

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA ERKLAVEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA ERKLAVEC

VPLIV SELENITA NA AKTIVNOST TIOPURIN S-METILTRANSFERAZE

**THE EFFECT OF SELENITE ON THIOPURINE S-METHYLTRANSFERASE
ACTIVITY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof.dr. Irene Mlinarič-Raščan in somentorstvom asist. dr. Alenke Šmid.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan za strokovno vodenje, somentorici asist. dr. Alenki Šmid za strokovno vodenje in pomoč pri laboratorijskem delu in Dunji Urbančič za pomoč pri laboratorijskem delu.

Zahvala gre tudi vsem bližnjim in domačim za podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan in somentorstvom asist. dr. Alenke Šmid.

Urška Erklavec

Komisija:

Predsednik: prof. dr. Albin Kristl

Mentorica: prof. dr. Irena Mlinarič Raščan

Somentorica: asist. dr. Alenka Šmid

Članica: asist. dr. Mirjam Gosenca

Povzetek

Vpliv selenita na aktivnost tiopurin S-metiltransferaze (TPMT) smo proučevali v limfoblastoidnih celičnih linijah, katerim smo dodali selenit. Encim TPMT ima pomembno vlogo v terapiji s tiopurini, saj zmanjša nastanek toksičnih tiogvaninov. Bolniki z nizko aktivnostjo encima TPMT imajo večje tveganje za pojav neželenih učinkov, previsoka aktivnost TPMT pa zmanjša učinkovitost zdravljenja pri standardnih odmerkih. Nizka aktivnost TPMT je posledica mutacij v genu *TPMT* na enem ali obeh alelih. Večino preostalih faktorjev, ki tudi vplivajo na aktivnost TPMT, še ne poznamo, tako kot tudi ne poznamo njegove endogene vloge. Nekatere raziskave nakazujejo na vlogo TPMT pri metilaciji selenovih spojin, zato smo po dodatku selenita primerjali metabolno aktivnost celic in merili aktivnost TPMT in koncentracijo S-adenozilmetionina (SAM) z metodo HPLC. Limfoblastoidne celične linije z dodanim selenitom ($0,8\mu\text{M Na}_2\text{SeO}_3$) so imele po 72 h višjo aktivnost TPMT kot kontrolna skupina brez dodanega selenita. To smo opazili predvsem pri vzorcih z genotipom *TPMT* divjega tipa (genotip *TPMT* +/+), medtem ko je bila ta razlika manj izražena pri celičnih linijah z mutiranim genotipom (genotip *TPMT* -/-). Vidna je tudi razlika v koncentraciji SAM, ki nastopa v reakciji metilacije kot donor metilne skupine. V celicah, ki smo jih gojili v prisotnosti selenita, smo izmerili višje koncentracije SAM po 24 h.

Dodatno smo preučili vlogo izbranih mikro RNA (miRNA) v procesih uravnavanja aktivnosti TPMT ter vpliv selenita na izražanje miRNA. V spletnih bazah smo določili tri miRNA, ki imajo najboljšo oceno verjetnosti interakcije z informacijsko RNA *TPMT*. Izražanje izbranih miRNA smo izmerili s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Rezultati so pokazali višje izražanje miR-185 po 72 h in višje izražanje let-7a po 24 h od dodatka selenita. Vzorci z dodanimi selenitom in z genotipom *TPMT* -/- imajo nižje izražanje miR-223 kot vzorci z genotipom *TPMT* +/+. Na osnovi višjega izražanja merjenih miRNA pri vzorcih z višjo aktivnostjo TPMT lahko predvidevamo, da obstaja povezava med izbranimi miRNA in TPMT aktivnostjo. Pri meritvah miRNA smo opazili velike razlike med biološkimi ponovitvami, zato bo potrebno za validacijo rezultatov optimizirati metodo merjenja. V procesu izbiranja miRNA smo našli heterogene podatke med spletnimi bazami, ki uporabljajo različne algoritme za napoved interakcij med miRNA in mRNA, zato je za bolj verjetno napoved dobro preveriti več podatkovnih baz in zanesljivost le-teh.

Ključne besede: Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT), selenit, mikro RNA, S-adenozilmetionin (SAM)

Abstract

The effect of selenite on thiopurine S-methyltransferase (TPMT) activity was studied in lymphoblastoid cell lines (LCL) treated with selenite. TPMT enzyme has an important role in the thiopurine therapy because it lowers the level of toxic tioguanins. At standard doses of the thiopurine therapy, low activity of TPMT enzyme leads to severe side effects while too high activity of TPMT enzyme reduces efficiency of thiopurine therapy. Low TPMT enzyme activity is a consequence of *TPMT* gene mutation on one or both alleles. Most of the other factors influencing TPMT enzyme activity are not known yet as well as its endogene role. Some studies indicate its role in the methylation of selenium compounds. After addition of selenite to cells we measured their metabolic activity, TPMT enzyme activity and concentration of S-adenosyl methionine (SAM) with HPLC. LCL treated with selenite (0.8 μ M Na₂SeO₃) showed a higher TPMT activity after 72 h compared to the control group; especially in *TPMT* wild-type samples (+/+ genotype), while in the mutated LCL (-/- genotype) this difference was less expressed. There were also differences in the concentrations of SAM. SAM acts as a donor of methyl group in the methylation reaction. LCL with added selenite had higher SAM concentrations after 24 h of treatment compared to the control group.

Additionally we researched the role of micro RNA (miRNA) in TPMT activity regulation and miRNA expression after the selenite addition. Most miRNAs bond to mRNA and in such way inhibit translation to protein. Three miRNAs that have the best probability for interaction with TPMT mRNA were determined according to web databases. The expression of selected miRNA was measured with quantitative polymerase chain reaction in real time. The results have shown a higher expression of miR-185 after 72 h and higher expression of let-7a after 24 h of selenite treatment. The selenite treated LCL with -/- *TPMT* genotype had a lower expression of miR-223 in comparison to LCL with +/+ *TPMT* genotype. Based on higher expression of miRNA in the samples with higher TPMT activity we can hypothesize that there is a connection between selected miRNAs and TPMT enzyme activity. MiRNA measurements showed significant differences between biological replicates, therefore we should firstly optimize the method of measuring miRNA to validate our findings. In the process of choosing miRNAs we found heterogenic data in different web based databases for predicting miRNA-mRNA interactions. Therefore several databases should be checked to obtain more reliable predictions.

Key words: Thiopurine S-methyltransferase (TPMT), selenite, micro RNA, S-adenosyl methionine (SAM)

Seznam okrajšav

6-MMP	6-metilmerkaptopurin
3'UTR	3' neprevedena regija (3' untranslated region)
ALL	akutna limfoblastna levkemija
cDNA	komplementarna DNA (complementary DNA)
DMSe	dimetil selenid
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (European Food Safety Authority)
FBS	Fetalni goveji serum (Fetal bovine serum)
GPX	glutation peroksidaza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high precision liquid chromatography)
IC50	polovica maksimalne inhibitorne koncentracije
KP	kalijev fosfatni (pufer)
LCL	limfoblastoidna celična linija
miRNA	mikro RNA
mRNA	informacijska RNA
MTI	interakcija miRNA – tarča (mRNA) (miRNA-target interaction)
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
PES	fenazin etosulfat
ROS	reaktivne kisikove spojine (reactive oxygen species)
RPMI	medij Roswell Park Memorial Institute
SAM	S-adenozilmetionin
SECIS	zaporedje za vstavitev selenocisteina (selenocysteine insertion sequence)
snRNA	majhna jedrna RNA (small nuclear RNA)
TGN	tiogvaninski nukleotid
TMSe	trimetil selenonij
TPMT	tiopurin S-metiltransferaza

Kazalo

1	Uvod.....	1
1.1	Tiopurin S-metiltransferaza	1
1.1.1	Encim TPMT in inhibitorji.....	1
1.1.2	Vpliv genotipa <i>TPMT</i> na aktivnost TPMT.....	1
1.1.3	Tiopurini in njihov metabolizem.....	3
1.2	Selen in selenoproteini.....	4
1.2.1	Selen in selenit	4
1.2.2	Selenoproteini.....	5
1.2.3	Metabolne poti selenovih spojin.....	7
1.3	S-adenozilmetionin (SAM).....	8
1.4	Povezava med TPMT in selenom	9
1.5	Mikro RNA	9
1.5.1	Mehanizem delovanja miRNA.....	10
1.5.2	MiRNA miR-185(-5p).....	11
1.5.3	MiRNA miR-223(-5p).....	12
1.5.4	MiRNA let-7a(-5p).....	12
1.5.5	RNU6	13
2	Namen dela.....	14
3	Materiali in metode	15
3.1	Bioinformatične metode	15
3.1.1	Bioinformatični pregled spletnih podatkovnih baz	15
3.1.2	Izbira miRNA.....	15
3.2	Metode dela v laboratoriju	16
3.2.1	Uporabljene kemikalije in reagenti	16
3.2.2	Uporabljeni pripomočki in aparature	18
3.2.1	Gojenje celic.....	18
3.2.2	Test metabolne aktivnosti.....	19
3.2.3	Določanje aktivnosti TPMT in koncentracije SAM.....	20
3.2.4	Izolacija RNA.....	21
3.2.5	Meritve koncentracije RNA	22
3.2.6	Reverzna transkripcija RNA v cDNA	22
3.2.7	RT-qPCR– kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času	23
3.2.8	Normalizacija meritev miRNA	24

3.3	Statistična obdelava podatkov	25
4	Rezultati in razprava.....	26
4.1	Bioinformatični izbor miRNA	26
4.2	Določanje razlik metabolne aktivnosti LCL po dodatku selenita.....	32
4.3	Aktivnost TPMT in koncentracija SAM.....	33
4.3.1	Aktivnosti TPMT	33
4.3.2	Koncentracije SAM.....	35
4.4	Izražanje miRNA	38
4.4.1	Izražanje miR-185	38
4.4.2	Izražanje miR-223	39
4.4.3	Izražanje let-7a	40
4.5	Analiza korelacij	41
5	Sklep.....	46
6	Literatura	47

Kazalo slik

Slika 1: Struktura tiopurin S-metiltransferaze (TPMT).....	1
Slika 2: Najpogostejši TPMT aleli	2
Slika 3: Tiopurinska zdravila.....	3
Slika 4: Metabolizem 6-merkaptopurina	4
Slika 5: Metabolne poti selenovih spojin	7
Slika 6: Strukturna formula SAM.....	8
Slika 7: Prikaz prepisa miRNA	11
Slika 8: Shema gojenja celic.....	19
Slika 9: Metabolna aktivnost celic po dodatku selenita po 24 h	33
Slika 10: Aktivnost TPMT v lizatih LCL.....	34
Slika 11: Koncentracija SAM v lizatih LCL	36
Slika 12: Graf korelacije aktivnosti TPMT in koncentracije SAM pri vzorcih divjega tipa (genotip <i>TPMT</i> +/+)......	37
Slika 13: Izražanje miR-185 po vzorcih.....	38
Slika 14: Izražanje miR-223 po vzorcih.....	39
Slika 15: Izražanje let-7a po vzorcih	40
Slika 16: Korelacija izražanja let-7a in koncentracije SAM pri vzorcih z genotipom <i>TPMT</i> -/-	41

Kazalo preglednic

Preglednica I: 25 poznanih človeških selenoproteinov	6
Preglednica II: Uporabljeni reagenti.....	16
Preglednica III: Uporabljeni pripomočki in aparature.....	18
Preglednica IV: Reakcijska mešanica za reverzno transkripcijo.....	23
Preglednica V: Reakcijska mešanica za RT-qPCR	23
Preglednica VI: Program PCR.....	24
Preglednica VII: Pregled ocen interakcij miRNA z mRNA selenoproteinov in TPMT	26
Preglednica VIII: Pregled spletnih baz za napoved interakcij.....	27
Preglednica IX: Pregled pozitivnih interakcij po bazah	31
Preglednica X: Podatki o vzorcih in IC50 Na ₂ SeO ₃	32
Preglednica XI: Analiza meritev aktivnosti TPMT po 72 h.....	35
Preglednica XII: Analiza meritev koncentracije SAM po 24 h.....	37
Preglednica XIII: Pregled korelacij med merjenimi parametri	42

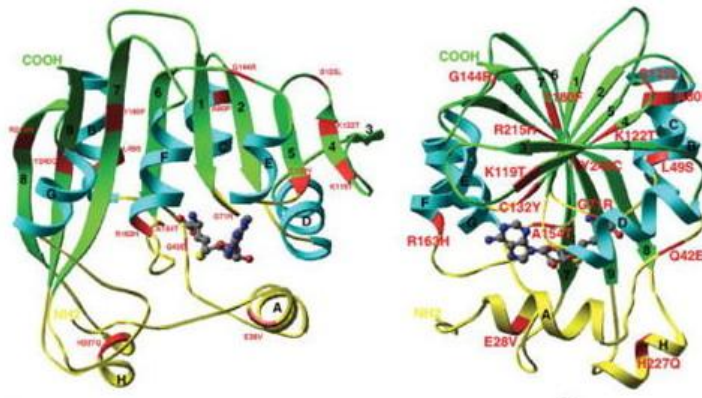
1 Uvod

1.1 Tiopurin S-metiltransferaza

1.1.1 Encim TPMT in inhibitorji

Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT) je citoplazemski encim (*Slika 1*), katerega endogena funkcija še ni poznana (1). Raziskani substrati TPMT encima so predvsem tiopurinska zdravila, deloma pa tudi metabolit disulfirama (dietilditiokarbamat), ki se uporablja pri zdravljenju alkoholizma (2).

Med inhibitorje TPMT spadata 2-hidroksimerkaptopurin in 2,8-hidroksimerkaptopurin ter tudi številni derivati benzojske kisline, kot so salicilna kislina, sulfasalazin in mesalazin. Zadnja dva se uporabljata tudi pri primerih vnetne črevesne bolezni, tako kot tudi terapija s tiopurini, zato je potrebna previdnost pri predpisovanju, da ne pride do hkratnega jemanja in posledično do neželene interakcije (1, 3).



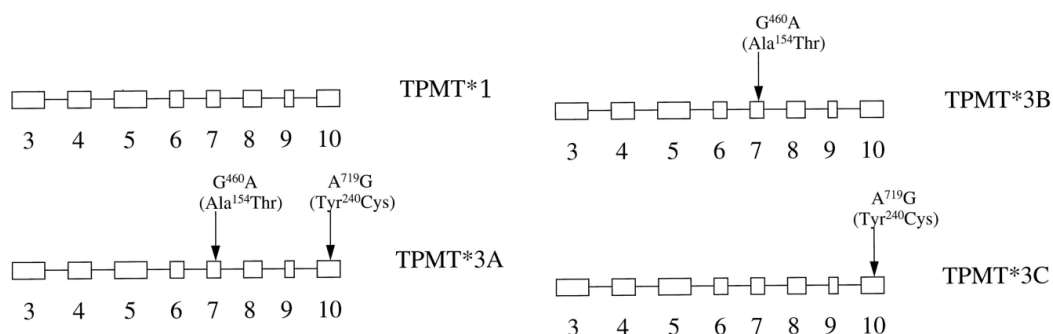
Slika 1: Struktura tiopurin S-metiltransferaze (TPMT)

TPMT je eno domenski protein s klasičnim zvitjem metiltransferaz razreda 1. Domena vsebuje devet β -struktur (zelene barve), ki so obdane s tremi α -vijačnicami (modre barve). Iz analize strukture človeškega TPMT so raziskovalci ugotovili, da se pojavljajo aminokislinske zamenjave v celem zaporedju encima, vendar največji vpliv na funkcionalnost TPMT imajo tiste zamenjave, ki nastanejo na mestih, ki so odgovorne za stabilizacijo encima preko van der Waalsovih vezi, kot sta tudi mutaciji *3B in *3C (4).

1.1.2 Vpliv genotipa *TPMT* na aktivnost TPMT

Gen za tiopurin S-metiltransferazo (*TPMT*) se nahaja na kromosomu 6p22.3. Genotip *TPMT* je pri posamezniku podedovan kot ko-dominantna in monogenetska lastnost. Poznanih je več kot 20 variantnih alelov oziroma mutacij, za večino katerih imamo na

voljo genetsko testiranje. Najpogostejši aleli so *TPMT**2, *3A in *3C (Slika 2), saj so le-ti odgovorni za znižano aktivnost TPMT v več kot 90% primerih (5, 6). Najpogostejši raziskani mehanizem, ki vpliva na zmanjšano aktivnost TPMT, je pospešena razgradnja encima preko vezave ubikvitina, kar vodi v proteasomsko razgradnjo proteina (7).



Slika 2: Najpogostejši TPMT aleli

TPMT*1 je najpogostejši alel (divji tip) in je brez mutacije, TPMT*3A je najpogostejši variantni alel med Kavkazijci, TPMT*3C pa je najpogostejši variantni alel med vzhodnimi Azijci. Pravokotniki na sliki predstavljajo odprte bralne okvirje (8).

Porazdelitev aktivnosti TPMT je pri kavkazijcih trimodalna in v veliki meri korelira z genotipom TPMT. Približno 89 % Kavkazijcev ima visoko oziroma normalno aktivnost encima (večinoma posamezniki z genotipom divjega tipa *TPMT* +/+ , kjer mutacija ni prisotna), 11 % ima nizko aktivnost encima (večinoma gre za posameznike s heterozigotnim genotipom *TPMT* +/- z mutacijo na enem alelu) in približno 0,3% oseb izkazuje zelo nizko oziroma odsotno aktivnost encima (posamezniki z genotipom *TPMT* -/- , z mutacijo na obeh alelih) (6, 1). Kljub temu, da je genotip dober kazalec aktivnosti TPMT, so v študiji na 1017 Estoncih ugotovili odstopanja pri 14% posameznikov z genotipom *TPMT* +/+ , ki so imeli nepričakovano nizko aktivnost TPMT in 18% posameznikov s heterozigotnim (+/-) genotipom, ki so imeli aktivnost TPMT nad pričakovano vrednostjo (9).

