

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNI^{KA} FAKULTETA
TUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Petra KONE NIK

**DOLO ANJE IZRAFIANJA OZNA EVALCEV
EMBRIONALNIH MATI NIH CELIC V PERIFERNI
KRVI LOVEKA Z METODO
PCR V REALNEM ASU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni –tudij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNI^{KA} FAKULTETA
TUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Petra KONE NIK

**DOLO ANJE IZRAFANJA OZNA EVALCEV EMBRIONALNIH
MATI NIH CELIC V PERIFERNI KRVI LOVEKA Z METODO
PCR V REALNEM ASU**

DIPLOMSKO DELO
univerzitetni –tudij

**DETERMINATION OF THE EMBRYONIC STEM CELL MARKERS
EXPRESSION IN THE PERIPHERAL HUMAN BLOOD USING
REAL-TIME PCR METHOD**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehnički fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v Laboratoriju za molekularno in celično biologijo ter v celičnem laboratoriju Centra za imunohematologijo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

TMudijska komisija med oddelom nega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 14.05.2009 za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miomirja Knefleviča, univ. dipl. biol., za somentorja dr. Tino Cirman, univ. dipl. biol. in za recenzenta doc. dr. Tanjo Kunej, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehnička fakulteta, Oddelek za agronomijo

lan: doc. dr. Miomir KNEFLEVÍ
Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

lan: dr. Tina Cirman
Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

lan: doc. dr. Tanja Kunej
Univerza v Ljubljani, Biotehnička fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehničke fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Petra KONEČNIK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

| | |
|----|--|
| TD | Dn |
| DK | UDK 602.9 : 611.018 : 577.2 (043.2) |
| KG | Embrionalne mati ne celice odraslega/kri/MAPC/VSEL/embrionalne lastnosti/PCR v realnem asusu/cDNA/Oct-4A/Sox-2/Nanog |
| AV | KONE NIK, Petra |
| SA | KNEFTEVIČ, Miomir (mentor)/CIRMAN, Tina (somentor) |
| KZ | SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101 |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehnička fakulteta, Tudič biotehnologije |
| LI | 2009 |
| IN | DOLOČANJE IZRAFLJANJA OZNAČEVALCEV EMBRIONALNIH MATIH CELIC V PERIFERNI KRVI LOVEKA Z METODO PCR V REALNEM ASU |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni -tudič) |
| OP | XIII, 67 str, 19 preg., 26 sl., 144 vir. |
| IJ | sl |
| JI | sl/en |
| AI | V periferni krvi odraslega loveka se nahaja več vrst matih celic. Med njimi so tudi celice, ki izraflajo označevalce embrionalnih celic ter imajo lastnosti embrionalnih matih celic. Namen diplomske naloge je bil določiti izrafljanje teh označevalcev v periferni krvi loveka z uporabo metode PCR v realnem asusu. Izrafljanje označevalcev embrionalnih celic smo določili v vzorcu polne krvi zdravega darovalca, v zlevkociti bogatemu vzorcu krvi (angl. buffy coat), v celicah LIN- in LIN+ ter med izoliranimi enojedrnimi celicami iz vzorca krvi. RNA smo izolirali iz posameznih vzorcev, preverili njeno integriteto, z encimom reverzno transkriptazo sintetizirali komplementarno cDNA ter z metodo PCR v realnem asusu preverili izrafljanje embrionalnih označevalcev Oct-4A, Sox-2 in Nanog. Dobavljeni rezultati kažejo, da se v periferni krvi odraslega loveka nahajajo celice, ki izraflajo embrionalne označevalce Oct-4A in Nanog. Z nadaljnimi raziskavami bi bilo potrebno preveriti, za kateri tip celic gre ter njihov potencial diferenciacije v druge tipe celic, ki bi jih v prihodnosti lahko uporabili v namene regenerativne medicine. |

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 602.9 : 611.018 : 577.2 (043.2)
CX Embryonic stem cells of the adult/peripheral blood/MAPC/VSEL/embryonic characteristics/real-time PCR/cDNA/Oct-4A/Sox-2/Nanog
AU KONE NIK, Petra
AA KNEFTEVIČ, Miomir (supervisor)/CIRMAN, Tina (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2009
TI DETERMINATION OF THE EMBRYONIC STEM CELL MARKERS EXPRESSION IN THE PERIPHERAL HUMAN BLOOD USING REAL-TIME PCR METHOD
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIII, 67 p., 19 tab., 26 fig., 144 ref.
LA sl
AL sl/en
AB There are several types of stem cells to be found in the peripheral blood of an adult. Recent studies indicate there is a subpopulation of very small cells in peripheral blood that expresses embryonic markers. These cells are rare, hard to isolate and to characterize. The purpose of this graduation thesis was to demonstrate their presence in adult human peripheral blood. By determining the expression of embryonic stem cell markers using real-time PCR. After collection of peripheral blood samples from healthy donors, isolation of buffy coat and mononuclear cells was performed using density gradient centrifugation. RNA was isolated from each sample, RNA integrity number measured, cDNA synthesized and the expression of embryonic markers Oct-4A, Sox-2 and Nanog verified using real-time PCR. Our results show there is a subpopulation of stem cells in peripheral blood that express embryonic stem cell markers mentioned above. We believe that these cells circulate around the body and participate in tissue regeneration. In the future these cells could be expanded *in vitro* and used for the purposes of regenerative medicine.

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|-----------|
| Ključna dokumentacijska informacija | III |
| Key words documentation | IV |
| Kazalo vsebine | V |
| Kazalo preglednic | VII |
| Kazalo slik | VIII |
| Okrajave in simboli | X |
| Slovar ek | XI |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 DEFINICIJA | 1 |
| 1.2 LASTNOSTI MATIČNIH CELIC | 2 |
| 1.3 VERIFIKAЦIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU | 3 |
| 1.3.1 Obratno prepisovanje | 4 |
| 1.3.2 Sonde za PCR v realnem času | 5 |
| 1.3.3 Metode za obdelavo rezultatov | 5 |
| 1.3.3.1 Primerjalna Ct metoda | 6 |
| 1.4 OCENA INTEGRITETE RNA Z APARATOM Agilent 2100 Bioanalyzer | 7 |
| 2 PREGLED OBJAV | 8 |
| 2.1 RAZLIČNI TIPI PLURIPOTENTNIH MATIČNIH CELIC V PERIFERNI KRVI | 8 |
| 2.1.1 Multipotentne prednice odraslega (MAPC) | 8 |
| 2.1.2 Celice MIAMI | 9 |
| 2.1.3 Celice VSEL | 10 |
| 2.1.3.1 Mi-je celice VSEL | 11 |
| 2.1.3.2 love-ke celice VSEL | 12 |
| 2.2 MATIČNE CELICE Z VPRAZLJIVO PLURIPOTENTNOSTJO V PERIFERNI KRVI | 13 |
| 2.2.1 Krvotvorne matične celice | 13 |
| 2.2.2 Mezenhimske matične celice | 13 |
| 2.2.3 Endotelijalne progenitorske celice | 15 |
| 2.3 EMBRIONALNI OZNAČVALCI | 16 |
| 2.3.1 Nanog | 16 |
| 2.3.2 Sex Determining Region Y-box 2 (SOX-2) | 18 |
| 2.3.3 Oktamer-4 (Oct-4) | 19 |
| 2.4 SIGNALNE POTI, KI SODELUJEJO PRI VZDRŽEVANJU PLURIPOTENTNOSTI IN SAMOOBNAVLJANJA LOVE TM KIH EMBRIONALNIH MATIČNIH CELIC | 21 |
| 2.4.1 Signalna pot Wnt | 21 |
| 2.4.2 Signalna pot fibroblastnega rastnega faktorja | 22 |
| 2.4.3 Signalna pot TGF /BMP | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.4 Signalni poti NOTCH in Hedgehog | 25 |
| 2.4.5 Signalna pot fosfoinozitid 3 ó kinaze (PI3K) | 27 |
| 3 MATERIAL IN METODE | 29 |
| 3.1 CILJI RAZISKAVE | 29 |
| 3.2 DELOVNA HIPOTEZA | 29 |
| 3.3 POTEK DELA | 30 |
| 3.4 METODE | 31 |
| 3.4.1 Pridobivanje vzorcev periferne krvi | 31 |
| 3.4.2 Izolacija frakcije mononuklearnih celic iz vzorca polne krvi z uporabo fikola | 31 |
| 3.4.3 Izolacija MC iz vzorca MNC s sistemom StemSepTM | 31 |
| 3.4.4 Izolacija RNA iz vzorcev mononuklearnih celic ter celic Lin- in Lin+ | 34 |
| 3.4.5 Izolacija RNA iz frakcije z levkociti bogate krvi | 34 |
| 3.4.6 Merjenje koncentracije in integritete RNA | 35 |
| 3.4.6.1 Merjenje koncentracije na Thermo Scientific NanoDrop $\hat{\lambda}$ 1000 spektrofotometru | 35 |
| 3.4.6.2 Merjenje integritete RNA z napravo Agilent 2100 Bioanalyzer | 35 |
| 3.4.7 Obdelava vzorcev z encimom DNazo | 35 |
| 3.4.8 Sinteza komplementane DNA | 36 |
| 3.4.9 Metoda PCR v realnem asu | 37 |
| 3.4.9.1 Ugotavljanje prisotnosti gDNA v vzorcih RNA, cDNA, sintetizirane iz z DNazo obdelane z RNA in v cDNA, sintetizirane iz z DNazo neobdelane RNA z metodo PCR v realnem asu | 39 |
| 3.4.9.2 Določanje izraflanja označevalcev embrionalnih celic z metodo PCR v realnem asu | 39 |
| 3.4.9.3 Določanje izraflanja označevalcev embrionalnih celic s predhodnim pomnoščevanjem cDNA (preamplifikacijo) | 40 |
| 4 REZULTATI | 42 |
| 4.1 KONCENTRACIJA IZOLIRANE RNA IZ POSAMEZNIH VZORCEV, ISTOST IN INTEGRITETA RNA | 42 |
| 4.2 PREVERJANJE PRISOTNOSTI GENOMSKE DNA V VZORCIH | 43 |
| 4.3 DOLOČANJE IZRAFLJANJA EMBRIONALNIH OZNAČEVALCEV Z METODO PCR V REALNEM ASU | 44 |
| 4.4 PREAMPLIFIKACIJA cDNA | 46 |
| 5 RAZPRAVA IN SKLEPI | 49 |
| 5.1 PRIHODNJE DELO | 54 |
| 6 POVZETEK | 55 |
| 7 VIRI | 56 |
| ZAHVALA | |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Preglednica 1: MC imajo lahko različne stopnje potentnosti | 2 |
| Preglednica 2: Označevalci CD na celicah, ki jih zazanava kompleks StemSep™ | 33 |
| Preglednica 3: Izračun koncentracije RNA za nadaljnjo obdelavo z DNazo | 36 |
| Preglednica 4: Sestava reakcijskih mehanizmov za sintezo cDNA | 36 |
| Preglednica 5: Program sinteze cDNA | 36 |
| Preglednica 6: Tari ni geni merjeni pri PCR v realnem času | 37 |
| Preglednica 7: Uporabljeni testi TaqMan® Gene Expression Assays proizvajalca Applied Biosystems | 37 |
| Preglednica 8: Sekvenca smiselnega (F) ter protismiselnega (R) za etnega oligonukleotida ter sonde (S) za 4. intron gena za RhD | 38 |
| Preglednica 9: Količine RNA oz. cDNA, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju prisotnosti gDNA v vzorcih RNA, ter cDNA, sintetizirane iz z DNazo obdelane oz. neobdelano RNA | 39 |
| Preglednica 10: Metodika označevalcev Oct-4A, Nanog, Sox-2, ciklofilina in pufra Tris-EDTA | 40 |
| Preglednica 11: Metodika reagentov za preamplifikacijo cDNA | 40 |
| Preglednica 12: Program za preamplifikacijo cDNA | 40 |
| Preglednica 13: Koncentracije RNA in čistost vzorcev | 42 |
| Preglednica 14: Vrednosti RIN vzorcev | 42 |
| Preglednica 15: Izraščanje označevalca RhD inton 4 v vzorcih RNA, v cDNA, sintetizirane iz z DNazo obdelane oz. neobdelane RNA v celicah fibroblastov, EMC in MNC | 43 |
| Preglednica 16: Izraščanje označevalca Oct-4A v vzorcih RNA, v cDNA, sintetizirane iz z DNazo obdelane oz. neobdelane RNA v celicah fibroblastov, EMC in MNC | 44 |
| Preglednica 17: Izraščanje označevalca ciklofilina C v vzorcih RNA, v cDNA, sintetizirane iz z DNazo obdelane oz. neobdelane RNA v celicah fibroblastov, EMC in MNC | 44 |
| Preglednica 18: Reaktivni nivo izraščanja embrionalnih označevalcev Nanog, Oct-4A in Sox-2 glede na negativno kontrolo fibroblastov za posamezne vzorce celic | 45 |
| Preglednica 19: Reaktivni nivo izraščanja embrionalnih označevalcev Nanog, Oct-4A in Sox-2 glede na negativno kontrolo fibroblastov za posamezne vzorce celic | 47 |

KAZALO SLIK

| | |
|---|----|
| Slika 1: V različnih razvojnih stopnjah v razvoju osebka se nahajajo MC z različnim razvojnimi potencialom. Po trenutno prevladajoči teoriji se s staranjem osebka zmanjšuje potentnost MC. | 1 |
| Slika 2: Grafično predstavljen rezultat verifikacije pomnoščevanja DNA v realnem času.. | 6 |
| Slika 3: Celice MAPC v kulturi. | 9 |
| Slika 4: Celice MIAMI. | 10 |
| Slika 5: Mišje Sca-1 ⁺ /lin CD45 ⁻ matične celice VSEL in mišje Sca-1 ⁺ /lin CD45 ⁺ KMC. | 11 |
| Slika 6: Celice VSEL so pritrjene na fibroblaste iz KM. | 12 |
| Slika 7: Transmisija elektronske mikroskopije: CXCR4+/lin- CD45- celice iz humana popkovnic nekrvi. | 12 |
| Slika 8: Mezenhimske matične celice v kulturi. | 15 |
| Slika 9: Vloga Nanog pri vzdrževanju pluripotentnosti EMC. | 17 |
| Slika 10: Kristalna struktura homeozaporedja Nanog. | 18 |
| Slika 11: Struktura kompleksa Oct1/Sox-2/FGF. | 19 |
| Slika 12: Oct-4 pri uravnavanju pluripotentnosti EMC. | 21 |
| Slika 13: Signalna pot Wnt. | 22 |
| Slika 14: Signalna pot FGF. | 23 |
| Slika 15: Signalna pot TGF <beta>/BMP.</beta> | 24 |
| Slika 16: Signalna pot NOTCH. | 26 |
| Slika 17: Signalna pot Hedgehog. | 27 |
| Slika 18: Signalna pot PI3K. | 28 |
| Slika 19: Shema poteka dela. | 30 |
| Slika 20: Izolacija MNC z gradientnim centrifugiranjem na fikolu. | 31 |
| Slika 21: Shematski prikaz ločevanja celic z uporabo kolon v magnetnem polju. | 32 |
| Slika 22: Elektroferogram za posamezne vzorce. | 42 |
| Slika 23: Relativni nivo izraščanja embrionalnih označevalcev Nanog, Oct-4A in Sox-2 glede na negativno kontrolo fibroblastov v vzorcih EMC, v z levkociti bogatem vzorcu BC, v mononuklearnih celicah MNC, v celicah Lin+ in Lin-. | 45 |

Slika 24: Relativni nivo izraščanja embrionalnih označevalcev Nanog, Oct-4A in Sox-2 glede na negativno kontrolo fibroblastov v z levkociti bogatemu vzorcu BC, v mononuklearnih celicah MNC, v celicah Lin+ in Lin-. 46

Slika 24: Relativni nivo izraščanja embrionalnih označevalcev Nanog, Oct-4A in Sox-2 glede na negativno kontrolo fibroblastov v vzorcih EMC, v z levkociti bogatemu vzorcu BC, v mononuklearnih celicah MNC, v celicah Lin+ in Lin-. 47

Slika 26: Relativni nivo izraščanja embrionalnih označevalcev Nanog, Oct-4A in Sox-2 glede na negativno kontrolo fibroblastov v vzorcih mononuklearnih celic MNC, v celicah Lin+ in z levkociti bogatemu vzorcu BC po preamplifikaciji. 48

OKRAJNAVE IN SIMBOLI

| | |
|-----------|---|
| Bp | bazni par |
| CBE | embrionalni matici celici podobna celica iz popkovne krvi (angl. Cord-blood-derived Embryonic-like Stem Cell) |
| CD | označevalec pripadosti (angl. Cluster of Differentiation) |
| cDNA | komplementarna DNA (cDNA) |
| Celice EC | embrionalna karcinomska celica |
| Ct | pravilni cikel (angl. Cycle threshold) |
| EMC | embrionalna mati na celica |
| EPC | endotelijalne prednike celice (angl. Endothelial Progenitor Cells) |
| ESC-A | embrionalne matice celice odraslega (angl. Embryonic-like Stem Cell of the Adult) |
| hMASC | humana multipotentna mati na celica odraslega (angl. Human Multipotent Adult Stem Cell) |
| ICM | notranja celica na masa (angl. Inner Cell Mass) |
| KM | kostni možeg |
| KMC | krvotvorna mati na celica |
| MAPC | Multipotentna prednica odraslega (angl. Multipotent Adult Progenitor Cell) |
| MC | mati na celica |
| MIAMI | angl. Marrow-isolated Adult Multilineage Inducible Cells |
| MMC | mezenhimska mati na celica (angl. Mesenchymal Stem Cell) |
| MNC | mononuklearne celice |
| Oct-4 | Oktamer-4 |
| PBS | fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffered Saline) |
| PCR | verifikacija s polimerazo |
| PK | periferna kri |
| RT-PCR | obratna transkripcija in verifikacija s polimerazo |
| qPCR | Kvantitativna verifikacija reakcija s polimerazo, verifikacija s polimerazo v realnem času |
| Sox-2 | angl. Sex Determining Region Y-box 2 |
| SSEA-1 | angl. Stage-specific Embryonic Antigen 1 |
| SSEA-4 | angl. Stage-specific Embryonic Antigen 4 |
| VSEL | zelo majhne celice podobne embrionalnim maticnim celicam (angl. Very Small Embryonic-like Stem Cells) |

SLOVAR EK

| Pojem | Razlaga |
|--|---|
| Angiogeneza | Fiziološki proces rasti novih žil iz teh obstoječih žil s pomočjo angiogenih faktorjev, ki jih lahko izločajo tudi tumorske celice. |
| A260/A280 | A260 in A280 so meritve absorbance optične spektralne oblike pri valovni dolžini 260 nm in 280 nm. A260 se uporablja za merjenje koncentracij nukleinskih kislin (DNA/RNA), A280 pa se uporablja za merjenje koncentracije proteinov. Razmerje A260/A280 pove, kako je istost vzorca oz. koliko je v vzorcu proteinov glede na RNA. Če je razmerje >1.8 , to pomeni, da je v vzorcu malo proteinov. Baze v DNA ali RNA absorbirajo UV svetlobo z maksimalno absorbancijo pri valovni dolžini 260 nm. Večina proteinov ima maksimum absorbcije UV svetlobe pri valovni dolžini 280 nm, predvsem zaradi aromatskih aminokislín. |
| CBE | Embrionalnim matim celicam podobne celice iz popkovne krvi (angl. Cord-blood-derived Embryonic-like Stem Cells), ki so jih leta 2005 odkrili angleški raziskovalci. Celice CBE izraščajo embrionalne označevalce Oct-4, SSEA-4 in SSEA-3 ter TRA-1-60 in TRA-1-81 in so negativne za nehumanne označevalce SSEA-1. |
| Embrionalne karcinomske celice | Pluripotentne maligne sprememnjene celice, ki jih vsebujejo teratokarcinomi. |
| Embrionalna mati na celica | Pluripotentna linija matih celic, ki izhajajo iz zgodnjega zarodka (~5 dn), preden se tvorijo zarodne plasti. |
| Embrionalnim matim celicam podobne celice | Mati ne celice, ki ne izhajajo iz notranje celih ne mase blastociste, ampak iz npr. tkiv odraslega loveka, imajo pa lastnosti embrionalnih matih celic (pluripotentnost). |
| EPC | Endoteljske prednike celice (angl. Endothelial Progenitor Cells) izhajajo iz KM in sodelujejo pri nastajanju novih krvnih žil. Njihovo odkritje je pripeljalo do koncepta, da vaskularizacija in angiogeneza lahko poteka simultano v postnatalnem obdobju, saj se lahko celice EPC diferencirajo v vaskularni endotelij. |
| ESC-A | Embrionalne mati ne celice odraslega (angl. Embryonic-like Stem cell of the Adult), ki so jih prvi izolirali iz površinskega epitelija jajnika pri flenskah brez naravnih prisotnih foliklov in jajnih celic. ESC-A so pozitivne za označevalce embrionalnih matih celic (Oct-4, Sox-2, Nanog in za površinski antigen SSEA-4), v pogojih <i>in vitro</i> se lahko razvijejo v jajnih podobne celice in druge tipe celic. |
| Hematopoeza | Tvorba in razvoj raznih tipov krvnih celic. |
| hMASC | Humane multipotentne mati ne celice odraslega (angl. Human Multipotent Adult Stem Cells) so izolirali iz različnih tkiv, vse so izraščale gene znane za pluripotentne celice Oct-4, Nanog in Rex1, kazale pa so tudi telomerazno aktivnost. Celice hMASC imajo tudi visoki diferenciacijski potencial, kar so pokazali tako na morfološki kot tudi na funkcionalni ravni. |

| | |
|---|--|
| Kemoatraktant | Anorganska ali organska substanca, ki ima učink spodbujanja kemotakse v gibajočih celicah. Učinki kemoatraktantov so posredovani preko kemotaktičnih receptorjev, ligand kemoatraktanta pa je specifičen za tarene celice in odvisen od koncentracije. Najpogosteje se preiskuje kemoatraktante formalin peptide in kemokine. |
| Krvotvorna mati na celica | Mati na celica iz katere lahko nastanejo levkociti, eritrociti ali trombociti. |
| Mati na celica | Vse celice, ki lahko stalno producirajo nespremenjene hibernantske celice hkrati pa imajo tudi sposobnost, da tvorijo hibernantske celice, ki so v svojem razvojnem potencialu bolj omejene (manjša potentnost). |
| Mati nost | Sposobnost vzdrževanja pluripotentnosti navkljub delitvam. Mati ne celice vzdržujejo mati nost s pomočjo aktivnega izraščanja določenih genov in z različnimi drugimi mehanizmi. |
| MIAMI | Celice MIAMI (angl. Marrow-isolated Adult Multilineage Inducible cells) so velike od 7-10 µm, imajo malo citoplazme in se hitro delijo. Morfologija celic ostaja enaka tudi po 52 podvojitvah. <i>In vitro</i> se celice MIAMI lahko diferencirajo v vse tri embrionalne plasti. |
| MMC | Mezenhimska mati na celica (angl. Mesenchymal Stem cell). MMC spadajo med stromalne celice KM in imajo dvojno vlogo: a) predstavljajo izvorne celice za ne-hematopoetska tkiva in b) so hkrati hranilne celice za podporo rasti in diferenciaciji krvnih celic in ostalih tkiv, saj sintetizirajo različne komponente zunajceličnega matriksa in različne faktorje. |
| Multipotentna mati na celica | Celica, sposobna tvoriti več linij celic, ki tvorijo celotno tkivo ali tkiva. Primer: krvotvorna mati na celica. |
| Multipotentna prednica odraslega (MAPC) | Celice izolirane iz kostnega mozga in krvi. Lahko jih diferenciramo v hondrocyte, adipocyte in kostne celice (angl. Multipotent Adult Progenitor Cell). |
| Notranja celi na masa | Notranja skupina celic v blastocisti, ki v kulturi <i>in vitro</i> tvori embrioidna telesca, iz katerih osamimo embrionalne matice celice. |
| Ontogeneza | Ontogeneza, tudi ontogenija ali morfogeneza, je razvoj in spremenjanje organizma od oplojene jajne celice do odrasle oblike in nato smrti. |
| Označevalci (pluripotentni, tkivno specifični) | Genotipski (geni) ali fenotipski (proteini) označevalci, ki so znani za določen tip celic. Z njimi lahko identificiramo celice. |
| Plastičnost | Nedokazano opaškanje, da tkivne matice celice lahko raziskajo svojo potentnost kot odgovor na fiziološke potrebe ali dražljaje. |
| Pluripotentna mati na celica | Celica, sposobna tvoriti vse telesne celice, vključno z germinalnimi celicami in nekaj ali vse ekstraembrionalna tkiva. Primer so embrionalne matice celice. |
| Potentnost | Obseg možnosti za končno diferenciacijo celic. |
| Prednica celica, tudi usmerjena mati na celica | Potomska celica matice celice v direktni liniji. |

| | |
|--|--|
| Rakava (tumorska) mati na celica | Samoobnavljajoča celica, ki je odgovorna za ohranjanje tumorja, ker proizvaja differencirane progenitorske celice, ki tvorijo tumor. Prav tumorske matice ne celice, ki jih je možno identificirati pri nekaterih levkemijah in solidnih tumorjih, so potencialne/kratke terapevtske tarže. |
| Regenerativna medicina | Veja medicine, ki se ukvarja z obnovo fizioloških funkcij organov in tkiv in pri tem lahko uporablja tudi celice. |
| Reproducativno kloniranje | Cilj reproducativnega kloniranja je ustvariti osebek, ki je genetsko identen s osebkom, ki je bil donor somatskega jedra. Klonirani zarodek se nato implantira v maternico, kjer se razvije v osebek. |
| Samoobnavljanje, Samopomnovevanje | Celične delitve, ki v vsakem ciklu generirajo vsaj eno hčerinsko celico, ki je popolnoma enaka materinski in ima latentno sposobnost differenciacije. Lastnost samoobnavljanja definira matice ne celice. |
| Simetrična celica na delitev | Celična delitev, kjer nastaneta dve enaki hčerinski celici. |
| Somatska celica | Vsaka celica v telesu razen gamet (jajecne in spremišč). |
| Teratokarcinom | Teratokarcinom je epiteljski malignom, ki je nastal iz prizadene nepravilnosti razvoja kakega organa ali tkiva. Teratomi spadajo med teratokarcinome. |
| Teratom | Tumor, sestavljen in skupka različnih tkiv. Ti tumorji vsebujejo celice, ki pripadajo vsem trem zarodnim plastem. |
| Totipotentna mati na celica | Celica, sposobna tvoriti celoten organizem, vključno s trofoblastom. Totipotentna je zigota, pri rastlinah pa meristemske celice. Totipotentnost ni bila pokazana pri nobeni mati ni celici vreten arjev. |
| Trofoblast | Del blastociste, ki ne pripada embriu in se ugnedzi v maternino steno ter kasneje razvije v fetalni del placentae. |
| Unipotentna celica | Tvori le eno celico no linijo. |
| Usmerjenost | Vstop v program, ki vodi v differenciacijo. Za matice no celico to pomeni, da izstopi iz samoobnavljanja. |
| VSEL | Zelo majhne celice podobne embrionalnim maticnim celicam (Angl. Very Small Embryonic-like Stem Cells). Odkrili so jih v kostnem mozgu odraslih mesečev, v humanih popkovnih in perifernih krvi. Celice VSEL kažejo embrionalne lastnosti, <i>in vitro</i> so jih tudi differencirali v tkiva, ki pripadajo vsem trem embrionalnim plastem. |

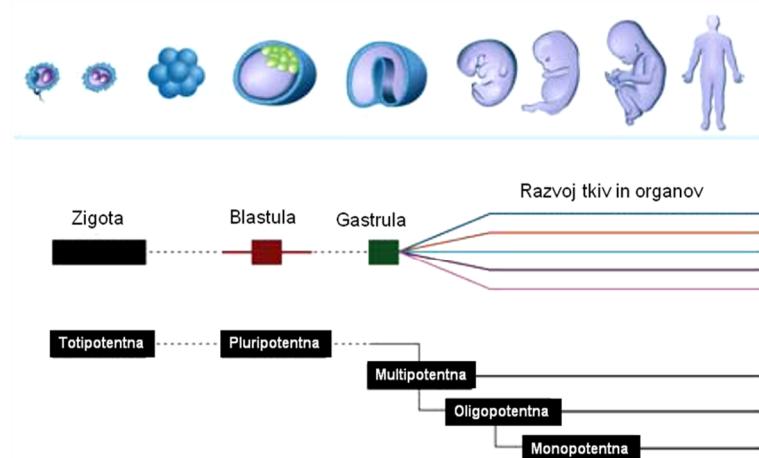
1 UVOD

1.1 DEFINICIJA

V lovečem telesu se nahajajo celice, ki se ohranljajo v telesu vse do vrednosti in sposobnosti flivljenje in omogočajo, da se tkiva in organi obnavljajo. Te celice se imenujejo matične celice (MC, angl. stem cells) in so nediferencirane celice, ki imajo sposobnost dolgotrajnega deljenja in tvorbe sebi identičnih kopij ali samoobnavljanja ali ter diferenciacije v bolj usmerjene tkivne celice. Najdemo jih v vseh tkivih odraslega loveka, npr. epiteliju, prebavilih, skeletnih mišicah, očeh, jetrih, dojki, zobni pulpi, kofli, lasnih mešicah, perifernih krvi, mame obnem tkivu, testisih, prostati, v ovarijih. Odgovorne so za nadomečanje odmrlih celic ali popravljanje tkivnih poškodb. Z njimi lahko tudi zdravimo določene degenerativne, presnovne, prirojene in rakaste bolezni, predvsem pa mehanske poškodbe tkiv in organov (Strbad in Roflman, 2005).

Matične celice so nediferencirane, po obliki podobne majhnim limfocitom in sposobne dolgotrajnega asimetričnega deljenja. Pri tem tvorijo v procesu samoobnavljanja identične kopije celic, ali pa nove linije bolj diferenciranih celic. Najprej nastanejo celice prednice (prekurzorji) specializiranih tkivnih celic, iz njih pa funkcionalne celice tkiv. Pomembna lastnost MC je tudi plastičnost, to je sposobnost odraslih MC, da se kot odgovor na fiziološke dražilje diferencirajo tudi v celice drugih tkiv, ne le v celice tkiva, iz katerega izhajajo. MC se obnavljajo z asimetrično delitvijo celic, pri kateri nastaneta dve identični celici, ena ohrani lastnosti MC, druga pa se lahko diferencira v različne tipe. Ena izmed pomembnih lastnosti MC je potentnost, sposobnost diferenciacije v različne vrste celic (Strbad in Roflman, 2005; Zipori, 2005).

Po prevladujoči teoriji vsako tkivo vsebuje majhno populacijo MC, ki imajo sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije (Ratajczak in sod., 2004). Razvoj MC je enosmeren. Z diferenciacijo v zrele celice se zmanjšuje pluripotentnost celice (slika 1). Mnoge študije so pokazale, da imajo odrasle MC sposobnost diferenciacije tudi v celice drugih tkiv in ne samo v celice tkiva, iz katerega izhajajo (Zipori, 2005).



Slika 1: V različnih razvojnih stopnjah v razvoju osebka se nahajajo MC z različnim razvojnim potencialom. Po trenutno prevladujoči teoriji se s staranjem osebka zmanjšuje potentnost MC (Zipori, 2005).

