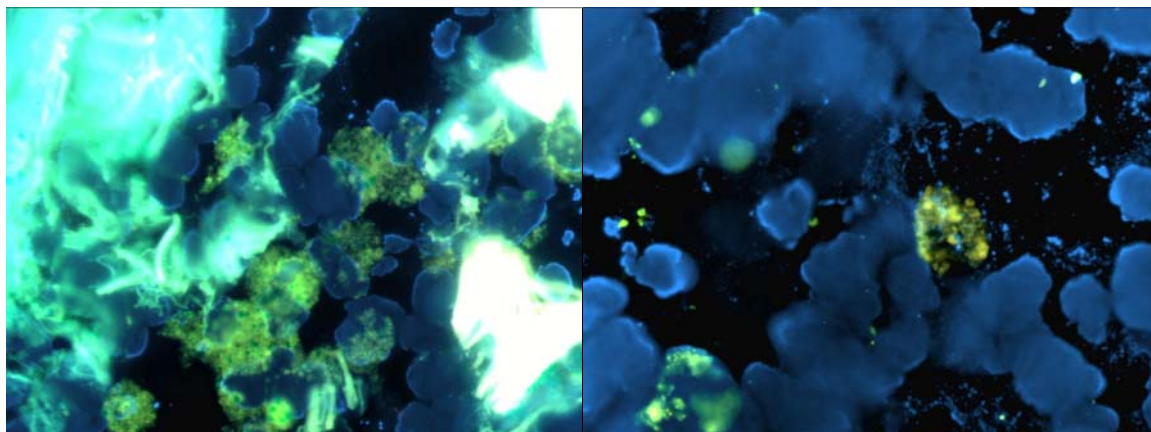
Da bi preverili specifičnost našega postopka v reakcijsko mešanico nismo dodali terminalne transferaze. Rep se na 3' koncu komplementarnega oligonukleotida ni sintetiziral in fluorescenčno označeno protitelo se ni vezalo nanj. S tem smo želeli preveriti nespecifično vezavo fluorescenčno označenega protitelesa. Dobljene rezultate prikazuje Slika 21.



Slika 21: Rezultat standardnega postopka FISH; mešanica vseh sond označenih z vezavo fluorescenčno označenega (rodamin) protitelesa na 3' rep predhodno vezane sonde, brez terminalne transferaze. Leva slika: Bolnik 2, , normalno tkivo, 600 × povečava; Desna slika: Bolnik 2, tumorsko tkivo 1000 × povečava.

Dobili smo rezultat, ki smo ga pričakovali. Protitelo se ne veže nespecifično na strukture v rakavem ali normalnem tkivu. Prisotna je le običajna avtofluorescenca, specifičnih rdečih signalov ni.

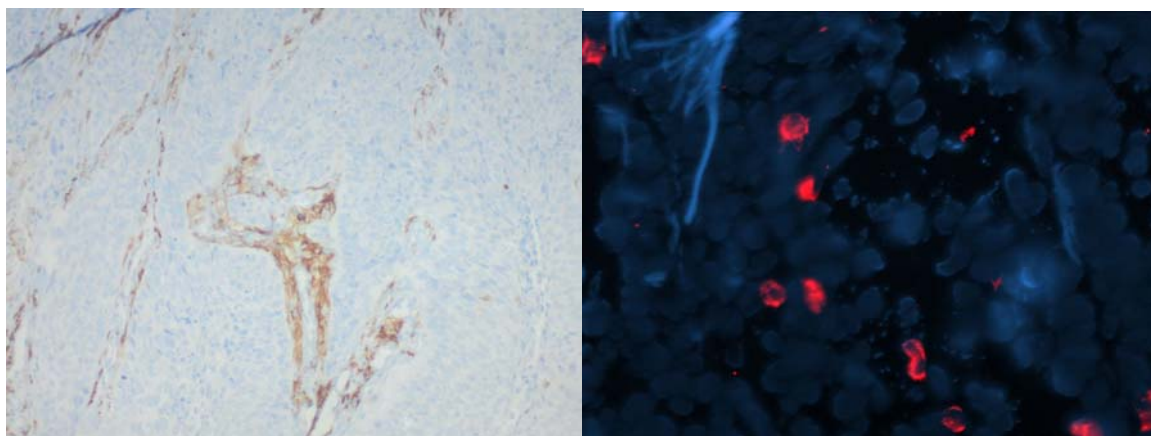
Da bi dodatno preverili specifičnost postopka FISH, smo izpustili inkubiracijo s protitelesom anti – digoksinin rodamin. Dobljene rezultate prikazuje Slika 22.