Pri proteomskih raziskavah na človeških T-limfocitih so z dodatkom kratkih lasničnih RNA inhibirali gen *TPMT*, s čimer so znižali encimsko aktivnost TPMT za vsaj 72%, kar je vodilo v povišan oksidativni stres. To so pokazali s testom reaktivnih kisikovih zvrsti in spremembami na nekaterih proteinih, ki so vpleteni v procese oksidativnega stresa, kot sta tioreduksin odvisna peroksid reduktaza (PRDX3) in superoksid dismutaza 1 (SOD1) (10).

1.1.3 Tiopurini in njihov metabolizem

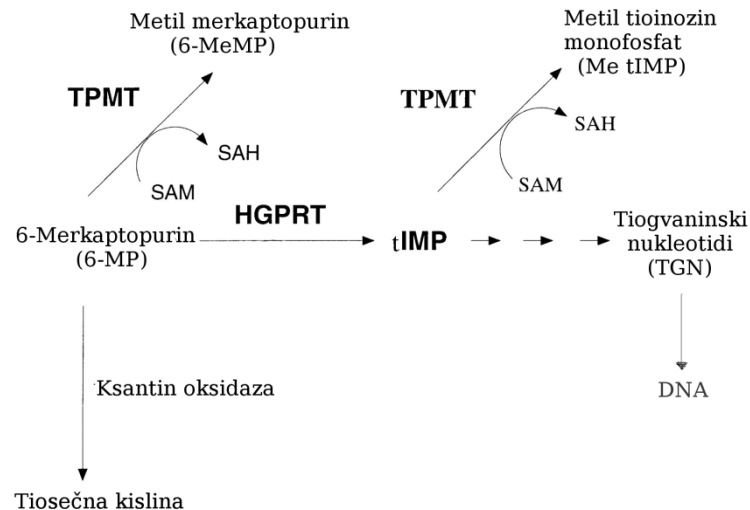
TPMT je eden izmed glavnih inhibitornih encimov tiopurinskih zdravil (*Slika 3*), ki se že dolgo uporabljajo v terapiji vnetnih in avtoimunskih bolezni ter raka. Merkaptopurin in tiogvanin sta indicirana za zdravljenje akutne levkemije, kjer se ju uporablja pri indukciji remisije, predvsem pa sta indicirana za vzdrževalno zdravljenje pri akutni limfoblastni levkemiji in akutni mieloični levkemiji (11, 12). Azatioprin je imunosupresivni antimetabolit, ki se lahko uporablja samostojno ali v kombinaciji z drugimi učinkovinami, ki vplivajo na imunski odziv. Z uporabo azatioprina se zmanjša poraba kortikosteroidov, s čimer se zmanjša toksičnost pri dolgotrajnem jemanju steroidov. Azatioprin se uporablja v kombinaciji z drugimi imunosupresivi za preprečevanje zavrnitve presajenih organov ter pri zmernih do hudih črevesnih boleznih, kot sta Crohnova bolezen in ulcerozni kolitis (13).



Slika 3: Tiopurinska zdravila

Strukturne formule tiopurinskih zdravil (14).

Pri pacientih z nizko aktivnostjo TPMT, ki prejemajo standardni odmerek terapije, obstaja tveganje supresije kostnega mozga zaradi povišane koncentracije citotoksičnih tiogvaninskih nukleotidov (TGN). TGN se vključi v DNA, kar vodi v programirano celično smrt (*Slika 4*). Pri pacientih, ki imajo na drugi strani zelo visoko aktivnost TPMT, pa se preveč zdravila inaktivira in posledično se poviša tveganje za ponovni pojav bolezni (1, 5, 15). Pacientom z znižano aktivnostjo TPMT je potrebno ustrezno znižati odmerek tiopurinov: pacienti z genotipom *TPMT* $-/-$ potrebujejo 10% standardnega odmerka, osebe z genotipom *TPMT* $+/-$ pa 30-70%, odvisno od odziva na začetni odmerek (16).



Slika 4: Metabolizem 6-merkaptopurina

Shema prikazuje inaktivacijo tiopurinov s TPMT pri čemer sodeluje S-adenozilmetionin (SAM) kot donor metilne skupine. Druga pot inaktivacije tiopurinov je s ksantin oksidazo do tiosečne kisline. Metabolično aktivacijo tiopurinov do tiogvaninskih nukleotidov (TGN) katalizirajo hipoksantin gvanin fosforiboksiltransferaza (HGPRT) in inozin monofosfat (IMP) dehidrogenaza. Nastanek TGN je ključen za delovanje zdravila, vendar preveč TGN vodi v neželene učinke, kot je supresija kostnega mozga (8).

1.2 Selen in selenoproteini

1.2.1 Selen in selenit

Selen je esencialno mikrohranilo, ki je toksično ob višjih odmerkih. Ima žveplu podobne lastnosti, a tudi nekatere lastnosti kovin (17). Vloga selena je bila raziskana v preventivi in zdravljenju bolezni. Povprečen vnos selenovih spojin v telo je odvisen od hrane in regije. Po smernicah EFSA (Evropska agencija za varnost hrane) je priporočen dnevni vnos selena za odrasle 70 µg/dan (18). Najpomembnejši vir selena je hrana, zato se pomanjkanje selena pojavi običajno zaradi uživanja hrane, ki je bila gojena v zemlji, ki ima v določenih regijah zelo malo selena. Pomanjkanje selena se lahko kaže s kardiomiopatijo in Keshanovo boleznijo, ki se pojavlja v nekaterih predelih Kitajske. Epidemiološke študije so pokazale tudi povezave nizkega statusa selena z različnimi boleznimi, kot so srčno-žilne bolezni, rak, infekcije, reproduktivne težave in motnje razpoloženja. Zastrupitev s selenom se kaže z izgubo las, prebavnimi motnjami, česnovim zadahom in težavami v živčnem sistemu (17, 18). Ocena zgornje varne meje je 300 µg/dan, pri čemer še ni opaznih stranskih učinkov (18).

Med zdravili najdemo selen v antioksidativni učinkovini ebselen (še v fazi kliničnih

študij), ki oponaša glutation peroksidazno (GPX) aktivnost, vendar natančen mehanizem delovanja še ni razložen (19). Zaradi mehanizma delovanja je ebselen uporabno orodje v proučevanju celičnih redoks mehanizmov (20). Poleg potencialnih indikacij v primeru raka in srčno-žilnih dogodkov raziskovalci odkrivajo uporabnost ebselena tudi pri infekcijah z rezistentnimi bakterijami, kot so MRSA (proti metilicinu odporni *Staphylococcus aureus*) in VRSA (proti vankomicinu odporni *Staphylococcus aureus*), tako samostojno kot sinergistično z drugimi antimikrobnimi zdravili (21).

V prehranskih dopolnilih, prehrani za živali in v pripravkih za dojenčke pogosto najdemo selen v obliki selenita (SeO_3^{2-}), selenata (SeO_4^{2-}), L-selenometionina in s selenom obogatenih kvasovk. Antioksidativne lastnosti selenovih spojin, kot sta nevtralizacija reaktivnih kisikovih snovi in indukcija apoptoze v rakavih celicah, nakazujejo na pomembno vlogo selena v preventivi rakavih obolenj (22). Ugotovili so, da SeO_2 in Na_2SeO_3 delujeta v celicah pro-oksidativno kot tudi antioksidativno, odvisno od koncentracije selenove spojine in vodikovega peroksida. Dodatno so ugotovili, da je antioksidativno delovanje odvisno od oksidativnega stanja selenovega atoma v anorganskih selenovih spojinah (23). Battin s sodelavci pa je povezal antioksidativne lastnosti selena s kompleksacijo kovinskih ionov (kot sta železo in baker), ki so odgovorni za nastanek reaktivnih radikalov in posledično za oksidativne poškodbe DNA. V celicah so z bakrovimi ioni sprožili nastanek $\cdot\text{OH}$ radikalov ter preverili poškodbe DNA. V primeru dodatka selenocistina je le-ta popolnoma zavrl oksidativne poškodbe DNA. Na osnovi meritev aktivnosti GPX se je 2-aminofenil diselenid (v primerjavi s selenocistinom in selenometioninom) pokazal kot najbolj antioksidativen, rezultati meritev poškodb DNA pa so bili slabši kot pri selenocistinu. Avtor zaključuje, da je bolj kot nevtralizacija vodikovega peroksida z glutation peroksidazno aktivnostjo pomembna vloga selena pri inhibiciji nastanka $\cdot\text{OH}$ radikala (24).

1.2.2 Selenoproteini

Selen je del aminokisliline selenocistein, ki je del aktivnega mesta pri selenoproteinih. Selenocistein se vgradi v peptid preko UGA kodona na mRNA, ko je prisoten poseben motiv oziroma zaporedje, ki omogoča vključitev (kratica: SECIS). Če motiv SECIS ni prisoten, določa UGA kodon zaključek sinteze polipeptidne verige. Selenoproteini so tisti proteini, ki vsebujejo selenocistein, medtem ko so proteini, ki vsebujejo selenometionin,

poimenovani kot selen-vsebujoči proteini, saj pri prevajanju proteina iz AUG kodona ne pride do razlikovanja med metioninom in selenometioninom. Kljub vgradnji selenometionina v protein do sedaj še niso opazili posebnega vpliva selena na delovanje teh proteinov. Pri ljudeh poznamo 25 različnih selenoproteinov (*Preglednica I*) (25).

Preglednica I: 25 poznanih človeških selenoproteinov

Selenoprotein (okrajšava)	Vloga
Glutation peroksidaza 1 (GPX1)	Antioksidativna (citosol)
Glutation peroksidaza 2 (GPX2)	Antioksidativna (gastrointestinalno tkivo)
Glutation peroksidaza 3 (GPX3)	Antioksidativna (plazma)
Glutation peroksidaza 4 (GPX4)	Fosfolipidna hidroperoksid glutation peroksidaza
Glutation peroksidaza 6 (GPX6)	Antioksidativna (olfaktorna)
Jodotironin dejodinaza 1 (DIO1)	Aktivira tiroidni hormon
Jodotironin dejodinaza 2 (DIO2)	Tkivno specifično aktivira tiroidni hormon
Jodotironin dejodinaza 3 (DIO3)	Tkivno specifično deaktivira tiroidni hormon
Tioreduksin reduktaza 1 (TXNRD1)	Redukcija citosolnega tioreduksina
Tioreduksin/glutation reduktaza (TXNRD2)	Redukcija tioreduksina v testisih
Tioreduksin reduktaza 3 (TXNRD3)	Redukcija mitohondrijskega tioreduksina
Metionin-R-sulfoksid reduktaza (MSRB1, SelR, SelX)	Redukcija oksidiranih metioninskih odstankov
Selenofosfat sintetaza 2 (SPS2, SEPHS2)	Sodeluje v sintezi selenoproteinov
Selenoprotein W (SelW)	Nepoznana
Selenoprotein T (SelT)	Nepoznana
Selenoprotein H (SelH)	Nepoznana
Selenoprotein V (SelV)	Nepoznana
Selenoprotein I (SelI, EPT1)	Nepoznana
15kDa selenoprotein (Sel15)	Nadzor zvijanja proteinov v ER*
Selenoprotein M (SelM)	Nepoznana
Selenoprotein K (SelK)	Razgradnja proteinov v ER*
Selenoprotein S (SelS, VIMP)	Razgradnja proteinov v ER*
Selenoprotein O (SelO)	Nepoznana
Selenoprotein N (SelN)	Sodeluje pri razvoju mišic
Selenoprotein P (SelP)	Transport selena

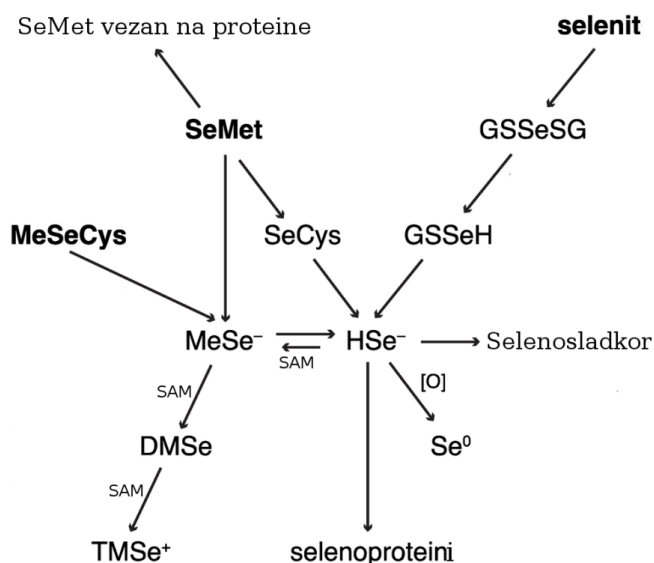
*ER: endoplazmatski retikulum

Selenoproteini imajo v telesu različne vloge, kot so antioksidativna (glutation peroksidaze), transport selena (selenoprotein P), vzdrževanje znotrajceličnega redoks stanja (tioreduksin reduktaze) in proizvodnje ščitničnih hormonov (jodotironin dejodinaze); vloga ostalih selenoproteinov pa je relativno slabo poznana. Zaradi vloge selena pri oksidativnem stresu je bilo opravljenih veliko raziskav o vplivu selena na srčno-žilne in nevrodegenerativne

bolezni ter rakava obolenja (26).

Glutation peroksidaze (GPX) so encimi, ki so ključni pri detoksifikaciji peroksidov in zaščiti celic pred oksidativnimi poškodbami. GPX1 je citosolni encim, ki ga najdemo v vseh tkivih in krvnih celicah, kjer reagira s peroksidi, tako kot GPX3, ki ga najdemo izločenega v plazmi in mleku. GPX6 pa se nahaja v olfaktornem epiteliju in je homolog GPX3, njegova vloga pa še ni poznana (27).

1.2.3 Metabolne poti selenovih spojin



Slika 5: Metabolne poti selenovih spojin

HSe⁻ - selenid; SeMet-selenometionin; MeSeCys-metilselenocistein; SeCys-selenocistein; MeSe⁻ - metil selenid; DMSe- dimetil selen; TMSe⁺ - trimetil selenonij; GSSeSG - selenodiglutation; GSSeH - glutatioselenol; SAM – S-adenozilmetionin (26).

Po absorpciji se selenat in selenit naprej reducirata do selenida (HSe⁻) v reakciji z glutationom, medtem ko se absorbirani selenometionin (SeMet) najprej pretvori v selenocistein (SeCys), ta pa se razgradi do selenida (HSe⁻). Selenid se nadalje pretvori v selenofosfat in selenocistein-tRNA, nato pa se lahko vgradi v selenoprotein (Slika 5).

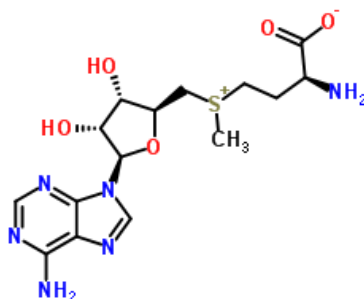
Pri izločanju selena z metilacijo selenida nastane dimetil selenid (DMSe), ki ga izločimo z dihanjem, medtem ko z metilacijo dimetil selena nastane trimetil selenonij (TMSe⁺), ki se izloči z urinom. Za to metilacijo so odgovorne tiol-S-metiltransferaze in tioeter-S-metiltransferaze, ki prenesejo metilno skupino iz S-adenozilmetionina (SAM) na selenid (HSe⁻) in na nadaljnje metilirane metabolite (25, 26). Glavni metabolit v urinu se razlikuje med posamezniki glede na vnos selena. Pri običajnem vnosu je pretežni metabolit

metilirani selenoslador (predvsem Se-metilseleno-N-acetilgalaktozamin), pri drugih z visokim vnosom selena pa predstavljata večji del izločenega selena TMSe^+ v urinu in DMSe v izdihanem zraku (25).

1.3 S-adenozilmetionin (SAM)

SAM ima pomembno vlogo v številnih celičnih procesih, kot so izražanje proteinov, prenos signalov in metabolizem malih molekul. Nastopa kot glavni donor metilne skupine pri metilaciji proteinov, nukleinskih kislin in fosfolipidov, nastopa pa tudi kot ko-substrat številnih od SAM-odvisnih metiltransferaz (28).

TPMT spada v podrazred od SAM-a odvisnih metiltransferaz udeleženih pri metilaciji malih molekul (7). Poleg vloge kofaktorja, je bil v raziskavah ugotovljen tudi vpliv SAM na aktivnost TPMT: predvsem v skupini heterozigotnih posameznikov, so imeli tisti z višjimi koncentracijami SAM tudi višjo aktivnost TPMT (9). To odkritje ima pomen tudi pri individualizaciji terapije, če upoštevamo koncentracijo SAM kot dodatni napovedni faktor aktivnosti TPMT, saj SAM z vezavo na mutiran TPMT stabilizira nativno obliko, kar omogoči višjo aktivnost TPMT (29).



