

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA KRESNIK

**Vpliv miR-195-5p na izražanje genov za elongazo maščobnih
kislin 6, oksidazo Cyp26B1, C terminalno domeno glutation S-
transferaze in proto-onkogen c-Myb v osteosarkomski celični
liniji**

**The effect of mir-195-5p on expression of fatty acid elongase 6,
oxidase Cyp26B1, glutathione S-transferase C-terminal domain
containing and c-Myb proto-oncogene genes in osteosarcoma
cell line**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, Katedri za klinično biokemijo, pod mentorstvom prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom asist. dr. Nike Marije Lovšin, univ. dipl. kem.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorici, asist. dr. Niki Mariji Lovšin, univ. dipl. kem., za pomoč, prijaznost in potrpežljivost ter za vse strokovne nasvete, tako pri delu v laboratoriju, kot tudi pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim sodelavcem na Katedri za klinično biokemijo.

Najlepša hvala staršem, bratu in sestri, posebno partnerju Matevžu in prijateljem za njihovo podporo tekom celotnega študija. Hvala tudi Karolini Zgaga za pomoč pri lektoriranju.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Nike Marije Lovšin, univ. dipl. kem.

Anja Kresnik

KAZALO VSEBIN

POVZETEK	VI
ABSTRACT	VIII
KLJUČNE BESEDE/KEYWORDS	IX
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1 UVOD	1
1.1 OSTEOPOROZA	1
1.2 KOSTNE CELICE	1
1.2.1 Osteoblasti	1
1.2.2 Osteoklasti	1
1.2.3 Osteociti.....	1
1.3 REMODELACIJA KOSTNEGA TKIVA	2
1.4 POMEMBNEJŠI PROCESI, KI URAVNAVAJO KOSTNO REMODELACIJO	3
Signalna pot RANKL/RANK/OPG pri uravnavanju osteoklastogeneze	3
1.4.1 Signalna pot Wnt/ β katenin pri uravnavanju osteoblastogeneze.....	4
1.4.2 Signalna pot BMP pri uravnavanju osteoblastogeneze	4
1.5 miRNA IN POTENCIALNA VLOGA V URAVNAVANJU KOSTNE REMODELACIJE	5
1.5.1 Zorenje miRNA	5
1.5.2 Delovanje miRNA	6
1.6 miRNA IN KOSTNE CELICE	6
1.6.1 miRNA in osteoblasti	6
1.6.2 miRNA in osteoklasti	7
1.7 miR-195-5p	7
1.8 PREUČEVANI GENI	8
1.8.1 <i>GST-CD</i> (C-terminalna domena glutation S-transferaze)	8
1.8.2 <i>ELOVL6</i> (elongaza maščobnih kislin 6).....	8
1.8.3 CYP26B1 (oksidaza CYP26B1).....	8
1.8.4 <i>c-Myb</i> (proto-onkogen <i>c-Myb</i>).....	9

2	NAMEN.....	10
3	MATERIALI IN METODE.....	11
3.1	PRIPRAVA PLAZMIDNIH VEKTORJEV Z DELNIM ZAPOREDJEM TARČNIH GENOV IN NJIHOVIH MUTIRANIH VARIANT Z METODO MOLEKULSKEGA KLONIRANJA.....	11
3.1.1	Priprava gojišč	11
3.1.2	Priprava oligonukleotidov za tarčne gene.....	12
3.1.3	Restrikcija vektorja.....	13
3.1.4	Ligacija in nastanek rekombinantne DNA	14
3.1.5	Transformacija.....	14
3.1.6	Izolacija plazmida iz bakterij.....	15
3.1.7	Elektroforeza	16
3.1.8	Izolacija plazmida iz gela	17
3.1.9	Pridobivanje višjih koncentracij plazmida (MidiPrep).....	17
3.2	VSTAVLJANJE PLAZMIDNE DNA ALI miRNA V SESALSKE CELICE.....	19
3.2.1	Štetje celic.....	19
3.2.2	Gojenje celic	20
3.2.3	Ko-transfekcija	21
3.2.4	Transfekcija miRNA mimikov	21
3.3	IZOLACIJA RNA IN TVOBA cDNA	22
3.3.1	Izolacija RNA.....	22
3.3.2	Obratna transkripcija (RT-PCR).....	23
3.4	MERJENJE IZRAŽANJA TARČNIH GENOV V PRISOTNOSTI miRNA MIMIKOV IN DOLOČANJE DIREKTNEGA VPLIVA miRNA MIMIKOV NA TARČNE GENE	24
3.4.1	Test luciferazne aktivnosti.....	24
3.4.2	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (Q-PCR).....	25
4	REZULTATI.....	28
4.1	PRIPRAVA PLAZMIDNIH VEKTORJEV Z DELNIM ZAPOREDJEM TARČNIH GENOV IN NJIHOVIH MUTIRANIH VARIANT Z METODO MOLEKULSKEGA KLONIRANJA.....	28

4.1.1	Restrikcija vektorja in agarozna elektroforeza	28
4.2	PREVERJANJE USPEŠNOSTI LIGACIJE	30
4.2.1	Vizualni pregled plošč	30
4.2.2	Sekveniranje plazmidne DNA in uporaba bioinformatičnega orodja	31
4.3	REZULTATI DVOJNEGA LUCIFERAZNEGA TESTA	33
4.4	VPLIV miR-195-5P NA IZRAŽANJE TARČNIH GENOV	35
4.4.1	Izolacija RNA iz sesalskih celic	35
4.4.2	Relativna kvantifikacija – metoda standardne krivulje	36
4.4.3	Statistična obdelava rezultatov dobljenih s Q-PCR.....	38
5	RAZPRAVA	44
5.1	Povezava miR-195-5p s kostnim tkivom.....	46
6	SKLEP.....	48
7	LITERATURA	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Nukleotidna zaporedja posameznih oligonukleotidov.	12
Preglednica II: Reakcijska shema prileganja oligonukleotidov.	12
Preglednica III: Mešanica reagentov za restrikcijo vektorja.	13
Preglednica IV: Mešanica reagentov za izvedbo ligacije.	14
Preglednica V: Količine posameznih reagentov uporabljenih pri ko-transfekciji v ploščici s 24 luknjicami.	21
Preglednica VI: Količine reagentov uporabljenih pri RT-PCR.....	23
Preglednica VII: Program za izvedbo RT-PCR.....	24
Preglednica VIII: Količine reagentov za izvedbo Q-PCR.....	26
Preglednica IX: Serijsko redčenje standardov.....	27
Preglednica X: Program za izvedbo Q-PCR.....	27
Preglednica XI: Izmerjene povprečne koncentracije RNA.	36
Preglednica XII: Rezultati razmerij valovnih dolžin, ki določajo čistost RNA.	36
Preglednica XIII: Prikaz povprečnega relativnega izražanja gena <i>GST-CD</i>	38

Preglednica XIV: Relativna kvantifikacija podatkov za vzorec z miR-195-5p transfeciranih HOS celic in netransfeciranih celic po 48 urah.	38
Preglednica XV: Prikaz povprečnega relativnega izražanja gena <i>ELOVL6</i>	40
Preglednica XVI: Prikaz povprečnega relativnega izražanja gena <i>CYP26B1</i>	41
Preglednica XVII: Prikaz povprečnega relativnega izražanja gena <i>c-Myb</i>	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Diferenciacija kostnih celic [prirejeno po 5]. Levo je prikazana diferenciacija celic MSC v osteoblaste, desno pa je prikazan razvoj osteoklastov.	2
Slika 2: Remodelacija kostnega tkiva [prirejeno po 5].	3
Slika 3: RANKL/RANK/OPG-pot [prirejeno po 4].	4
Slika 4: Zorenje miRNA [prirejeno po 15].	6
Slika 5: Hemocitometer za štetje celic.	20
Slika 6: Vektor <i>pmirGLO</i> in MCS-poliklonska mesta kloniranja [povzeto po 44].	29
Slika 7: Potovanje razrezanega, v primerjavi z nerazrezanim plazmidom <i>pmirGLO</i> na agarozni elektroforezi.	29
Slika 8: Vizualno preverjanje pozitivnosti ligacije.	30
Slika 9: Nukleotidna zaporedja plazmidov, ki smo jih pridobili z molekulskim kloniranjem.	31
Slika 10: Preverjanje ujemanja plazmida <i>pmirGLO-CYP26B1</i> v programu BLAST.	32
Slika 11: Relativna luciferazna aktivnost plazmidnih vektorjev s tarčnimi geni <i>GSTCD</i> in <i>ELOVL6</i> ter kontrolnim vektorjem <i>pmirGLO</i> , v prisotnosti sintetičnih mimikov miR-195-5p 48 h po transfekciji celic HOS.	33
Slika 12: Relativne luciferazne aktivnosti plazmidnih konstrukтов s tarčnim genom <i>CYP26B1</i> , v prisotnosti sintetičnih mimikov miR-195-5p. Luciferazna aktivnost je bila izmerjena 48 h po transfekciji celic HOS.	34
Slika 13: Naraščanje fluorescence v odvisnosti od časa.	37
Slika 14: Izražanje gena <i>GST-CD</i> v celicah HOS v prisotnosti mimika 195-5p.	39
Slika 15: Vpliv mimikov miR-195-5p na izražanje <i>ELOVL6</i>	40
Slika 16: Vpliv mimikov miR-195-5p na izražanje gena za <i>CYP26B1</i>	42
Slika 17: Vpliv mimikov miR-195-5p na izražanje gena za <i>c-Myb</i>	43

POVZETEK

Dandanes osteoporoza predstavlja velik zdravstveni problem. Je večgenska in več faktorska metabolična, skeletna bolezen, pri kateri lahko spremembe v izražanju genov vodijo do porušene mikroarhitekture kostnega tkiva in s tem do povečane šibkosti kosti ter številnih zlomov. Izražanje genov uravnavajo t. i. mikroRNA (miRNA), 22 nukleotidov dolge, enoverižne molekule RNA. Z vezavo na tarčno 3' UTR-regijo v različnih obveščevalnih mRNA povzročijo njeno razgradnjo ali pa le zavrejo njeno translacijo. Zaradi svoje stabilnosti in prisotnosti v skoraj vseh telesnih tekočinah bi lahko bile miRNA-molekule uporabne tudi kot terapevtske učinkovine in diagnostični markerji.

Namen naše raziskave je bil, ugotoviti, ali miRNA-195-5p vpliva na izražanje štirih izbranih tarčnih genov: C-terminalno domeno glutation S-transferaze (*GST-CD*), elongazo maščobnih kislin 6 (*ELOV6*), oksidazo *CYP26B1* in proto-onkogen *c-Myb*. Ta vpliv smo preverjali na dva načina in z dvema metodama. Z merjenjem luciferazne aktivnosti smo dokazovali neposredno vezavo miRNA-195-5p na tarčna zaporedja v izbranih genih, nato pa s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času izmerili vpliv miRNA na izražanje vsakega od izbranih genov. Testiranje luciferazne aktivnosti je potekalo tako da smo najprej z molekulskim kloniranjem izdelali reporterske plazmidne konstrukte in njihove mutirane variante, ki so služile kot pozitivna kontrola. Sledila je transfekcija človeških osteosarkomskih celic (celice HOS), v katere smo vstavili plazmidne vektorje in spremljali luciferazno aktivnost.

Rezultati luciferaznih testov so pokazali, da se miRNA-195-5p neposredno veže na tarčna zaporedja v C-terminalni domeni glutation S-transferaze (*GST-CD*) in oksidazi *CYP26B1*, medtem ko te vezave na tarčnih zaporedjih v genih za elongaze maščobnih kislin 6 ter proto-onkogen *c-Myb* nismo dokazali.

Preverjanje vpliva na izražanje genov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času je potekalo nekoliko drugače. Mimike za miRNA-195-5p smo vstavili v osteosarkomske celice, nato izolirali RNA, jo z reverzno transkripcijo prepisali v enoverižno cDNA in s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času preverili izražanje genov za C-terminalno domeno glutation S-transferaze, elongazo maščobnih kislin 6, oksidazo *CYP26B1* in proto-onkogen *c-Myb*, pri čemer smo kot referenčni gen

uporabili *RPLP0*. Rezultati kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času so pokazali, da miRNA-195-5p statistično značilno vpliva na izražanje C-terminalne domene glutation S-transferaze in oksidaze *CYP26B1*, na izražanje ostalih dveh tarčnih genov pa ta miRNA ni imela vpliva. Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da miRNA-195-5p neposredno uravnava (zavira) izražanje genov *GST-CD* in *CYP26B1*. V prihodnje bo potrebno proučiti vpetost obeh genov v patogenezo osteoporoze.

ABSTRACT

Nowadays, osteoporosis is one of the most concerning medical issues. It is metabolic and skeletal disease. Alterations in expression of some genes cause degradation in bone micro architecture and furthermore increase bone weakness and fractures. Small molecules, so called micro RNAs (miRNAs) may play important role in state of osteoporosis. Due to their stability and presence in almost every body fluid, they can be used as therapeutic or diagnostic markers. However, they are 22 nucleotide long, one-stranded molecules which affect expression of many genes. They regulate gene expression by targeting messenger RNA as they degrade it or prevent it's translation.

Intention of our research was to test the effect of miRNA-195-5p on expression of glutathione S-transferase C-terminal domain containing, fatty acid elongase 6, oxidase *CYP26B1*, and *Myb* proto-oncogene genes using two methods Dual-Luciferase® Reporter Assay System and real time polymerase chain reaction. To measure relative luciferase activity at first we have constructed reporting vectors containing plasmids and their suitable mutant variation, which were used for positive control. Then we inserted them in osteosarcoma cells and after 48h detected micro RNA's influence on gene expression. Second method was slightly different from the first one. We used real time polymerase chain reaction. Firstly, we put mimics of miRNA-195-5p into the osteosarcoma cells and after 24h and 48h we isolated the produced RNA. Furthermore, isolated RNA was converted in one-stranded cDNA by reverse polymerase chain reaction and it was multiplied in the next step using real time polymerase chain reaction. The results showed that statistically influenced genes are glutathione S-transferase C-terminal domain containing and oxidase *CYP26B1*. On the other hand fatty acid elongase 6 and *Myb* proto-oncogene genes are not affected by miRNA-195-5p. We found out the same using luciferase method. To proof our conclusions, more researches should be done.

KLJUČNE BESEDE/KEYWORDS

Osteoporoza, mikroRNA, luciferazna aktivnost, kvantitativna reakcija s polimerazo v realnem času, transfekcija, molekulska kloniranje

Osteoporosis, microRNA, luciferase activity, real time polymerase chain reaction, transfection, molecular cloning

SEZNAM OKRAJŠAV

3'UTR	3' neprevedena regija (ang. <u>U</u> n <u>t</u> r <u>a</u> nslated <u>R</u> egion)
BMP	kostni morfogenski protein
bp	bazni par
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
c-Myb	proto-onkogen cMyb (ang. avian myeloblastosis viral oncogene homolog)
CYP26B1	oksidaza citokrom P450 (ang. oxidase CYP26B1)
DMEM	ang. Dulbecco's modified eagle medium
ELOVL6	elongaza maščobnih kislin 6 (ang. ELOVL fatty acid elongase 6)
FBS	ang. Fetal bovine serum
GSTCD	C-terminalna domena glutation S-transferaze (ang. Glutathion S-transferase C-terminal)
HOS	človeški osteosarkom (ang. Human osteosarcoma)
miRNA	mikroRNA
MSC	mezenhimske matične celice
MCS	poliklonsko mesto
OPG	osteoprotegerin

PBS	fosfatni pufer
pDNA	plazmidna deoksiribonukleinska kislina
Pre-miRNA	prekurzorska mikro RNA
Pri-miRNA	primarna mikro RNA
Q-PCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RLA	relativna luciferazna aktivnost
RISC	RNA induciran utišujoč kompleks
RUNX2	osteoblastno specifični transkripcijski dejavnik 2

1 UVOD

1.1 OSTEOPOROZA

Osteoporozna je s starostjo povezana degenerativna kostna bolezen (1). Je sistemska, metabolična bolezen skeleta, ki se kaže v nizki kostni gostoti in spremembi mikroarhitekture kostnega tkiva. Oboje vodi do povečane šibkosti in lomljivosti kosti ter do osteoporoznih zlomov (2–4). Pogosteje se pojavlja pri starejši populaciji, večinoma pri ženskah v postmenopavzalnem obdobju, vendar pa lahko prizadene tudi moške (3).

1.2 KOSTNE CELICE

1.2.1 Osteoblasti

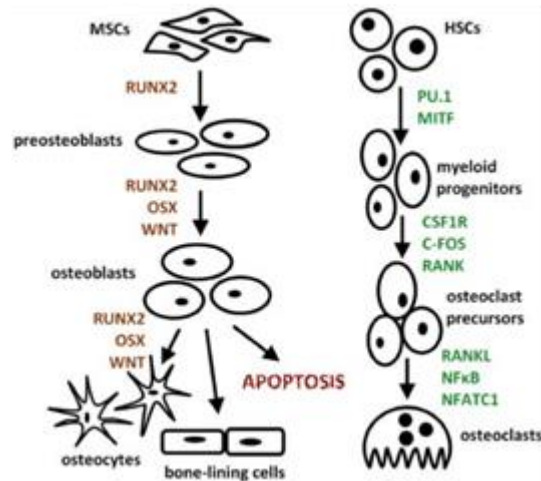
Osteoblasti so enojedrne celice, ki izvirajo iz mezenhimskih celic. Osteoblasti so zaslužni za izgrajevanje kosti, hkrati pa spodbujajo tvorbo in delovanje osteoklastov. Tvorijo kolagenski del kosti ter izločajo lokalne faktorje RANKL, OPG, interlevkine, TGF beta, IGF, FGF, TNF in PDGF (4).

1.2.2 Osteoklasti

Osteoklasti delujejo nasprotno od osteoblastov, resorbirajo kostno tkivo. So mnogojedrne celice, ki se razvijejo iz hematopoetskih celic makrofagno-monocitne vrste. Osteoklasti sintetizirajo lizosomske encime, ki jih izločijo v zunajcelični prostor. Tako znižajo lokalni pH in povzročijo, da se hidroksiapatit raztopi. Njihovo delovanje spodbujajo CFD, TNF, RANKL, IL-1 ter IL-6 (4).

