

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nada PINTAR

OPIS CELIČNIH TIPOV V MLEČNI ŽLEZI KOZE

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nada PINTAR

OPIS CELIČNIH TIPOV V MLEČNI ŽLEZI KOZE

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

**A DESCRIPTION OF CELL TYPES IN THE MAMMARY GLAND OF
GOAT**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes – Biotechnology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje - Biotehnologija.

Delo je bilo opravljeno na Katedri za Genetiko, Animalno biotehnologijo in Imunologijo.

Študijska komisija Študija biotehnologije je za mentorja magistrske naloge imenovala prof. dr. Petra Dovča in za somentorja asist. dr. Jerneja Ogorevca.

Recenzentka: doc. dr. Elvira Maličev

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Biotehniška Fakulteta, Univerza v Ljubljani, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Peter DOVČ
Biotehniška Fakulteta, Univerza v Ljubljani, Oddelek za zootehniko

Član: asist. dr. Jernej OGOREVC
Biotehniška Fakulteta, Univerza v Ljubljani, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Elvira MALIČEV
Zavod Republike Slovenije za Transfuzijsko Medicino

Datum predavitve:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Nada Pintar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 575:636.39(043.2)
KG	mlečna žleza/koze/celične kulture/genetski označevalci
AV	PINTAR, Nada, dipl. bioteh. (UN)
SA	DOVČ, Peter (mentor)/OGOREVC, Jernej (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2014
IN	OPIS CELIČNIH TIPOV V MLEČNI ŽLEZI KOZE
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija)
OP	IX, 44 str., 11 pregl., 18 sl., 44 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Kozja mlečna žleza je pogosto predmet znanstvenih raziskav. V tej nalogi smo preverili, ali je z uporabo primerjalno-genomskega pristopa in protiteles, narejenih proti kozjim ortologom v drugih živalskih vrstah, mogoče ustrezno določiti celične tipe kozje mlečne žleze. Preverjali smo, ali je primarna celična kultura v raziskavah ustrezno nadomestilo za tkivo kozje mlečne žleze. Izbrane označevalce (citokeratini 5, 14 in 18, gladki mišični α aktin, β -aktin, epitelijska celična adhezijska molekula, mucin 1, vimentin, CD49 in β -kazein) smo zaznavali na ravni mRNA z uporabo PCR metode in na ravni proteinov z imunofluorescenco. Tako smo določili tipe celic v tkivnih rezinah in celični kulturi kozje mlečne žleze. Epitelne luminalne celice je mogoče identificirati z označevalcema KRT18 in EpCAM, KRT14 in α SMA pa sta specifična označevalca za mioepitelne celice. Vimentin je bil v celični kulturi specifičen za fibroblaste. Mucin 1 se je v tkivu specifično izražal na apikalni membrani luminalnih celic. Izražanje drugih označevalcev ni bilo omejeno na določen celični tip ali več tipov celic.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
 DC UDC 575:636.39(043.2)
 CX mammary gland/goats/cell cultures/markers
 AU PINTAR, Nada
 AA DOVČ, Peter (supervisor)/OGOREVC, Jernej (co-advisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
 PY 2014
 TI A DESCRIPTION OF CELL TYPES IN THE MAMMARY GLAND OF GOAT
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes- Biotechnology)
 NO IX, 44 p., 11 tab., 18 fig., 44 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The goat mammary gland is often the object of reasearch. By using comparative genomic approach and immunofluorescent staining, it was tested in this thesis whether different cell types in goat mammary gland can be identified. It was also determined whether primary cell culture could be an equivalent replacement for research on goat mamary gland tissue. Chosen markers (keratins 5, 14, and 18, smooth muscle α actin, β actin, epithelial cell adhesion molecule, mucin 1, vimentin, CD49, and β -casein) were detected at mRNA level by using PCR method, and at protein level (except for keratin 5 and β actin) using immunofluorescence. Efficiency of primers and antibodies used was determined, and cell types in goat mammary gland were identified. The majority of markers gave good results. Epithelial luminal cells could be specifically detected by KRT18 and EpCAM, and myoepithelial cells by KRT14 and α SMA. Vimentin was specifically expressed in fibroblasts in cell culture. Mucin 1 was detected at apical side of luminal cells in the tissue. Other markers were not specific for certain cell type(s).

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
SLOVARČEK.....	IX
1 UVOD	1
2 OPREDELITEV PROBLEMA.....	2
3 HIPOTEZE	3
4 PREGLED LITERATURE	4
4.1 MLEČNA ŽLEZA	4
4.1.1 Struktura.....	4
4.1.2 Razvoj.....	4
4.2 CELIČNE KULTURE	6
4.2.1 Epitelno-mezenhimska tranzicija	8
4.3 IZRAŽANJE OZNAČEVALCEV	8
4.3.1 Mucin 1 (MUC1).....	8
4.3.2 Alfa aktin gladkih mišičnih vlaken (α SMA) in β -aktin (ACTB).....	9
4.3.3 EpCAM	9
4.3.4 CD49 ali integrin alfa 6.....	9
4.3.5 Citokeratini in vimentin.....	10
4.3.6 Kazein.....	10
5 MATERIALI IN METODE	11
5.1 MATERIALI	11
5.2 METODE	12
5.2.1 Izolacija RNA iz celične kulture in tkiva	12
5.2.2 Izolacija RNA iz celic	12
5.2.3 Izolacija iz tkiva.....	13
5.2.4 Obdelava vzorcev RNA z DNazo	13
5.2.5 Prepis RNA v cDNA (reverse transcription)	14
5.2.6 PCR.....	14
5.2.7 Vizualizacija vzorcev na agaroznem gelu	15
5.2.8 Priprava gojišča za pGMEC	16
5.2.9 Odmrznitev, gojenje in precepljanje celic pGMEC	16
5.2.10 Nacepljanje v gojitvene posodice z Geltrex-om.....	17
5.2.11 Fiksiranje celic v kulturah.....	17
5.2.11 Imunofluorescenca na celični kulturi	17
5.2.12 Barvanje z Oil red-O.....	18
5.2.13 Imunofluorescenca na tkivnih rezinah.....	18
6 REZULTATI	19

6.1 GOJENJE CELIC V KULTURI	19
6.2 IZRAŽANJE OZNAČEVALCEV V CELIČNI KULTURI IN TKIVU	19
6.2.1 Odrasla koza	19
6.2.2 Juvenilna koza	21
6.3 IMUNOFLUORESCENCA NA CELIČNIH KULTURAH.....	22
6.4.1 KRT14 in KRT18	22
6.4.2 αSMA	24
6.4.3 EpCAM	25
6.4.4 CD49f	26
6.4.5 MUC1	27
6.4.6 VIM	28
6.4.7 CSN2	29
6.5 IMUNOFLUORESCENCA NA TKIVNIH REZINAH	29
6.5.1 KRT14 in KRT18	29
6.5.2 αSMA	30
6.5.3 EpCAM	31
6.5.4 MUC1	32
7 RAZPRAVA	33
8 SKLEPI	39
9 POVZETEK	40
10 VIRI	41

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Tabela 1: Seznam uporabljenih kemikalij glede na namen in proizvajalca.	11
Tabela 2: Protitelesa, uporabljena pri imunofluorescenci na celičnih kulturah in tkivu.	11
Tabela 3: Sekundarna protitelesa	12
Tabela 4: Seznam uporabljene opreme in pripomočkov.	12
Tabela 5: Reagenti za osnovno reakcijo za obdelavo vzorcev RNA z DNAzo.	13
Tabela 6: reakcija za prepis RNA v cDNA.	14
Tabela 7: Izbrani označevalci, uporabljeni začetni oligonukleotidi in pričakovane dolžine produktov	14
Tabela 8: Osnovna reakcija za PCR na cDNA vzorcih.....	15
Tabela 9: Sestavine gojišča za primarno kulturo celic mlečne žleze.	16
Tabela 10: Uporabljena primarna in sekundarna protitelesa ter njihove redčitve.....	18
Tabela 11: simbolni prikaz izražanja in prisotnosti označevalcev v celičnih kulturah in v tkivu na nivoju RNA in proteinov.	33

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Tkivo kozje mlečne žleze.....	4
Slika 2: Celična kultura kozje mlečne žleze. Celice oblikujejo kolonije.	19
Slika 3: Izrezi agaroznih gelov s fragmenti, produkti PCR reakcij na cDNA celične kulture odrasle koze.	20
Slika 4: Izrezi agaroznih gelov s fragmenti, produkti PCR reakcij na cDNA celične kulture juvenilne koze.	21
Slika 5: Izrezi agaroznih gelov s fragmenti, produkti PCR reakcij na cDNA tkiva odrasle koze.	20
Slika 6: Izrezi agaroznih gelov s fragmenti, produkti PCR reakcij na cDNA tkiva juvenilne koze.	21
Slika 7: Negativna kontrola imunofluorescenčnega barvanja proti β -kazeinu na primarni celični liniji kozje mlečne žleze..	22
Slika 8: Imunofluorescenčno barvanje proti citokeratinoma 14 in 18 na primarni celični liniji kozje mlečne žleze.	23
Slika 9: imunofluorescenčno barvanje proti gladkemu mišičnemu α aktinu na primarni celični liniji kozje mlečne žleze.	24
Slika 10: Imunofluorescenčno barvanje proti epitelijski celični adhezijski molekuli na primarni celični liniji kozje mlečne žleze.....	25
Slika 11: Imunofluorescenčno barvanje proti CD49f na primarni celični liniji kozje mlečne žleze.....	26
Slika 12: Imunofluorescenčno barvanje proti mucinu 1 na primarni celični liniji kozje mlečne žleze.....	27
Slika 13: Imunofluorescenčno barvanje proti vimentinu na primarni celični liniji kozje mlečne žleze.....	28
Slika 14: Imunofluorescenčno barvanje proti β -kazeinu na primarni celični liniji kozje mlečne žleze.....	29
Slika 15: Imunofluorescenčno barvanje proti citokeratinoma 14 in 18 na tkivu kozje mlečne žleze.....	29
Slika 16: Imunofluorescenčno barvanje proti gladkemu mišičnemu α aktinu na tkivu kozje mlečne žleze.	30
Slika 17: Imunofluorescenčno barvanje proti epitelijski celični adhezijski molekuli na tkivu kozje mlečne žleze.	31
Slika 18: Imunofluorescenčno barvanje proti mucinu 1 na tkivu kozje mlečne žleze.	32

SLOVARČEK

ACTB	β aktin
α SMA	gladki mišični α aktin
CSFV	virus prašičje mrzlice
CSN	kazein
hG-CSF	humani granulocitne kolonije stimulirajoči faktor
KRT (5, 14, 18)	(cito)keratin
EMT	epitelno-mezenhimska tranzicija
EpCAM	epitelijska celična adhezijska molekula
HMEC	humane celice mlečne žleze
GMEC	kozje celice mlečne žleze
IF	imunofluorescenca
IGF-I	inzulinu podobni rastni faktor
MET	mezenhimsko-epitelna tranzicija
MUC	mucin
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PTHrp	paratiroidnemu hormonu sorodni peptid
VIM	vimentin
VNTR	variabilno število tandemskih ponovitev

1 UVOD

Koze (*Capra hircus*) spadajo med pogostejše gojene domače živali. Spadajo v družino votlorogov (*Bovidae*) in poddružino koz (*Caprinae*). Bile so ene prvih udomačenih živali. Najbolj sorodne so jim ovce, s katerimi si delijo poddružino. Danes je poznanih približno 300 pasem koz. Sanske koze so ena najpogostejših mlečnih pasem. V Sloveniji število koz narašča, s tem pa tudi količina namolženega mleka. Leta 2012 je bilo tako v Sloveniji namolženih 1,2 milijona litrov kozjega mleka (Kmetijstvo in ribištvo, 2014). Svetovna proizvodnja je leta 2011 znašala 15,5 milijona ton kozjega mleka, od tega ga je bila večina pridobljenega v južni Aziji in vzhodni Afriki, kjer kozje mleko predstavlja tudi do 50 % vsega pridobljenega mleka (FAOSTAT, 2011).

Poleg tradicionalne gospodarske uporabe za mleko, meso, dlako in kože, koze uporabljajo tudi v znanstvene namene in sicer kot modelne in poskusne živali. Koze zaradi relativno kratke brejosti in zgodnje spolne zrelosti predstavljajo odličen model za preučevanje fetalnega razvoja in laktacije. Z vzpostavitvijo kozjih celičnih kultur je omogočeno poglobljeno raziskovanje bolezni, poleg tega so transgenske koze uporabne za proizvodnjo rekombinantnih proteinov. Uporabili so jih na primer za proizvodnjo človeškega hormona hG-CSF (humani granulocitne kolonije stimulirajoči faktor, angl. human granulocyte colony-stimulating factor), cepiva za prašiče proti virusu svinjske mrzlice (E2-CSFV, angl. classical swine fever virus) in kot modelne živali za testiranje kostnih presadkov in študije celjenja osteohondralnih poškodb (Freitas in sod., 2012; Toledo in sod., 2007; Lamerigts in sod., 2000; Jackson in sod., 2001). Prvi humani rekombinantni protein na tržišču antitrombin III je bil sintetiziran prav v kozji mlečni žlezi (Niemann in Kues, 2003). Koze so, poleg drugih prežvekovalcev, ki se gojijo kot domače živali (krave, kobile, ovce), tudi obetavni model za preučevanje tumorjev mlečne žleze. Pri njih se namreč ti tumorji pojavljajo izjemno redko, poleg tega pa je zgradba kozje mlečne žleze bolj podobna človeški kot na primer mišja ali podganja, ki se najpogosteje uporabljata za tovrstne študije (Prpar Mihevc in Dovč, 2013).

2 OPREDELITEV PROBLEMA

Celične kulture ponujajo dobrodošlo alternativo poskusom na živih živalih, organih in tkivu, pridobljenih z biopsijami. So cenejši, hitrejši in bolj human način raziskovanja živalskih bolezni, razvoja novih načinov zdravljenja in testiranja snovi, namenjenih ljudem. Ali je celična kultura ustrezen nadomestek za določeno tkivo ali *in vivo* poskus, je odvisno od tega, kako dobro celična kultura ponazarja tkivo – njegove lastnosti in funkcije. Če želimo preučevati določen celični tip, je potrebno celično kulturo, ki jo običajno tvori heterogena mešanica celic, najprej okarakterizirati – določiti posamične celične tipe.

Tkivo mlečne žleze tvorijo različni celični tipi; stromalne celice, maščobne celice in različni tipi funkcionalno pomembnih celic - npr. žlezne luminalne epitelne celice, kontraktilne mioepitelne celice, epitelne celice, ki tvorijo mlečne kanalčke, in matične/predniške celice. Tekom razvoja in reproduktivnih ciklov se v mlečni žlezi dogajajo ciklične spremembe, ki močno vplivajo na zastopanost posameznih celičnih tipov v tkivu. Za posamezne celične tipe je značilno izražanje specifičnih označevalcev.

Razlike v izražanju izbranih označevalcev v celični kulturi in tkivu smo v nalogi najprej preverjali na ravni mRNA, nato pa še na ravni proteinov. Razlike v zastopanosti posameznih celičnih tipov/označevalcev smo ugotavljali na vzorcih juvenilne in odrasle koze v laktaciji ter poskušali določiti nabor označevalcev, ki bi bili specifični za posamezne celične tipe.

3 HIPOTEZE

Na osnovi pregleda literature in širše proučitve problema smo oblikovali sledeče hipoteze:

- Izražanje označevalcev na ravni mRNA se ujema z izražanjem na ravni proteinov.
- Izražanje testiranih označevalcev je v tkivu in v celični kulturi enako.
- Celična kultura kozje mlečne žleze je ustrezen model za tkivo mlečne žleze.
- Protitelesa, narejena proti specifičnim antigenom v drugih živalskih vrstah oz. človeku, delujejo tudi proti homolognim kozjim antigenom in so uporabna za karakterizacijo primarne celične kulture mlečne žleze koze.
- Z uporabo specifičnih protiteles lahko med heterolognimi celicami mlečne žleze določimo luminalne, mioepitelne in stromalne celice.

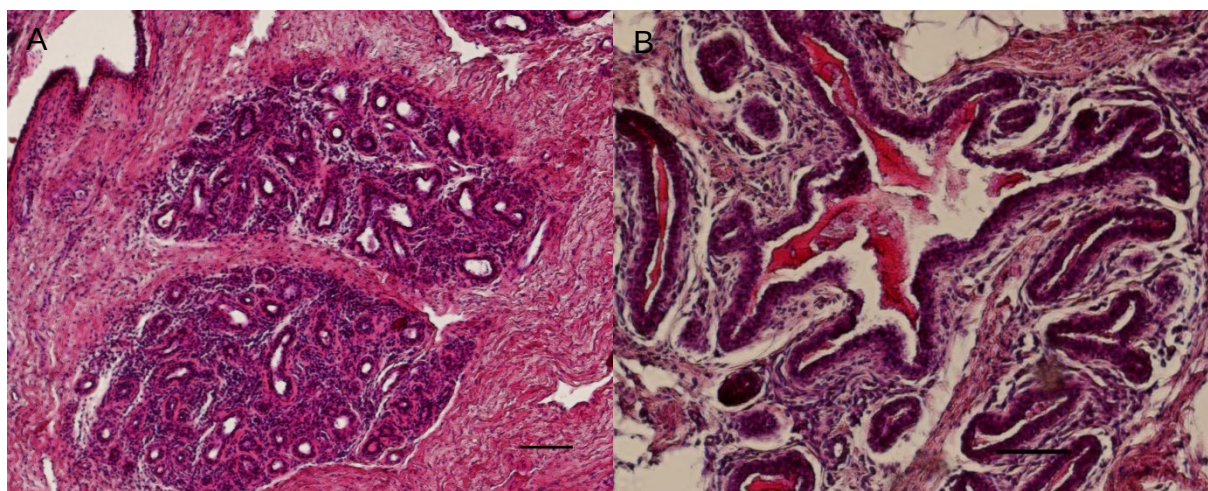
4 PREGLED LITERATURE

4.1 MLEČNA ŽLEZA

4.1.1 Struktura

Mlečna žleza je sekundarni spolni organ, značilen za samice sesalcev. Osnovna struktura je med vrstami dobro ohranjena. Je kožna žleza z apokrinim izločanjem. Cevasto-mešičkasta struktura je z vezivnim tkivom predeljena na režnje. Sestavljena je iz žleznega tkiva, vezivnega tkiva, maščobnega tkiva in je preprejena s krvnimi žilami in živci. Razmerje med tipi tkiv se spreminja glede na starost in fiziološko stanje živali. Drobničica ima po dva mlečna kompleksa, ki imata vsak po en sesek. Med seboj sta ločena s pretinom iz vezivnega tkiva.

Osnovna funkcionalna enota mlečne žleze je alveola – mešiček, katerega notranja plast je iz žleznega epitelija, ki ga sestavljajo luminalne celice in predstavlja sekretorno tkivo, v katerem nastaja mleko (slika 1). Obdajajo ga mioepitelne celice, ki s krčenjem omogočajo praznjenje alveol - izstiskanje mleka po mlečnem kanalčku. Kanalčki se združujejo v večje kanale, ki se stekajo v žlezno (vimensko) cisterno ter od tam skozi sesek. Za mioepitelnimi celicami se nahaja bazalna membrana, ki ima pomembno vlogo v razvoju epitelija in v induciranju polarnosti epitelija. V mlečni žlezi so prisotne tudi multipotentne matične/predniške celice, ki ob cikličnih spremembah (laktacija-involucija) omogočajo regeneracijo žleznega epitelija (Prpar in sod., 2012).