Slika 6: Strukturna formula SAM

Izmed številnih dejavnikov, ki vplivajo na koncentracijo SAM, so tudi selenove spojine. Visoki odmerki selenocistina so pri miših vodili v inaktivacijo metilacije selena in do zmanjšanja koncentracije SAM zaradi inhibicije metionin adenziltransferazne aktivnosti. To je bilo razvidno tudi pri analizi urina, saj je pri nizkem odmerku selenocistina TMSe^+ predstavljal 85% selena, pri visokem odmerku pa je bil ta delež zgolj 25%. Dodatno so pokazali, da se je z inhibicijo metilacije selena povečal toksični učinek na jetra, kar lahko

razložimo s preveliko akumulacijo selenida v jetrih (30). Odvisnost koncentracije SAM od dodatka selenovih spojin v netoksičnih odmerkih pri podganah pa je pokazala, da se koncentracija SAM z dodatkom selena poveča. To je morda eden od mehanizmov kemopreventivnega učinka, ki so ga opazili v eksperimentalnih modelih, kjer so proučevali vpliv selena (31).

1.4 Povezava med TPMT in selenom

Encim TPMT ni prisoten le pri sesalcih, ampak tudi pri pticah, dvoživkah in številnih bakterijah. Ortolog TPMT, izoliran iz bakterije *Pseudomonas syringae* (bTPMT), si deli 45% podobnost in 33% identičnost s človeškim TPMT. Mišji in podganji TPMT pa si s človeškim delita 82% podobnost (7). V okoljski in mikrobiološki študiji so pokazali, da ima bTPMT vlogo pri presnovi selenovih spojin, saj je bilo ob dodatku le-teh v zemljo povečano nastajanje dimetil selenida in dimetil diselenida, kar je koreliralo z višjimi aktivnostmi bTPMT, vendar točen mehanizem teh reakcij še ni pojasnjen (17).

Deiningerjeva s sodelavci je pokazala, da lahko tudi pri ljudeh TPMT katalizira metilacijo aromatskih spojin s selenom. Derivati 6-selenopurinov so bili izbrani poleg tiopurinov zaradi kemijske podobnosti selena z žveplom. Preučevani selenopurin, selenoiozin in selenogvanozin so se izkazali kot odlični substrati encima TPMT (32). Ko so eksperimentalno pokazali, da TPMT katalizira tudi S-metilacijo drugih aromatski tiolnih spojin, so raziskovalci predvidevali, da TPMT igra vlogo tudi v metilaciji nekaterih endogenih substanc (3). Glede na rezultate raziskav, pri katerih so proučevali vlogo TPMT, sklepajo, da je endogena vloga TPMT najverjetneje metilacija organskih in anorganskih spojin, ki vsebujejo žveplo, selen ali telurij s SAM-om kot donorjem metilne skupine (33).

1.5 Mikro RNA

Vloga regulacije izražanja proteinov z mikro RNA (v nadaljevanju miRNA) je relativno novo odkritje, saj so jo odkrili šele v sredini devetdesetih let. Njena vloga je prišla v ospredje v novem tisočletju z odkritjem nekaterih od njenih tarč oziroma funkcij (34). Od tega odkritja dalje se število odkritih funkcij miRNA hitro povečuje, k čemur je prispevala tudi uporaba bioinformatičnih orodij, s pomočjo katerih lahko napovemo morebitne funkcije na osnovi znanega zaporedja miRNA in mRNA. MiRNA so skupina kratkih nekodirajočih RNA, ki imajo vlogo v uravnavanju številnih procesov, odsotnost njihovega

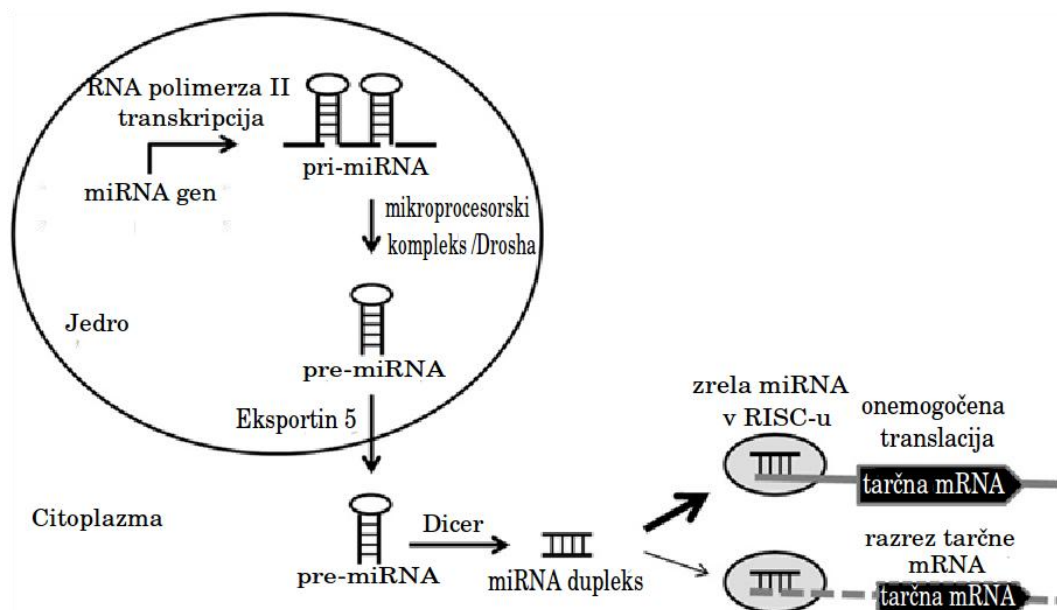
pravilnega delovanja pa je povezana z različnimi boleznimi. Merjenje miRNA je lahko učinkovit biološki označevalec nekaterih bolezni kot tudi potencialno zdravilo (35, 36). Poznanih je več kot 1000 človeških miRNA in trenutno je znano, da miRNA kontrolirajo izražanje več kot 50% kodirajočih sesalskih genov (37).

MiRNA so evlucijsko zelo ohranjene RNA molekule, v povprečju dolge 22 nukleotidov. Najdemo jih v rastlinah in živalih, kjer uravnavajo izražanje genov z vezavo na 3'-UTR tarčnih mRNA (38). Pri preučevanju 1997 miRNA v 61 tkivih različnih organov so našli 1364 miRNA, ki so bile prisotne v vsaj enem od analiziranih tkiv in 143 miRNA, ki so bile prisotne v vseh. Zanimiva ugotovitev je visoka korelacija izražanja miRNA v človeških organih z izražanjem v podganjih organih. To je dobro izhodišče za ekstrapolacijo ugotovitev s podgan na ljudi (39).

Na primeru imena miRNA (hsa-miR-223-5p) lahko razložimo pravila poimenovanja miRNA. Prve tri črke označujejo organizem (v primeru človeka: hsa), številka označuje kodo določene miRNA, ki je običajno zaporedna številka odkritja miRNA pri določenem organizmu. Zaradi načina odkrivanja miRNA lahko najdemo dve miRNA, ki izvirata iz istega prekursorja: eden je kopija 5' konca (-5p) in drugi 3' konca (-3p) (40).

1.5.1 Mehanizem delovanja miRNA

Poznamo različne mehanizme delovanja miRNA, od katerih je najpogosteje omenjen mehanizem vezave miRNA na tarčno informacijsko RNA (mRNA), kar vodi v razgradnjo mRNA ali pa zmanjšano prevajanje mRNA v protein (*Slika 7*). S tem organizem uravnava izražanje genov in vpliva na številne biološke procese. Posplošeno velja, da miRNA razgradi tarčno mRNA z boljšim prileganjem nanjo, medtem ko pri slabšem prilagajanju pride zgolj do zmanjšane prevajanja (44, 45). Nekatere miRNA so specifične zgolj za določene celice ali razvojno stopnjo celice, vendar praviloma miRNA niso omejene zgolj na eno tkivo (46, 47). V nekaterih sistemih ima lahko miRNA izjemoma tudi vlogo povečevanja izražanja mRNA (48, 49).



Slika 7: Prikaz prepisa miRNA

miRNA gen prepiše RNA polimeraza II v pri-miRNA; le-to potem odreže RNaza III Drosha, ki sprosti pre-miRNA v obliki zanke. V naslednjem koraku je transportirana v citoplazmo preko eksportina5, kjer je nadaljnjo s pomočjo RNaze III dicer spremenjena v krajšo RNA molekulo, ko helikaza razkrene miRNA-miRNA dupleks. Funkcionalna polovica dupleksa miRNA se nato lahko veže na tarčno mRNA preko RISC-a (z RNA inducirani kompleks za utišanje genov). Vezava na tarčno mRNA vodi do represije translacije ali do razgraditve tarčne mRNA (41, 42, 43).

V nadaljevanju so predstavljene miRNA, ki smo jih izbrali na osnovi računalniško predvidenega prileganja na mRNA encima TPMT in smo nato v eksperimentalnem delu merili njihovo izražanje v celicah.

1.5.2 MiRNA miR-185(-5p)

miRNA zaporedje: 5' - uggagagaaaggcaguuccuga - 3'

Lokacija na genomu: chr22:20033139-20033220

Raziskovalci so našli povezave med spremembami miR-185 in smrtjo pljučnih epitelnih celic po oksidativnem stresu (50). Ugotovljena je bila znižana prisotnost miR-185 v plazmi pri pacientih z ezofagalnim ploščatoceličnim karcinomom (51). Potencialno uporabnost merjenja miR-185 so ugotovili v primeru diagnostike in prognotike hondrosarkoma (52), kot tudi prognotike malignega glioma (53) in raka želodca (54). MiR-185 so identificirali tudi kot regulatorja *de novo* biosinteze holesterola in privzema LDL (55) ter ugotovili, da ima vlogo v karcinogenezi raka na dojkah (56). Raziskava na človeških rakavih celicah debelega črevesa v mediju brez selena in z zadostnim selenom je pokazala preko analize

miRNA s tehnologijo mikromreže, da miR-185 regulira ekspresijo selenoproteinov GPX2 in SEPSH2 (57).

1.5.3 MiRNA miR-223(-5p)

miRNA zaporedje: 5' - cguguauuugacaagcugaguu - 3'

Lokacija na genomu: chrX:66018870-66018979

Pri preučevanju miR-223 so ugotovili, da lahko pozdravi eksperimentalno povzročeno pulmonarno arterijsko hipertenzijo pri podganah (58), da regulira občutljivost na trastuzumab v terapiji raka na želodcu (59) in uravnava homeostazo holesterola (60). Inhibicija miR-223 prepreči rezistentnost T-ALL na terapijo z inhibitorji gama sekretaze (GSI). Previsoko izražanje miR-223 korelira z metastazo tumorjev in s kolorektalnim rakom in je lahko uporabljen kot samostojni faktor za določanje prognoze kolorektalnega raka (61).

1.5.4 MiRNA let-7a(-5p)

miRNA zaporedje: 5' - ugagguaguagguuguauaguu - 3'

Lokacija na genomu: chr9:94175957-94176036

Družina let-7 ima 12 članov miRNA in je ena najbolj preučeni na različnih področjih razvoja, staranja in metabolizma. Tudi njeno poimenovanje je izjema, saj iz zgodovinskih razlogov pri poimenovanju nima oznake miR- pred številko kot ostale miRNA. Veliko dokazov nakazuje na povezavo med zmanjšanim izražanjem let-7 in razvojem nizko diferenciranih in agresivnih rakavih obolenj (62). Ugotovili so, da visoko izražanje let-7a zmanjšuje možnosti za razvoj zarodnih celic raka na dojkah (63). Meta analiza študij, ki so raziskovale miRNA družino let-7 nakazuje, da bi lahko uporabili let-7 v neinvazivnih testiranjih raka pri ljudeh (64). Pokazano je bilo, da let-7a zmanjšuje ključne rakave anabolne encime in zvišuje nastanek reaktivnih kisikovih spojin (ROS), kar zviša celično občutljivost na doksorubicin (65). Vloga družine let-7 je bila ugotovljena tudi pri boleznih srčno-žilnega sistema in posledično možnosti uporabe miR let-7 kot biomarkerje bolezni in možnosti terapevtskega ciljanja (66).

Za let-7a so ugotovili, da v kombinaciji z njegovim antagonistom Lin28a regulira 38 metabolitov, od katerih je veliko metabolitov SAM. Lin28/let-7 imata vlogo v razvoju

zarodka, regulaciji metabolizma glukoze in nastanku raka. Lin28 je onkogen, ki omogoča nastanek tumorjev preko zaviranja let-7, kar so potrdili tudi s številnimi primeri rakavih obolenj, kjer so opazili znižano izražanje let-7 (67, 68).

1.5.5 RNU6

snRNA zaporedje: 5' - cacgagcgaa gccgucgugu auaugauuuu aaccuugcua ugucucuucu
aaucguaccg gggacgcguu ccuacugugc guuuagcac uucgcaaggu auaaaa - 3'

Lokacija na genomu: chr15:67839940-67840045

RNU6 je majhna jedrna RNA (snRNA), ki se nahaja v kromosomski regiji 15q23. Če želimo relativno kvantificirati izražanje miRNA je potrebno meritve normalizirati, vendar je v literaturi na voljo zelo malo podatkov o izbiri ustreznih genov za normalizacijo. Obstoječe informacije so specifične glede na uporabljene celice in preiskovano bolezen. RNU-6 je med najbolj uporabljenimi referenčnimi geni; poleg RNU6 zasledimo med referenčnimi geni pogosto tudi SNORD7 in kombinacijo drugih miRNA, ki se eksperimentalno izkažejo za najbolj stabilne pri določenem eksperimentu oziroma meritvi (69).

2 Namen dela

Na osnovi predhodnih rezultatov, ki nakazujejo povezavo med selenom in tiopurin S-metiltransferazo (TPMT), bo naše izhodišče dela iskanje povezave med encimom TPMT, katerega endogena funkcija ni poznana, in selenovimi spojinami, ki imajo vlogo v procesih oksidativnega stresa. Poleg vpliva selenita na aktivnost TPMT in na koncentracijo S-adenozilmetionina (SAM) bomo preverili tudi vlogo miRNA, ki ciljajo mRNA *TPMT* in mRNA vsaj enega od selenoproteinov. MiRNA bodo določene na osnovi spletno dostopnih podatkovnih baz, ki vključujejo podatke o tarčah mRNA *TPMT* in selenoproteinov.

Napovedane interakcije bomo ovrednotili v limfoblastoidnih celičnih linijah (LCL), katerim bo dodan selenit.

S tem namenom bomo:

- identificirali potencialne miRNA v spletnih bazah ter ocenili dostopnost informacij v različnih bazah,
- izbrali šest limfoblastoidnih celičnih linij (LCL) z različnimi genotipi *TPMT* in aktivnostmi TPMT,
- v izbranih LCL preverili korelacijo aktivnosti TPMT s 50% inhibitorno koncentracijo metabolne aktivnosti (IC50) selenita,
- izolirali celokupno RNA iz LCL in preverili izražanje miRNA s kvantitativnim PCR,
- preverili korelacijo aktivnosti TPMT s koncentracijo SAM,
- preverili korelacije med merjenimi parametri,
- s statističnimi pristopi analizirali signifikantnost razlik v aktivnosti TPMT, koncentraciji SAM in izražanju miRNA glede na dodatek selenita po 24 in 72 urah,
- ugotavljali odvisnost aktivnosti TPMT in izražanja miRNA od genotipa *TPMT*,
- analizirali povezave med aktivnostjo TPMT in izražanjem miRNA.

Predvidevamo, da bomo opazili razliko v aktivnosti TPMT in koncentraciji SAM po dodatku selenita in razliko v izražanju izbranih miRNA.

3 Materiali in metode

3.1 Bioinformatične metode

3.1.1 Bioinformatični pregled spletnih podatkovnih baz

S spletnim iskalnikom smo poiskali baze podatkov, ki so namenjene iskanju interakcij med geni in miRNA. Z namenom primerjave baz smo uporabili gen *TPMT* in zabeležili, ali določena baza napove interakcije z izbranimi miRNA v bazi miRDB (miR-185-5p, miR-223-5p in let-7a). V postopku smo preverili sledeče podatkovne baze: miRDB, miRTarBase, Mirbase, Diana Lab Tools (microT-CDS, Diana-TarBase), Gene Cards, Refgene, MiRcode, RepTar, microRNA.org, RNA22, TargetScan in PicTar.

3.1.2 Izbira miRNA

Za izbiro miRNA smo uporabili spletno bazo miRDB, saj se je po začetnem pregledu baz izkazala kot najbolj uporabna zaradi posodobljenosti, velikega števila interakcij, dodatnih informacij o bazi in preglednosti rezultatov. Tarče v bazi miRDB so napovedane z bioinformatičnim orodjem MirTarget, ki je bilo razvito preko analize tisočih interakcij miRNA-tarča v eksperimentih sekvenciranja, kar je bilo z metodami strojnega učenja preneseno v napovedovanje interakcij. Trenutna verzija baze 5.0 je na voljo od avgusta 2014 in je redno posodobljena (70, 71).

Naš primarni izbor miRNA so bile miRNA, ki imajo tarčo na mRNA *TPMT*, kar je v bazi ovrednoteno z vrednostjo, ki ocenjuje verjetnost interakcije na osnovi ujemanja zaporedij miRNA in mRNA *TPMT*. Po smernicah spletne baze miRDB je najboljšše izbrati interakcijo, ki ima oceno nad 80/100, saj višja vrednost pomeni večjo verjetnost, da bomo teoretično napovedano interakcijo potrdili tudi eksperimentalno. V naslednjem koraku smo preverili, koliko tarč ima vsaka od izbranih miRNA, saj je miRNA z veliko tarčami manj specifična. Za izbrane miRNA smo preverili, ali imajo tarčo tudi na katerem od selenoproteinov.