1.2.3 Osteociti

Osteoblasti se lahko preoblikujejo v celice, osteocite, ki so obdani z kostno lamelo ali pa se nahajajo na površini kosti. Osteociti naj bi igrali pomembno vlogo pri zaznavanju statičnih obremenitev, s čimer sprožijo krepitev kosti (4).



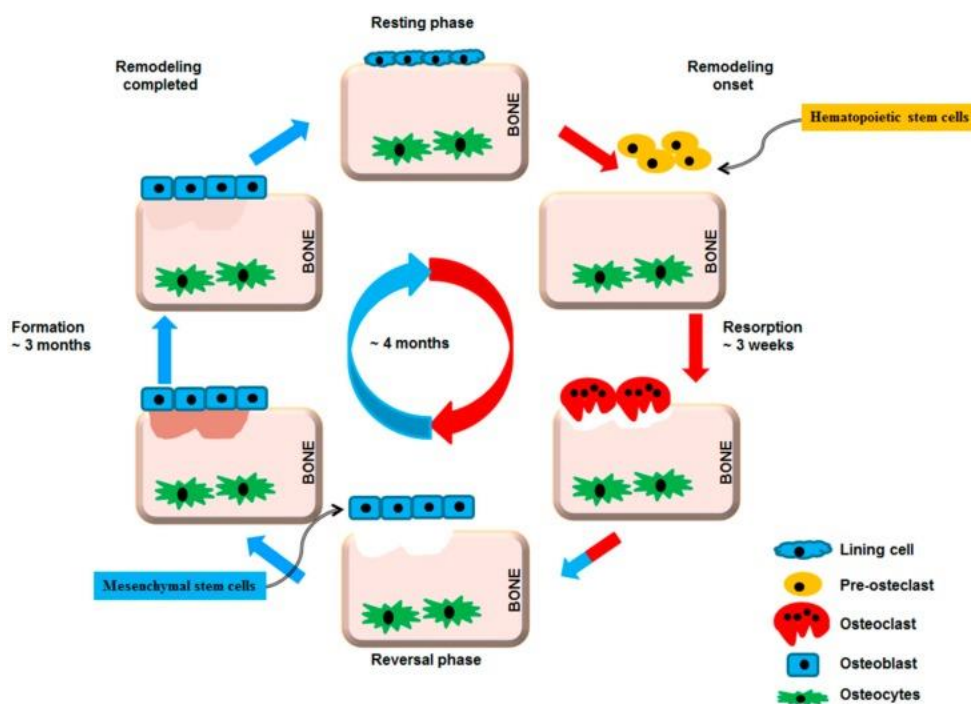
Slika 1: Diferenciacija kostnih celic [prirejeno po 5]. Levo je prikazana diferenciacija celic MSC v osteoblaste, desno pa je prikazan razvoj osteoklastov.

1.3 REMODELACIJA KOSTNEGA TKIVA

Za lažje razumevanje, kako pride do osteoporoze, moramo najprej spoznati kostno remodelacijo oz. homeostazo kostnega tkiva (5). Kost je živa, ves čas se razgrajuje in izgrajuje, torej stalno poteka remodelacija kostnega tkiva. Za zagotavljanje dobre homeostaze je zaslužna visoko regulirana interakcija med dvema celičnima linijama (6).

Sodelujejo osteoblasti, ki tvorijo kostno tkivo, in osteoklasti, katerih vloga je resorpcija kostnega tkiva (5). Proces remodelacije delimo na več faz. Začne se s fazo aktivacije, v kateri se neaktivni ploščati osteoblasti razmaknejo in razgalijo kostno površino, kar sproži fazo pridobivanja osteoklastov (4). Osteoklastni prekurzorji dozoriijo v večcelične, kratkoživeče in visoko aktivne osteoklaste in raztopijo minerale ter sprožijo encimsko degradacijo organskega matriksa (5). Gre za fazo resorpcije, kjer nastane kostna laguna (Howshipova lakuna). Temu sledi faza preobrata. V tej fazi se osteoklasti odmaknejo, mononuklearni fagociti pa očistijo dno votline, da se lahko prične mineralizirati. V zadnji fazi – fazi mirovanja – laguno zapolnijo neaktivni osteoblasti (4, 5).

Proces remodelacije lahko pogledamo še bližje, z vidika sodelujočih signalnih poti. Za vzdrževanje opisanega ravnovesja je zelo pomemben transkripcijski faktor RUNX2, ki je ključen regulator osteoblastogeneze. Deluje kot nekakšno križišče več signalnih poti (7). Povezuje Wnt- in BMP-signalno pot, ki sta poleg RANKL/RANK/OPG-poti najpomembnejši signalni poti v osteogenezi (8, 9).

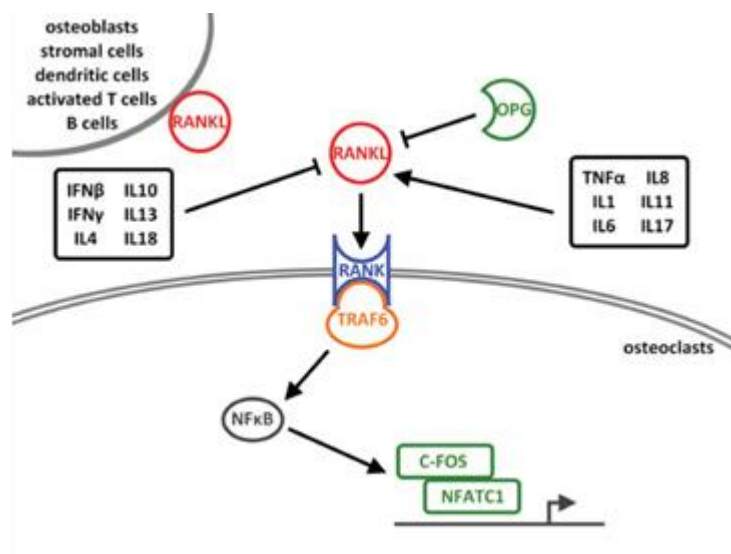


Slika 2: Remodelacija kostnega tkiva [prirejeno po 5].

1.4 POMEMBNEJŠI PROCESI, KI URAVNAVAJO KOSTNO REMODELACIJO

Signalna pot RANKL/RANK/OPG pri uravnavanju osteoklastogeneze

RANKL/RANK/OPG-signalna pot je odločilna za kostno resorpcijo. Osteociti, ki sodelujejo kot nekakšni senzorji, spodbudijo osteoblaste k izločanju regulatornega faktorja RANKL, ki se nadalje veže na molekulo RANK, izraženo na membrani osteoklastov (3, 10, 11). Z vezavo RANKL-RANK se aktivira osteoklastogeneza (9). Osteoblasti in osteociti izločajo tudi negativni regulator – OPG. Ta deluje kot vaba, veže se na RANKL in s tem prepreči vezavo RANKL-RANK ter posledično zavre osteoklastogenezo (3, 11). Ko se povežeta RANK-RANKL, se pojavi TRAF6. Ta aktivira številne signalne poti in transkripcijske faktorje. Eden izmed teh faktorjev je NF κ B, ki aktivira faktor C-FOS, ta pa povzroči delovanje NFATC1 ter regulira izražanje osteoklastnih genov. OPG in nekateri citokinski vnetni faktorji – IFN β , IFN γ , IL4, IL10, IL13, IL18 – zavirajo osteoklastogenezo. Nasprotno pa delujejo TNF α , IL1, IL6, IL8, IL11, IL17 (5).



Slika 3: RANKL/RANK/OPG-pot [prirejeno po 4].

1.4.1 Signalna pot Wnt/ β katenin pri uravnavanju osteoblastogeneze

Wnt-ligandi, ki sodelujejo pri Wnt/ β katenin-poti, imajo pomembno vlogo pri regulaciji osteoblastov. Lahko so β -katenin odvisni ali neodvisni (11). Signalna pot se začne, ko specifični, t. i. Frizzled proteini z LRP-5/6 tvorijo receptorski kompleks, na katerega se veže Wnt-ligand. Pri tem se sprosti faktor β -katenin, ki spodbuja proliferacijo in diferenciacijo osteoblastov. Prenese se v jedro, kjer skupaj z TCF-4 in LEF-1 vpliva na izražanje RUNX2 in osterixa ter na inhibicijo OPG. Wnt-sistem deluje še na nekatere druge faktorje. Preko izločanja Frizzled podobnega proteina 1 – Sfrp1 – zavira osteoklastogenezo. Omenjeni protein se namreč kompetitivno veže na RANKL in zmanjšuje resorpcijo kostnega tkiva (8).

1.4.2 Signalna pot BMP pri uravnavanju osteoblastogeneze

Pri tej poti se v uravnavanje nastajanja osteoblastov vključujejo proteini BMP ali kostni morfogenetski proteini. To so citokini, ki spadajo med transformirajoče rastne faktorje β . Vežejo se na BMP-receptorje, sestavljene iz heterodimerov in dveh različnih Ser/Therkinaznih receptorjev. S specifično fosforilacijo aktivirajo SMAD1, SMAD5 in SMAD8, ki se nato povežejo v komplekse s Co-Smad (Smad 4) ter se prenesejo v jedro (11). Z vplivom na izražanje določenih genov krepijo osteogenezo.

Križišče vseh opisanih poti predstavlja transkripcijski regulator RUNX2, ki je nepogrešljiv v vseh pogledih osteoblastogeneze (5). RUNX2 regulira gene za osteopontin (OPN), kostni sialoprotein (BSP) in osteokalcin (OCN) ter je bistven za aktivacijo SMAD-sistema preko BMP. Povečano izražanje RUNX2 krepi osteoblastogenezo (8, 9).

Pri normalnem odraslem človeku kostna remodelacija torej temelji na ravnovesju visoko vzdrževane diferenciacije, aktivnosti in apoptoze osteoblastov ter osteoklastov, kar zagotavljajo številni regulatorni geni. Spremembe v teh regulatornih genih pa lahko vodijo do pojava osteoporoze (12).

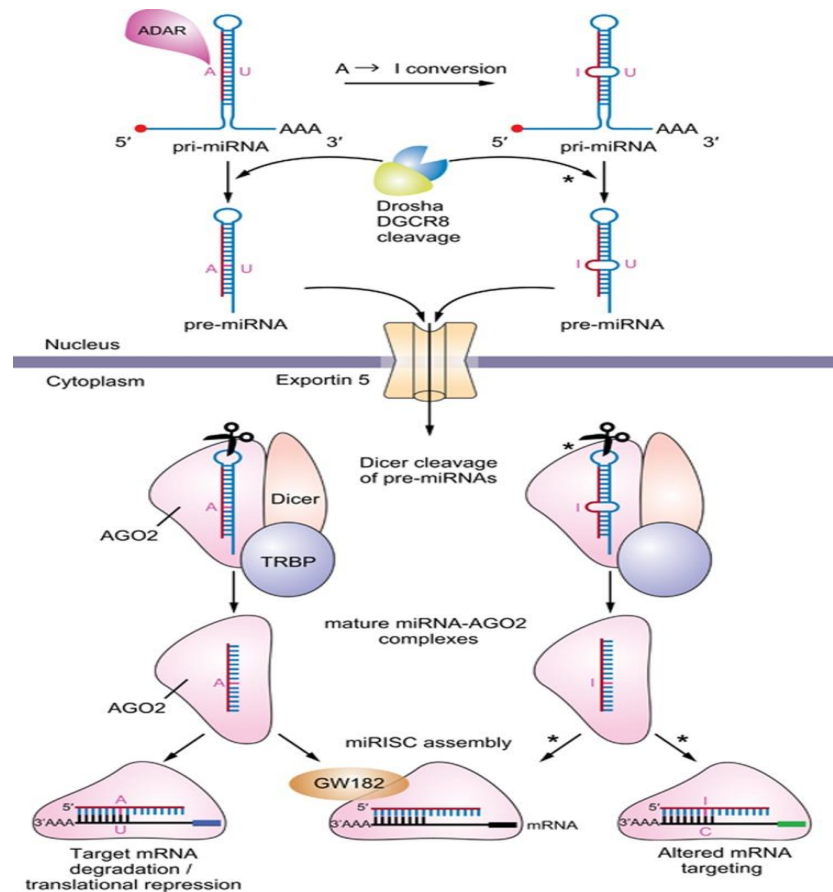
1.5 miRNA IN POTENCIALNA VLOGA V URAVNAVANJU KOSTNE REMODELACIJE

miRNA so kratke, 22 nukleotidov dolge, enoverižne, endogene RNA, ki sodelujejo pri regulaciji genskega izražanja. Nahajajo se v intronih protein-kodirajočih genov, v intronih in eksonih nekodirajočih genov ter na 3' UTR-regijah protein-kodirajočih genov (13, 14).

miRNA se lahko vpletajo v celični cikel, regulirajo apoptozo, preživetje celic in sodelujejo pri drugih procesih metabolizma in diferenciacije. Povezane so z normalnim razvojem kože, mišic, živcev, hrustanca in kosti. Raziskave so pokazale, da igrajo pomembno vlogo tudi pri boleznih, kot so rak, diabetes, nevrološke motnje, srčne bolezni, pljučna hipertenzija in avtoimunske bolezni (11).

1.5.1 Zorenje miRNA

Zorenje miRNA poteka v jedru in citoplazmi. V jedru celice kompleksa Drosha (RNA-polimeraza III) in DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) pretvorita pri-miRNA, ki je več tisoč nukleotidov dolga veriga v krajši, 70 nukleotidov dolg prekursor pre-miRNA. Exportin 5 veže pre-miRNA in jo prenese v citoplazmo, kjer jo Dicer (RNA-polimeraze II) z več zaporednimi cepitvami pretvori v zrelo dvovijačnico, 18–25 nukleotidov dolgo miRNA. Ena izmed verig nastalega kompleksa miRNA/miRNA* se nato poveže z Argonaute proteinom (AGO2). miRNA se kasneje vključi v RISC (RNA induciran utišajoč kompleks) in tvori kompleks mRISC, v takšni obliki pa je pripravljena na vezavo s tarčno mRNA (14, 15).



Slika 4: Zorenje miRNA [prirejeno po 15].

1.5.2 Delovanje miRNA

miRNA regulirajo gensko ekspresijo. Komplementarno se vežejo na 3' UTR-neprevedeno regijo mRNA, s t. i. SEED-sekvenco (11, 16). Regulacija lahko poteka na dva načina. Popolno prileganje miRNA in mRNA vodi do degradacije mRNA, medtem ko je z nepopolnim prileganjem zavrtja le translacija. SEED-sekvenca miRNA je zelo kratka, zaradi česar se lahko miRNA veže na več sto različnih mRNA (13).

1.6 miRNA IN KOSTNE CELICE

1.6.1 miRNA in osteoblasti

Znanih je kar nekaj miRNA, ki se pojavljajo med diferenciacijo osteoblastov. miR-2861 in miR-3960 posredno vplivata na izražanje RUNX2, s tem da zavreta transkripcijo njegovih inhibitorjev. Njuna povečana ekspresija spodbudi osteoblastogenezo, ki je inducirana z

BMP2. (5, 12). mir-3960/mir-2861 skupaj z RUNX2 tvorita pozitivno povratno regulacijo, s čimer spodbujajo osteoblastogenezo. Ključna pri osteoblastni diferenciaciji je tudi miR-29(11). Deluje tako, da regulira Wnt/ β -katenin-signalno pot.

1.6.2 miRNA in osteoklasti

miRNA-molekule sodelujejo tudi pri normalnem procesu osteoklastogeneze. Zabeležili so tri glavne miRNA, ki so povezane z regulacijo osteoklastogeneze: miR-21, miR-155 in miR-223 (12). miR-21 je miRNA, ki jo lahko zaznamo v dentritičnih celicah, v T-celicah in v prekurzorjih B-celic. Visoko izražena je tudi v tumorskih celicah, poleg tega igra pomembno vlogo pri avtoimunskih boleznih in regulaciji osteoklastogeneze (17). Sodeluje v osteoblastogenezi, ki je inducirana preko RANKL in regulira osteoklastno formacijo preko pozitivne povratne zanke c-Fos/mir-21/PDCD4 (18, 19).

Nasprotno miR-155 zavira osteoklastno diferenciacijo, saj inhibira izražanje SOCS1 in MITF, ki sta pozitivna regulatorja resorpcije kostnega tkiva. V raziskavi, narejeni na laboratorijskih miših, je bilo dognano, da so te v veliko manjši meri izgubljale kostno maso ob prisotnosti miR-155 (11). miR-155 bi lahko bila v prihodnosti pomemben člen v zdravljenju osteoporoze (12).

Vedno bolj raziskana pa je tudi vloga miR-223. Poleg njene vloge v kostnem tkivu se pojavlja tudi v maščevju in tkivu srčne mišice. Sodelovala naj bi pri diferenciaciji, vnetnih procesih in rakavih obolenjih (19). Povečano izražanje miR-223 zavira zorenje preosteoklastnih celic v TRAP-pozitivne večcelične zrele osteoklaste (12).

1.7 miR-195-5p

miRNA-195-5p so najprej odkrili pri miših, nato pa še pri ljudeh. Gre za miRNA družine 15/16/195/424/497. Nahaja se na kromosomu 17p13.1, in sicer na intronu 7. miR-195-5p naj bi povečala celično delitev in celično apoptozo ter inhibirala celično proliferacijo. Dokazali so, da sodeluje pri veliko boleznih – raku dojke, hepatocelularnem raku, levkemiji in shizofreniji ter tudi osteoporozi (14). V primerjavi z navadnimi celicami je v osteosarkomskih celicah negativno regulirana. Kljub mnogim raziskavam pa njena vloga še vedno ni v celoti pojasnjena (20).

1.8 PREUČEVANI GENI

Tarčne gene, opisane v nadaljevanju poglavja smo določili na podlagi bioinformatičnih analiz. Te so pokazale, da naj bi vsebovali zaporedje na katerega se veže miR-195-5p.