Slika 1: Tkivo kozje mlečne žleze: A – mlečna žleza koze v laktaciji; temnejši del predstavlja žlezno tkivo z alveolami, ki so obdane s plastjo epitelnih celic (temno vijolične; merilo = 100 μ m). B – mlečna žleza juvenilne koze; žlezno tkivo še ni razvito, maloštevilne večje alveole so obdane z debelejšo plastjo epitelnih celic (merilo = 100 μ m).

4.1.2 Razvoj

Razvoj mlečne žleze je genetsko in hormonalno nadzorovan. Grobo se razvoj deli na pre-natalni in post-natalni. V embrionalni fazi se organ zasnuje pri obeh spolih (do mlečnih

brstov). Razvije se iz embrionalnega ektoderma. Na ventralni strani embrija se razvijeta dve epitelni zadebelitvi, mlečni liniji (angl. mammary lines). Ti se razvijeta v mlečna brsta (angl. milk buds), ki sta od mezenhima ločena z bazalno membrano. Na sredi brstov se nato dogajajo celične spremembe. Celice na obrobju postajajo stolpičaste. Tako popek postane z daljšo osjo pravokoten na površino. Z množenjem mezenhimskih celic, ki obdajajo mlečni popek, začne nastajati izboklina – sesek. Z namnoževanjem in vraščanjem celic epiderma nastane primarni brst, ki je ima na notranji strani zadebelitev. Kasneje poteka kanalizacija tega brsta, nastanek žleznega sinusa oziroma cisterne in nastanek sekundarnih popkov, ki po razrastu mlečnih kanalčkov tvorijo mlečne vode, iz katerih nato vznikajo terciarni popki. Osnovni sistem kanalčkov se razvija do rojstva in je omejen na regijo ob žlezem sinusu. Obdajajoče mezenhimske celice zagotovijo podporno vezivno tkivo in krvne žile, ločijo vime na dva dela ter se delno razvijejo v maščobno tkivo (McGeady in sod., 2006).

Po rojstvu se pri kozi odvija alometrična rast – poteka razvoj mlečnih kanalčkov, kopiči se maščobno in vezivno tkivo. V pred-pubertetnem obdobju na ta razvoj vpliva tudi prehranjenost (Bowden in sod., 1995). Pred puberteto na razvoj mlečne žleze s sekrecijo vplivajo tudi jačniki. Razvoj mioepitelnih celic mlečne žleze je bil pri telicah v prepubertetni dobi po ovariektomiji spremenjen (Safayi in sod., 2012). Mioepitelne celice predstavljajo neke vrste izmenjevalno pregrado med ekstracelularnim matriksom in celicami lumna. Imajo pomembno vlogo v razvoju in funkciji mlečne žleze. Poznavanje dinamike njihovega spreminjanja lahko pripomore pri prizadevanjih za višjo produkcijo mleka.

Večje spremembe se začnejo dogajati v puberteti, ko pod vplivom hormonov poteka intenzivna rast mlečne žleze, razvoj kanalčkov in alveol. Estrogen spodbuja razvoj sistema kanalčkov, progesteron pa razvoj sekretornega tkiva. Rastni hormon in glukokortikoidi vplivajo na razvoj kanalčkov. Hormoni jajčnikov in placentne vplivajo na razvoj alveolarnega tkiva, ki nadomesti maščobno tkivo (McGeady in sod., 2006).

Pri odrasli živali laktacijski cikel delimo v štiri faze: mamogenezo, laktogenezo, galaktopoezo in involucijo. Vsaka izmed teh faz je uravnavana prek različnih hormonov, ki jih lahko delimo v tri skupine: reproduktivne hormone (estrogen, progesteron, placentalni laktogen, prolaktin in oksitocin), metabolne hormone (rastni hormon, kortikosteroidi, hormoni ščitnice, inzulin in gastrointestinalni hormoni) in lokalno proizvajane hormone (rastni hormon, prolaktin, paratiroidnemu hormonu sorodni peptid (PTHrp) in leptin). V mamogenezi so pomembni metabolni hormoni, rastni faktorji in prolaktin za normalen razvoj mlečne žleze. Tekom brejosti se žlezni epitelij deli pod vplivom estrogena in progesterona. Estrogen spodbuja izločanje inzulina podobnega rastnega faktorja (IGF-I) iz stromalnih celic, ki tudi vpliva na rast epitelnih celic. Tekom laktogeneze in galaktopoeze je proizvodnja mleka nadzorovana s prolaktinom in rastnim hormonom. Pri prežvekovalcih rastni hormon v galaktopoezi prevladuje nad prolaktinom. Pomemben je tudi oksitocin, ki ob sesanju sproža izstiskanje mleka. Tekom involucije je postopni upad epitelijskega povezan z nižanjem ravni prolaktina, rastnega hormona in IGF-I (Svennersten-Sjaunja in Olsson, 2005).

Mlečna žleza koze se spreminja tudi med laktacijo. Podatki o dinamiki produkcije mleka in aktivnosti celic se nekoliko razlikujejo. ELSayed in sod. (2009) navajajo najvišjo produkcijo mleka pri kozah sredi obdobja laktacije, nižjo v zgodnji laktaciji in najnižjo v pozni. V skladu s tem se giblje tudi število alveol in število celic v alveolah. Tudi aktivnost celic, določena z alkalno fosfatazo, ki je značilna zlasti za mesta, kjer poteka aktiven transport prek membrane, je najvišja v zgodnji in srednji laktaciji. Castañares in sod. (2013) pa navajajo pri ovcah največ alveol in sekretornih celic tik pred porodom in počasno upadanje števila med laktacijo. Število sekretornih celic na alveolo in proizvodnja mleka na celico sta se približno ohranjala. Razvoj, ki poteka med laktacijo, in laktacija se razlikujeta tudi glede na to, ali gre za prvo ali kasnejše laktacije. Za prvo laktacijo je značilno, da je daljša, vendar je produkcija mleka nižja (Safayi in sod., 2010).

Inzulin vpliva na učinkovitost izkoriščanja krme in produkcijo mleka. Ker je izkoristek oziroma pretvorba energije in proteinov iz krme v mleko pri mlečnih kravah dokaj nizka, tudi dodajanje krme nima velikih učinkov. Študije kažejo, da morda količina hranil ni tista, ki prva omejuje donos mleka in proteinov, temveč ima vlogo pri tem tudi endokrini sistem. Bequette in sod. (2001) so opazovali vpliv dodanega insulina na metabolizem v mlečni žlezi, aminokisline v krvi in krvni pretok. Insulin je povečal krvni pretok v zadnji nogi in mlečni žlezi. Insulin je indirektni regulator produkcije mleka, saj so bili učinki časovno zamaknjeni. Na proizvodnjo in kakovost mleka vplivajo tudi razpoložljiva hranila, vendar zveza ni premo-sorazmerna. V obdobju laktacije koz se lizin smatra za prvo aminokislino, katere pomanjkanje v prehrani omejuje tvorbo mlečnih proteinov. Kljub takšnim predvidevanjem pa se ob infuzijskem dodajanju lizina in metionina donos proteinov v mleku ni povečal, ne v zgodnji ne v pozni fazi laktacije (Mabjeesh in sod., 2000).

4.2 CELIČNE KULTURE

Razvoj celičnih kultur je ponudil možnost bolj ekonomičnega in etičnega raziskovanja. Celične kulture sicer niso popoln posnetek *in vivo* stanja, vendar so lahko dovolj dober približek, hkrati pa omogočajo prihranek časa, denarja, poskuse brez žrtvovanja živali ali bolečih operativnih posegov na njih. Uporabo celičnih kultur namesto živali spodbujamo tudi v okviru načela treh R (the 3Rs – reduce, refine, replace), ki zagovarja zniževanje števila poskusnih živali, izpopolnjevanje študij, bolj humano in prilagojeno ravnanje z živalmi in njihovo zamenjavo s celičnimi kulturami.

Celična kultura celic mlečne žleze je bila vzpostavljena že pri več živalskih vrstah. Celične kulture so različne in različno učinkovite pri posnemanju *in vivo* značilnosti. Primarna celična kultura lahko vključuje poljubne celične tipe iz tkiva. Tkivo mlečne žleze sestavljajo heterogene celice, pogosto pa prevladuje določen celični tip (na primer epitelne celice). Najbolje ohranjene značilnosti tkiva imajo primarne celične kulture, ki so vzpostavljene kulture iz tkiva in imajo običajno omejeno kapaciteto deljenja. Poleg teh poznamo tudi

celične linije, ki so lahko netransformirane in imajo omejeno število delitev, ali pa so transformirane in se lahko delijo neomejeno.

Ene najzgodnejših celičnih kultur mlečne žleze so bile kravje kulture. Schmid in kolegi (1983) so vzpostavili celične linije iz kravjih epitelnih celičnih kultur. Opazovali so spreminjanje izražanja citokeratinov in drugih filamentov citoskeleta med tkivom *in vivo*, celično linijo, gojeno na gojišču s hormoni, in celično linijo, gojeno na gojišču brez hormonov. Celice, gojene v prisotnosti hormonov, so ohranile izražanje citokeratinov kot v tkivu in niso izražale vimentina, pri celicah, gojenih brez hormonov, je bilo obratno. Izražanje vimentina, zlasti v večjih količinah, je sicer za tkivo neznačilno. Goveje epitelne celične kulture oziroma linije mlečne žleze so vzpostavili tudi Huynh in sod. (1991) in Zavizion in sod. (1996). Tudi Jedrzejczak in sod. (2014) so vzpostavili kulturo kravje mlečne žleze. Preverili so, ali je bolj primerna kultura iz celic krav v laktaciji, telic, ali krav v involuciji. Kulture iz celic telic so se izkazale za najprimernejše za morfološke študije in analize izražanja genov, ob nadaljni analizi so bile celice v drugi pasaži potrjene kot najustreznejše. Kulture iz krav v involuciji so dale podobno dobre rezultate.

Kot nadomestek za biopsije vimena so poskušali tudi z izolacijo somatskih celic iz kravjega mleka (Krappmann in sod., 2012). Izolate epitelnih celic mlečne žleze so obogatili z uporabo protitelesa proti KRT18, ki so ga epitelne celice izražale veliko več kot tkivo vimena. Ko pa so primerjali izražanje drugih specifičnih genov, med izražanjem v vimenu in v zbranih epitelnih celicah iz mleka ni bilo korelacije. Pri interpretaciji podatkov in razširjanju rezultatov z izoliranih epitelnih celic na celotno vime, je potrebna pazljivost.

Zheng in He (2010) sta vzpostavila prašičjo kulturo epitelnih celic mlečne žleze, v katero sta vnesla gen za zeleni fluorescentni protein. Celice so v kulturi uspešno rastle tudi preko daljših period in več pasaž in so izražale zeleni fluorescentni protein. Sun in kolegi (2005) so izolirali epitelne celice iz mlečne žleze svinj in jih gojili v kulturi. Funkcionalnost celic v kulturi so preverili z detektiranjem izražanja značilnih genov (α -laktalbumin, β -kazein, β -laktoglobulin) v prisotnosti/odsotnosti prolaktina. V prisotnosti hormona so se začeli izražati vsi trije proteini. Preverjali so tudi učinkovitost transfekcije, prenos genov in izražanje vnešenih genov *in vitro*. Kot reporterski gen so uporabili zeleni fluorescentni protein. Transfekcija je bila uspešna, izražanje konstruktov je začelo upadati med 10 in 15 pasažo.

Celična kultura epitelnih celic mlečne žleze je bila razvita in karakterizirana tudi za več pasem koz. Ogorevc in sod. (2009) so vzpostavili kulturo iz koze sanske pasme, Tong in sod. (2012) iz pasme Guang Zhong, Pantschenko in sod. (2000) pa iz anglo-nubijske koze.

Celična kultura humane mlečne žleze je bila vzpostavljena tudi že v tridimenzionalnem modelu (Wang, 2012). Ta naj bi bil najboljši posnetek tkiva *in vivo*, saj vključuje več celičnih tipov, ki jim matrica omogoča tudi prostorsko strukturiranje.

Celične kulture predstavljajo poleg preprostega modela tkiva tudi vir DNA in RNA za genetske raziskave. Sicer so pri kozah poleg celične kulture preizkusili tudi izolacijo RNA iz mlečnih maščobnih kapljic (Brenaut in sod., 2012). Maščobni globuli so se izkazali za dober vir RNA, ki je bila popolnoma primerljiva RNA, izolirani direktno iz tkiva – epitelnih celic mlečne žleze. Tako so ugotavljali spreminjanje izražanja genov ob bakterijski infekciji.

4.2.1 Epitelno-mezenhimska tranzicija

Epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT) in mezenhimsko-epitelijska tranzicija (MET) imata pomembni vlogi v embrionalnem razvoju. Pri EMT gre v glavnem za porušenje tesne epitelijske strukture – prekinitve povezav med celicami, izgubo značilnih epitelijskih adhezijskih komponent in pridobitev mezenhimskih označevalcev, kot je vimentin (Chaw in sod., 2012). Epitelne celice lahko migrirajo, kar povezujejo z napredovanjem – širjenjem rakastih obolenj. Obraten proces je MET, ki je bil manj preučevan. V tem primeru mezenhimske celice, ki so sicer ohlapno organizirane in individualizirane, postanejo fenotipsko bolj podobne epitelnim celicam. Tudi MET je povezan s širjenjem tumorjev, saj celice po EMT in razsejanju lahko prestanejo še MET in na mestu metastaze rastejo kot epitelijske tumorske celice (Yang in sod., 2013). EMT so opazovali tudi na celičnih linijah epitelnih celic mišje mlečne žleze (Robson in sod., 2006). V primeru, da je EMT potekala tudi v naši celični kulturi, bi to lahko delno spremenilo izražanje označevalcev in rezultate.

4.3 IZRAŽANJE OZNAČEVALCEV

Z zaznavanjem izražanja specifičnih označevalcev lahko določamo celične tipe, opazujemo stanja in spremljamo spremembe, ki se dogajajo v tkivu ali celični kulturi ob določenih pogojih. V našem primeru smo preizkusili označevalce, na podlagi katerih bi lahko določili različne celične tipe mlečne žleze in funkcionalno stanje tkiva oz. celic.

4.3.1 Mucin 1 (MUC1)

MUC1 je membransko vezan glikoprotein, ki se tvori v različnih epitelnih tkivih. Proizvajajo ga tudi epitelne celice mlečne žleze in ga kot komponento membrane mlečnih maščobnih globul izločajo v mleko. Gen, ki kodira ta protein, je močno polimorfen. Transmembranski del je relativno dobro ohranjen, VNTR (variable number of tandem repeats) del pa je visoko polimorfen. Pri kozi so našli 15 različnih alelov (Sacchi in sod., 2004). Poleg razlik v proteinskem delu je zelo različna lahko tudi glikozilacija. Primarna naloga mucina je vlaženje in lubrikacija epitelijskega tkiva. Možno je, da igra MUC1 tudi vlogo pri imunskem odgovoru na bakterijske okužbe, tako da preprečuje pritrditev bakterij na površino epitelijskega tkiva (Sando in sod., 2009). V mlečni žlezi se mucin1 specifično izraža v luminalnih epitelnih celicah (Raouf in sod., 2012).

4.3.2 Alfa aktin gladkih mišičnih vlaken (α SMA) in β -aktin (ACTB)

Aktin je strukturni protein, pogost v evkariontskih celicah in del njihovega citoskeleta. Poznanih je šest izoform tega proteina. Dve izmed izoform sta ne-mišični in naj bi bili prisotni v vseh celicah, ostale štiri so značilne za različne mišične tipe. Izoforme se med seboj razlikujejo le za nekaj aminokislinskih ostankov. A-aktini so glavne komponente kontraktilnega aparata. A-gladki mišični aktin je (večinsko) prisoten tudi v mioepitelnih celicah mlečne žleze, čeprav se med laktacijo v njih poveča tudi prisotnost γ -SMA (Alkafafy in sod., 2012; Arnoldi in sod., 2013). Miši, ki niso imele aktivnega gena za α -aktin, niso bile sposobne uspešno hraniti mladičev, ki so kmalu po rojstvu podlegli podhranjenosti (Weymouth in sod., 2012). Pomanjkanje α -aktina je verjetno onemogočalo normalno krčenje mioepitelnih celic in iztiskanje mleka. B-aktin je eno od ne-mišičnih izoform aktina in naj bi bil prisoten v večini tipov celic.

4.3.3 EpCAM

EpCAM (angl. epithelial cell adhesion molecule) je adhezijska molekula, transmembranski glikoprotein. Izraža se na medceličnih bazolateralnih stikih večine epitelijskih tkiv, razen ploščatih epitelijev. V mezenhimskih tkivih se ne izraža. Pomemben je za pravilno morfogenezo tkiva in njegovo integriteto, poleg tega ima vloge tudi v celičnih delitvah, migraciji, diferenciaciji in signaliziranju. EpCAM je tudi pomemben tumorski označevalec, saj je v epitelijskih rakavih obolenjih njegovo izražanje močno povečano (Schnell in sod., 2013). Sesalci z neizraženim EpCAM ne preživijo in umrejo že *in utero*. V mlečni žlezi naj bi EpCAM izražale vse epitelne celice (Martowicz in sod., 2013; Raouf in sod., 2012).

4.3.4 CD49 ali integrin alfa 6

Integrini so proteini, ki se izražajo na površini celic. Sestavljeni so iz dveh domen, α in β , ki obstajata v različnih izoformah. Domena $\alpha 6$ se združi z $\beta 1$ ali $\beta 4$. Njihove glavne vloge so v pritrtanju celic, signaliziranju, celični komunikaciji, so receptorji za laminine in glikoproteine zunajceličnega matriksa. CD49f je bil identificiran tudi kot označevalec rakavih celic pri raku dojke, zlasti celic, ki so v procesu epitelno-mezenhimske tranzicije (Mostert in sod., 2012). Interakcija med laminini in integrini je pomembna za razvoj živčevja. Miši brez *Itga6* gena so imele na koži hude mehurje in so poginile ob rojstvu. Ljudje, ki trpijo za bulozno epidermolizo, imajo verjetno mutacijo v *ITGA6* genu (Georges-Labouesse in sod., 1998). CD49 je marker mezenhimskih celic. V mlečni žlezi bi pričakovali izražanje označevalca v vseh epitelnih celicah (Raouf in sod., 2012).

4.3.5 Citokeratini in vimentin

Celični skelet je sestavljen iz mikrofilamentov, intermediarnih filamentov in mikrotubulov. Intermediarni filament se delijo na šest razredov, ki so značilni za določene tipe celic. Citokeratini spadajo v razreda I in II in se večinoma nahajajo v epitelnih celicah.