3.2 Metode dela v laboratoriju

3.2.1 Uporabljene kemikalije in reagenti

Preglednica II: Uporabljeni reagenti

REAGENTI	PROIZVAJALEC
<i>GOJENJE CELIC IN MERJENJE METABOLNE AKTIVNOSTI</i>	
Gojišče RPMI 1640	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, ZDA
Fetalni goveji serum (FBS)	Gibco; Grand Island, NY, USA
Antibiotik: penicilin/streptomycin, 100U/ml	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, ZDA
L-glutamin	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, ZDA
Natrijev selenit, Na ₂ SeO ₃	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, ZDA
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, Nizozemska
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay System (reagent MTS)	Promega, ZDA
<i>ANALIZA miRNA</i>	
Reagenčni komplet miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Nizozemska
Reagenčni komplet miScript II RT Kit	Qiagen, Nizozemska
Reagenčni komplet miScript SYBR Green PCR Kit - osnovna zmes za PCR	Qiagen, Nizozemska
miScript Universal Primer – univerzalni začetni oligonukleotid	Qiagen, Nizozemska
miScript Primer Assay – specifični začetni oligonukleotidi za posamezno miRNA: - Hs_miR-185_1 miScript Primer Assay - Hs_miR-223*_1 miScript Primer Assay - Hs_RNU6-2_11 miScript Primer Assay - Hs_let-7a_2 miScript Primer Assay - Hs_miR-248_1 miScript Primer Assay - Hs_miR-32_1 miScript Primer Assay - Hs_miR-1226_1 miScript Primer Assay	Qiagen, Nizozemska

- Hs_miR-520c_1 miScript Primer Assay	
Pufer z EDTA (Tris-EDTA buffer solution, pH 8,0)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, ZDA
Ultra čista voda W4502 brez DNaz, RNaz in proteaz	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, ZDA
Kloroform Ph.Eur. za analizo	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
Etanol Ph.Eur. za analizo	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
MERJENJE AKTIVNOSTI TPMT IN KONCENTRACIJE SAM	
S-adenozilmetionin, C ₁₅ H ₂₂ N ₆ O ₅ S	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, ZDA
alopurinol, C ₅ H ₄ N ₄ O	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, ZDA
D,L- ditiotritol, C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂ (čistota ≥ 99 %)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, ZDA
6-merkaptopurin monohidrat, C ₅ H ₄ N ₄ S×H ₂ O (čistota min. 98 %)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, ZDA
6-metilmerkaptopurin (6-MMP), C ₆ H ₆ N ₄ S (čistota ≥ 98 %)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, ZDA
Kalijev dihidrogenfosfat, KH ₂ PO ₄ (čistota ≥ 99,0 %);	Fluka Chemie, Buchs, Švica
Kalijev hidrogenfosfat, K ₂ HPO ₄ (čistota ≥ 99,0 %);	Riedel-de Häen AG, Nemčija
Metanol: LiChrosolv Methanol for liquid chromatography, MeOH (čistota ≥ 99,8 %);	Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
Klorova(VII) kislina, 70% HClO ₄ (čistota ≥ 70 %);	Fluka Chemie, Buchs, Švica
Dimetilsulfoksid: Chromasolv Dimethyl sulfoxide for high-performance liquid chromatography, C ₂ H ₆ OS (čistota min. 99,7 %);	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, ZDA
Ultračista voda pridobljena z napravo Purelab Flex, specifična upornost 18,2 MΩcm	Elga Labwater, UK

3.2.2 Uporabljeni pripomočki in aparature

Preglednica III: Uporabljeni pripomočki in aparature

Komora DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR
Biosan DNA/RNA UV-cleaner UVT-S-AR in UVC/T-M-AR
1100 HPLC sistem (Agilent Technologies, CA, USA)
ChemStation za LC 3D sisteme (Agilent Technologies, CA, USA)
Pipete Eppendorf Research (plus): 2,5-1000 μ l
Nastavki za pipete Tip One: 10-1000 μ l (Graduated, Filter tip, Sterile)
Ultrazvočna kadička (Badelin Sonorex, Nemčija)
Natančna tehtnica (Acculab, USA)
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific), program ND-1000 v.3.8.1
Aparat za PCR: C1000 Thermal Cycler (Biorad)
Aparat za PCR v realnem času: Roche LightCycler 480
PCR ploščice in folije za zatesnitev: 4titude FrameStar 480/384 with qPCR, Adhesive Seal
Centrifuga Tehnica Centric 322A
Centrifuga Biosan Combi-Spin FVL-2400N
Naprava za čiščenje vode Purelab Flex, Elga Labwater, UK

3.2.1 Gojenje celic

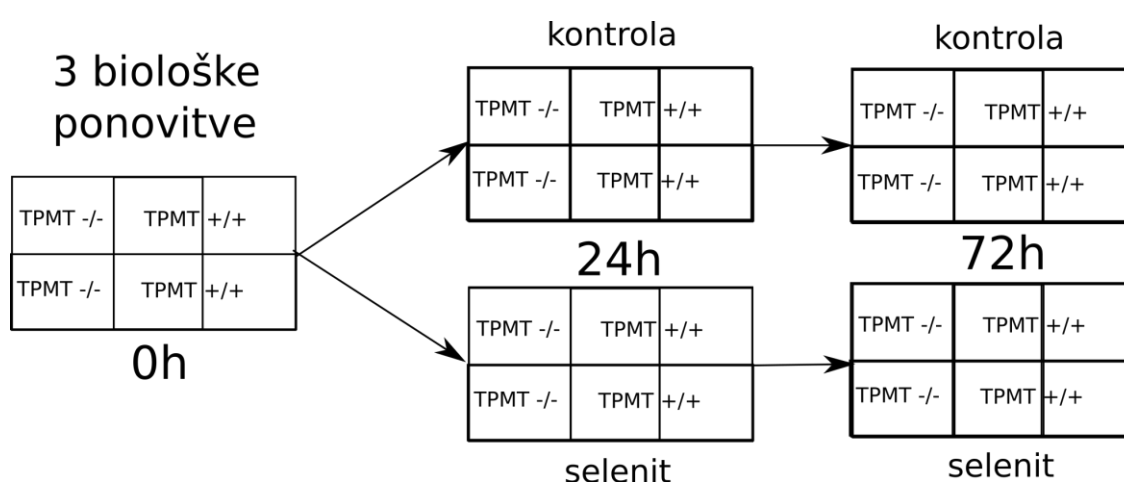
Izhodni material za meritve so bile limfoblastoidne celične linije, skupno šest linij, od katerih sta bili dve liniji z genotipom *TPMT* $-/-$ (mutirani) in štiri linije *TPMT* $+/+$ (divji tip). Gojišče, ki smo ga uporabljali za gojenje celic je bilo gojišče RPMI s fetalnim govejim serumom (10 %), antibiotikom (penicilin/streptomycin 100 U/mL) in glutaminom (4mM). Vsako celično linijo smo vzporedno gojili v gojišču brez selenita (negativna kontrola) in v gojišču z 0,8 μ M selenitom ter vzorce za analizo zbirali v treh časovnih točkah: v času 0 h in nato po 24 h in po 72 h. Za vsak eksperiment smo naredili 3 biološke ponovitve. Shema gojenja celic je prikazana na Sliki 8.

Za izvedbo celotnega eksperimenta smo potrebovali $126 \cdot 10^6$ celic vsake izmed izbranih celičnih linij, zato smo jih najprej nagojili. Vzorce, ki so vsebovale $126 \cdot 10^6$ celic, smo pred začetkom eksperimenta dvakrat centrifugirali 5 minut pri 1500 rpm in jih resuspendirali v 42 ml svežega gojišča. 2 ml suspendiranih celic smo nato redčili z 9 mL svežega gojišča ter tako dobili v vsakem vsebniku želeno končno koncentracijo $0,5 \cdot 10^6$

celic/mL. Celice smo nato gojili v prisotnosti ali odsotnosti selenita in vzorce za analizo miRNA ter določanje koncentracije SAM in aktivnosti TPMT shranili v treh časovnih točkah: ob času 0 h, po 24 h in po 72 h.

Za analizo miRNA smo shranili $2,5 \cdot 10^6$ celic v reagentu QIAzol in sicer tako, da smo odpipetirali ustrezen volumen suspenzije, vzorec centrifugirali 5 min pri 1500 rpm in odstranili medij. Celicam smo dodali 500 μ l reagenta QIAzol za lizo celic, 1 minuto močno mešali in vzorce zamrznili pri -80°C .

Za analizo koncentracije SAM in aktivnosti TPMT smo v vsaki časovni točki pripravili celično pelet s $5 \cdot 10^6$ celic za posamezno analizo in jo shranili pri -80°C .



Slika 8: Shema gojenja celic

Gojili smo 6 različnih LCL, dve sta imeli genotip *TPMT* -/-, štiri pa genotip *TPMT* +/+. Ob času 0 h smo celicam dodali 0,8 μ M selenit. V času 24 h smo za analizo miRNA, aktivnost TPMT in koncentracijo SAM odvzeli vzorce celic gojene s selenitom in kontrolne vzorce celic brez dodanega selenita. Enak postopek smo ponovili po 72 h. Vse celice smo gojili v treh bioloških paralelah.

3.2.2 Test metabolne aktivnosti

S testom (CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) smo merili metabolno aktivnost celic po dodatku selenita. Test je osnovan na kolorimetrični metodi za določanje števila živih celic v testih kemosenzitivnosti, citotoksičnosti in proliferacije. Reagent je sestavljen iz reagenta za prenos elektronov (fenazin etosulfat ali PES) in reagenta MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol, notranja sol]. PES lahko zaradi svoje kemijske stabilnosti tvori z MTS stabilno raztopino. Test smo izvedli tako, da smo celice najprej razredčili na koncentracijo $3 \cdot 10^5$ celic/mL. Nato smo na mikrotitrsko ploščico s 24 vdolbinicami prenesli po 1 ml celične

suspenzije in jih izpostavili različnim koncentracijam selenita (0,3 μM do 25 μM). Nato smo v triplikatu prenesli po 100 μl celičnih suspenzij na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami in pustili inkubirati 24 h. Na ploščico smo nanесли tudi kontrolne vzorce celic brez dodanega selenita in kot slepe vzorce samo gojišče brez celic. Po 21 h smo dodali 10 μl reagenta MTS in celice nadalje inkubirali 3-4 ure. Nato smo izmerili absorbanco pri 490 nm, s čimer smo dobili podatek o količini formazanskega produkta, ki je proporcionalen številu živih celic v kulturi (72).

Na osnovi meritev smo določili metabolno IC50 (50% inhibitorna koncentracija) selenita. IC50 predstavlja koncentracijo selenita, ki je potrebna, da se zniža metabolna aktivnost celic na polovico maksimalne metabolne aktivnosti.

3.2.3 Določanje aktivnosti TPMT in koncentracije SAM

Aktivnost TPMT in koncentracijo SAM smo izmerili z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). Uporabili smo sistem HPLC Agilent 1260 Infinity Series.

Merjenje aktivnosti TPMT

Peleto celic ($5 \cdot 10^6$ celic) smo vzeli iz zamrzovalnika (-80°C), dodali 85 μl 150 mM kalijevega fosfatnega pufru (pH 7,4) in celice lizirali z ultrazvokom na najvišji jakosti vsaj 15 sekund. Odstranili smo 10 μl celičnega lizata in ga shranili za določitev koncentracije proteinov. Preostanku smo dodali 75 μl delovne raztopine (150 mM kalijev fosfatni pufer (pH=7,4), 100 μM SAM, 100 μM alopurinol, 100 μM ditiotreitol in 337 μM 6-merkaptopurin) ter vzorec 2 h inkubirali v vodni kopeli pri 37°C . Reakcijo smo ustavili z dodatkom 5 μl HClO_4 (70%), močno zmešali in shranili na ledu za 10 minut. Vzorce smo centrifugirali 5 min pri 14.000 g. Supernatant smo prenesli v novo mikroepreveto, ga nevtralizirali z 10 μl 4 M K_2HPO_4 , nato močno zmešali in postavili na led za 5 min preden smo ponovno 5 min centrifugirali pri 14.000 g. Za umeritveno krivuljo smo pripravili raztopine 6-metilmerkaptopurina (6-MMP) v 150 mM kalijevem fosfatnem (KP) pufru (pH=7,4) s koncentracijami 4 μM , 2 μM , 1 μM , 0,5 μM , 0,25 μM in 0,125 μM . Vzorce smo analizirali z obratnofazno C18 kolono Agilent ZORBAX ODS. Kolona je bila zaščitena s predkolono Agilent ZORBAX ODS Analytical Guard Column. Kot mobilni fazo smo uporabili 50 mM KP pufer (pH 7,5) v 25 % mentolu. Elucija je potekala izokratsko pri pretoku 1,5 ml/min. Analiza posameznega vzorca je trajala 13 min, volumen

vbrizganega vzorca je bil 100 μ l. Detekcija je potekala pri valovni dolžini 290 nm. S pomočjo umeritvene premice, pridobljene iz površin kromatografskih vrhov standardov, smo iz površine kromatografskih vrhov izračunali koncentracijo nastalega 6-MMP.

Merjenje koncentracije SAM

Peleto celic ($5 \cdot 10^6$ celic) smo vzeli iz zamrzovalnika (-80°C), dodali 85 μ l 150 mM KP pufra (pH 7,4) in celice lizirali z ultrazvokom na najvišji jakosti vsaj 15 sekund. 10 μ l celičnega lizata smo odstranili in ga shranili za določitev koncentracije proteinov. Preostanku lizata (75 μ l) smo dodali 70% perklorovo kislino (3,75 μ l, 11M), vzorce pustili 10 min na ledu in jih nato centrifugirali (14.000 g, 15 min, 4°C). Za umeritveno krivuljo smo pripravili raztopine SAM v 0,5 M HClO_4 s koncentracijami od 1,56 μM in 75 μM .

Vzorce smo analizirali z obratnofazno C18 kolono Agilent ZORBAX ODS. Kot mobilno fazo smo uporabili 50 mM NaH_2PO_4 puffer z 10 mM heptansulfonsko kislino (pH = 3) in metanol. Elucija je potekala gradientno z 20 do 40% metanolom s pretokom 1ml/min. Volumen vbrizganega vzorca je bil 100 μ l. Detekcija je potekala pri valovni dolžini 254 nm (9).

3.2.4 Izolacija RNA

V tem koraku smo izolirali RNA s centrifugalno kolono, ki temelji na metodi ekstrakcije na trdni fazi. RNA se v določenih pogojih veže na silikatno membrano v koloni, tako da lahko z različnimi pufri odstranimo nevezane nečistote in na koncu z vodo eluiramo vezano RNA.

Postopek izolacije RNA:

1. V digestoriju smo vzorcem s QIAzolom dodali 100 μ l kloroforma in stresali 15s.
2. Po 2 do 3 minutah smo centrifugirali 15 min z 12.000 g pri 4°C .
3. Zgornjo vodno fazo smo prenesli v zbiralno mikropruveto (glede na volumen QIAzola in dodanega kloroforma smo lahko prenesli med 200-300 μ l vodne faze). Volumen vodne faze smo pomnožili z 1,5, da smo dobili volumen 100% etanola, ki smo ga dodali prenešeni vodni fazi. Dodani etanol smo s pipetiranjem premešali z vodno fazo ter vzorec nato prenesli na kolono (do 700 μ l naenkrat zaradi volumna kolone).
4. Mikropruvete s kolonami smo centrifugirali pri 10.000 x g, 15s na sobni temperaturi.
5. Tekočino, ki je prišla skozi kolono, smo zavrgli in ponovili prejšnji korak, v kolikor smo imeli več kot 700 μ l vzorca.

6. Na kolono smo dodali 700 μ l pufru RWT ter centrifugirali mikroeprovete s kolonami pri 10.000 g, 15s na sobni temperaturi ter zavrgli tekočino, ki je pritekla skozi kolono.
7. Nato smo na kolono dodali 500 μ l pufru RPE ter centrifugirali mikroeprovete s kolonami pri 10.000 g, 15s na sobni temperaturi ter zavrgli, kar je priteklo skozi kolono.
8. Nato smo ponovno dodali 500 μ l pufru RPE na kolono in centrifugirali mikroeprovete s kolonami pri 10.000 g, 2 min na sobni temperaturi ter zavrgli, kar je priteklo skozi kolono.
9. Da smo dodatno odstranili reagent, smo prazno kolono eno minuto centrifugirali pri polni hitrosti.
10. Kolono smo prenesli v 1,5 ml zbiralno mikroeproveto, napipetirali 30 μ l vode brez RNaz neposredno na membrano kolone in centrifugirali pri 10.000 g, 1min na sobni temperaturi.
11. Prejšnji korak smo ponovili še s 15 μ l vode brez RNaz.
12. Za namen meritev koncentracije smo odpipetirali 3 μ l v manjšo mikroeproveto, preostali eluirani vzorec pa smo shranili pri -80°C .

3.2.5 Meritve koncentracije RNA

Za merjenje koncentracij izolirane RNA v vzorcih smo uporabili Thermo Scientific NanoDrop spektrofotometer. Na osnovi te meritve smo nato z redčenjem pripravili vzorce, ki so imeli enako koncentracijo RNA. V programu smo izbrali merjenje nukleinskih kislin, ter izbrali program RNA40. Število 40 označuje pretvorni faktor ($\text{CF} = 40 \text{ ng}\cdot\text{cm}/\mu\text{l}$) pri izračunu koncentracije RNA ($c = A\cdot\text{CF}/I$; c = koncentracija [$\text{ng}/\mu\text{l}$], A = absorbanca, I = dolžina svetlobne poti [cm]). Z meritvijo smo preverili tudi ustreznost razmerja pri valovnih dolžinah 260/280 in 260/230. Z razmerji absorbanc A_{260}/A_{280} in A_{260}/A_{230} ocenimo čistoto izoliranega vzorca RNA. Zaželeni vrednosti čistega vzorca so čim bližje vrednosti 2. Prisotnost kontaminantov, kot so proteini in fenoli, znižajo razmerje, saj le-ti močno absorbirajo pri valovni dolžini 280 nm (73).