Slika 22: Postopek FISH brez inkubacije s protitelesom anti-digoksinin-rodamin, mešanica vseh sond označenih z vezavo fluorescenčno označenega (rodamin) protitelesa na 3' rep predhodno vezane sonde. Leva slika: Bolnik 2, normalno tkivo, 600 × povečava; Desna slika: Bolnik 2, tumorsko tkivo, 600 × povečava.

Tako kot pri prejšnjem poskusu tudi tu nismo opazili rdeče obarvanih signalov.

Ker nismo mogli doseči istočasne zaznave mRNA LPL s postopkom FISH in makrofagov s protitelesom anti – CD14, smo poizkusili opredeliti celice, ki sintetizira LPL z analizo umeščenih fluorescenčnih signalov v strukturno urejenostjo tkiva.



Slika 23: Leva slika prikazuje tumorsko tkivo po inkubaciji z anti – CD 163, 100 × povečava; Desna slika: rdeči signali po standardnem postopku FISH v tumorskem tkivu, 400 × povečava .

Po razporeditvi in številu z rodaminom označenih celic (Slika 23) v preparatu v primerjavi z imunohistokemijsko barvanimi preparati, z veliko gotovostjo sklepamo, da intenzivno obarvane celice ustrezajo makrofagom. Obarvane celice so bile prisotne tako v

normalnem kot tudi v tumorskem tkivu. Zagotovo lahko rečemo, da mRNA *LPL* ne sintetizirajo tumorske celice, ker smo v sicer celularnem tumorskem tkivu dobili le posamezne obarvane celice.

4.5 Skladnost naših rezultatov s predhodnimi meritvami

V raziskovalnih skupinah, kjer je potekalo tudi naše delo, se že dlje časa ukvarjajo z odgovorom na vprašanje katera celica v NSCLC in navidezno zdravem pljučnem tkivu sintetizira LPL. V predhodnih raziskavah so na nivoju celotnega NSCLC in navidezno zdravega pljučnega tkiva istih bolnikov analizirali izražanje mnogih genov in njihov nivo izražanja primerjali z izražanjem LPL. Ugotovili so, da:

- V celotnem rakavem tkivu izražanje gena za LPL korelira z izražanjem gena za:
 - SRA1 ($p = 0,001$; specifičen za makrofage in za s tumorjem povezane makrofage ali TAM, angl. Tumor-associated macrophages);
 - z apo E ($p = 0,0026$; sinteza v makrofagih) (39);
 - s CD163 ($p = 0,0064$; sinteza v makrofagih in TAM); in
 - s FOLR2 ($p = 0,0145$; sinteza v TAM, verjetno pa tudi v drugih celicah, ki rabijo folate) (40).

- V celotnem rakavem tkivu izražanje gena za LPL ne korelira z izražanjem genov, ki jih makrofag ne izraža:
 - sintaza višjih maščobnih kislin (izraža tumorska celica) (41);
 - LDL receptor (izraža tumorska celica);
 - SREBP1 (izraža tumorska celica);
 - SREBP2 (verjetno izraža tumorska celica);
 - SPOT14 (verjetno izraža tumorska celica); in
 - Angptl4 (ne izraža makrofag).

- Iz drugih bolezni (ateroskleroza) je znano, da makrofag sintetizira LPL

S predhodnimi meritvami lahko podkrepimo našo ugotovitev, da mRNA *LPL* v NSCLC tkivu sintetizirajo makrofagi (42).