1.2 LASTNOSTI MATI NIH CELIC

MC lahko razdelimo v dve skupini: embrionalne mati ne celice, ki se nahajajo v blastocisti (zarodku) in mati ne celice odraslega, ki se nahajajo v tkivih odraslega osebka. Nekateri avtorji navajajo tudi tretjo obliko MC, in sicer fetalne MC, med katere sodijo tudi MC iz popkovnice in placente. Potentnost embrionalnih celic je velika, saj se lahko razvijejo v vseh 200 različnih tipov celic lovekega telesa, medtem ko so MC odraslega v svojem razvoju bolj omejene (Meng in sod., 2007).

Edine resni no pluripotentne MC izhajajo iz notranje celične mase blastociste in se imenujejo EMC. Iz njih izhajajo vse somatske mati ne celice (mati ne celice odraslega), ki se naprej diferencirajo v multipotentne tkivno specifične MC. Iz multipotentnih tkivno specifičnih MC se razvijejo prednike celice, ki se delijo in končno diferencirajo v zrele somatske celice organov (preglednica 1) (Oertel in Shafritz, 2008).

Preglednica 1: MC imajo lahko različno stopnjo potentnosti (Jefl, 2008)

| | |
|-------------------------------------|--|
| Totipotentne mati ne celice | Nastanejo pri zdravljitvi spermija in jajeca. Zigota in zgodnje blastomere (do stopnje blastociste) so totipotentne, saj se lahko diferencirajo v embrionalna in ekstraembrionalna tkiva. Iz vsake celice torej lahko nastane celoten zarodek (trofoblast in notranja celica na masa). |
| Pluripotentne mati ne celice | Lahko se diferencirajo v tkiva, ki pripadajo vsem trem embrionalnim plasti (endoderm, mezoderm, ektoderm) ne pa v trofoblast, to je v delu blastociste, ki se vgneždi v steno maternice in se kasneje razvije v posteljico. Celične linije pluripotentnih celic lahko vzpostavimo iz celic znotraj celice mase blastociste ali iz primordialnih germinalnih celic. |
| Multipotentne mati ne celice | Iz njih se lahko razvijejo celice, ki pripadajo le eni embrionalni plasti. Multipotentne celice se nahajajo v tkivih odraslega osebka, njihova naloga pa je obnavljati celice v tkivu in sodelovati v regeneraciji ob po-kodbi. Primer multipotentnih MC so KMC pri katerih so opazili fenomen plastičnosti in zmogljivosti razvoja tudi v kardiomiocite. |
| Unipotentne mati ne celice | So tkivno specifične in se lahko razvijejo v samo eno celico no linijo. Imajo pa sposobnost samoobnavljanja in le-ta jih loči od somatskih celic (npr. mišične mati ne celice). |

Med odraslimi MC in EMC obstajajo težilne razlike (Bongso in Richards, 2004):

- MC odraslega so multipotentne. V organizmu se nahajajo v zelo majhnem težilu in jih je težko izolirati. Celične linije odraslih MC ne obstajajo, tudi ni znano, ali se *in vitro* ohranja normalen genetski profil celic. Ker imajo nizko stopnjo telomerazne aktivnosti, se jim s staranjem krajajo telomere in v kulturi dokaj hitro zapadejo v senescenco ter odmrijo. Po transplantaciji ne predstavljajo nevarnosti za nastanek teratomov. Za pridobivanje celic z fletenim genotipom metoda prenosa jedra pri somatskih MC ni možna. Zaradi svojega izvora iz tkiv odraslega loveka njihova uporaba ni etično sporna. Uporabljajo se v terapijah s transplantacijami.
- EMC so pluripotentne, nahajajo se v notranji celici nič mase blastociste, od koder jih lahko izoliramo in nato namnoščimo v kulturi v velikem težilu. V kulturi lahko preživijo zelo dolgo in asa in ohranjajo normalen kariotip, na voljo so tudi različne

celi ne linije. Imajo visoko telomerazno aktivnost, kar omogoči, da ohranjajo dolgino telomer. V terapevtske namene se jih ne uporablja, ker lahko po transplantaciji povzročijo nastanek tumorjev, poleg tega pa je zaradi uni enja blastocista pri izolaciji EMC njihova uporaba sporna. EMC se lahko uporablja za testiranje farmacevtskih substanc, za razvojne studije, za studij kongenitalnih anomalij in raka pri otrocih ter za produkcijo gamet in embrijev. Pri EMC lahko za pridobitev celic z flelenim genotipom uporabimo metodo prenosa jedra.

MC lahko gojimo *in vitro* in jih s pomočjo rastnih dejavnikov usmerimo v diferenciacijo v različne specializirane tipe celic, npr. mišične, jetrne ali plivne celice. Moderna medicina si zato veliko obeta od uporabe MC za zdravljenje v regenerativne namene. Najbolj so uporabne avtologne celice, ki jih lahko pridobimo iz popkovne krvi, KM ali s terapevtskim kloniranjem. Pri tem s prenosom somatskega jedra v oocito, ki ji odstranijo jedro, ustvarijo blastocisto, ki je genetsko identična osebki, nato pa iz nje izolirajo EMC za zdravljenje. Ker se zarodke uniči, je ta način no sporen, zato raziskovalci iščutijo alternativne načine za pridobivanje ustreznih MC za zdravljenje.

V zadnjih letih se pojavlja vedno več objav, v katerih avtorji dokazujejo, da so v različnih tkivih odraslega loveka načini – tretja skupina MC v populacijo MC z embrionalnim znamenjem (McGuckin in sod., 2005; Ratajczak in sod., 2008a; Ratajczak in sod., 2008b; Virant-Klun in sod., 2008). Te celice bi lahko predstavljale alternativo EMC za uporabo v regenerativni medicini, saj njihovo pridobivanje ni etično sporno. Vendar jih je v odraslih tkivih izjemno malo, zato je njihovo pridobivanje in razmnoževanje tehniki nočelo zahtevno.

V načelu se nameravamo posvetiti tej skupini matih celic pri loveku, saj bi dokaz njihovega dejanskega obstoja omogočil nadaljnje raziskave, s katerimi bi te celice lahko postale alternativo uporabne v medicini brez etične nihali druge nihale tehnike pri njihovem pridobivanju in uporabi.

1.3 VERIFIČNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ASU

Verificna reakcija s polimerazo (PCR) v realnem asu (kvantitativna PCR v realnem asu (qPCR)), je laboratorijska tehnika, ki temelji na verificni reakciji s polimerazo. Uporablja se za istoimensko pomnoževanje in kvantificiranje taretne molekule (DNA, cDNA ali RNA) (Valasek in Repa, 2005).

PCR v realnem asu temelji na metodi PCR, ki jo je v osemdesetih letih 20. stoletja razvil Kary Mullis, in omogoča podvojevanje specifičnih delov DNA. Za pomnoževanje specifičnih delov DNA se uporablja DNA-polimeraza. Najpogosteje se uporablja DNA-polimeraza *Taq* (iz organizma *Thermus aquaticus*), lahko pa tudi DNA-polimeraza *Pfu* (iz organizma *Pyrococcus furiosus*). Obe polimerazi imata imata skupni dve zelo pomembni lastnosti: nove verige DNA ustvarjata z uporabo matrice DNA in za etnih oligonukleotidov ter sta odporni na visoke temperature. To je pomembno zato, ker je potrebno po vsakem ciklu DNA pomnoževanja dvoverifčno DNA pri visokih temperaturah »raztopiti« v enoverifčno obliko. Denaturaciji DNA sledi vezava za etnih oligonukleotidov

(kratkih, sekvene specifičnih oligonukleotidov) na nove enoverificne matrice DNA. DNA-polimeraza nato podaljuje verigo z dodajanjem posameznih komplementarnih nukleotidov in tako ustvarja novo verigo DNA, ki se uporabi v novem ciklu pomnoščevanja.

Kljub mnogim prednostim ima »klasična« metoda PCR tudi nekaj omejitev. Največja je relativno nizka ob utrjenosti, saj za analizo potrebujemo veliko izhodiščnega materiala, ki nam ni vedno na voljo. Prav tako ne drži popolnoma, da lahko DNA namnoščujemo v nedogled, saj lahko v reakcijski mehanizmu zmanjka npr. oligonukleotidov. Zato so se razvile nove metode, ki so bolj ob utrjenive in pri katerih potrebujemo manj vzorca, ki ga sledimo analizirati (Valasek in Repa, 2005). Ena od teh metod je PCR v realnem asu, ki so jo kot nadgradnjo »klasične« metode PCR leta 1992 prvi objavili Higuchi in sod. (1992) pri Roche Molecular Systems in Chiron. V reakcijsko mehanizmu za PCR so dodali etidijev bromid (EtBr), ki se je vrnil v DNA. Reakcija je tekla pod UV svetlobo, ki je povzročila fluoresciranje EtBr. Fluorescenca EtBr so posneli z video kamero. Na ta način so razvili kinetični pristop analize PCR za obutrjenivo, selektivno kvantifikacijo DNA v drugem dinamičnem območju (Higuchi in sod., 1992).

Verjetno najpomembnejša prednost PCR v realnem asu je zmognost kvantificiranja nukleinskih kislin v izjemno drugem dinamičnem razponu (vsaj 5 logaritemskih enot). To je zdravljivo z izjemno ob utrjenostjo, saj lahko zaznamo manj kot 5 kopij kar ne sekvene. PCR v realnem asu je tudi relativno hitra metoda, ki se jo da delno avtomatizirati. Reakcije PCR v realnem asu tečejo v zaprtih luknjicah mikrotitrskih plovil. Po koncu reakcije nadaljnja manipulacija vzorcev ni potrebna, kar zmanjša možnost navzkrižne kontaminacije v laboratoriju. Kljub mnogim prednostim pa ima PCR v realnem asu nekaj slabosti. Reakcija PCR v realnem asu je lahko inhibirana s komponentami, ki so prisotne v določenih bioloških vzorcih (npr. hemoglobin, se na kislina), ali raznimi organskimi ali fenolnimi inhibitorji. Tovrstni inhibiciji se lahko izognemo z uporabo odporne DNA polimeraze (npr. *Tfl*, *Pwo*, *Tth*, *Taq*). Velika omejitev reakcije je tudi lovečki faktor, saj se mnogokrat odločimo za napovedno izbiro sond, za etničnih oligonukleotidov ali ostalih reagentov. Lovečki faktor je prisoten tudi pri analizi podatkov in posledi noben pri nepravilni interpretaciji (Valasek in Repa, 2005).

1.3.1 Obratno prepisovanje

Ena večjih omejitev metode PCR je uporaba DNA kot matrice za pomnoščevanje (DNA-polimeraze ne podvojujejo RNA). To pomanjkljivost lahko rešimo z uporabo encima reverzna transkriptaza, ki RNA prepiše v stabilnejšo, komplementarno cDNA, ki jo nato kot matrico uporabimo v reakciji PCR. Reverzna transkriptaza je od RNA odvisna DNA-polimeraza, ki enoverificno RNA prepisuje v enoverificno DNA. Encim ima dvojno aktivnost, in sicer DNA-polimerazno aktivnost ter ribonukleazno aktivnost (razgradnja RNA po prepisu v cDNA). Obratno prepisovanje lahko poteka z naključnimi za etnični oligonukleotidi, oligo(dT) za etnični ali gensko specifičnimi za etnični oligonukleotidi. Izolirani mRNA se doda poliT za etnični oligonukleotid ter reverzna transkriptaza in ostali za etnični oligonukleotidi, ki jih reverzna transkriptaza pripenja na novo sintetizirano cDNA. PCR v realnem asu, zdravljeno z obratnim prepisovanjem, se imenuje RT-PCR in je trenutno najbolj obutrjeniva tehnika za detekcijo in kvantifikacijo mRNA (Valasek in Repa,

2005). V zadnjih nekaj letih je razvoj novih sond in opreme, ki omogoča detekcijo PCR produktov v realnem asu, privedel do sprejetja metode RT-PCR kot metode za kvantificiranje sprememb izraščanja genov. RT-PCR v realnem asu je postala preferenčna metoda za vrednotenje rezultatov, pridobljenih na podlagi analize mrefin drugih tehnik, ki ocenjujejo spremembe izraščanja genov na globalni ravni (Prediger in sod., 2008).

1.3.2 Sonde za PCR v realnem asu

Sonde so enoverifične molekule DNA ali RNA, ki so označene radioaktivno, z encimi ali s fluorescenčnimi znački. Omogočajo detekcijo komplementarnih sekvenč v mehanizmu ostalih DNA ali RNA molekul. Obstaja mnogo različnih tipov sond, npr. DNA-vezne značke (angl. DNA-binding dyes) (EtBr, SYBR Green I), hidrolizne (5'-nukleazne) sonde, hibridizacijske sonde, molekularna svetila (angl. molecular beacons), sonde Sunrise in Scorpion ter sonde PNA (angl. peptide nucleic acid light-up).

Vsek tip sond ima svoje edinstvene značnosti. DNA-vezne značke se veflejo na mali flleb dvooverifične DNA, kar poveča njihovo fluorescenco v primerjavi z DNA-vezno značko, ki se nahaja prosti v raztopini (npr. na DNA vezan SYBR Green I oddaja 1000x večjo fluorescenco, kot je prosti v raztopini). V mehanizmu količine dvooverifične DNA v reakcijskih tubicah se vidi fluorescencni signal. Ostale, za dvooverifično DNA specifične sonde, so BEBO, YOYO-1, TOTO-1, ecc. Slaba stran uporabe teh sond je slaba specifičnost, saj je vezava sonde na DNA nespecifična in lahko zaznavamo nespecifične produkte in dimere za etničnih oligonukleotidov (Wong in Medrano, 2005).

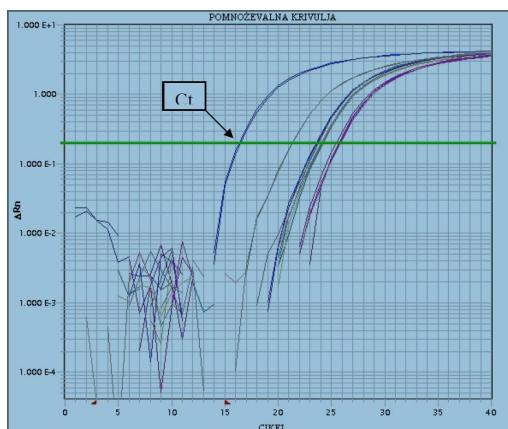
Specifičnost metode lahko izboljšamo z uporabo hidroliznih ali 5'-nukleaznih sond (tako se imenujejo zaradi aktivnosti 5'-eksonukleaze DNA-polimeraze, ki cepi sondi). Hidrolizne sonde so sekvenčno specifične oligonukleotidi, ki imajo na svojem 5'-koncu vezano reporterko značko, na 3'-koncu pa dvojilno značko. Ko sta reporter in dvojilec blizu skupaj (oba vezana na isti kratek oligonukleotid), dvojilec absorbira signal reporterja (prenos energije FRET, angl. Förster type of energy transfer). Ko pride po denaturaciji DNA do vezave sonde na DNA ter njenega podvojevanja, DNA-polimeraza zaradi svoje 5'-eksonukleazne aktivnosti z oligonukleotida odcepi najprej dvojilec, v nadaljevanju reakcije se razgradi celoten oligonukleotid, na koncu pa se z DNA sprosti reporterka značka. Posledica tega je naraščanje fluorescence reporterkega barvila, ki odraža specifično podvojevanje DNA. Primeri reporterkih sond so TAMRA, DABCYL, BHQ, dvojilnih sond pa FAM, VIC, NED, itd. (Valasek in Repa, 2005).

Obstajajoči druge variacije sond z reporterjem in dvojilcem, kot so molekularna svetila, sonde Sunrise in Scorpion. Njihovo delovanje temelji na enakem principu kot hidrolizne sonde, torej da sta reporter in dvojilec združena in se ločita le med amplifikacijo, ko reporter odda fluorescencni signal (Ma in sod., 2006).

1.3.3 Metode za obdelavo rezultatov

S PCR v realnem asu v vzorcu podvojujemo specifično tarčno sekvenco DNA, kopiramo pa spremljamo z merjenjem fluorescence. Ko fluorescencni signal barvila doseže pravljno stopnjo, to lahko poveflemo s količino tarčne sekvence, kar omogoča kvantifikacijo.

DNA. Prafni cikel oz. stopnja (angl. threshold cycle) je cikel, pri katerem R_n (intenziteta fluorescenčne sevanje barvil) presefle nastavljeni prag (slika 2). Vrednost C_t je obratno sorazmerna za etni koli in tar ne cDNA in jo lahko uporabimo za izračun absolutne (dejansko -tevilo kopij cDNA v vzorcu ali absolutna kvantifikacija) ali relativne koli in razlike v izraščanju gena med dvema vzorcema, t.i. fold difference ali relativna kvantifikacija cDNA določenega pomnoščka (Baebler, 2006).



Slika 2: Grafično predstavljen rezultat verifičnega pomnoščevanja DNA v realnem asusu. Na osi x so prikazani zaporedni cikli pomnoščevanja, na osi y pa intenziteta fluorescenčne sevanje barvil (R_n). S C_t je označen prafni cikel (Dušanić, 2007).

Najpogosteje uporabljeni metodi za relativno kvantifikacijo sta metoda standardne krivulje ter primerjalna (komparativna) C_t metoda, uporablja pa se tudi metode Pfaffl, Q-Gene, Gentle, Liu in Saint ter DART-PCR (angl. Data Analysis for Real-time PCR) (Wong in Medrano, 2005). Pri metodi standardne krivulje dobimo z redenjem DNA znanih koncentracij umeritveno krivuljo, ki jo uporabimo kot referenco za določitev koncentracij DNA v vzorcu. Model Pfaffl zdrusluje kvantifikacijo gena in normalizacijo v enem izračunu. Metoda Q-Gene izračuna povprečje normaliziranega izraščanja genov s standardno napako, z uporabo dveh različnih matematičnih modelov. Liu in Saint sta razvila sigmoidni matematični model za kvantifikacijo in normalizacijo izraščanja genov. Podobno kot metoda Gentle, tudi ta metoda izračuna inkovitost pomnoščevanja iz dejanskega naklona pomnoščevalne krivulje in ne standardne krivulje. DART-PCR uporablja preprost algoritem za izračun inkovitosti pomnoščevanja za vsak vzorec posebej. Ti podatki se nato uporabijo za izračun kvantifikacije izraščanja. DART je program, ki hitro iz neobdelanih podatkov izračuna rezultate (Wong in Medrano, 2005; Applied Biosystems, 2008).

1.3.3.1 Primerjalna C_t metoda

S primerjalno C_t metodo primerjamo vrednosti C_t vzorcev, ki nas zanimajo, z vrednostmi C_t v kontrolnem ali kalibratorskem vzorcu (npr. neobdelani vzorci, normalno tkivo). Primerjalna C_t metoda se imenuje tudi metoda [ΔΔCt] (Livak in Schmittgen, 2001).

Razliko v izraščanju določene gena v testiranem glede na kalibratorski vzorec (t.i. fold difference) izrazimo tako, kot to prikazuje ena na sliki.

$$\text{Razlika v izraščanju gena} = 2^{-\Delta C_t} \quad (1)$$

Izračun vrednosti $\Delta\Delta Ct$ prikazuje enačba 2.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{t,vzorec} - \Delta Ct_{t,kalibrator} \quad (2)$$

ΔCt vzorca je Ct vrednost za kateri koli vzorec, normaliziran na endogeni gospodinjski gen, in ΔCt kalibratorskega vzorca je Ct vrednost za kalibrator, prav tako normaliziran na endogeni gospodinjski gen. ΔCt izračuna tako, kot prikazuje enačba 3.

$$\Delta Ct = povprečje Ct_{vzorec/kalibrator} - povprečje Ct_{endogena kontrola} \quad (3)$$

1.4 OCENA INTEGRITETE RNA Z APARATOM Agilent 2100 Bioanalyzer

Ocena integritete RNA je pomemben korak pri pridobivanju podatkov genskega izraščanja, saj delo z nizkokakovostno RNA močno vpliva na vrednotenje rezultatov, pridobljenih s PCR v realnem asusu ali mikromreflami. RNA je v primerjavi z DNA zelo nestabilna in se hitro razgradi z RNazami. Tako posebej so na razgradnjo ob utljivi 10 kb dolgi mRNA fragmenti (Fleige in Pfaffl, 2006).

Kvaliteto oziroma RNA ocenujemo z več parametri.

- odsotnost proteinov (njihovo prisotnost ovrednotimo tako, da izračuna razmerje med absorbancijo pri 260 nm in 280 nm)
- odsotnost genomske DNA
- nerazgrajenost RNA ocenimo iz razmerja med 28S mRNA ter 18S mRNA. Če je razmerje med 1.8 in 2.0 to pomeni, da je RNA nerazgrajena.
- odsotnost snovi, ki so inhibitorji encimov za reakcije RT in PCR. K temu najbolj pripomorejo ustrezne metode izolacije RNA.
- odsotnost substanc, ki bi lahko kompleksirale ko-faktorje, pomembne za reakcijo PCR (npr. Mg^{2+} , Mn^{2+})
- odsotnost nukleaz pri daljšem shranjevanju (Fleige in Pfaffl, 2006)

Kvaliteto oziroma RNA lahko določimo na več načinov: s klasičnim merjenjem absorbance pri 260 nm, z denaturirajočim agarozno gelsko elektroforezo ali preko inovativnih metod »lab-on-chip« kot sta Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, ZDA) in Experion (Bio-Rad Laboratories, ZDA).

Aparat Agilent Bioanalyzer 2100 je bil leta 1999 predstavljen kot naprava za ločevanje vzorcev DNA, RNA in proteinov. Od takrat je vodilna tehnika za analizo RNA vzorcev. Osnovni princip temelji na ločevanju fragmentov RNA na osnovi velikosti, s pomočjo kapilarne elektroforeze. Analizator za vsak vzorec izriče elektroferogram, določi faktor, ki meri kvaliteto RNA, in izračuna delež molekul rRNA v vzorcih mRNA (Toplak, 2006). Z določitvijo RIN se olajša interpretacija rezultatov, omogočena je primerjava vzorcev in ponovljivost (Fleige in Pfaffl, 2006).

2 PREGLED OBJAV

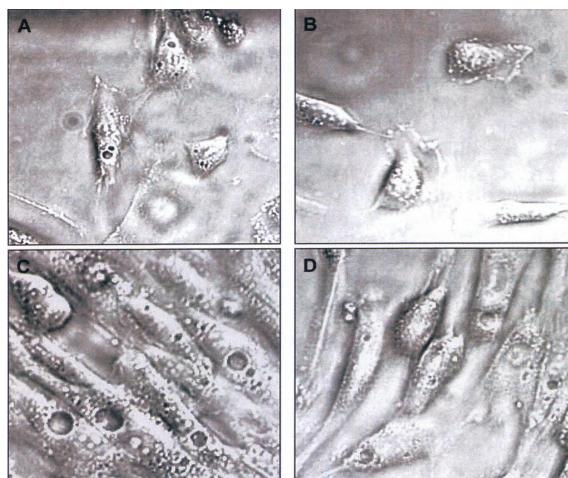
2.1 RAZLIČNI TIPI PLURIPOTENTNIH MATIH CELIC V PERIFERNI KRVI

2.1.1 Multipotentne prednice odraslega (MAPC)

Multipotentne prednice odraslega ali MAPC (angl. Multipotent Adult Progenitor Cells) so MC, ki krofijo po PK in lahko tvorijo celice vseh zarodnih plasti.

Odkrili so jih leta 2001, ko sta Reyes in Verfaillie poskušala izolirati mezenhimske MC iz lovekega KM. Celice MAPC je mogoče izolirati iz KM, pa tudi iz močilgan in skeletnih mišic (Jiang in sod., 2002). Iz PK so bile izolirane po stimulaciji z GM-CSF. MAPC se posebej določajo enimi pogoji gojenja diferencirajo v flivne celice, glia celice, hepatocite, kardiomiocite, endotelijalne celice in osteoblaste. Profil genskega izraflanja MAPC se delno prekriva z genskim profilom flivnih in embrionalnih MC, kar dokazuje njihov primitiven, nedoločen fenotip. Loveke celice MAPC kažejo visoko telomerazno aktivnost ter se intenzivno delijo v pogojih gojenja *in vitro*. Izraflajo za pluripotentno stanje značilne transkripcijske faktorje Nanog, Oct3/4, Sox-2, c-Myc in Klf4 ter -tevilne antogene, ki so značilni za mezenhimske MC. Ne izraflajo označevalcev hematopoetskih matih celic in celicnih linij KM (CD34+, c-kit+ (CD117+), CD45-, MHC-I- in MHC-II-negativne in Flk1- (VEGFR2), Sca1-, CD44-, CD13- in Thy-1- (CD90+)). Mišične MAPC izraflajo tudi antigen SSEA1 (angl. Stage Specific Embryonic Antigen-1), ki ga ponavadi povezujemo z EMC (Reyes in sod., 2001, 2005; Schwartz in Verfaillie, 2005; Serafini in sod., 2007). Ravni mRNA za CXCR4 so pri MAPC znatno nižje kot pri ostalih celicah KM, ki se nahajajo v PK, kar poslabša sproščanje celic v PK pod vplivom G-CSF in dodajanjem antagonistov CXCR4. Celice MAPC nimajo receptorjev VEGF2 in se ne odzivajo na VEGF. Izraflajo pa IGFBP5, ki v kombinaciji z inzulinom podobnim rastnim faktorjem 1 (IGF-1) in 2 (IGF-2) pospešuje migracijo nediferenciranih mezenhimskih celic. MAPC izraflajo adhezijske molekule integrin-3, integrinu sorodni ITGBL1, VCAM, L1CAM in OBCAM, ki lahko te celice zadržujejo v nizah KM in otefijo izplavljanje v PK (Cesselli in sod., 2009).

MAPC so potajoče ne-hematopoetske celice s širokim diferencijskim potencialom, ki so v osebku prisotne od embriogenze do odraslega stanja ter enako kot EMC izraflajo gene, povezane s samoobnavljanjem in multipotentnostjo (Cesselli in sod., 2009). Celice MAPC po presaditvi *in vivo* potujejo do ciljanega mesta, se vključijo v parenhimo in pridobijo strukturno in funkcionalno identiteto celic, potrebnih za regeneracijo (Reyes, 2005).

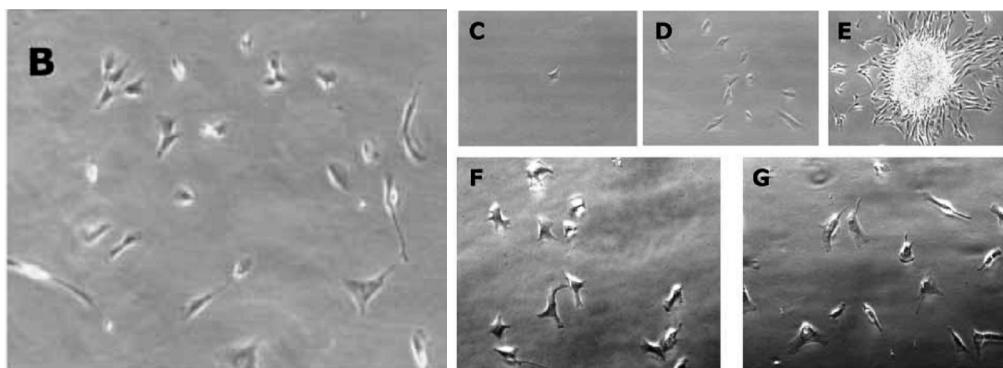


Slika 3: Celice MAPC v kulturi. Po 15-dnevnih podvojitvah (A) in 53-dnevnih podvojitvah (B), gostota celic je bila med 2000 in 8000 celic/cm². Celice MAPC gojene v 10-odstotnem zarodnem tele jem serumu (FBS) (C) in pri gostoti, večji od 10 000 celic/cm² (D) (Reyes in sod., 2001).

2.1.2 Celice MIAMI

Celice MIAMI (angl. Marrow-isolated Adult Multilineage Inducible Cells) so prvi izolirali leta 2004 iz lovečkega KM. D'Ippolito v svojem lanku omenja, da so celice MIAMI lahko izolirane tudi iz mobilizirane periferne krvi in medeni ne kosti. Celice MIAMI so adherentne, velike od 7-10 µm, imajo malo citoplazme in se hitro delijo. Morfologija celic ostaja enaka tudi po več kot 50 podvojitvah (slika 4). *In vitro* se celice MIAMI lahko diferencirajo v celice vseh treh zarodnih plasti – osteoblaste, adipocite, flivne celice in celice, ki izraflajo označevalce pankreatičnih otočkov. Celice MIAMI so izolirali s posebnimi pogoji gojenja iz različno starih prostovoljcev (3-72 let), uporabili so EMC substrat, nizki tlak kisika, dodatek rastnih faktorjev in vitaminov, ustrezno gostoto celic ter jih gojili v sokulti z drugimi celicami. Z vsemi temi pogoji so poskušali imeti bolj posnemati nič mirokuljka, v kateri so priakovani, da se primitivne celice nahajajo. Pred izolacijo niso izvedli nobene frakcionacije KM, ker so predpostavili, da bi s frakcionacijo uničili nič mirokuljka, v kateri se MC nahajajo (D'Ippolito in sod., 2004).

Nediferencirane celice imajo veliko potentnost in izraflajo označevalce, značilne za EMC kot tudi za linije, ki izhajajo iz mezoderma, ektoderma in endoderma. Celice MIAMI so pozitivne za naslednje označevalce: CD29, CD49e, CD63, CD81, CD90, CD122, CD164, CNTFR, c-Met, NTRK3, BMP-receptor 1b, Oct-3/4 in SSEA-4, negativne pa so za: CD36, ICAM-1 (CD54), N-CAM (CD56), CD109, CD34, CD45, CD117 in HLA-I ter HLA-II. Vse kolonije celic MIAMI imajo visoko telomerazno aktivnost. Avtorji kot kombinacijo označevalcev za izolacijo celic MIAMI predlagajo vse zgoraj naštete pozitivne označevalce (D'Ippolito in sod., 2006).



Slika 4: Celice MIAMI. (B) Celice MIAMI so velike od 7-10 μm , imajo malo citoplazme in se hitro delijo. Celice MIAMI nasajene pri nizki gostoti ($0.1\text{-}0.2 \text{ celic}/\text{cm}^2$) (C) so pustili, da so se namnožile (D) in dosegle velikost 50-100 celic (E). Nato so kolonije izolirali in zopet nasadili pri nizki gostoti celic. Morfologija celic ostaja enaka po 5 podvojitvah (F) in po 52 podvojitvah (G). Velja opozoriti na obliko teh celic, ki ni okrogla! (B,F,G) $20\times$ povečava; (C-E) $10\times$ povečava (D'Ippolito in sod., 2004).