3.2.6 Reverzna transkripcija RNA v cDNA

1. Na ledu smo odtalili RNA vzorce in pripravili reakcijsko mešanico (master mix) v razmerju:

Preglednica IV: Reakcijska mešanica za reverzno transkripcijo

pufer miScript HiSpec Buffer	4 μ l
10x miScript Nucleics Mix	2 μ l
miScript Reverse Transcriptase (reverzna transkriptaza)	2 μ l

2. V mikropruvete smo napipetirali reakcijsko mešanico (8 μ l) ter dodali 12 μ l vzorca z vodo brez RNaz. Razmerje vzorca in vode smo določili na osnovi meritev Nanodrop, kot je opisano v prejšnjem poglavju.

3. V skladu s priporočili proizvajalca za kasnejšo kvantifikacijo zrele miRNA (od 10 ng do 2 μ g) smo v mikropruvete napipetirali volumen vzorca, ki je ustrezal 1,5 μ g RNA, ter dodali vodo brez RNaz do volumna 12 μ l.

4. Mikropruveto smo nežno pretresli, kratek čas centrifugirali ter shranili na ledu do inkubacije.

5. Inkubirali smo 60 minut pri temperaturi 37°C ter nato še 5 minut pri 95°C, saj smo s tem inaktivirali reverzno transkriptazo.

6. Vzorce smo shranili pri -20°C.

7. Za namene nadaljnega PCR je bilo potrebno cDNA dodatno redčiti; za kvantifikacijo zrele miRNA pa je bilo potrebno zagotoviti od 50 pg do 3 ng cDNA za vsako PCR reakcijo. Najprej smo pripravili redčitve vseh vzorcev cDNA na koncentracijo 3 ng/ μ l, iz vseh vzorcev odvzeli majhen volumen, da smo pripravili 12 redčitev za umeritveno krivuljo. Nato smo redčili vzorce na 0,75 ng/ μ l, da so PCR krivulje vzorcev bile znotraj umeritvene krivulje in smo lahko izražanje ustrezno kvantificirali.

3.2.7 RT-qPCR– kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času

1. Pripravili smo reakcijsko mešanico za vse vzorce v sledečem razmerju; za eno vdolbinico na PCR plošči smo pripravili skupno 9 μ l:

Preglednica V: Reakcijska mešanica za RT-qPCR

2xQuantiTech SYBR Green PCR Master Mix	5 μ l
10x miScript Universal Primer	1 μ l
10x miScript Primer Assay	1 μ l
Voda brez RNaz*	2 μ l

*Pri merjenju miR-223 in miR-4306 smo pripravili mešanico brez vode, saj smo dodali 2 μ l več vzorca (z namenom boljše detekcije).

Mešanico smo dobro premešali.

2. Pripravljeno reakcijsko mešanico smo napipetirali v vdolbinice na PCR ploščice v skladu z načrtom pipetiranja.
3. V vdolbinice z reakcijsko mešanico smo dodali 1 μ l vzorca ali standarda ali vode (slepi vzorci) ali 3 μ l vzorca v primeru merjenja miR-223. Vsak vzorec/standard smo na PCR ploščico nanegli v triplikatu.
4. Napipetirano ploščico smo zatesnili s priloženo samolepilno folijo.
5. Zatesnjeno ploščico smo centrifugirali dve minuti pri 1000 g na sobni temperaturi.
6. Ploščico smo vstavili v aparat za PCR v realnem času (LightCycler 480) z nastavljenim ustreznim programom:

Preglednica VI: Program PCR

Ime koraka (število ponovitev)	Trajanje	Temperatura
Začetni aktivacijski korak (1x)	15 minut	95°C
Denaturacija (50x)	15 sekund	94°C
Prileganje (50x)	30 sekund	55°C
Podaljševanje (50x)	30 sekund	70°C

Začetni aktivacijski korak je aktiviral HotStart Taq DNA polimerazo. Po končani aktivaciji se je začelo hitrejše menjavanje temperature, kjer so se v ciklu menjavali koraki denaturacije, prileganja in podaljševanja. Število ciklov je odvisno od količine cDNA; v našem programu smo določili 50 ciklov, katerim sledi ohlajanje po končanem programu. V program smo nato vnesli podatke o vzorcih v vdolbinicah ter o standardih, kar je omogočalo določitev koncentracije miRNA v programu.

3.2.8 Normalizacija meritev miRNA

Normalizacija meritev miRNA je velik izziv, ker nimamo na voljo univerzalnih ali sprejetih referenčnih miRNA, zato so nastale različne strategije za normalizacijo meritev izražanja miRNA (74). Uporabili smo majhno jedrno RNA (RNU6), ki se je izkazala za bolj stabilno, kot ostale testirane miRNA. V tej raziskavi smo pred izbiro referenčnega gena testirali več miRNA (RNU-6, let-7a, miR-248, miR-32, miR-1226 in miR-520c) na setu 16 vzorcev z različnimi genotipi, z dodanim selenitom in kontrolne vzorce in vzorce v različnih časovnih točkah. Meritve smo vnesli v razpredelnico Excelovega dokumenta ter uporabili program NormFinder. NormFinder je program, ki nam kot dodatek v Excelovem

programu omogoča izbiro najbolj optimalnega referenčnega gena oziroma najboljše kombinacije dveh referenčnih genov.

Program je predlagal kombinacijo RNU-6 in let-7a oziroma izbiro RNU-6, kot samostojnega referenčnega gena. Izmerili smo izražanje predlaganih miRNA v vseh vzorcih, pri čemer smo opazili nizko stabilnost izražanja let-7a. Ob preverjanju več spletnih podatkovnih baz smo našli tudi na informacije o možni interakciji miRNA let-7a in mRNA TPMT. Zaradi omenjenih razlogov smo se odločili, da obravnavamo let-7a kot drugi dve izbrani miRNA (miR-185 in miR-223). Za normalizacijo smo meritve izražanja izbrane miRNA delili z izražanjem referenčne miRNA (RNU-6), da smo na ta način zmanjšali razlike, ki so nastale v procesu priprave vzorcev.

3.3 Statistična obdelava podatkov

Rezultate smo v prvem koraku podali kot povprečje treh tehničnih ponovitev meritev in nato te meritve kot povprečje treh bioloških meritev s standardnim odklonom. Signifikantnost razlik med skupinami smo statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Normalnost porazdeljevanja meritev smo preverili s statističnima testoma normalnosti D'Agostino & Pearson in Shapiro-Wilk, ki sta pokazala ali meritve sledijo Gaussovi distribuciji. Skupine meritev, ki niso ustrezale normalnosti tudi po transformaciji podatkov z logaritmiranjem vrednosti, smo analizirali z neparametričnim testom korelacije ter prikazali s Spearmanovim faktorjem korelacije. Za analizo korelacij med vzorci, ki so ustrezali normalnosti, smo uporabili Pearsonovo korelacijo.

Za vse statistične teste smo uporabili stopnjo tveganja $\alpha = 0,05$.

4 Rezultati in razprava

4.1 Bioinformatični izbor miRNA

Po pregledu številnih miRNA spletnih baz smo izbrali bazo miRDB katero smo ocenili kot najbolj zanesljivo in posodobljeno. Naš cilj je bil izbrati miRNA, ki nastopajo v regulaciji mRNA TPMT in mRNA vsaj enega od selenoproteinov. Po omejitvi miRNA na tiste, ki imajo v bazi miRDB oceno interakcije z mRNA TPMT vsaj 80 od možnih 100 točk, smo opravili pregled interakcij izbranih miRNA s selenoproteini in zabeležili oceno interakcije s selenoproteini. Za končno izbiro miRNA smo preverili še njeno število tarč. Na osnovi dobrih interakcij s TPMT in selenoproteini smo se kljub velikemu številu tarč odločili, da testiramo hsa-miR-4306*. Izbrali smo tudi miR-223, saj je na osnovi števila tarč najbolj specifična za TPMT, čeprav program ni našel morebitnih interakcij s selenoproteini. Dve predvideni interakciji s selenoproteini in nizko število tarč ima miR-185, zato smo izbrali tudi njo.

Preglednica VII: Pregled ocen interakcij miRNA z mRNA selenoproteinov in TPMT

Selenoprotein mRNA (ocena interakcije)	Ocena interakcije mRNA TPMT-miRNA	miRNA	Število tarč miRNA
GPX1(84), GPX3(94), GPX6(91)	94	hsa-miR-4306*	1703
	93	hsa-miR-4267	1108
	92	hsa-miR-616-5p	1318
	88	hsa-miR-4478	1727
	84	hsa-miR-223-5p	207
GPX3(80), GPX6(64)	83	hsa-miR-185-5p	796
GPX3(80), GPX6(64)	83	hsa-miR-4644**	830
	82	hsa-miR-373-5p	1306
	82	hsa-miR-371b-5p	1312

** hsa-miR-4644 sicer ustreza večini postavljenih kriterijev, vendar smo se zaradi podobnosti zaporedja miR-4644 z miR-4306 odločili, da testiramo zgolj miR-4306, ki je imel boljše ocene interakcij s TPMT in selenoproteini.

* hsa-miR-4306 v postopku merjenja izražanja miRNA z metodo PCR v realnem času nismo zaznali pri večini vzorcev, zato nadaljnja obravnava miRNA ni bila mogoča.

Pregled spletnih podatkovnih baz za napoved interakcij miRNA- mRNA (tarča) na primeru encima TPMT in miRNA hsa-miR-185(-5p), miR-223(-5p) in let-7a(-5p).

Preglednica VIII: Pregled spletnih baz za napoved interakcij

Ime baze (spletna stran, datum dostopa)	Interakcije TPMT in miRNA	Dodatne informacije o bazi
miRDB (http://mirdb.org/miRDB/ ; 3.4.2016).	TPMT: 55 najdenih interakcij miR-185-5p: 796 interakcij (TPMT ocena: 83/100; med prvimi šestimi rezultati pri tarčah TPMT) miR-223-5p: 207 interakcij (TPMT ocena: 84/100) let-7a-5p: 435 interakcij (ni TPMT)	Tarče v bazi miRDB so napovedane z bioinformatičnim orodjem MirTarget, ki je bilo razvito preko analize tisočih interakcij miRNA-tarča v eksperimentih sekvenciranja. To je bilo z metodami strojnega učenja preneseno v algoritme za napovedovanje interakcij. Trenutna verzija baze 5.0 je na voljo od avgusta 2014. Baza je bila v času dostopa nazadnje posodobljena 1.2.2016 (70, 71).
miRTarBase (http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php ; 29.3.2016)	TPMT: Ni podatkov miR-185: 488 interakcij z mRNA miR-223: 573 interakcij z mRNA let-7a: 1034 interakcij z mRNA	Podatkovna baza, ki ima eksperimentalno validirane interakcije miRNA-tarča (MTI). (74) V času dostopanja do baze je bila zadnja posodobitev 6.0 posodobljena septembra 2015. V bazi je zbranih skoraj 5.000 člankov, ki opisujejo 22.000 tarč in skoraj 4.000 miRNA, ter skupaj 366.000 MTI v 18 vrstah. V sekciji miRTar.Human ni zabeleženih miRNA, ki bi regulirale mRNA TPMT, kar je najverjetneje posledica nizke raziskanosti regulacije izražanja gena <i>TPMT</i> .

		Prednost strani so označbe interakcij med mRNA in miRNA glede na moč dokazov za določeno interakcijo. Ločeno je na močne dokaze za interakcije, ki so bile potrjene eksperimentalno z Western blot-om ali s kvantitativnim PCR ter šibkejša dokaze z mikromrežami, sekvenciranjem, pSILAC ali z drugimi metodami.
Mirbase (http://www.mirbase.org/ ; 29.3.2016).	/	Mirbase vsebuje 28.645 vnosov miRNA. Na strani Mirbase najdemo zgozlj splošne informacije o iskanih miRNA, zbrane reference in povezave do strani, kjer lahko dobimo seznam tarč za določeno miRNA. Stran nas poveže do strani: Diana-Microt, MicroRna.org, Mirdb, RNA22-hsa, TargetMiner, TargetScan in Pictar, ki smo jih v nadaljevanju obravnavali posamezno.
Diana Lab Tools (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php ; 2.4.2016)	TPMT: 101 interakcija miR-185-5p: 1318 tarč (tudi TPMT z oceno 0,721/1,000) miR-223-5p: 369 tarč (ni TPMT) let-7a-5p: 987 tarč (ni TPMT)	MicroT-CDS išče interakcije na osnovi microT-CDS algoritma (76, 77).
Diana Lab Tools (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php ; 2.4.2016)	TPMT: 2 interakciji (hsa-miR-22-5p in hsa-miR-148-5p), ki sta bili potrjeni z imunoprecipitacijo v beta celicah trebušne slinavke miR-185-5p: 1318 tarč (tudi TPMT z	DIANA-TarBase v7.0 (78) je bila prvič objavljena že leta 2006 in je bila med prvimi, ki so združili eksperimentalno potrjene interakcije gen(mRNA)-miRNA.

	oceno 0.721/1.000) miR-223-5p : 369 tarč (ni TPMT) let-7a-5p : 987 tarč (ni TPMT)	
Gene Cards (http://www.genecards.org ; 2.4.2016)	TPMT : hsa-miR-3613-3p, hsa-miR-586, hsa-miR-556-5p, hsa-miR-373*, hsa-miR-616*	Združuje informacije iz različnih virov o iskanem genu. Iskanje informacij o mRNA TPMT in miRNA vrne predloge miRNA produktov, ki jih ponuja podjetje Qiagen kot regulatorje TPMT.
Refgene (http://refgene.com/ ; 3.4.2016)	TPMT (z virom miRBase, Sanger): hsa-miR-586, hsa-miR-609 in hsa-miR-655	Pomanjkljivost strani je, da ni posodobljena z novjšimi podatki, saj so najnovejše informacije iz leta 2009.
MiRcode (http://mircode.org/index.php ; 3.4.2016)	TPMT : 40 najdenih interakcij miR-185 : ni v bazi miR-223 : je TPMT let-7a-5p : ni v bazi	Zadnja posodobitev je bila leta 2012.
RepTar (http://reptar.ekmd.huji.ac.il/ ; 3.4.2016)	TPMT : 172 interakcij miR-185 : 3883 interakcij (ni TPMT) miR-223 : 418 interakcij (ni TPMT) let-7a : 2693 interakcij (je TPMT)	RepTar je podatkovna baza in deluje s pomočjo RepTar algoritma, ki vključuje set pravil za napovedovanje interakcij kot so: komplementarnost vezavnega mesta z miRNA 5' semenom, obširnost vezave na 3' konec in vezave na sredini miRNA. Slabost baze je, da je bila nazadnje posodobljena decembra 2010 (79).
microRNA.org (http://www.microrna.org/microrna/home.do ;	TPMT : 35 interakcij miR-185 : 8708 interakcij (je TPMT) miR-223 : 5886 interakcij (ni TPMT)	Baza vsebuje 1100 človeških miRNA in je bila nazadnje posodobljena novembra 2010.

3.4.2016)	let-7a: 5436 interakcij (ni TPMT)	
RNA22 (dostopna na naslovu: https://cm.jefferson.edu/rna22/ ; 3.4.2016)	TPMT: 4723 interakcij miR-185: 34.973 interakcij (je TPMT) miR-223: 11.104 interakcij (ni TPMT) let-7a: 33.059 interakcij (je TPMT)	(80)
TargetScan (http://www.targetscan.org/ ; 3.4.2016)	TPMT: 880 interakcij miR-185-5p: 5364 interakcij (je TPMT) miR-223-5p: 3614 interakcij (je TPMT) let-7a-5p: 3353 interakcij (ni TPMT)	Trenutna verzija 7.0 je na voljo od avgusta 2015 in ima izboljšano metodo za napoved učinkovitosti vezave miRNA (81).
PicTar (http://pictar.mdc-berlin.de/ ; 3.4.2016).	TPMT: ni v bazi miR-185: 195 interakcij (ni TPMT) miR-223-5p: 180 interakcij (ni TPMT) let-7a: 602 interakcij (ni TPMT)	Stran je bila nazadnje posodobljena marca 2007.

Preglednica IX prikazuje pregled interakcij po bazah. Zeleno označeni kvadratici z oznako X označujejo napovedane interakcije miRNA in mRNA TPMT, v primeru oznake 0, pa v bazi ni bilo podatkov o interakciji. Tri baze so označene z odebeljenim tiskom, saj smo jih ocenili kot bolj zanesljive na osnovi stanja baze. Te so redno posodobljene in imajo na voljo veliko dodatnih informacij o bazi. Baza miRTarBase vsebuje veliko informacij, vendar nima podatkov o tarčah za gen *TPMT*, zato so vse interakcije v tabeli negativne, kar v tem primeru ne pomeni odsotnosti interakcije. Prav tako ne moremo zanemariti morebitne interakcije mRNA TPMT z *let-7a*, kljub temu da te interakcije nismo zasledili v bolj posodobljenih bazah. Zato velja pri izbiranju manjšega števila interakcij preveriti večje število baz in napovednih algoritmov za večjo verjetnost pričakovanih *in vitro/in vivo* rezultatov.