1.8.1 GST-CD (C-terminalna domena glutation S-transferaze)

Gen *GST-CD* je izražen v celicah dihalne poti (21). Nahaja se na kromosomu 4q24 in ima 14 eksonov (22). GST-genska družina je pri ljudeh zelo kompleksna; sestavljena je iz 16 genov, ki so razvrščeni v šest družin. Eden izmed genov je tudi *GST-CD*-protein, ki naj bi sodeloval pri kataliziranju konjugacije glutationa v produkte oksidativnega stresa in s tem prispeval k celični detoksifikaciji (21). Kakorkoli fiziološka vloga *GST-CD* še vedno ni popolnoma raziskana.

1.8.2 ELOVL6 (elongaza maščobnih kislin 6)

Gen *ELOVL6* ima zapis za mikrosomalni encim, ki je odgovoren za endogeno sintezo maščobnih kislin (23). Gen se nahaja na 4q25-kromosomu in vsebuje osem eksonov (24). *ELOVL6* spada v skupino encimov, ki imajo pomembno vlogo v biosintezi maščobnih kislin. Sodelujejo pri podaljševanju dolgih verig maščobnih kislin in so vezani na membrano endoplazmatskega retikuluma (25). Funkcionalne analize, opravljene na gojenih celicah, so pokazale, da naj bi ta vrsta encimov specifično katalizirala podaljševanje nasičenih in mononasičenih maščobnih kislin z 12, 14 ali 16 ogljikovimi atomi. Encim *ELOVL6* po zadnjih raziskavah povezujejo tudi z občutljivostjo na inzulin (24).

1.8.3 CYP26B1 (oksidaza CYP26B1)

CYP26B1-gen kodira protein, ki spada med citokrome P450, natančneje v družino 26, podružino B in je polipeptid 1. Poznane so tri izoforme – *CYP26A1*, *CYP26B1* in *CYP26C1* – ki kodirajo citokrom P450, encim, ki katabolizira retinojsko kislino (RA) (26, 27).

CYP26B1-protein je lokaliziran na endoplazmatskem retikulumu. Deluje kot kritični regulator transretinojskih kislin, ki jih s hidroksilacijo inaktivira. Mutacije v izražanju gena za ta encim vodijo do pojava skeletnih anomalij. Kot posledica povečanega izražanja omenjenega gena se lahko razvijejo tudi aterosklerotične lezije (28).

1.8.4 *c-Myb* (proto-onkogen *c-Myb*)

Gen *c-Myb* je znan tudi pod imenom *Myb* in je onkogen. Lokaliziran je na kromosomu 6q23.3 in ima 19 eksonov. Ta gen sodeluje pri regulaciji hematopoeze, saj je regulator transkripcijskega faktorja, ki je potreben za normalno hematopoezo pri odraslem človeku. Klinične študije so pokazale veliko odstopanje njegovega izražanja v rakavih celicah. Izražen naj bi bil pri akutni levkemiji, melanomu, raku dojke, raku debelega črevesja in tudi pri raku trebušne slinavke. Njegovo izražanje lahko kontrolirajo specifične miRNA (29).

2 NAMEN

Namen magistrske naloge je preveriti rezultate, dobljene z bioinformatičnimi analizami, ki so pokazale, da nosijo geni *GST-CD*, *ELOVL6*, *CYP26B1* in *c-Myb* tarčno 3' UTR-zaporedje za miR-195-5p. Namen magistrske naloge je potrditi hipotezo:

miR-195-5p inhibira izražanje tarčnih genov *GST-CD*, *ELOVL6*, *CYP26B1* in *c-Myb* v sesalski osteosarkomski celični liniji HOS preko direktne vezave na 3' UTR-zaporedje.

Glede na oblikovano hipotezo smo oblikovali cilje naše naloge:

- Z molekularnim kloniranjem pripraviti rekombinantno DNA – plazmide *pmirGLO-GST-CD*, *pmirGLO-ELOVL6*, *pmirGLO-CYP26B1* in njihove pozitivne kontrole *pmirGLO-GST-CD mut*, *pmirGLO-ELOVL6 mut* ter *pmirGLO-CYP26B1 mut*.
- Z luciferaznim testom izmeriti inhibitorno aktivnost miRNA miR-195-5p na tarčne mRNA-gene *GST-CD*, *ELOVL6* in *CYP26B1* v sesalski osteosarkomski celični liniji HOS.
- Določiti vpliv miR-195-5p na izražanje genov za *GST-CD*, *ELOVL6*, *CYP26B1* in *c-Myb* s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA PLAZMIDNIH VEKTORJEV Z DELNIM ZAPOREDJEM TARČNIH GENOV IN NJIHOVIH MUTIRANIH VARIANT Z METODO MOLEKULSKEGA KLONIRANJA

Molekularno kloniranje je skupek postopkov, s katerimi lahko rekombinantno DNA prokariotskega ali evkariotskega izvora vstavimo v plazmidni ali virusni vektor. Najprej smo pripravili tarčni insert s prileganjem dveh protismernih komplementarnih oligonukleotidov. Hkrati smo razrezali plazmidni poročevalski vektor *pmirGLO*, v katerega smo kasneje z ligacijo vstavili tarčni segment (insert). Temu je sledila transformacija, metoda privzema gole DNA v ekspresijski sistem. Po transformaciji smo plazmid izolirali iz bakterij in z restrikcijo ter z agarozno elektroforezo preverili prisotnost DNA inserta v plazmidu. Plazmidom, ki so vsebovali zelene DNA inserte smo določili tudi nukleotidno zaporedje.

3.1.1 Priprava gojišč

LB-tekoče gojišče

Pred transformacijo smo pripravili LB-tekoče gojišče. 10 g LB Broth Base (proizvajalca Sigma-Aldrich) smo natehtali v 500 ml stekleničko in dopolnili z ultračisto vodo do oznake. Vse skupaj smo premešali in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

LBA-trdno gojišče

Pripravili smo ga tako, da smo zatehtali 20 g LB Broth Base (proizvajalca Sigma-Aldrich), 7,5 g agarja (proizvajalca Fluka) in v 1000 ml steklenički dopolnili z ultračisto vodo do oznake. Nato smo dobro premešali in sterilizirali 15 minut pri 121 °C na programu za tekočine. Po sterilizaciji smo počakali, da se je gojišče ohladilo na približno 55 °C, potem smo sterilno (ob gorilniku) dodali 1 ml antibiotika ampicilina (100 mg/ml; proizvajalca Sigma-Aldrich), premešali in vlili na plošče, primerne za trdno gojišče.

LBA-tekoče gojišče

Naredili smo medij po navodilu za LB-tekoče gojišče (za 250 ml) in mu dodali 250 μ l ampicilina (proizvajalca Sigma-Aldrich; 100 mg/ml).

3.1.2 Priprava oligonukleotidov za tarčne gene

Iz kupljenih oligonukleotidov smo s prileganjem dveh oligonukleotidov pripravili tarčne molekule: *GST-CD*, *GST-CD mut*, *ELOVL6*, *ELOVL6 mut*, *CYP26B1* in *CYP26B1 mut*.

Preglednica I: Nukleotidna zaporedja posameznih oligonukleotidov.

Oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje
GST-CD_miR195_ F	5'-GAGGCGAGTGGTCTGCG-3'
GST-CD _miR195_ R	5'-TTCATTGGGTCACCTGGTCG-3'
ELOVL6_miR195_ F	5'-CAAAGCACCCGAAGTAGGAGA-3'
ELOVL6 _miR195_ R	5'-GGAGCACAGTGATGTGGTGA-3'
CYP26B1_miR195_ F	5'-TGGACCTCCTCATTGAGAGCA-3'
CYP26B1_miR195_ R	5'-GGCATAGGCCGCAAAGATCA-3'

Materiali

- oligonukleotidi (proizvajalec Sigma-Aldrich; 100 μ M)
- 5 μ M NaCl
- dH₂O

Postopek

Preglednica II: Reakcijska shema prileganja oligonukleotidov.

REAGENT	VOLUMEN
F-oligonukleotidni začetnik (100 μ M)	20 μ L
R-oligonukleotidni začetnik (100 μ M)	20 μ L
NaCl 5 μ M	20 μ L
dH ₂ O	20 μ L
	80 μ L

V 1,5 ml sterilno epico smo napipetirali F- in R-oligonukleotidni začetnik za posamezen gen, nato NaCl in na koncu še vodo. Epico smo dali v časo, v kateri je bila voda segreta na 95 °C. Epico smo v vodni kopeli inkubirali 3–5 minut, nato pa čašo skupaj z epico postavili na led, da smo zmes ohladili na sobno temperaturo. Med ohlajanjem je potekalo prileganje dveh komplementarnih oligonukleotidov in nastal je DNA insert, ki smo ga uporabili pri ligaciji.

3.1.3 Restrikcija vektorja

Restrikcija je tehnika, pri kateri smo vektor razrezali z dvema restriksijskima encimoma, da smo kasneje vanj lahko vstavili DNA insert. Uporabljali smo vektor *pmirGLO* in restriksijske endonukleaze iz skupine TIP II,: Xho I in Xba I.

Materiali

- Xho I (proizvajalec *BioLabs® Inc.*)
- Xba I (proizvajalec *BioLabs® Inc.*)
- pDNA (*pmirGLO* 300 ng/μl)
- NEB SmartCut 10x (proizvajalec *BioLabs® Inc.*)
- dH₂O

Postopek

Preglednica III: Mešanica reagentov za restrikcijo vektorja.

REAGENT	VOLUMEN
Xho I	1 μl
Xba I	1 μl
<i>pmirGLO</i> 300 ng/μl	6 μl
NEB SmartCut 10x	1,5 μl
dH ₂ O	5,5 μl
	15 μl

V 1,5 ml epico smo napipetirali pDNA, NEB SmartCut 10x in dH₂O in vse skupaj kratko centrifugirali. Nato smo dodali oba encima, pri čemer smo pazili, da smo ju imeli ves čas na ledu. Restriksijsko zmes smo inkubirali v vodni kopeli 2 uri pri 37 °C. Po 2 urah inkubacije smo naredili elektroforezo in razrezan plazmid izrezali iz gela.

3.1.4 Ligacija in nastanek rekombinantne DNA

Ligacija je metoda, pri kateri DNA insert vstavimo v razrezan plazmidni vektor, da nastane rekombinantna DNA. DNA-ligaze katalizirajo nastanek fosfodiesterne vezi med 5'-fosfatom ene in 3'-hidroksilno skupino druge verige – tvori se kovalentna vez med insertom in vektorjem.

Materiali

- pDNA (razrezan vektor)
- oligonukleotidni insert (razredčen 1 : 200)
- 10xT4 buffer (proizvajalec *BioLabs® Inc.*)
- T4-ligaza (proizvajalec ThermoFisher Scientific)

Postopek

Preglednica IV: Mešanica reagentov za izvedbo ligacije.

REAGENT	VOLUMEN
razrezan pmirGLO	1 µl
oligonukleotid CYP (1 : 200)	7 µl
10xT4 EG buffer	1 µl
T4-ligaza	1 µl
	10 µl

Med postopkom ligacije smo pazili, da smo imeli 10xT4 EG pufer in T4-ligazo ves čas na ledu. Encima ligaze nismo centrifugirali ali vorteksirali. V 1,5 ml epico smo napipetirali pDNA, insert in 10x T4 EG-pufer. Reagente smo premešali, centrifugirali in na koncu dodali še T4-ligazo. Ligacija je potekala 16 ur na 4 °C.

3.1.5 Transformacija

Transformacija je proces, pri katerem gostiteljska celica privzame golo DNA. Plazmid lahko v ekspresijski sistem vstavimo s toplotnim šokom ali z elektroporacijo. V našem primeru smo izvedli transformacijo s toplotnim šokom. CaCl₂ je povzročil, da se je plazmid pritrdil na steno bakterijske celice, toplotni šok pa, da je celica sprejela molekulo DNA. Naše gojišče je bilo selekcijsko gojišče LBA, ki je vsebovalo antibiotik ampicilin.

Materiali

- One Shot® Top10 kompetentne celice E. coli
- LB-tekoče gojišče
- LBA-trdno gojišče

Postopek

Najprej smo kompetentne celice odtajali na ledu, potem smo celicam s pipeto dodali 5 μ l ligacijske zmesi in 30 minut inkubirali na ledu. Sledila je inkubacija v vodni kopeli 45 sekund pri 42 °C. Po inkubaciji smo epice prestavili nazaj na led ter sterilno – ob ognju – dodali 250 μ l LB-tekočega gojišča in stresali 1 uro na 37 °C in 225 rpm. Zmes celic in gojišča smo ob ognju nanegli na LBA-trdno gojišče. Za vsako epico smo uporabili dve LBA-trdni gojišči. Na prvo smo nanegli 100 μ l zmesi. Preostanek smo 5 minut centrifugirali pri 3000 x g in zopet nanegli 100 μ l na drugo ploščo. Plošče smo zavili v alufolijo in inkubirali 24 ur pri 37 °C. Po 24 urah smo preverili, ali so kolonije zrastle, plošče smo prevlekli s parafilmom, jih zavili v alufolijo ter jih do enega meseca hranili na 4 °C.

3.1.6 Izolacija plazmida iz bakterij

Po postopku transformacije smo iz zrastih kolonij izolirali plazmid s kitom QIAprep® Miniprep (QIAGEN) po protokolu Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge.

Materiali

- QIAprep® Miniprep
- QIAprep Spin kolone 50x
- Pufer P1
- Pufer P2
- Pufer N3
- Pufer PB
- Pufer PE
- Voda brez RNase
- Zbiralne epice (2 ml)
- LBA-tekoč medij

Postopek

Delali smo ob plamenu. V sterilno epruveto smo napipetirali 5 ml LBA-medija, v katerega smo nacepili eno kolonijo bakterij *E. coli* in stresali 16–18 ur v inkubatorju na 37 °C in 225 rpm. Preden smo začeli z delom, smo pripravili potrebne raztopine. Pufra PE smo dodali 96 % etanol. Vse korake, ki jih je bilo potrebno centrifugirati, smo centrifugirali pri 13 000 rpm, razen kjer je bilo označeno drugače. 1–5 ml prekonočne kulture *E. coli* v LBA-mediju smo prenesli v 2 ml epico in centrifugirali na 12 000 rpm 1 minuto. Odvečen LBA-medij smo odlili, peletko pa resuspendirali v 250 µl pufra P1. Dodali smo 250 µl pufra P2 in premešali z nežnim obračanjem epice 4–6x, da je raztopina postala viskozna in čista. Nato smo dodali 350 µl pufra N3 in z obračanjem 4–6x premešali, da je raztopina postala motna (v primeru uporabljenega LyseBlue-reagenta se je modra raztopina razbarvala). Centrifugirali smo 10 minut v zaprti centrifugi. 800 µl supernatanta smo prenesli v QIAprep Spin kolono in centrifugirali 30–60 sekund. Kolono smo sprali s 500 µl PB pufrom in centrifugirali 30–60 sekund. Potem pa kolono sprali s 750 µl PE-pufrom in centrifugirali 30–60 sek. Da smo kolono dobro osušili, smo še dodatno centrifugirali 1 minuto na maksimalni hitrosti. Kolono smo prestavili v čisto 1,5 ml epico in na sredino kolone napipetirali 50 µl vode. Pustili smo stati 1 minuto in nato 1 minuto centrifugirali. Filtrat, ki je vseboval izoliran plazmid, smo shranili na -20 °C.

3.1.7 Elektroforeza

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev. Pozitivno nabiti delci potujejo v smeri negativno nabite elektrode, medtem ko negativno nabiti delci potujejo v smeri pozitivno nabite elektrode. Hitrost potovanja je odvisna od velikosti in oblike DNA, koncentracije agaroze, napetosti električnega polja ter sestave elektroforeznega pufra.

Materiali

- Agarosa (proizvajalec Sigma-Aldrich)
- TAE puffer (Tris-EDTA)
- Miodori Green (proizvajalec Nippon Genetics)
- 6x nanašalni pufer
- PCR-marker (proizvajalec Promega)
- DNA molecular weight marker II (0,12-23,1 kBp) (proiz. Roche)

Priprava agaroznega gela

V 100 ml erlenmajerico smo zatehtali 1 g agaroze, dodali 100 ml pufra TAE in segrevali, da se je agarozna raztopila. Pustili smo, da se je raztopina nekoliko ohladila in dodali 3 μ l barvila Miodori Green ter gel ulili v pripravljen model z glavnikom za 20 žepkov. Počakali smo 30 minut, da se je gel strdil.

Postopek

Pred nanosom na elektroforezo smo vzorcem dodali 2 μ l nanašalnega pufra. Vse skupaj smo prenesli v žepke v gelu. V prva dva žepka smo napipetirali po 5 μ l markerjev, v ostale žepke smo napipetirali naše vzorce. Gel smo prekrili s TAE-pufrom, nato pa elektroforezo pustili teči 20 minut pri napetosti 80 V in toku 100 mA.

3.1.8 Izolacija plazmida iz gela

Postopek

Plazmid smo izolirali iz gela po protokolu QIAquick® Gel Extraction Kit proizvajalca Qiagen. Pod UV-lučko smo s skalpelom izrezali plazmid, ga prenesli v epico in stehali. Dodali smo 3-kratni volumen pufra QG k 1 volumnu gela in 10 minut inkubirali na 50 °C. Na 2–3 min smo vorteksirali, da se je gel v celoti raztopil. Potem smo dodali 1 volumen izopropanola in zmešali. QIAquick kolono smo namestili v 2 ml epico. 800 μ l zmesi smo prenesli v kolono in centrifugirali 1 minuto pri 17900 x g. Filtrat smo zavrgli, kolono pa sprali z 750 μ l pufra PE. Centrifugirali smo 1 minuto 17900 x g, zavrgli filtrat in ponovno centrifugirali pri istih pogojih, s tem smo popolnoma osušili membrano. Kolono smo premestili v 1,5 ml epico, v center kolone dodali 30 μ l destilirane vode, pustili stati 1 minuto in centrifugirali 1 minuto pri 17900 x g. Koncentracijo plazmida smo spektrofotometrično določili na napravi NanoDrop. Izoliran plazmid smo shranili na – 20 °C.