2.1.3 Celice VSEL

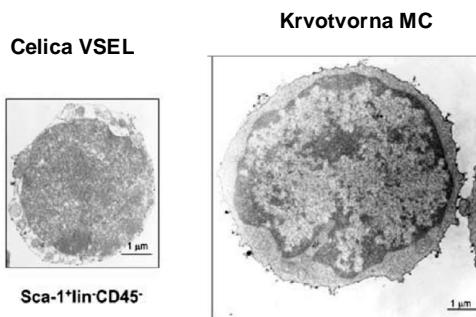
KM vsebuje poleg populacije krvotvornih MC (KMC), iz katerih se razvijejo krvne celice, -e heterogeno populacijo ne-krvotvornih MC, ki se enako kot KMC sprostojo v PK in sodelujejo pri samoobnavljanju MC v ni-jih na različnih lokacijah KM. Te veliko krofle ih ne-KMC se v PK lahko povečajo ob dodatku G-CSF samostojno ali v kombinaciji s komponentami, ki blokirajo receptor CXCR4 (npr. T140 ali AMD3100) (Ratajczak in sod., 2004; Shyu in sod., 2004). Kucia in sod. (2008c) so poročali, da so v mi-jih odraslih tkivih, vključno s KM, odkrili populacijo zelo majhnih, EMC podobnih MC (celice VSEL, angl. Very Small Embryonic-like Stem Cells). Z raziskvami so pokazali, da v ravnotežnih pogojih te celice krofijo v zelo majhnem tevilu tudi po PK ($\sim 100\text{-}200 \text{ celic}/\text{ml}$), vanjo pa se -e dodatno sprostijo ob stimulaciji z G-CSF ali s kemičnim stresom. VSEL so mobilni vir primitivnih MC, ki se lahko sprostijo iz nich MC v PK (Kucia in sod., 2008c). Celice VSEL so majhne ($2\text{-}4 \mu\text{m}$), imajo veliko jedro z neorganiziranim kromatinom, na površini izraflajo specifični embrionalni antigen 1 (SSEA-1), v jedru zgodnja embrionalna transkripcijska faktorja Oct-4 in Nanog. Imajo tudi visoko telomerazno aktivnost in se v *in vitro* pogojih diferencirajo v celice vseh treh zarodnih plasti. Poleg KM in PK, so celice VSEL izolirali tudi iz love-ke popkovni ne krvi, predvidevajo pa, da so prisotne tudi v KM pri novorojenih kih in se sprostojo v kri-kot posledica porodnega stresa (Kucia in sod., 2007). Obstajajo domneve, da je prisotnost različnih populacij MC v KM posledica razvojne migracije MC med ontogenezo in prisotnosti mikrookolja, ki privlači te celice v KM. Celice VSEL imajo vlogo pri ohranjanju homeostaze, ob postopkih kodbi tkiva ali stresu pa se sprostijo v PK in pomagajo pri obnovi po-kodovanega tkiva oziroma organa (Kucia in sod., 2007). Po-kodovano tkivo pospešeno izrafla mnogo potencialnih kemoatraktantov, ki privlačijo MC v obtoku, kot so SDF-1, VEGF, HGF/SF, LIF ali FGF-2 (Ratajczak in sod., 2007b). Sprostoje celice VSEL ob nepravlem asu in zasidranje na mesta, kjer niso potrebne, ima lahko za posledico nastajanje tumorjev (Kucia in sod., 2006b).

V ena raziskav poteka na mi-jih celicah VSEL, nekaj eksperimentov pa je bilo opravljenih tudi na love-keh celicah VSEL iz popkovni ne krvi (Ratajczak in sod., 2006, 2007; Kucia in sod., 2006a, 2006b, 2007, 2007a, 2007b, 2008b, 2008c). V zadnjih letih so

različne raziskovalne skupine odkrile več vrst MC pri odraslih, ki imajo embrionalne lastnosti, vsaka skupina jih pa poimenovala po svoje, mogoče pa je, da gre za iste celice.

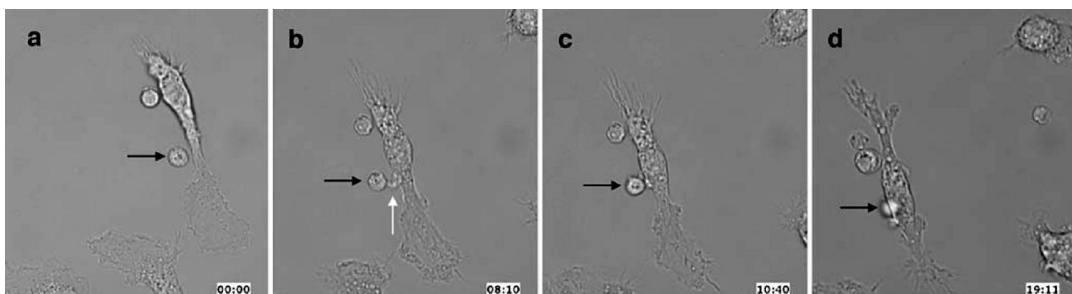
2.1.3.1 Mišične celice VSEL

Lastnosti mišičnih celic VSEL kot jih opisujejo avtorji so naslednje: celice so velike od 2-4 µm, imajo veliko jedro, ki ga obdaja ozek pas citoplazme. V jedru se nahaja evkromatin, ki je znaten za EMC. Ugotovili so, da so celice VSEL v KM prisotne v majhnem deležu, in da njihovo delež upada s staranjem flivali. To se ujema z ugotovitvijo, da je regeneracija v mladih flivalih hitrejša. Celice VSEL so zelo mobilne in se odzivajo na gradient SDF-1 (po-kodovano tkivo izloča razne kemoatraktante poleg SDF-1 tudi VEGF, HGF/SF, LIF in FGF-2): potujejo proti višji koncentraciji SDF-1, ter se pritrjajo na fibroblaste (slika 6), ki izhajajo iz KM. Fibroblasti izločajo SDF-1 in druge kemoatraktante, zato je možno, da ustvarjajo neke vrste nivoje, v kateri se nahajajo celice VSEL. Zaradi povezave med fibroblasti iz KM in celicami VSEL so izolirane stromalne celice iz KM verjetno fleča za etko kontaminirane s populacijo celic VSEL. Avtorji predpostavljajo, da se podobne celice nahajajo tudi v drugih tkivih. Celice VSEL imajo velik razvojni potencial in so sposobne diferencirati v tkiva, ki pripadajo vsem trem embrionalnim plastem (ektoderm, nevroni, mezoderm ali kardiomiociti, endoderm ali celice otočkov trebušne slinavke) (Kucia in sod., 2006a; Jefl, 2008).



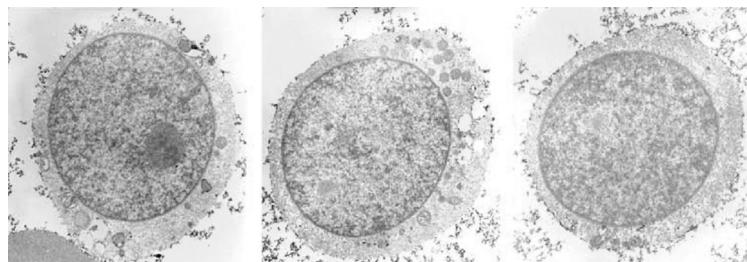
Slika 5: Mišične Sca-1⁺lin- CD45- matice ne celice VSEL in mišične Sca-1⁺lin+ CD45⁺ KMC (TEM) (Kucia in sod., 2006b).

Mišične celice VSEL izraflajo naslednje označevalce: Oct-4, Rex1, Nanog, Dppa3, CXCR4 in Telomerazni protein Rif1. Dokazali pa so tudi, da so pozitivne za nekatere označevalce pluripotentnosti tudi na ravni proteinov: SSEA-1, Oct-4 in Nanog, ne izraflajo pa MHC-I in HLA-DR antigenov in so CD90, CD105 in CD29 negativne (Kucia in sod., 2006b, 2008a; Ratajczak in sod., 2007a).



Slika 6: Celice VSEL so pritrjene na fibroblaste iz KM. Med celicami VSEL in fibroblasti prihaja do interakcij. Fotografije so posnete v razmakih 20 minut. (a) VSEL celica se približa/pritrdi na fibroblast (belo puščica). (b) Fibroblast z neke vrste podaljškom ujame celico VSEL (bela puščica). (c, d) Fibroblastni podaljšek povleče celico blifje in jo namesti pod fibroblast. Zaradi opazovanj, dokumentiranih na zgornji sliki avtorji svetujejo, da je pri eksperimentih s transdiferenciacijo potrebno izključiti možnost kontaminacije preko evane celic ne populacije s celicami VSEL (Kucia in sod., 2008b).

2.1.3.2 love-ke celice VSEL



Slika 7: Transmisajska elektronska mikroskopija: CXCR4⁺ lin- CD45⁻ celice iz love-ke popkovni ne krvi. Premer celic je 3-5 µm, imajo veliko jedro in tanek obod citoplazme, ki vsebuje nekaj mitohondrijev, ribosomov, veziklov in endoplazemski retikulum. Kromatin je v obliki evkromatina (Kucia in sod., 2007a).

love-ke celice VSEL so bile izolirane iz popkovni ne krvi in so dobile ime CB-VSEL. Verjetno je prisotnost celic VSEL v popkovni ni krvi tista, ki je odgovorna za pozitivne rezulante na regeneracijo tkiv po infuziji celic iz popkovni ne krvi. Lastnosti love-kih celic VSEL so enake kot pri miših: so zelo majhne celice, velike od 3-5 µm, imajo veliko jedro z evkromatinom in ozek obod citoplazme. Izraflajo Oct-4 in Nanog ter antigen SSEA-4, negativne pa so za označevalce SSEA-1 (Kucia in sod., 2007a).

2.2 MATI NE CELICE Z VPROTILJIVO PLURIPOTENTNOSTJO V PERIFERNI KRVI

2.2.1 Krvotvorne mati ne celice

Krvotvorne mati ne celice so zelo redki vir nediferenciranih celic, ki se delijo in imajo sposobnost diferenciacije v prednike (progenitor) celice vseh limfoidnih in mieloidnih celnih linij (Lu in sod., 1996). KMC so v KM redke, 1 celica na 10.000 v KM, v PK 1 na 100.000 vseh krvnih celic (Soker in sod., 2008). Vir KMC so KM, popkovni na kri, jetra zarodka in PK odraslih. Hemangioblasti so embrionalni prekurzorji KMC, ki se diferencirajo v krvotvorne prednike celice. Mnoge tudi so pokazale (Dochcera in sod., 2007; Smith, 2003, Thomas in Trancy, 2006), da celice iz KM stalno izplavljajo v PK, presaditve KM pa so pokazale, da je proces lahko tudi obraten in celice iz PK naseljujejo KM (Soker in sod., 2008). KMC so organizirane v kompleksno razvojno hierarhijo. Med seboj se ločijo po potentnosti in tevilnih površinskih označevalcih - CD (angl. Clusters of Differentiation). Najbolj primitivne KMC imajo tudi nekatere značilnosti pluripotentnosti. Zrelejše oblike so sicer sposobne tako samoobnavljanja kot tudi dozorevanja v usmerjene krvne celice, zmanjšana je le njihova sposobnost plastinosti. Tak-ne celice se po več zaporednih delitvah in dozorevanju razvijejo v zrele krvne celice, ki izplavljajo v kri (Strbad, 2004).

KMC izraflajo specifične površinske antogene. Dolgo časa so kot edini označevalci za obogatitev pluripotentnih KMC in njihovih bolj zrelih potomcev navajali CD34. V zadnjem času so pri mihih in ljudeh našli med KMC poleg CD34-poz tudi celice CD34-neg. Nobena od teh populacij ne izrafla antigenov, prisotnih na zrelih krvnih celicah. Dokazano je bilo, da celice CD34-poz lahko prehajajo v CD34-neg in obratno. CD34-neg celice kulturi postanejo antigen CD34-poz, zato domnevajo, da so celice CD34-neg bolj primitivne od CD34-poz, označevalci CD34-poz pa je verjetno aktivacijski antigen, ki vodi v diferenciacijo KMC. Na loveckih KMC so našli tudi antigen AC133 (CD133), ki je skupen obema prej omenjenima podsetoma celic CD34 in tevilne druge antogene. KMC so pozitivne tudi za c-kit, CD 38, CD33, CD133, CD135, CD162, CD164, CD184 (CXCR-4) in CD243 (Cimino in Godia, 2001; Kućin sod., 2003).

2.2.2 Mezenhimske mati ne celice

Mezenhimske mati ne celice so multipotentne celice, ki se lahko diferencirajo v različne mezenhimske celične linije (kostne, hrustanice, maščobe, mišične celice). MMC so bile prvi odkrite v odraslem KM (Friedenstein in sod., 1987; Caplan, 1991) in so bile opredeljene kot osteogenske prednice, zmogljive tvorbe kosti podobnih struktur *in vitro* (Friedenstein, 1976; Owen, 1988). Caplan je opisal, da so MMC tudi prednice maščobnih celic. Nadaljnje raziskave so pokazale, da je MMC mogoče najti v vsakem mezenhiskem tkivu, ki ima sposobnost obnavljanja. Poleg KM so bile MMC izolirane iz mišic, maščobe, kosti, hrustanca, kosti in krvnih filil.

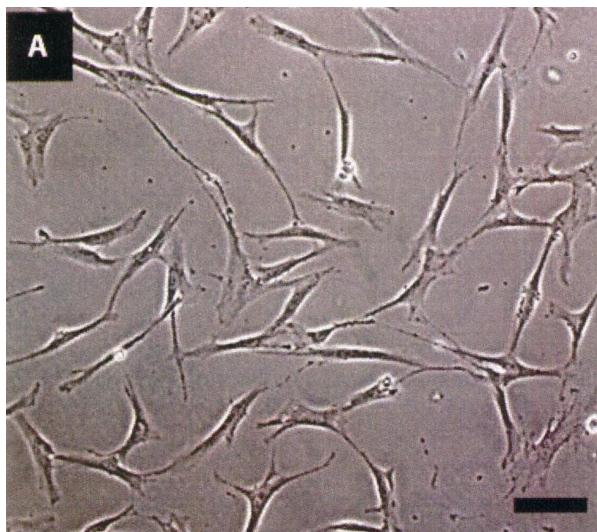
MMC uvrščamo med stromalne celice KM in imajo dvojno vlogo: a) so izvorne celice za ne-hematopoetska tkiva in hkrati b) hrnilne celice za podporo rasti in diferenciacije krvnih

celic in ostalih tkiv, saj sintetizirajo različne komponente zunajceli nega matriksa in različne rastne faktorje. So torej zelo pomembne pri ustvarjanju nih celic KMC, dokazali pa so tudi, da izboljšujejo preflivetje KMC pri presaditvi (Locatelli in sod. 2007). MMC se poleg KM nahajajo tudi v drugih tkivih: popkovni ni krvi, fetalnih jetrih, fetalnih pljučih, amnionski tekočini, periferni krvi, zobe, koflhem tkivu in manj obnem tkivu (Jackson in sod., 2007). Pogostost teh celic pri ljudeh je 1-20 na 100.000 celic (Soker in sod., 2008).

MMC imajo osnovne značilnosti MC, kot so samoobnavljanje, multilinijska diferenciacija, klonalnost (angl. clonality) ter obnavljanje tkiv *in vitro* (Verfaillie, 2002; Roufosse in sod., 2004). Odrasle MMC in KM se delijo skozi mnogo pasafli, ne da bi prele v senescenco. Analiza dolfin telomer v teh celicah je pokazala, da so bile le-te daljše kot pri nevtrofilih in limfocitih, med mladimi in starejšimi darovalci pa se niso razlikovale (Reyes in Verfaillie, 2001). MMC so bile izolirane iz različnih tkiv, vendar pa le nekaj raziskovalcev omenja njihovo pristonost v PK. MMC so bile izolirane iz PK pri osebah, ki so prejemale G-CSF in GM-CSF. V kulturi so te celice kazale fibroblastom podoben fenotip (Fernandez in sod., 1997). MMC so bile izolirane iz PK tudi brez stimulacije z rastnimi faktorji (Zvaifler in sod., 2000).

Pri izolaciji MMC lahko uporabimo več pristopov. Tradicionalno se izkoristi njihova sposobnost adherence na plastiko, s presajanjem celic v kulturi pa se nato zmanjšuje njihova heterogenost (Jackson in sod., 2007). Danes se za izolacijo vedno bolj uporablja označevalce, značilne za ta tip celic. Celice so negativne za krvotvorne označevalce CD14, CD34 in CD45 in pozitivne za tevilne adhezijske molekule, ki vključujejo CD73 (SH3, SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2), CD166 (ALCAM) (Locatelli in sod., 2007). Markerji, ki jih različne skupine raziskovalcev uporabljajo za izolacijo MMC frakcije iz ločenega kostnega mozga, vključujejo poleg zgoraj navedenih še: CD13, CD29, CD31, CD44, CD54, CD63, CD106, CD140b in Stro-1. MMC izraflajo nizko stopnjo HLA molekul razreda I in ne izraflajo HLA molekul razreda II. Primerjava markerjev, ki jih uporabljajo različne skupine, je pokazala, da večina izborov vključuje CD29 in/ali CD105, še vedno pa ni nekega spomenega soglasja o optimalni kombinaciji označevalcev MMC (Jackson in sod., 2007). Kolf in sodelavci predlagajo uporabo Stro-1 označevalca v kombinaciji z drugimi npr. s CD73 in CD106 (Kolf in sod. 2007). Mednarodno društvo za celicno terapijo (angl. International Society for Cellular Therapy, ISCT) predлага tri kriterijev za izolacijo in karakterizacijo MMC: a) adherence na plastiko, b) pozitivni označevalci CD105, CD73, CD90, negativni CD45, CD34 in označevalci za monocite, makrofage in B celice in c) celice morajo biti sposobne diferenciacije v vsaj osteoblaste, adipocite in hondroblaste pod standardnimi *in vitro* pogoji (Kolf in sod., 2007; Jefl, 2008).

MMC so v kulturi vretenaste oblike. Odvisno od tkiva, iz katerega izhajajo in pogojev v kulturi, lahko izraflajo tudi: CD349, SSEA-4, Oct-4, nanog-3 in nestin (Buhring in sod., 2007).



Slika 8: Mezenhimske matne celice v kulturi (Docheva in sod., 2007).

Mnogi opozarjajo, da naini izolacije MMC niso idealni in da je v kulturi –e vedno opaziti heterogeno populacijo celic, in sicer majhne okrogle celice med fibroblastnimi MMC. Zato se pojavljajo dvomi o diferenciacijski sposobnosti MMC in o njihovi domnevni plastinosti (Jackson in sod., 2007).

lovečke MMC tudi po daljšem gojenju v kulturi ohranijo svojo diferenciacijsko sposobnost, so enostavno dostopne in niso eti no sporne, zato so primerne za mnoge aplikacije s področja regenerativne medicine.

2.2.3 Endotelijalne progenitorske celice

Dokaze, da je endotelijalne progenitorske celice (angl. Endothelial Progenitor Cells, EPC) mogoče najti v periferni krvi, sta predstavili dve skupini raziskovalcev na osnovi izraščanja CD34 in drugih označevalcev endotelija na površini celic (Rafii in sod., 1995, Asahara in sod., 2004). Torej EPC v PK se znatno poveča ob akutni po-kodbi fil, angiogenetskih signalov iz po-kodovanega tkiva ter zmanjša ob določenih kroničnih boleznih stanjih (npr. bolezen koronarnih arterij) (Gill in sod., 2001). Krofle EPC izvirajo predvsem iz KM in jih lahko identificirano z diferencialno ekspresijo hematopoetskih in EC označevalcev (Hirschi in Goodell, 2001). Celice EPC sodelujejo pri nastajanju novih krvnih fil. Bolniki z raki imajo v krvi više EPC kot zdravi prostovoljci, kar kaže, da imajo te celice vlogo pri neovaskularizaciji tumorjev (Mancuso in sod., 2001). Tumorske celice izločajo angiogene faktorje in citokine, ki spodbujajo sprostitev, diferenciacijo in integracijo iz KM pridobljenih EPC v krvne file tumorja. Zrele endotelijalne celice se lahko sprostijo iz krvnih fil tumorja v obtok, kjer so nato podvrflene apoptozi (Schuch in sod., 2003; Beaudry in sod., 2005).

V mezenhimske celic EPC se nahaja v KM, kjer so v tesnem stiku s KMC in stromalnimi celicami, ki tvorijo ustrezno mikrookolje. Celice EPC se lahko delijo, migrirajo in diferencirajo v celice endotelijalne linije, nimajo pa –e značilnosti zrelih endotelijalnih celic. Urbich in Dimmeler (2004) sta celice EPC definirala kot neendotelijalne celice, ki kažejo klonalno ekspresijo (sposobnost namnoščevanja posamezne celice), imajo značilnosti matne nosti

(sposobnost podvojevanja in odpornost na stres) in se lahko diferencirajo v endotelijalne celice. Celice EPC, ki se nahajajo v periferni krvi, verjetno izhajajo iz KM in se ne niso vgradile v stene fil. V flivalskih modelih se celice EPC nahajajo na mestih aktivne neovaskularizacije in diferencirajo v endotelijalne celice. Odkritje EPC je pripeljalo do koncepta, da vaskularizacija in angiogeneza lahko potekata simultano v postnatalnem obdobju, saj se lahko celice EPC diferencirajo v vaskularni endotelij (Ribatti, 2007).

Celice EPC izraflajo označevalce CD34 in VEGFR-2 (angl. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2). Tudi AC133, transmembranski glikoprotein z neznano funkcijo, so načeli na celicah EPC, ne pa na zrelih endotelijalnih celicah. AC133 naj bi bil trenutno tudi najboljši selekcijski označevalec za selekcijo celic EPC. Pred kratkim so ugotovili, da celice, ki so pozitivne za CD34 (in AC133 ali CD14) izraflajo tudi Nanog in Oct-4, ki sta označevalca, značilna za EMC. Te populacije celic so se sposobne diferencirati v endotelijalne celice, adipocite, osteoblaste in nevralne celice. Trenutno ni znane označevalce, ki bi bil značilen samo za celice EPC (Ribatti, 2007).

2.3 EMBRIONALNI OZNAČEVALCI

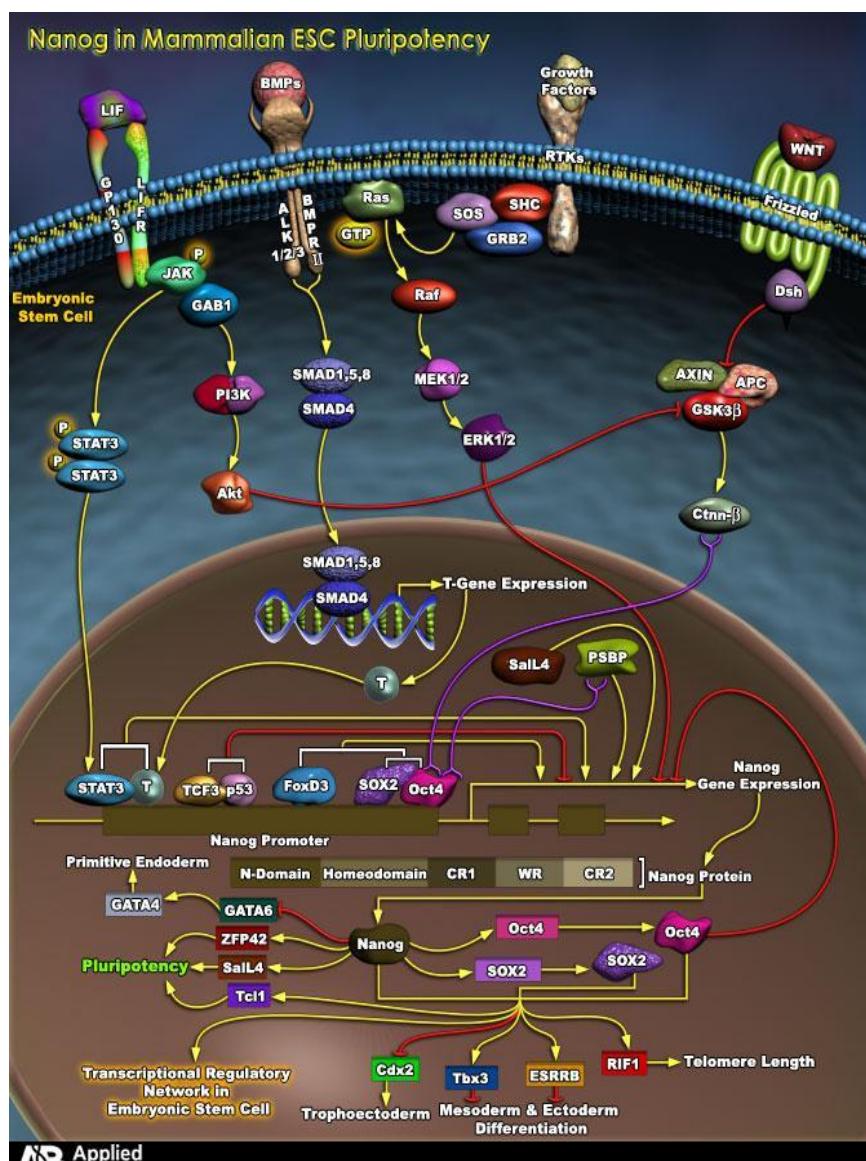
2.3.1 Nanog

Nanog sodi v družino ANTP homeo zaporedje (angl. homeobox) genov in ima pomembno vlogo pri samoobnavljanju in vzdrževanju pluripotentnosti EMC. Družina genov *Nanog* je sestavljena iz gena *Nanog*, podvojenega psevdogenega *NanogP1* in desetih procesiranih psevdogenov. Tako težilo psevdogenov je mogoče pripisati sorazmerno močnu izrafljanju v zarodni liniji (Hyslop in sod., 2005).

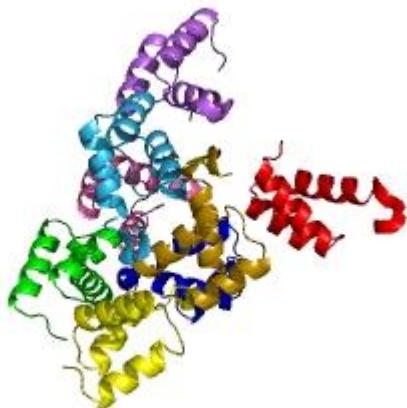
Gen za protein Nanog se nahaja na 12. kromosomu, na lokaciji 12p13.31. Gen *Nanog* se prepisuje pod nadzorom regulatorne regije, ki leži znotraj 332 bp navzgor od začetka transkripcije. Ta regija vsebuje Oktamer in SOX elemente, ki so zelo ohranjeni med 5'-robnimi območji mi-jih, opijih in love-kih *Nanog* genov (Booth in Holland, 2004). Protein se nahaja v jedru EMC in embrionalnih karcinomskeh (EC) celic in je sestavljen iz 305 aminokislín. Ima tri funkcionalne domene - s serinom bogato N-terminalno domeno, centralno homeodomenu in C-terminalno domeno. C-terminalna domena je naprej razdeljena v ponovitve triptofanov (8x ponovitev W-X-X-X motiva, kjer W predstavlja triptofan, X pa katerakoli aminokislina) ter na regiji, ki se nahaja na zgornji (CD1) in spodnji (CD2) strani motiva. Triptofanska in kislota CD2 regija kaže na to, da ima Nanog močno transaktivacijsko aktivnost (Jauch in sod., 2008).

Nanog ima omejen vzorec izrafljanja. Pri razvoju embria se začne izraflat v notranjih celicah morule, pred tvorbo blastociste, nato pa njegovo izrafljanje omejeno na znotrajceli no maso blastociste (Booth in Holland, 2004). Po implantaciji embria izrafljanje gena *Nanog* ni več zaznati do 6. dneva embrionalnega razvoja, ko se začne *Nanog* ponovno izraflat v proksimalnem epiblastu (Rodda in sod., 2005). Gen *Nanog* se močno izraflja tudi v EMC, EC celicah ter tumorjih zarodnih celic. Izrafljanje gena *Nanog* se zmanjša med diferenciacijo, isto tako celice tudi izgubijo pluripotentnost. V celicah EC je zmanjšano izrafljanje posledica sekvenčne metilacije otočkov CpG v promotorski regiji genov *Nanog* in Oct-4 (Hyslop in sod., 2005).

Nanog je najpomembnejši regulator, potreben za vzpostavitev in vzdrževanje fenotipa EMC, eprav mehanizem, preko katerega Nanog regulira pluripotentnost MC, ni popolnoma znani. Nanog regulira izrafljanje tarih genov z vezavo na TAAT(G/T)(G/T) motiv v promotorskih elementih tarih genov (Jauch in sod., 2008). Nanog regulira pluripotentnost MC kot represor transkripcije genov, ki so pomembni za diferenciacijo celic (Gata4, Gata6) (Liu in sod., 2004). V nediferenciranih love-kih EM celicah je približno 352 genov, povezanih z Oct-4, Nanog in Sox-2 hkrati, njihovo izrafljanje pa je lahko spodbujeno ali zavrnjeno (Hatano in sod., 2005; Mitsui in sod., 2003; Suzuki in sod., 2006). Sposobnost proteina NANOG, da ohranja identiteto EMC brez navadno obveznih LIF in BMP/GdF (Growth Differentiation Factor) signalov, postavlja NANOG na vrh faktorjev, odgovornih za vzdrževanje lastnosti samoobnavljanja in pluripotentnosti. Visoke ravni proteina NANOG v celici so ključne za samoobnovno ES celic, vendar pa izmerno izrafljanje Nanog povzroča njihovo diferenciacijo (Chambers in sod., 2003).



Slika 9: Vloga Nanog pri vzdrževanju pluripotentnosti EMC (Nanog in Mammalian ESC Pluripotency, 2009).



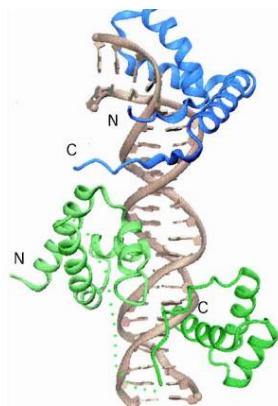
Slika 10: Kristalna struktura homeo zaporedja Nanog (Jauch in sod., 2008)

2.3.2 Sex Determining Region Y-box 2 (SOX-2)

Sox-2 je transkripcijski faktor, ki ima pomembno vlogo pri vzdrfovanju samoobnavljanja nediferenciranih EMC. Sox-2 je lančan družine SRY-related HMG-box transkripcijskih faktorjev, ki sodelujejo pri regulaciji embrionalnega razvoja in določevanju celin neusode. Veflejo se na DNA (motiv CATTGTT) in tvorijo trojni kompleks s proteinom Oct-4 in oja evalnim elementom ter nega gena ter regulirajo njegovo izrafljanje (Botquin in sod., 1998).

Sox-2 sodeluje pri vzdrfovanju oz. ohranjanju razvojnega potenciala celic. Izraflja se v nekaj celicah morule (2,5 dan po oploditvi), v znotrajceli ni masi blastociste (3,5 dan po oploditvi), med razvojem zarodka pa tudi v epiblastu, izvenembrionalnem ektodermu, horionu ter anteriornem delu nevroektoderma (Avilon in sod., 2003). Izrafljanje Sox-2 je torej povezano z dele imi se celicami, katerih razvoj -e ni »zapisan« določeni embrionalni plasti, ter prekurzorskimi celicami razvijajo ega se centralnega fličnega sistema (Li in sod., 1998).

Ekspresijski profil Sox-2 je zelo podoben Oct-4 (Liu in sod., 2007). V notranji celi ni masi blastociste se protein SOX-2 nahaja v jedru. Izraflja se tudi v trofoektodermu, le da se tam nahaja v citoplazmi. Protein, prisoten v citoplazmi, je verjetno dolgočivlji maternalni protein (Avilon in sod., 2003). Sox-2 je potreben za vzdrfavanje celic v epiblastu v nediferenciranem stanju, in sicer njegova odsotnost povzroči spremembo identitete, saj se celice diferencirajo v trofoektoderm in izvenembrionalni ektoderm (Avilon in sod., 2003).



Slika 11: Struktura kompleksa Oct1/Sox-2/FGF. Modra barva označuje Sox-2, zelena pa POU domeno Oct1 (Reményi in sod., 2003).