Vimentin je (poleg desmina) intermediarni filament razreda III in sestavina citoskeleta v mezenhimskih celicah (Satelli in Li, 2011). Vzdržuje celično obliko, integriteto in zagotavlja zaščito proti stresu (Goldman in sod., 1996). Kot označevalec se ga uporablja v celicah, ki se razvijajo iz mezenhima, in v celicah, ki prestajajo epitelno-mezenhimsko tranzicijo. Njegovo izražanje je povečano v tumorjih. V mlečni žlezi in njenih tumorjih je vimentin označevalec za mioepitelne in mezenhimske celice (Toniti in sod., 2010).

V mlečni žlezi je citokeratin 14 značilen označevalec za mioepitelne celice, citokeratin 18 pa za celice lumna (Alkafafy in sod., 2012; Tong in sod., 2012; Martowicz in sod., 2013). Martowicz in kolegi (2013) navajajo tudi izražanje CK5/14 (kombinacija citokeratinov 5 in 14) kot označevalec za mioepitelne celice v mlečni žlezi.

4.3.6 Kazein

Kazeini so družina glavnih mlečnih proteinov. Zajemajo kazein α S1, α S2, β in κ kazein. So dokaj hidrofobni, zato se v mleku nahajajo v skupkih – kazeinskih micelijih. Sestava in vsebnost kazeinov vplivata na kakovost mleka in njegovo uporabnost za različne namene, zlasti za izdelavo sira. Kazein α S1 vpliva na koagulacijske lastnosti mleka in izkoristek pri izdelavi sira (Díaz in sod., 1999). Za koze je značilna visoka polimorfnost genov za kazeine, kar tudi vpliva na kakovost mleka. Kazeini se lahko izražajo v celičnih kulturah mlečne žleze, ob prisotnosti laktogenih hormonov (Ogorevc in sod., 2009; Tong in sod., 2012). Izražanje kazeinov bi pričakovali v terminalno diferenciranih luminalnih epitelih celicah.

5 MATERIALI IN METODE

5.1 MATERIALI

Kemikalije in drugi materiali, uporabljene v različnih sklopih laboratorijskega dela, in proizvajalci so navedeni v Tabeli 1.

Tabela 1: Seznam uporabljenih kemikalij glede na namen in proizvajalca.

namen	proizvajalec	kemikalije
sestavine gojišča	Sigma-Aldrich	RPMI-1640, L-metionin, L-lizin, NaHCO ₃ , Na-piruvat, penicilin-streptomycin, FBS, prolaktin, insulin, hidrokortizon, glutamin
gojenje celic	Sigma-Aldrich	PBS
	Gibco, Life Technologies	GelTrex - LDEV-Free Reduced Growth Basement Membrane Matrix
IHC	Sigma-Aldrich	Triton X-100, formaldehid
	Dako	Target Antigen Solution
izolacija RNA	Invitrogen, Life Technologies	miRNAeasy mini kit, TRIzol reagent
obdelava vzorcev z DNazo	Thermo Scientific	DNaza I, pufer
prepis RNA v cDNA	Invitrogen, Life Technologies	High capacity RNA to cDNA kit
PCR	Biotools	Polimeraza, pufer, MgCl ₂
vizualizacija vzorcev	Sigma-Aldrich	agaroza, TBE pufer

V Tabeli 2 so navedena primarna protitelesa, ki smo jih uporabili za detekcijo antigenov izbranih označevalcev v celicah kozje mlečne žleze, in njihovi proizvajalci.

Tabela 2: Protitelesa, uporabljena pri imunofluorescenci na celičnih kulturah in tkivu.

primarna protitelesa	protitelo	proizvajalec, kataloška številka
citokeratin 14 (KRT14)	kunčje poliklonsko	Covance; PRB-155P-100
citokeratin 18 (KRT18)	mišje monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology; sc-51582
gladki mišični α -aktin (SMA)	mišje monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology; sc-58669
mucin1 (MUC1)	kunčje poliklonsko	abcam; ab37435-250
epitelijska celična adhezijska molekula (EpCAM)	kunčje monoklonsko	abcam; ab32392
vimentin (VIM)	mišje monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology; sc73262
CD49f	podganje monoklonsko, konjugirano s FITC	Stemcell Technologies; CAT#10111
β -kazein (CSN2)	kunčje poliklonsko	Abbiotec; #250558

Sekundarna fluorescentno označena protitelesa, s katerimi smo detektirali in locirali vezana primarna protitelesa, so navedena v Tabeli 3.

Tabela 3: Sekundarna protitelesa

sekundarna protitelesa	proizvajalec, kataloška številka
Alexa fluor 488 kozje protitelo proti kunčjemu IgG (H+L)	Life Technologies; A11008
Alexa fluor 488 kozje protitelo proti mišjemu IgG (H+L)	Life Technologies; A11001
Alexa fluor 594 kozje protitelo proti mišjemu IgG (H+L)	Life Technologies; A-11005

V tabeli 4 so navedeni uporabljeni laboratorijski pripomočki, pribor in naprave.

Tabela 4: Seznam uporabljene opreme in pripomočkov.

oprema	proizvajalec, model
inkubator	Sanyo, CO ₂ Incubator
centrifuga	Tehtnica, Centric322A
pipete	Gilson
vakumski sesalnik	Vacusaft comfort, Vacuboy
spektrofotometer	Nanovue, GE Healthcare
mikroskop	Nikon TE 2000
PCR-aparatura	Applied Biosystems, PCR GeneAmp 9700 Thermocycler

5.2 METODE

5.2.1 Izolacija RNA iz celične kulture in tkiva

RNA smo izolirali iz celičnih kultur ter iz tkiva juvenilne koze in koze v laktaciji. Celična kultura in tkivo odrasle koze sta izvirala iz iste živali, vzorca za juvenilno kožo pa sta izvirala iz različnih živali. RNA smo izolirali z miRNeasy kit-om (Invitrogen, Life Technologies) po priloženem protokolu (s prilagoditvijo nekaterih volumnov in korakov).

5.2.2 Izolacija RNA iz celic

Celice smo po odstranitvi gojišča lizirali v T25 gojitveni posodici, z dodatkom 1,5 ml TRIzola. Tekočino s celicami smo dobro prepipetirali, prenesli v 2 ml mikrocentrifugirko in inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Nato smo suspenziji dodali 280 µl kloroforma. Sledilo je 15 sekund vorteksiranja, 3-minutna inkubacija na sobni temperaturi in centrifugiranje (1200 g, 15 minut, 4°C). Zgornjo vodno fazo smo previdno prenesli v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko. Dodali smo 1,5-kratni volumen (600 µl) ohlajenega etanola in dobro premešali s pipetiranjem. Po 700 µl tekočine smo prenesli v kolono in centrifugirali 15 sekund na 9000 g na sobni temperaturi. Korak smo ponovili tolikokrat, da smo na kolono nanesli vso tekočino. Centrifugiranje smo ponovili najprej s 700 µl pufra RWT (v kitu), nato pa še dvakrat s po 500 µl pufra RPE (v kitu), najprej za 15 sekund in nato 2 minuti. Po vsakem centrifugiranju smo tekočino, zbrano v mikrocentrifugirki, zavrgli. Kolono smo prestavili v novo mikrocentrifugirko in centrifugirali na najvišji hitrosti (25000 g) 1 minuto. Kolono smo prestavili v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in nanesli 30 µl vode. S

centrifugiranjem na 9000 g 1 minuto smo eluirali RNA. Korak smo ponovili še z 10 µl vode. Koncentracijo RNA smo izmerili z NanoVue spektrofotometrom.

5.2.3 Izolacija iz tkiva

RNA smo iz tkiva izolirali po enakem protokolu. Tkivo v vzorcu odrasle koze je bilo predhodno encimsko razgrajeno, v vzorcu juvenilne koze pa je bilo homogenizirano v homogenizatorju. Vzorca sta bila predhodno zamrznjena v TRIzolu. Po odtalitvi smo vzorca inkubirali še 5 minut na sobni temperaturi, nato smo jima dodali 140 µl kloroforma (korak 5 v protokolu). Sledil je enak postopek kot pri izolaciji iz celične kulture. Prilagodili smo volumen dodanega ohlajenega etanola – 400 µl za odraslo in 700 µl za juvenilno kozo. Vzorca smo na koncu eluirali v 30 µl vode. Koncentracijo RNA v vzorcih smo izmerili s spektrofotometrom.

5.2.4 Obdelava vzorcev RNA z DNazo

Pred prepisom RNA v stabilnejšo cDNA je potrebno vzorec obdelati z DNazo, da se odstranijo morebitni fragmenti DNA, ki bi lahko dajali lažno pozitivne rezultate. V Tabeli 5 so navedene kemikalije, ki smo jih uporabili pri obdelavi vzorcev z DNazo. Te je potrebno še prilagoditi koncentraciji izolirane DNA.

Tabela 5: Reagenti za osnovno reakcijo za obdelavo vzorcev RNA z DNazo.

Volumen reakcije	10 µl
RNA vzorec	1 µg
10x pufer z MgCl ₂	1 µl
DNaza I (50 U/µl)	1 U/µg RNA
Inhibitor RNaz (založna 20 U/µl)	1 U/µl
H ₂ O brez RNaz	do 10 µl

Vzorci smo najprej 30 minut inkubirali na 37°C. Ob koncu inkubacije smo jim dodali 1 µl 50 mM EDTA na reakcijo (5 µl v naše 50 µl reakcije) in inaktivirali DNazo z 10 minutno inkubacijo na 65°C.

5.2.5 Prepis RNA v cDNA (reverse transcription)

Vzorci smo prepisali v cDNA s High capacity RNA to cDNA kompletom reagentov (Invitrogen, Life Technologies). Volumni uporabljenih reagentov so navedeni v Tabeli 6.

Tabela 6: reakcija za prepis RNA v cDNA.

Predmešanica	10 µl
10x RT buffer	2 µl
25x dNTPs (100 mM)	0,8 µl
10x RT random primers	2 µl
encim reverzna transkriptaza	1 µl
inhibitor Rnaz	1 µl
H ₂ O brez Rnaz	3,2 µl
RNA	10 µl
Končni volumen reakcije	20 µl

Predmešanico za reverzno transkripcijo in RNA vzorec smo zmešali v razmerju 1:1. V PCR-aparaturi so bili vzorci najprej 10 minut inkubirani na 25°C, nato 2 uri na 37°C, nato še 10 minut na 85°C. Po inkubacijah so bili vzorci ohlajeni na 4°C, nato zamrznjeni do nadaljne uporabe.

5.2.6 PCR

Z verižno reakcijo s polimerazo smo preverili izražanje izbranih genetskih označevalcev na ravni RNA.

Založne raztopine začetnih oligonukleotidov za izbrane označevalce (KRT5, KRT14, KRT18, SMA, MUC1, EpCAM, CD49, VIM, CSN2 in ACTB) smo razredčili v vodi na delovno koncentracijo 10 pmol/µl. V Tabeli 7 so navedeni izbrani označevalci s pripadajočimi začetnimi oligonukleotidi in pričakovanimi dolžinami produktov PCR.

Tabela 7: Izbrani označevalci, uporabljeni začetni oligonukleotidi in pričakovane dolžine produktov

Označevalec	Gen	F (5'→3')	R (5'→3')	dolžina produkta (bp)
KRT5	keratin 5	CCAAGCTGGCCCTGGACGTG	GCTGCTACTGCCGCTCCAC	254
KRT14	keratin 14	GAGCTGGTGCAGAGCGGCAA	CAAGTGCTTGGGGAGGCGG	552
KRT18	keratin 18	TGGCCATGCGCCAGTCTGTG	GACAGTGCGCCTCAGCTCCG	395
SMA	gladki mišični aktin α	CCGCTGCCCTGAGACCCTGT	GATGGATGGCCCGGCTTCGT	343
MUC1	mucin 1	GGCCGAGTGGGTGAAGGCAC	GGCTGTGAGCAGCCCACCTG	550
EpCAM	epitelijska cel. adhezijska mol.	ACGCACTCGGTCAGTGCCAG	GTGCCGTTGCACTGCTTGGC	217
CD49f	integrin 6 α	CTGTGGGGCGCCTAGTGGGA	CTCGCCTCCGAGTGCTTGGC	326
VIM	vimentin	GCCAGTCCGTGCTACCGCAG	TGCTGCTCCAGGAAGCGCAC	430
CSN2	β-kazein	ACAGCCTCCCACAAAACATC	AGGAAGGTGCAGCTTTTCAA	206
ACTB	aktin β	CCAACCGTGAGAAGATGACC	CGCTCCGTGAGAATCTTCAT	247

Za PCR smo najprej pripravili reakcijsko zmes, v kateri so bili vsi reagenti, razen cDNA in začetnih oligonukleotidov. Predmešanico smo razdelili na posamezne reakcije, v katere smo dodali ustrezne začetne oligonukleotide in cDNA. Negativno kontrolo smo izvedli brez dodatka cDNA. V Tabeli 8 so navedeni volumni uporabljenih reagentov.

Tabela 8: Osnovna reakcija za PCR na cDNA vzorcih.

Volumen reakcije	x1 (20 µl)	xN (20 xN µl)
10x Standard Reaction Buffer (vsebuje MgCl ₂)	2 µl	2 x N
dNTPs	1 µl	1 x N
začetni oligonukleotid Forward	0,5 µl	v vsako reakcijo posebej
začetni oligonukleotid Reverse	0,5 µl	v vsako reakcijo posebej
DNA polimeraza	0,1 µl	0,1 x N
H ₂ O brez nukleaz	15,4 µl	15,4 x N
cDNA	0,5 µl	0,5 x N

Za PCR smo uporabili naslednji program:

95°C	5 minut
95°C	60 sekund \
56°C	35 sekund - 32-34 ciklov
72°C	40 sekund /
72°C	10 minut

5.2.7 Vizualizacija vzorcev na agaroznem gelu

Uspešnost PCR in nastale produkte smo preverili na agaroznem gelu.

Pripravili smo 1% agarozni gel. TBE pufer in ustrezno maso agaroze smo zavreli v mikrovalovni pečici, da se je agaroz raztopila. Ko se je raztopina nekoliko ohladila, smo dodali nekaj mikrolitrov etidijevega bromida (EtBr). Gel smo vlili v kadičko z vstavljenim glavničkom.

Strjen gel smo prenesli v elektroforezno kadičko. Vsak vzorec smo pred nanašanjem na gel pomešali s približno 1 µl kapljico nanašalne pufra (ksilencianola). Nanesli smo tudi lestvico z znanimi dolžinami fragmentov. Elektroforezo smo nastavili na 100 V. Po približno 30 minutah smo rezultate preverili pod UV svetlobo.

5.2.8 Priprava gojišča za pGMEC

Za gojenje primarne kulture celic mlečne žleze smo pripravili gojišče s sestavo, navedeno v Tabeli 9.

Tabela 9: Sestavine gojišča za primarno kulturo celic mlečne žleze.

RPMI-1640	glede na končni volumen
L-metionin	0,1 mM
L-lizin	0,4 mM
Na-piruvat	0,1 mM
NaHCO ₃	2 g/L
Penicilin-streptomycin	1 ml/100 ml
FBS	10%
Prolaktin	1 µg/ml
Insulin	1 µg/ml
Hidrokortizon	1 µg/ml
Glutamin	2 mM

Postopek priprave gojišča je potekal v laminariju in ob uporabi aseptičnih tehnik.

Vse sestavine gojišča smo odmerili in dodali ustreznemu volumnu osnovnega gojišča RPMI-1640. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo.

5.2.9 Odmrznitev, gojenje in precepljanje celic pGMEC

Vse postopke smo opravljali v brezprašni komori (laminariju) in z uporabo aseptičnih tehnik.

Celice so bile shranjene v tekočem dušiku. Odmrznili smo eno vialo celic juvenilne koze in eno vialo celic odrasle koze.

Viali smo prenesli iz tekočega dušika v vodno kopel na 37°C, da se je tekočina skoraj popolnoma odtalila. V vsako vialo smo dodali malo ohlajenega osnovnega gojišča in dobro premešali s pipetiranjem. Suspenzijo celic iz viale smo prenesli v 15 ml centrifugirko in vialo še enkrat izprali z majhnim volumnom gojišča iz mikrocetrifugirke. Celice smo centrifugirali na 1200 rpm, 10 minut. Supernatant smo odsesali, pelet pa resuspendirali v 35 ml popolnega gojišča in jih nacepili v gojitvene posodice. Celice smo gojili v inkubatorju na 37°C in 5 % CO₂.

Celicam smo vsake 2-3 dni zamenjali gojišče. Staro izrabljeno gojišče smo odsesali in ga nadomestili s svežim.

Ko so celice dosegle konfluenco, smo jih precepili v nove gojitvene posodice. Gojišče smo odstranili in celice sprali s PBS brez Ca in Mg ionov. Dodali smo 1 ml tripsina. Gojitveno posodico smo za nekaj minut prestavili v inkubator na 37°C, da so se celice odlepili. Nato smo dodali trikratni volumen (dodanega tripsina) PBS z 10 % FBS za inhibicijo tripsina.

Suspenzijo celic smo prenesli v tubico in centrifugirali na 1200 rpm, 10 minut. Supernatant smo odsesali, pelet pa resuspendirali v gojišču. Celice smo precepili v razmerju 1:3.

5.2.10 Nacepljanje v gojitvene posodice z Geltrex-om

GelTrex (Gibco) smo nanесли po metodi tanke plasti (angl. thin layer method). Razredčili smo ga v ohlajenem gojišču brez seruma do koncentracije 0.1 mg/ml. V plošče s šestimi luknjami (angl. 6-well plate) smo nanесли 1 ml razredčenega GelTrex-a, v vsako izmed luknjic, da je bilo pokrito dno. Sledila je enournna inkubacija na 37°C. Odvečno tekočino smo odsesali in površino še enkrat sprali s PBS. Nato smo celice nacepili v plošče.

5.2.11 Fiksiranje celic v kulturah

Pred imunofluorescenčnim barvanjem smo celice fiksirali. Gojišče smo odsesali in celice dvakrat sprali s PBS. V vsako luknjico smo odpipetirali 1,5 ml 10% formalina, sledila je 30 minutna inkubacija na sobni temperaturi. Celice smo še enkrat sprali s PBS in jih pustili v 2 ml PBS.

5.2.11 Imunofluorescenca na celični kulturi

Celice smo naceplili v ploščo s 6 luknjicami. Celice v vsaki izmed luknjic smo barvali proti enemu (SMA, MUC1, EpCAM, CSN2), oziroma dvema proteinoma (KRT14 in KRT18).

Imunofluorescenčno barvanje smo izvedli po sledečem protokolu. Celice v luknjici smo permeabilizirali z dodatkom 2 ml 1% Tritona X-100 30 minut na sobni temperaturi. Sledilo je trikratno spiranje s PBS (dodatek in odsesanje 2 ml PBS). Potencialna nespecifična vezavna mesta protiteles smo blokirali s 45 minutno inkubacijo v 2 ml 10 % kozjega seruma. Po odstranitvi seruma smo v luknjicah s celicami z vodoodbojnim pisalom narisali krog, ki je omejil površino, na katero smo nanašali protitelesa. S tem smo dosegli manjšo porabo reagentov. Sledila je inkubacija s primarnimi protitelesi 1,5 ure na sobni temperaturi (EpCAM), oziroma čez noč na 4°C (KRT14, KRT18, SMA, MUC1, CD49, VIM, CSN2). Po inkubaciji smo celice znova trikrat sprali s PBS. Nanesli smo ustrezne redčitve sekundarnih protiteles (Tabela 10) in inkubirali 1 uro na sobni temperaturi v temi. Po inkubaciji smo celice ponovno trikrat sprali s PBS. Na koncu smo celice 3 minute inkubirali v DAPI za obarvanje celičnih jeder. Po inkubaciji z DAPI smo luknjice še enkrat sprali, nato pa zalili z 2 ml PBS in slikali na fluorescentnem mikroskopu Nikon TE 2000 oziroma shranili na 4°C.

