

RAPORT KOŃCOWY

z wykonania Etapu II Analiza ekspresji genów za pomocą metody Real-time PCR projektu pn. „Pozyskiwanie farmaceutyków drogą analizy chemicznej i ich izolacji do badań podstawowych”.

W ramach niniejszego zadania planowano zbadać poziom ekspresji 35 genów, kodujących geny dla czynników transkrypcyjnych i innych białek obecnych w komórkach macierzystych MIC-1. Wybrane do badań geny odpowiadają m.in. za regenerację naskórka, skóry, ścięgien, nerwów czy kości. Sprawdzano poziom ekspresji następujących genów:

- czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF2), EGF czynnik wzrostu naskórka (EGF) - istotne dla procesu regeneracji rogówki;
- białko morfogenetyczne kości 7 (BMP7), białko morfogenetyczne kości (BMP12) – biorące udział w regeneracji ścięgien;
- czynnik wzrostu nerwów (NGF), czynnik neurotroficzny pochodzący z mózgu (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina (NT-4), czynnik wzrostu pochodzący z siatkówki (RDGF), czynnik neurotroficzny pochodzący z gleju (GDNF), czynnik neurotroficzny pochodzący z ciała rzęskowego (CNTF) – odpowiedzialne za regenerację nerwów;
- czynnik wzrostu keratynocytów (KGF), insulino-podobny czynnik wzrostu 1 (IGF1), insulino-podobny czynnik wzrostu 2 (IGF2), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), transformujący czynnik wzrostu β 1 (TGF β 1), czynnik wzrostu nowotworów α (TGF α), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), czynnik stymulujący tworzenie koloni granulocytów (G-CSF), angiopoetyna 1 (Ang1), angiopoetyna 2 (Ang2), erytropoetyna (EPO), trombopoetyna (TPO) – biorące udział w procesach regeneracji skóry;
- białko morfogenetyczne kości 2 (BMP2), białko morfogenetyczne kości 4 (BMP4), czynnik wzrostu pochodzący z płytek (PDGF), czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF) uczestniczące w regeneracji kości;
- interleukiny-1 i -12 (IL-2, IL12) - czynniki hamujące procesy zapalne;
- kolagen I, II i VII, laminina, fibronektyna - białka macierzy zewnątrzkomórkowej;
- czynnik wzrostu łożyska (PGF).

Na podstawie dostępnych w bazach sekwencji nukleotydowych dla poszczególnych genów, zaprojektowano zestawy starterów do reakcji PCR oraz zestawy starterów i sond do reakcji Real-Time PCR dla wszystkich genów. Należy nadmienić, iż genom jelenia nie został w całości zsekwencjonowany, dlatego też startery projektowano głównie do sekwencji ludzkich oraz bydła domowego. Ponieważ czynniki wzrostu są konserwatywne wśród organizmów żywych, taka metodyka badań była uprawniona. W celu sprawdzenia specyficzności zaprojektowanych starterów (oraz poprawności ich zaprojektowania, jak również dopasowania do genów jelenia), przeprowadzono reakcje Real-time PCR dla 35 genów i sprawdzono produkty reakcji przez wykonanie krzywej topnienia. Poziom ekspresji poszczególnych genów określano techniką Real-Time PCR, metodą krzywej standardowej. W tym celu uzyskane matryce rozcieńczano oraz amplifikowano, wyznaczając krzywe standardowe dla poszczególnych genów.

Wyniki pozytywne uzyskano dla 6 genów (NGF, IGF2, KGF, TGF β 1, FGF2, GAPDH) i dla tych genów kontynuowano dalsze badania. W przypadku pozostałych genów, jeszcze czterokrotnie projektowano nowe zestawy starterów, specyficznych wobec innych fragmentów tych genów, za każdym razem uzyskując wyniki negatywne w eksperymentach

wstępnych (próby wykreślenia krzywych topnienia po amplifikacji fragmentów genów techniką Real-Time PCR).

W związku z uzyskanymi wynikami wywnioskowano iż:

- wybrane czynniki są ekspresjonowane na bardzo niskim poziomie w komórkach MIC-1, poniżej progu detekcji techniki Real-Time PCR,
- spośród genów, dla których zaprojektowano specyficzne startery, najwyższy poziom ekspresji określono dla TGF β oraz KGF,
- czynniki wzrostu TGF β oraz KGF, biorą udział między innymi w regulacji wzrostu i regeneracji komórek skóry (keratynocytów), co może po części świadczyć o pozytywnym wpływie komórek MIC-1 na ich regenerację i na potencjalne zastosowanie w leczeniu schorzeń skórnych i kosmetologii,
- poprawność metodologii prowadzonych eksperymentów potwierdzono przez określenie poziomu ekspresji genu referencyjnego dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH),
- ponieważ nie określono poziomu ekspresji większości wybranych genów, można spekulować o różnicach w ich sekwencji pomiędzy genami ludzkimi/bydlęcymi a genami komórek MIC-1 z poroży jelenia szlachetnego. W związku z powyższym istnieje silna potrzeba zsekwencjonowania genomu jelenia i ponowne oznaczenie poziomu ekspresji interesujących nas genów w przyszłości.

Szczegółowe wyniki analizy znajdują się w załączniku.