2.3.3 Oktamer-4 (Oct-4)

Oct-4 je eden drugih transkripcijskih faktorjev POU in je eden ključnih regulatorjev pluripotentnosti. Transkripcijski faktorji z domeno POU lahko aktivirajo prepisovanje genov, ki znotraj promotorskih ali ojačevalnih regij vsebujejo oktamerna zaporedja ATGCAAAT (Zangrossi in sod., 2007). Oct-4 je kot lana manjih oktamer-vezavnih proteinov, ki interagirajo z oktamernim motivom v promotorjih in ojačevalcih mnogih genov, prvi opisal Schöler (Schöler in sod., 1989). Ekspresija Oct-4 in njegovo cDNA zaporedje, je bila v odraslem tkivu loveka prvič opisana leta 1992 (Takeda in sod., 1992), kot označevalec pluripotentnosti pri različnih odraslih tkivih pa so ga opisali tudi Zangrossi sodelavci ter Atlasi in sodelavci (Zangrossi in sod., 2007; Atlasi in sod., 2008).

Gen za Oct-4 se nahaja na 6. kromosому, v regiji histokompatibilnega kompleksa. Velik je 7 kb in sestavljen iz 5 eksonov (Takeda in sod., 1992). Na različnih kromosomalnih lokacijah je bilo identificiranih tudi dve psevdogenovi za Oct-4. Njihova vloga pa ni znana, verjetno pa je z epigenetskimi mehanizmi vpletena v regulacijo celih nospecifičnih izrafljanj (Zangrossi in sod., 2007).

Protein Oct-4 je sestavljen iz treh domen: N-terminalne domene, domene POU in C-terminalne domene. Domena POU je sestavljena iz dveh strukturno neodvisnih poddomen; iz 75 aminokislinskih sestavljenih amino-terminalnih specifičnih regij POU in iz 60 aminokislinskih sestavljenih karboksilnih-terminalnih homeodomene. Obe domeni ustvarjata posebne stike z DNA preko strukture vija nica-obrat-vija nica. Domeni sta povezani z gibljivo vezjo iz 15 do 56 aminokislinskih. Regije zunaj domene POU niso odločilne za vezavo na DNA in so slabo ohranjene med različnimi organizmi. N-terminalna domena je bogata s prolinskimi ostanki, medtem ko je C-terminalna domena bogata s prolinskimi, serinskimi in treoninskimi ostanki. Dejavnost C-domene Oct-4 je celih nospecifičnih in je regulirana z oksidativno fosforilacijo, medtem ko N-domena ni. Domena POU Oct-4 služi kot interakcijsko območje za vrsto celih nospecifičnih regulatornih dejavnikov (Babaie in sod., 2007). Izrafljanje Oct-4 je regulirano na stopnji transkripcije preko cis-aktivnih elementov, ki se nahajajo vzdolgi gena Oct-4, in z metilacijo kromatina (Pan in sod., 2002).

Poznamo dve izoformni obliki molekule Oct-4. Oct-4A in Oct-4B imata enako POU DNA-vezno in C-transaktivacijsko domeno ter različni N-terminalni deli. Samoobnavljanje matih celic lahko vzdržuje le Oct-4A (daljša izoforma). Oct-4B verjetno ne deluje kot transkripcijski aktivator (Kotoula in sod., 2008). Oct-4A se moreno izraflja v predimplantacijskem obdobju loveka v vseh jedrih kompaktnega zarodka in v blastocisti, Oct-4B pa se v citoplazmi vseh celic izraflja od 4-celičnega stadija naprej. Oct-4B v citoplazmi verjetno ne vpliva na aktivacijo transkripcije oz. ima druga ne biološke funkcije. Za matinost (angl. stemness) EMC je pomemben samo Oct-4A (se izraflja v lovečkih EMC), ne pa tudi Oct-4B. Ker se Oct-4A izraflja tudi v netotipotentnem trofoektodermu, zigoti ter zgodnjih fazah zarodka, ki so najverjetneje totipotentne, Oct-4A ni primeren označevalec totipotentnosti (Atlasi in sod., 2008).

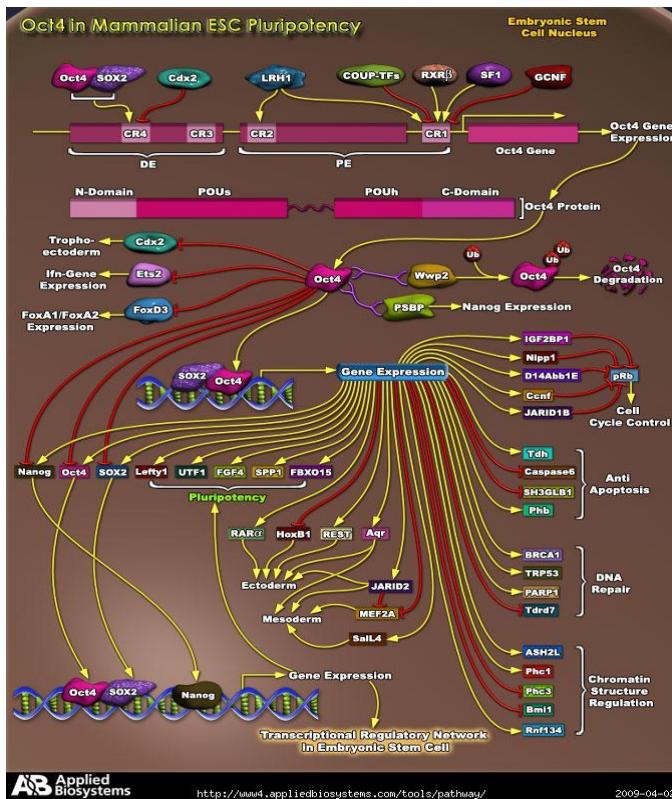
Vzorec izraflanja Oct-4A kaže, da Oct-4A sam ne more vzdrževati pluripotentnosti, lahko pa jo v sodelovanju z drugimi faktorji mati nosti. Najpogosteje-a regulatorja, ki sodeluje z Oct-4 pri aktiviranju Oct-3/4 tar matih genov, sta SOX-2 in Nanog. Oct-4 in SOX-2 se vefle na nekaj tisoč različnih regulatornih območij v genomu EMC, ki vzajemno urejajo prepisovanje POU5F1 in SOX-2 prek Oct4-SOX2 kompleksa v EMC. Poleg tega Oct-4 in SOX2 pozitivno regulirata izrafljanje gena Nanog, kar kaže na to, da je za ohranjanje nediferenciranega stanja EMC odgovorna tesno povezana transkripcijska mreža (Boyer in sod., 2005).

Skupna tar na mesta v regulatornih elementih Oct-3/4, SOX-2 in Nanog so pokazala, da lahko Oct-3/4, SOX-2 in Nanog tvorijo regulatorne povratne mreže, ki ohranjajo pluripotentnost v lovečkih in mišičnih EMC; v tem krogu vsi trije transkripcijski faktorji regulirajo sebe, kot tudi vsak drugega. Eprav Oct-4 ohranja pluripotentnost v kombinaciji z Nanog in SOX-2, gre rahlo preveliko izrafljanje Oct-3/4 sproti diferenciaciji. Prekomerno izrafljanje Oct-4 lahko zavira lastno izrafljanje kot tudi izrafljanje Sox-2 in Nanog. Oct-4 ima lahko vlogo tudi pri regulaciji ekspresije genov v tumorskih celicah (Pan in sod., 2002). Zato je razumevanje funkcij Oct-4 v biologiji matih celic zelo pomembno in lahko vodi tudi do novih metod zdravljenja nekaterih bolezni (Lee in sod., 2006).

Oct-4 lahko transaktivira tar e proksimalno ali na daljavo, odvisno od lokacije vezavnega mesta na tar matih promotorjih. Oct-4 se lahko vefle tudi na oktamerni motiv ATGCAAAT FGF-4 (specifični rastni faktor za mati ne celice) in skupaj s Sox-2 sinergistično deluje na aktivacijo transkripcije (Pan in sod., 2002).

Izrafljanje gena *Oct-4* so izmerili v MC iz različnih tkiv odraslega, npr. v epidermisu (Dyce in sod., 2004; Yu in sod., 2006), bronhialnem epiteliju (Ling in sod., 2006), pankreasu (Kruse in sod., 2006), v MAPC (Zeng in sod., 2006), v subpopulaciji iz kostnega mozga pridobljenih mezenhimskih matih celic (Lamoury in sod., 2006), v celicah MIAMI (D'Ippolito in sod., 2004), CD133+ pluripotentnih progenitorjih iz popkovne krvi (Carlin in sod., 2006) in v CB EMC-podobnih celicah (Kucia in sod., 2007a). Da bi določili zvezo med izrafljanjem Oct-4 in pluripotentnostjo matih celic, je Niwa sodelavci izmerili stopnjo izrafljanja Oct-4 v različnih razvojnih stopnjah embrionalnih matih celic. Njegovi rezultati kažejo, da Oct-4A nadzoruje pluripotentnost MC na nivoju kolikosti oz. koncentracije (Niwa in sod., 2000). Visoke koncentracije izrafljanja Oct-4A povzročijo

diferenciacijo EMC v endodermalne in mezodermalne celi ne linije, MC z nivojem stopnje izrafljanja Oct-4 pa se diferencirajo v trofoektoderm (Pan in sod., 2002).



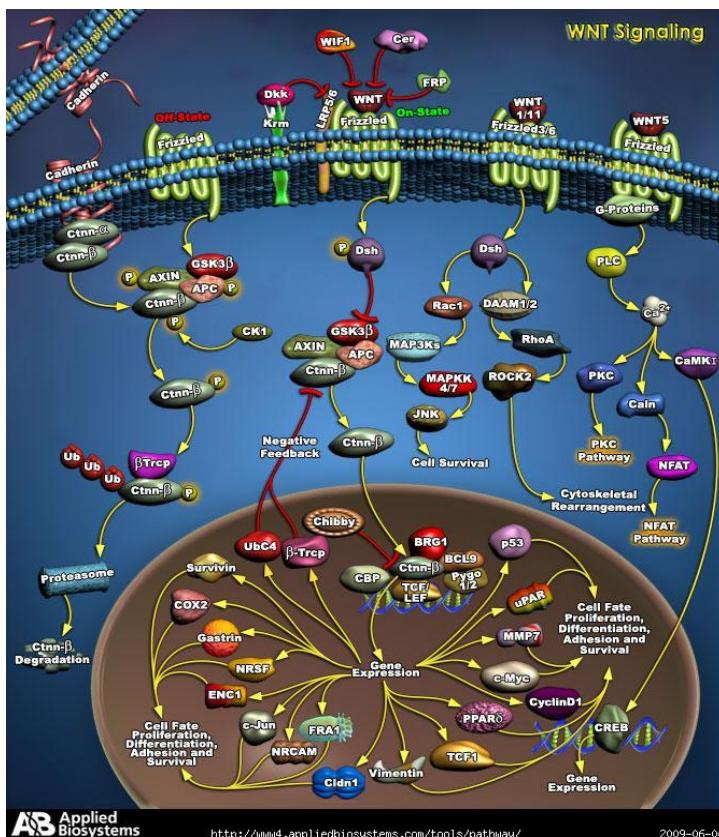
Slika 12: Oct-4 pri uravnavanju pluripotentnosti EMC (Oct4 in Mammalian ESC Pluripotency, 2009).

2.4 SIGNALNE POTI, KI SODELUJEJO PRI VZDRŽEVANJU PLURIPOTENTNOSTI IN SAMOOBNAVLJANJA LOVE™ KIH EMBRIONALNIH MATI NIH CELIC

2.4.1 Signalna pot Wnt

Signalna pot Wnt (wingless in INT) sodeluje pri vzdrževanju pluripotentnosti tako pri love-kih kot mi-jih EMC. Molekule Wnt sodelujejo kot rastni faktorji pri urejanju celi ne usode, proliferacije, migracije, polarnosti, smrti ter vzdrževanju homeostaze. Nepravilna aktivacija poti Wnt je povezana z različnimi tipi raka (Polakis, 2000).

Vezava proteina Wnt na receptorje družine Frizzled na celi ni povročiti sprofil aktivacije proteinov družine Dishevelled ter v koncu fazi sprememb kolikorine transkripcijskega faktorja -katenina, ki potuje v jedro. Dishevelled je ključna komponenta z membrano povezanega Wnt receptorskega kompleksa, ki ob vezavi proteina Wnt inhibira drugi kompleksi proteinov, ki vključuje aksin, GSK-3 in APC (Adenomatozni polipozis coli protein). Ko je kompleks aksin/GCK-3/APC inhibiran, se poveča količina -katenina v citoplazmi. Nekaj ga vstopi tudi v jedro, kjer interagira z drugimi transkripcijskimi faktorji TCF/LEF, ki spodbujajo specifično izrafljanje genov. Vezava Wnt prav tako deluje preko -kateninóneodvisne, nekanonične poti ter ima vlogo pri organizaciji celi ne polarnosti (Okita in Yamanaka, 2006).



Slika 13: Signalna pot Wnt (WNT Signaling, 2009).

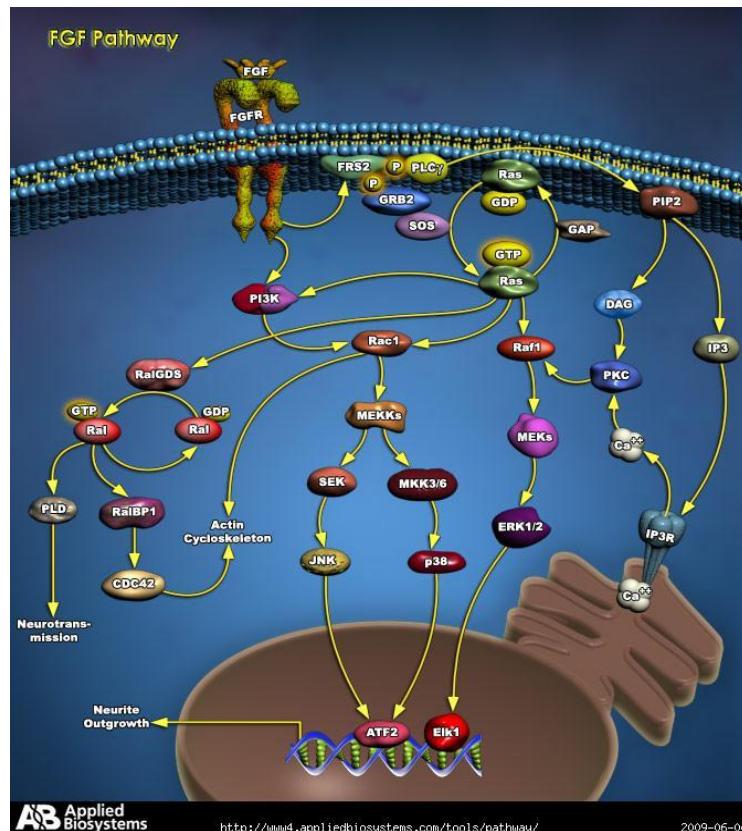
V EMC je signalizacija preko signalne poti Wnt aktivirana endogeno in se zmanjšuje z diferenciacijo. Signalna pot Wnt/-katenin, ki vodi v samoobnavljanje EMC, se ne razlikuje med mi-jimi in love-kimi EMC. Aktivacija signalizacije Wnt lahko zvi-a raven izraflanja STAT3, kar kaže na sinergistični učinek s signalizacijsko potjo LIF-STAT3 (Liu in sod., 2007). Aktivacija poti Wnt s 6-bromoindirubin-3-oksimom (BIO), specifičnim farmakološkim inhibitorjem glikogen sintaze kinaze-3 (GSK-3), lahko vzdržuje nediferencirani fenotip v EMC in ohranja izrafljanje za EMC specifičnih označevalcev (Liu in sod., 2007). Wnt tudi pospešuje proliferacijo MC v intestinalnem, epidermalnem in hematopoetskem sistemu. Wnt lahko olajša diferenciacijo EM celic v nevrone (Okita in Yamanaka, 2006).

2.4.2 Signalna pot fibroblastnega rastnega faktorja

Signalizacija s fibroblastnim rastnim faktorjem (FGF, angl. fibroblast growth factor) ima pomembno vlogo pri preprečevanju diferenciacije love-kih EMC. Opazili so tudi znifikantno izrafljanje avtokrinega faktorja love-kih EMC, FGF2 in FGF12, ob uticaju Oct-4. Nasprotno pa je bilo izrafljanje FGF8 in FGFR1 povezano, kar kaže, da lahko diferenciacija love-kih EMC v liniji trofoblasta vključuje zapletene modulacije signaliziranja FGF.

Proteini FGF se vezajo na receptorje FGFR in aktivirajo mnoge poti signalne transdukcije. Aktivacija FGFR sprostijo fosforilacijo tirozina v proteinu FRS2, kar sprostijo aktivacijo GRB2, SOS, GAB1 in Shp2, to pa aktivira proteine v signalni poti Ras-Raf1-MEK-

MAPK. Aktivacija te signalne poti je bistvena za pravilen razvoj mezoderma. FGF preko poti Shp2-Ras-ERK vpliva na širok spekter bioloških aktivnosti, kot so celi na rast, diferenciacija in morfogeneza (Mansukhani in sod., 2000).



Slika 14: Signalna pot FGF (FGF Pathway, 2009).

Signalizacija s FGF je osrednjega pomena za samoobnavljanje lovečkih EMC, zato jih najpogosteje gojijo v prisotnosti osnovnega fibroblastnega rastnega faktorja (-FGF), na hranilnih plasteh fibroblastov ali pa v fibroblastnem izrabljenem (angl. conditioned) mediju (Liu in sod., 2007). Študije, s katerimi so preverili izrafljanje različnih elementov signalnih poti v lovečkih EMC, so pokazale, da pri tem sodelujejo elementi signalne poti FGF vključno z vsemi tipimi receptorji FGF in nekaterimi sestavnimi deli nadaljnje kaskade. Signaliziranje preko signalne poti FGF je bilo mogoče v nediferenciranih lovečkih EMC v primerjavi s celicami, v katere so se te celice diferencirale (Liu in sod., 2007). Med tipimi receptorji FGFR je izrafljanje FGFR1 najbolj močno v nediferenciranih lovečkih EMC (Dvorak in Hampl, 2005).

Ob utikanju Oct-4 z uporabo molekul siRNA so opazili znifikano izrafljanje avtokrinega faktorja lovečkih EMC FGF2 in FGF12, medtem ko je bilo izrafljanje FGF8 in FGFR1 povezano. To pomeni, da diferenciacija lovečkih EMC v linije trofoblasta vključuje modulacije signaliziranja FGF. Pomembno je, da je potencialno vezno mesto za NANOG prisotno v promotorju FGF8 (Babaie in sod., 2007).

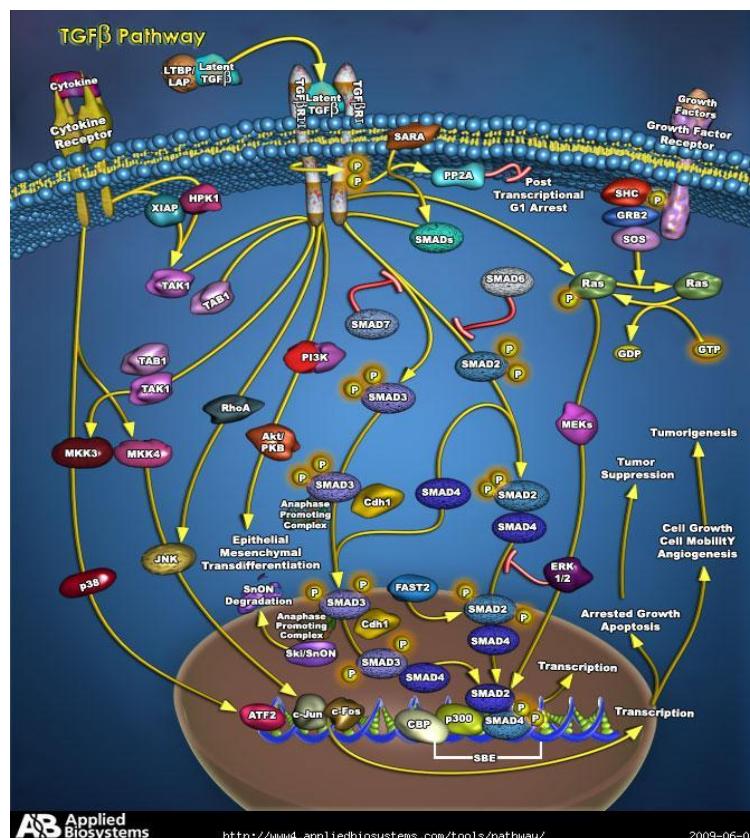
V mediju brez seruma in dodatka -FGF je prioritetno do diferenciacije EMC, medtem ko je dodajanje -FGF gojiti povzročilo, da so bile celice bolj kompaktne in omogočilo

vzdrflevanje nediferencirane kulture (Amit in sod., 2000). Podrobni mehanizem delovanja -FGF pri vzdrflevanju nediferenciranega stanja v EMC je še ni znani (Liu in sod., 2007).

2.4.3 Signalna pot TGF /BMP

Transformirajoči rastni faktor beta (TGF β , angl. transforming growth factor beta) je eden superdržavljivih rastnih in diferenciacijskih dejavnikov. Družina vsebuje več kot 40 molekul, vključno z TGF β , Aktivini, Nodalni in kostnimi morfogenetski proteini (BMP). Aktivini so vpletjeni v embriogenezo in osteogenezo ter regulirajo mnogo hormonov. Stimulacija celic preko TGF β vodi tako do pozitivne kot negativne regulacije izraščanja stotin različnih genov. Aktivacija in zaviranje je regulirano preko istega seta proteinov Smad. Smad vpliva na tarene gene preko različnih transkripcijskih ko-aktivatorjev in ko-represorjev, ki povzročajo ijočen odgovor na signal TGF β (Wrana in sod., 1992).

Signaliziranje se začne z oligomerizacijo, ki jo spodbudi vezava TGF β na heteromerni kompleks serin/treonin kinaznih receptorjev TGF β tipa I ali TGF β tipa II ter fosforilacija citoplazmatskih signalnih molekul Smad2 in Smad3 signalne poti TGF β /aktivin oz. Smad1/5/8 poti BMP. Fosforilacija karboksilnega konca Smad z aktivnim receptorjem, vodi do zdrflevanja s Smad4 in translokacije kompleksa v jedro. Poti aktivin in BMP so inhibirane s signaliziranjem preko MAPK na mnogih stopnjah. Izraščanje inhibitornih Smad6 in Smad7 je preko negativne povratne zanke regulirano s signaliziranjem aktivin/TGF β /BMP. TGF β lahko v nekaterih primerih vpliva na od Smad-neodvisne poti, kot so poti Erk, SAPK/JNK in p38 MAPK (Herpin in Cunningham, 2007).



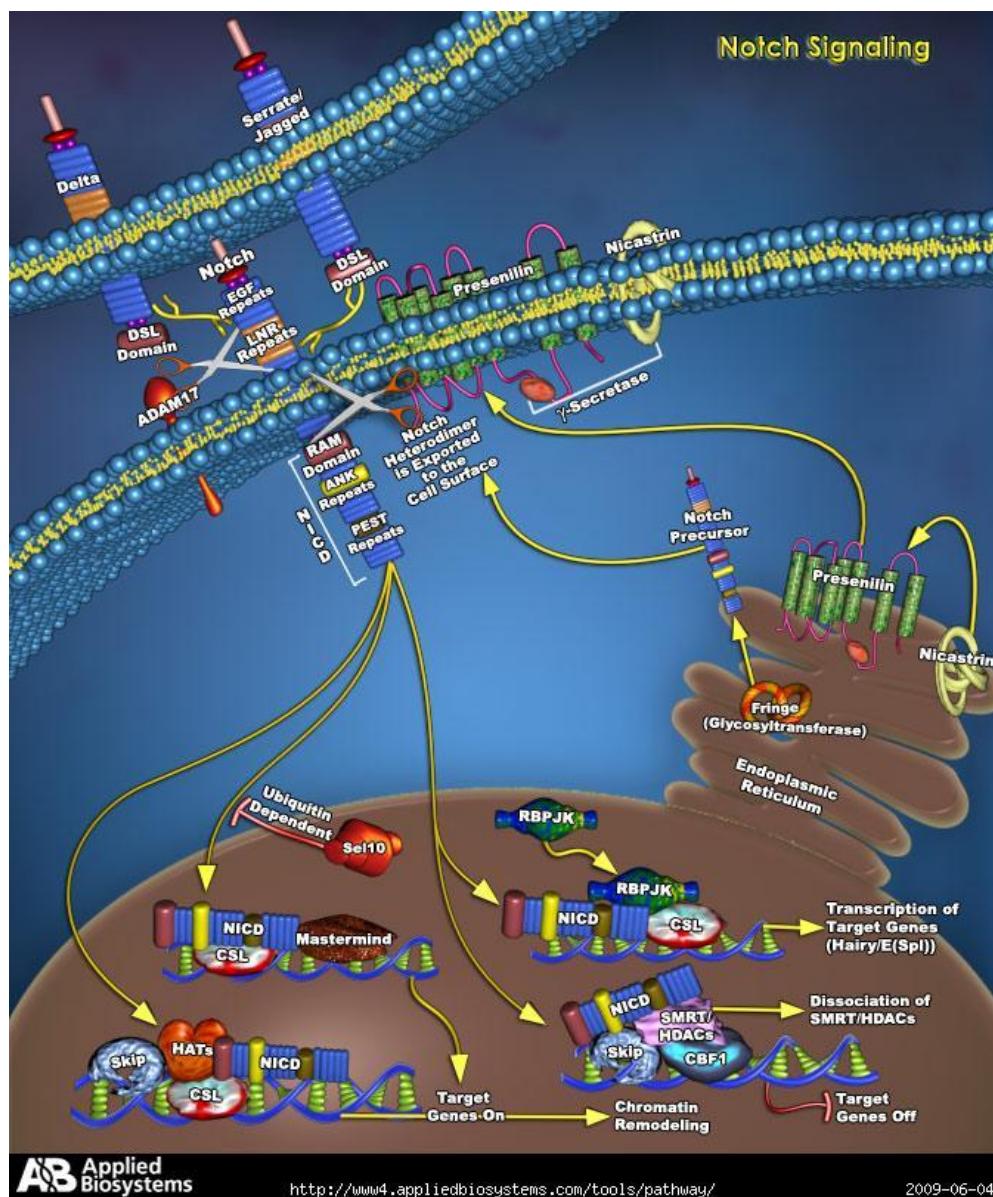
Slika 15: Signalna pot TGF β /BMP (TGF β Pathway, 2009).

Nedavne objave so pokazale, da je signaliziranje TGF /ACTIVIN/NODAL ključno za ohranjanje pluripotentnosti lovečkih MC. Izrafljanje liganda NODAL, njegovega koreceptorja TDGF1 in antagonistov LEFTY1 in LEFTY2 se po uticaju OCT-4 z uporabo siRNA zmanjša. Znislano izrafljanje genov LEFTY1, LEFTY2 in NODAL je lahko posledica tega, da so tare SOX-2/Nanog, ali pa izgube avtokrinega signaliziranja NODAL, ko se lovečke EMC diferencirajo. Utičanje Oct-4 tudi poveča izrafljanje BMP in njegovega tare nega gena ID2 ter zmanjša izrafljanje njegovega antagonista CHORDIN. Te ugotovitve so skladne z opaflanjem, da BMP4 povzroča diferenciacijo v trofoblast v lovečkih EMC (Babaie in sod., 2007). V lovečkih EMC BMP4 povzroča diferenciacijo v mezoderm in ektoderm, medtem ko BMP2 spodbuja diferenciacijo v izvenembrionalni endoderm. Dodajanje antagonista BMP Noggin in visokih odmerkov -FGF v kulturo lovečkih EMC, zmanjša signaliziranje preko BMP ter spodbuja samoobnavljanje EMC v odsotnosti serum in hranilnih celic (Okita in Yamanaka, 2006). Promotor BMP4 ni opredeljen kot tare OCT-4, SOX-2 ali NANOG, kar pomeni, da je njegova ekspresija najverjetneje regulirana posredno (Babaie in sod., 2007).

BMP lahko aktivira progenitorske in MC na območju po-kodbe kosti, stimulira angiogenezo in proliferacijo MC iz okoliškega mezenhimskega tkiva in spodbuja razvoj MC v smeri tvorbe hondroblastov, osteoblastov in osteocitov. BMP sodeluje tudi pri regulaciji drugih bioločkih procesov, ki niso povezani s tvorbo kosti: pri zgodnji embriogenezi vreten arjev - pri indukciji mezoderma, razvoju udov, stimulaciji sinteze proteoglikanov, aktivnosti alkalne fosfataze, sintezi kolagena ter pri hematopoezi (Monzen in sod., 1999).

2.4.4 Signalni poti NOTCH in Hedgehog

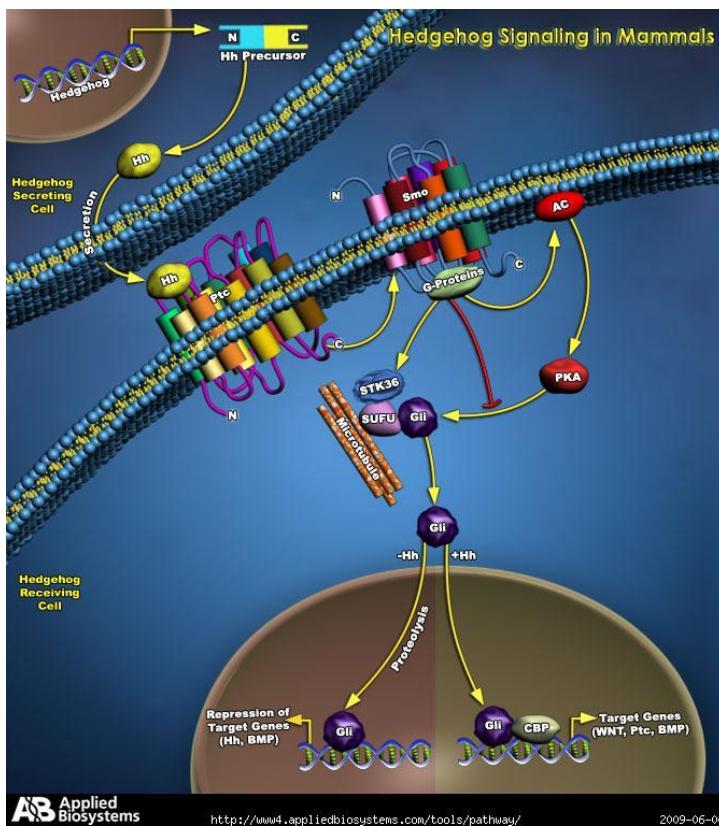
Signaliziranje preko proteina NOTCH poteka preko kaskade proteina NOTCH, ligandov, ki se veflejo nanj, ter znotrajceli nih proteinov, ki prenaročajo NOTCH signal do jedra. Protein NOTCH prebada celično membrano. Na njegovo zunajcelično domeno se veflejo ligandi, kar povzroči proteolitično cepitev in sprostitev znotrajcelične domene proteina NOTCH, ki vstopi v jedro in vpliva na izrafljanje genov (Oswald in sod., 2001). Ker je večina ligandov prav tako transmembranskih proteinov, je receptor aktiviran preko direktnega stika celice s celico (Singson in sod., 1998).



Slika 16: Signalna pot NOTCH (Notch Signaling, 2009).

Analiza komponent poti NOTCH je pokazala, da se z uticanjem izraflanja OCT-4 s siRNA zmanjša izrafljanje CBF2 in poveča regulacija NOTCH2, TLE2, DTX4 in HES1. Ekspresija transkripcijskega represorja TLE2 je regulirana preko NANOG in Sox-2 (Babaie in sod., 2007).