Tabela 10: Uporabljena primarna in sekundarna protitelesa ter njihove redčitve.

primarno protitelo	uporabljena redčitev	sekundarno protitelo	uporabljena redčitev
KRT14	1:200	488 kozje proti kunčjemu IgG	1:200
KRT18	1:50	594 kozje proti mišjemu IgG	1:200
SMA	1:200	488 kozje proti mišjemu IgG	1:200
EpCAM	1:200	488 kozje proti kunčjemu IgG	1:200
MUC1	1:200	488 kozje proti kunčjemu IgG	1:200
VIM	1:200	488 kozje proti mišjemu IgG	1:200
CD49f	1:200	/	/
CSN2	1:200	488 kozje proti kunčjemu IgG	1:200

Pri nekaterih imunofluorescenčnih barvanjih je bil protokol prilagojen:

- CD49 se nahaja na celični membrani, zato smo permeabilizacijo izpustili. V tem primeru je označeno že primarno protitelo. Po nanosu primarnega protitelesa je sledila inkubacija čez noč na 4°C, nato pa dokončanje postopka po protokolu (od siceršnje inkubacije s sekundarnimi protitelesi naprej).

5.2.12 Barvanje z Oil red-O

Prisotnost mlečne maščobe smo določali z Oil Red-O. Za založno raztopino smo 0,5 g prahu raztopili v izopropanolu z blagim segrevanjem v vodni kopeli. Za delovno raztopino smo 30-ml založne raztopine zmešali z 20 ml destilirane vode ter po 10 minutah prefiltrirali. V vsako luknjico smo nanесли 2 ml delovne raztopine, sledila je 15 minutna inkubacija. Na koncu smo celice še sprali z destilirano vodo.

5.2.13 Imunofluorescenca na tkivnih rezinah

Postopek za imunofluorescenčno barvanje tkivnih rezin je bil enak postopku za barvanje celičnih kultur, le da je potrebno tkivne rezine pred barvanjem še deparafinizirati.

Za odstranitev parafina in rehidracijo tkivnih rezin smo objektna stekelca inkubirali v:

- 3x po 10 minut v ksilenu,
- 2x po 5 minut v 100 % etanolu,
- po 5 minut v 96 % in 70 % etanolu.

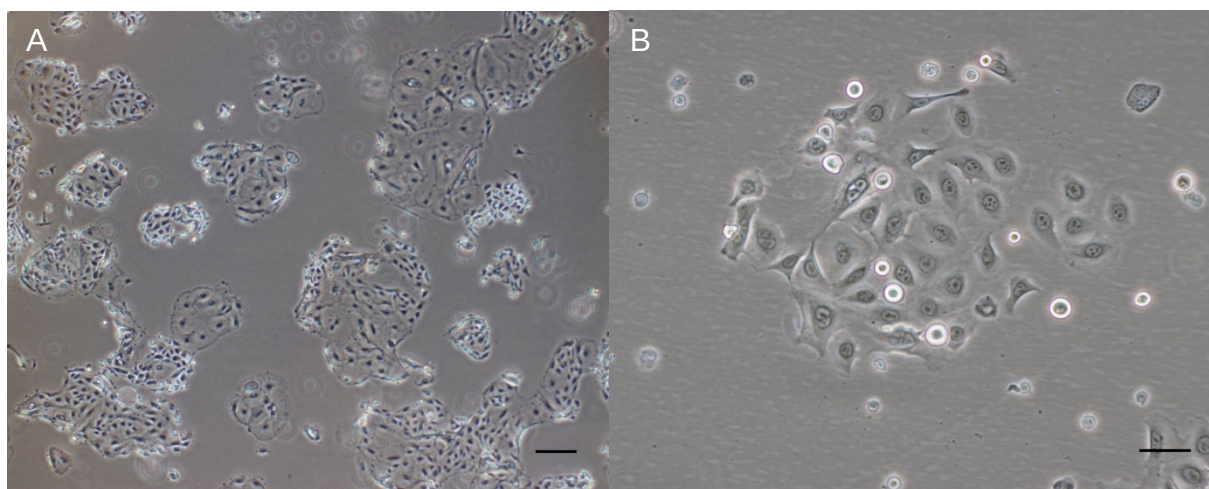
Stekelca smo sprali s PBS. Za razkrivanje antigenov (angl. antigen retrieval) smo stekelca 10 minut kuhali v Na-citratnem pufru (pH 6) v mikrovalovni pečici ob minimalnem vretju. Ponovno smo jih sprali s PBS. Tako so bila pripravljena na imunofluorescenčno barvanje po enakem protokolu kot celične kulture.

Rezultate smo opazovali in zabeležili na fluorescentnem mikroskopu Nikon TE 2000.

6 REZULTATI

6.1 GOJENJE CELIC V KULTURI

Celični kulturi obeh koz sta bili uspešno odmrznjeni in nacepljeni. Po odmrzovanju so se celice v nekaj urah po nacepljanju pritrdile na dno gojitvenih posodic. V nekaj dneh so oblikovale okroglaste kolonije (Slika 2). Luminalne celice so bile večje, na videz sploščene, okroglastih oblik, mioepitelne celice so bile bolj skladaste, manjše, fibroblasti so bili vretenastih oblik, razvejani. V obeh kulturah so bile prevladujoči tip mioepitelne celice, fibroblastov in luminalnih celic je bilo na pogled približno enako. V kulturi odrasle koze je bilo več luminalnih celic kot v kulturi juvenilne koze.

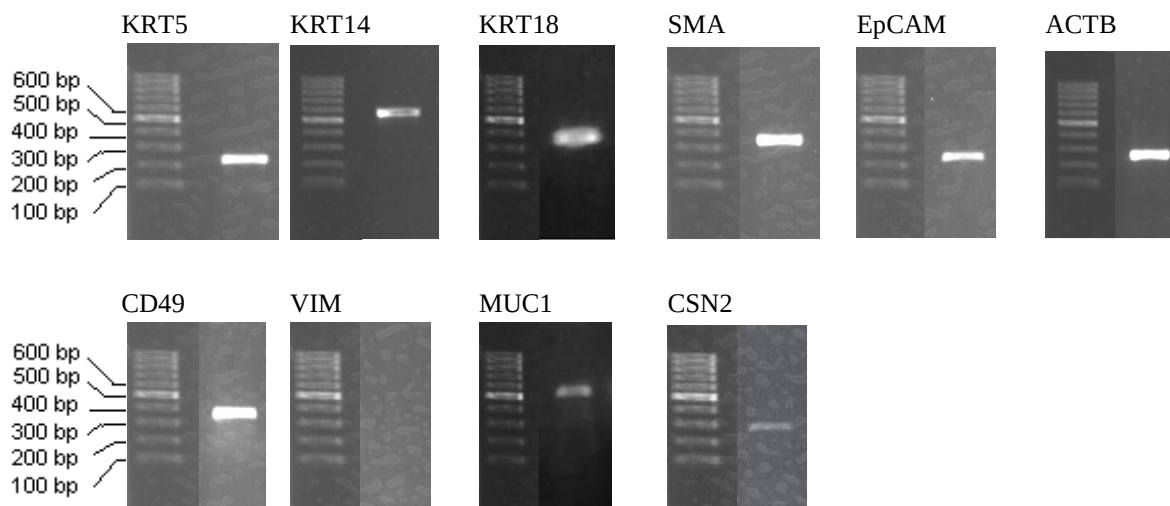


Slika 2: Celična kultura kozje mlečne žleze. Celice oblikujejo kolonije. A (merilo = 100 μm); B (merilo = 20 μm).

6.2 IZRAŽANJE OZNAČEVALCEV V CELIČNI KULTURI IN TKIVU

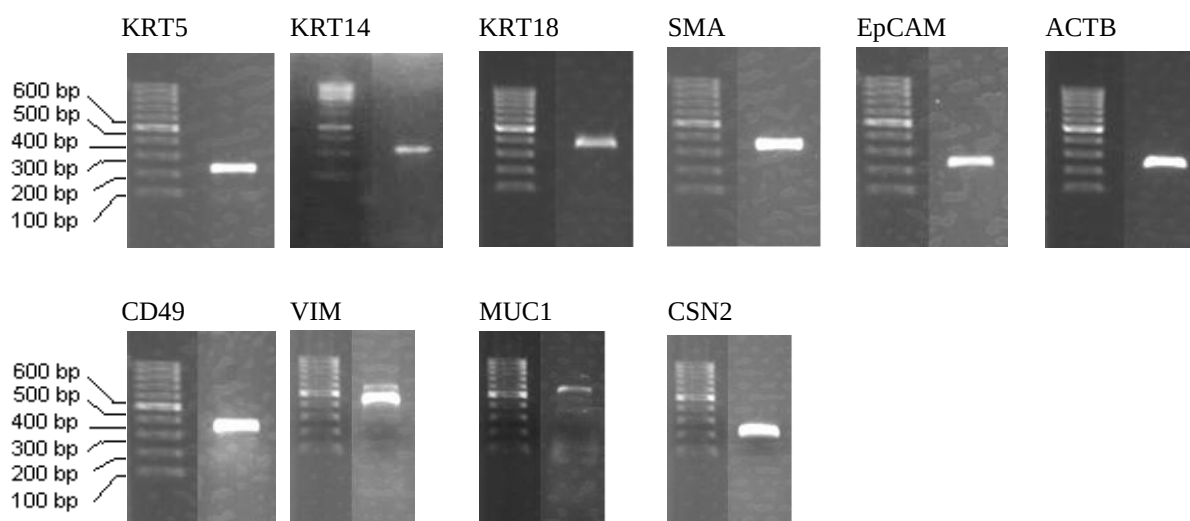
6.2.1 Odrasla koza

Koncentracija iz celične kulture izolirane RNA je bila 2261 ng/ μl . Kontaminacija RNA s proteini je bila nizka ($A_{260}/A_{280} = 2,039$), prav tako z drugimi organskimi spojinami ($A_{260}/A_{230} = 2,167$). PCR produkti so bili pričakovanih dolžin (glej Tabela 7). Vimentina nam ni uspelo detektirati (Slika 3).



Slika 3: Izrezi agaroznih gelov s produkti PCR reakcij na cDNA, pridobljeni iz celične kulture odrasle koze v laktaciji.

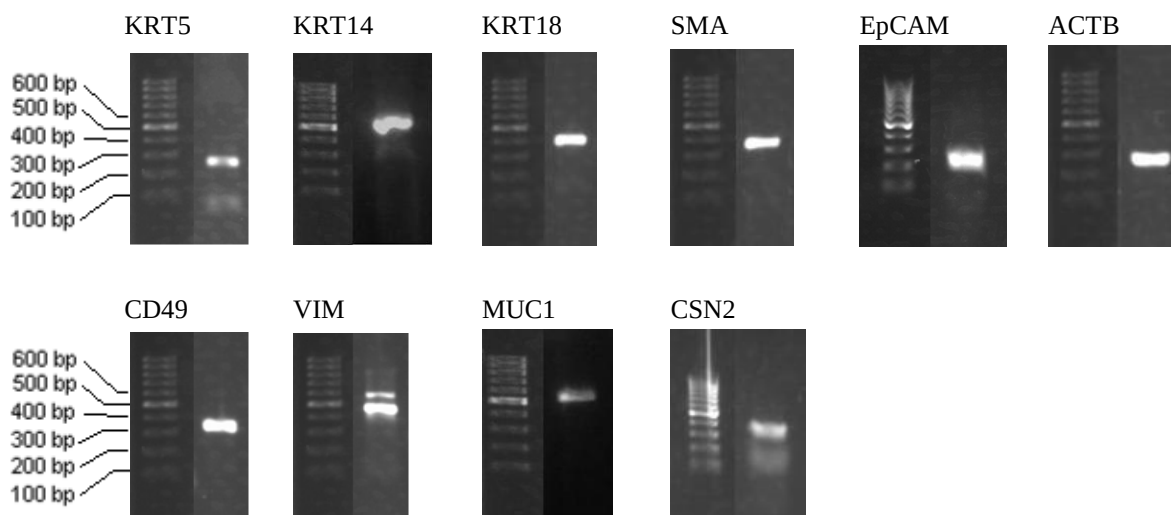
Koncentracija iz tkiva izolirane RNA je bila 190 ng/ μ l ($A_{260}/A_{280} = 2,01$; $A_{260}/A_{230} = 1,79$). Pridobljeni produkti PCR so ustrezali predvidenim dolžinam. PCR je uspel pri vseh označevalcih, le pri vimentinu se je pojavljala šibkejša dvojna proga (Slika 4). V obeh vzorcih za odraslo kozo v laktaciji so se na RNA nivoju izražali keratini 5, 14 in 18, α aktin gladkih mišičnih vlaken, epitelijska celična adhezijska molekula, β aktin, CD49, mucin 1 in β kazein. Razlika med rezultati PCR za celično kulturo in tkivo odrasle koze je tako le pri izražanju vimentina – le-ta se je v tkivu izražal, v celični kulturi pa se ni.



Slika 4: Izrezi agaroznih gelov s produkti PCR reakcij na cDNA, pridobljeni iz tkiva odrasle koze v laktaciji.

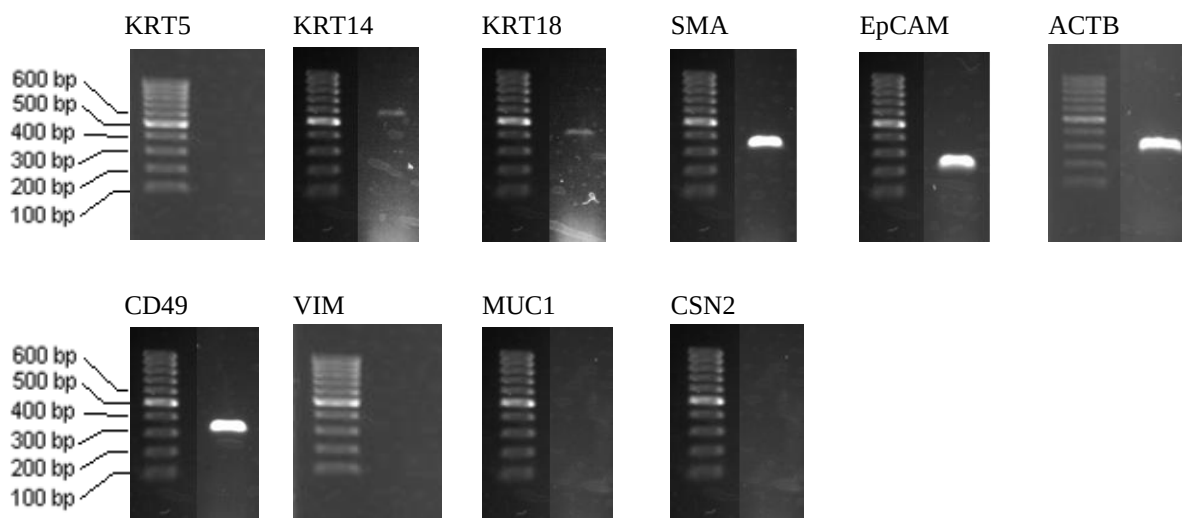
6.2.2 Juvenilna koza

Koncentracija RNA, izolirane iz celične kulture juvenilne koze je bila 2412 ng/μl. RNA je bila tudi ustrezno čista ($A_{260}/A_{280} = 2,01$; $A_{260}/A_{230} = 2,16$). PCR produkte smo pridobili za vse izbrane označevalce. Pomnoženi fragmenti so bili pričakovanih dolžin, razen pri vimentinu, kjer smo detektirali še nespecifičen daljši fragment.



Slika 5: Izrezi agaroznih gelov s produkti PCR reakcij na cDNA, pridobljeni iz celične kulture juvenilne koze.

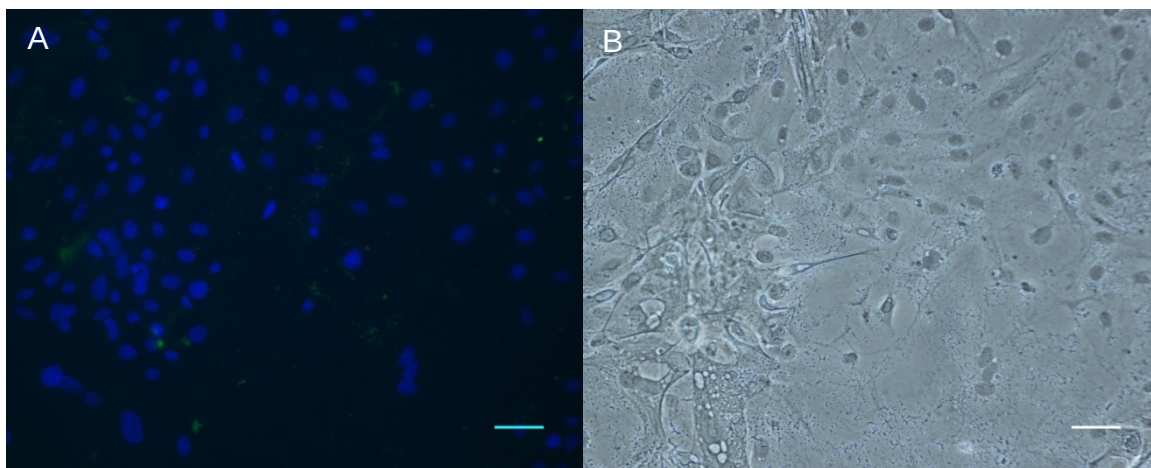
Koncentracija iz tkiva izolirane RNA je bila 284 ng/μl ($A_{260}/A_{280} = 2,02$; $A_{260}/A_{230} = 1,89$). Produkti uspešnih reakcij so bili pričakovanih dolžin. Reakcije za citokeratin 5, vimentin, mucin 1 in β -kazein niso dale produktov, reakcije za citokeratina 14 in 18 pa šibke produkte (Slika 6). Pri juvenilni kozi so se tako v celični kulturi izražali keratini 5, 14 in 18, α aktin gladkih mišičnih vlaken, epitelijska celična adhezijska molekula, β aktin, CD49, vimentin, mucin 1 in β kazein (Slika 5), v tkivu pa so se izražali keratina 14 in 18, α aktin gladkih mišičnih vlaken, epitelijska celična adhezijska molekula, β aktin in CD49 (Slika 6).



Slika 6: Izrezi agaroznih gelov s produkti PCR reakcij na cDNA, pridobljeni iz tkiva juvenilne koze.