Preglednica IX: Pregled pozitivnih interakcij po bazah

Ime baze	miR-185 – mRNA TPMT	miR-223 – mRNA TPMT	let-7a – mRNA TPMT
miRDB	x	x	0
miRTarBase	0	0	0
microT-CDS	x	0	0
DIANA-TarBase v7.0	x	0	0
Gene Cards	0	0	0
Refgene	0	0	0
MiRcode	0	x	0
RepTar	0	0	x
microRNA.org	x	0	0
RNA22	x	0	x
TargetScan	x	x	0
PicTar	0	0	0

4.2 Določanje razlik metabolne aktivnosti LCL po dodatku selenita

S testom metabolne aktivnosti smo želeli preveriti razlike v toksičnosti dodanega selenita med izbranimi šestimi limfoblastoidnimi celičnimi linijami s predhodno določenimi genotipi TPMT in izmerjenimi aktivnostmi TPMT. Test za določitev metabolnega IC50 selenita smo izvedli po 24-urni in po 72-urni izpostavitvi celic različnim koncentracijam selenita (Na_2SeO_3). Rezultati so prikazani v Preglednici X.

Preglednica X: Podatki o vzorcih in IC50 Na_2SeO_3

Vzorec	Genotip TPMT	Aktivnost TPMT [pmol 6-MMP/h/mg prot.]	IC50* (Na_2SeO_3 po 24 h) [mM]	IC50* (Na_2SeO_3 po 72 h) [mM]
1	*3C/*3A	37,5	0,0101	0,00461
2	*3A/*3A	10,3	0,0105	0,00425
3	*1/*1	172,3	2,052	0,00495
4	*1/*1	83,1	0,0278	0,00431
5	*1/*1	138,9	2,052	0,00501
6	*1/*1	241,7	**	0,00535

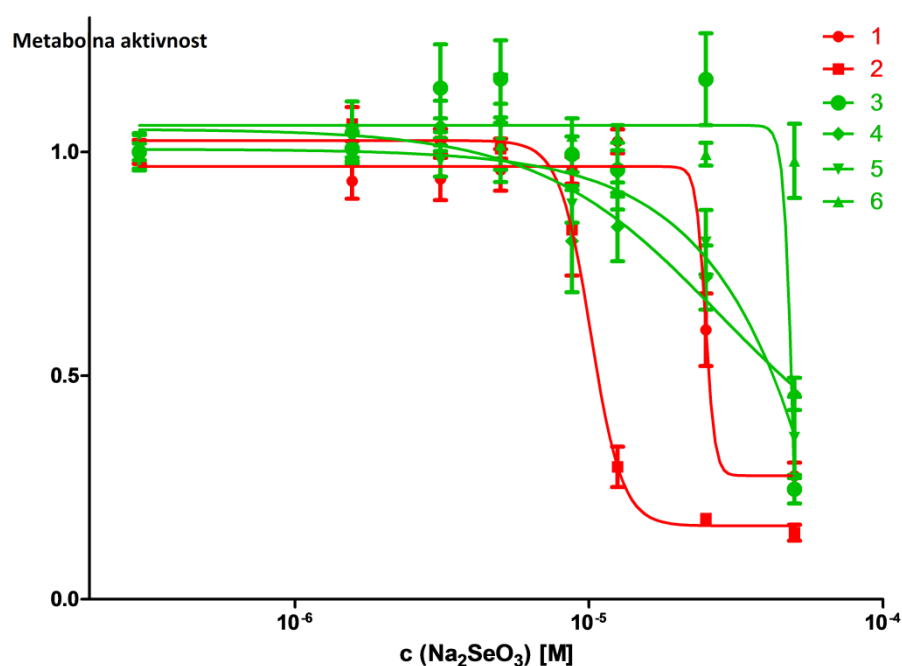
* IC50 predstavlja koncentracijo selenita, ki je potrebna, da se zniža metabolna aktivnost celic na polovico maksimalne metabolne aktivnosti.

** Vzorec 6 nima podane IC50 vrednosti po 24 h, saj ni prišlo do dovolj velike razlike v metabolni aktivnosti, da bi lahko izračunali IC50.

Vzorec 1 ima genotip *3C/*3A, vzorec 2 ima genotip *3A/*3A, vzorci od 3 do 6 pa imajo genotip *1/*1 ali drugače zapisano ++ oziroma imajo genotip divjega tipa, brez mutacij (Preglednica X). Ta genotip omogoča prepis mRNA, ki bo prevedena v delujoč in stabilen protein TPMT. Vzorca 1 in 2 imata mutacijo na obeh alelih, kar lahko zapišemo kot -/-. Oba vzorca z mutacijo imata nižjo aktivnost TPMT v primerjavi z vzorci 3-6, pri katerih mutacija ni bila prisotna. Vzorec 1 se razlikuje od vzorca 2 v mutaciji na enem od alelov. Alel *3A je oznaka za kombinacijo dveh mutacij (*3B in *3C), zato povzroči genotip *3A/*3A večjo destabilizacijo proteina TPMT in posledično nižjo aktivnost TPMT (8), kar je razvidno tudi iz meritev aktivnosti TPMT (Preglednica X).

Ko primerjamo izbrane LCL z znanimi genotipi lahko največje razlike opazimo pri 50% metabolni inhibitorni koncentraciji (IC50) selenita po 24 h (Preglednica X, Slika 9). Vrednosti metabolne IC50 selenita pri vzorcih z visoko aktivnostjo TPMT (3,5 in 6; genotip TPMT +/+) so nad 2,0 mM Na_2SeO_3 . Vrednosti pri vzorcih z nizko aktivnostjo

TPMT (vzorci 1, 2 (genotip *TPMT* $-/-$) in 4 (genotip *TPMT* $+/+$)) pa so pod 0,03 mM Na_2SeO_3 , kar je skoraj 100-kratna razlika. Po 72 h so razlike v metabolni IC₅₀ manjše, vendar vseeno vidimo nižje vrednosti pri vzorcih z nižjo aktivnostjo TPMT (1,2 in 4). Iz rezultatov sklepamo, da se celice z višjo aktivnostjo TPMT lažje spopadajo s stresom, ki ga predstavlja dodan selenit. To nakazuje, da ima encim TPMT morebitno vlogo pri metiliranju in s tem pri detoksifikaciji dodanega selenita. Rezultati so skladni s predhodnimi študijami, ki so jih opravljali na bakterijah in nakazujejo na večjo proizvodnjo metiliranih presnovkov v celicah z močno aktivnim TPMT (17).



Slika 9: Metabolna aktivnost celic po dodatku selenita po 24 h

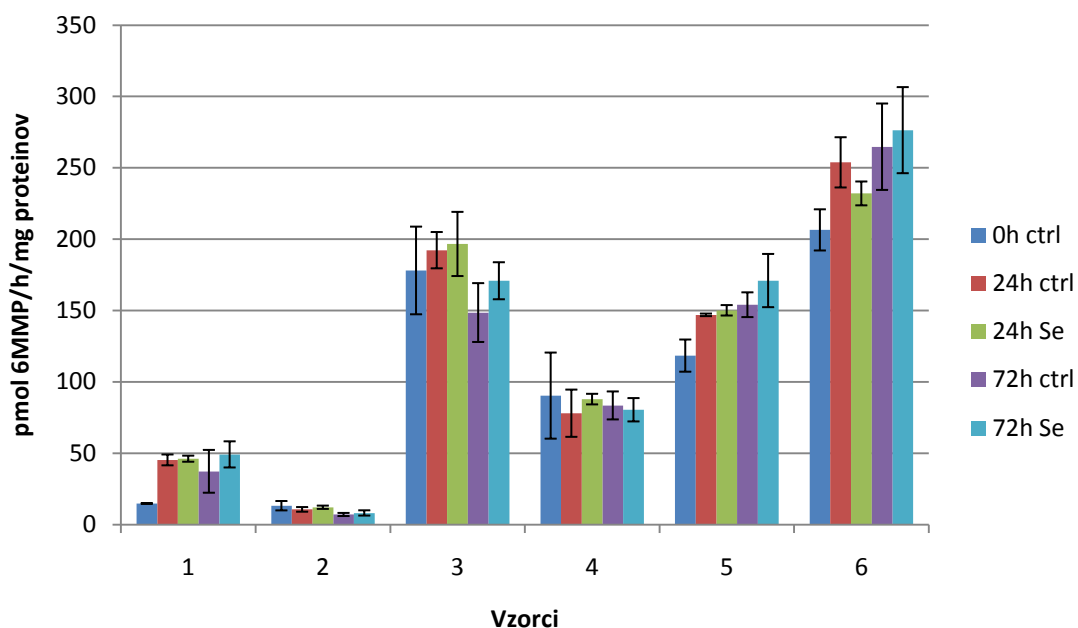
Pri LCL-ih 1 in 2 (genotip *TPMT* $-/-$) se metabolna aktivnost zmanjša pri nižji koncentraciji dodanega selenita. Do padca metabolne aktivnosti pri LCL-ih 3,4 in 5 (genotip *TPMT* $+/+$) pa pride pri višji koncentraciji selenita. Pri LCL 6 (genotip *TPMT* $+/+$), ki ima najvišjo izmerjeno aktivnost TPMT, pri najvišji dodani koncentraciji selenita še nismo zaznali padca metabolne aktivnosti, ki bi omogočal izračun IC₅₀.

4.3 Aktivnost TPMT in koncentracija SAM

4.3.1 Aktivnosti TPMT

Aktivnost TPMT smo določali z metodo HPLC, da smo potrdili razlike v aktivnosti TPMT med celicami z različnimi genotipi TPMT. Iz rezultatov (*Slika 10*) je razvidna pričakovana razlika med vzorci z genotipom *TPMT* $-/-$ (vzorci 1 in 2) ter genotipom *TPMT* $+/+$ (vzorci 3,4,5 in 6). Vzorci $-/-$ imajo signifikantno nižje aktivnosti TPMT ($p < 0,001$), povprečna

aktivnost vzorcev $-/-$ je 25 pmol 6MMP/h/mg proteinov, pri vzorcih $+/+$ pa je ta vrednost 6,6-krat višja: 166 pmol 6MMP/h/mg proteinov. Vzorec 4 ima nepojasnjeno nižjo aktivnost od ostalih vzorcev z genotipom *TPMT* $+/+$, kar nakazuje na morebiti še neodkrito mutacijo na enem od alelov ali na drug mehanizem regulacije, ki povzroči nižjo aktivnost encima TPMT.



Slika 10: Aktivnost TPMT v lizatih LCL

Višina stolpcev predstavlja aktivnost TPMT, sklopi predstavljajo vzorce LCL (1-6), barve stolpcev pa predstavljajo časovno točko meritve in dodatek selenita (ctrl - LCL brez dodatka selenita, Se – dodan selenit). Prva dva sklopa meritev vzorcev 1 in 2 (genotip *TPMT* $-/-$) sta nižja od ostalih meritev 4-6 (genotip *TPMT* $+/+$), kar se ujema z dejstvom, da imata LCL 1 in 2 na obeh alelih prisotno mutacijo na genu *TPMT*, ki povzroči destabilizacijo v proteinu TPMT. Razlika v višini rdečega in zelenega stolpca pri vsakem vzorcu predstavlja spremembo v aktivnosti TPMT po 24 h dodanega selenita, razlika med vijoličnim in turkiznim pa spremembo po 72 h. Najbolj nepričakovane so velike razlike v aktivnosti TPMT pri kontrolnih vzorcih (modra, rdeča in vijolična) v različnih časovnih točkah, ki so najverjetneje posledica spreminjajočih pogojev v gojišču skozi čas.

Drugi razlog za merjenje aktivnosti TPMT je bilo vprašanje vpliva selenita na aktivnost TPMT na osnovi našega predvidevanja, da dodatek selenita poviša aktivnost TPMT.

Merili smo razlike po dodatku selenita v času 24 h in 72 h (*Slika 10*), kjer smo lahko primerjali kontrolni vzorec z vzorcem z dodanim selenitom. V času 24 h meritve niso pokazale signifikantnih razlik med kontrolno skupino in skupino z dodanim selenitom, zato smo v nalogo vključili zgolj preglednico z rezultati po 72 h (*Preglednica XI*). Razlike po

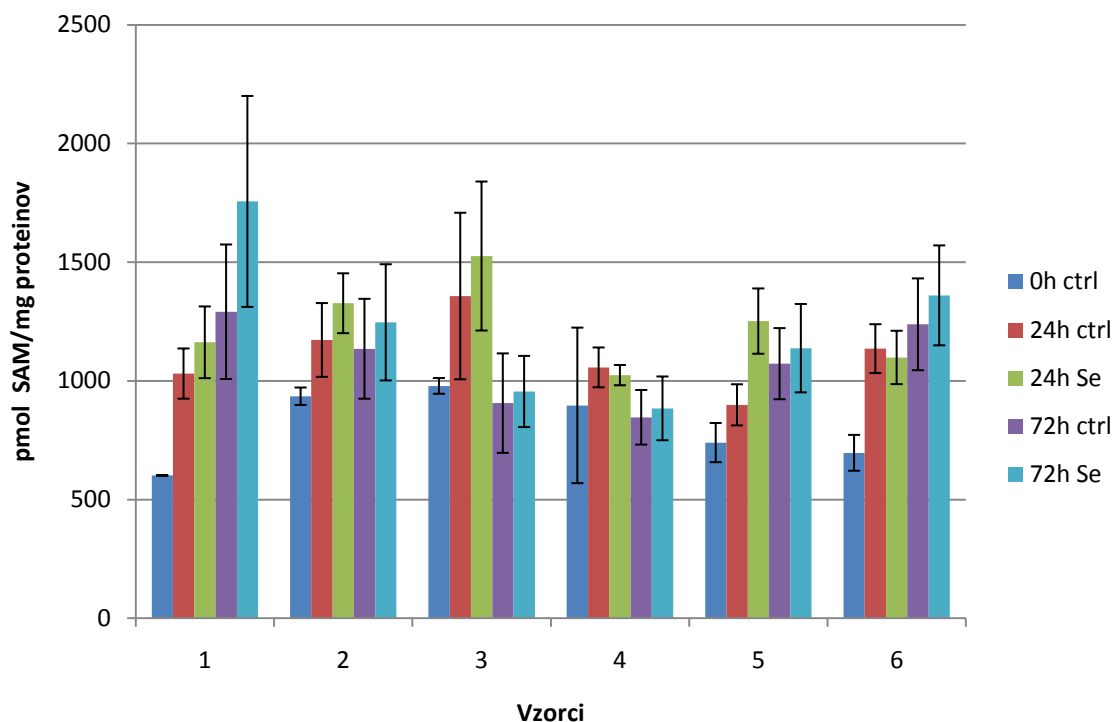
72 h niso bile zelo velike, vendar je bila aktivnost TPMT signifikantno višja pri celicah z dodanim selenitom, predvsem pri celicah z genotipom *TPMT* +/+, ki imajo višjo aktivnost TPMT. Izjema sta vzorca 1 in 2 (genotip *TPMT* -/-), kjer je razmerje selenita in kontrole sicer najvišje, vendar razlika ni statistično signifikantna ($p > 0,05$) (*Preglednica XI*). Ker spremembe po 24 h pri aktivnosti TPMT niso bile statistično značilne, bi bilo zanimivo spremljati aktivnost TPMT v ožjih časovnih intervalih, da bi lahko potrdili, da celice potrebujejo nekaj časa, da prilagodijo aktivnost TPMT povišanemu selenitu v okolju. Glede na to, da po 72 h urah nismo več merili dogajanja v celicah, bi morebiti našli večje razlike v aktivnosti TPMT po daljšem časovnem obdobju, ko bi se celica prilagodila na okolje z več selenita. Pri vzorcih z genotipom *TPMT* -/- bi potrebovali več vzorcev, da bi lahko potrdili statistično značilno povečanje aktivnosti TPMT po dodatku selenita.

Preglednica XI: Analiza meritev aktivnosti TPMT po 72 h

Vzorci	Povprečje akt. TPMT v kontrolnih vzorcih [pmol 6-MMP/h/mg prot.]	Povprečje akt. TPMT v vzorcih s selenitom [pmol 6-MMP/h/mg prot.]	Razmerje aktivnosti TPMT pri vzorcih s selenitom in kontrolnimi vzorci	Ttest (p vrednost)
Vsi	115,83	125,95	1,09	0,00573
1,2	22,14	28,60	1,29	0,143
3,4,5,6	162,68	174,63	1,07	0,0210

4.3.2 Koncentracije SAM

Nadalje nas je zanimala koncentracija SAM v LCL-ih, saj smo želeli potrditi korelacijo z aktivnostjo TPMT (9). Pričakovali smo razlike v koncentraciji SAM po dodatku selenita, saj SAM nastopa kot donor metilne skupine v reakcijah metilacije selenovih spojin (26). Koncentracijo SAM smo merili z metodo HPLC. Iz Slike 11 lahko grafično opazimo povišanje koncentracije SAM po dodatku selenita pri večini vzorcev, vendar zaradi velikih razlik med kontrolnimi vzorci v različnih časovnih točkah, ne moremo pripisati povečanja koncentracije SAM zgolj dodatku selenita.



Slika 11: Koncentracija SAM v lizatih LCL

Višina stolpcev predstavlja koncentracijo SAM, sklopi predstavljajo vzorce LCL (1-6), barve stolpcev pa predstavljajo časovno točko meritve in dodatek selenita (ctrl - LCL brez dodatka selenita, Se – dodan selenit). Razlika v višini rdečega in zelenega stolpca pri vsakem vzorcu predstavlja spremembo v koncentraciji SAM po 24 h dodanega selenita, razlika med vijoličnim in turkiznim pa predstavlja spremembo po 72 h. Najbolj nepričakovane so velike razlike v koncentraciji SAM pri kontrolnih vzorcih (modra, rdeča in vijolična) v različnih časovnih točkah, ki so najverjetneje posledica različnih pogojev v gojišču skozi čas. To nam onemogoča, da bi lahko potrdili signifikantnost razlik v koncentraciji SAM med kontrolnimi in celicami z dodanim selenitom v isti časovni točki.