Signaliziranje preko signalne poti Hedgehog se prične ob vezavi liganda Hedgehog na transmembranski protein Patched (Ptc). Ptc deluje kot inhibitor transmembranskega proteina Smoothened (Smo). Navzdol od Smo je multiproteinski kompleks, znan kot Hedgehog signalizacijski kompleks (HSC), ki vključuje transkripcijski faktor Cubitus interruptus, serin/treonin kinazo Fused (Fu), kinezinu podobno molekulo Costal 2 (Cos2) in supresor of fused (Sufu). Cos2 se vefle tudi na protein kinazo A (PKA), protein kinazo CK1 in glikogen sintazo kinazo 3 (GSK3) (Cohen, 2003).



Slika 17: Signalna pot Hedgehog (Hedgehog Signaling in Mammals, 2009).

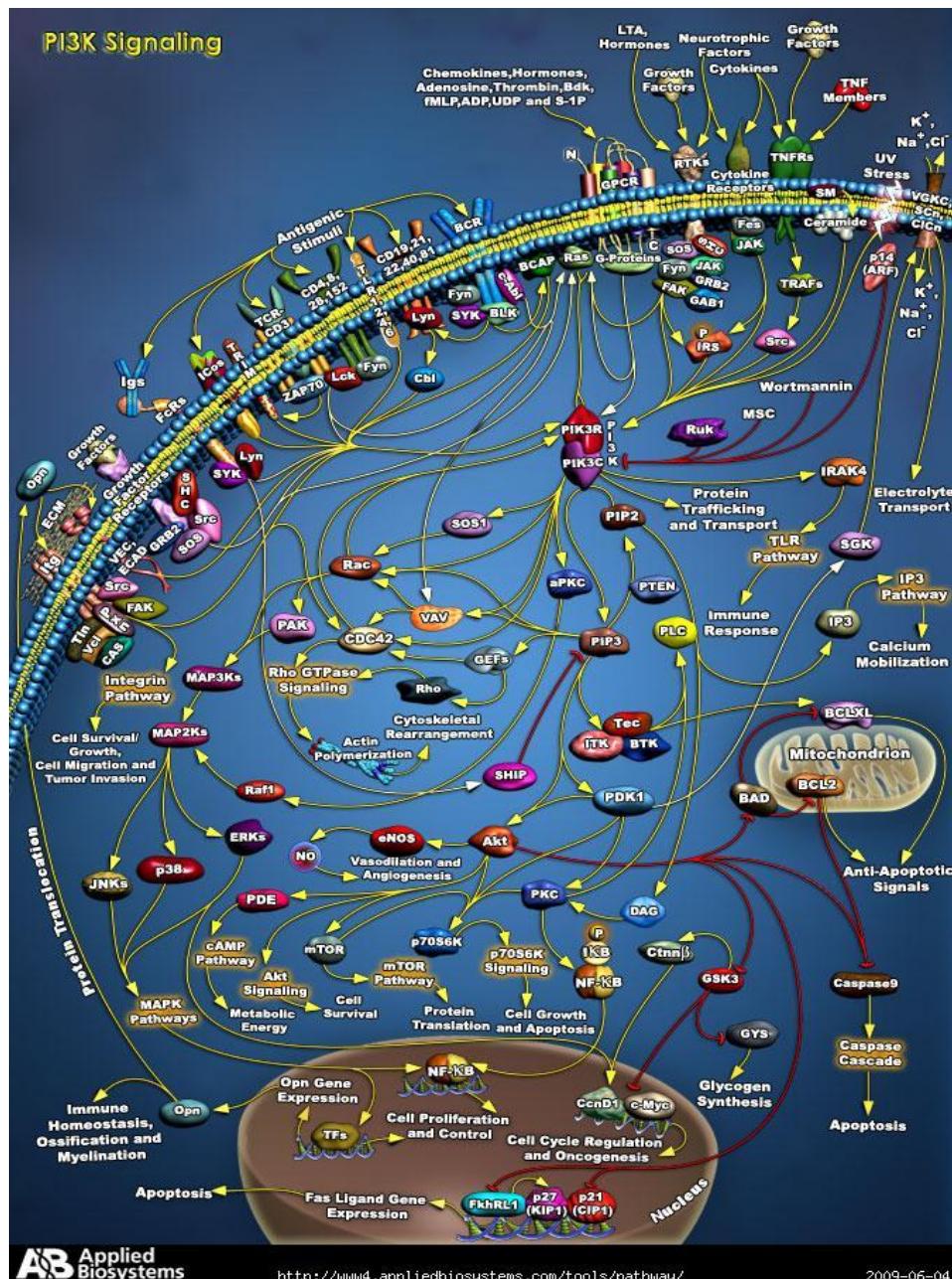
Analiza signalizacijskih komponent poti Hedgehog (Hh) je pokazala, da prihaja do znivljanja ravni izraflanja PTCH1, Hh receptorja, ter SOX2 in NANOG ter Hh-reguliranega transkripcijskega represorja GLI3 (Babaie in sod., 2007).

2.4.5 Signalna pot fosfoinozitid 3 ó kinaze (PI3K)

Signalizacija preko fosfoinozitid 3-kinazne (PI3K) poti je pomembna za proliferacijo, preflivetje in vzdrflevanje pluripotentnosti EMC pri mi-hi in loveku (Okita in Yamanaka, 2006). Signalna pot PI3K/Akt ima vlogo tudi pri zaviranju apoptoze v EMC (Liu in sod., 2007).

PI3K se delijo v 3 razrede. Preferen ni substrat PI3 kinaze razreda I je fosfoinozitid(4,5) bifosfat (PIP2). Fosforilacija PIP2 z PI3K generira PtdIns (3,4,5)P3. PtdIns (3,4,5) in njegovi 5'-defosforilirani produkti PtdIns (3,4)P2 so pomembni sekundarni sporočevalci, ki koordinirajo spodbujanje preflivetje celic, rast, sintezo proteinov, mitozo in presnova. PtdIns(3,4)P2 producira tudi PI3K razreda II iz PtdIns(4)P. PI3K-odvisno aktivacijo poti PDK/AKT(PKB) spodbudi preflivetje celic, mitozo in sintezo proteinov. PI3K razreda II preferen no fosforilirajo fosfoinozitol (PI) in PtdIns(4)P, s tem nastaneta PtdIns(3)P in PtdIns(3,4)P2. PI3K razred III preferen no fosforilirajo fosfatidilinositol (PtdIns), nastane fosfoinositol-3-P (PtdIns(3)P). PtdIns(3)P ima pomembno vlogo pri potovanju vezikov in proteinov po celici.

Signalna pot PI3K/Akt aktivirajo rastni faktorji, ki sodelujejo pri vzdrflevanju pluripotentnosti celic EM (LIF, -FGF) (Jirmanova in sod., 2002; Xu in sod., 2005).



Slika 18: Signalna pot PI3K (PI3K Signaling, 2009).

Transkripcijski faktor Eras je posebej izraffen v EMC in aktivira PI3K, to pa spodbudi proliferacijo EMC (Takahashi in sod., 2003). Aktivnost PI3K je ključna nega pomena tudi za samoobnavljanje EMC (Takahashi in sod., 2005). Ugotovili so, da zmanjšanje signalizacije PI3K in Akt v prisotnosti LIF in hraničnih celic spodbudi diferenciacijo mi-jih in love-kih EMC (Paling in sod., 2004; Kim in sod., 2005). To pomeni, da je signalizacija PI3K/Akt potrebna za vzdrflevanje pluripotentnosti EMC (Paling in sod., 2004). Watanabe in sodelavci so pokazali, da aktiviranje signaliziranja Akt lahko ohranja pluripotentnost mi-jih EMC neodvisno od signaliziranja Wnt/-katenin (Watanabe in sod., 2006).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 CILJI RAZISKAVE

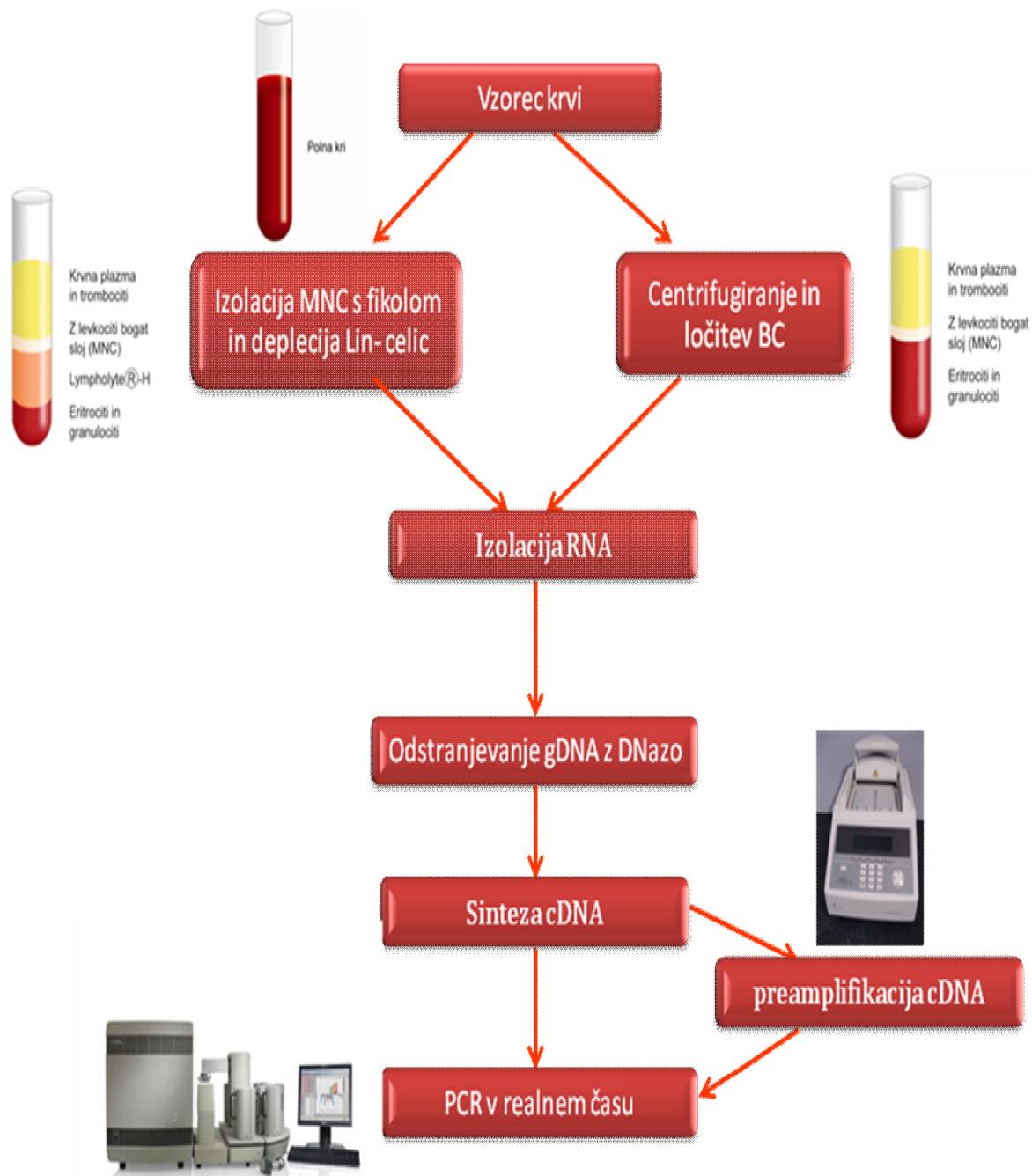
V PK odraslega se nahaja več vrst MC. Zadnje raziskave kažejo, da med njimi obstaja tudi subpopulacija MC z embrionalnimi lastnostmi. Namen dela je bil preveriti, ali lahko z metodo PCR v realnem asu izmerimo izraščanje embrionalnih označevalcev v vzorcih, pripravljenih iz PK. Vzporedno smo fleleli ovrednotiti koli ino ter integrirano RNA v teh vzorcih, ter določiti, ali v procesu izolacije RNA iz vzorcev odstranimo genomske DNA. Ovrednotiti smo fleleli tudi, kako potencialna prisotnost gDNA vpliva na rezultate, pridobljene z metodo PCR v realnem asu.

3.2 DELOVNA HIPOTEZA

Naše delovne hipoteze so naslednje:

- a) z uporabo kompleta RNeasy PLUS Micro Kit (Qiagen) izoliramo iz vzorcev PK zadostne koliine nerazgrajene RNA;
- b) v vzorcu RNA naj ne bi bila prisotna gDNA, v kolikor pa je, bi jo lahko odstranili z DNazo;
- c) je v vzorcih, ki jih uporabimo za določanje izraščanja embrionalnih označevalcev z metodo PCR v realnem asu, kljub vsemu prisotna gDNA, lahko lo imo med signalom z gDNA oz. cDNA;
- d) z metodo PCR v realnem asu lahko v vzorcih, pripravljenih iz PK, izmerimo izraščanje genov, značilnih za EMC;
- e) s pomnolitvijo specifične cDNA lahko poveamo ob utrjivost metode PCR v realnem asu.

3.3 POTEK DELA



Slika 19: Shema poteka dela.

3.4 METODE

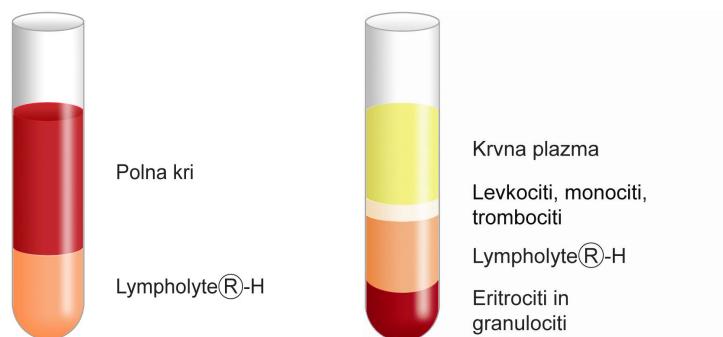
3.4.1 Pridobivanje vzorcev periferne krvi

Vzorci periferne krvi so bili odvzeti v 6 ml epruvete z dodatkom antikoagulanta EDTA. Zdravi prostovoljci so darovali kri na Oddelku za odvzem krvi na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

3.4.2 Izolacija frakcije mononuklearnih celic iz vzorca polne krvi z uporabo fikola

Za izolacijo MNC smo uporabili metodo gradientnega centrifugiranja ter Lympholyte®-H. Lympholyte®-H je ločitveni medij za ločevanje viabilnih limfocitov in monocitov od ostalih komponent krvi v loveki periferni in popkovni krvi. Med centrifugiranjem celice glede na svojo gostoto potujejo različno daleč vzdolgi vertikalne osi raztopine. Eritrociti agregirajo, zato se jim poveča hitrost sedimentacije in se po centrifugiraju nahajajo v peletu na dnu centrifugirke. V peletu se po ločevanju nahajajo tudi granulociti. Limfociti, monociti in trombociti nimajo dovolj velike gostote, da bi penetrirali v plast fikola, zato se po ločevanju nahajajo na meji med plazmo ter fikolom in so vidni kot bel obrok (slika 20). S spiranjem mononuklearnih celic (MNC) nato odstranimo trombocite, ostanke plazme in fikola (GE Healthcare, 2005).

Za izolacijo MNC smo vzorec polne krvi (15 ml) razredili z enakim volumenom PBS. V dve 15 mL-centrifugirki smo s pipeto nanesli 3 mL na sobno temperaturo segretega Lympholyte®-H, natančno pa 6 mL razred enega vzorca polne krvi. Pri tem smo pazili, da nismo premešali faz. Tako pripravljeni centrifugirki smo centrifugirali 30 minut pri sobni temperaturi s hitrostjo $400 \times g$. Po centrifugirjanju smo s pasteurjevo pipeto previdno pobrali celice MNC, ki so se nahajale v sloju med Lympholyte®-H in plazmo, ter jih prenesli v novo centrifugirko. Nazadnje smo celice MNC sprali z PBS tako, da smo vzorcu dodali pufer in centrifugirali 10 min pri $400 \times g$. Vzorce smo hranili pri temperaturi $-80^{\circ}C$.

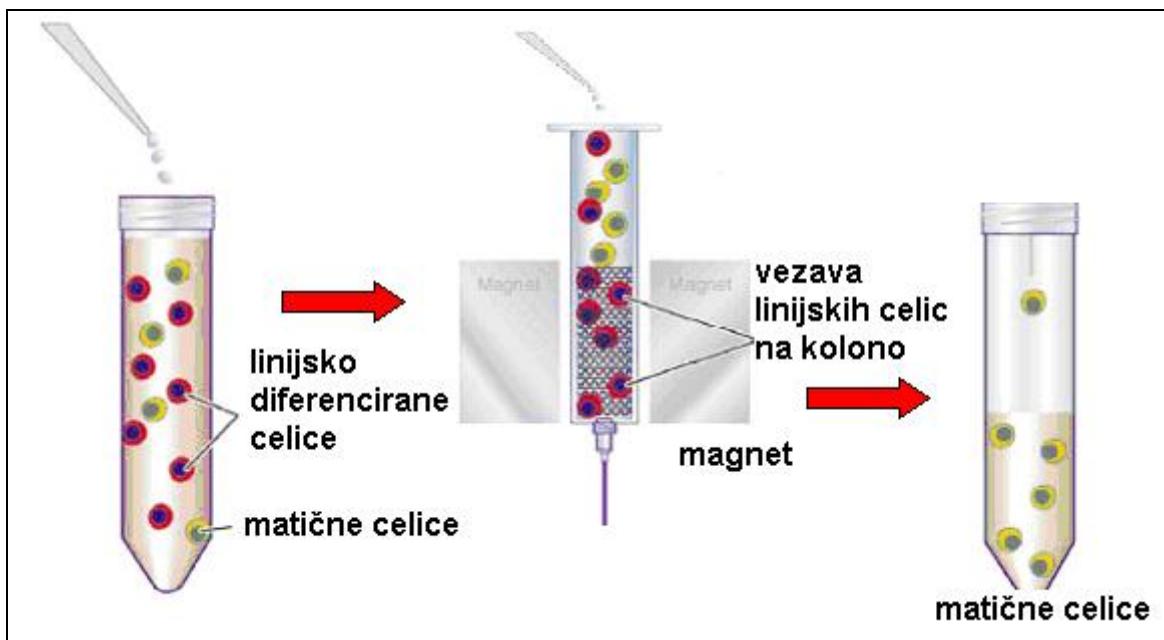


Slika 20: Izolacija MNC z gradientnim centrifugiranjem na fikolu (GE Healthcare, 2005).

3.4.3 Izolacija MC iz vzorca MNC s sistemom StemSep™

Enojedrna frakcija celic kljub ločevanju na fikolnem gradientu ne vsebuje iste populacije MC, pač pa linijsko diferencirane celice (limfocite, monocite, itd.) in samo 3-4% MC

(Strbad, 2004). Ker prisotnost celic, ki niso MC, lahko vpliva na določanje izrašanja embrionalnih označevalcev z metodo PCR v realnem času, smo neflelene linijsko diferencirane celice odstranili s komercialnim kompletom StemSep™ Human Primitive Progenitor Enrichment Cocktail (proizvajalec: StemCell). Ta vsebuje monoklonska protitelesa proti 12 linijsko specifičnim označevalcem na celicah (CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD36, CD38, CD45RA, CD56, CD66b, Glycophorin A) (preglednica 2), ki se vezajo na linijsko diferencirane celice. Na tako označene celice se nato vezajo protimimika IgG, ki imajo naše vezane magnetno koloidne nanopartikle. Ko magnetno skozi magnetno polje, dobimo v frakciji samo linijsko nediferencirane, matične celice (slika 21).



Slika 21: Shematski prikaz ločevanja celic z uporabo kolon v magnetnem polju (StemSep negative selection, 2005). Vsebino centrifugirke nanesemo v kolono, to pa vstavimo v magnetno stojalo. Z batom oz. z ravnako celice potiskamo ali sesamo skozi magnetno polje. Suspenzija, ki pride skozi kolono, vsebuje oziroma ene MC, ki nimajo vezanih protiteles in so uporabne za nadaljnje raziskave.

Preglednica 2: Označevalci CD na celicah, ki jih zazanava komplet StemSepTM (StemSepTM negative selection, 2005)

| Označevalci CD | Celice, ki ga izraščajo |
|----------------|--|
| CD2 | Timociti, T-limfociti, NK-celice |
| CD3 | Timociti, T-limfociti |
| CD14 | Monociti, makrofagi, nevtrofilci |
| CD16 | NK-celice, makrofagi, mastociti, neutrofilci |
| CD19 | B-limfociti, flokularne dendriti ne celice |
| CD24 | B limfociti, granulociti, timociti, epitelne celice |
| CD36 | Trombociti, monociti, makrofagi, eritrocitni prekurzorji, adipociti, nekatere endotelne in epitelne celice |
| CD38 | Eritroidne in mieloi ne celice KM (multipotentne KMC), nezreli B in T-limfociti, NK-celice, monociti |
| CD45RA | Vse krvne celice razen eritrocitov (angl. Leucocyte common antigen) |
| CD56 | NK celice, T-limfociti, najdeni tudi v flivnih tkivih in mišicah |
| CD66b | Odrasli granulociti |
| Gly-A | Eritrociti |

Pred za etkom selekcije celic Lin- smo celice MNC, ki smo jih izolirali z gradientnim centrifugiranjem na fikolu, pre-teli z aparatom Vi-CELL (Beckman Coulter, ZDA). MNC smo ponovno suspendirali v 1 ml PBS tako, da smo dobili 5×10^7 mononuklearnih celic v enem ml raztopine. Tako pripravljenim MNC smo dodali 100 µl koktejla protiteles CD za lovanje (ustrezen volumen protiteles za selekcijo flegeničnih celic smo določili na podlagi izmerjenega -tevila celic v vzorcu) ter me-anico inkubirali 30 min pri sobni temperaturi. Po preteku inkubacijskega časa smo vzorcu dodali z magnetnimi koloidi obloflena protimija IgG protitelesa (60 µl protitelesa v 1 ml celic), vzorec temeljito premeljali ter ponovno inkubirali 15 min pri sobni temperaturi.

Za lovanje linijsko diferenciranih od nediferenciranih celic smo uporabili kolono MS. Vstavili smo jo v magnetno stojalo na ploskoti ter kolono do vrha napolnili z nana-alnim puferom (2% FBS). Pod kolono smo postavili centrifugirko, v katero smo zbirali vzorce. Po akali smo, da je pufer iztekel iz kolone ter zamenjali centrifugirko. Na kolono smo nato nanesli vso suspenzijo mononuklearnih celic ter kolono trikrat sprali s 3 ml nana-alnega pufera. Vse frakcije smo zbirali v isto centrifugirko, ki smo jo označili z Lin-: v tem vzorcu se nahajajo samo linijsko nediferencirane celice. Nato smo zamenjali centrifugirko, iz magnetnega stojala odstranili kolono ter jo dvakrat sprali s 3 ml nana-alnega pufera. Celice, ki smo jih spirali iz kolone v tem koraku, so linijsko diferencirane, poimenovali smo jih Lin+. Sledilo je -e centrifugiranje vzorcev Lin- in Lin+ 7 min pri 400 x g. Supernatant smo odpipetirali, pelet pa raztopili v PBS. Vzorce smo hranili pri -80 °C.

3.4.4 Izolacija RNA iz vzorcev mononuklearnih celic ter celic Lin- in Lin+

Za izolacijo RNA smo uporabili komplet RNeasy® Plus Micro Kit (Qiagen, Nemčija). Izolacija RNA je potekala v centrifugah, ohlajenih na 4 °C, vzorce smo vesas hranili na ledu.

Pred izolacijo smo z aparatom Vi-CELL (Beckman Coulter, ZDA) ocenili, koliko celic se nahaja v vzorcih, saj je od njihovega tevila odvisen volumen kemikalij, ki jih uporabimo za izolacijo RNA.

Vzorce smo najprej centrifugirali 5 min pri 180 x g. Supernatant smo odstranili, pelet pa ponovno suspendirali v 350 µl pufra RLT plus, kateremu smo predhodno dodali -merkaptoetanol (pufer RLT lizira celice, -merkaptoetanol v njem pa denaturira RNaze). Volumen pufra RLT je bil izbran glede na tevilo celic v vzorcu: e je bilo v vzorcu manj kot 5×10^7 celic, smo celice ponovno suspendirali v 350 µl, e jih je bilo več, pa v 700 µl pufra RLT z -merkaptoetanolom. Po dodatku pufra smo vzorce temeljito premešali, nanesli na kolono za homogenizacijo lizata QIAshredder ter centrifugirali 2 min pri polni hitrosti (20000 x g). Homogeniziran lizat smo prenesli na kolono gDNA Eliminator ter centrifugirali 30 s pri $\times 8000$ x g. V tem koraku smo iz vzorca odstranili gDNA, saj se le-ta vefle na kolono. Filtratu smo dodali 350 µl 70-odstotnega etanola, vzorec prenesli na kolono za centrifugiranje RNeasy MinElute in centrifugirali 15 s pri $\times 8000$ x g. V tem koraku se vsa RNA ujame na filter v koloni. V naslednjem koraku smo kolono sprali s 700 µl pufra RW1 (centrifugiranje 15 s pri $\times 8000$ x g), po centrifugiranju filtrat odlili, mikrocentrifugirko pa namestili nazaj na kolono, ki smo jo sprali -e s 500 µl pufra RPE, ki vsebuje etanol. Sledilo je centrifugiranje 15 s pri $\times 8000$ x g. Filtrat smo zavrgli, na kolono nanesli 500 µl 80-odstotnega etanola ter centrifugirali 2 min pri $\times 8000$ x g. Mikrocentrifugirko za zbiranje smo skupaj s filtratom zavrgli, kolono preneseli v novo mikrocentrifugirko ter centrifugirali odprto kolono 5 min pri polni hitrosti. Kolono smo prenesli v novo mikrocentrifugirko za zbiranje, na sredino membrane kolone dodali 30 µl vode brez RNaz, kolono zaprli ter centrifugirali 1 min pri polni hitrosti. Na ta način smo iz kolone sprali RNA. Vzorce RNA smo hranili pri -80 °C.

3.4.5 Izolacija RNA iz frakcije z levkociti bogate krvi

Za izolacijo RNA iz frakcije z levkociti bogate krvi smo uporabili komplet QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAamp, Nemčija) ter komplet RNeasy plus Micro Kit (Qiagen, Nemčija). Izolacija RNA je potekala v centrifugah, ohlajenih na 4 °C, vzorce smo vesas hranili na ledu.

Epruveto s krvjo smo centrifugirali 10 min pri 3000 vrt./min, da se je vzorec ločil na frakcije eritrocitov, z levkociti bogato frakcijo ter frakcijo plazme s trombociti. Previdno smo odpipetirali srednjo, z levkociti bogato frakcijo. Volumen vzorca (800 µl) smo dodali 5-kratni volumen (4 ml) pufra EL, ki lizira eritrocite, ter vzorec 10-15 min inkubirali na ledu. Sledilo je centrifugiranje vzorca 10 min pri 400 x g. Supernatant smo previdno odstranili, pelet, ki je vseboval levkocite, ponovno suspendirali v 2-kratnem volumenu pufra EL (1,6 ml), dobro premešali ter ponovno centrifugirali 10 min pri 400 x g pri 4 °C. Supernatant smo zavrgli, peletu levkocitov pa dodali 600 µl pufra RLT z -merkaptoetanolom. Lizat smo prenesli na kolono QIAshredder iz kompleta RNeasy plus

Micro Kit ter centrifugirali 2 min pri polni hitrosti (20000 x g). Nadaljnja izolacija je potekala enako kot pri toki 3.5.4.

3.4.6 Merjenje koncentracije in integritete RNA

3.4.6.1 Merjenje koncentracije na Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 spektrofotometru

Vraunalni-ki program smo vnesli parametre za meritev RNA. Aparat smo najprej umerili: na konec vlakna optične kabla (sprejemno vlakno) smo nanseli 1 µl vode brez DNaz ter pokrili s pokrovom, v katerem je merilno vlakno. Merilno ročico smo obrisali in na sprejemno vlakno odpipetirali 1 µl vzorca. Raunalni-ki program je analiziral signal iz aparata ter izračunal koncentracijo vzorca, vrednost A260, vrednost A280 ter razmerje A260/280.

3.4.6.2 Merjenje integritete RNA z napravo Agilent 2100 Bioanalyzer

Za določanje kvalitete RNA smo uporabili komplet RNA 6000 Pico LabChip® (Ambion, ZDA).

Po 2 µl vzorecv RNA ustrezne koncentracije (500 pg/µl - 5000 pg/µl) in standarde velikosti RNA 6000 Ladder (Ambion, ZDA) smo denaturirali (2 min, 80 °C), kratko centrifugirali in shranili na ledu. Nato smo pripravili mehanično gela (RNA 6000 Pico Gel Matrix) in barvila (RNA 6000 PicoDye Concentrate) ter jo nanesli na ipu (RNA 6000 Pico LabChip). V vdolbinice za standard velikosti in vzorce na ipu Pico smo najprej nanesli po 9 µl reagenta RNA 6000 Pico Marker in nato v iste vdolbinice nanesli po 1 µl standarda velikosti in vzorcev. ipu Pico smo z vrti enjem premešali in vstavili v aparat Agilent 2100 Bioanalyzer. Podatke smo analizirali s programom 2100 Expert Software (Agilent Technologies, ZDA).

3.4.7 Obdelava vzorcev z encimom DNazo

Uporabili smo komplet Turbo DNA-free (Ambion, ZDA).

Z DNazo smo obdelali RNA vzorcev MNC, EMC 420-P23 in fibroblaste P15. Končna koncentracija RNA v vzorcih je bila 100 ng/µl.

Reakcijsko mehanično smo pripravili tako, kot prikazuje preglednica 3. Mehanično smo inkubirali 30 min pri 37 °C, dodali 10 µl inaktivacijskega reagenta ter inkubirali 2 min pri sobni temperaturi. Med inkubacijo smo vzorec dvakrat kratko premešali. Sledilo je centrifugiranje 1,5 min pri 10000 x g pri sobni temepraturi. Supernatant smo prenesli v sveflo, označeno epico ter shranili pri -80 °C.

Preglednica 3: Izračun koncentracije RNA za nadaljnjo obdelavo z DNazo

| Vzorec | Konc. RNA (ng/µl) | Volumen RNA (µl) | Volumen H ₂ O (µl) | Volumen pufra 10x RT (µl) | Volumen me-anice 5x SS (µl) | Konični volumen (µl) |
|------------------------|-------------------|------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------|
| MNC | 45,1 | 2,2 | 31,8 | 4 | 2 | 40 |
| EMC 420-p23 | 27,1 | 3,7 | 30,3 | 4 | 2 | 40 |
| Fibroblasti P15 | 69,4 | 1,4 | 32,6 | 4 | 2 | 40 |

3.4.8 Sinteza komplementane DNA

Za sintezo cDNA smo uporabili komplet SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, ZDA).

Za sintezo cDNA smo uporabili 100ng RNA. Volumen RNA, ki smo ga uporabili za sintezo cDNA, smo določili glede na izmerjeno koncentracijo RNA v vzorcu. RNA smo dodali vodo do koničnega volumena 28 µl, 4 µl pufra 10x RT ter 8 µl pufra 5xSS. Konični volumen reakcijske me-anice je bil tako 40 µl. Sestava reagentov je predstavljena v preglednici 4.