5 SKLEP

- razvili in optimizirali smo postopek FISH za zaznavo mRNA *LPL* v zamrznjenih histoloških rezinah pljučnega tkiva. Postopke lahko s prilagoditvami uporabimo tudi za analizo mRNA drugih genov;
- postopek označevanja oligonukleotidov s tvorbo repa na 3`UTR omogoča večjo občutljivost postopka FISH, kot postopek z naključnim označevanjem vzdolž verige.
- postopka FISH ni mogoče istočasno izvesti z imunohistokemičnim označevanjem zaradi obvezne uporabe pepsinizacije v postopku FISH, ki razgrajuje vezavna mesta za ustrezne antigene.
- po razporeditvi in številu s postopkom FISH označenih celic v preparatu (in v primerjavi z imunohistokemičnim označevanjem z anti – CD163 v vzporednih preparatih) lahko z veliko gotovostjo sklepamo, da makrofagi sintetizirajo mRNA *LPL*. Makrofagi sintetizirajo mRNA *LPL* v NSCLC tkivu, kot tudi v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu.
- v normalnem pljučnem tkivu je infiltracija makrofagov izrazitejša kot v NSCLC tkivu istega bolnika. Skladno s tem je bilo več mRNA *LPL* v navidezno zdravem pljučnem tkivu kot v NSCLC tkivu;
- zagotovo lahko rečemo, da tumorske celice ne sintetizirajo mRNA *LPL*.

Potrjena domneva, da makrofag sintetizira LPL, nam omogoča nadaljnje proučevanje mehanizmov zvečane aktivnosti LPL v rakavem tkivu na celičnem nivoju, predvsem z namenom odkrivanja novih načinov zdravljenja bolezni. Razviti postopek FISH je novo raziskovalno orodje, ki omogoča zanesljivo zaznavo mRNA različnih genov v NSCLC tkivu, pa tudi v sosednjem, navidezno zdravem pljučnem tkivu.