3.1.9 Pridobivanje višjih koncentracij plazmida (MidiPrep)

V primeru pozitivnih plazmidov smo zopet naredili transformacijo in izolacijo pozitivnega plazmida. Najprej smo naredili postopek transformacije, kot je že opisan, nato pa smo nacepili bakterije v tekoč LBA-medij. Izolacijo smo naredili s kitom PureYield™ Plasmid

Midiprep System po protokolu Standard DNA Purification Protocol. Plazmide, ki smo jih izolirali, smo kasneje uporabili za merjenje luciferazne aktivnosti.

Materiali

- Raztopina za resuspendiranje CRA
- Lizirajoča raztopina CLA
- Nevtralizacijska raztopina NSB
- Raztopina za odstranjevanje endotoksinov
- Raztopina za spiranje kolone
- Voda brez nukleaz
- PureYield Clearing-kolona™
- PureYield Binding-kolona™

Postopek

Delali smo ob ognju. V sterilno erlenmajerico smo napipetirali 100 ml LBA-medija in vanj nacepili eno kolonijo. Erlenmajerico smo pokrili z alufolijo in vse skupaj dali stresati čez noč (16–21 ur) v inkubator na 37 °C. Prvih pet korakov smo delali ob plamenu. 50 ml prekonočne kulture smo odpipetirali v sterilno 50 ml falkonko. Nato smo falkonko centrifugirali 10 minut pri 5000 x g. Odlili smo supernatant in odvečen medij odcedili na papirnati brisači. Peletko smo resuspendirali v 3 ml raztopine za resuspendiranje. Dodali smo 3 ml lizirajoče raztopine in rahlo premešali z obračanjem falkonke 3–5-krat. Nato smo 3 minute inkubirali pri sobni temperaturi. Liziranim celicam smo dodali 5 ml nevtralizacijske raztopine in premešali z obračanjem falkonke 5–10-krat. Lizat smo centrifugirali 15 minut pri 15000 x g.

PureYield™ Clearing-kolono smo namestili na vrh PureYield™ Binding-kolone. Obe koloni skupaj smo nato namestili na vakuumski zbiralnik. Lizat iz falkonke smo odpipetirali v PureYield™ Clearing-kolono, pri tem pa pazili, da zraven nismo odpipetirali tudi peletke. Počasi smo dovajali vakuum tako dolgo, da je tekočina stekla skozi obe koloni. Nato smo tlak počasi zapirali, previdno, da se koloni nista sneli. PureYield™ Clearing-kolono smo odstranili in dodali 5 ml raztopine za odstranjevanje endotoksinov. Počasi smo začeli dovajati tlak, da je tekočina stekla skozi kolono. Nato smo dodali 20 ml raztopine za spiranje kolone in počasi začeli dovajati tlak. Membrano smo posušili, tako da smo tlak dovajali še od 30 sekund do 1 minute. Pod kolono smo namestili 1,5 ml epico,

zataknilo smo jo v Eluator™ Vacuum Elution Device. Na sredino kolone smo napipetirali 400–600 μl vode brez nukleaz in pričeli dovajati tlak, dokler se plazmid ni eluiral v epico. Koncentracijo plazmida smo izmerili na napravi NanoDrop.

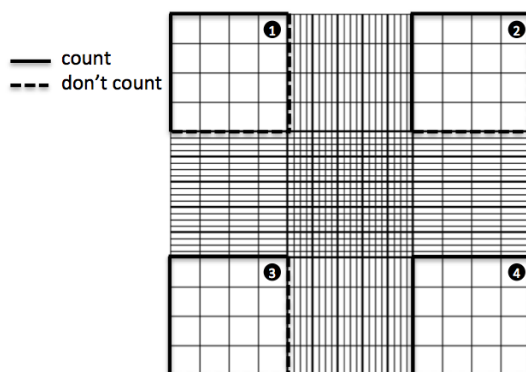
3.2 VSTAVLJANJE PLAZMIDNE DNA ALI miRNA V SESALSKE CELICE

Materiali

- Sesalske celice (HOS-celice)
- Medij brez antibiotikov (10 % FBS v DMEM; proiz. Sigma-Aldrich)
- 1X PBS
- 0,25 % tripsin (proizvajalec Gibco)
- ploščica s 24 luknjicami
- ploščica s 6 luknjicami
- Plazmidna DNA (0.1-3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- RNAi (2 μM)
- RNAi-kontrole
- Lipofectamine™ 2000 Reagent (proizvajalec Invitrogen)
- Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (proiz. Sigma-Aldrich)

3.2.1 Štetje celic

10 μl resuspendiranih celic smo napipetirali na ploščico za štetje (hemocitometer) in pogledali pod invertnim mikroskopom. V štirih kvadratih (slika 5) smo prešteli celice, izračunali povprečje ter po križnem računu izračunali, koliko celic potrebujemo za eno luknjico. (Npr. skupen volumen ene luknjice na plošči s šestimi luknjicami je 2 ml, do tega volumna smo luknjico dopolnili z medijem.)



Slika 5: Hemocitometer za štetje celic.

X (ponazarja povprečje prešteti celic) $\times 10^4$ 1 ml

$1,5 \times 10^4$ celic Y

Neznanka Y torej ponazarja, koliko ml suspendiranih celic smo napipetirali v eno luknjico.

2 ml - Y = Z (ta spremenljivka pa pove, s koliko ml medija moramo še dopolniti našo luknjico)

3.2.2 Gojenje celic

Celice smo gojili v gojilni posodici v mediju brez antibiotikov in antimikotikov – 10 % FBS v DMEM. Ko so celice dosegle 90 % konfluentnost, smo jih precepili v novo gojilno posodico. Konfluentnost je gostota celic v gojilni posodici, če preseže 100 %, se lahko celična rast ustavi. Celicam smo najprej aspirirali (odvzeli) medij, dodali 5 ml PBS in ga aspirirali. Nato smo dodali 2 ml 0,25 % tripsina ter inkubirali 2 minuti. Tripsinizacija, ki traja več kot 4 minute, lahko uniči celice HOS. Gojilno posodico smo nežno pretresli in pogledali pod mikroskopom, če so se celice odlepili s podlage. Tripsinizacijo smo ustavili z 5 ml PBS in centrifugirali pri 1000 rpm 5 minut. Nastali supernatant smo aspirirali, peletko pa resuspendirali v 5 ml medija brez antibiotika. Celice smo prestavili v novo gojilno posodico, ki smo jo označili z imenom, datumom, vrsto celice in št.pasaže. Npr. če smo redčili 1 : 10, pomeni, da smo dodali 1 ml resuspendiranih celic in 9 ml svežega medija.

3.2.3 Ko-transfekcija

Kotransfekcija je postopek, pri katerem s pomočjo lipidnih kompleksov v celice vstavljamo plazmidno DNA in miRNA.

Preglednica V: Količine posameznih reagentov uporabljenih pri ko-transfekciji v ploščici s 24 luknjicami.

	<i>pmiRGLO</i> (100 ng/μl)	<i>pmiRGLO-GST-CD/ pmiRGLO-ELOVL6 pmiRGLO - CYP26B1/</i> (100 ng/μl)	<i>pmiRGLO – GST-CD mut / pmiRGLO - ELOVL6 mut/ pmiRGLO - CYP26B1 mut/</i> (100 ng/μl)	<i>pmiRGLO -miR_21</i> (100 ng/μl)	<i>pmiRGLO - miR_21 mut</i> (100 ng/μl)
Opti-MEM®	2x50 μl	2x50 μl	2x50 μl	2x50 μl	2x50 μl
pDNA (100 ng)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
miR_195 (2 μM)	/	2,5 μl	2,5 μl	/	/
Lipofectamine™ 2000 Reagent	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl

Uporabili smo 90 % konfluentne celice, jih prešteli in prenesli v ploščico, kjer je celokupen volumen ene luknjice 500 μl. Za eksperiment smo potrebovali gostoto celic – 7×10^4 celic/luknjico. Ploščo s celicami smo inkubirali 24 ur pri 37 °C in 5 % CO₂. Po 24 urah smo preverili, da so bile celice 90 % konfluentne, nato smo pripravili reagente (preglednica V). V eni epici smo združili Opti-MEM® in Lipofectamine™ 2000 Reagent, vorteksirali in inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. V drugi epici smo združili Opti-MEM®, pDNA in miR-195-5p. Vsebino obeh epic smo združili, vorteksirali in inkubirali 20 minut, da so se tvorili kompleksi ter po 20 minut v vsako luknjico kapljično napipetirali 100 μl. Ploščici smo po 4–6 ur zamenjali medij in celice inkubirali 48 ur na 37 °C in 5 % CO₂.

3.2.4 Transfekcija miRNA mimikov

Transfekcija je postopek, pri katerem v sesalske celice vstavljamo miRNA, siRNA, ali pDNA. Uporabili smo metodo vstavljanja z lipidnimi kompleksi. Transfekcijo mimikov miRNA smo izvedli z reagentom Lipofectamine 2000. Za eksperiment smo dan prej pripravili ploščico s šestimi luknjicami, v katerih je bila gostota celic 30×10^5

celic/luknjico. Ločeno smo pripravili 2 epici. V eni smo združili Opti-MEM® in transfekcijski reagent (Lipofectamine™ 2000 Reagent), vorteksirali in inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Vmes smo v drugi epici 50 pmol miR-195-5p razrečili v 250 ml Optimem-u in vorteksirali. Vsebinsko obeh epic smo združili, vorteksirali in inkubirali 20 minut, da so se tvorili kompleksi. Po inkubaciji smo kapljično napipetirali 500 µl lipnih kompleksov v luknjice. Po 4–6 urah zamenjali medij, nato pa ploščico inkubirali 48 ur na 37 °C in 5 % CO₂.

3.3 IZOLACIJA RNA IN TVOBA cDNA

3.3.1 Izolacija RNA

Materiali

- Kolone za odstranjevanje gDNA
- Kolone za izolacijo RNA
- 1,5 ml zbiralne tube
- 2 ml zbiralne tube
- RLT Plus-pufer
- RW 1-pufer
- RPE-pufer (koncentrat)
- Voda brez RNaz
- 1x PBS

Postopek

Izolacijo RNA smo delali po protokolu: RNeasy® Plus Mini Kit. Preden smo začeli z delom smo RPE-pufru dodali 44 ml 96 % etanola. Celice smo pogledali pod mikroskopom, nato smo jim aspirirali medij. Dodali smo 1x PBS in zopet aspirirali. Dodali smo 350 µl RLT Plus-pufra in z gumijastim nastavkom postrgali celice ter jih odpipetirali v epico. Sledilo je delo v za to primerni komori, ki smo jo predhodno očistili. Celice lizirane v RLT Plus-pufru smo odpipetirali v kolono za odstranjevanje gDNA. Centrifugirali smo 30 sekund na več kot 8000 x g. Nato smo odstranili kolono. Dodali smo 350 µl 70 % etanola in s pipeto dobro premešali. Vse skupaj smo odpipetirali v kolono za izolacijo RNA. Centrifugirali smo 15 sekund na več kot 8000 x g. Filtrat smo odstranili ter napipetirali 700 µl RW1 pufra. Centrifugirali smo 15 sekund na več kot 8000 x g in odlili tekočino v epici.

Dodali smo 500 µl RPE pufru in centrifugirali 15 sekund na več kot 8000 x g, še enkrat dodali 500 µl RPE-pufra in centrifugirali pri istih pogojih. Kolono smo nato prestavili v novo 2 ml zbiralno epico in 1 minuto centrifugirali pri maksimalni hitrosti, da se je membrana kolone v celoti posušila. Nato smo kolono prestavili v 1,5 ml epico, dodali 50 µl vode brez RNaz in centrifugirali 1 minuto na več kot 8000 x g, da se je eluirala RNA.

3.3.2 Obratna transkripcija (RT-PCR)

Obratna ali reverzna transkripcija je metoda, s katero izolirano RNA prepisemo v enoverižno cDNA, ki jo potrebujemo pri metodi PCR v realnem času. Običajno se DNA prepisuje v RNA, tukaj pa gre za obraten prepis. Za pripravo mešanice smo uporabili High capacity Reverse Transcription Kit (200 reactions, Applied Bioscience).

Materiali

- 10 x RT Pufer
- 25 x dNTP Mix (100nM)
- 10 x RT Random Primers
- MultiScribe Transcriptaza
- dH₂O

Postopek

Preglednica VI: Količine reagentov uporabljenih pri RT-PCR.

REAGENT	VOLUMEN
10 x RT Pufer	2 µL
25 x dNTP Mix (100nM)	0,8 µL
10 x RT Random Primers	2 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µL
dH ₂ O	4,2 µL
vzorec RNA (100ng/µL)	10 µL
	20 µL

Po izolaciji RNA iz celic HOS je sledila RT PCR. RNA smo izolirali iz celic HOS po 24 urah in 48 urah po transfekciji. Izmerjene koncentracije izolirane RNA so bile v razponu od 200–500 ng/ul. Nato smo jih za izvedbo RT PCR ustrezno redčili. Potrebovali smo 10 µl redčenega vzorca s koncentracijo 100 ng/µl in 10 µl mešanice. Naš skupni volumen je bil 20 µl.

Program

Preglednica VII: Program za izvedbo RT-PCR.

	Korak 1	Korak 2	Korak 3	Korak 4
Temp.	25 °C	37 ° C	85 ° C	4 °C
Čas	10 min	120 min	5 min	∞

3.4 MERJENJE IZRAŽANJA TARČNIH GENOV V PRISOTNOSTI miRNA MIMIKOV IN DOLOČANJE DIREKTNEGA VPLIVA miRNA MIMIKOV NA TARČNE GENE

3.4.1 Test luciferazne aktivnosti

Luciferazni test je metoda, ki temelji na merjenju relativne luciferazne aktivnosti. Za merjenje smo uporabili Dual-Luciferase® Reporter Assay sistem, kjer smo zaporedno merili luciferazno aktivnost kresničke (firefly) in Renilla luciferazno aktivnost celičnega lizata. Renilla luciferazna aktivnost nam je služila kot kontrola transfekcije. Z LAR II-reagentom smo izmerili luciferazno aktivnosti, medtem ko smo Renilla aktivnost merili s STOP&GLO-reagentom.

Materiali

- Luciferase assay pufer II
- Luciferase Assay-substrat (liofiliziran)
- Stop & Glo®-pufer
- Stop & Glo®-substrat 50x
- Pasivni lizirajoč pufer 5x

Priprava reagentov

1. 1x PLB

Enemu volumnu 5x pasivnemu lizirajočemu pufri (PLB) smo dodali 4 volumne destilirane vode in dobro premešali.

2. LAR II

Liofiliziran Luciferase Assay-substrat smo resuspendirali v 10 ml Luciferase Assay pufri II, in česar nismo porabili za naš poskus, smo shranili na – 70 °C (ne več kot za 1 leto).

3. STOP&GLO

Za 10 vzorcev smo pripravili STOP Glo reagent tako, da smo 20 µl 50x Stop & Glo®-substrata dodali k 1 ml Stop & Glo®-reagentu.

Postopek

S pomočjo merjanja luciferazne aktivnosti smo merili direktno vezavo miR-195-5p na tarčne gene. Tik pred merjenjem smo pripravili reagente. 48 ur po kotransfekciji smo celice sprali z 1 ml PBS in dodali 100 µl 1x PLB ter stresali na stresalniku 15 minut pri sobni temperaturi. V mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami smo napipetirali po 100 µl LAR II reagenta, dodali celične lizate in izmerili luminescenco kresničkine luciferaze. Nato smo dodali 100 µl Stop & Glo-reagenta in izmerili luminescenco Renilla luciferaze. Po spodnji Enačbi 1 smo izračunali relativno luciferazno aktivnost.

$$\text{Relativna luciferazna aktivnost} = \frac{\text{Fluorescenca luciferaze}}{\text{Renilla fluorescenca}}$$

(1)

3.4.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (Q-PCR)

PCR ali verižna reakcija s polimerazo je *in vitro* metoda, ki omogoča sintezo nukleinskih kislin. V kratkem času lahko pomnožimo veliko število kopij želenega odseka DNA. Je ciklična reakcija, vsak cikel pa je sestavljen iz treh stopenj: denaturacija (95 °C), prileganje nukleotidnih začetnikov (40–50 °C) in podaljševanje (72 °C). V okviru našega raziskovanja smo uporabljali verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (Q-PCR), ki predstavlja nadgradnjo prej opisanega konvencionalnega PCR. Poleg sinteze omogoča tudi takojšnjo detekcijo pomnožene DNA. Količino nastale DNA lahko kontinuirano spremljamo v vsakem ciklu z določevanjem Cp. Cp je tisti cikel, določen v eksponentni fazi, kjer je intenziteta fluorescence za vzorec značilno višja od fluorescence ozadja.

Uporabili smo fluorescenčno barvilo EVA Green, ki močno fluorescira, kadar je vezano v nastajajočo DNA-verigo.

Materiali

- 5 HOT FIREPol EvaGreen qPCR SuperMix (proizvajalec Solis BioDyne)
- F-oligonukleotidni začetnik (20 μ M)
- R-oligonukleotidni začetnik (20 μ M)

Postopek

Preglednica VIII: Količine reagentov za izvedbo Q-PCR.

REAGENT	VOLUMEN
5 HOT FIREPol EvaGreen qPCR S.	4 μ L
F-oligonukleotidni začetnik (20 μ M)	0,2 μ L
R-oligonukleotidni začetnik (20 μ M)	0,2 μ L
dH ₂ O	10,6 μ L
Vzorec cDNA (50 ng/ μ L)	5 μ L
	20 μ L

- *Redčitev vzorcev*

Vzorci s koncentracijo $C_1 = 50$ ng/ μ L (cDNA, ki smo jih pripravili z RT PCR) smo ustrezno redčili, da smo dobili koncentracijo $C_2 = 2,5$ ng/ μ L. Skupen volumen za vsak vzorec je znašal $V_2 = 60$ μ L (5 μ L za vsako luknjico v paralelah za 5 genov + 10 μ L rezerve).