Preglednica 4: Sestava reakcijskih me-anic za sintezo cDNA

| Reagenti | Sestava |
|-----------------------------------|--|
| 5x VILO reakcijska me-anica | Vsebuje začetne oligonukleotide, MgCl ₂ ter dNTP v pufrski me-anici, ki je optimizirana za qRT-PCR. |
| 10x SuperScript encimska me-anica | Vsebuje encim reverzno transkriptazo, rekombinantni ribonukleazni inhibitor ter lastni helper protein. |

Sintezo cDNA smo opravili s pomočjo aparata za PCR PE7900 proizvajalca Perkin Elmer. Program za sintezo cDNA je prikazan v preglednici 5. Sintetizirano cDNA smo shranili pri -20 °C.

Preglednica 5: Program sinteze cDNA

| Korak | Trajanje in temperatura, pri kateri je potekala reakcija |
|-------------------------------------|--|
| Aktivacija reverzne transkriptaze | 10 min, 25 °C |
| Sintesa cDNA | 60 min, 42 °C |
| Inaktivacija reverzne transkriptaze | 5 min, 85 °C |

3.4.9 Metoda PCR v realnem asu

Metodo PCR v realnem asu smo uporabili za določanje prisotnosti genomske DNA v vzorcih RNA ter za določanje izraflanja označevalcev embrionalnih celic brez oz. s preamplifikacijo cDNA.

Pred analizo PCR v realnem asu smo izolirano RNA prepisali v cDNA, kot je to opisano v poglavju 3.4.8. Za eksperiment določanja prisotnosti gDNA v vzorcu RNA smo RNA tudi predhodno obdelali z DNazo, kot je opisano v poglavju 3.4.7. Za analizo PCR v realnem asu smo uporabili metodo zaznavanja pomoflnih produktov TaqMan®. Zaznavali smo 5 teh nih genov, ki smo jih uporabili bodisi za ugotavljanje prisotnosti gDNA v vzorcu RNA, izrafljanja genov ali za normalizacijo. Gene, katerih izrafljanje smo spremeljali z metodo PCR, smo izbrali glede na podatke iz literature (International Stem Cell Initiative, 2007).

V preglednici 6 so prikazani tar ni geni, katerih izrafljanje smo merili z metodo PCR v realnem asu.

Preglednica 6: Tar ni geni merjeni pri PCR v realnem asu

| Okraj-ava tar nih genov | Uporaba |
|-------------------------|---|
| Cyc C | normalizacija |
| Nanog | izrafljanje genov |
| Oct-4A | izrafljanje genov, prisotnost gDNA v vzorcu RNA |
| Sox-2 | izrafljanje genov |
| RhD | prisotnost gDNA v vzorcu RNA |

Za določanje izrafljanja genov Oct-4A, Sox-2, Nanog ter ciklofilin C smo pri proizvajalcu Applied Biosystems (ZDA) kupili me-anico za etnih oligonukleotidov in sondne TaqMan® Gene Expression Assays. Test vsebuje dva (smiseln in protismiseln) neozna ena za etno oligonukleotida ter sondno TaqMan®. Sonda je ozna ena z reportersko značko FAM (Oct-4A, Sox-2, Nanog) oz. VIC (ciklofilin C) ter drugo značko MGB. V preglednici 7 so predstavljeni testi TaqMan® Gene Expression Assays, ki smo jih uporabili za določanje izrafljanja genov.

Preglednica 7: Uporabljeni testi TaqMan® Gene Expression Assays proizvajalca Applied Biosystems

| Tar ni gen | Oznaka testa |
|--------------|---------------|
| Oct-4A | Hs03005111_g1 |
| Nanog | Hs02387400_g1 |
| Sox-2 | Hs00602736_s1 |
| Ciklofilin C | Hs99999904_m1 |

*Proizvajalec ne daje informacij o sekvenci, ki jo prepozna za etni oligonukleotidi oz. sondne. Predpona Hs pred -tevilko testa pomeni, da je za pripravo za etnih oligonukleotidov in sondne uporabljeni sekvenca lovekega gena (*Homo sapiens*). Kon nici g in s pomenita, da so za etni oligonukleotidi oz. sonda zasnovani tako, da se lahko veflejo tudi na gDNA, kon nica m pa pomeni, da se za etni oligonukleotidi oz. sonda lahko veflejo samo na sekvenco v cDNA.

Pri ugotavljanju kontaminacije RNA z genomsko DNA smo uporabili za etne oligonukleotide ter sondno, ki se veflejo na sekvenco v 4. intronu gena za RhD (T. Dov

Drnovšek, P. Roflman, neobjavljeni rezultati). Njihova sekvenca ter nukleotidno zaporedje so predstavljeni v preglednici 8.

Preglednica 8: Sekvenca smiselnega (F) ter protismiselnega (R) za etnega oligonukleotida ter sonde (S) za 4. intron gena za RhD

| Tar ni gen | Nukleotidno zaporedje |
|----------------|--|
| Intron 4 - RhD | F: 5'-GCCCTTCCATCATGATTCAATT-3' R: 5'-ACAAGGAAACAAAGGCCAAGAG-3' S: 5'-FAM-AAGCACTTCACAGAGCA-MGB-3' |

*Pri sondi je označena tudi reporterska in dualna značka.

Reakcijo PCR v realnem asusu smo izvedli v aparaturi Applied Biosystems 7900HT (Applied Biosystems, ZDA). Končni volumen reakcijske mešanice je bil 20 µl, v njej pa je bilo:

- 10 µl 2x TaqMan Universal PCR Master Mix;
- sonda (končna koncentracija 250 nM) ter za etni oligonukleotidi (končna koncentracija 900 nM);
- cDNA oz. RNA (samo za ugotavljanje prisotnosti gDNA v vzorcih RNA); za različne eksperimente smo uporabili različne količine, ki so navedene v nadaljnjem tekstu);
- ddH₂O do končne volumena 20 µl.

V mikrocentrifugirki smo pripravili izhodiščne zmesi iz TaqMan Universal PCR Master Mix, sonde ter za etni oligonukleotidov oz. testa TaqMan® Gene Expression Assay ter vode. Pripravili smo toliko izhodiščne zmesi, da je bilo dovolj za vse reakcije. Zmehali smo jo z vrtinjenjem ter kratko centrifugirali. V vdolbinice na poličici (96 Well Clear Optical Reaction Plates, Applied Biosystems, ZDA) smo dodali ustrezno količino cDNA ter dodali toliko izhodiščne zmesi, da je bil končni volumen 20 µl. Vsak vzorec smo pripravili v dveh paralelkah. Za vsak gen smo izvedli tudi reakcijo brez cDNA ali v te vdolbinice smo namesto cDNA dodali ddH₂O. Poličico smo pokrili z lepljivo folijo (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems, ZDA), centrifugirali 1 minutu pri 1000 vrt./min ter vstavili v PCR aparaturo. PCR reakcijo smo izvedli pri naslednjih pogojih:

- Aktivacija polimeraze: 2 minuti pri 50 °C, 10 minut pri 95 °C
- PCR: 15 sekund pri 95 °C, 1 minuta pri 60 °C; 40 ciklov

Podatke PCR v realnem asusu smo analizirali s programom SDS 2.1 (Applied Biosystems, ZDA). Program je na podlagi izmerjenega fluorescenčnega signala ter nastavljene bazne linije ter pragu izračunal vrednost Ct. Te vrednosti smo prenesli v program Microsoft Excel ter izračunali povprečne vrednosti Ct. Pri določanju izraščanja označevalcev embrionalnih celic smo izračunali tudi inkovitost pomnoščevanja posameznega gena ter določili relativni nivo izraščanja v vzorcih po metodi ΔΔCt (Livak in Schmittgen, 2001). Kot referenčni gen smo uporabili ciklofilin C, kot kalibratorski vzorec pa vzorec fibroblastov. S programom Microsoft Excel smo izračunali standardne deviacije.

3.4.9.1 Ugotavljanje prisotnosti gDNA v vzorcih RNA, cDNA, sintetizirane iz z DNazo obdelane z RNA in v cDNA, sintetizirane iz z DNazo neobdelane RNA z metodo PCR v realnem asusu

V tem eksperimentu smo fleleli preveriti, ali imamo v vzorcih RNA tudi genomske DNA ter, ali lahko to gDNA odstranimo z obdelavo RNA z DNazo.

Za določanje izraščanja označevalcev smo uporabili RNA, cDNA, ki smo jo sintetizirali iz RNA obdelane z DNazo ter cDNA, katero smo sintetizirali iz RNA, katere nismo obdelali z DNazo, pripravljene iz treh različnih vzorcev: embrionalnih matih celic, fibroblastov ter MNC.

Loveke fibroblaste smo prejeli od dr. Metke Kračne, Zavoda RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana. Nagojene fibroblaste smo v gojilni posodici postregali s strgalom, prenesli v 15 ml centrifugirko, sprali z 10 ml PBS (centrifugiranje 15 min, 1000 vrt./min), supernatant odstranili, pelet pa ponovno suspendirali v 350 µl pufra RLT z -merkaptoetanolom iz kompleta za izolacijo RNA RNeasy® Plus Micro Kit (Qiagen, Nemčija). Nadaljnja izolacija RNA je potekala enako kot pri toki 3.5.4.

RNA, pripravljeno iz embrionalnih matih celic, smo prejeli od Susanne Ström iz laboratorija dr. Outi Hovatta, Karolinska University Hospital, Stockholm, TMVästsvenska.

Uporabili smo tri različne označevalce:

- označevalec, ki prepozna taran no zaporedje v intronu 4 gena za RhD. S tem označevalcem smo zaznali samo gDNA.
- označevalec, ki prepozna taran no zaporedje gena Oct-4A. Sonda oz. nukleotidni zaporedji etniki se lahko veflejo na taran no zaporedje na gDNA ali cDNA.
- označevalec, ki prepozna taran no zaporedje gena ciklofilin C samo v cDNA.

V preglednici 9 so prikazane uporabljeni količine RNA ter cDNA. Poskus smo ponovili trikrat.

Preglednica 9: Količine RNA oz. cDNA, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju prisotnosti gDNA v vzorcih RNA, ter cDNA, sintetizirane iz z DNazo obdelane oz. neobdelano RNA.

| Označevalec | RNA (µl) | cDNA iz z DNazo neobdelane RNA (µl) | cDNA iz z DNazo obdelane RNA (µl) |
|--------------|----------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| RhD | 10 | 10 | 10 |
| Oct-4A | 6 | 2 | 2 |
| Ciklofilin C | 6 | 2 | 2 |

3.4.9.2 Določanje izraščanja označevalcev embrionalnih celic z metodo PCR v realnem asusu

V tem eksperimentu smo določili izraščanje označevalcev embrionalnih celic (Oct-4A, Nanog ter Sox-2). Za določanje ekspresije smo uporabili cDNA, pripravljeno iz RNA, ki smo jo izolirali iz različnih vzorcev: iz frakcije z levkociti bogate krvi, MNC, celic Lin+ ter celic Lin-. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili cDNA, pripravljeno iz RNA

embrionalnih matih celic, kot negativno kontrolo pa cDNA, pripravljeno iz RNA fibroblastov. Uporabili smo 4 µl cDNA, poskus smo ponovili trikrat.

Pri obdelavi podatkov smo kot referenčni gen uporabili *ciklofilin C*, kot kalibratorski vzorec pa vzorec fibroblastov.

3.4.9.3 Določanje izraščanja označevalcev embrionalnih celic s predhodnim pomnoščevanjem cDNA (preamplifikacijo)

V tem eksperimentu smo določali izraščanje označevalcev embrionalnih celic (Oct-4A, Nanog ter Sox-2), vendar smo cDNA, ki smo jo za to uporabili, predhodno namnoščili. Za določanje izraščanja smo uporabili cDNA, pripravljeno iz RNA, ki smo jo izolirali iz različnih vzorcev: iz frakcije z levkociti bogate krvi, MNC, celic Lin+ ter celic Lin-. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili cDNA, pripravljeno iz RNA embrionalnih matih celic, za negativno kontrolo pa cDNA, pripravljeno iz RNA fibroblastov.

cDNA smo pred določanjem izraščanja označevalcev embrionalnih celic namnoščili z uporabo kompleta TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems, ZDA). Pripravili smo me-anico označevalcev Oct-4A, Nanog, Sox-2, ciklofilina C in pufra Tris-EDTA, kot kafle preglednica 10. V naslednjem koraku smo zdrusili TaqMan PreAmp Master Mix, zdruseno me-anico označevalcev in pufra Tris-EDTA ter cDNA kot kafle preglednica 11, ter namnoščili cDNA v PCR aparatu PE9700 (Perkin Elmer, ZDA). Program za preamplifikacijo je prikazan v preglednici 12. Po končani preamplifikaciji smo vzorce prenesli na led, jih razdelili na enake dele ter shranili pri -20 °C.

Preglednica 10: Me-anica označevalcev Oct-4A, Nanog, Sox-2, ciklofilina in pufra Tris-EDTA

| | Volumen (µl) |
|-----------------|--------------|
| Oct-4A | 5 |
| Nanog | 5 |
| Sox-2 | 5 |
| Ciklofilin C | 5 |
| Pufra Tris-EDTA | 480 |
| Končni volumen | 500 |

Preglednica 11: Me-anica reagentov za preamplifikacijo cDNA

| Reagenti | Volumen (µl) |
|--|--------------|
| TaqMan PreAmp Master Mix | 25 |
| Me-anica označevalcev in pufra Tris-EDTA | 12,5 |
| cDNA | 12,5 |
| Končni volumen | 50 |

Preglednica 12: Program za preamplifikacijo cDNA

| | Aktivacija encima | Preamplifikacija PCR | |
|------------|-------------------|----------------------|--------------------------|
| | Zadrževanje | Cikli (14x) | Prileganje/podaljševanje |
| | | Denaturacija | |
| Teperatura | 95 °C | 95 °C | 60 °C |
| as | 10 min | 15 sek | 4 min |

5 µl tako namnoščene cDNA smo uporabili za določanje izraščanja označevalcev embrionalnih celic. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili cDNA, pripravljeno iz RNA embrionalnih matih celic, kot negativno kontrolo pa cDNA, pripravljeno iz RNA fibroblastov. Poskus smo ponovili trikrat.

Pri obdelavi podatkov smo kot referenčni gen uporabili *ciklofilin C*, kot kalibratorski vzorec pa vzorec fibroblastov.

4 REZULTATI

4.1 KONCENTRACIJA IZOLIRANE RNA IZ POSAMEZNIH VZORCEV, ISTOST IN INTEGRITETA RNA

Po vsaki izolaciji RNA iz vzorcev smo izmerili koncentracijo RNA na spektrofotometru NanoDrop ter istost izolirane RNA (preglednica 13).

Preglednica 13: Koncentracije RNA in istost vzorcev. Razmerje A260/280 pove istost vzorca oz. koliko je v vzorcu prisotnih proteinov. Optimalno razmerje je med 1,7 in 1,9.

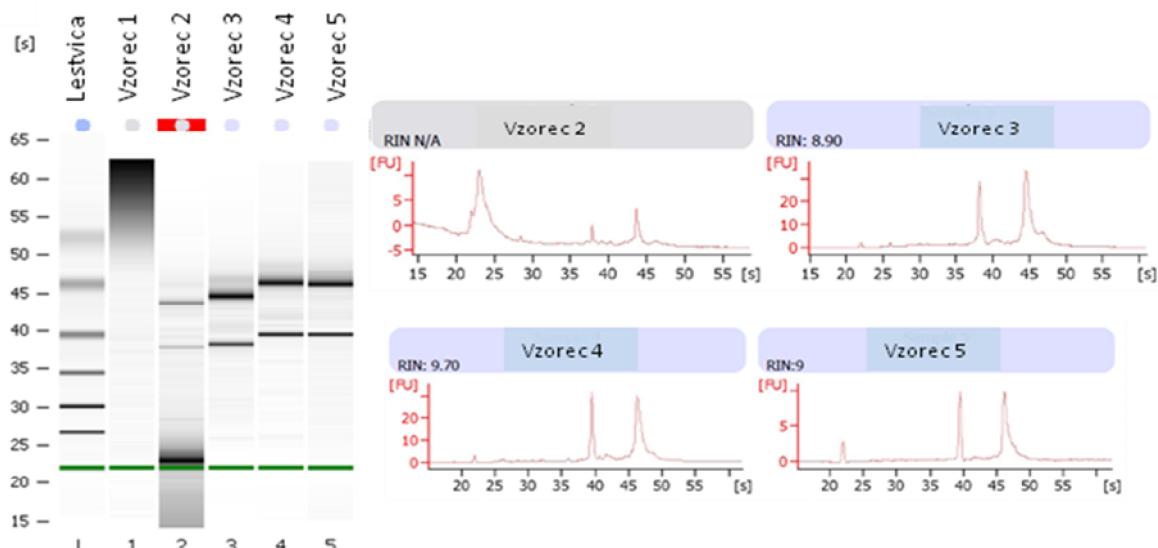
| Vzorec RNA | Koncentracija ($\mu\text{g/ml}$) | Absorbanca (A260) | istost (A260/A280) |
|-------------|------------------------------------|-------------------|--------------------|
| MNC | 45,12 | 1,128 | 1,94 |
| Lin - | 6,69 | 0,167 | 1,37 |
| Lin + | 13,84 | 0,346 | 1,56 |
| BC | 4,18 | 0,105 | 1,69 |
| EMC | 27,10 | 0,678 | 1,20 |
| Fibroblasti | 5,98 | 0,149 | 2,18 |

Z napravo Agilent 2100 Bioanalyzer smo izmerili tevilo RIN, ki je merilo razgrajenosti RNA. RNA je dobro ohranjena, saj so tevila RIN zelo visoka (preglednica 14). Tudi elektroferogram ne kaže lis, ki bi bile posledica razgrajene RNA (slika 22).

Preglednica 14: Vrednosti RIN vzorcev. Veje kot je tevilo RIN, manj je RNA razgrajena. RIN 1 pomeni zelo razgrajeno RNA, RIN 10 pa zelo ohranjeno.

| Vzorec | Vrednost RIN |
|-------------|--------------|
| EMC | /* |
| MNC | 8,9 |
| BC | 9,7 |
| Fibroblasti | 9,0 |

*vrednost ni bila določena



Slika 22: Elektroferogram za posamezne vzorce (vzorec 2 EMC, vzorec 3 MNC, vzorec 4 BC in vzorec 5 fibroblasti).

Na elektroferogramih vzorcev RNA mononuklearnih celic, z levkociti bogatega vzorca ter vzorca fibroblastov so lepo vidni vrhovi 18S rRNA okrog 40 sek, ter 28S rRNA okrog 45 sek. Vrhovi so ozki in visoki, kar je značilno za nerazgrajeno RNA. Pri vzorcu EMC je okrog 25 sek viden vrh neznanega izvora.

4.2 PREVERJANJE PRISOTNOSTI GENOMSKE DNA V VZORCIH

Prisotnost genomske DNA v vzorcih smo določili tako, da smo izmerili praflni cikel (Ct) različnih označevalcev v vzorcih. Vrednosti Ct označevalca RhD inton 4, ki se izrašča iz genomske DNA, so bile 38,3 (RNA fibroblastov), 36,55 (cDNA fibroblastov, ki so bili sintetizirali iz DNazo neobdelane RNA) ter 37,35 (v vzorcih cDNA fibroblastov, sintetiziranih iz DNazo obdelane RNA). Pri EMC so vrednosti Ct sledeče: 40,4 pri vzorcu RNA, 32,35 pri cDNA, sintetizirane iz DNazo obdelane RNA, ter 39,8, v vzorcu cDNA, sintetizirane iz neobdelane RNA. V vzorcu RNA MNC je vrednost Ct 40,4, v vzorcu cDNA, ki je bil sintetiziran iz DNazo obdelane RNA 38,3, podobno (38,35) tudi pri cDNA, sintetizirani iz DNazo neobdelane RNA (preglednica 15). Standardne deviacije vrednosti Ct pri vzorcih RNA ter vzorcu mononuklearnih celic MNC oziroma cDNA, sintetizirana iz DNazo neobdelane RNA nis bilo mogoče izračunati, ker smo vrednosti Ct dobili samo pri eni od treh meritvev.

Preglednica 15: Izraščanje označevalca RhD inton 4 v vzorcih RNA, v cDNA, sintetizirane iz DNazo obdelane oz. neobdelane RNA v celicah fibroblastov, EMC in MNC. Prikazane so povprečne vrednosti Ct ± standardna deviacija.

| Povprečje praflnih ciklov Ct izraščanja označevalca RhD inton 4. | | | |
|--|------|------------------------------|----------------------------|
| RhD inton 4 | RNA | cDNA iz DNazo neobdelane RNA | cDNA iz DNazo obdelane RNA |
| Fibroblasti | 38,8 | 36,55±0,07 | 37,35±0,35 |
| EMC | 40,4 | 32,35±0,02 | 39,8±1,27 |
| MNC | 40,4 | 38,3 | 38,35±0,78 |

Pri fibroblastih so vrednosti Ct označevalca Oct-4A v RNA 41,9, v vzorcu cDNA, ki je bila sintetizirana iz DNazo obdelane RNA 36,25, v vzorcu cDNA, ki pa je bila sintetizirana iz DNazo neobdelane RNA, pa je vrednost Ct 37,65. Pri EMC je vrednost Ct Oct-4A RNA 37,45. V vzorcu cDNA, ki je bila sintetizirana iz DNazo neobdelane RNA, je vrednost Ct Oct-4A 21,65, v cDNA iz DNazo obdelane RNA pa 24,3. Pri mononuklearnih celicah MNC je vrednost Ct v cDNA iz DNazo neobdelane RNA 35,1 in v cDNA iz DNazo obdelane RNA 33,15 (preglednica 16). Standardne deviacije vrednosti Ct pri vzorcuih RNA fibroblastov nismo mogli izračunati, ker smo vrednost Ct dobili le pri eni od treh meritvev.

Preglednica 16: Izraščanje označevalca Oct-4A v vzorcih RNA, v cDNA, sintetizirane iz z DNazo obdelane oz. neobdelane RNA v celicah fibroblastov, EMC in MNC. Prikazane so povprečne vrednosti Ct ± standardna deviacija.

| Povprečje pravnih ciklov (Ct) izraščanja označevalca Oct-4A. | | | |
|--|---------------|--------------------------------|------------------------------|
| Oct-4A | RNA | cDNA iz z DNazo neobdelane RNA | cDNA iz z DNazo obdelane RNA |
| Fibroblasti | 41,9 | 36,25±1,06 | 37,65±0,92 |
| EMC | 37,45±2,33 | 21,65±0,64 | 24,3±1,56 |
| MNC | se ne izrašča | 35,1±1,27 | 33,15±1,06 |

V vzorcih RNA izraščanja nismo zaznali, ker se označevalci izraščajo le iz cDNA, zato tudi nismo mogli izračunati vrednosti Ct. Pri fibroblastih je v vzorcu cDNA, sintetizirane iz z DNazo neobdelane RNA vrednost Ct 26,45, v cDNA, sintetizirani iz z DNazo obdelane RNA pa 26,1. Vrednost Ct ciklofilina C v vzorcu cDNA, ki je bila sintetizitana iz z DNazo neobdelane RNA je 22,4, v cDNA, ki je bila sintetizirana iz z DNazo obdelane RNA pa je vrednost Ct 25,2. Pri mononuklearnih celicah MNC je vrednost Ct v cDNA, ki je bila sintetizirana iz neobdelane RNA 29,9, v cDNA, sintetizirani iz z DNazo obdelane RNA pa 27,3. Zgoraj opisane podatke prikazuje preglednica 17.

Preglednica 17: Izraščanje označevalca ciklofilina C v vzorcih RNA, v cDNA, sintetizirane iz z DNazo obdelane oz. neobdelane RNA v celicah fibroblastov, EMC in MNC. Prikazane so povprečne vrednosti Ct ± standardna deviacija.

| Povprečje pravnih ciklov Ct izraščanja označevalca ciklofilina C. | | | |
|---|---------------|--------------------------------|------------------------------|
| Ciklofilin C | RNA | cDNA iz z DNazo neobdelane RNA | cDNA iz z DNazo obdelane RNA |
| Fibroblasti | se ne izrašča | 26,45±0,07 | 26,1±0,28 |
| EMC | se ne izrašča | 22,4±0,28 | 25,2±0,56 |
| MNC | se ne izrašča | 29,9±0,14 | 27,3±0,14 |

4.3 DOLOČANJE IZRAŠČANJA EMBRIONALNIH OZNAČEVALCEV Z METODO PCR V REALNEM ASU

Relativni nivo izraščanja označevalcev embrionalnih celic v vzorcih smo določili glede na izraščanje teh markerjev v fibroblastih po metodi $\Delta\Delta Ct$ (Livak in Schmittgen, 2001).

Relativni nivo izraščanja označevalca Nanog v EMC je 103,59, v z levkociti bogatem vzorcu BC 14,37, pri Lin+ 4,27, pri Lin- pa izraščanje označevalca Nanog ni bilo tako močno, da bi fluorescenco lahko zaznali v statistiki no relevantnem območju (preglednica 18).

Relativni nivo izraščanja embrionalnega označevalca Oct-4A je v embrionalnih mati nih celicah 1216,49, v z levkociti bogatem vzorcu BC 20,78, podobno v vzorcu MNC 18,35, pri Lin+ 9,39, pri Lin- pa 11,14.

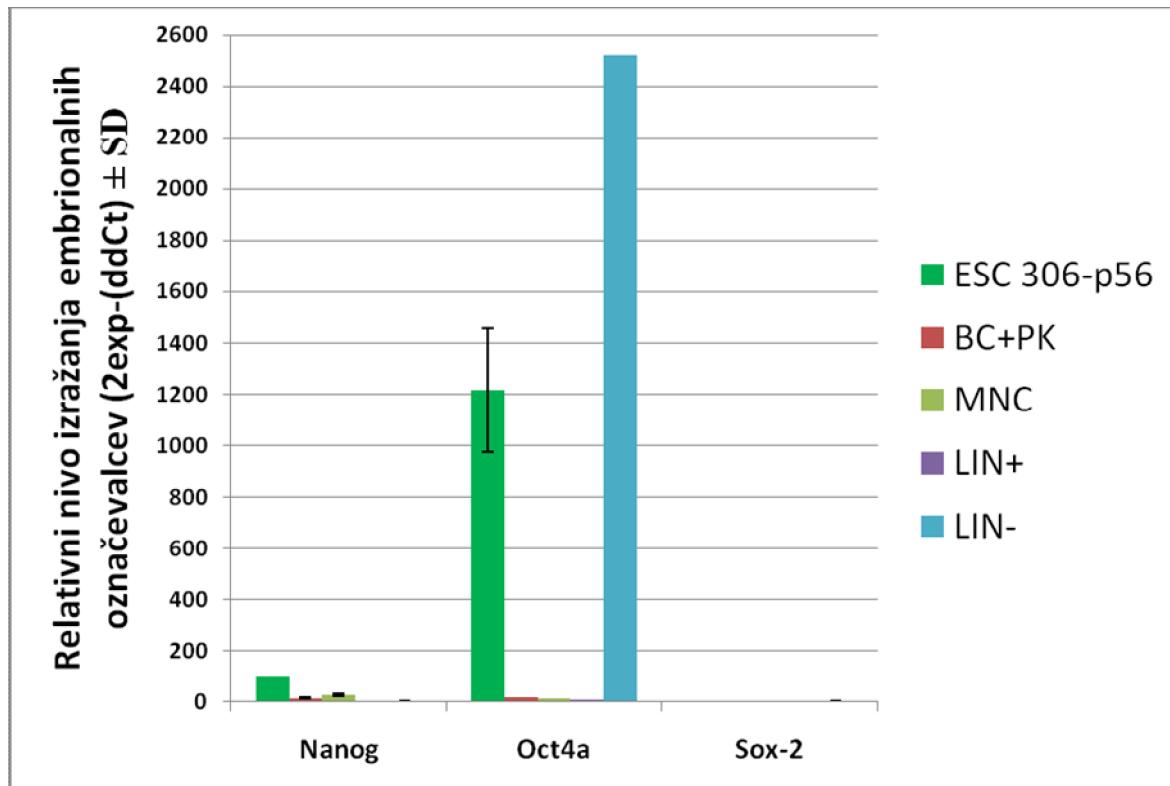
Izraščanje embrionalnega označevalca Sox-2 nismo zaznali v nobenem vzorcu.

Grafi ni prikaz relativnega nivoja izraščanja označevalcev embrionalnih matnih celic glede na izraščanje označevalcev v fibroblastih, prikazuje slika 23.

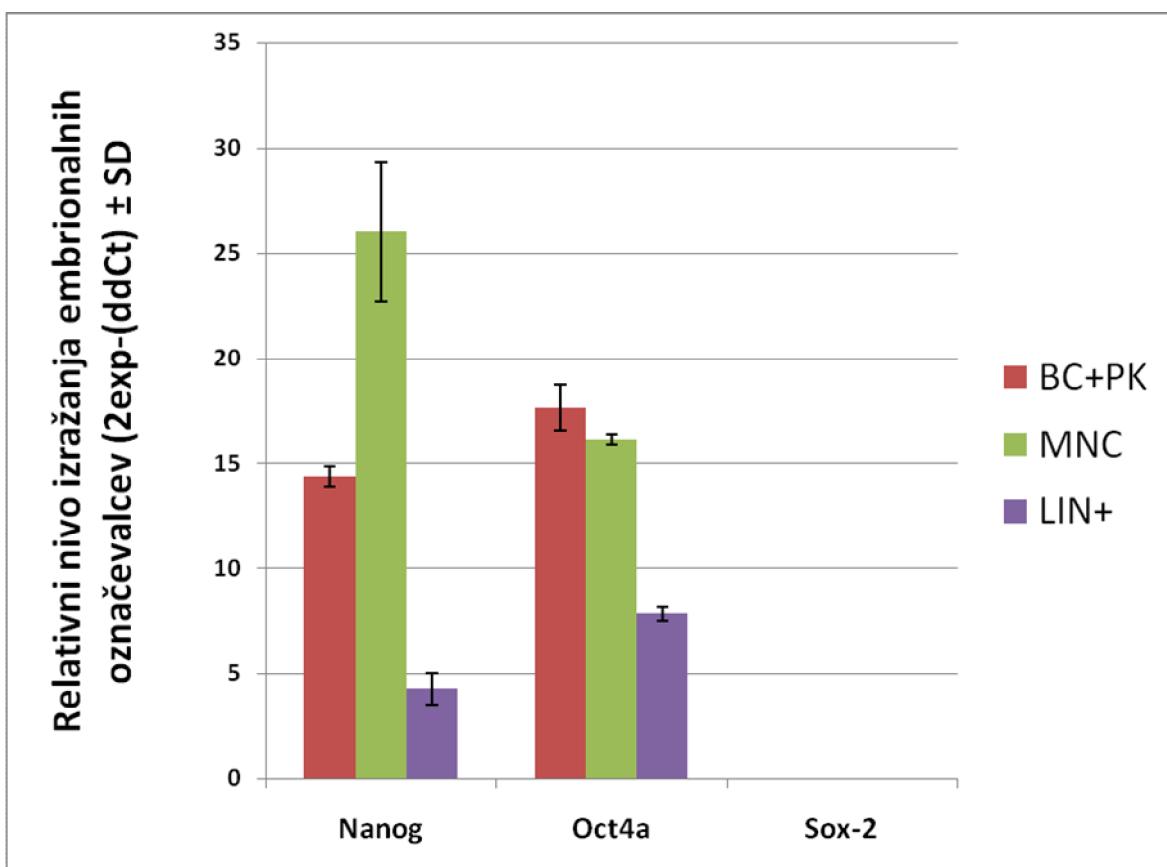
Preglednica 18: Relativni nivo izraščanja embrionalnih označevalcev Nanog, Oct-4A in Sox-2 glede na negativno kontrolo fibroblastov za posamezne vzorce celic. Prikazan je povprečni relativni nivo izraščanja ± standardna deviacija.

| Relativni nivo izraščanja embrionalnih označevalcev glede na fibroblaste. | | | |
|--|----------------|----------------|---------------|
| Vzorec | Nanog | Oct-4A | Sox-2 |
| EMC | 103,59±0,3 | 1216,49±243 | se ne izrašča |
| BC | 14,37±0,5 | 17,61±1,1 | se ne izrašča |
| MNC | 26,04±3,3 | 16,12±0,2 | se ne izrašča |
| LIN+ | 4,27±0,7 | 7,82±0,3 | se ne izrašča |
| LIN- | se ne izrašča* | 2522,17±1577,7 | se ne izrašča |

* Izraščanje označevalca ni dovolj močno, da bi ga lahko zaznali v statistično relevantnem signalu.