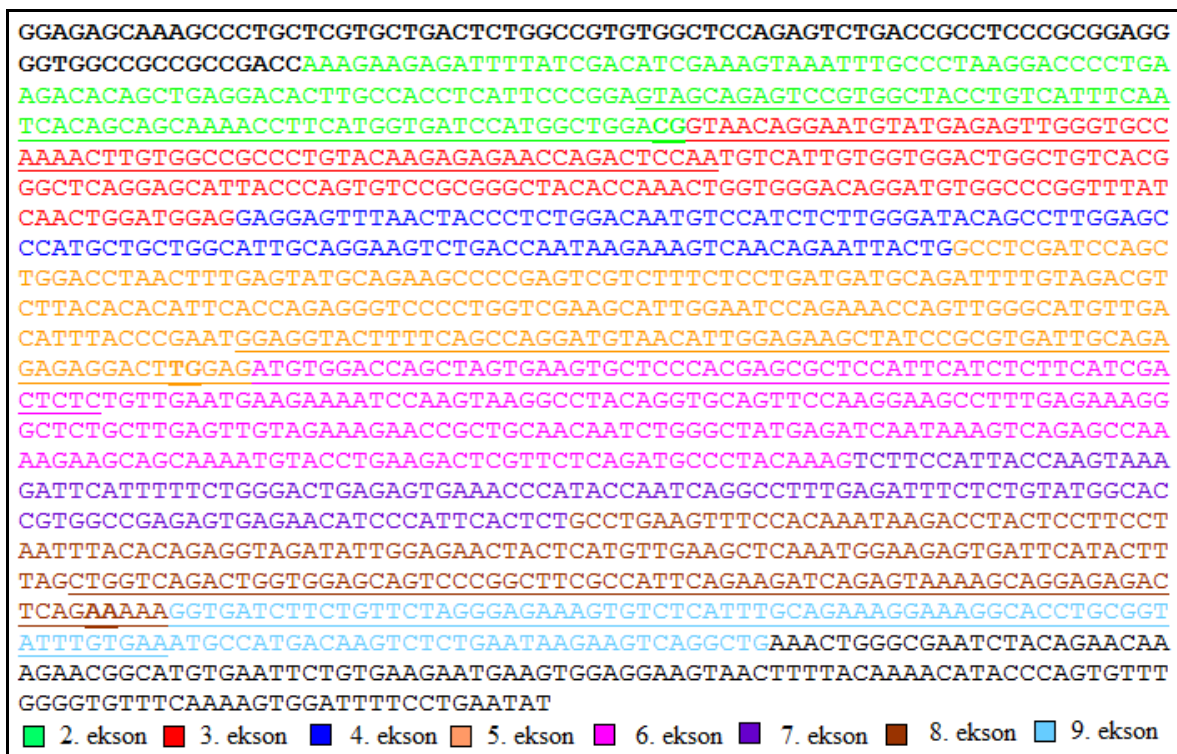
6 LITERATURA

1. Debeljak A. Pljučni rak- da vas ne premaga. Pomoč za vsak dan 2007.
2. Non-Small Cell Lung Cancer (<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/>). Dostopano: 11-12-2010.
3. Mountain CF, Libshitz HI, Hermes KE. A Handbook for Staging, Imaging, and Lymph Node Classification. Texas: Charles P. Young Company, 2003: 5-41.
4. Škrlec F, Pompe-Kirn V, Glavač D, Ravnik-Glavač M. Pljučni rak; Rak ščitnice: zbornik / 14. onkološki vikend, Kulturni center Laško, 1998; 12-28.
5. Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *European Respiratory Journal* 2009; 33 (6): 1485-1497.
6. Kim SY, Park SM, Lee ST. Apolipoprotein C-II is a novel substrate for matrix metalloproteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339 (1): 47-54.
7. Tsutsumi K. Lipoprotein Lipase and Atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2003; 170 (1): 1-9.
8. Wang H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297 (2): 271-288.
9. Kos T. Klinična kemija in biokemija 4. Ljubljana, SŠFKZ, 2006; 77-78.
10. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry* (5th ed.). New York , WH Freeman and Company, 2002.
11. Rosenthal D. *Medical biochemistry: Human metabolism in health and disease.* United States of America, 2009; 141-161.
12. Devor EJ. IDTutorial: The polimerase chain reaction. ZDA, Coralville, 2005; 1-20.
13. Sigma Life science. qPCR Technical Guide. Missouri, Sigma Aldrich, 2008; 2-5.
14. Gruden K, Herzog B. *Praktikum iz molekularne biologije - Teoretični del.* Ljubljana, Študentska založba, 2000; 74-87.
15. Sieben VJ, Debes-Marun CS, Pilarski LM, Backhouse CJ. An integrated microfluidic chip for chromosome enumeration using fluorescence in situ hybridization. *Lab on a Chip* 2008; 8 (12): 2151-2156.
16. Le Moine C, Normand E. Use of non-radioactive probes for mRNA detection by in situ hybridization: interests and applications in the central nervous system. *Cellular and Molecular Biology* 1995; 41 (7): 917-923.

17. Zenklusen D, Singer RH. Analyzing mRNA expression using single mRNA resolution fluorescent in situ hybridization. *Methods Enzymol* 2010; 470: 641-659.
18. Vance DE, Vance JE. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (5th edition). Madžarska, Elsevier Science, 2008; 498-519.
19. Garrett RH, Grisham CM. *Biochemistry* (2nd edition). Texas, Harcourt College Pub, 1999.
20. Setnikar T. Preučevanje izražanja gena za sintazo višjih maščobnih kislin v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu: diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
21. Spring KR, Davidson MW. *Introduction to Fluorescence Microscopy*, (<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>). Dostopano 10-03-2011.
22. Albani JR. *Structure and dynamics of macromolecules: Absorption and fluorescence studies*. Elsevier, 2004.
23. Pivk B. *Analizna kemija instrumentalne analize*. Ljubljana, Srednja šola za farmacijo, kozmetiko in zdravstvo, 2001; 63-66.
24. Wilson T, Fridrich M, Diaspro A. *Basics of Light Microscopy and Imaging*. Darmstadt, GIT VERLAG GmbH&Co. KG, 2006; 34-41.
25. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev.* 2005; 11: 227-256.
26. Kiernan JA. *Autofluorescence: Causes and Cures*. Billington and Knight, 2001; 4-8.
27. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med.* 2002; 80(12): 753-769.
28. LPL (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/LPL>). Dostopano: 28-05-2011.
29. Fluorescent in situ hybridization (<http://www.creative-biolabs.com/fish/tissuearray5.htm>). Dostopano: 28-05-2011.
30. Nanodrop (<http://wisbiomed.blogspot.com/2009/04/compare-micro-volume-uv-vis.html>). Dostopano: 28-05-2011.
31. PerkinElmer. *Lambda 20/Lambda 40 Installation and Maintenance Guide*. PerkinElmer. 2000: 19.
32. Qiagen. *RNeasy Mini Handbook*. Qiagen. 2010: 11.
33. Kreatech Biotechnology. *FISHBright Nucleic Acid Labeling Kit*. 2010: 18.