6.3 IMUNOFLUORESCENCA NA CELIČNIH KULTURAH

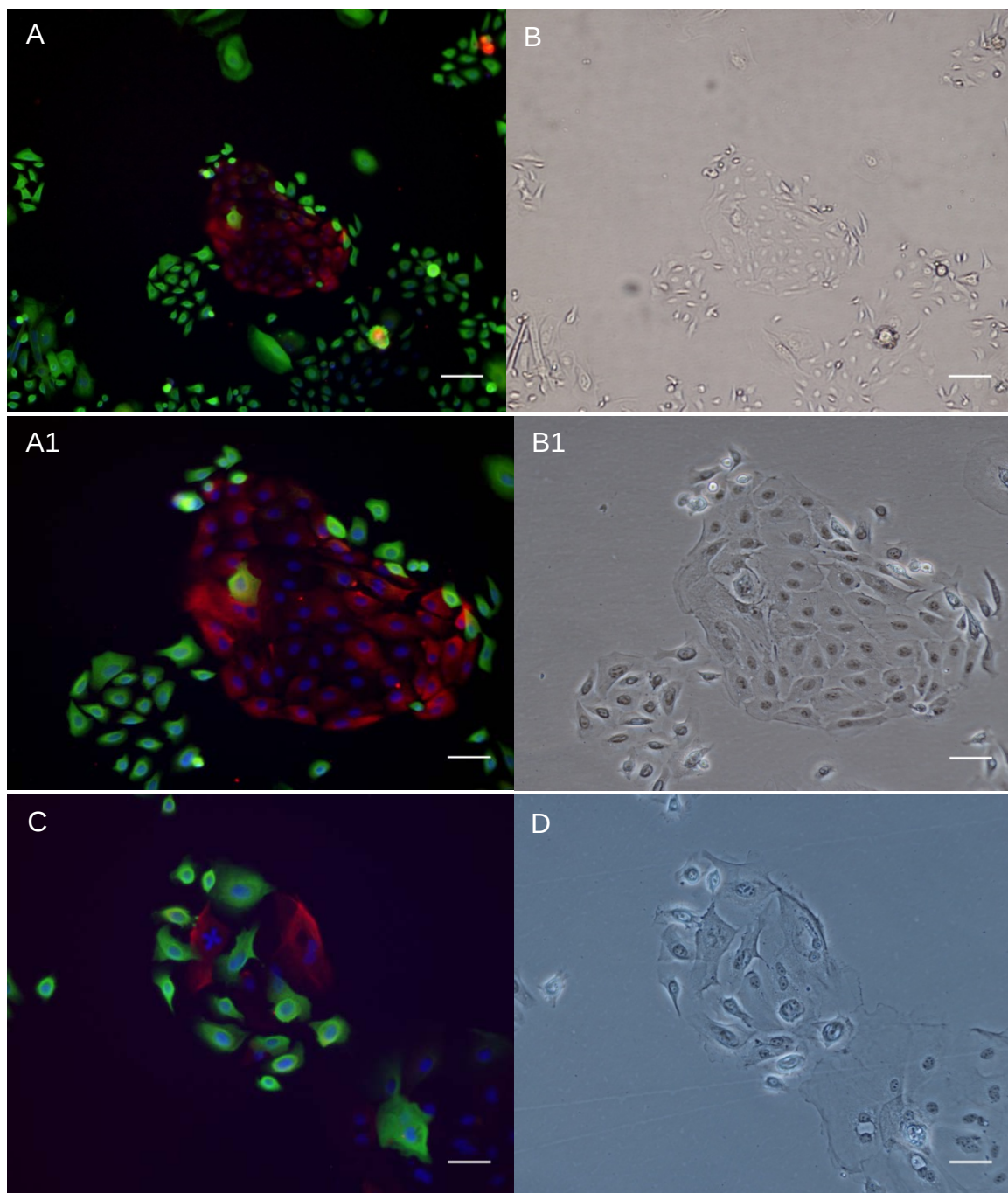
Za zaznavanje izražanja označevalcev smo uporabili različna primarna protitelesa (Tabela 2) in fluorescentno označena sekundarna protitelesa (Tabela 3). Pri negativni kontroli ni bilo nespecifičnega barvanja za izbrano sekundarno protitelo Alexa fluor kozje protitelo proti kunčjemu IgG 488 (Slika 7).



Slika 7: Negativna kontrola imunofluorescenčnega barvanja na primarni celični liniji kozje mlečne žleze. A, B – IF s sekundarnim protitelesom Alexa fluor kozje protitelo proti kunčjemu IgG 488 (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi odrasle koze (merilo = 50 μ m). Jedra celic so obarvana z DAPI (modro).

6.4.1 KRT14 in KRT18

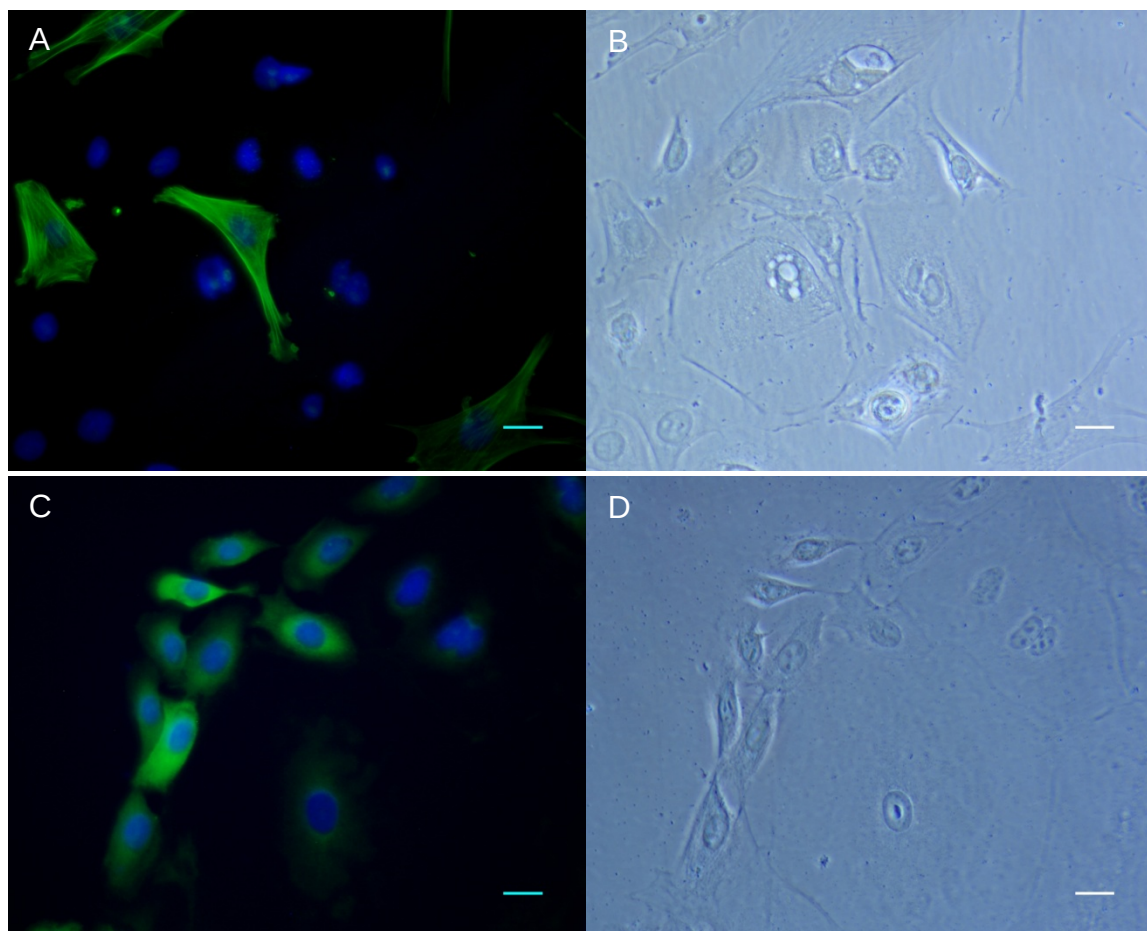
Barvanje proti citokeratinoma 14 in 18 smo izvedli hkrati, v isti gojitveni posodici, z uporabo dveh različno označenih protiteles. Citokeratin 14 se izraža v mioepitelnih celicah, citokeratin 18 pa v luminalnih. Sočasno barvanje je omogočilo razlikovanje obeh celičnih tipov. Oba citokeratina se enakomerno izražata po celotni citoplazmi (Slika 8).



Slika 8: Imunofluorescenčno barvanje proti citokeratinoma 14 in 18 na primarni celični liniji kozje mlečne žleze. A, B – IF proti citokeratinoma CK14 (zelen) in CK18 (rdeč) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi odrasle koze (merilo = 100 μm); A1, B1 – IF proti citokeratinoma CK14 (zelen) in CK18 (rdeč) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi odrasle koze (merilo = 50 μm); C, D – IF proti citokeratinoma CK14 (zelen) in CK18 (rdeč) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi juvenilne koze (merilo = 20 μm). Jedra celic so obarvana z DAPI (modro).

6.4.2 α SMA

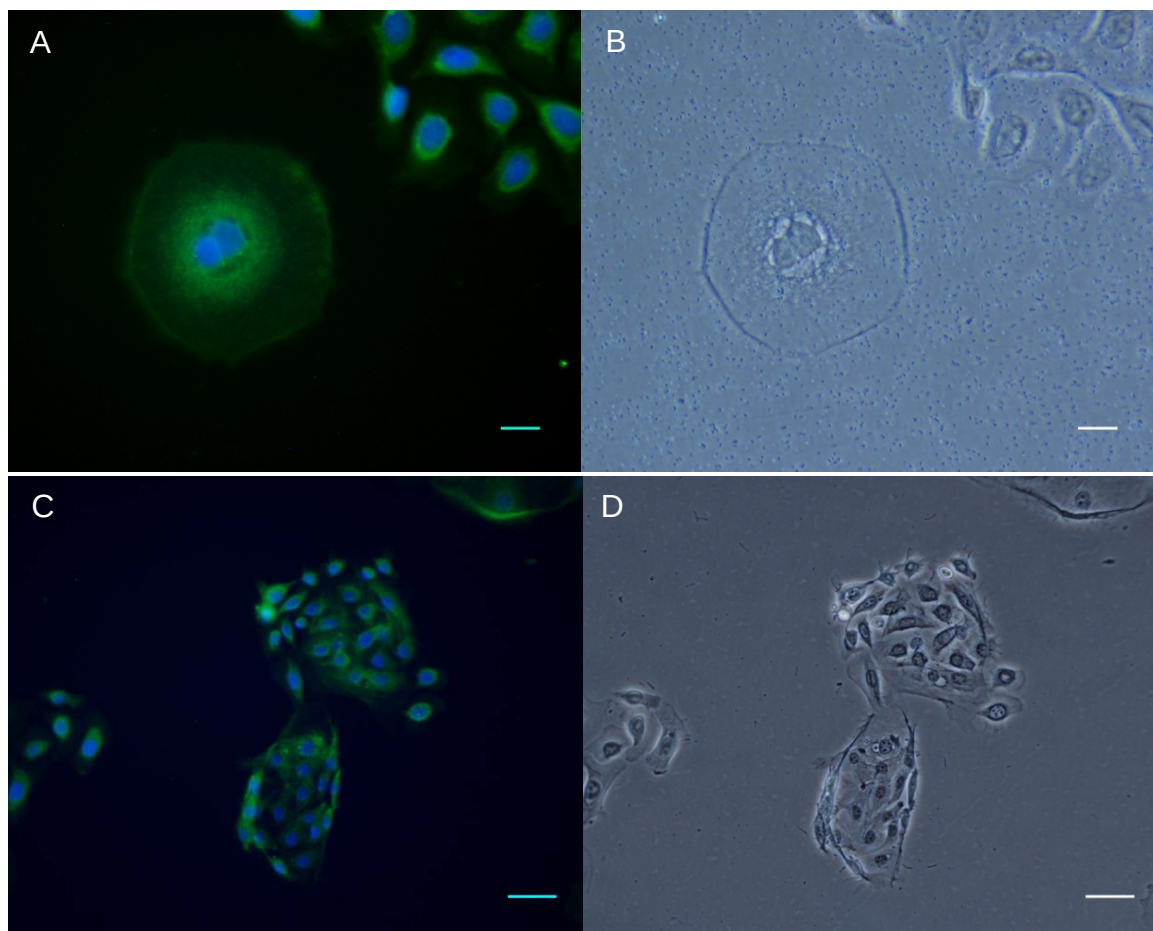
A aktin gladkih mišičnih vlaken je bil prisoten v fibroblastih (Slika 9: A, B) in v mioepitelialnih celicah (Slika 9: C, D). Obarvali so se aktinski filamenti v citoplazmi celic, ki so bili opazni pod veliko povečavo. Razlik med barvanjem v kulturi juvenilne in odrasle koze ni bilo.



Slika 9: imunofluorescenčno barvanje proti α aktinu gladkih mišičnih vlaken na primarni celični liniji kozje mlečne žleze. A, B – IF proti SMA (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi odrasle koze (merilo = 20 μ m); C, D - IF proti SMA (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi juvenilne koze (merilo = 20 μ m). Jedra celic so obarvana z DAPI (modro).

6.4.3 EpCAM

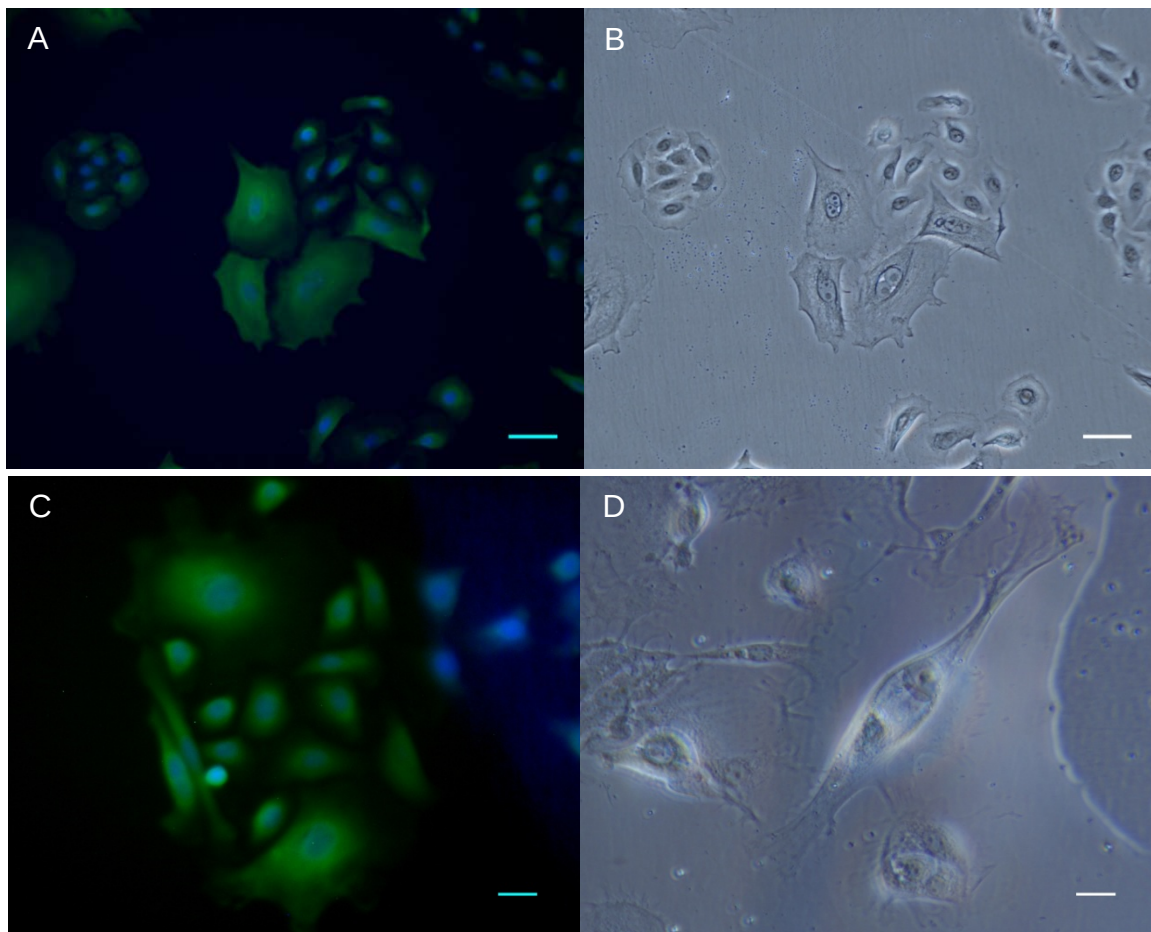
Epitelijska celična adhezijska molekula je bila prisotna v vseh epitelnih celicah. Obarvana je bila celotna površina celic, čeprav izraziteje okoli jedra (Slika 10). Razlik v izražanju med kulturama odrasle in juvenilne kože ni bilo.



Slika 10: imunofluorescenčno barvanje proti epitelijski celični adhezijski molekuli na primarni celični liniji kozje mlečne žleze. A, B – IF proti EpCAM (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi odrasle kože (merilo = 20 μm); C,D - IF proti EpCAM (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi juvenilne kože (merilo = 50 μm). Jedra celic so obarvana z DAPI (modro).

6.4.4 CD49f

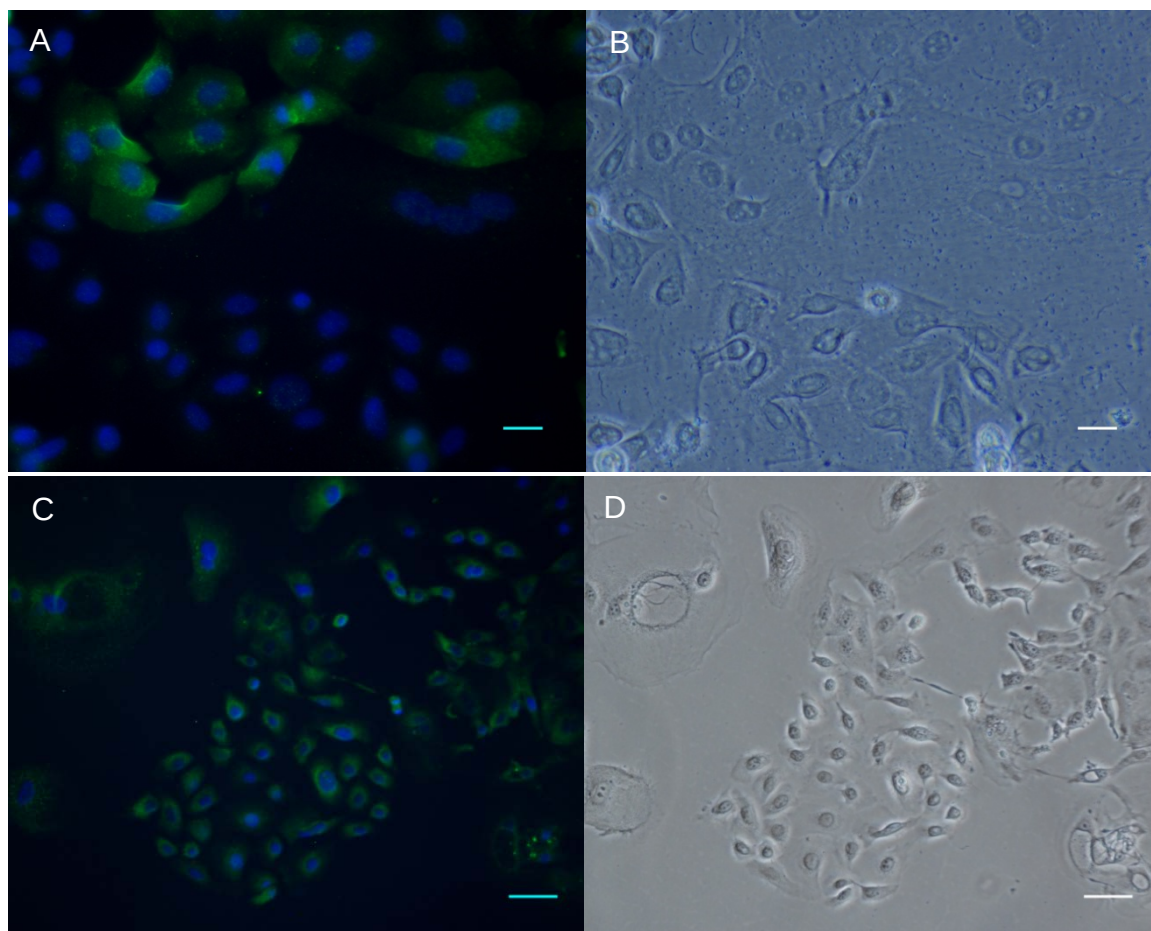
Integrin $\alpha 6$ se je izražal v vseh celicah in po celotni citoplazmi (Slika 11). Razlik med izražanjem v kulturah odrasle in juvenilne koze ni bilo.