Slika 23: Relativni nivo izraščanja embrionalnih označevalcev Nanog, Oct-4A in Sox-2 glede na negativno kontrolo fibroblastov v vzorcih EMC, v levkociti bogatem vzorcu BC, v mononuklearnih celicah MNC, v celicah Lin+ in Lin-.



Slika 24: Relativni nivo izrašanja embrionalnih označevalcev Nanog, Oct-4A in Sox-2 glede na negativno kontrolo fibroblastov v z levkociti bogatemu vzorcu BC, v mononuklearnih celicah MNC, v celicah Lin+ in Lin-.

4.4 PREAMPLIFIKACIJA cDNA

V procesu preamplifikacije smo namnolfili cDNA s specifičnimi za etnimi oligonukleotidi za označevalce embrionalnih celic (Nanog, Oct-4A, Sox-2). Relativni nivo izrašanja teh označevalcev smo določali glede na izrašanje v fibroblastih po metodi $\Delta\Delta Ct$ (Livak in Schmittgen, 2001).

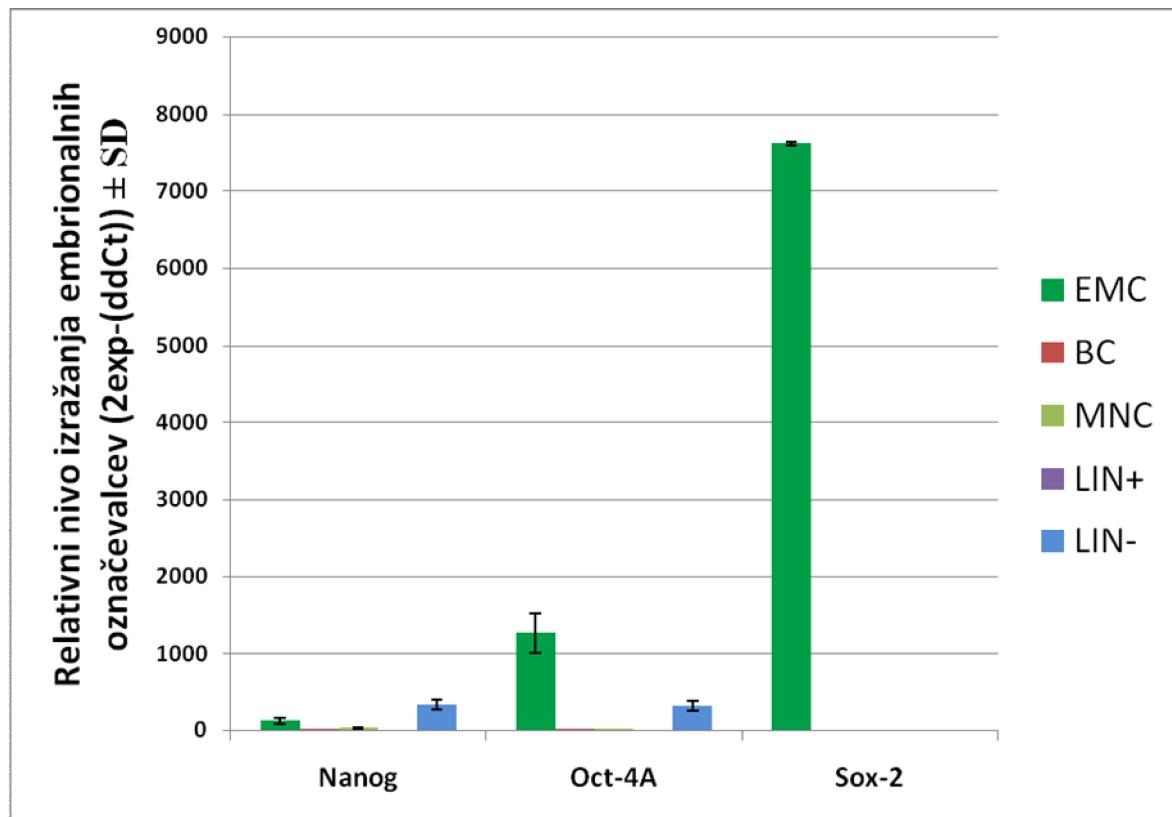
Pokazali smo, da je relativni nivo izrašanja označevalca Nanog v EMC 126,01, v z levkociti bogatemu vzorcu BC 21,39, v mononuklearnih celicah 28,78, v Lin+ 7, v Lin- pa 331,75.

Relativni nivo izrašanja označevalca Oct-4A v EMC je 1262,62, v z levkociti bogatemu vzorcu BC 18,24, v mononuklearnih celicah 15,62, v Lin+ celicah 8,64 in v Lin- celicah 315,21.

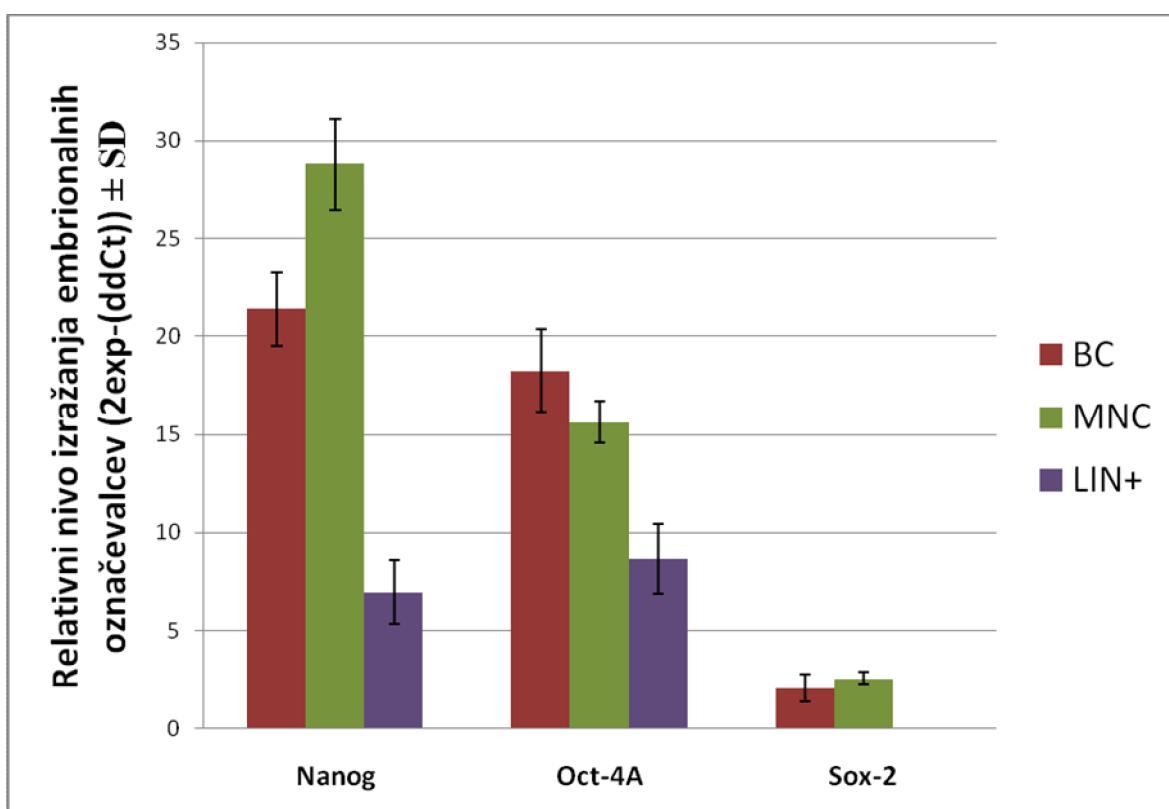
Relativni nivo izrašanja Sox-2 v z levkociti bogatemu vzorcu BC je bil 2,06, v vzorcu mononuklearnih celic pa 2,58. V celicah EMC je bil relativni nivo izrašanja označevalca 7622,44, v vzorcih Lin+ in Lin- pa izrašanja nismo zaznali (preglednica 19).

Preglednica 19: Relativni nivo izrašanja embrionalnih označevalcev Nanog, Oct-4A in Sox-2 glede na negativno kontrolo fibroblastov za posamezne vzorce celic. Uporabili smo cDNA, ki smo jo pred uporabo metode PCR v realnem času namnolfili. Prikazan je povprečni relativni nivo izrašanja ± standardna deviacija.

| Relativni nivo izrašanja embrionalnih označevalcev glede na fibroblaste. | | | |
|--|--------------|---------------|---------------|
| Vzorec | Nanog | Oct-4A | Sox-2 |
| EMC | 126,01±39,9 | 1261,62±253,4 | 7622,44±21,92 |
| BC+PK | 21,39±1,90 | 18,24±2,10 | 2,06±0,69 |
| MNC | 28,78±2,30 | 15,62±1,10 | 2,58±0,30 |
| LIN+ | 6,95±1,60 | 8,64±1,80 | ni expr |
| LIN- | 331,75±70,30 | 315,21±67,60 | ni expr |



Slika 25: Relativni nivo izrašanje embrionalnih označevalcev Nanog, Oct-4A in Sox-2 glede na negativno kontrolo fibroblastov v vzorcih EMC, v levkociti bogatemu vzorcu BC, v mononuklearnih celicah MNC, v celicah Lin+ in Lin-.



Slika 26: Relativni nivo izrašanja embrionalnih označevalcev Nanog, Oct-4A in Sox-2 glede na negativno kontrolo fibroblastov v vzorcih mononuklearnih celic MNC, v celicah Lin+ in v z levkociti bogatemu vzorcu BC po preamplifikaciji. Zaradi boljše preglednosti na sliki niso prikazane vrednosti relativnega izrašanja označevalcev v vzorcih EMC ter Lin-.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Vsako tkivo vsebuje majhno populacijo MC, ki imajo sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije. Odgovorne so za nadomešanje izrafljanja označevalcev embrionalnih mati nih celic ali popravljanje po-kodovanih tkiv (Strbad in Roflman, 2005). Ker z njimi lahko zdravimo določene degenerativne, presnovne, prirojene in rakaste bolezni, bi bil dokaz o obstoju celic, ki izraflajo embrionalne označevalce v periferni krvi velikega pomena. Takšne celice bi lahko postale zelo uporabne v medicini, saj ni eti nih omejitev pri pridobivanju in uporabi. Periferna krv kot vir MC ima v primerjavi s kostnim mozgom kar nekaj prednosti, saj je poseg pridobivanja oz. izolacije teh celic manj invaziven, nebole, hitrejši, okrevanje po odvzemu je hitrejše itd. (Kassis in sod., 2006; Bradley, 2001).

Obstaja več metod, s katerimi lahko dokazujemo, da imajo celice, izolirane iz različnih tkiv, res embrionalni potencial. Celice MAPC so bile iz kostnega mozga izolirane in identificirane s pomočjo pretečne citometrije, analize imunofluorescence, kariotipiziranja ter hibridizacije FISH (Reyes in sod., 2008). Za identifikacijo embrionalnih mati nih celic se uporablja tudi analiza specifičnih genov z mikromreflami, transmisivska elektronska mikroskopija, FACS sortiranje (angl. fluorescence activated cell sorting), (Kucia in sod., 2006a, 2008a; Zuba-Surma in sod., 2009; Ratzajczak in sod., 2008b). Preferenčno uporabljeni metoda identifikacije mati nih celic pa je PCR v realnem asu, s katero lahko pokazljemo razlike v izrafljanju specifičnih genov.

Izrafljanje genov v celicah je proces, ki spremeni informacijo, zapisano v DNA, v genski produkt kot je RNA ali protein. Ocena mRNA (informacijske RNA) lahko slufi kot vmesni pokazatelj stopnje izrafljanja proteina in je zelo pomembna za prikaz profila genskega izrafljanja v celici. Prvi korak pri analizah izrafljanja genov z metodo PCR v realnem asu je zato priprava RNA, ki mora biti imenovana manj razgrajena, saj delo s slabo kvalitetno RNA moreno vpliva na eksperimentalne rezultate. Vendar pa so molekule RNA zelo neobstojne: ribonukleaze - encimi, ki jih razgrajujejo, so prisotni vsepozdno in zelo stabilni. Zato je zelo pomembno, da material, ki ga uporabljamo, ne vsebuje RNaz, da uporabljamo ustrezno iste reagente, da pri delu uporabljamo rokavice,...(Bustin in sod., 2009; Bogart in Andrews, 2006). Načini vzorci RNA so bili pripravljeni iz krvi, ki vsebuje velike količine proteinov, genomske DNA in ribonukleaz, ki moreno vplivajo na postopek izolacije RNA iz celic krvi (Czajkowska in sod., 1986; Theophilus, 2008). Vzdrževanje nerazgrajene RNA iz krvi, v primerjavi z drugimi tkivi, je problematično predvsem zato, ker krv vsebuje mnogo več RNaz kot ostala tkiva. Zato si pri metodi izolacije RNA iz krvnih celic prizadevamo, da postopek opravimo imenovane hitreje in s tem odstranimo množične faktorje. Priporočljivo je, da s centrifugiranjem najprej ločimo eritrocite od ostalih celic, saj leti vsebujejo veliko ribonukleaz, ki razgrajujejo RNA. Vzorce RNA shranjujemo na ledu, saj s tem upoštevamo encimski reakcije. V krvi so prisotni tudi razni inhibitorji (hem, imunoglobulin G, laktoperin), katerih prisotnost vpliva na postopek ekstrakcije in zmanjšuje količino izolirane RNA (Al-Soud in Rådström, 2001; Al-Soud in sod., 2000; Akana in sod., 1994). Na metodo PCR lahko vplivajo tudi antikoagulantni, tak primer je heparin.

Ocenjujemo kvalitete RNA lahko ocenimo preko tevila RIN. Blifje kot je tevilo RIN vrednosti 10, bolj intaktna je RNA. Tevilo RIN na teh vzorcev smo izmerili na aparatu Agilent

Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, ZDA). Kljub temu je RNA, ki smo jo na različne načine pripravili iz celic, izoliranih iz krvi, v raztopini dobro ohranjena, saj so bila levkociti bogati RIN za vsak vzorec visoka (preglednica 14). Vrednosti RIN so bile za levkocite bogati vzorec BC RNA 9.7, za RNA mononuklearnih celic MNC 8.9 ter za vzorec RNA fibroblastov 9 (slika 22). Elektroferogram analiziranih vzorcev (slika 22) kaže, da dobimo vrhove 18S in 28S rRNA lepo ločene ter da se ne pojavlja vrhovi, ki bi bili posledica razgrajene RNA. Le pri vzorcu EMC se okrog 25 sekunde pojavi vrh, ki onemogoči izračun vrednosti RIN. Ta vrh najverjetneje ni posledica razgrajene RNA, saj sta vrhova 18S in 28S lepo vidna (Uršula Prosenc, Center za funkcionalno genomiko in bioteknologijo, Medicinska fakulteta; ustno). S tem eksperimentom smo potrdili hipotezo, da lahko s kompletom RNeasy® Plus Micro Kit (Qiagen, Nemčija) iz krvi izoliramo nerazgrajeno RNA, z meritvami koncentracije na aparatu NanoDrop pa smo potrdili, da je izoliramo v zadostnih količinah za naposkus.

Na rezultate analiz izraščanja genov z metodo PCR v realnem asusu lahko vpliva tudi genomska DNA, ki jo izoliramo kot stranski produkt ob izolaciji RNA ter predstavlja kontaminacijo RNA. Mnogi avtorji navajajo, da prisotnost gDNA v vzorcih lahko povzroči napačno interpretacijo rezultatov, saj se lahko nek označevalci izraščajo iz gDNA in ne iz cDNA (Fleige in sod., 2006; Kucia in sod., 2006a; 2007a, Mueller, 2004). Zaradi velike ob utrjenosti metode PCR v realnem asusu je potrebno gDNA odstraniti, saj le tako lahko preprečimo hkratno pomnoščevanje gDNA in cDNA (Baebler, 2006). To lahko naredimo z obdelavo vzorcev z encimom DNazo, z uporabo ustreznih kompletov, ki vsebujejo kolone, na katere se vefle gDNA in jih nato zavrfemo ali pa uporabimo ustrezeno konstruirane za etne oligonukleotide, ki v vzorcu ne pomnoščujejo gDNA. To naredimo tako, da vezava etnika z matrico temelji na vezavi ekson-ekson, zato se gDNA (ki vsebuje introne) ne pomnoščuje (Apte in Daniel, 2009).

Vsi smo preverili, ali z uporabo kompleta RNeasy® Plus Micro Kit gDNA res odstranimo iz vzorcev. Pri obdelavi vzorcev z DNazo moramo paziti, da jo inaktiviramo, saj druga cDNA ni obstojna. Na elektroferogramu (slika 22) ostrina vrhov 18S in 28S mononuklearnih celic ter z levkociti bogatega vzorca kaže, da imamo v vzorcih prisotno gDNA, torej je s kolono gDNA Eliminator nismo popolnoma odstranili. Predvidevali smo, da gDNA verjetno vsebujejo tudi vzorci RNA, pripravljeni iz EMC, saj so bili pripravljeni s kompletem, ki ne vsebuje kolone gDNA Eliminator (dr. Susanne Ström, Institut Karolinska, TMNedsko; ustno). Da bi gDNA v teh vzorcih odstranili, smo vzorce RNA obdelali z encimom DNazo, z reverzno transkriptazo sintetizirali cDNA ter v vzorcih RNA, cDNA, sintetizirani iz z DNazo obdelane RNA ter v vzorcih cDNA, sintetiziranih iz z DNazo neobdelane RNA, preverili izraščanje različnih označevalcev z metodo PCR v realnem asusu. Za etni oligonukleotidi za določanje izraščanja teh označevalcev so bili skonstruirani tako, da so se vezali na tarne gene v različnih molekulah nukleinskih kislin. Označevalci RhD intron 4 se je vezal na tarne zaporednje v intronu 4 gena za RhD, torej samo na gDNA. Označevalci Oct-4A je konstruiran tako, da se smiselnici in protismiselnici oligonukleotid vefle vsak na eno stran stika ekson-ekson. Tako skonstruirani označevalci se naj bi na eloma vezali samo na cDNA, a lahko izjemoma prepozna tudi tarne zaporedje v gDNA (Applied Biosystems, 2008). Označevalci ciklofilin C je narejen tako, da se smiselnici in protismiselnici oligonukleotid vefle vsak na eno stran stika ekson-ekson, označevalci se vefle samo na cDNA.

Namen poskusa z DNazo je bil dvojen. Preverjali smo, ali imamo v vzorcih gDNA ter ali z obdelavo vzorcev z DNazo odstranimo gDNA, ki lahko moti potek poskusa in interpretacijo rezultatov. Pri poskusu, kjer smo preverjali prisotnost gDNA, smo primerjali podatke o Ct, pridobljene z RhD intron 4, ki se vefle na introne, torej se signal izrafla iz gDNA ter Oct-4A, ki se vefle tako na gDNA kot cDNA. Če kateri od vzorcev vsebuje gDNA, se le-ta pokafle tako, da jo zaznamo pri obeh označevalcih, v vseh vzorcih. Glede na na-e rezultate lahko rečemo, da je v vzorcih prisotna gDNA, saj se označevalec RhD intron 4 izrafla v vsakem vzorcu, vendar pri relativno visokih vrednostih Ct (v poznih ciklih) (preglednica 15). Pri ciklofilinu C je vrednost Ct pri vseh vzorcih približno istih vrednosti, kar pomeni, da je v vzorcih prisotna gDNA (preglednica 17). Označevalec Oct-4A, ki se vefle tako na cDNA kot gDNA, kaže predvidljiv vzorec, in sicer zaznamo signal pri RNA, iz katerega izraščamo Ct (preglednica 16). Nisfje vrednosti Ct se pojavi pri cDNA, ki je bila sintetizirana iz RNA, ki ni bila obdelana z DNazo, v primerjavi z vrednostmi Ct pri cDNA, ki je bila sintetizirana iz obdelane RNA. Kasnejši signal je posledica obdelave vzorca z DNazo, saj s tem odstranimo nekaj gDNA, v vzorcu je manj matric, na katere se vefle specifični za etni oligonukleotid in specifični signal se doseže kasneje.

Pri tem poskusu smo tudi preverjali, ali z obdelavo vzorcev RNA z DNazo odstranimo gDNA. Pri predpostavki, da imamo v vzorcih gDNA, kar smo potrdili pri prvem delu poskusa, bi morale biti prafne cikli Ct vzorcev cDNA, ki je bila sintetizirana iz z DNazo obdelane RNA vi-jji (signal dobimo kasneje) od prafnega cikla Ct vzorcev cDNA, ki je bila sintetizirana iz z DNazo neobdelane RNA (ker gDNA odstranimo). To seveda velja le za etni oligonukleotid Oct-4A, ki se vefle na gDNA in cDNA. Pri označevalcu, ki se vefle samo na cDNA (v na-em primeru ciklofilin C), bi morale biti vrednosti Ct pri vseh vzorcih cDNA približno enake, ker predpostavljamo, da je prisotna gDNA. Označevalec RhD se v vzorcih fibroblastov v cDNA, ki je bila sintetizirana iz neobdelane RNA, pojavi v enakem ciklu, kot pri cDNA, ki je bila sintetizirana iz neobdelane RNA, to pomeni, da gDNA nismo odstranili. Vrednost Ct pri EMC je v cDNA, ki je bila sintetizirana iz neobdelane RNA, 32, pri cDNA, ki pa je bila sintetizirana iz neobdelane RNA, pa 40. Pri vzorcu EMC je vidno, da se s postopkom obdelave z DNazo nekaj gDNA odstrani, pri fibroblastih pa ne. To je posledica različne nega na ina izolacije RNA. Pri izolaciji fibroblastov smo uporabili i-enje RNA s kolono gDNA Eliminator, pri izolaciji RNA iz EMC pa je bil uporabljen kompletni, ki te kolone nima. Pri vzorcu mononuklearnih celic MNC je Ct vrednost enaka, kar ponovno nakazuje, da gDNA nismo odstranili (preglednica 15). Enako velja za označevalca Oct-4A, in sicer je pri fibroblastih v cDNA, ki je bila sintetizirana iz RNA, ki ni bila obdelana z DNazo, Ct vrednost nisfje kot pri cDNA, ki je bila sintetizirana iz z DNazo obdelane RNA. Torej smo z obdelavo nekaj gDNA odstranili, vendar pa ne dovolj, saj signal -e vedno zaznavamo v relativno poznih ciklih. Pri EMC je vidno tudi, da se z obdelavo vzorcev z DNazo nekaj genomske DNA odstrani, saj je Ct v vzorcu cDNA, ki je bila sintetizirana iz neobdelane RNA, 22, pri cDNA, ki pa je bila sintetizirana iz RNA, ki je bila obdelana z DNazo, pa 24. Vrednost za označevalec Oct-4A je v cDNA mononuklearnih celic MNC, ki je bila sintetizirana iz neobdelane RNA, 35, v cDNA, ki pa je bila sintetizirana iz obdelane RNA, pa 33. To nasprotuje trditvi, da se v cDNA, ki je bila sintetizirana iz z DNazo obdelane RNA, signal pojavi kasneje, torej imamo opravka z

gDNA (preglednica 16). Pri označevalcu ciklofilinu C so vrednosti Ct z in brez obdelave z DNazo podobne, v vzorcih je -e vedno prisotna gDNA (preglednica 17).

Ker smo gDNA zaznali v vzorcih RNA tako pri merjenju integritete RNA kot tudi z metodo PCR v realnem asu, torej ne velja, da v vzorcih RNA gDNA ni prisotna. gDNA je ostala tudi po obdelavi z DNazo. Ker pa je bilo mogočno ločiti signal, ki prihaja z gDNA oz. cDNA (velika razlika v vrednostih Ct v EMC pri označevalcu Oct-4A med vzorcema RNA oz. cDNA (preglednica 15 in 16) smo se odločili, da vzorcev RNA pred uporabo za sintezo cDNA ne bomo obdelali z DNzo.

Prepis RNA v cDNA je ena izmed ključnih faz za natančno kvantifikacijo količine RNA. Napake pri prepisu RNA v cDNA lahko nastanejo zaradi tvorbe sekundarnih ali terciranih struktur RNA, variabilnosti v učinkovitosti za etnih oligonukleotidov in lastnosti encima reverzne transkriptaze. Količina cDNA lahko variira tudi do 100x glede na opazovani gen in uporabo reverzne transkriptaze (Baebler, 2006). Do napak pri ocenjevanju koncentracije RNA je priložno tudi pri nas, saj smo zaznali razliko med koncentracijami, merjenimi na klasi nem spektrofotomeru in aparatu NanoDrop. Avtorji navajajo, da je za merjenje koncentracije bolj zanesljivo merjenje na napravi NanoDrop (Fleige in Pfaffl, 2006), zato smo koncentracije vzorcev izmerili na ta način.

Izrafljanje embrionalnih označevalcev smo določili z metodo PCR v realnem asu. Metoda je zelo običajna in ima širok razpon kvantifikacije. Z metodo lahko zaznamo in izmerimo minimalne količine nukleinskih kislin v različnih vzorcih. Metoda PCR v realnem asu je hitra, običajna in specifična (Bustin in sod., 2009). Kljub mnogim prednostim pa se pri uporabi te metode srečujemo tudi s problemi, ki lahko zelo vplivajo na interpretacijo rezultatov. Pri analizah s PCR v realnem asu je pomembno, da delamo s isto in nerazgrajeno RNA -e posebej zato, ker delamo z nizkimi koncentracijami nukleinskih kislin (Fleige in Pfaffl, 2006). Srečujemo se tudi s problemom endogenih kontrol, saj se gospodinjski geni v različnih tkivih ne izraflajo enako, kar lahko vodi do nepravilne interpretacije rezultatov (Glare in sod., 2002). Priporočljivo je testirati več normalizacijskih genov in se na podlagi rezultatov odločiti za tistega, ki daje najboljše rezultate (Dheda in sod., 2004; Bustin in sod., 2009; Wong in Medrano, 2005).

Z diplomskim delom smo preverjali izrafljanje označevalcev embrionalnih mati nih celic v periferni krvi, saj predhodne raziskave potrjujejo, da so celice, ki izraflajo te označevalce, prisotne v različnih tkivih (Ratajczak in sod., 2007a, 2007b; D'Ippolito in sod., 2004; Cesselli in sod., 2009). Kot kalibratorski vzorec smo izbrali vzorec RNA, pripravljen iz celic ne kulture fibroblastov v poznih pasaflah. Izrafljanje embrionalnih označevalcev Nanog in Oct-4A smo zaznali tudi v tem vzorcu, vendar so vrednosti pravljnih ciklov visoke (neobjavljeni rezultati). To izrafljanje je najverjetnejše posledica izrafljanja označevalcev iz gDNA, saj smo s predhodnimi eksperimenti pokazali, da imamo v različnih vzorcih prisotno tudi gDNA, ki je iz vzorcev nismo mogli popolnoma odstraniti. Pokazali smo, da se v celicah MNC in v levkociti bogatem vzorcu, izraflata embrionalna označevalca Nanog in Oct-4A (relativni nivo izrafljanja gena Oct-4A v MNC je 16,12, gena Nanog pa 26,04, relativni nivo izrafljanja gena Oct-4A v levkociti bogatem vzorcu je 17,61, gena Nanog pa 14,37 (slika 23 in 24)). Ker je Ct izrafljanja gena Nanog 32 pri MNC in 33 pri levkociti bogatem vzorcu ter Oct-4A 30 pri levkociti bogatem vzorcu in 32 pri MNC

predvidevamo, da se izraflata iz cDNA, saj se v primerjavi s fibroblasti, pri katerih sta vrednosti Ct Nanog in Oct-4A 35, izraflajo prej (neobjavljeni rezultati). Izraflanje označevalcev Oct-4A in Nanog smo izmerili tudi pri vzorcu Lin- (slika 23). Vendar je Ct zelo visok, podobno kot pri fibroblastih (neobjavljeni rezultati), zato predvidevamo, da so se označevalci vezali na specifično zaporedje v gDNA in ne v cDNA. Izraflanja embrionalnega označevalca Sox-2 v tem poskusu nismo zaznali.

Ker smo fleleli preveriti, ali se Sox 2 dejansko ne izrafla ali pa je to posledica zelo nizkega izraflanja v celicah, smo se odločili, da bomo cDNA pred uporabo v metodi PCR v realnem asusu namnofili v postopku specifičnega pomoflavanja cDNA, preamplifikacije. Po koncu preamplifikaciji dobimo v vzorcu več kopij gena, zato ga z metodo PCR v realnem asusu zaznamo pri nizkih vrednostih Ct. Pokazali smo, da se s preamplifikacijo trend izraflanja označevalcev v primerjavi z eksperimentom, v katerem cDNA nismo predhodno namnofili, ohranjuj (preglednica 19). Po preamplifikaciji smo izmerili tudi močno izraflanje označevalca Oct-4A v celicah Lin-, celo više, kot jo imajo EMC (slika 28). Vrednosti Ct so visoke, torej to pomeni, da se Oct-4A izrafla iz gDNA.

Po preamplifikaciji cDNA smo zaznali tudi izraflanje Sox-2 v vzorcih mononuklearnih celic ter v zlevkociti bogatemu vzorcu kot v teh vzorcih pred preamplifikacijo izraflanja gena Sox-2 nismo zaznali. Očitno je izraflanje tega gena v vzorcih, pripravljenih iz PK, slabo. Vendar pa ta rezultat dokazuje, da smo s pomnoflitvijo specifične cDNA povečali ob utljivost metode PCR v realnem asusu.

Z merjenjem izraflanja embrionalnih označevalcev z metodo PCR v realnem asusu v vzorcih, pripravljenih iz PK, smo pokazali, da se izraflata označevalca Oct-4A in Nanog v mononuklearnih celicah in v zlevkociti bogatemu vzorcu, izraflanje označevalca Sox-2 pa je zelo slabo in ga s klasičnimi postopki PCR v realnem asusu ne moremo zaznati. S preamplifikacijo cDNA smo pokazali, da se označevalci Sox-2 izrafla v mononuklearnih celicah in v zlevkociti bogatemu vzorcu, vendar pa je relativni nivo izraflanja le 2. Ti rezultati se ujemajo s trditvami Kucie in sod. (2008c), ki pravijo, da so celice VSEL prisotne v mišiji periferne krvi, te celice pa izraflajo poleg ostalih tudi označevalca Oct-4A in Nanog. V krvi so prisotne tudi celice MIAMI, ki poleg ostalih označevalcev izraflajo tudi Oct-4A (D'Ippolito in sod., 2004), kar sovpada z našimi rezultati. Cesselli in sod. (2009) poročajo, da so iz periferne krvi izolirali celice MAPC, ki izraflajo označevalce Nanog, Oct-4A ter Sox-2, torej enake označevalce, kot smo jih mi zaznali v diplomski nalogi. Tudi mezenhimske mati ne celice izraflajo označevalca pluripotentnosti Oct-4A in Nanog (Buhring in sod., 2007), prav tako endotelijalne mati ne celice (Ribatti, 2007), torej so tudi naši rezultati pokazatelj, da so v krvi prisotne celice, ki močno izraflajo označevalce pluripotentnosti Nanog in Oct-4A ter v manjši meri tudi Sox-2.