34. Trost Z, Sok M, Marc J, Černe D. Increased lipoprotein lipase activity in non-small cell lung cancer tissue predicts shorter patient survival. *Arch Med Res.* 2009; 40(5): 364-368.
35. Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res.* 1996; 37(4): 693-707.
36. <http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/PDF/Autofluorescence.pdf>. Dostopano: 20-06-2011.
37. GeneDetect. In – situ hybridization using GeneDetect™ oligonucleotide probes. GeneDetect, 2000: 3 – 4.
38. O'Brien KD, Deeb SS, Ferguson M. Apolipoprotein E localization in human coronary atherosclerotic plaques by in situ hybridization and immunohistochemistry and comparison with lipoprotein lipase. *Am J Pathol.* 1994; 144(3): 538–548.
39. Puig-Kröger A, Sierra-Filardi E, Domínguez-Soto A. Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer Res.* 2009; 69(24):9395-9403.
40. Černe D, Žitnik IP, Sok M. Increased fatty acid synthase activity in non-small cell lung cancer tissue is a weaker predictor of shorter patient survival than increased lipoprotein lipase activity. *Arch Med Res.* 2010; 41(6):405-409.
41. Babaev VR, Patel MB, Semenkovich CF, Fazio S, Linton MF. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem.* 2000 Aug 25;275(34):26293-26299.

7 PRILOGA



Slika 24: Nukleotidno zaporedje treh različnih odsekov za LPL: posamezni eksoni so označeni z različnimi barvami, podčrtani deli pa označujejo posamezne oligonukleotide, ki so jih sintetizirali.

Sestava komplementarnega oligonukleotida dolžine 143 bp, dobljenega z uporabo reagenta Hs01012567_m1 (2/3 ekson):

GTAGCAGAGTCCGTGGCTACCTGTCATTTCAATCACAGCAGCAAAACCTTCAT
GGTGATCCATGGCTGGACGGTAACAGGAATGTATGAGAGTTGGGTGCCAAAA
CTTGTGGCCGCCCTGTACAAGAGAGAACCAGACTCCAA

Sestava komplementarnega oligonukleotida dolžine 134 bp, dobljenega z uporabo reagenta Hs01012569_m1 (5/6 ekson):

GGAGGTACTTTTCAGCCAGGATGTAACATTGGAGAAGCTATCCGCGTGATTGC
AGAGAGAGGACTTGGAGATGTGGACCAGCTAGTGAAGTGCTCCCACGAGCGC
TCCATTCATCTCTTCATCGACTCTC

Sestava komplementarnega oligonukleotida dolžine 144 bp, dobljenega z uporabo reagenta Hs01012571_m1 (8/9 ekson):

CTGGTCAGACTGGTGGAGCAGTCCCGGCTTCGCCATTGAGAAGATCAGAGTA
AAAGCAGGAGAGACTCAGAAAAAGGTGATCTTCTGTTCTAGGGAGAAAGTGT
CTCATTTGCAGAAAGGAAAGGCACCTGCGGTATTTGTGAA