Slika 11: Imunofluorescenčno barvanje proti CD49f na primarni celični liniji kozje mlečne žleze. A, B – IF proti CD49f (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi odrasle koze (merilo = 50 μm); C, D - IF proti CD49f (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi juvenilne koze (merilo = 20 μm). Jedra celic so obarvana z DAPI (modro).

6.4.5 MUC1

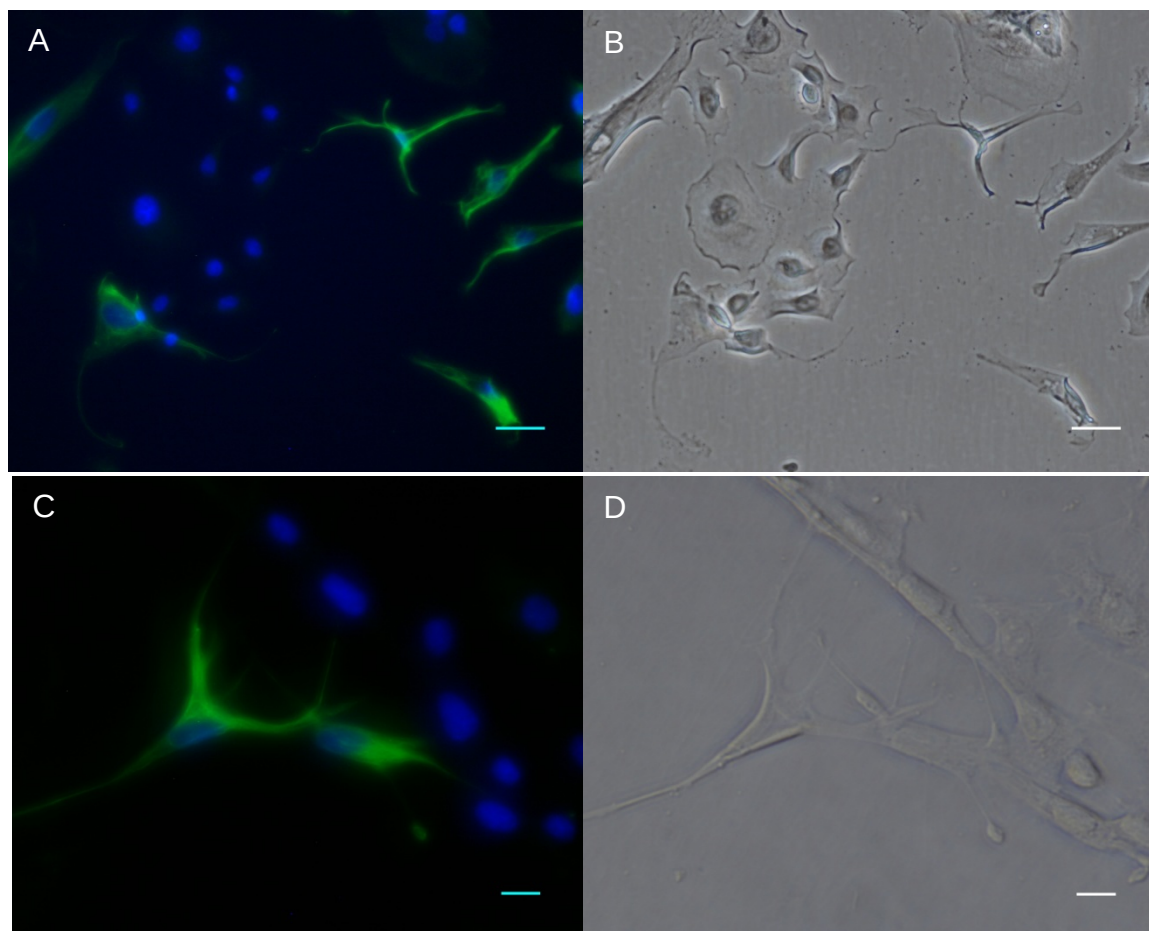
Mucin 1 je bil prisoten v luminalnih celicah. To se dobro vidi na sliki 12: A, kjer so zgoraj obarvane luminalne, spodaj pa neobarvane mioepitelne celice. Celice, v katerih je bil MUC1 prisoten, so bile obarvane enakomerno po celotni citoplazmi (Slika 12).



Slika 12: Imunofluorescenčno barvanje proti mucinu 1 na primarni celični liniji kozje mlečne žleze. A, B – IF proti MUC1 (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi odrasle koze (merilo = 20 μm); C,D - IF proti MUC1 (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi juvenilne koze (merilo = 50 μm). Jedra celic so obarvana z DAPI (modro).

6.4.6 VIM

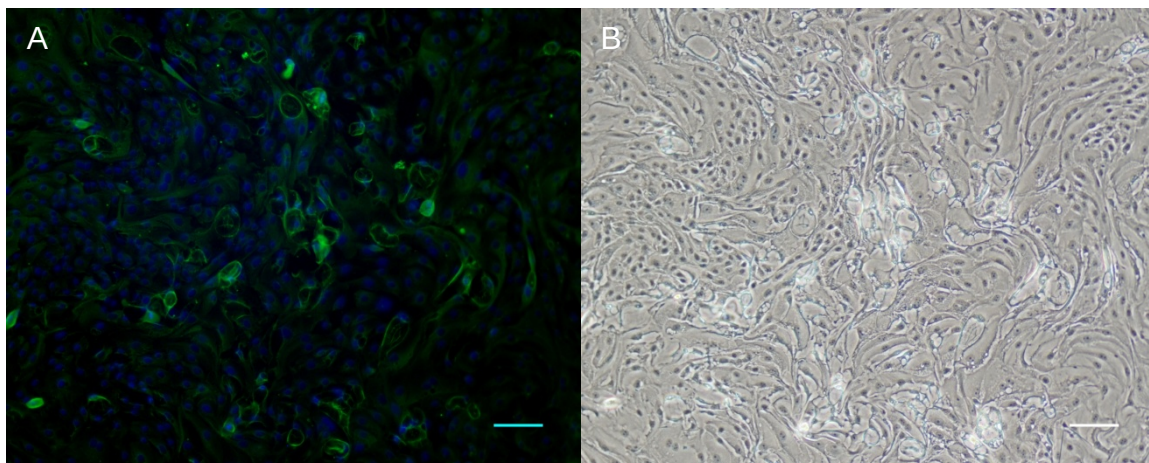
Vimentin je bil prisoten le v fibroblastih, v katerih je bila obarvana celotna citoplazma (Slika 13). Med kulturama juvenilne in odrasle koze ni bilo razlik v barvanju.



Slika 13: Imunofluorescenčno barvanje proti vimentinu na primarni celični liniji kozje mlečne žleze. A, B – IF proti VIM (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi odrasle koze (merilo = 50 μm); C,D - IF proti VIM (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi juvenilne koze (merilo = 20 μm). Jedra celic so obarvana z DAPI (modro).

6.4.7 CSN2

Barvanje je bilo pozitivno okoli mehurčastih struktur, ki so se pojavile v konfluentni kulturi, in tam, kjer so se celice organizirale v več plasteh (Slika 14).

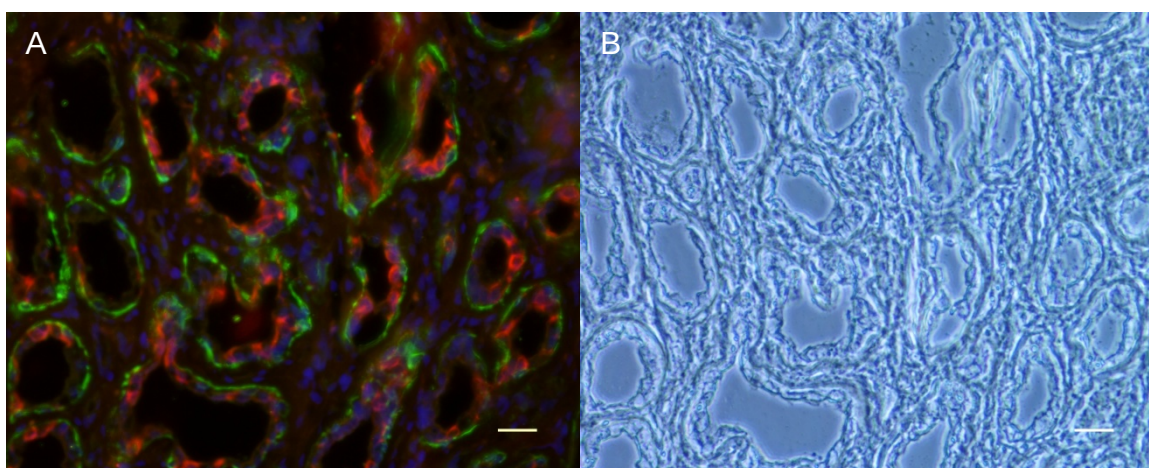


Slika 14: Imunofluorescenčno barvanje proti β -kazeinu na primarni celični liniji kozje mlečne žleze. A, B – IF proti CSN2 (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi odrasle koze (merilo = 100 μ m). Jedra celic so obarvana z DAPI (modro).

6.5 IMUNOFLUORESCENCA NA TKIVNIH REZINAH

6.5.1 KRT14 in KRT18

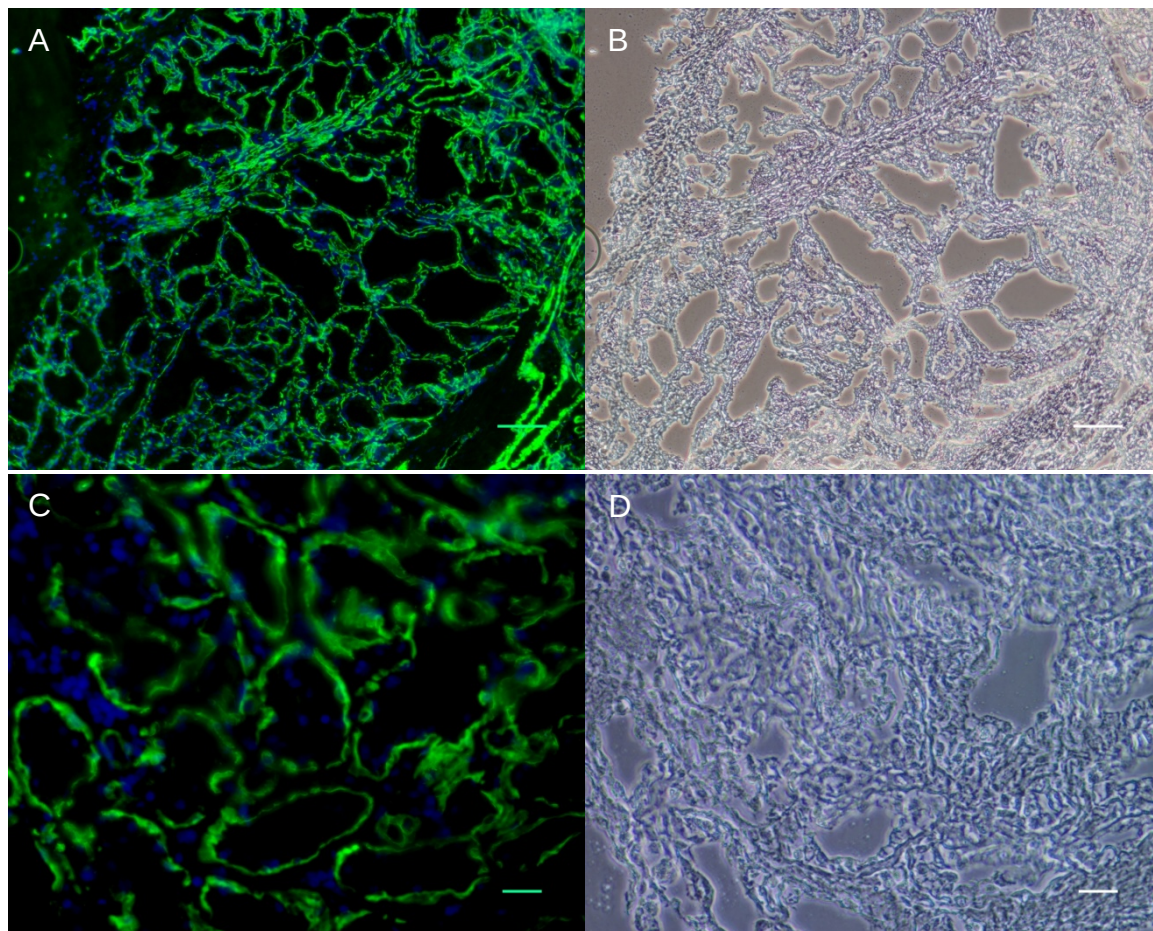
Protitelesi proti citokeratinoma 14 in 18 sta delovali tudi na tkivnih rezinah. Razvidno je bilo obarvanje citokeratina 14 na zunanji strani alveol in citokeratina 18 na notranji strani, v lumnu alveol (Slika 15).



Slika 15: Imunofluorescenčno barvanje proti citokeratinoma 14 in 18 na tkivu kozje mlečne žleze. A, B – IF proti citokeratinoma (CK14 zelen, CK18 rdeč) in svetlobna mikroskopija na tkivu odrasle koze v laktaciji (merilo = 20 μ m). Jedra celic so obarvana z DAPI (modro).

6.5.2 α SMA

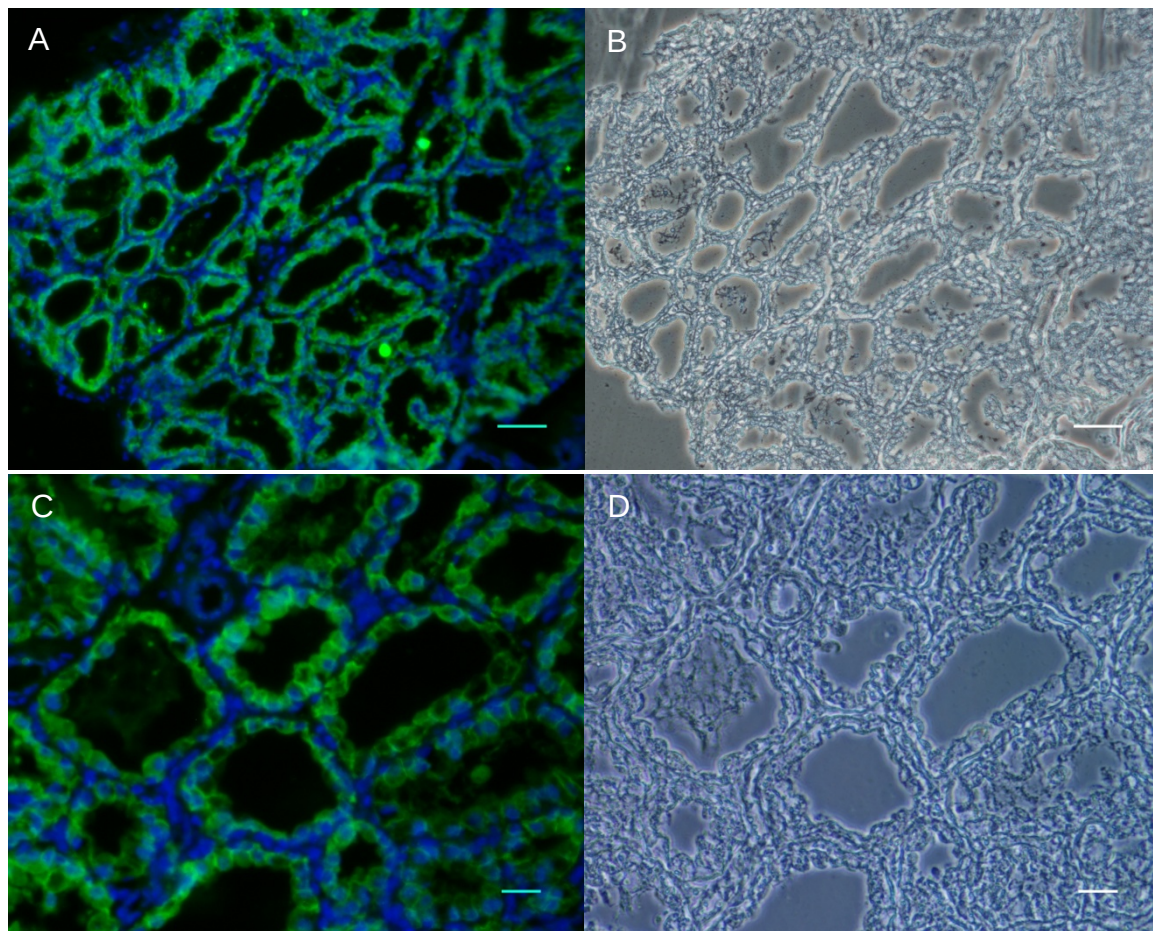
Gladki mišični α aktin je obarval tudi zunanje stene alveol na tkivnih rezinah, ki predstavljajo mioepitelne celice (Slika 16).



Slika 16: Imunofluorescenčno barvanje proti gladkemu mišičnemu α aktinu na tkivu kozje mlečne žleze. A, B – IF proti SMA (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi odrasle koze v laktaciji (merilo = 100 μ m); C,D – IF proti SMA (zelen) in svetlobna mikroskopija na tkivu odrasle koze v laktaciji (merilo = 20 μ m). Jedra celic so obarvana z DAPI (modro).