- *Priprava standardov*

Vzorci cDNA, začetne koncentracije $C_1 = 50$ ng/ μ L smo razredčili na koncentracijo $C_2 = 5$ ng/ μ L. Iz tega smo pripravili pet standardov, redčili smo serijsko. Po pripravi standardov in vzorcev smo v ploščico s 96 luknjicami napipetirali po 15 μ L reakcijske zmesi in 5 μ L vzorca ali standarda.

Preglednica IX: Serijsko redčenje standardov.

STANDARD	cDNA (ng/ μ L)	VOLUMEN cDNA (μ L)	VOLUMEN dH ₂ O (μ L)	KONČNI VOLUMEN	PRENOS
ST1 (5 ng/ μ L)	25	16	144	160	80
ST2 (2,5 ng/ μ L)	12,5	80	80	160	80
ST3 (1,25 ng/ μ L)	6,25	80	80	160	80
ST4 (0,625 ng/ μ L)	3,125	80	80	160	80
ST5 (0,313 ng/ μ L)	1,565	80	80	160	/

Program

Preglednica X: Program za izvedbo Q-PCR.

	Temperatura (°C)	Čas	Cikel
Začetna denaturacija	95	12 min	1
Denaturacija	95	15 s	} 40
Prileganje	60–65	20–30 s	
Podaljševanje	72	20–30 s	

- *Relativna kvantifikacija PCR v realnem času (metoda standardne krivulje)*

Po končanem PCR v realnem času smo dobljene rezultate primerno kvantificirali z metodo relativne kvantifikacije, kar pomeni, da smo izračunali razmerje med tarčnim genom in kalibratorjem. Odločili smo se za metodo standarne krivulje. Za oba gena smo v vsaki seriji iz vzorcev različnih koncentraciji naredili standardno krivuljo. Rezultate smo normalizirali po enačbi 2, pri čemer smo obema genoma odčitali njun Cp. Eksperiment smo izvedli v paralelkah, zato smo uporabili povprečja Cp-jev.

$$\frac{Cp \text{ (tarčni gen)}}{Cp \text{ (referenčni gen)}}$$

(2)

4 REZULTATI

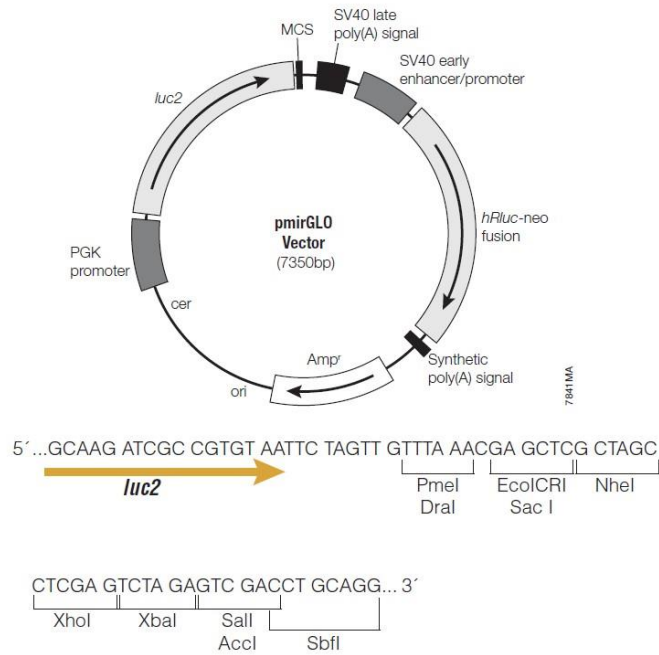
4.1 PRIPRAVA PLAZMIDNIH VEKTORJEV Z DELNIM ZAPOREDJEM TARČNIH GENOV IN NJIHOVIH MUTIRANIH VARIANT Z METODO MOLEKULSKEGA KLONIRANJA

Da smo lahko preverili, ali so izbrani tarčni geni direktna tarča miR-195-5p smo najprej pripravili reporterske plazmidne vektorje, ki so vsebovali kratko zaporedje tarčnega gena. Uporabili smo tehniko molekulskega kloniranja, ki je sestavljena iz postopka restrikcije, ligacije, transformacije in izolacije plazmida iz gostiteljske celice (42). Za pripravo rekombinantne DNA smo potrebovali vektor v katerega smo vstavili tarčni segment (insert) (41).

Izbrali smo vektor *pmirGLO*, saj je oblikovan za načrtno merjenje aktivnosti miRNA. Vsebuje namreč kresničkin reporterski gen (*luc2*), ki omogoča obratno sorazmerno merjenje aktivnosti miRNA v sesalskih celicah. Plazmidni vektor vsebuje poliklonsko MCS regijo, ki vsebuje prepoznavna mesta za restrikcijske endonukleaze. Zaporedje vektorja *pmirGLO* nosi zapis tudi za rezistenco na antibiotik Amp, ki je služil kot selekcijski marker (43, 44).

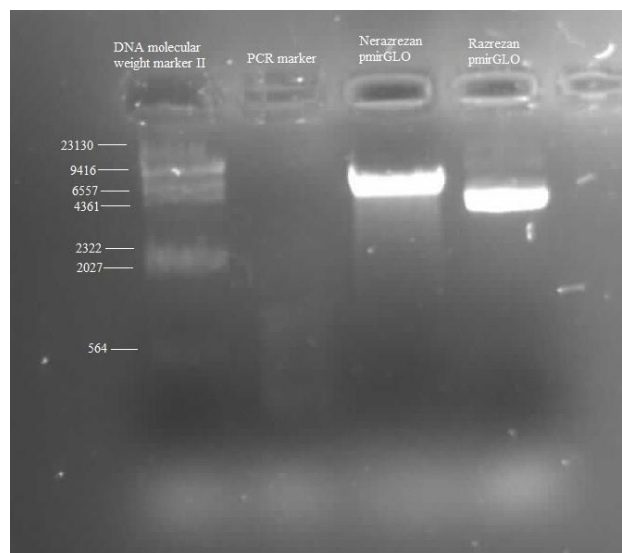
4.1.1 Restrikcija vektorja in agarozna elektroforeza

Metoda restrikcije je bila ključna, saj smo s tem linealizirali vektor *pmirGLO* in s postopkom ligacije vanj vstavili segment s tarčnim zaporedjem – dobili smo rekombinantno DNA. Vektor smo razrezali z restrikcijskima encimoma XhoI in XbaI, ki sta specifično prepoznavala in rezala na mestih 7326 ter 7332 (slika 6) (45). Na sliki 6 je prikazan vektor *pmirGLO* z MCS-mestom za restrikcijske endonukleaze. Označeni sta zaporedji, kjer se nahajata gen za luciferazo in gen za rezistenco na Amp.



Slika 6: Vektor *pmirGLO* in MCS-poliklonska mesta kloniranja [povzeto po 44].

Po končani restrikciji smo z agarozno elektroforezo preverili ali je restrikcija ustrezno potekla. Na gel smo nanegli vzorec (razrezan vektor *pmirGLO*), kontrolo (nerazrezan vektor *pmirGLO*) in dva standarda velikosti (DNA molecular weight marker II in PCR-marker). Linealiziran plazmid (vzorec) je potoval hitreje kot krožni plazmi (kontrola) (slika 7) (46).



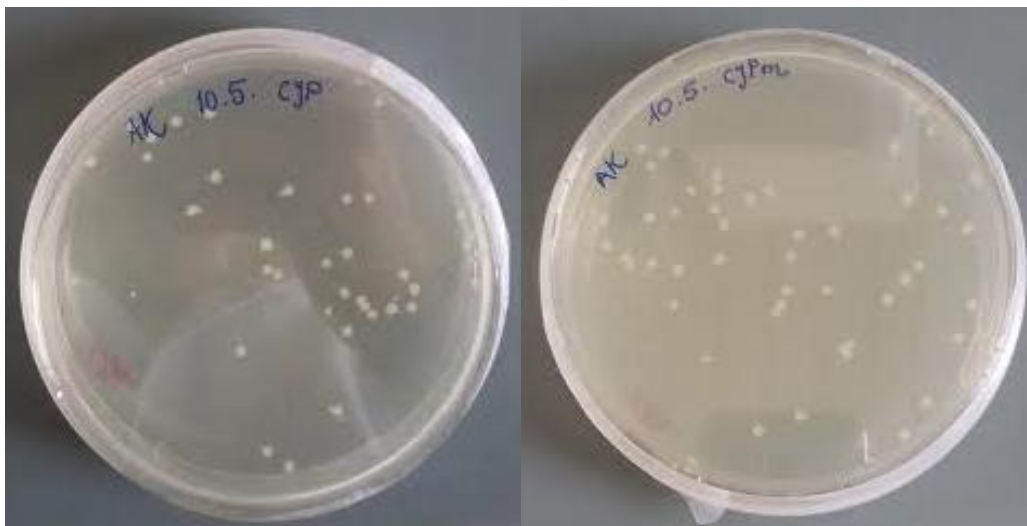
Slika 7: Potovanje razrezanega, v primerjavi z nerazrezanim plazmidom *pmirGLO* na agarozni elektroforezi.

4.2 PREVERJANJE USPEŠNOSTI LIGACIJE

Rekombinantno DNA smo s transformacijo vstavili v bakterije. Na LBA ploščah so zrastle kolonije, ki so vsebovale plazmidne molekule. Da bi preverili ali so plazmidi vsebovali zelene inserte smo bakterijske kolonije nacepili v tekoče gojišče, izolirali plazmidno DNA, nato pa plazmidom določili nukleotidno zaporedje. Nukleotidna zaporedja smo analizirali s pomočjo bioinformatičnega programa BLAST (42, 46).

4.2.1 Vizualni pregled plošč

Uspešnost ligacije smo najprej preverili z vizualnim pregledom agarnih plošč, ki so vsebovale antibiotik Amp. Ker je naš vektor nosil tudi zapis za rezistenco na Amp, smo sklepali, da so zrasle le tiste kolonije bakterij, ki so uspešno privzele rekombinantno DNA. Slika 8 prikazuje uspešnost ligacije dveh vstavljenih plazmidov *pmirGLO-CYP26B1* (levo) in *pmirGLO-CYP26B1 mut* (desno). V obeh primerih so zrasle kolonije, zato smo domnevali, da sta bili ligaciji v obeh primerih uspešni. Nadaljne analize s sekveniranjem plazmidne DNA so pokazale, da je bila uspešna le ligacija plazmida *pmirGLO-CYP26B1*. Pri transformaciji ligacijske zmesi s plazmidom *pmirGLO-CYP26B1 mut* niso zrasle bakterijske kolonije s plazmidi *pmirGLO-CYP26B1 mut*.



Slika 8: Vizualno preverjanje pozitivnosti ligacije.

4.2.2 Sekveniranje plazmidne DNA in uporaba bioinformatičnega orodja

Za analizo uspešnosti kloniranja, smo naključno izbranim klonom plazmidnih molekul DNA določili nukleotidno zaporedje. Za določitev nukleotidnega zaporedja smo uporabili storitev podjetja GATC (Nemčija). Dobljene sekvence smo preko BLAST-algoritma primerjali s primarno biološko sekvenčno informacijo. V primeru pozitivnega plazmida je program BLAST zaznal visoko homologijo z enim izmed plazmidov v podatkovni bazi GenBank (slika 10). Na sliki 9 so prikazani rezultati sekvenčne analize, ki ponazarjajo zaporedja treh tarčnih genov - *GST-CD*, *ELOVL6* in *CYP26B1*, kar pomeni, da smo z molekulskim kloniranjem uspešno pridobili plazmide *pmirGLO-GST-CD*, *pmirGLO-ELOVL6*, *pmirGLO-CYP26B1*. Uspešno smo pripravili tudi plazmida *pmirGLO-GST-CD mut* in *pmirGLO-ELOVL6 mut*.

```
GSTCD
5'...CAGCCGATCAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAAATTAGCAGCA
TTGAGAAAGGATGCATCACTCGAGGCTAGCGAGCTCGTTTAAACAACCTAG...3'

ELOVL6
5'...GCCGGATCAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAAGATAGCAGCAAG
CAACCTCCTGCCTGAACTCGAGGCTAGCGAGCTCGTTTAAACAACCTAGAA...3'

CYP26B1
5'...TTGTTTaaCGA GCTCGCTAGCCTCGAGCAATTTGAAATTACCTATTGCTGCT
ACTTTCTAGAGTCGACCTGCAGGCA TGCAAGCTGATCCGGCTGCTAACAA...3'
```

Slika 9: Nukleotidna zaporedja plazmidov, ki smo jih pridobili z molekulskim kloniranjem.

RID [ADT7GTUA015](#) (Expires on 02-18 18:56 pm)

Query ID lcl|Query_170117
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 1102

Database Name Human G+T (2 databases)
Description [> See details](#)
Program BLASTN 2.6.1+ [> Citation](#)

Other reports: [> Search Summary](#) [\[Taxonomy reports\]](#) [\[Distance tree of results\]](#) [\[Genome view\]](#)

Graphic Summary

Distribution of the top 6 Blast Hits on 6 subject sequences [?](#)
 Mouse over to see the title, click to show alignments

Color key for alignment scores

< 40	40-50	50-80	80-200	> = 200
------	-------	-------	--------	---------

Query

1 200 400 600 800 1000

PREDICTED: Homo sapiens cytochrome P450 family 26 subfa..
 Score:54 Evalue:0.00026
 Accession:XM_011532988.1

Descriptions

Alignments

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next](#) [▲ Previous](#) [▲ Descriptions](#)

PREDICTED: Homo sapiens cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1 (CYP26B1), transcript variant X1, mRNA
 Sequence ID: [XM_005264433.4](#) Length: 4520 Number of Matches: 1

Range 1: 2095 to 2123 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
54.7 bits(29)	3e-04	29/29(100%)	0/29(0%)	Plus/Plus

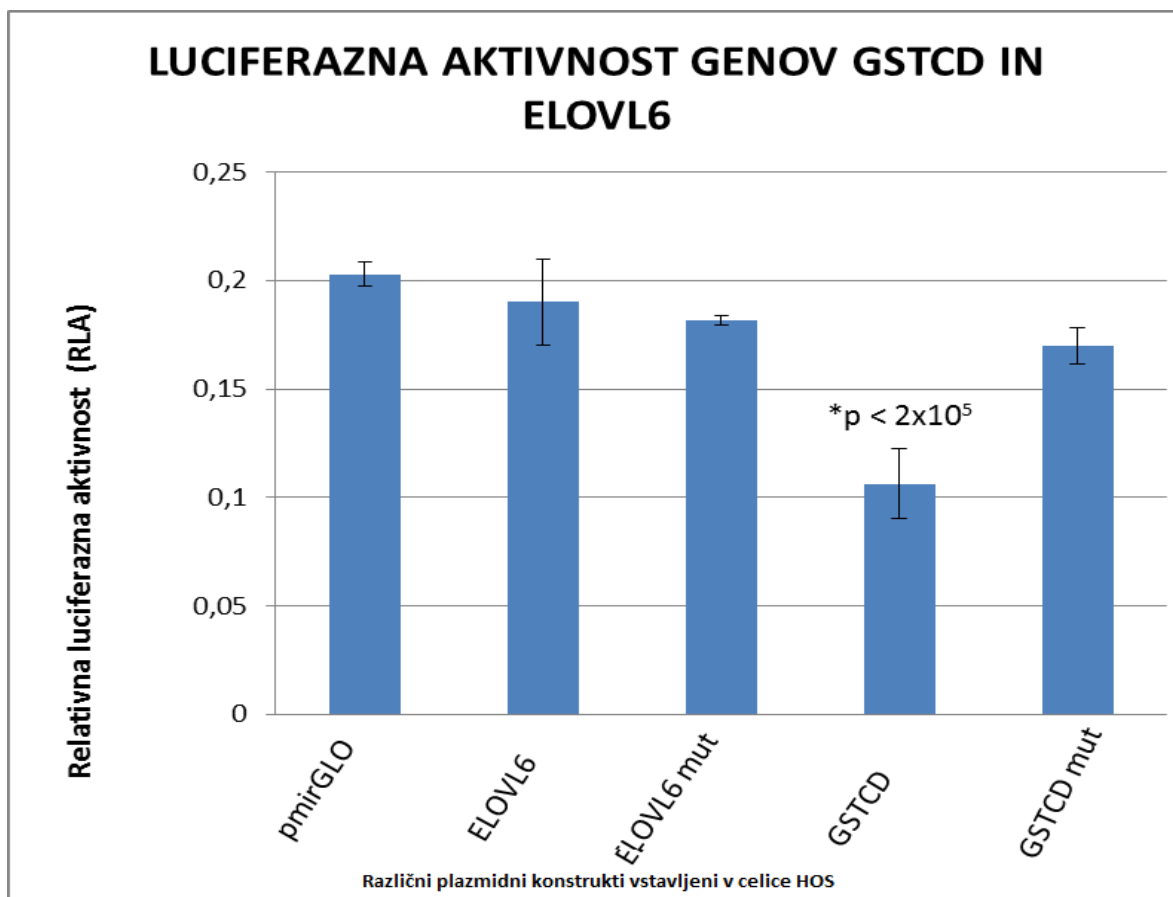
Query 44 CAATTTGAAATTACCTATTGCTGCTACTT 72
 Sbjct 2095 CAATTTGAAATTACCTATTGCTGCTACTT 2123

Related Information

Slika 10: Preverjanje ujemanja plazmida *pmirGLO-CYP26B1* v programu BLAST.