Potrebne so nadaljnje raziskave, s katerimi bi določili za kateri tip EM celic gre oz. ali niso to morda karcinomske celice, ki tudi lahko izraflajo te označevalce (Oct-4A, Nanog in Sox-2). S poznavanjem signalnih poti, ki sodelujejo pri samoobnavljanju oz. diferenciaciji EMC, bi lahko v prihodnosti tarčiti usmerjali diferenciacijo v flegene celice ne tipe in morda razjasnil mehanizem, zakaj lahko EMC postane EC celica ter se temu pri delu s EMC izogibali.

5.1 PRIHODNJE DELO

V prihodnosti bo potrebno izolirati tip embrionalnih matnih celic, ki smo jih identificirali v periferni krvi in dokazati njihovo pluripotentnost in uniformnost v vseh organih. To lahko dosežemo z uporabo genetskih označevalcev, ki so sestavni element genskega kartiranja in se hkrati uporabljajo tudi za kontrolo genske uniformnosti. Genski označevalci pa so lahko vse razlike, ki se jih da določiti z molekularnimi, imunološkimi, biokemičnimi ali morfološkimi metodami.

Potrebno bi bilo tudi izboljšati izolacijo EMC celic iz krvi in ostalih tkiv, saj z izolacijo dobimo zelo majhno število celic, ter postopkov diferenciacije v različne celične tipe.

Z nadaljnimi raziskavami bo potrebno poleg fle znanega G-CSF poiskati druge faktorje, ki povzročijo izplavljanje embrionalnih matnih celic v periferno kri. Z vidika uporabe teh celic v regenerativni medicini bi bilo koristno vedeti, kateri so tisti faktorji, ki povzročajo vezavo iz krvi v specifična tkiva, saj bi lahko s poznavanjem teh faktorjev ciljno delovali na po-kodovano tkivo. Dobro bi bilo vedeti, ali se v kulturi razvijejo strukture podobne embrioidnim telescem ter ali vsebujejo celice embrioidnih teles označevalce vseh treh zarodnih plasti.

Rezultati diplomskega dela bodo spodbudili raziskave, ki bodo usmerjene k aplikacijam v celični terapiji ter posledi v uporabo embrionalnih matnih celic v regenerativni medicini.

6 POVZETEK

V lovečkem telesu se nahajajo celice, ki se ohranljajo v telesu vse življenje in omogočajo, da se tkiva in organi obnavljajo. Te celice se imenujejo matih celice (MC, angl. stem cells) in so nediferencirane celice, ki imajo sposobnost dolgotrajnega deljenja in tvorbe sebi identičnih kopij ali samoobnavljanja ali ter diferenciacije v bolj usmerjene tkivne celice. Najdemo jih v vseh tkivih odraslega telesa, npr. epiteliju, prebavilih, skeletnih mišicah, očeh, jetrih, dojki, zobni pulpi, kofli, lasnih mehkih, perifernih krvi, mačkah obnem tkivu, testisih, prostati, v ovarijih. Odgovorne so za nadomečanje odmrlih celic ali popravljanje tkivnih poškodb. Z njimi lahko tudi zdravimo dolečne degenerativne, presnovne, prirojene in rakaste bolezni, predvsem pa mehanske poškodbe tkiv in organov (Strbad in Roflman, 2005).

Razvoj metode PCR v realnem asu je izjemnega pomena, saj lahko z njo spremljamo izrafljanje specifičnih genov v zelo kratkem času in v majhnih količinah vzorcev. S PCR v realnem asu v vzorcu podvojujemo specifično tarčno sekvenco DNA, kopirajočo DNA pa spremljamo z merjenjem fluorescence. Ko fluorescenčni signal barvila doseže pravilno stopnjo, to lahko poveflemo s količino tarčne sekvence, kar nam omogoči kvantifikacijo DNA. Metoda PCR v realnem asu ima mnogo prednosti, ima pa tudi nekaj slabosti, na katere moramo biti pozorni pri delu z njo, saj nepravilna uporaba metode lahko vodi do napačne interpretacije rezultatov.

Kot kaflje, se v PK nahajajo populacija zgodnjih MC, saj smo v vzorcih mononuklearnih celic in v levkociti bogatem vzorcu krvi zaznali izrafljanje označevalcev pluripotentnosti (Oct-4A, Sox-2 in Nanog). Po pridobivanju vzorcev periferne krvi zdravih prostovoljcev smo izolirali RNA iz levkociti bogatega sloja krvi ter iz mononuklearnih celic, ki smo jih dobili z izolacijo na fikolu in nato z ločitvijo s sistemom StemSep™. Dobljeni rezultati potrjujejo, da se v periferni krvi odraslih oseb nahaja populacija celic, ki izraflja embrionalne označevalce in za katere predpostavljamo, da je sposobna nadaljnje diferenciacije.

V prihodnosti nasaka veliko dela na področju izolacije in identifikacije zgodnjih matih celic ter razvoj metod za njihovo uspešno gojenje in namnoščevanje. Predvidevamo, da bodo te celice dober vir matih celic za uporabo v celih matih terapijah in regenerativni medicini.

7 VIRI

- Akana A., Matsubara K., Nakamura H., Takahashi S., Kimura K. 1994. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstrains, a major inhibitor of polymerase chain reaction. *Journal of Forensic Sciences*, 39, 2: 362-372
- Al-Soud W.A., Jonsson L.J., Rådström P. 2000. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 345-350
- Al-Soud W.A., Rådström P. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2: 485-493
- Amit M., Carpenter M.K., Inokuma M.S., Chiu C.P., Harris C.P., Waknitz M.A., Itsakovitz-Eldor J., Thomson J.A. 2000. Clonally derived human embryonic stem cells lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental Biology*, 227: 271-278
- Apte A., Daniel S. 2009. PCR Primer Design. *Cold Spring Harb. Protoc.* V: PCR Primer: A Laboratory Manual. Dieffenbach C.W. in Dveksler G.S. (ur.). New York, CSHL Press, Cold Spring: 61-74
- Applied Biosystems. 2008. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR.
http://www.uoguelph.ca/~genomics/Genomics%20Facility%20_Seminar.pdf (4.6.2009)
- Asahara T., Kawamoto A. 2004. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 287: 572-579
- Atsasi Y., Mowla S.J., Ziaee S.A. M., Gokhale P.J. Andrews P.W. 2008. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and non-pluripotent cells. *Stem Cells*, 26: 3068-3074
- Avilon A.A., Nicolis S.K., Peny L.H., Perez L., Vivian N. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*, 17: 126-140
- Babaie Y., Herwig R., Greber B., Brink T.C., Wruck W., Groth D., Lehrach H., Burdon T., Adjaye J. 2007. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem cells*, 25: 5006-510
- Baabler TM 2006. Izraščanje genov pri obutljivi in odporni sorti krompirja (*Solanum tuberosum* L.) v zgodnjem odzivu na okuslbo s krompirjevim virusom Y^{NTN}: doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehnička fakulteta: 108 str.
- Beaudry P., Force J., Naumov G.N., Wang A., Baker C.H., Ryan A., Soker S., Johnson B.E., Folkman J., Hymach J.V. 2005. Differential effects of vascular endothelial

growth factor receptor-2 inhibitor ZD6474 on circulating endothelial progenitors and mature circulating endothelial cells: implications for use as a surrogate marker of antiangiogenic activity. Clinical Cancer Research, 11: 3514-3522

Beltrami A.P., Cesselli D., Bergamin N., Marcon P., Rigo S., Puppato E., D'Aurizio F., Verardo R., Piazza S., Pignatelli A., Poz A., Baccarani U., Damiani D., Fanin R., Mariuzzi L., Finato N., Masolini P., Burelli S., Belluzzi O., Schneider C., Beltrami C. A. 2007. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). Blood, 110, 9: 3438-3446

Bogart K., Andrews J. 2006. Extraction of total RNA from *Drosophila*. CGB Technical report, 10: 1-5

Bongso A., Richards M. 2004. History and perspective of stem cell research. Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, 18, 6: 827-842

Booth H.A.F., Holland P.W.H. 2004. Eleven daughters of NANOG. Genomics, 84, 229-238

Botquin V., Hees H., Fuhrmann G., Anastassiadis C., Gross M.K., Vriend G., Schöler H.R. 1998. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. Genes & Development, 12: 2073-2090

Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., Gifford D.K., Melton D.A., Jaenisch R., Young R.A. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell, 122: 947-956

Bradley M.B. 2001. Peripheral blood and bone marrow transplants. V: Pediatric Hematology/Oncology secrets. Weiner M.A. (ur.). ZDA, Elsevier Health Sciences: 191-197

Buhring H.J., Battula V.L., Treml S., Schewe B., Kanz L., Vogel, W. 2007. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. Annals of the New York Academy of Science, 1106: 262-271

Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry, 55, 4: 611-622

Caplan A.I. 1991. Mesenchymal stem cells. Journal of Orthopaedic Research, 9: 641-650

Carlin R., Davis D., Weiss M., Schultz B., Troyer D. 2006. Expression of early transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. Reproductive Biology and Endocrinology, 4: 8

Cesselli D., Beltrami A.P., Rigo S., Bergamin N., D'Aurizio F., Verardo R., Piazza S., Klaric E., Fanin R., Toffoletto B., Marzinotto S., Mariuzzi L., Finato N., Pandolfi M., Leri A., Schneider C., Beltrami C.A., Anversa P. 2009. Multipotent progenitor cells are present in human peripheral blood. *Circulation Research*, 1-37

Chambers I., Colby D., Robertson M., Nicols J., Lee S., Tweedie S., Smith A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113: 643-655

Cohen M.M. Jr. 2003. The Hedgehog signaling network. *American Journal of Medical Genetics*, 123: 5-28

Cumano A., Godin I. 2001. Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. *Current Opinion in Immunology*, 13:166-171

Czajkowska B., Naskalski J.W., Sznajd J. 1986. Ribonuclease from cytosolic fraction of human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 154, 1:19-27

Dheda K., Huggett J.F., Bustin S.A., Johnson M.A., Rook G., Zumla A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 37: 112-119

D'Ippolito G., Diabira S., Howard G.A., Menei P., Roos B.A., Schiller P.C. 2004. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *Journal of Cell Science*, 117, 14: 2971-2981

D'Ippolito G., Howard G.A., Roos B.A., Schiller P.C. 2006. Isolation and characterization of marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells. *Experimental Hematology*, 34, 11: 1608-1610

Docheva D., Popov C., Mutschler W., Schieker M. 2007. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11, 1: 21-38

Dušanić D. 2007. Spremljanje fenotipskih lastnosti love-kih hrustanih celic med gojenjem v alginat/agaroznem gelu, diplomsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehnička fakulteta, 52 str.

Dvorak P., Hampl A. 2005. Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. *Folia Histochemical Cytobiologica*, 43: 203-208

Dyce P.W., Zhu H., Craig J., Li J. 2004. Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316: 651-658

Fernandez M., Simon V., Herrera G., Cao C., Del Favero H., Minguez J.J. 1997. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplantation*, 20: 265-271

- FGF Pathway. 2009. Applied Biosystems (4.6.2009)
http://www.ambion.com/tools/pathway/form_handler.php?search_option=str_pathway&sub_option=eq&keyword=FGF (4.6.2009)
- Flege S., Pfaffl M.W. 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Molecular Aspects of Medicine, 27: 126-139
- Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Gerasimo U.V. 1987. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vivo* cultivation and transplantation in diffusion chambers. Cell and Tissue Kinetics, 20: 263-272
- Friedenstein A.J. 1976. Precursor cell of mechanocytes. International Review of Cell and Molecular Biology, 47: 327-359
- GE Healthcare. Isolation of mononuclear cells, methodology and applications. 2005. GE Healthcare. Ref Type: Catalog
- Gill M., Dias S., Hattori K. Rivera M.L., Hicklin D., Witte L., Girardi L., Yurt R., Himel H., Rafii S. 2001. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+) AC133(+) endothelial precursor cells. Circulation Research, 88: 167-174
- Glare E.M., Divjak M., Bailey M.J., Walters E.H. 2002. -Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. Thorax, 57: 765-770
- Hatano S.Y., Tada M., Kimura H., Yamaguchi S., Kono T., Nakano T., Suemori H., Nakatsuji N., Tada T. 2005. Pluripotent competence of cells associated with Nanog activity. Mechanism of Development, 122, 1: 67-79
- Hedgehog Signaling in Mammals. 2009. Applied Biosystems (4.6.2009)
http://www.ambion.com/tools/pathway/form_handler.php?search_option=str_pathway&sub_option=eq&keyword=hedgehog (4.6.2009)
- Herpin A., Cunningham C. 2007. Cross-talk between the bone morphogenic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. FEBS Journal, 274, 12: 2977-2985
- Hirschi K., Goddell M. 2001. Common origins of blood and blood vessels in adults? Differentiation, 68: 186-192
- Hyslop L., Stojkovic M., Armstrong L., Walter T., Stojkovic P., Przyborski S., Herbert M., Murdoch A., Strachman T., Lako M. 2005. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. Stem Cells, 23: 1035-1043
- International Stem Cell Initiative: Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. 2007. Nature Biotechnology, 25, 7: 803-816

- Jackson L., Jones D.R., Scotting P., Sottile V. 2007. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *Journal of Postgraduate Medicine*, 53, 2: 121-127
- Jauch R., Ng C. K., Saikatendu K.S., Stevens R.C., Kolatkar P.R. 2008. Crystal structure and DNA binding of the homeodomain of the stem cell transcription factor Nanog. *Journal of Molecular Biology*, 376, 3: 758-770
- Jefl, M. 2008. Identifikacija celic z embrionalnimi lastnostmi v kostnem mozgu odraslega loveka: diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehnička fakulteta: 77 str.
- Jiang Y., Vaessen B., Lenvik T., Blackstad M., Reyes M., Verfaillie C.M. 2002. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Experimental Hematology*, 30, 8: 896-904
- Jirmanova L., Afanassieff M., Gobert-Gosse S., Markossian S., Savetier P. 2002. Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, 8: 285-292
- Kassis I., Zangi L., Rivkin R., Levdansky L., Samuel S., Marx G., Gorodetsky R. 2006. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF- mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplantation*, 37: 967-976
- Kim S.J., Cheon S.H., Yoo S.J., Kwon J., Park J.H., Kim C.G. Rhee K., You S., Lee J.Y., Roh S.I., Yoon H.S. 2005. Contribution of the PI3K/Akt/PKB signal pathway to maintenance of self-renewal in human embryonic stem cells. *FEBS Letters*, 579: 534-540
- Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S. 2007. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research and Therapy*, 9, 1: 204
- Kotoula V., Papamichos S.I., Lambropoulos A.F. 2008. Revisiting OCT4 expression in peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cells*, 26, 1: 290-291
- Kruse C., Kajahn J., Petschnik A.E., Maass A., Klink E., Rapoport D.H., Wedel T. 2006. Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. *Annals of Anatomy*, 188: 503-517
- Kuçi S., Wessels J.T., Bühring H., Schilbach K., Schumm M., Seitz G., Löffler J., Bader P., Schlegel P.G., Neithammer D., Handgretinger R. 2003. Identification of novel class of human adherent CD34⁻ stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood*, 101, 3: 869-876

- Kucia M., Wu W., Ratajczak M.Z. 2007. Bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells: their developmental origin and biological significance, *Development and Dynamics*, 236, 12: 3309-3320
- Kucia M., Reca R., Campbell F.R., Zuba-Surma E., Majka M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2006a. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 20, 5: 857-869
- Kucia M., Zuba-Surma E., Wysoczynski M., Dobrowolska H., Reca R., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2006b. Physiological and pathological consequences of identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in adult bone marrow. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 57, 5: 5-18
- Kucia M., Halasa M., Wysoczynski M., Baskiewicz-Masiuk M., Moldenhawer S., Zuba-Surma E., Czajka R., Wojakowski W., Machalinski B., Ratajczak M.Z. 2007a. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia*, 21, 2: 297-303
- Kucia M., Zuba-Surma E.K., Wysoczynski M., Wu W., Ratajczak J., Machalinski B., Ratajczak M.Z. 2007b. Adult marrow-derived very small embryonic-like stem cells and tissue engineering. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7, 10: 1499-1514
- Kucia M., Wysoczynski M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2008a. Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell and Tissue Research*, 331, 1: 125-134
- Kucia M., Wysoczynski M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2008b. Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell and Tissue Research*, 331, 1: 125-134
- Kucia M., Wysoczynski M., Wu W., Zuba-Surma E.K., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2008. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells*, 26: 2083-2092
- Lamoury F.M., Croitoru-Lamoury J., Brew B.J. 2006. Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1. *Cyotherapy*, 8: 228-242
- Lee J., Kim H.K., Rho J.Y., Han Y.M., Kim J. 2006. The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 44: 33554-33565
- Li M., Pevny L., Lovell-Badge R., Smith A. 1998. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Current Biology*, 8: 971-974
- Ling T.Y., Kuo M.D., Li C.L., Yu A.L., Huang Y.H., Wu T.J., Lin Y.C., Chen S.H., Yu J. 2006. Identification of pulmonary Oct-4+ stem/progenitor cells and demonstration of

- their susceptibility to SARS coronavirus (SARS-CoV) infection in vitro. The Proceedings of the National Academy of Sciences Online USA, 103: 9530-9535
- Liu N., Lu M., Tian X., Han Z. 2006. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. Journal of Cellular Physiology, 211: 279-286
- Livak J.K., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25, 4:402-408
- Locatelli F., Maccario R., Frassoni F. 2007. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders? Haematologica, 92, 7: 872-877
- Ma H., Shieh K.J., Chen G., Qiao H.T., Chuang M.Y. 2006. Application of Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The Journal of American Science, 2, 3: 1-15
- Mancuso P., Burlini A., Pruneri G., Goldhirsch A., Martinelli G., Bertolini F. 2001. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. Blood, 97: 3658-3661
- Mansukhani A., Bellosta P., Sahni M., Basilico C. 2000. Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating Mutations Block Mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. The Juornal of Cell biology, 149, 6: 1297-1308
- McGuckin C.P., Forraz N., Baradez M.O., Basford C., Dickinson A.M., Navran S., Hartgerink J.D. 2006. Embryonic-like stem cells from umbilical cord blood and potential for neural modeling. Acta Neurobiologiae Experimentalis, 66: 321-329
- McGuckin C.P., Forraz N., Baradez M.O., Navran S., Zhao J., Urban R., Tilton R., Denner L. 2005. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. Cell Proliferation, 38, 4: 245-255
- Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M., Yamanaka S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell, 113, 5: 631-642
- Monzen K., Shiojima I., Hiroi Y., Kudoh S., Oka T., Takimoto E., Hayashi D., Hosoda T., Habera-Ohkubo A., Nakaoka T., Fujita T., Yazaki Y., Komuro I. 1999. Bone morphogenic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase TAK1 and cardiac transcription factor Csx/Nkx-2.5 in GATA-4. Molecular and Cell Biology, 10: 7096-7105
- Mueller O., Lightfoot S., Schroeder A. RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality Control. 2004. Agilent Technologies
- Nanog in Mammalian ESC Pluripotency. 2009. Applied Biosystems (2.4.2009)
http://www.ambion.com/tools/pathway/form_handler.php?search_option=str_pathway&sub_option=eq&keyword=nanog (3.5.2009)

- Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. 2002. Quantitative expression of Oct 3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24: 1-5
- Notch Signaling. 2009. Applied Biosystems (4.6.2009)
http://www.ambion.com/tools/pathway/form_handler.php?search_option=str_pathway&sub_option=eq&keyword=notch (4.6.2009)
- Oct4 in Mammalian ESC Pluripotency. 2009. Applied Biosystems (2.4.2009)
http://www.ambion.com/tools/pathway/form_handler.php?search_option=str_pathway&sub_option=eq&keyword=oct4
- Oertel M. Shafritz D.A. 2008. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782, 2: 61-74
- Okita K., Yamanaka S. 2006. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 1: 103-111
- Oswald F., Täuber B., Dobner T., Bourteau S., Kostecka U., Adler G., Liptay S., Schmid R.M. 2001. p300 acts as a transcriptional activator for mammalian Notch-1. *Molecular and Cellular Biology* 21, 22: 7761-7774
- Owen M. 1988. Marrow stromal stem cells. *Journal of Cell Science Supplement* 10: 63-76
- Pan G.J., Chang Z.Y., Schöler H.R., Pei D. 2002. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Research*, 12: 321-329
- Paling N.R., Whealon H., Bone H.K., Welham M.J. 2004. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 48063-48070
- PI3K Signaling. 2009. Applied Biosystems (4.6.2009)
<http://www.ambion.com/tools/pathway/pathway.php?pathway=PI3K%20Signaling> (4.6.2009)
- Polakis P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes and Development*, 14, 15: 1837-1851
- Prediger E., Smith T., Brown C. 2008. Molecular Guide for Stem Cell Researchers, Applied Biosystems: 104 str.
- Rafii S., Oz M.C., Seldomridge J.A., Ferris B., Asch A.S., Nachman R.L., Shapiro F., Rose E.A., Levin H.R. 1995. Characterization of hematopoietic cells arising on the textured surface of left ventricular assist devices. *The Annals of Thoracic Surgery*, 60: 1627-1632
- Ratajczak M.Z., Machalinski B., Wojakowski W., Ratajczak J., Kucia M. 2007a. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia*, 21, 5: 860-867

- Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Machalinski B., Kucia, M. 2007b. Bone-marrow-derived stem cells--our key to longevity? *Journal of Applied Genetics*, 48, 4: 307-319
- Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Machalinski B., Ratajczak J., Kucia M. 2008a. Very Small Embryonic-Like (VSEL) Stem Cells: Purification from Adult Organs, Characterization, and Biological Significance. *Stem Cell Review*, 4, 2: 89-99
- Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Wysoczynski M., Ratajczak J., Kucia M. 2008b. Very small embryonic-like stem cells: characterization, developmental origin, and biological significance. *Experimental Hematology*, 36, 6: 742-751
- Ratajczak M.Z., Kucia M., Majka M., Reca R., Ratajczak J. 2004. Heterogeneous population of bone marrow stem cells - are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia histochemica et cytopathologica*, 42, 3: 139-146
- Reményi A., Lins K., Nissen L.J., Reinbold R., Schöler H.R., Wilmanns M. 2003. Crystal structure of a POU/MHG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox on two enhancers. *Genes and Development*, 17: 2048-2059
- Reyes M., Li S., Foraker J., Kimura E., Chamberlain J.S. 2005. Donor origin of multipotent adult progenitor cells in radiation chimeras. *Blood*, 106, 10: 3646-3649
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98, 9: 2615-2625
- Reyes M., Verfaillie, C.M. 2001. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Annals of New York Academy of Sciences*, 938: 231-233
- Ribatti D. 2007. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leukemia Research*, 31, 4: 439-444
- Rodda D.J., Chew J.L., Lim L.H., Loh Y.H., Wang B., Ng H.H., Robson P. 2005. Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 26: 24731-24737
- Roufosse C.A., Direkze N.C., Otto W.R., Wright N.A. 2004. Circulating mesenchymal stem cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36: 585-597
- Schöler H.R., Hatzopoulos A.K., Balling R., Suzuki N., Gruss P. 1989. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO Journal*, 8, 9:2543-50
- Schuch G., Heymach J.V., Nomi M., Machluf M., Force J., Atala A., Eder J.P., Folkman J., Soker S. 2003. Endostatin inhibits the vascular endothelial growth factor-induced mobilization of endothelial progenitor cells. *Cancer Research*, 63: 8345-8350

- Schwartz R.E. Verfaillie, C. 2005. Adult stem cell plasticity. V: Human embryonic stem cells. J. Odorico, S.-C. Zhang, R. Pedersen. (ur.). BIOS Scientific Publishers, 45-55
- Serafini M., Dylla S.J., Oki M., Heremans Y., Tolar J., Jiang Y., Buckley S.M., Pelacho B., Burns T.C., Frommer S., Rossi D.J., Bryder D., Panoskaltsis-Mortari A., O'Shaughnessy M.J., Nelson-Holte M., Fine G.C., Weissman I.L., Blazar B.R., Verfaillie C.M. 2007. Hematopoietic reconstitution by multipotent adult progenitor cells: precursors to long-term hematopoietic stem cells. Journal of Experimental Medicine, 204, 1: 129-139
- Singson A., Mercer K.B., L'Hernault S.W. 1998. The *C. elegans* spe-9 gene encodes a sperm transmembrane protein that contains EGF-like repeats and is required for fertilization. Cell, 93, 1: 71-79
- Smith C. 2003. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. Cancer Control, 10, 1: 9-16
- Soker S., Schuch G., Williams J.K. 2008. Peripheral blood stem cells. V: Principles of regenerative Medicine. Atala A., Lanza R., Thomson J., Nerem R. (ur.). Academic press: 438-455
- SOX2 SRY (sex determining region Y)-box 2 [*Homo sapiens*], GeneID: 6657. 2008. ENZTREZ Gene (9. 6. 2009)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=Gene&Cmd>ShowDetailView&TermToSearch=6657&ordinalpos=5&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum (9.6.2009)
- StemSep negative selection procedure. 2005. Vancouver. StemCell Technologies.
 (29.5.2009)
http://www.stemcell.com/product_catalog/stemsep.asp (29.05.2009): str 1-2
- Strbad M. 2004. Osamitev in opredelitev love-kih mati nih celic iz kostnega mozga: diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, biotehnička fakulteta: 77 str.
- Strbad M., Rofman, P. 2005. Uporaba mati nih celic v medicini. Proteus, 67, 8: 340-348
- Suzuki A., Raya A., Kawakami Y., Morita M., Matsui T., Nakashima K., Gage F.H., Rodriguez-Esteban C., Belmonte J.C. 2006. Maintenance of embryonic stem cell pluripotency by Nanog-mediated reversal of mesoderm specification. Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine, 1: 114-122
- Takahashi K., Mitsui K., Yamanaka S. 2003. Role of ERas in promoting tumour like properties in mouse embryonic stem cells. Nature, 423: 541-545
- Takahashi K., Murakami M., Yamanaka S. 2005. Role of phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. Biochemical Society Transactions, 33: 1522-1525

Takeda J., Seino S., Bell G.I. 1992. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. Nucleic Acids Research, 20, 17: 4613-4620

TFG Signaling. 2009. Applied Biosystems (4.6.2009)
http://www.ambion.com/tools/pathway/form_handler.php?search_option=str_pathway&sub_option=eq&keyword=TGF (4.6.2009)

Theophilus B.D.M. 2008. Extraction of RNA from Fresh and Frozen Blood. Methods in Molecular Biology, 86:39-45

Thomas X., Troncy J. 2006. Haematopoietic stem cell transplantation: a historical overview. Haema, 9, 4: 482-495

Toplak N. 2006. Prouvanje molekularnih mehanizmov odpornosti proti virusu PVY^{NTN} v gensko spremenjenih rastlinah krompirja (*Solanum tuberosum* L.) sorte 'Igor': doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehnička fakulteta: 194 str.

Ulloa-Montoya F., Kidder L.B., Pauwelyn K.A., Chase L.G., Luttun A., Crabbe A., Geraerts M., Sharov A., Piao Y., Ko S.H.M., Hu W-S., Verfaillie C.M. 2007. Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity. Genome Biology, 8: R163

Urbich C., Dimmeler S. 2004. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. Circulation Research, 95, 4: 343-353

Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education, 29: 151-159

Verfaillie C.M. 2002. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. Trends in Cell Biology, 12: 502-508

Verfaillie C.M. 2005. Multipotent adult progenitor cells: an update. Novartis Foundation Symposium, 265: 55-61

Virant-Klun I., Zech N., Rozman P., Vogler A., Cvjeticanin B., Klemenc P., Malicev E., Meden-Vrtovec H. 2008. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. Differentiation, 76, 8: 843-856

Xu C., Rosler E., Jiang J., Lebowski J.S., Gold J.D., O'Sullivan C., Delavan-Boorsma K., Mok M., Bronstein A., Carpenter M.K. 2005. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. Stem Cells, 23: 315-323

WNT Signaling. 2009. Applied Biosystems (4.6.2009)
http://www.ambion.com/tools/pathway/form_handler.php?search_option=str_pathway&sub_option=eq&keyword=WNT (4.6.2009)

Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantification. BioTechniques, 39: 75-85

Wrana J.L., Attisano L., Cárcamo J., Zentella A., Doody J., Laiho M., Wang X.F., Massagué J. 1992. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. Cell, 71, 6: 1003-1014

Yu H., Fang D., Kumar S.M., Li L., Nguyen T.K., Acs G., Herlyn M., Xu X. 2006. Isolation of novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. American Journal of Pathology, 168: 1879-1888

Zangrossi S., Marabese M., Broggini M., Giordano R., Døerasmo M., Montelatici E., Intini D., Neri A., Pesce M., Rebulla P., Lazzari L. 2007. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. Stem Cells, 25:1675-1680

Zeng L., Rahrmann E., Hu Q., Lund T., Sandquist L., Felten M., O'Brien T.D., Zhang J., Verfaillie C. 2006. Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow. Stem Cells, 24: 2355-2366

Zipori D. 2005. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. Stem Cells, 23, 6: 719-726

Zuba-Surma E.K., Wu W., Ratajczak J., Kucia M., Ratajczak M.Z. 2009. Very small embryonic-like stem cells in adult tissues- Potential implications for aging. Mechanisms of Ageing and Development, 130: 58-66

Zvaifler N.J., Marinova-Mutafchieva L., Adams G., Edwards C.J., Moss J., Burger J.A., Maini R.N. 2000. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. Arthritis Research, 2: 477-488

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. dr. Miomirju Kneflevi u, ki me je popeljal v svet matih celic in predstavil pomen teh celic v regenerativni medicini.

Somentorici in delovni mentorici, dr. Tini Cirman, se najlepše zahvaljujem za potrpefljivost in pomoč pri uvajanju v laboratoriju, za spodbude, zaupanje ter pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvala gre tudi recenzentki doc. dr. Tanji Kunej in somentorici dr. Tini Cirman za strokovni pregled naloge.

Zahvaljujem se Zavodu RS za transfuzijsko medicino, ki mi je finančno omogočil izvedbo raziskave ter Mojci Jefl in ostalem osebju, ki mi je kakorkoli pomagalo pri nastanku diplomske naloge.

Zahvala gre tudi izr. prof. dr. Primoflu Rofšmanu, ker mi je omogočil izvedbo raziskave.

Hvala dr. Tadeji Dov Drnovšek za oligonukleotidne za etnike označevalca RhD inton 4 in vso pomoč pri delu.

Zahvaljujem se Centru za funkcionalno genomiko in bioteknologijo, posebej Uršuli Prosenc in Heleni Klavflar.

Hvala tudi dr. Metki Kračun, Center za tipizacijo tkiv, Zavod RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani za celice fibroblastov.

Zahvala gre tudi Susanne Ström iz laboratorija dr. Outija Hovatta, Karolinska University Hospital, Stockholm, Tyskland za izolirano RNA embrionalnih matih celic.

Iskreno se zahvaljujem vsem, ki ste mi kakor koli pomagali pri nastajanju tega dela.

Najlepša hvala tudi moji družini, ker so verjeli vame, me spodbujali in mi omogočili vse potrebno, da sem delo lahko pripeljala do konca.