6.5.3 EpCAM

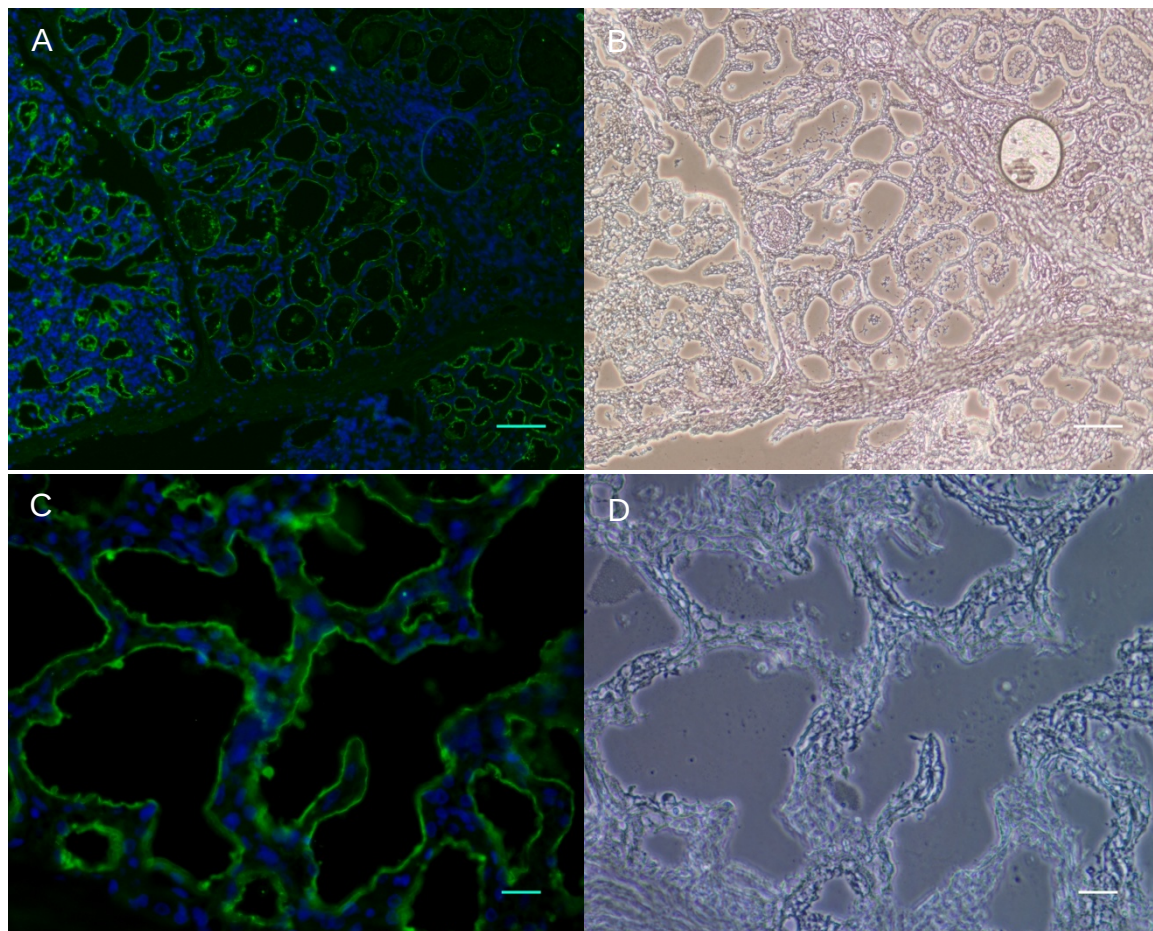
Epitelijska celična adhezijska molekula se je obarvala tudi na tkivnih rezinah. Označevalec se je izražal v epitelijah celicah alveol (Slika 17), na večji povečavi so razvidne posamezne obarvane celice (Slika 17 C).



Slika 17: Imunofluorescenčno barvanje proti epitelijski celični adhezijski molekuli na tkivu kozje mlečne žleze. A, B – IHC proti EpCAM (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi odrasle koze v laktaciji (merilo = 50 μm); C, D – IF proti EpCAM (zelen) in svetlobna mikroskopija na tkivu odrasle koze v laktaciji (merilo = 20 μm). Jedra celic so obarvana z DAPI (modro).

6.5.4 MUC1

Mucin 1 je bil prisoten v tanki plasti na površini apikalnih membran v alveolah (Slika 18).



Slika 18: Imuno fluorescenčno barvanje proti mucinu 1 na tkivu kozje mlečne žleze. A, B – IF proti MUC1 (zelen) in svetlobna mikroskopija na celični kulturi odrasle koze v laktaciji (merilo = 100 μm); C,D – IF proti MUC1 (zelen) in svetlobna mikroskopija na tkivu odrasle koze v laktaciji (merilo = 20 μm). Jedra celic so obarvana z DAPI (modro).

Prisotnosti vimentina in CD49f na tkivnih rezinah z imuno fluorescenčnim barvanjem nismo uspeli potrditi.

7 RAZPRAVA

Gojenje celic v kulturi je bilo uspešno, celice so se delile in oblikovale skupke. Pod svetlobnim mikroskopom, glede na morfološke značilnosti, sicer ni mogoče zanesljivo določiti tipov celic, vendar se je tekom imunofluorescenčnega barvanja izkazalo, da so v naši celični kulturi prevladovali trije tipi celic: luminalne epitelne in mioepitelne celice ter fibroblasti. Luminalne celice imajo v tkivu skladasto obliko, v celični kulturi pa so lahko tudi večje, bolj okroglaste, delujejo bolj ploščato. Mioepitelne celice so nekoliko bolj podolgovate, v celični kulturi so manjše. Fibroblasti so večji, bolj podolgovati, vretenastih oblik.

Izolacija RNA iz celičnih kultur je bila uspešna, pridobljena RNA je imela visoko koncentracijo in čistočo. RNA, izolirana iz tkiva, je imela precej nižjo koncentracijo in nekoliko nižjo kakovost. Medtem ko je bilo pri izolaciji iz celične kulture povsem jasno, iz kakšnega materiala smo pridobili RNA, pri tkivnih vzorcih nimamo takšnega pregleda nad sestavo in običajno tudi ne tako homogene sestave vzorca. To bi lahko bil vzrok za nekatere nepričakovane rezultate RT-PCR iz vzorcev tkiva. Možno je, da je košček tkiva, ki je bil shranjen za analizo, vseboval pretežno vezivno in maščobno tkivo in le manjši delež epitelnih celic.

Tabela 11: simbolni prikaz izražanja in prisotnosti označevalcev v celičnih kulturah in v tkivu na nivoju RNA in proteinov (+ označevalec je bil prisoten, - označevalca nismo zaznali, NT reakcija ni bila vključena v poskus).

lokus	PCR				imunofluorescenca			
	odrasla koza		juvenilna koza		odrasla koza		juvenilna koza	
	c. kultura	tkivo	c. kultura	tkivo	c. kultura	tkivo	c. kultura	tkivo
KRT5	+	+	+	-	NT	NT	NT	NT
KRT14	+	+	+	+	+	+	+	NT
KRT18	+	+	+	+	+	+	+	NT
SMA	+	+	+	+	+	+	+	NT
MUC1	+	+	+	-	+	+	+	NT
EpCAM	+	+	+	+	+	+	+	NT
CD49	+	+	+	+	+	-	+	NT
VIM	-	+	+	-	+	-	+	NT
CSN2	+	+	+	-	+	NT	NT	NT
ACTB	+	+	+	+	NT	NT	NT	NT

Pri celični kulturi juvenilne koze smo dobili PCR produkte za vse izbrane označevalce. Pri vimentinu se je na agaroznem gelu pojavljala dodatna proga. Pri tkivu juvenilne koze reakcije za citokeratin 5, vimentin, mucin 1 in β -kazein niso dale produktov.

Tudi pri celični kulturi odrasle koze smo dobili PCR produkte, razen pri vimentinu, kjer proge ni bilo. Podobno je bilo v primeru tkiva odrasle koze, kjer so vsi produkti PCR ustrezali pričakovanjem, pri vimentinu pa se je pojavljal dodaten produkt.

Pred primerjanjem rezultatov je potrebno v ozir vzeti še nekaj dejstev. Začetni oligonukleotidi za PCR so bili načrtovani na osnovi genskega zapisa goveda, saj v času zasnove naloge genom koze še ni bil anotiran in dostopen. Proti koncu našega dela je bil kozji genom že večinsko anotiran, kar nam je omogočilo, da smo preverili naleganje začetnih oligonukleotidov. Vsi začetni oligonukleotidi so se ujemali z mRNA zaporedjem za posamezne označevalce, z največ dvema nukleotidoma razlike, razen začetnih oligonukleotidov za vimentin, za katerega nam na kozjem zaporedju ni uspelo najti mesta naleganja. Pri genih za tako pomembne osnovne proteine sicer pričakujemo visoko ohranjenost med vrstami sesalcev, vendar so kljub temu lahko prisotne manjše razlike. Te lahko povzročijo nekoliko slabše naleganje začetnih oligonukleotidov na kozjo DNA, ali pa naleganje na dodatnem nepredvidenem mestu, kar bi lahko povzročilo pojav nespecifičnih prog na agaroznem gelu. Dodatni produkti se lahko pojavijo tudi v primeru prisotnosti podvojenih genov in psevdogenov, saj tako začetni oligonukleotidi enakovredno nalegajo na več mestih. V določeni meri lahko sicer takšne pomakljivosti izničimo z optimizacijo PCR, predvsem s prilagajanjem temperature naleganja začetnih oligonukleotidov.

Obe celični kulturi sta bili gojeni v prisotnosti laktogenih hormonov, ki omogočajo posnemanje fiziološkega stanja, kot je prisotno med laktacijo. Hormoni spodbujajo diferenciacijo in ohranjanje diferenciranega stanja celic. Za celično kulturo odrasle koze v laktaciji bi torej lahko pričakovali enake rezultate kot za tkivo odrasle koze v laktaciji, saj bi bila celična zastopanost in stanje kar se da podobna. Ne vemo pa natančno, kako ti hormoni vplivajo na celice juvenilne koze, ki še niso diferencirane. Ali jih gojenje v prisotnosti laktogenih hormonov približa fiziološkemu stanju odrasle koze v laktaciji, ali v tem primeru laktogeni hormoni še nimajo takšnega vpliva.

Večina začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili za pomnoževanje fragmentov cDNA iz celic ali tkiva kozje mlečne žleze, je dobro delovala. Pri nekaterih bi bilo potrebno še dodatno optimizirati PCR in proces. To potrjuje, da so uporabljeni začetni oligonukleotidi, narejeni proti DNA v sorodnih vrstah živali, večinoma ustrezni tudi za uporabo pri kozah.

Večina protiteles, ki smo jih uporabili za imunofluorescenco, je delovala tudi pri kozi, čeprav so se lahko rezultati na celični kulturi in tkivu razlikovali. To potrjuje, da so uporabljena protitelesa, specifična za antigene pri drugih vrstah živali, večinoma ustrezna za uporabo pri kozah, tako na tkivu kot v celični kulturi.

Z uporabo različnih protiteles, ki se značilno izražajo le v določenem tipu celic v mlečni žlezi, smo lahko identificirali tipe celic in opisali celično kulturo. Kateri označevalec se izraža oziroma je prisoten v katerem tipu celic, je lažje opazovati na tkivu, kjer celice tvorijo značilne strukture. Nato lahko s poznanimi označevalci identificiramo tudi celice v celični kulturi.

Citokeratin 14 in gladki mišični α aktin sta bila že v preteklih študijah prepoznana kot specifična označevalca mioepitelnih celic (Arnoldi in sod., 2013; Alkafafy in sod., 2012). Tudi v našem primeru sta bila tako v tkivu kot v celični kulturi prisotna le v mioepitelnih

celicah. Citokeratin 18 je prisoten v luminalnih žleznih celicah, kot so to potrdile že predhodne raziskave (Martowicz in sod., 2013; Tong in sod., 2012). Epitelijska celična adhezijska molekula je bila v naših vzorcih tkiva prav tako prisotna le v luminalnih celicah, v celični kulturi pa je bila njena prisotnost splošna, obarvane so bile vse celice. Glede tega se sicer rezultati preteklih študij razlikujejo. Martowicz in kolegi (2013) v celični kulturi humanih epitelnih celic mlečne žleze niso zaznali prisotnosti EpCAM, čeprav so njeno izražanje zaznali na ravni RNA.

Za citokeratine 5, 14 in 18, gladki mišični α aktin, β -aktin, epitelijsko celično adhezijsko molekulo in integrin α 6 (CD49) je bilo pričakovati, da se bodo izražali v vseh vzorcih. To so namreč osnovne komponente citoskeleta, citoplazme in membrane epitelijskih celic. V vzorcih iz celičnih kultur ter v tkivu odrasle koze so se ti proteini izražali na ravni mRNA. V vzorcu tkiva juvenilne koze nismo uspeli dokazati prisotnosti citokeratina 5. To bi si lahko razlagali s prej omenjeno nereprezentativnostjo vzorca. Vzrok bi bila lahko tudi degradirana RNA v kombinaciji z nizkim izražanjem keratina 5. Izražanje drugih štirih markerjev (SMA, ACTB, EpCAM, CD49) je bilo pričakovano.

IF na celičnih kulturah potrjuje prisotnost proteinov: KRT14 in KRT18, α SMA, EpCAM, CD49, MUC1, VIM. Pri citokeratinih, gladkemu mišičnemu α aktinu in vimentinu so se obarvali le določeni tipi celic. Obarvanost le določene frakcije kaže na specifičnost uporabljenih protiteles. Pri ostalih treh označevalcih (EpCAM, MUC1, CD49) so se obarvale vse epitelne celice.

Vimentin naj bi bil prisoten predvsem v fibroblastih, saj predstavlja del njihovega citoskeleta (Satelli in Li, 2011). Naši rezultati se v tem primeru delno ujemali s pričakovanji, saj so se v celični kulturi obarvali fibroblasti, vendar pa ga v tkivu nismo zaznali. Vzrok bi lahko bilo drugačno tretiranje vzorcev tkiva (parafinizacija). Nekateri avtorji sicer izražanje vimentina zlasti v celičnih kulturah povezujejo s tumorskimi spremembami (Toniti in sod., 2010). Vimentin se je na RNA nivoju izražal v vzorcih celične kulture juvenilne koze in tkiva odrasle koze. Pri IF proti vimentinu so se fibroblasti v celični kulturi specifično obarvali, na tkivu pa reakcija ni delovala. Verjetno so vzrok za negativne PCR rezultate neprilegajoči se začetni oligonukleotidi oziroma bi bilo potrebno PCR dodatno optimizirati.

Mucin 1 je bil v tkivu značilno in pričakovano prisoten na vrhu apikalne membrane, znotraj lumnov alveol. V celični kulturi bi ga pričakovali na površini luminalnih epitelnih celic (Raouf in sod., 2012), vendar so bile enakomerno obarvane vse celice. Mucin 1 je dal pozitivne rezultate PCR v treh vzorcih, le reakcija za tkivo juvenilne koze je bila negativna. To bi se ujemale s pričakovanji, saj je v tem vzorcu manj luminalnih celic kot pri kozi v laktaciji, vendar glede na njegovo izražanje v vzorcu celične kulture juvenilne koze lahko v to podvomimo. Morda zastopanost celic v celični kulturi juvenilne koze ni povsem reprezentativna in je delež luminalnih celic previsok, ali pa to lahko ponovno pripišemo nizki kakovosti vzorca tkiva juvenilne koze.

Kazein je mlečni protein, zato bi ga pričakovali predvsem v tkivu koze v laktaciji. Celični kulturi sta bili gojeni v prisotnosti laktogenih hormonov, kar pojasnjuje prisotnost mRNA za beta kazein (Ogoverc in sod., 2009; Tong in sod., 2012). Tudi IF proti kazeinu je dala rezultate, kar potrjuje, da se kazein ni izražal le na ravni RNA, temveč tudi kot protein.

Z uporabo izbranih celičnih označevalcev lahko določimo, katere celice so luminalne, katere mioepitelne in katere stromalne (fibroblasti). Zlasti za oba tipa epitelnih celic so označevalci (KRT14, KRT18, SMA, EpCAM) zelo specifični in zanesljivi. Vendar pa nekateri izmed izbranih proteinov niso idealni za označevalce v nekaterih primerih (na tkivu, v celični kulturi ali za primerjavo med obema), saj so ali prisotni v vseh celicah, ali pa se njihovo izražanje v celični kulturi in v tkivu razlikuje.

Ob primerjavi IF na celični kulturi in tkivu vidimo, da so rezultati za KRT14 in KRT18 zelo podobni. α SMA se je v celični kulturi izraziteje izražal v fibroblastih in mioepitelnih celicah, podobno je EpCAM prisoten v luminalnih celicah. V tkivu je jasno vidno obarvanje SMA-pozitivnih mioepitelnih celic, ki obdajajo plast luminalnih celic v alveoli. Luminalne KRT18-pozitivne celice se nahajajo v notranjosti lumna in na apikalni membrani izločajo mucin. CD49 in MUC1 sta v celični kulturi dala zelo podobne rezultate – šibko obarvanje večine celic (ki bi lahko bilo nespecifično), medtem ko je na tkivnih rezinah MUC1 dal rezultate z značilnim obarvanjem, za CD49 pa obarvanja ni bilo. Za VIM so bili rezultati obratni – v celični kulturi so se fibroblasti barvali specifično in intenzivno, medtem ko v tkivu izražanja nismo zaznali. Barvanje v tkivu za α SMA, EpCAM in KRT18 se je ujemalo z rezultati, ki so jih dobili Martowicz in sod. (2013), vendar pa je bila njihova celična kultura HMEC negativna za vse tri označevalce. Navajajo, da so bile v kulturi le bazalne celice.

Imunofluorescenca na tkivnih rezinah je lažje opazovati, saj ima tkivo izoblikovano strukturo, v kateri tudi neizkušen opazovalec vsaj okvirno ve, kje se nahajajo katere celice. V primeru, da se nam označevalec izraža v določenem tipu celic, lahko opazujemo strukture, ki jih tvori določeno tkivo/celični tip. V heterogeni celični kulturi je težje določiti tipe celic, ki so naključno locirane in brez jasnih struktur. To je sicer odvisno tudi od kulture, načina gojenja celic in konfluentnosti. Previsoka konfluentnost, pri kateri se celice prekrivajo, dodatno oteži ločevanje posameznih tipov celic. Razlikovanje tipov celic si lahko olajšamo z barvanjem z več označevalci hkrati (angl. co-staining), če izberemo označevalce, specifične za različne tipe celic (na primer KRT14 in KRT18).

Na uspešnost IF barvanja lahko vpliva tudi tretiranje vzorcev. Vzorci tkiva so namreč dehidrirani in zaliti v parafin in nato pred barvanjem deparafinizirani in rehidrirani, medtem ko so celične kulture le fiksirane v gojitvenih posodicah. Po deparafinizaciji tkivnih rezin je potrebno narediti še razkritje antigena. To je postopek, s katerim razbijemo vezi med proteini, ki bi lahko zakrivali vezavno mesto antigena in onemogočali vezavo protiteles. Takšno zamreženje je lahko posledica fiksacije ali drugih predhodnih obdelovanj vzorcev. V našem primeru smo antigene razkrivali s toploto – kuhanjem vzorcev. Ezaki (2000) izpostavlja, da premočno segrevanje lahko povzroči lažno pozitivno ali nespecifično zaznavanje antigenov, ali pa dodatno denaturacijo proteinov, ki bi onemogočila njihovo dobro zaznavanje. To je možen vzrok za neuspešnost barvanja proti VIM in CD49 na tkivu, kljub uspešnosti na

celičnih kulturah. V celičnih kulturah lahko na izražanje označevalcev vpliva tudi epitelno-mezenhimska tranzicija, ki podre tesno epitelno strukturo in spremeni izražanje označevalcev. Izražanje označevalcev, značilnih za epitelne celice, se lahko zniža ali izgine, izražanje označevalcev, značilnih za mezenhimske celice (na primer vimentin), pa se lahko okrepi (Chaw in sod., 2012). Epitelno-mezenhimska in mezenhimsko-epitelna tranzicija sta sicer v celičnih kulturah povezani s tumorsko rastjo. (Robson in sod., 2006). Za boljše in zanesljivejše rezultate imunofluorescence bi bila morda potrebna še kakšna optimizacija protokola, ugotavljanje idealne koncentracije protiteles, časa inkubacije in spiranja. Velika prednost bi bila tudi uporaba protiteles, narejenih specifično proti kozjim antigenom, ki trenutno še niso na voljo.