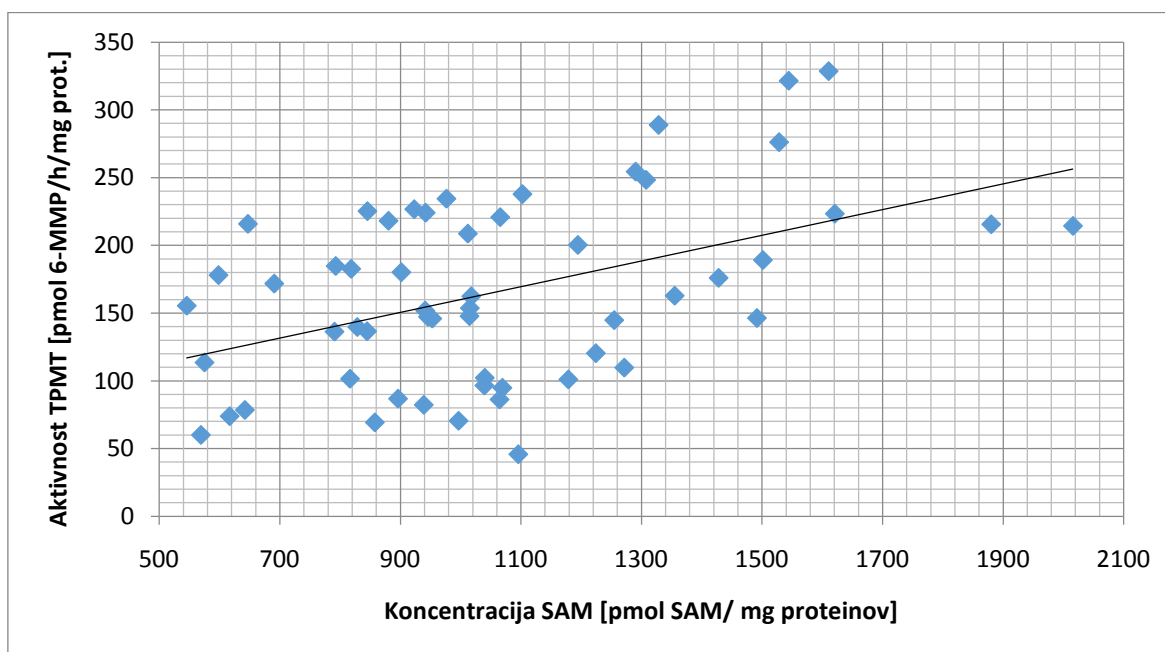
Po 24 h so bile razlike signifikantne, ko smo upoštevali vse vzorce, medtem ko v času 72 h meritve niso pokazale statistično značilnih razlik med kontrolno in skupino z dodanim selenitom. Največje relativno povišanje koncentracije SAM po dodatku selenita smo opazili v skupini vzorcev z genotipom *TPMT* $-/-$ (Preglednica XII). Povišanje koncentracije SAM po dodatku selenita je potrdil tudi Dausch s sodelavci, ki je proučeval vpliv različnih oblik selena na koncentracijo SAM pri podganah. Po dodatku natrijevega selenita (1ppm - 30 ppm) so izmerili največjo razliko v primerjavi s kontrolo po enem tednu, po treh in petih tednih pa je bila razlika majhna (31).

Preglednica XII: Analiza meritev koncentracije SAM po 24 h

Vzorci	Povprečna konc. SAM (kontrolni vzorci) [pmol SAM/ mg proteinov]	Povprečna konc. SAM (vzorci s selenitom) [pmol SAM/ mg proteinov]	Razmerje koncentracije SAM med vzorci s selenitom ter kontrolnimi vzorci	Ttest (p vrednost)
vsi	1081,53	1223,21	1,13	0,0211
1,2 (-/-)	1213,08	1501,15	1,24	0,0294
3,4,5,6 (+/+)	1015,75	1084,23	1,07	0,135

Glede na to, da do spremembe koncentracije SAM pride hitreje (po 24 h) kot do povišane aktivnosti TPMT (po 72 h), bi bilo zanimivo v prihodnje podrobneje preučiti, ali je vpliv selenita na izražanje *TPMT* neposreden ali posreden preko povišane koncentracije SAM.

Pri izbranih vzorcih je bila korelacija med aktivnostjo TPMT in koncentracijo SAM prisotna le pri skupini z genotipom divjega tipa (genotip *TPMT* +/+) (Slika 12 in Preglednica XIII). Povezavo med višjo koncentracijo SAM in višjo aktivnostjo TPMT so pokazali tudi v analizi krvnih vzorcev heterozigotov (genotip *TPMT* +/-) iz estonske genske banke (9).



Slika 12: Graf korelacije aktivnosti TPMT in koncentracije SAM pri vzorcih divjega tipa (genotip *TPMT* +/+)

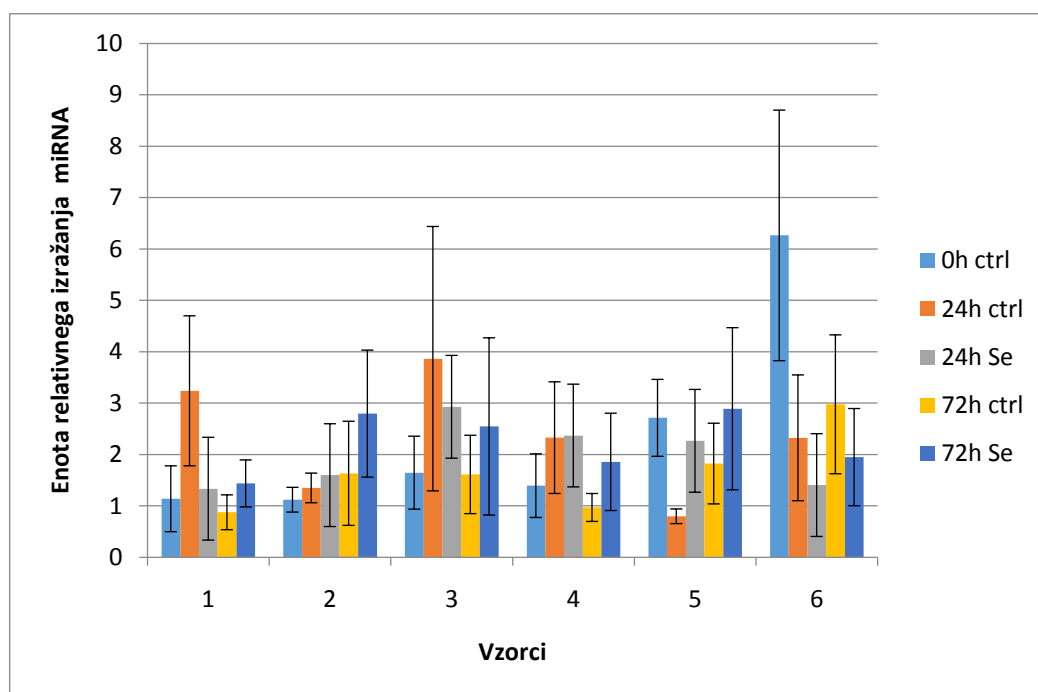
Faktor korelacije med parametroma je 0,440 ($p = 7,00 \cdot 10^{-4}$, $n = 56$, Pearsonova korelacija) (Preglednica XIII). Dobra korelacija med parametroma je statistično značilna ($p < 0,05$).

4.4 Izražanje miRNA

Merili smo izražanje miRNA, ki odraža nivo regulacije prevajanja tarčnih mRNA v protein, ker nas je zanimalo, v kakšni meri se izražajo izbrane miRNA v odvisnosti od aktivnosti TPMT in dodatka selenita. Vzorci so bili pripravljani s postopki izolacije RNA in z reverzno transkripcijo RNA v cDNA. Nato smo izmerili prisotnost izbranih miRNA s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času.

Meritve izražanja miRNA so bile normalizirane z izmerjenimi vrednostmi izražanja miRNA RNU-6, ki se izraža dovolj stabilno oziroma neodvisno od aktivnosti TPMT in dodatka selenita. S tem smo zmanjšali razlike, ki so nastale pri pripravi vzorcev.

4.4.1 Izražanje miR-185



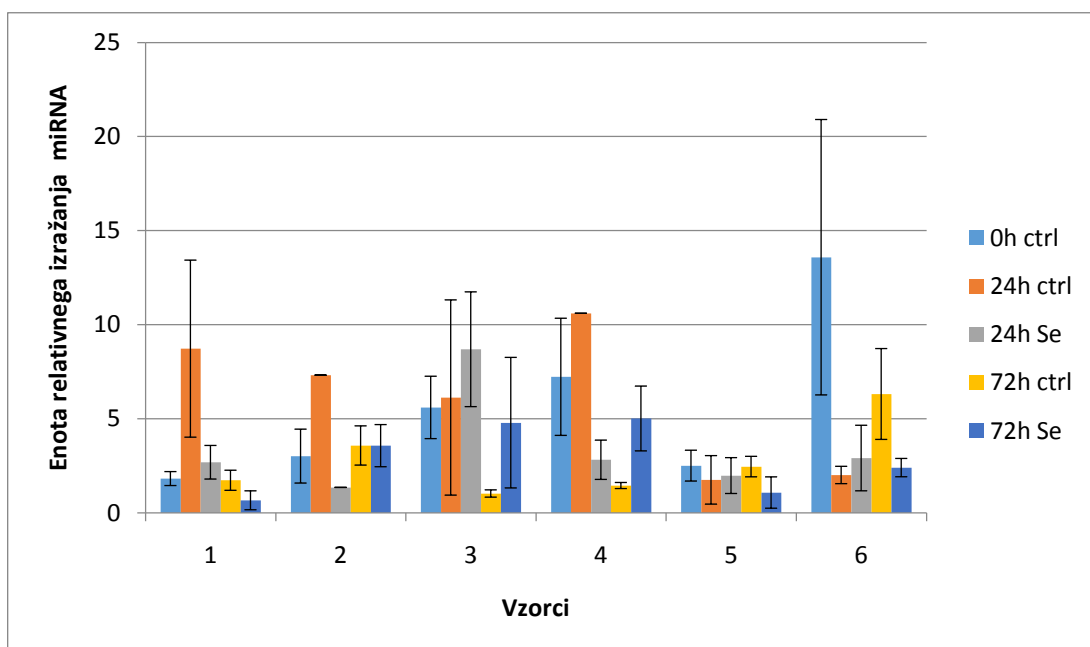
Slika 13: Izražanje miR-185 po vzorcih

Višina stolpcev predstavlja relativno izražanje miR-185, sklopi predstavljajo vzorce (1-6), barve stolpcev pa predstavljajo časovno točko meritve in dodatek selenita (ctrl - LCL brez dodatka selenita, Se – dodan selenit). Razlika v višini oranžnega in sivega stolpca pri vsakem vzorcu predstavlja spremembo v izražanju miR-185 po 24 h dodanega selenita, razlika med rumenim in temno modrim pa spremembo po 72 h.

Meritve izražanja miR-185 so bile statistično značilno različne pri primerjavi treh bioloških ponovitev, kar je razvidno tudi iz širokega intervala napake na grafu (*Slika 13*). Velike razlike med biološkimi ponovitvami onemogočajo potrjevanje statistično značilnih razlik rezultatov, ki jih nakazujejo statistične analize, zato bom omenila zgolj nekaj glavnih

trendov. Kaže se trend povišanja miR-185 po 72 h pri vzorcih z dodanim selenitom, kar nakazuje, da je potrebno nekaj časa, preden se je celica prilagodila na s selenom bogato okolje. Čeprav statistična analiza ni pokazala signifikantne korelacije med miR-185 in aktivnostjo TPMT, je opazen trend, da je izražanje miR-185 višje v vzorcih z višjo aktivnostjo TPMT (Slika 13). Ena od možnih razlag je, da v celicah z nižjo aktivnostjo TPMT ni smiselno dodatno nižati aktivnosti preko miRNA, medtem ko je uravnavanje aktivnosti TPMT v celicah z visoko aktivnostjo TPMT preko miRNA bolj smiselno, saj se prepíše dovolj mRNA, ki se bo prevedla v funkcionalen in stabilen encim. Kljub temu da obstaja dobra možnost, da se miR-185 veže na mRNA TPMT, je povišano izražanje miR-185 lahko tudi odraz povišanja drugih proteinov, katerih mRNA je možna tarča miR-185.

4.4.2 Izražanje miR-223



Slika 14: Izražanje miR-223 po vzorcih

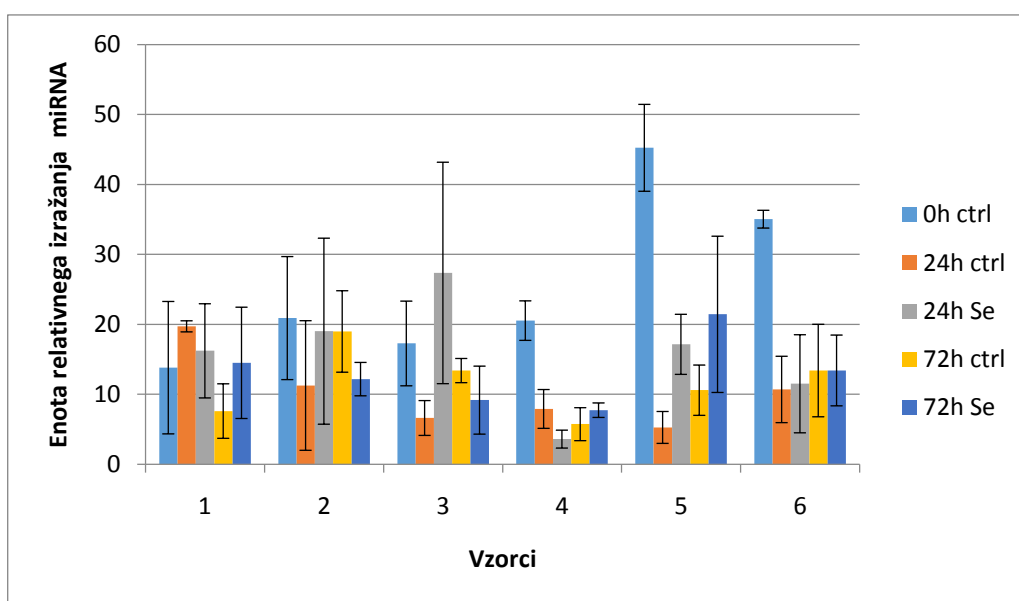
Višina stolpcev predstavlja relativno izražanje miR-223, sklopi predstavljajo vzorce (1-6), barve stolpcev pa predstavljajo časovno točko meritve in dodatek selenita (ctrl - LCL brez dodatka selenita, Se – dodan selenit). Razlika v višini oranžnega in sivega stolpca pri vsakem vzorcu predstavlja spremembo v izražanju miR-223 po 24 h dodanega selenita, razlika med rumenim in temno modrim pa spremembo po 72 h.

Tako kot pri merjenju aktivnosti TPMT in koncentracij SAM, smo pri izražanju miR-223 opazili velike razlike med kontrolnim vzorcem v času 0 h in kontrolnima vzorcema v času 24 h in 72 h (Slika 14). Velike razlike niso bile pričakovane, vendar jih lahko pojasnimo z vplivom spreminjajočih pogojev v gojišču skozi čas. Iz analize rezultatov je bil viden trend

med vzorci s selenitom, kjer smo opazili višje izražanje miR-223 v vzorcih s genotipom *TPMT* *+/+* v primerjavi z vzorci z genotipom *TPMT* *-/-*. Tako kot pri miR-185, tudi pri miR-223 opazimo povišano regulacijo aktivnosti *TPMT* pri vzorcih z dodanim selenitom preko višjega izražanja miRNA.

4.4.3 Izražanje let-7a

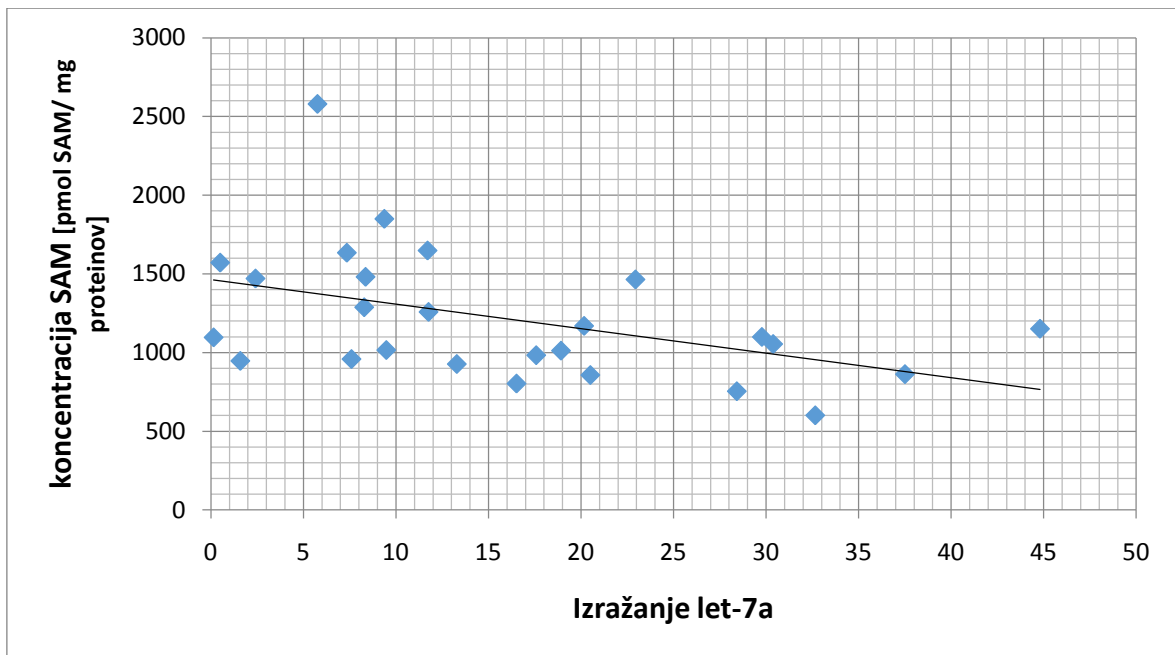
Pri meritvah izražanja let-7a smo opazili trend višjega izražanja let-7a 24 h po dodatku selenita v primerjavi s kontrolno skupino (Slika 15). Tudi pri let-7a opazimo enak trend kot pri prejšnjih dveh miRNA: višje izražanje pri celicah z genotipom *TPMT* divjega tipa.