4.3 REZULTATI DVOJNEGA LUCIFERAZNEGA TESTA

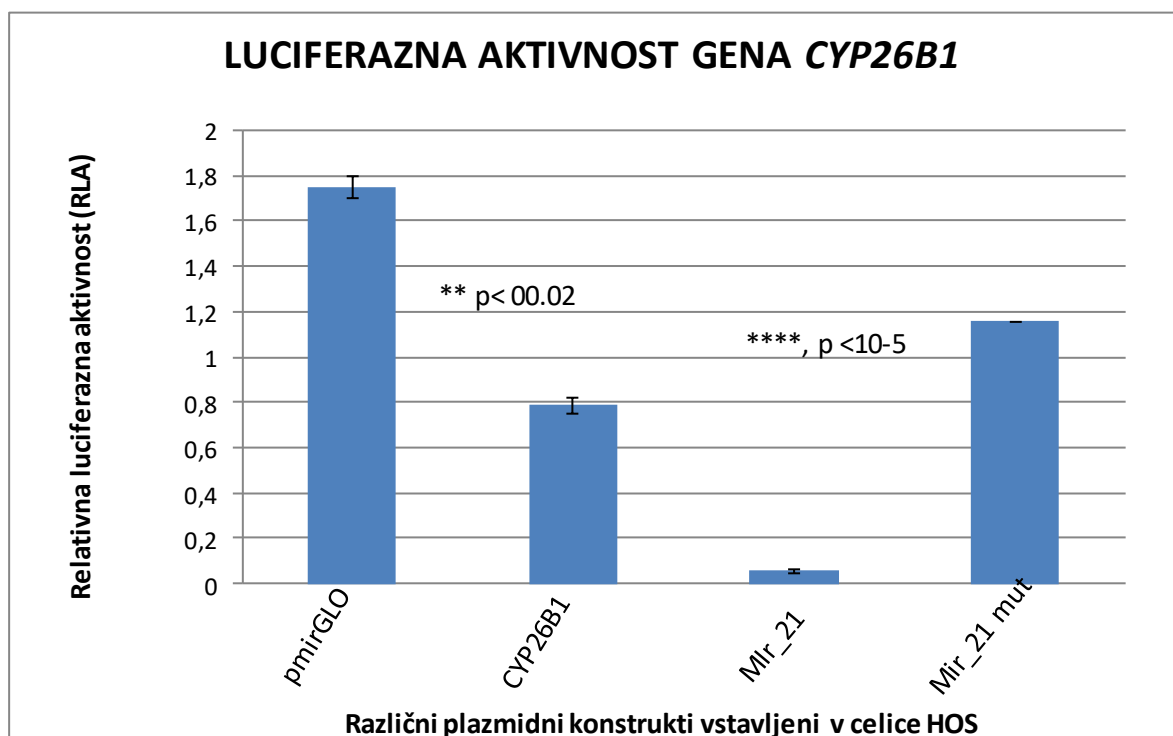
Z luciferaznim testom, smo preverjali, ali se miR-195-5p, potem ko smo jo vstavili v celice HOS, direktno veže na vstavljeno 3' UTR-regijo in posledično inhibitorno deluje na tarčne gene.



Slika 11: Relativna luciferazna aktivnost plazmidnih vektorjev s tarčnimi geni *GSTCD* in *ELOVL6* ter kontrolnim vektorjem *pmirGLO*, v prisotnosti sintetičnih mimikov miR-195-5p 48 h po transfekciji celic HOS.

Celice smo transfecirali z reporterskimi plazmidi *pmirGLO-GST-CD* in *pmirGLO-ELOVL6* ter 48 ur po transfekciji izmerili luciferazno aktivnost. Kot pozitivni kontroli sta nam služili mutirani različici plazmidov – *pmirGLO-GST-CD mut* in *pmirGLO-ELOVL6 mut*. Za negativno kontrolo smo uporabili kar prazen plazmid *pmirGLO*. Pripravljenim vzorcem smo izmerili luminiscenco. Uporabljali smo luciferazni test Dual-Luciferase® Reporter Assay System dual reporter. V primeru, da se je miR-195-5p vezala na tarčno zaporedje, ki

smo ga vstavili na 3' konec gena za kresničkino luciferazo, je vezava povzročila, da se protein luciferaze ni sintetiziral in v reakciji s substratom ni prišlo do pojava svetlobe. Če pa na vstavljenem segmentu ni bilo tarčnega zaporedja, kamor bi se lahko miR-195-5p vezala, se je protein normalno sintetiziral in pojavila se je svetloba (44). Najprej smo pomerili kresničkino aktivnost, nato pa še Renilla. Njun kvocient nam je podal relativno luciferazno aktivnost (RLA). Slika 11 prikazuje izmerjeno RLA v odvisnosti od različnih plazmidnih konstruktov, vstavljenih v celice HOS. Dobljene rezultate smo med seboj primerjali. RLA, izmerjena celicam, z vstavljenimi negativno kontrolo, je bila v obeh primerih (za oba gena) visoka. Slika 11 prikazuje, da je RLA plazmida *pmirGLO-GST-CD* opazno znižana v primerjavi z negativno kontrolo ($p = 2 \times 10^5$). Nasprotno se stopnja luminiscence za *pmirGLO-ELOVL6* ni znatno razlikovala od luminiscence, ki smo jo izmerili ustrezni negativni in pozitivni kontroli (slika 11).



Slika 12: Relativne luciferazne aktivnosti plazmidnih konstruktov s tarčnim genom *CYP26B1*, v prisotnosti sintetičnih mimikov miR-195-5p. Luciferazna aktivnost je bila izmerjena 48 h po transfekciji celic HOS.

Dvojni luciferazni test smo izvedli tudi za tarčni gen *CYP26B1*. Poiskus se je od prejšnjega razlikoval v tem, da smo za pozitivni kontroli uporabili *miR-21* in *miR-21 mut*, saj

mutirane različice plazmida *pmirGLO-CYP26B1 mut* nismo uspeli pripraviti. Na Katedri za klinično biokemijo so namreč predhodno dokazali, da je plazmidni konstrukt *pmirGLO-miR-21* ustrezna pozitivna kontrola. Slika 12 prikazuje luciferazno aktivnost reporterskega vektroja s tarčnim zaporedjem gena *CYP26B1*. Prazen plazmid *pmirGLO* je služil kot negativna kontrola, medtem ko sta plazmidna konstrukta *pmirGLO-miR-21* in *pmirGLO-miR-21 mut* predstavljal pozitivno kontrolo. Relativna luciferazna aktivnost plazmidov *pmirGLO-miR-21* in *pmirGLO-miR-21 mut* je bila pomembno različna ($p = 10^{-5}$), kar dokazuje ustreznost sistema in relevantnost naših rezultatov. miR-21 se je popolnoma vezala na tarčo zaporedje v plazmidnem konstrukt *pmirGLO-miR-21*, luciferazni protein se ni sintetiziral, kar je povzročilo manjšo stopnjo luminiscence. Na plazmidni konstrukt *pmirGLO-miR-21 mut* pa se je miR-21 le deloma vezala (majhna verjetnost vezave), zato je stopnja luminiscence višja (44). Rezultati na sliki 12 kažejo, da je luminiscenca, merjena praznemu plazmidu *pmirGLO* visoka v primerjavi z merjenjem luminiscence plazmidnemu konstrukt *pmirGLO-CYP26B1*. Ta razlika je signifikantna ($p = 0.02$).

4.4 VPLIV miR-195-5P NA IZRAŽANJE TARČNIH GENOV

Rezultati testa luciferazne aktivnosti so nam povedali ali se miR-195-5p direktno veže na tarčno zaporedje, z Q-PCR metodo pa smo želeli ugotoviti ali miR-195-5p kakorkoli vpliva na izražanje tarčnih genov - *GST-CD*, *ELOVL6*, *CYP26B1* in *c-Myb*, pri čemer ni nujno, da se direktno veže na morebitno tarčno zaporedje. Celice HOS smo najprej transfecirali z mimiki miR-195-5p. Netransfecirane celice so služile kot slepi vzorec. Iz vseh celic smo po 24 urah in 48 urah izolirali celotno RNA in jo z reverzno transkripcijo pretvorili v cDNA, ki je v reakciji služila kot matrica za Q-PCR. Pred izvedbo Q-PCR smo optimizirali oligonukleotidne začetnike (omejili smo želeni odsek pomnoževanja) in sestavine reakcijske zmesi. Poskus smo naredili v paralelkah, v treh bioloških ponovitvah.

4.4.1 Izolacija RNA iz sesalskih celic

Z namenom da bi ugotovili ali miR-195-5p vpliva na izražanje tarčnih genov ali ne, smo najprej iz HOS celic, transfeciranih z miR-195-5p izolirali celotno RNA. Celice smo 24 ur ali 48 ur po transfekciji »postrgali« iz gojilne posodice, nato pa v posebni RNA komori RNA izolirali z RNeasy® Plus Mini Kit-om. Po končani izolaciji RNA smo vzorcem izmerili koncentracijo in jim določili čistost. V preglednici XI so prikazani rezultati, ki kažejo povprečje koncentracij izolirane RNA iz z miR-195-5p transfeciranih HOS celic in

iz netransfeciranih HOS celic, treh bioloških ponovitev, izvedenih v paralelkah. Razvidno je, da je koncentracija RNA za posamezno časovno točko višja pri vzorcih RNA transfeciranih celic kot pri vzorcih netransfeciranih celic. V povprečju so koncentracije RNA iz transfeciranih celic 1,74 x višje od koncentracij RNA izoliranih iz netransfeciranih celic. Izolirani RNA smo preverili tudi čistost (preglednica XII). Razmerje 260/280 naj bi bilo nad 2. Razmerje 260/230 pa v razponu. 2,0–2,2 (47).

Preglednica XI: Izmerjene povprečne koncentracije RNA.

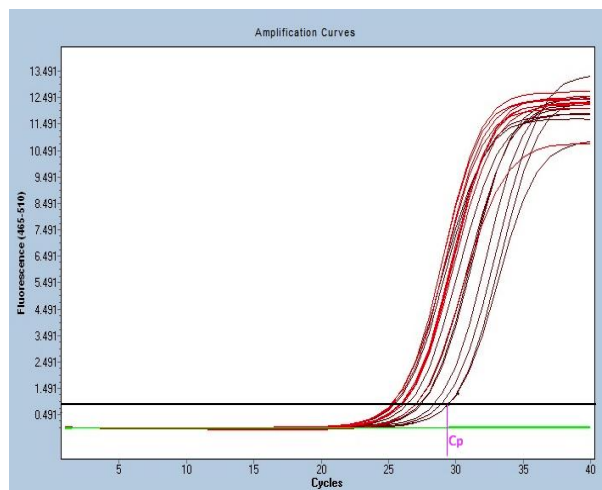
VZOREC	IZMERJENA KONCENTRACIJA RNA (ng/μL)
Z miR-195-5p transfecirane celice HOS, po 24 h	332,6
Netransfecirane celice po 24 h	173,8
Z miR-195-5p transfecirane celice HOS, po 48 h	400,7
Netransfecirane celice po 48 h	256,7

Preglednica XII: Rezultati razmerij valovnih dolžin, ki določajo čistost RNA.

RAZMERJE	VREDNOST
260/280	2,06
260/230	2,22

4.4.2 Relativna kvantifikacija – metoda standardne krivulje

Za prikaz rezultatov smo izbrali relativno kvantifikacijo in metodo standardne krivulje, kar pomeni, da rezultate podajamo le relativno kot razmerje med preiskovanim vzorcem in kalibratorjem (40). Vzorec in kalibrator smo prej normalizirali z referenčnim genom. Kadar pripravljamo nov poskus, je primerno izbrati metodo standardne krivulje, kar pomeni, da za vsako serijo tarčnemu in referenčnemu genu pripravimo standardno krivuljo (40). Standardno krivuljo smo naredili iz različnih koncentracij cDNA in iz naklona premice preverili učinkovitost pomnoževanja.



Slika 13: Naraščanje fluorescence v odvisnosti od časa.

Na sliki 13 je prikazano, kako luminiscenca narašča v odvisnosti od časa oz. cikla. Fluorescenca barvila EVA Green je naraščala v odvisnosti od časa, dokler ni dosegla platoja. Povedano drugače, fluorescenca je sorazmerna količini nastale DNA. Iz krivulj pomnoževanja smo določili koncentracijo (C_p) (mRNA) tarčnih genov in koncentracijo (C_p) hišnega oz. referenčnega gena (*RPLP0*). Dobljene vrednosti smo normalizirali, tako da smo izračunali kvocient med C_p tarčnega in C_p referenčnega gena. Izračunali smo povprečje, standardni odklon, nato pa z dvostranskim t-testom preračunali p-vrednost. P-vrednost nam pove, ali se podatki med seboj statistično razlikujejo ali ne. Da se statistično razlikujejo, mora biti $p < 0.05$. Dobljeni rezultati so prikazani v sledečih preglednicah in grafih.

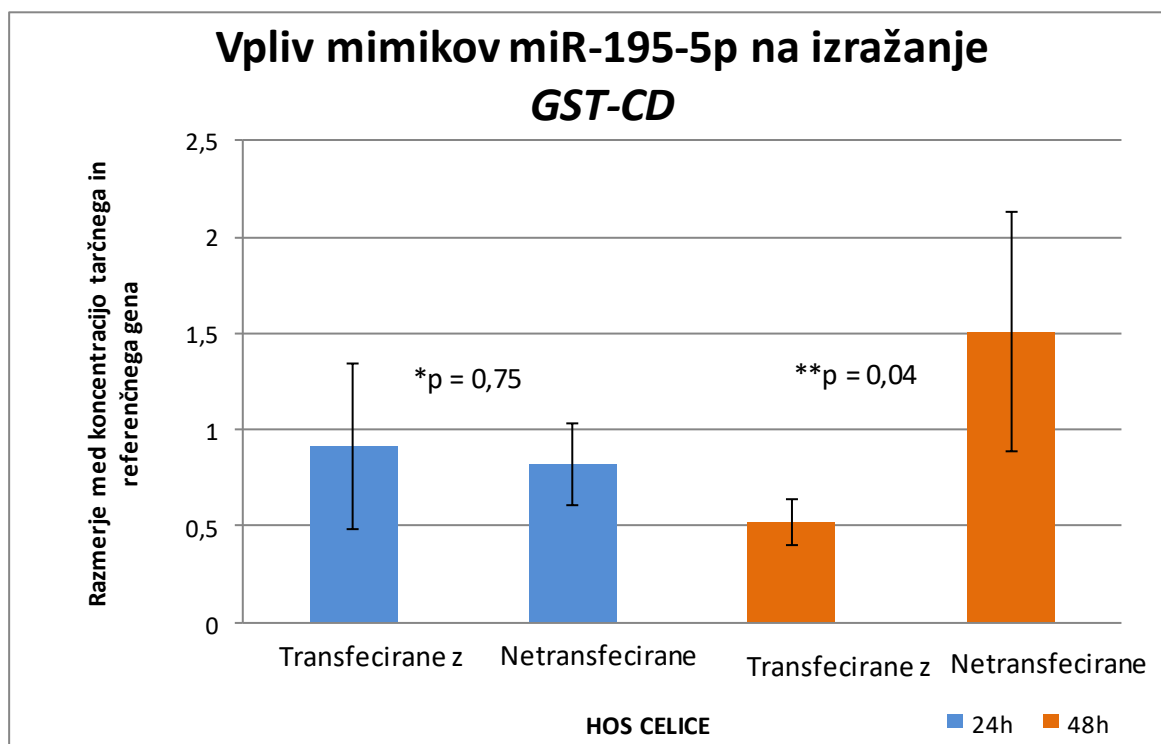
4.4.3 Statistična obdelava rezultatov dobljenih s Q-PCR

Preglednica XIII: Prikaz povprečnega relativnega izražanja gena *GST-CD*.

	Transfecirane celice HOS z miR-195-5p, po 24 h	Ne-transfecirane celice po 24 h	Transfecirane celice HOS, z miR-195-5p po 48 h	Ne-transfecirane celice po 48 h
Biolška pon. 1	0,444406018	0,576496998	0,43414879*	1,943921258
Biolška pon. 2	1,300129366	0,982102908	0,606319703*	1,068965517
Biolška pon. 3	0,997946612	0,899159664	/	/
Povprečje	0,914160665	0,81925319	0,520234246	1,506443388
SD	0,433970824	0,214284442	0,12174322	0,618687138
P-vrednost	0,751209868		/	

Preglednica XIV: Relativna kvantifikacija podatkov za vzorec z miR-195-5p transfeciranih HOS celic in netransfeciranih celic po 48 urah.

	Transfecirane celice HOS z miR-195-5p, po 48 h	Ne-transfecirane celice po 48 h
Biolška pon. 1	0,223336613	1
Biolška pon. 2	0,567202302	1
P-vrednost	0,036095053	

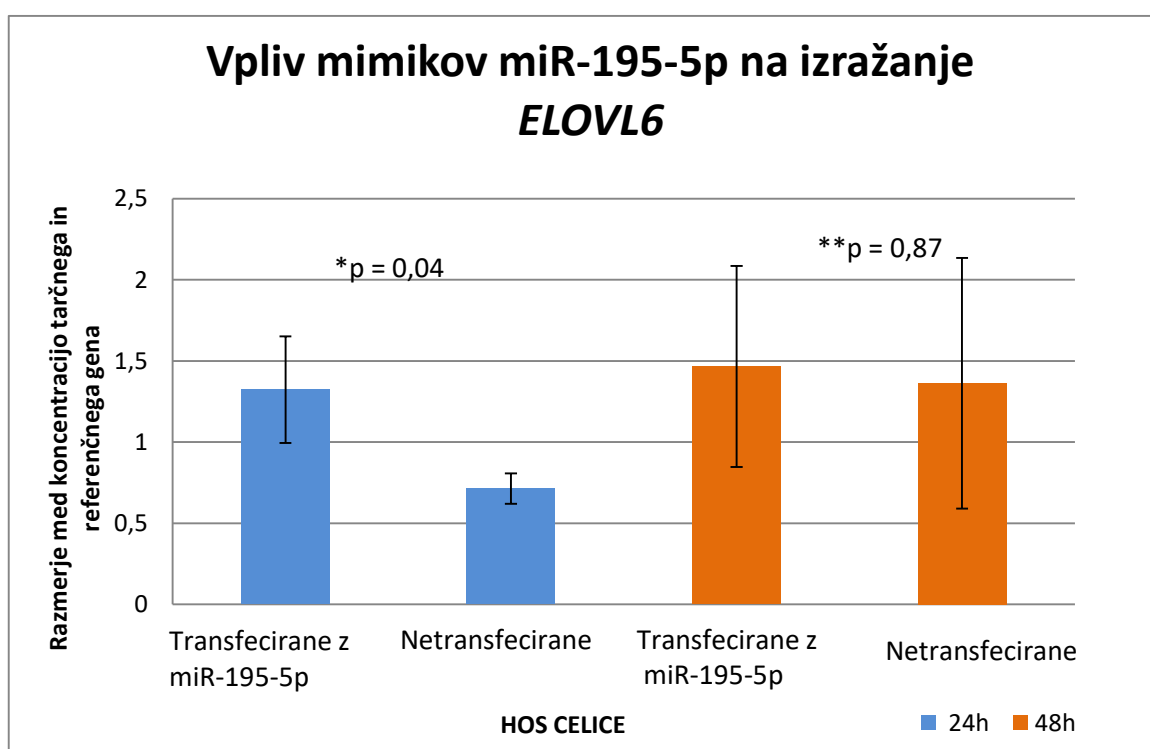


Slika 14: Izražanje gena *GST-CD* v celicah HOS v prisotnosti mimika 195-5p.