Primarna kultura celic mlečne žleze je v nekaterih primerih lahko ustrezen nadomestek za tkivo. Za raziskave izražanja genov je lahko ustrezen vir RNA in DNA. Nekoliko več previdnosti je potrebne pri raziskavah, pri katerih so za rezultate pomembni stiki in komunikacija med celicami, struktura tkiva ali širša vpetost organa v organizmu.

Na splošno sta kombinaciji označevalcev, ki se izražajo, enaki pri celični kulturi in tkivu odrasle koze (celična kultura juvenilne koze izraža tudi VIM, ki ga ostale ne, tkivo juvenilne koze pa ne izraža KRT5, VIM, MUC1 in CSN2). Morda to lahko razložimo s tem, da se mlečna žleza pri juvenilni kozi še razvija in spreminja ter v vseh obdobjih ne izraža vseh označevalcev, značilnih za dokončno diferencirano mlečno žlezo v laktaciji. Odsotnost KRT5 in VIM v tkivu juvenilne koze je sicer nepričakovana in nenavadna. Vzroke zanjo bi lahko iskali v tkivu, iz katerega je bila RNA izolirana ter degradiranosti RNA. Odsotnost MUC1 in CSN2 v tkivu juvenilne koze je pričakovana, saj mlečna žleza še ni dokončno diferencirana, število luminalnih celic pa je bistveno manjše. V času laktacije se mlečna žleza poveča, oblikujejo se alveole, ki jih sestavljajo žlezne epitelne celice, v katerih se tvori mleko, zato sta prisotna kazein (kot najbolj zastopan mlečni protein pri kozi) in mucin, ki skrbi za zaščito epitelijskega tkiva.

Tudi pri IF na tkivnih rezinah so izbrana protitelesa večinoma delovala. KRT14 in KRT18 sta se izražala specifično (v mioepitelnih oziroma epitelnih celicah). Na podlagi barvanja je dobro vidna struktura tkiva koze v laktaciji z luminalnimi celicami na notranji strani alveol in z mioepitelnimi celicami na zunanji strani. α SMA in EpCAM sta se izražala v celicah alveol. α SMA se je izraziteje izražal v mioepitelnih celicah, kjer je na fotografijah vidna vlaknasta struktura cioskeleta, EpCAM pa v epitelnih celicah alveol. Barvanje za KRT14 in α SMA se ujema z rezultati, ki so jih dobili Alkafafy in sodelavci (2012). MUC1 se je izražal v tanki plasti na notranji površini lumnov. Izražanja VIM in CD49 z uporabljenima protitelesoma na tkivnih rezinah nismo uspeli identificirati.

Izražanje oziroma prisotnost označevalcev KRT14, KRT18, SMA in EpCAM smo dokazali tako na ravni RNA kot na ravni proteinov. Z uporabo RT-PCR smo potrdili izražanje CD49 na ravni RNA, medtem ko v tkivu s protitelesi nismo uspeli dokazati njegove prisotnosti. MUC1 se na RNA ravni izraža tako v celični kulturi kot tkivu, na ravni proteina se v tkivu izraža značilno na površini luminalnih celic, v celični kulturi pa je izražanje neznačilno in

nekoliko nejasno. VIM je na ravni RNA dal pozitiven rezultat le v celični kulturi juvenilne koze, na ravni proteina pa je dal jasne rezultate v celičnih kulturah.

V tej nalogi smo preverjali izražanje označevalcev na ravneh mRNA in proteinov, s katerimi smo določili celične tipe v primarni celični kulturi kozje mlečne žleze in ugotovili, ali se ti ujemajo s tkivom kozje mlečne žleze. Z uporabo tehnik PCR in imunofluorescence smo potrdili ali delno potrdili vse postavljene delovne hipoteze. Uporabljeno primarno celično kulturo kozje mlečne žleze tako sestavljajo luminalne in epitelne celice ter fibroblasti. Te celične tipe je mogoče identificirati in locirati s protitelesi za citokeratina 14 in 18, α aktin gladkih mišičnih vlaken, epiteljsko celično adhezijsko molekulo, mucin 1 in vimentin. Pri nekaterih raziskavah bi bilo delo na tkivnih biopsijah ali *in vivo* možno nadomestiti s primarno celično kulturo, ki je v našem delu kazala podobno izražanje označevalcev in celično sestavo kot tkivne rezine. To predstavlja prednost zlasti pri raziskavah, pri katerih ni pomembna struktura tkiva, temveč le njegove posamezne komponente – nukleinske kisline, proteini.

8 SKLEPI

1. Z uporabo RT-PCR smo dokazali izražanje izbranih označevalcev (KRT5, KRT14, KRT18, α SMA, EpCAM, VIM, MUC1, ACTB, CD49, CSN2) v celični kulturi in tkivu kozje mlečne žleze na RNA nivoju.
2. Z uporabo protiteles smo dokazali prisotnost izbranih označevalcev (KRT14, KRT18, α SMA, EpCAM, VIM, MUC1, CD49, CSN2) v celični kulturi in tkivu kozje mlečne žleze na nivoju proteinov. Hkrati smo s tem tudi potrdili, da protitelesa, narejena v drugih živalskih vrstah, delujejo tudi proti homolognim kozjim antigenom.
3. Ugotovili smo, da je izražanje KRT14 in α SMA značilno za mioepitelne celice, tako v celični kulturi kot v tkivu. Izražanje KRT18 in EpCAM je značilno za epitelne luminalne celice, tako v celični kulturi kot v tkivu. Izražanje MUC1 je značilno za epitelne luminalne celice v tkivu, v celični kulturi pa je bil označevalec prisoten v vseh epitelnih celicah. Izražanje VIM je značilno za fibroblaste v celični kulturi, v tkivu pa prisotnosti nismo zaznali. CD49 označevalec je bil v celični kulturi prisoten v vseh tipih celic, v tkivu pa njegove prisotnosti nismo zaznali.
4. Za ločevanje luminalnega in mioepitelnega celičnega tipa sta najbolj primerna označevalca KRT14 in KRT18.

9 POVZETEK

Koze so že od nekdaj uporabljali za pridobivanje življenjskih dobrin, mesa, mleka in kože. V zadnjih desetletjih je tehnološki in znanstveni napredek omogočil tudi izkoriščanje v znanstvene namene. Eden pomembnejših organov, ki mu je bilo tudi naklonjene veliko pozornosti raziskovalcev, je mlečna žleza. Ne le zaradi proizvodnje mleka, ki sicer postaja med potrošniki vse bolj priljubljeno, temveč tudi zaradi možnosti izločanja izbranih produktov v mleko (na primer rekombinantnih proteinov), kot modelni organ za študije zaradi izjemno nizke pojavnosti tumorjev mlečne žleze.

Raziskave, ki potekajo na živih kozah, so lahko drage, dolgotrajne in zahtevne. V vsaj nekaterih med njimi pa je mogoče žive živali zamenjati s celičnimi kulturami. K temu stroka vse bolj stremi ne le zaradi etičnih razlogov, temveč tudi nižjih stroškov vzdrževanja in pogosto hitrejših rezultatov. Da je lahko celična kultura ustrezen nadomestek tkivu ali živali, jo je potrebno najprej okarakterizirati in preveriti, ali so ohranjene značilnosti tkiva. To lahko preverimo tudi z zaznavanjem izražanja genov in prisotnosti proteinov.

Ker kozji genom še ni bil dostopen v času zasnove naloge, so začetni oligonukleotidi oblikovani na osnovi genomov drugih živali, prav tako so protitelesa pridobljena s pomočjo drugih živalskih vrst (kunec, miš) proti antigenom, homolognim kozjim. Izbrane označevalce (citokeratini 5, 14 in 18, gladki mišični α aktin, β -aktin, epiteljska celična adhezijska molekula, mucin 1, vimentin, CD49 in β -kazein) smo zaznavali na ravni mRNA z uporabo PCR metode in na ravni proteinov (razen citokeratina 5 in β -aktina) z imunofluorescenco. Tako smo določili tipe celic v tkivnih rezinah in celični kulturi kozje mlečne žleze. Izbrani označevalci so dobili dobre rezultate. Epitelne luminalne celice se da specifično identificirati z označevalcema KRT18 in EpCAM, KRT14 in α SMA pa sta specifična označevalca za mioepitelne celice. Vimentin je bil v celični kulturi specifičen za fibroblaste. Mucin 1 se je v tkivu specifično izražal na apikalni površini epitelnih luminalnih celic, CD49 se je v celični kulturi izražal v epitelnih tipih celic. Izražanje β -kazeina ni bilo omejeno na določen celični tip.

S tem smo identificirali celične tipe v primarni celični kulturi kozje mlečne žleze in ugotovili, da med celično kulturo celic juvenilne in odrasle koze ni razlik, razen večjega števila luminalnih celic pri odrasli kozi. Med izražanjem označevalcev v celični kulturi in tkivu smo opazili nekaj razlik, vendar jih verjetno lahko pripišemo različnim vzorcem in njihovim tretiranjem. Tako je lahko celična kultura ustrezen nadomestek za vzorec tkiva ali *in vivo* delo, v primerih kadar so predmet zanimanja nukleinske kisline ali proteini (težje je nadomestiti raziskave, v katerih je pomembna tri-dimenzionalna struktura tkiva, celoten organ in njegova vpetost v organizem).

10 VIRI

- Alkafafy M., Rashed R., Helal A. 2012. Immunohistochemical studies on the bovine lactating mammary gland. *Acta Histochemica*, 114: 87-93
- Arnoldi R., Hiltbrunner A., Dugina V., Tille J.-C., Chaponnier C. 2013. Smooth muscle actin isoforms: A tug of war between contraction and compliance. *European Journal of Cell Biology*, 92: 187-200
- Bequette B.J., Kyle C.E., Crompton L.A., Buchan V., Hanigan M.D. 2001. Insulin regulates milk production and mammary gland and hind-leg amino acid fluxes and blood flow in lactating goats. *Journal of Dairy Science*, 84: 241-255
- Bowden C.E., Plaut K., Maple R.L., Caler W. 1995. Negative effects of a high level of nutrient intake on mammary gland development of prepubertal goats. *Journal of Dairy Science*, 78: 1728-1733
- Brenaut P., Bangera R., Bevilacqua C., Rebours E., Cebo C., Martin P. 2012. Validation of RNA isolated from milk fat globules to profile mammary epithelial cell expression during lactation and transcriptional response to a bacterial infection. *Journal of Dairy Science*, 95: 6130-6144
- Castañares N., Colitti M., Nudda A., Stefanon B., Pulina G. 2013. Dynamics of mammary secretory cells in lactating dairy ewes. *Small Ruminant Research*, 113: 251-253
- Chaw S.Y., Majeed A.A., Dalley A.J., Chan A., Stein S., Farah C.S. 2012. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers – E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin – in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncology*, 48: 997-1006
- Díaz E., Annalla M., Muñoz-Serrano A., Alonso-Moraga A., Serradilla J.M. 1999. Variation of milk yield and contents of total casein and casein fractions in Murciano-Granadina goats. *Small Ruminant Research*, 34: 141-147
- Elsayed E.H., EL-Shafie M.H., Saifelnasr E.O.H., Abu El-Ella A.A. 2009. Histological and histochemical study on mammary gland of Damascus goats through stages of lactation. *Small Ruminant Research*, 85: 11-17
- Ezaki T. 2000. Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: Its potential drawbacks and optimization for double immunostaining. *Micron*, 31: 639-649
- FAOSTAT. Rome, Food and Agriculture Organisation of the United Nations. 2011. <http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor> (1.12.2014)

- Freitas V.J.F., Serova I.A., Moura R.R., Andreeva L.E., Melo L.M., Teixeira D.I.A., Lopes-Jr E.S., Dias L.P.B., Nunes-Pinheiro D.C.S., Sousa F.C., Alcântara-Neto A.S., Albuquerque E.S., Melo C.H.S., Rodrigues V.H.V., Batista R.I.T.P., Dvoryanchikov G.A., Serov O.L. 2012. The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. *Small Ruminant Research*, 105: 105-113
- Georges-Labouesse E., Mark M., Messaddeq N., Gansmüller A. 1998. Essential role of $\alpha 6$ integrins in cortical and retinal lamination. *Current Biology*, 8: 983-986
- Goldman R.D., Khuon S., Chou Y.H., Opal P., Steinert P.M. 1996. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *The Journal of Cell Biology*, 134, 4: 971-983
- Huynh H.T., Robitaille G., Turner J.D. 1991. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. *Experimental Cell Research*, 197: 191-199
- Jackson D.W., Lalor P.A., Aberman H.M., Simon T.M. 2001. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 83-A, 1: 53-64
- Jedrzejczak M., Szatkowska I. 2014. Bovine mammary epithelial cultures for the study of mammary gland functions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 50, 5: 389-398
- Kmetijstvo in ribištvo. 2014. Ljubljana. Statistični urad Republike Slovenije
http://www.stat.si/tema_okolje_kmetijstvo.asp (12.2.2014)
- Krappmann K., Weikard R., Kühn C. 2012. Evaluation of a replacement method for mammary gland biopsies by comparing gene expression in udder tissue and mammary epithelial cells isolated from milk. *Research in Veterinary Science*, 93: 970-974
- Lamerigts N.M.P., Buma P., Huiskes R., Schreurs W., Gardeniers J., Slooff T.J.J.H. 2000. Incorporation of morsellized bone graft under controlled loading conditions. A new animal model in the goat. *Biomaterials*, 21: 741-747
- Mabjeesh S.H., Kyle C.E., Macrae J.C., Bequette B.J. 2000. Lysine metabolism by the mammary gland of lactating goats at two stages of lactation. *Journal of Dairy Science*, 83: 996-1003
- McGeady T.A., Quinn P.J., FitzPatrick E.S., Ryan M.T. 2006. *Veterinary Embriology*, 1st edition. Oxford, UK, Blackwell Publishing: 377 str.

- Mertowicz A., Rainer J., Lelong J., Spizzo G., Gastl G., Untergasser G. 2013. EpCAM overexpression prolongs proliferative capacity of primary human breast epithelial cells and supports hyperplastic growth. *Molecular Cancer*, 12: 56
- Mostert B., Kraan J., Sieuwerts A.M., van der Spoel P., Bolt-de Vries J., Prager-van der Smissen W.J.C., Smid M., Timmermans A.M., Martens J.W.M., Gratama J.W., Foekens J.A., Sleijfer S. 2012. CD49f-based selection of circulating tumor cells (CTCs) improves detection across breast cancer subtypes. *Cancer Letters*, 319: 49-55
- Niemann H., Kues W.A. 2003. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Animal Reproduction Science*, 79: 291-317
- Prpar Mihevc S., Dovč P. 2013. Mammary tumors in ruminants. *Acta agriculturae Slovenica*, 102, 2: 83-86
- Prpar S., Martignani E., Dovc P., Baratta M. 2012. Identification of goat mammary stem/progenitor cells. *Biology of Reproduction*, 68, 4: 117, 1-7
- Raouf A., Sun Y., Chatterjee S., Basak P. 2012. The biology of human breast epithelial progenitors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23: 606-612
- Robson E.J.D., Khaled W.T., Abell K., Watson C.J. 2006. Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine epithelial cell lines. *Differentiation*, 74: 254-264
- Sacchi P., Caroli A., Cauvin E., Maione S., Sartore S., Soglia D., Rasero R. 2004. Analysis of the MUC1 gene and its polymorphism in *Capra hircus*. *Journal of Dairy Science*, 87: 3017-3021
- Safayi S., Korn N., Bertram A., Akers R.M., Capuco A.V., Pratt S.L., Ellis S. 2012. Myoepithelial cell differentiation označevalci in prepubertal bovine mammary gland: Effect of ovariectomy. *Journal of Dairy Science*, 95: 2965-2976
- Safayi, S., Theil, P.K., Elbrønd, V.S., Hou, L., Engbæk, M., Nørgaard, J.V., Sejrsen, K., Nielsen, M.O. (2010). Mammary remodeling in primiparous and multiparous dairy goats during lactation. *Journal of Dairy Science*, 93: 1478-1490
- Satelli A., Li S. 2011. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 18: 3033-3046

- Schmid E., Schiller D.L., Grund C., Stadler J., Franke W.W. 1983. Tissue-type specific expression of intermediate filament proteins in a cultured epithelial cell line from bovine mammary gland. *The Journal of Cell Biology*, 96: 37-50
- Schnell U., Cirulli V., Giepmans B.N.G. 2013. EpCAM: Structure and function in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828: 1989-2001
- Sun Y.L., Lin C.S., Chou Y.C. 2005. Gene transfection and expression in a primary culture of mammary epithelial cells isolated from lactating sows. *Cell Biology International*, 29: 576-582
- Svennersten-Sjaunja K., Olsson K. 2005. Endocrinology of milk production. *Domestic Animal Endocrinology*, 29: 241-258
- Toledo J.R., Sánchez O., Montesino R., Farnos O., Rodríguez M.P., Alfonso P., Oramas N., Rodríguez E., Santana, E., Vega E., Ganges L., Frias M.T., Cremata J., Barrera M. 2007. Highly protective E2-CSFV vaccine candidate produced in the mammary gland of adenoviral transduced goats. *Journal of Biotechnology*, 133: 370-376
- Toniti P., Sirivisoot S., Jandee P., Srimontri P., Puchadapirom P., DOUNGHAWEE G., Kasornrorkbua C. 2010. AE1/AE3, Vimentin and p63 immunolocalization in canine mammary gland tumours: roles in differentiation between luminal epithelial and myoepithelial lineages. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 11: 227-230
- Tong H.-L., Li Q.-Z., Gao X.-J., Yin D.-Y. 2012. Establishment and characterization of a lactating dairy goat mammary gland epithelial cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 48: 149-155
- Zavizion B., van Duffelen M., Schaeffer W., Politis I. 1996. Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 32: 138-148
- Zheng Y.-M., He X.-Y. 2010. Characteristics and EGFP expression of porcine mammary gland epithelial cells. *Research in Veterinary Science*, 89: 383-390
- Weymouth N., Shi Z., Rockey D.C. 2012. Smooth muscle α actin is specifically required for the maintenance of lactation. *Developmental Biology*, 363: 1-14
- Yang J., Du X., Wang G., Sun Y., Chen K., Zhu X., Lazar A.J.F., Hunt K.K., Pollock R.E., Zhang W. 2013. Mesenchymal to epithelial transition in sarcomas. *European Journal of Cancer*, 50: 593-601