Vrednosti, ki so v preglednici XIII označene z *, smo relativno kvantificirali, saj je bila med rezultati prevelika variabilnost. Rezultate vzorca transfeciranih celic po 48 urah smo delili z rezultati vzorca netransfeciranih celic po 48 urah. Izražanje gena *GST-CD* je bilo v prvih 24 urah skoraj enako pri transfeciranih in netransfeciranih celicah. Pomembna razlika pa se je pojavila pri vzorcih, ki smo jih izolirali po 48 urah. RNA, ki smo jo izolirali iz z miR-195-5p transfeciranih HOS celic 48 ur po transfekciji, je izražanje gena *GST-CD* znatno nižje kot pri netransfeciranih celicah. miR-195-5p se je vezala na tarčno mesto in inhibirala izražanje gena (slika 14, preglednica XIII, preglednica XIV).

Preglednica XV: Prikaz povprečnega relativnega izražanja gena *ELOVL6*.

	Transfecirane celice HOS z miR-195-5p, po 24 h	Ne-transfecirane celice po 24 h	Transfecirane celice HOS z miR-195-5p, po 48 h	Ne-transfecirane celice po 48 h
Biološka pon. 1	1,052721412	0,761839355	1,654715685	2,247560964
Biološka pon. 2	1,689521345	0,606196581	1,970260223	1,019157088
Biološka pon. 3	1,228971963	0,773109244	0,774611399	0,822584693
Povprečje	1,32373824	0,71371506	1,466529103	1,363100915
SD	0,328806971	0,093284082	0,619640759	0,772245013
P-vrednost	0,036524459		0,865218324	



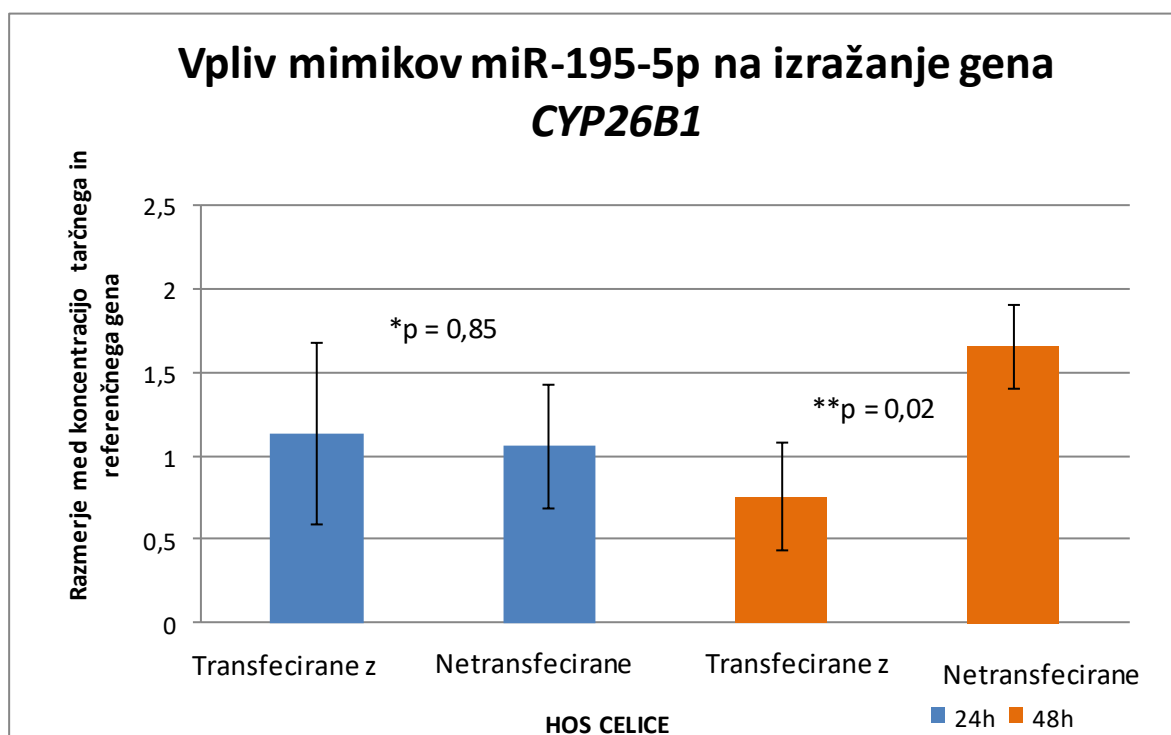
Slika 15: Vpliv mimikov miR-195-5p na izražanje *ELOVL6*.

Izražanja gena *ELOVL6* je bilo signifikantno različno med vzorcema z miR-195-5p transfeciranih HOS celic po 24 urah in netransfeciranih celic po 24 urah ($p = 0,04$), pri čemer je bila relativna stopnja izražanja višja pri vzorcu, kjer smo uporabili RNA

transfeciranih celic. miR-195-5p bi lahko celo spodbujala izražanja tega gena. Vendar pa med vzorcema, pridobljenima po 48 urah, do večjih razlik ni prišlo. Na osnovi teh rezultatov smo zaključili, da miR-195-5p na izražanje gena za *ELOVL6* ne vpliva. ($p = 0,9$) (slika 15, preglednica XV).

Preglednica XVI: Prikaz povprečnega relativnega izražanja gena *CYP26B1*.

	Transfecirane celice HOS z miR-195-5p, po 24 h	Ne - transfecirane celice po 24 h	Transfecirane celice HOS z miR-195-5p, po 48 h	Ne - transfecirane celice po 48 h
Biološka pon. 1	0,597606302	0,670287962	0,739313611	1,6520354
Biološka pon. 2	1,122897801	1,39917474	1,081784387	1,402298851
Biološka pon. 3	1,684579439	1,099943852	0,440414508	1,90966123
Povprečje	1,135027847	1,056468851	0,753837502	1,65466516
SD	0,543588083	0,366383051	0,320931516	0,253691412
P-vrednost	0,8457053		0,018875127	

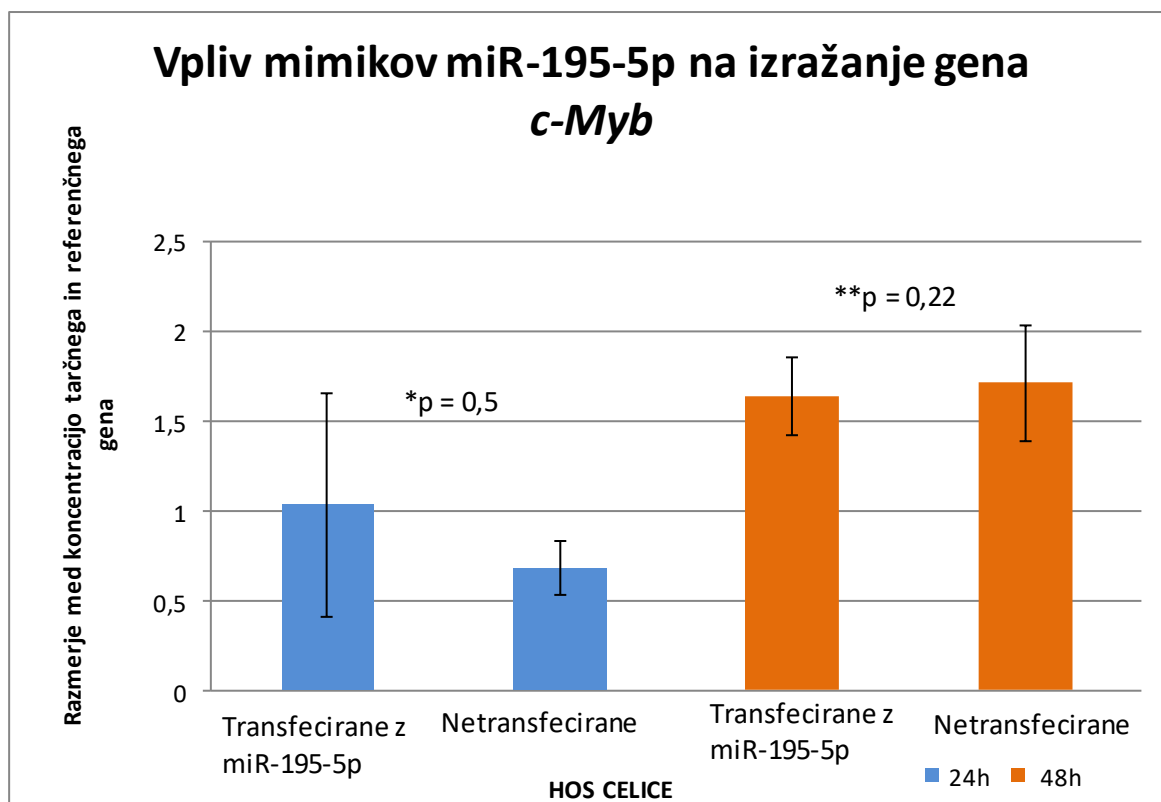


Slika 16: Vpliv mimikov miR-195-5p na izražanje gena za *CYP26B1*

Izražanja gena *CYP26B1* je bilo po 48 urah pomembno različno ($p = 0,02$) med vzorcema z miR-195-5p transfeciranih HOS celic in netransfeciranih celic. Relativna stopnja izraženosti *CYP26B1* je bila znatno znižana v primeru, v katerem smo uporabili RNA, izolirano iz transfeciranih celic, medtem ko rezultati uporabljene RNA iz netransfeciranih celic takšnih sprememb niso pokazali. miR-195-5p je torej negativno vplivala na izražanje gena *CYP26B1* (slika 16, preglednica XVI).

Preglednica XVII: Prikaz povprečnega relativnega izražanja gena *c-Myb*.

	Transfecirane celice HOS z miR-195-5p, po 24 h	Ne - transfecirane celice po 24 h	Transfecirane celice HOS z miR-195-5p, po 48 h	Ne - transfecirane celice po 48 h
Biološka pon. 1	0,59163992	0,78923185	0,43871609	1,94053629
Biološka pon. 2	1,47736093	0,57773109	1,48698885	1,48698885
Biološka pon. 3	2,54672897	1,74824659	1,79404145	2,40116279
Povprečje	1,03450042	0,68348147	1,64051515	1,71376257
SD	0,62629934	0,14955362	0,21711898	0,32070647
P-vrednost	0,496955701		0,223016344	



Slika 17: Vpliv mimikov miR-195-5p na izražanje gena za *c-Myb*

Rezultati merjenja vpliva miR-195-5p na izražanje gena *c-Myb* so pokazali, da ni prišlo do velike razlike med izražanjem tarčnega gena v miR-195-5p transfeciranih HOS celic v primerjavi z netransfeciranimi celicami. Razlika se pri vzorcih ni pojavila niti po 24 urah niti po 48 urah ($p = 0,22$) (slika 17, preglednica XVII). miR-195-5p naj na izražanje tega gena ne bi vplivala.

5 RAZPRAVA

miRNA bi kot majhne, zelo stabilne molekule, ki jih najdemo v skoraj vseh telesnih tekočinah lahko predstavljale nove diagnostične markerje. Analiza profila miRNA v kostnih vzorcih bolnikov z osteoporozo je nakazala pomembnost miR-195-5p pri kostnih boleznih. V naši raziskavi smo hoteli oceniti vlogo miRNA-195-5p pri osteoporozni in preveriti napovedi bioinformatičnih analiz, ki so pokazale, da so *GST-CD*, *ELOVL6*, *CYP26B1* in *c-Myb* tarčni geni za miR-195-5p. Raziskovali smo, ali miRNA-195-5p vpliva na njihovo izražanje. V naših raziskavah smo uporabili celični model osteosarkomske celične linije HOS. Pristopili smo na dva načina, z luciferaznimi testi in nato še s kvantitativno PCR preverjali, ali so našti geni res direktne tarče za miRNA-195-5p. Ugotovili smo, da miR-195-5p različno vpliva na izražanje teh genov. Iz rezultatov luciferaznih testov lahko povzamemo, da se miR-195-5p direktno veže na zaporedje v genih *GST-CD* in *CYP26B1*. Luciferazni test za plazmid *pmirGLO-GST-CD* je namreč pokazal, da je bila relativna luciferazna aktivnost signifikantno znižana glede na negativno kontrolo ($p = 2 \times 10^{-5}$). Sklepamo, da je rekombinantna DNA z *GST-CD* zaporedjem najverjetneje vsebovala tarčno mesto za miR-195-5p, na katero se veže miRNA-195-5p in prepreči izražanje gena *GST-CD*. Kontrolna plazmida tarčnega mesta za to miRNA nista imela, zato smo izmerili visoko luminiscenco (slika 11). Podobne rezultate smo dobili za *pmirGLO-CYP26B1* (slika 12). Plazmida *pmirGLO* in *pmirGLO-miR-21 mut* nista vsebovala tarčnih mest za miR-195-5p, zato je bila njuna relativna luciferazna aktivnost (RLA) visoka. V primeru pozitivne kontrole, plazmida *pmirGLO-miR-21*, ki vsebuje vezavno mesto za miR-21-5p, pa je prišlo do znižanja RLA. Endogeno prisotna miR-21-5p je prepoznala tarčno mesto in z vezavo nanj negativno vplivala na izražanje plazmida *pmirGLO-miR-21* (56). Do inhibicije je prišlo tudi pri izražanju *CYP26B1*, saj je bila izmerjena RLA *pmirGLO-CYP26B1* nižja kot RLA njegove negativne kontrole. Konstrukt *pmirGLO-CYP26B1* torej vsebuje tarčno zaporedje za miR-195-5p na katerega se je vezala in povzročila da je do sinteze luciferaznega proteina prišlo v manjši meri in posledično v reakciji s substratom do šibkejše svetlobe - znižane relativne luciferazne aktivnosti. Na osnovi tega smo zaključili, da gen *CYP26B1* vsebuje tarčno mesto za miR-195-5p, na katerega naj bi se ta vezala in inhibirala izražanje gena. Na Katedri za klinično biokemijo

so kasneje dodatno naredili luciferazni test za *pmirGLO-CYP26B1*, za pozitivno kontrolo pa so uporabili plazmidni konstrukt *pmirGLO-CYP26B1 mut*. V vseh primerih, ne glede na vrsto dodanega mimika je bila RLA plazmidnega konstrukta *pmirGLO-CYP26B1* vedno nižja v primerjavi z RLA *pmirGLO-CYP26B1 mut*, kar korelira z našimi rezultati. Nasprotno je test luciferazne aktivnosti pokazal, da miRNA-195-5p nima vpliva na izražanje genov *ELOVL6* in *c-Myb*. Statistične razlike v izražanju teh dveh genov v primerjavi z izražanjem njunih negativnih in pozitivnih kontrol ni bilo. Izmerjena luminiscenca *pmirGLO-ELOVL6* se ni razlikovala od luminiscence negativne kontrole *pmirGLO*. Menimo, da do inhibicije ni prišlo, torej gen *ELOVL6* najverjetneje nima tarčnega zaporedja, na katerega bi se lahko vezala miR-195-5p (slika 11). Raziskave, ki so jih dodatno naredili sodelavci na Katedri za klinično biokemijo na *pmirGLO-c-Myb*, so pokazale, da *c-Myb* najverjetneje ne nosi tarčnega gena za miR-195-5p, zato se nanj ne veže in ga ne inhibira.

Vpletenost miR195-5p v uravnavanje izražanja izbranih štirih genov smo ocenjevali tudi z metodo Q-PCR. Tukaj smo primerjali, kakšno je izražanje tarčnih genov ob prisotnosti miR-195-5p. Celicam smo dodatno vstavljali (transfecirali) mimike miR-195-5p in preverjali, če se je izražanje tarčnih genov po 24 urah oziroma 48 urah značilno zmanjšalo. Rezultate smo podajali kot razmerje koncentracij med tarčnimi geni in referenčnim (hišnim) genom *RPLP0* ter jih primerjali z netransfeciranimi celicami. Signifikantne razlike v izražanju tarčnih genov so se pojavile šele po 48-urni transfekciji celic z mimiki. Domnevamo, da po preteklih 24 urah še ni nastalo dovolj RNA, da bi bile razlike vidne v izražanju genov med preučevanimi vzorci in negativnimi kontrolami. Glede na rezultate sklepamo, da je po 48 urah prišlo do opazne razlike v izražanju gena *GST-CD* zaradi dodanega mimika ($p = 0,036$). Tako se je miR-195-5p iz vzorca transfeciranih celic v večji meri vezala na tarčno mesto gena *GST-CD* ter inhibirala njegovo izražanje (slika 14). Do enakih zaključkov smo prišli tudi pri izražanju gena *CYP26B1* (slika 16). Metoda PCR v realnem času je za gena *ELOVL6* in *c-Myb* pokazala, da miR-195-5p na njihovo izražanje nima vpliva (slika 15, slika 17). Slednja gena sta se enako izražala tako v primeru dodanega mimika kot v primeru kontrole. Obstaja možnost, da vpliva miR-195-5p nismo zaznali zaradi morebitne premajhne količine izolirane RNA, ki je potrebna za zaznavo kakršnegakoli odziva. Za potrditev naših domnev bi morale biti izvedene še nadaljne študije.

5.1 Povezava miR-195-5p s kostnim tkivom

Rezultati, ki smo jih dobili, kažejo na to, da preučevana miR-195-5p na tarčne gene, določene z bioinformatično analizo, vpliva le deloma. Pokazali smo, da tarčno mesto za miR-195-5p najverjetneje nosita gena *GST-CD* in *CYP26B1*, zato miRNA regulira izražanje teh dveh genov, medtem ko na ostala nima vpliva. Po pregledu literature smo ugotovili, da naj bi gen *CYP26B1* sodeloval pri katabolizmu retinojske kisline (RA), tako da eliminira RA. Povečana koncentracija RA povzroči povečano osteoklastogenezo in zmanjšano osteoblastogenezo, poveča torej tveganje za zlom (57). Torej miR-195-5p negativno vpliva na kostno remodelacijo, saj inhibira *CYP26B1*, tako povzroča zvišano koncentracijo RA in posledično povečuje tveganje za razvoj osteoporoze. Za gen *c-Myb* smo zasledili, da ima pomembno vlogo pri induciranju osteogeneze dolgih kosti. Ob potencialni inhibiciji z miRNA bi znižano izražanje gena povzročilo zmanjšano osteogenezo. V literaturi za ostala dva gena nismo našli relevantne povezave s kostno remodelacijo.

Po drugi strani pa smo zasledili dve raziskavi, ki sta dokazali, da obstaja povezava med miR-195-5p in osteoblastno diferenciacijo ter BMP-signalno potjo. V prvi raziskavi so na mišjem modelu preučevali, ali je izražanje miR-195-5p povezano s starostjo, kako miR-195-5p vpliva na diferenciacijo celic in na BMP-signalno pot (58). Predvidevali so, da je miR-195-5p specifično povišana pri linijah osteoblastov. Naredili so analize pri različnih konfluentnostih, kar odraža različno starost celic. Celično rast so ustavljali z metotreksatom. Ugotovili so, da je miR-195-5p pri različnih stopnjah konfluentnosti različno izražena. Za določanje vpliva miR-195-5p na diferenciacijo in mineralizacijo so celice pCOBs transfecirali z mimikom miR-195-5p. Rezultate so lahko ovrednotili šele po devetih dneh, pri čemer so ugotovili, da vstavljena kontrola ni povišala endogene miR-195-5p, vendar pa je transfekcija z miR-195-5p povzročila znižanje ALP in transkripcijski faktorjev, med njimi tudi RUNX2. Da bi ugotovili vpliv miR-195-5p na BMP-signalno pot, so celice transfecirali ali z miR-195-5p ali z rhBMP. Dognali so, da se je regulacija faktorjev, ki sodelujejo pri BMP-poti, znatno spremenila v tistih celicah pCOBs in MC4, ki so bile transfecirane z miR-195-5p (58).

V drugi raziskavi so naredili poskuse na mišjih pre-osteoblastnih celicah, ki so jih primerjali s poskusi izvedenimi na človeških MSC-celicah. Mišjim celičnim linijam

MC3T3 so vstavili pospeševalce osteogeneze in jih opazovali 14 dni. V teh celicah je prišlo do mineralizacije in povečanja zgodnjega osteogenega markerja ALP. Rezultate so potrdili z RT-Q-PCR in zaznali povečano izražanje ALP, RUNX2 in OSN, tri dni po vstavljanju pospeševalcev osteogeneze. Vse rezultate, dobljene s poskusi na MC3T3, so primerjali s poskusi na človeških osteoblastih. Človeškim celicam MSC so prav tako vstavili pospeševalce osteogeneze, vendar so jih opazovali kar 28 dni. Opazili so povišano izražanje ALP in mineralizacijo. 3.,7.,14.,21. in 28. dan so analizirali izražanje miR-195-5p in ugotovili, da je bila v vseh točkah znižana. Z luciferaznim testom so ugotovili, da je VEGF-tarča za miR-195-5p ter da miR-195-5p posredno vpliva na izražanja SMAD5. V MSC-osteoblastnih celicah naj bi zmanjšana stopnja izražanja VEGF vodila do znižanja RUNX2. Pri mišjih celicah pa znižan VEGF vodi do zmanjšane kostne gostote (59).

Iz vseh opisanih raziskav je razvidno, da je miR-195-5p negativen regulator osteoblastogeneze in zato rizičen dejavnik za razvoj osteoporoze ali drugih kostnih bolezni. Tudi izsledki naše raziskave kažejo, da ima miR-195-5p pomembno vlogo pri kostni remodulaciji in podpirajo opisane zaključke. Z vedno večjim razumevanjem vloge potencialnih markerjev, bomo lahko nekoč diagnosticirali metabolične bolezni, ugotovili, kakšne so predispozicije za bolezen, dodatno potrdili diagnozo in zmanjšali možnost napačnega diagnosticiranja (60).

6 SKLEP

Namen magistrske naloge je bil potrditi hipotezo: miR-195-5p inhibira izražanje tarčnih genov *GST-CD*, *ELOVL6*, *CYP26B1* in *c-Myb* v sesalskih osteosarkomski celični liniji HOS preko direktne vezave na 3' UTR-zaporedje. Tekom naše raziskave smo zadane cilje deloma sprejeli. Molekulske konstrukte, ki smo jih potrebovali za nadaljno raziskovanje, smo skoraj v celoti uspešno sklonirali z metodo molekulskega kloniranja. Pridobili smo plazmide *pmirGLO-GST-CD*, *pmirGLO-GST-CD mut*, *pmirGLO-CYP26B1*, *pmirGLO-ELOVL6* in *pmirGLO-ELOVL6 mut*.

Na osnovi naših rezultatov, lahko zaključimo, da miR-195-5p inhibira izražanje genov *GST-CD* in *CYP26B1*, kar sta pokazali obe metodi – dvojni luciferazni test in kvantitativna reakcija s polimerazo v realnem času. Luminiscenca, izmerjena med luciferaznim testom, je bila pomembno različna od luminiscence, izmerjene njegovim kontrolam, kar pomeni, da gena najverjetneje vsebujeta 3' UTR-tarčno zaporedje za miR-195-5p. Ta se je nanj vezala in inhibirala izražanje gena. Za ostala tarčna gena lahko sklepamo, da je vpliv miR-195-5p zagotovo negativen, saj se izmerjena relativna luciferazna aktivnost pri obeh genih (*ELOVL6* in *c-Myb*) ni razlikovala od njihovih kontrol. Do enakih rezultatov smo prišli tudi s Q-PCR metodo; miR-195-5p inhibira izražanje genov *GST-CD* in *CYP26B1* v HOS celicah. Na osnovi teh rezultatov smo hipotezo, da miR-195-5p inhibira izražanje tarčnih genov, potrdili samo delno.

Z magistrsko nalogo smo potrdili vpletenost miR-195-5p v regulacijo izražanja genov *GST-CD* in *CYP26B1*, ki sta lahko udeležena v razvoj kostnih bolezni preko različnih signalnih poti npr. RUNX, BMP in VEGF. Upoštevajoč naše rezultate bi miR-195-5p v prihodnosti morda lahko uporabili kot diagnostični marker, vendar pa bi bile za potrditev teh dognanj potrebne še dodatne raziskave.

7 LITERATURA

1. Mencej Bedrač S, Zupan J, Kocjan T, Mlakar V, Preželj J, Marc J, Ostanek B: Zdravljenje osteoporoze danes in jutri. *Farmacevtski vestnik*, 2012; 63: 279–89.
2. Sok Kuan Wong, Kok-Yong Chin, Fariyah Hj Suhaimi, Fairus Ahmad, Soelaiman Ima-Nirwana: The Relationship between Metabolic Syndrome and Osteoporosis: A Review. *Nutrients*, 2016; 8: 347–65.
3. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P. *Interna medicina*, 4. Izdaja, Littera picta, d.o.o., Ljubljana, 2011: 973-1001.
4. Vrtačnik P, Marc J, Ostanek B: Epigenetic mechanisms in bone. *Clin Chem Lab Med*, 2014; 52(5): 589–608.
5. Ghayor C, Franz E. Weber: Epigenetic Regulation of Bone Remodeling and Its Impacts in Osteoporosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016; 17(9): 1446.
6. Grace L. Lin, Kurt D. Hankenson: Integration of BMP, Wnt, and Notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*, 2011; 112(12): 3491–501.
7. Mengge Sun, Xiaoya Zhou, Lili Chen, Shishu Huang, Victor Leung, Nan Wu, Haobo Pan, Wanxin Zhen, William Lu, and Songlin Peng: The Regulatory Roles of MicroRNAs in Bone Remodeling and Perspectives as Biomarkers in Osteoporosis. *BioMed Research International*, 2016(2016).
8. Garnero P: New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis. *Bone*, 2014; 66: 46–55.
9. Maria Teresa Valenti, Luca Dalle Carbonare, Monica Mottes: Osteogenic Differentiation in Healthy and Pathological Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(1), 41–50.
10. Zhao X, Xu D, Li Y, Zhang J, Liu T, Ji Y, Wang J, Zhou G, Xie X: MicroRna's regulate bone metabolism. *J Bone Miner Metab*, 2014; 32: 221–31.
11. Marini F, Cianferotti, Brandi M: Epigenetic Mechanisms in Bone Biology and Osteoporosis: Can They Drive Therapeutic Choices? *International Journal of Molecular Sciences*, 2016; 17(8), 1329.
12. Ell B, Kang Y: MicroRNAs as regulators of bone homeostasis and bone metastasis. *Bonekey Reports*, 2014; 3: 549–58.

13. He JF, Luo YM, Wan XH, Jiang D: Biogenesis of MiRNA-195 and Its Role in Biogenesis, the Cell Cycle, and Apoptosis. *J Biochem Mol Toxicol*, 2011; 25: 404–08.
14. Ui-Tei K: Is the Efficiency of RNA Silencing Evolutionarily Regulated. *Int J Mol Sci*, 2016; 17: 719–29.
15. Deilulis JA: MicroRNAs as regulators of metabolic disease: Pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int J Obes (Lond)*, 2016; 40: 88–101.
16. Wang S, Wan X, Ruan Q: The MicroRNA-21 in Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci*, 2016; 17: 864–73.
17. Tang P, Xiong Q, Ge W, Zhang L: The role of microRNA's in osteoclasts and osteoporosis. *RNA Biol.*, 2014; 11: 1355–363.
18. Xiao Ji, Xiang Chen, Xijie Yu: MicroRNA in osteoclastogenesis and function: Potential targets for osteoporosis. *Int J Mol Sci*, 2016; 17: 349–65.
19. Xie Y, Zhang L, Gao Y, Ge W, Tang P: The Multiple Roles of Microrna-223 in Regulating Bone Metabolism. *Molecules*, 2015; 20: 19433–9448.
20. Qu Q, Chu X, Wang P: MicroRNA-195-5p suppresses osteosarcoma cell proliferation and invasion by suppressing naked cuticle homolog 1. *Cell Biol Int*, 2016; 29.
21. Obeidat M, Miller S, Probert K, Billington CK, Henry AP, Hodge E, Nelson CP, Stewart CE, Swan C, Wain LV, Soler Artigas M, Melén E, Ushey K, Hao K, Lamontagne M, Bossé Y, Postma DS, Tobin MD, Sayers I, Hall IP: GSTCD and INTS12 regulation and expression in the human lung. *PLoS One*, 2013; 18.
22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79807>, dostopno: november 2016.
23. Matsuzaka T, Shimano H: Elovl6: a new player in fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *J Mol Med*, 2009; 87: 379–84.
24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79071>, dostopno: november 2016.
25. Xue X, Feng CY, Hixson SM, Johnstone K, Anderson DM, Parrish CC, Rise ML: Characterization of the fatty acyl elongase (elovl) gene family, and hepatic elovl and delta-6 fatty acyl desaturase transcript expression and fatty acid responses to diets containing camelina oil in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2014; 175: 9–22-
26. Nelson CH, Buttrick BR, Isoherranen N: Therapeutic Potential of the Inhibition of

- the Retinoic Acid Hydroxylases CYP26A1 and CYP26B1 by Xenobiotics. *Curr Top Med Chem.* 2013; 13(12): 1402–428.
27. Wen J, Lopes L, Soares G, Farrell SA, Ying Qiao Y, Martell S, Badukke C, Bessa C, Ylstra B, Lewis S, Isoherranen N, Patricia Maciel P, Separovic EV: Phenotypic and functional consequences of haploinsufficiency of genes from exocyst and retinoic acid pathway due to a recurrent microdeletion of 2p13.2. *Orphanet journal of rare diseases*, 2013; 8: 100.
 28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56603>, dostopno: november 2016.
 29. Bengsten M., Klepper K, Gundersen S, Cuervo I, Drablas F, Hoving E, Sandve GK, Gabrielsen OS, Eskeland R, c-Myb Binding Sites in Haematopoietic Chromatin Landscapes. *Plus One.* 2015; 10(7).
 30. Štrukelj B, Kos J: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, 1. Izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana 2007, 26–107.
 31. <https://www.promega.com/-/media/files/vector-sequences/luciferase/pmirglo.txt?la=en>, dostopno: februar 2017.
 32. Protocol for Annealing Oligonucleotides
<http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/protocols/biology/annealig-oligos.html>, dostopno: november 2016.
 33. <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>, dostopno: november 2016.
 34. Ligation Protocol with T4 DNA Ligase
<https://www.neb.com/protocols/1/01/01/dna-ligation-with-t4-dna-ligase-m0202>, dostopno: november 2016.
 35. One Shot®TOP 10 Competent Cells, Invitrogen
http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshottop10_man.pdf, dostopno: november 2016.
 36. QIAprep®Miniprep Handbook, QIAGEN
https://public.wsu.edu/~kahn_sci/Flow/E2-QIAprep_Miniprep_Handbook.pdf, dostopno: november, 2016.
 37. QIAquick®Spin Handbook, QIAGEN
http://mvz.berkeley.edu/egl/inserts/QIAquick_Spin_Handbook.pdf, dostopno: november, 2016.
 38. PureYield™ Plasmid Midiprep System
<https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical->

- manuals/0/pureyield-plasmid-midiprep-system-protocol.pdf, dostopno: november 2016.
39. RNeasy® Plus Mini Handbook, QIAGEN
<http://mace.ihes.fr/data/protocol/1/RNeasy%20Plus%20Mini.pdf>, dostopno: november 2016.
40. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika I, Učbenik za študente laboratorijske biomedicine, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012, 108–48.
41. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042557.pdf, dostopno: november 2016.
42. http://www.blackwellpublishing.com/allison/docs/sample_ch8.pdf, dostopno: februar 2017.
43. Dual-Luciferase® Reporter Assay System, TECHNICAL MANUAL
<https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf>, dostopno: november 2016.
44. pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector
<https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/a/pmirglo-dual-luciferase-mirna-target-expression-vector-protocol.pdf>, dostopno: januar 2017.
45. <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/showdig.php?name=e5b502a4->, dostopno: februar 2017.
46. Cloning and Sequencing Explorer Series, Bio-Rad Explorer™
<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/10000069187.pdf>, dostopno: januar 2017.
47. <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>, dostopno: januar 2017.
48. <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/listdig.php?name=e5b502a4-&showgel=1>, dostopno: februar 2017.
49. Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research, PROMEGA
<https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/cell-notes/cn021/luciferase-reporter-assays-powerful-adaptable-tools-for-cell-biology-research.pdf?la=en>,

- dostopno: januar 2017.
50. T.A. Brown: Gene cloning and DNA analysis, 6. Izdaja, Wiley-Blackwell, UK, 2007, 63–4.
 51. Seeman NC: At the Crossroads of Chemistry, Review Biology, and Materials: Structural DNA Nanotechnology. *Cell Chemical Biology*, 2003; 10: 1151–159.
 52. Fonović UP, Obermajer N, Jevnikar Z, Mirković B, Rojnik M, Hafner A, Kos J: Vaje iz farmacevtske biokemije, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo, 2. Izdaja, Ljubljana 2011, 74.
 53. Dale JW, von Schantz M: From genes to genomes, 2. Izdaja, John Wiles & Sons, UK 2007, 37.
 54. <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/listdig.php?name=e5b502a4-&showgel=1>, dostopno: februar 2017.
 55. Kushlinskii NE, Fridman MV, Braga EA: Molecular mechanisms and microRNAs in osteosarcoma Pathogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, 2016; 4: 315–28.
 56. Vanas V, Haigl B, Stockhammer V, sutterlüty-Fall H: MicroRNA-21 Increase Proliferation and Cisplatin Sensitivity of Osteosarcoma-Derived Cells. *PloS One*, 2016; 11.
 57. Yorgan TA, Heckt T, Rendenbach C, Helmis C, Seitz S, Streichert T, Amling M, Schinke T: Immediate effects of retinoic acid on gene expression in primary murine osteoblasts. *J Bone Miner Metab* (2016) 34: 161–170.
 58. Grünhagen J, Bhushan R, Degenkolbe E, Jäger M, Knaus P, Mundlos S, Robinson PN, Ott CE: MiR-497~195 cluster microRNAs regulate osteoblast differentiation by targeting BMP signaling. *J Bone Miner Res*, 2015; 30: 796–808.
 59. Almeida MI, Silva AM, Vasconcelos DM, Almeida CR, Caires H, Pinto MT, Calin GA, Santos SG, Barbarosa MA: MiR-195 in human primary mesenchymal stromal/stem cells regulates proliferation, osteogenesis and paracrine effect on angiogenesis. *Oncotarget*, 2016; 7: 7–22.
 60. Mohseny AB, Machado I, Cai Q, Schaefer KL, Serra M, Hogendoom PC, Liombart-Bosch A, Cleton-Jansen AM: Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. *Lab Invest*, 2011; 8: 1195–205.
 61. van Rooij E: The art of MicroRNA research. *Circ Res*, 2011; 108: 219–34.