Slika 15: Izražanje let-7a po vzorcih

Višina stolpcev predstavlja relativno izražanje let-7a, sklopi predstavljajo vzorce (1-6), barve stolpcev pa časovno točko meritve in dodatek selenita (ctrl - LCL brez dodatka selenita, Se – dodan selenit). Razlika v višini oranžnega in sivega stolpca pri vsakem vzorcu predstavlja spremembo v izražanju let-7a po 24 h dodanega selenita, razlika med rumenim in temno modrim pa spremembo po 72 h.

Analiza je pokazala negativno korelacijo SAM in let-7a, ki je najbolj izražena med mutiranimi vzorci v kontrolni skupini (Slika 16, Preglednica XIII). Povezavo med SAM in let-7a pojasnjuje raziskava, kjer so ugotovili, da let-7a v kombinaciji z njegovim antagonistom Lin28a regulira več metabolitov SAM-a (67). Smer korelacije in razloge zakaj je korelacija bolj izrazita pri mutiranih vzorcih, bo potrebno še dodatno raziskati.



Slika 16: Korelacija izražanja let-7a in koncentracije SAM pri vzorcih z genotipom *TPMT* –/–

Faktor korelacije med parametroma je $-0,477$ in je statistično značilna ($p = 1,40 \cdot 10^{-2}$, $n = 26$, Pearsonova korelacija) (Preglednica XIII).

4.5 Analiza korelacij

Pred analizo korelacij smo preverili normalnost porazdeljevanja meritev s statističnima testoma normalnosti D'Agostino & Pearson in Shapiro-Wilk, ki sta pokazala ali meritve sledijo Gaussovi distribuciji. Skupine meritev, ki niso ustrezale normalnosti tudi po transformaciji podatkov z logaritmiranjem vrednosti, smo analizirali z neparametričnim testom korelacije ter prikazali s Spearmanovim faktorjem korelacije. Za analizo korelacij med vzorci, ki so ustrezali normalnosti, smo uporabili Pearsonovo korelacijo. V obeh primerih faktor r predstavlja korelacijo med 0 in 1, pri čemer je 1 popolna korelacija. V Preglednici XIII so prikazane samo korelacije s faktorjem korelacije na 0,30, ki imajo signifikantnost korelacije pod 0,05. Faktor korelacije med 0.30 in 0.49 smo obravnavali kot srednje močno korelacijo, korelacije s faktorjem nad 0.50 pa kot močne korelacije.

Preglednica XIII: Pregled korelacij med merjenimi parametri

Vključeni vzorci	Analizirana parametra (p-parametrični, n-neparametrični)	R- faktor korelacije	P vrednost (signifikantnost korelacije)	N (velikost vzorca)
Vsi vzorci (0 h, 24 h in 72 h, kontrolni in vzorci s selenitom)	SAM – let-7a (n)	-0,330	2,00E-03	82
	miR-185 – miR-223 (n)	0,412	3,38E-04	72
	miR-185 – let-7a (n)	0,476	3,65E-06	86
	miR-223 – let-7a (n)	0,311	8,00E-03	72
Mutirani vzorci (genotip <i>TPMT</i> -/-)	log(SAM) – let-7a (p)	-0,477	1,40E-02	26
	log(miR-185) - let-7a (p)	0,423	2,50E-02	28
Vzorci z genotipom divjega tipa (genotip <i>TPMT</i> +/-)	TPMT – log(SAM) (p)	0,440	7,00E-04	56
	miR-185 – miR-223 (n)	0,377	6,00E-03	51
	miR-185 - let-7a (n)	0,514	3,69E-05	56
Vsi kontrolni vzorci	log(SAM) - log(miR-223) (p)	0,400	6,00E-03	41
	SAM - let-7a (n)	-0,394	6,00E-03	48
	miR-185 - let-7a (n)	0,468	4,70E-04	52
	miR-223 - let-7a (n)	0,376	1,10E-02	45
Vsi vzorci s selenitom	log(SAM) – miR-185 (p)	-0,453	7,00E-03	34
	miR-185 – let-7a (n)	0,528	1,00E-03	34
Kontrolni mutirani vzorci	SAM – let-7a (p)	-0,527	4,30E-02	15
Kontrolni vzorci divjega tipa	TPMT - SAM (p)	0,404	2,00E-02	33
	log(miR-185) – log(miR- 223) (p)	0,392	2,90E-02	32
	log(miR-185)- log(let-7a) (p)	0,509	2,00E-03	35
Vzorci divjega tipa s selenitom	TPMT - SAM (p)	0,526	1,00E-02	23
	miR-185 – let-7a (n)	0,535	9,00E-03	23

Pri statistični analizi meritev izbrane miRNA niso korelirale z aktivnostjo TPMT. Iz tega sklepamo, da morda do interakcije z mRNA TPMT ne pride, ali pa ta interakcija prispeva v manjši meri, kar z našimi meritvami in analizami nismo zaznali. To bi lažje potrdili ali ovrgli, če bi v raziskavi merili še izražanje mRNA TPMT. Kljub temu, da statistično značilne korelacije med izbranimi miRNA in aktivnostjo TPMT nismo zaznali, smo opazili večje izražanje miRNA pri vzorcih z višjo aktivnostjo TPMT.

Korelacijska analiza je razkrila pozitivno medsebojno odvisnost med merjenimi miRNA. Predvsem opazimo višjo korelacijo med vsemi miRNA pri vzorcih, katerim je bil dodan selenit. Verjetno je, da so izbrane miRNA povezane v procesih, na katere vpliva selenit. Možno je tudi, da se velik delež prisotnih miRNA povečano izraža v primeru spremembe v okolju, kot je dodatek selenita. V takem primeru se sproži več procesov, da omogočijo ravnovesje v spremenjenem okolju.

Merjenje miRNA smo v raziskovalni skupini izvajali prvič, zato je bilo težje predvideti morebitne težave pri meritvah, kot so večja odstopanja meritev med kontrolnimi vzorci in biološkimi ponovitvami, kjer razlike niso bile pričakovane. Glede na vpletenost miRNA v veliko procesov je razlog za odstopanja lahko v faktorjih, ki jih še ne poznamo in so vplivali na procese, v katere so vpletene izbrane miRNA. Delno je vzrok v slabi ponovljivosti metode merjenja zaradi možne slabše specifičnosti uporabljenih sond, saj so miRNA zelo kratke. Z vidika metode je problematična tudi uporaba fluorescentnega barvila SYBR zaradi slabše specifičnosti barvila. V primeru merjenja miRNA, ki so si zelo podobne, je bolj primerno označevanje s fluorofori (75).

Statistična moč rezultatov meritev miRNA je premajhna, da bi pokazali signifikantno razliko med skupinami vzorcev zaradi visoke variabilnosti bioloških ponovitev, nekaterih nepojasnjenih odstopanj tehničnih ponovitev in velikih razlik med časovnimi točkami v kontrolnih skupinah. Kljub velikemu skupnemu številu meritev smo imeli v raziskavi veliko različnih skupin meritev in raziskovalnih vprašanj, zato je v nekaterih primerih število meritev za določanje signifikantnosti relativno nizko. Po drugi strani pa obstaja glede na majhno število vzorcev in relativno visoko variabilnost in standardno deviacijo meritev istega vzorca verjetnost, da bi analiza zaznala statistično signifikantne razlike relativno majhna, saj pričakovane razlike niso zelo velike.

Zaradi velike variabilnosti rezultatov znotraj skupine je težko določiti, ali je neko odstopanje naključje ali statistično pomemben vpliv. Ob dodatnem upoštevanju zgoraj omenjene variabilnosti med meritvami in velikim številom testiranih hipotez smo se odločili, da je v primeru meritev miRNA bolj ustrezno govoriti o trendih in ne o statistično značilnih ugotovitvah, čeprav smo s Studentovim t-testom potrdili signifikantnost ($\alpha < 0,05$).

Problem testiranja več neodvisnih ničelnih hipotez (*Preglednica XIII*) je, da s tem povečamo verjetnost, da bo vsaj ena analiza vrnila $p < 0,05$, čeprav so lahko načeloma vse ničelne hipoteze pravilne. Zato je potrebno v primeru testiranja več hipotez uvesti korekcijo, kot je na primer Bonferroni, razen če testiramo zgolj omejeno število prej predvidenih hipotez v primerjavi s testiranjem vseh mogočih kombinacij. Bonferroni korekcija predvideva ustrezno znižanje stopnje tveganja (α), s čimer zmanjšamo verjetnost potrjevanja lažno pozitivnih hipotez. Vendar gledano z druge strani, če bi merili veliko število vzorcev in bi iskali veliko razliko ali učinek in bi imeli majhno standardno deviacijo med meritvami, je verjetnost, da bi našli statistično signifikanten efekt zelo velika, če le-ta obstaja in smo lahko enako prepričani tudi o tem, da ni statistično signifikantnega efekta, če ga test ne pokaže. Na drugi strani, če imamo majhno število vzorcev z relativno majhnimi razlikami in veliko standardno deviacijo (kot v našem primeru), odsotnost statistično signifikantnega učinka še ne pomeni, da učinka ni.

Vprašanje, ki se nam je porajalo ob pregledu meritev z vidika metodologije je, kaj se je dogajalo s celicami skozi čas, saj smo pri nekaterih vzorcih opazili velike razlike med kontrolnimi skupinami v času 0 h, 24 h in 72 h. Zato bi bilo zanimivo v prihodnje preučiti vzorce v ožjih časovnih intervalih in ugotoviti časovno bolj natančno, kdaj pride do spremembe. En del variabilnosti med kontrolnimi celicami lahko pripišemo pogojem v gojišču, ki se spreminjajo skozi čas. V gojišču se spreminja gostota celic, kot tudi koncentracija različnih metabolitov, ki vplivajo na aktivnost TPMT, koncentracijo SAM in miRNA. Vprašanje je, ali pride po določenem času do stabilne vrednosti, in kako velika nihanja vrednosti med časovnimi točkami so normalna. Za bolj celostno sliko dogajanja po dodatku selenita bi bilo smiselno meriti tudi izražanje mRNA ter tako primerjati vse tri stopnje: izražanje miRNA, ki ciljajo mRNA TPMT, izražanje mRNA TPMT in aktivnost encima TPMT. Glede na dodatek selenita in izbiro miRNA, ki ciljajo tudi glutathion peroksidaze, bi bilo smiselno meriti tudi razlike v glutathion peroksidazni aktivnosti, vendar se je predhodno test, ki smo ga imeli na voljo, izkazal kot neuporaben. V primeru večjih finančnih virov bi bilo bolj optimalno analizirati izolirane RNA z metodo mikromrež, kjer bi lahko dobili podatke o spremembah izražanja miRNA za veliko število miRNA (več sto miRNA), nato pa bi dodatno potrdili opažene spremembe v izražanju z metodo PCR.

Pri analizi miRNA težko z gotovostjo rečemo, ali miRNA vpliva na nižjo aktivnost TPMT, ali zaradi nizke aktivnosti TPMT celica zmanjša izražanje miRNA, ki še dodatno niža aktivnost TPMT. Poleg same smeri vpliva pa tudi težko izključimo vpliv selenita na izražanje drugih proteinov in posledično na izražanje miRNA, ki zavirajo izražanje le-teh. Kljub številnim zanimivim odkritjem na področju miRNA, so orodja za analizo in normalizacijo teh podatkov še relativno nerazvita. Zato je težko z zanesljivostjo trditi, kakšen vpliv ima posamezna miRNA na aktivnost določenega encima, kot je TPMT. V trenutni fazi informacij, ki so poznane o miRNA, je analiziranje miRNA bolj uporabno na področju iskanja biomarkerjev določenih stanj in bolezni, kot pa pri razumevanju vloge posamezne miRNA, ki ima tarče na več sto mRNA različnih proteinov.

Ob prihodnjih študijah vpliva selenita na TPMT bi bilo smiselno meriti tudi faktorje oksidativnega stresa, kot so glutation peroksidazna aktivnost, prisotnost vodikovega peroksida in reaktivnih radikalov, kar je bilo že nakazano v raziskavah z drugimi selenovimi spojinami. Za bolj podrobno razjasnitev, kako selenit vpliva na aktivnost TPMT in kakšna je endogena vloga TPMT, bo potrebno še nekaj raziskav, vendar smo na pravi poti k večjemu razumevanju encima TPMT in morebiti tudi bliže k razumevanju procesov oksidativnega stresa.

5 Sklep

Na podlagi rezultatov smo prišli do sledečih sklepov:

- Podatkovne baze interakcij mRNA - miRNA so heterogene, zato je potrebno za izbiro ustreznih miRNA za *in vitro* ali *in vivo* testiranje pregledati več baz, ter se odločiti za uporabo tistih z več informacijami o napovednem modelu oziroma v bazah izbrati le tiste interakcije, ki so že bile eksperimentalno validirane.
- Potrdili smo, da imajo celice z genotipom *TPMT* $-/-$ nižjo aktivnost TPMT in da imajo celice z genotipom *TPMT* $*3A/*3A$ nižjo aktivnost TPMT kot celice z genotipom *TPMT* $*3C/*3A$, saj mutacija $*3C$ manj destabilizira strukturo TPMT kot mutacija $*3A$.
- V limfoblastoidnih celičnih linijah smo pokazali, da aktivnost TPMT in koncentracija SAM pozitivno korelirata pri celicah z genotipom *TPMT* $+/+$.
- Vrednosti metabolne 50% inhibitorne koncentracije (IC50) selenita so nižje pri celicah z nižjo aktivnostjo TPMT, večja razlika v IC50 je vidna pri 24 h, medtem ko so po 72 h razlike manjše.
- Celice z dodanim selenitom imajo statistično značilno višjo aktivnost TPMT po 72 h, predvsem je razlika bolj signifikantna pri celicah z visoko aktivnostjo TPMT. Celice s selenitom imajo signifikantno višjo koncentracijo SAM po 24 h, kar je najbolj izrazito pri vzorcih z mutacijo v genu *TPMT*.
- Pri celicah z višjo aktivnostjo TPMT je opazen trend višjega izražanja miR-185, kar je opazno tudi pri celicah gojenih v prisotnosti selenita po 72 h. Celice z dodanim selenitom imajo opazno višje izražanje miR-223 v vzorcih z genotipom *TPMT* $+/+$ v primerjavi z vzorci z genotipom *TPMT* $-/-$. Izražanje *let-7a* je pri celicah s selenitom višje po 24 h in negativno korelira s koncentracijo SAM. Izražanje izbranih miRNA med seboj pozitivno korelira.

Kljub temu da mehanizem metilacije selenovih spojin preko encima TPMT še ni pojasnjen, naši rezultati kažejo, da selenit vpliva na aktivnost TPMT. Opazili smo, da celice z višjo aktivnostjo TPMT prenesejo več selenita, saj morebiti TPMT sodeluje pri presnovi selenita v manj toksične metabolite. Pri vseh testiranih miRNA smo opazili trend višjega izražanja miRNA pri vzorcih z višjo aktivnostjo TPMT, kar kaže na morebitno vlogo izbranih miRNA v regulaciji TPMT. Nadaljnje študije so potrebne, da bomo razumeli endogeno vlogo človeškega TPMT in vlogo selena v regulaciji aktivnosti TPMT.

6 Literatura

- 1) Lennard L. Implementation of TPMT testing. *Br J Clin Pharmacol* 2014; 77(4):704-14.
- 2) Glauser TA, Nelson AN, Zembower DE, Lipsky JJ, Weinshilboum RM. Diethyldithiocarbamate S-methylation: evidence for catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266(1):23-32.
- 3) Woodson LC, Ames MM, Selassie CD, Hansch C, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase. Aromatic thiol substrates and inhibition by benzoic acid derivatives. *Mol Pharmacol* 1983; 24(3):471-8.
- 4) Wu H, Horton JR, Battaile K, Allali-Hassani A, Martin F, Zeng H, Loppnau P, Vedadi M, Bochkarev A, Plotnikov AN, Cheng X. Structural Basis Of Allele Variation Of Human Thiopurine-S-Methyltransferase. *Proteins* 2007; 67.1: 198-208.
- 5) Azimi F, Jafariyan M, Khatami S, Mortazavi Y, Azad M. Assessment of Thiopurine-based drugs according to Thiopurine S-methyltransferase genotype in patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Iran J Ped Hematol Oncol* 2014; 4(1):32-8.
- 6) Wang L, Pellemounter L, Weinshilboum R, Johnson JA, Hebert JM, Altman RB, Klein TE. Very important pharmacogene summary: thiopurine S-methyltransferase. *Pharmacogenet Genomics* 2010; 20(6):401-5.
- 7) Scheuermann TH, Lolis E, Hodsdon ME. Tertiary structure of thiopurine methyltransferase from *Pseudomonas syringae*, a bacterial orthologue of a polymorphic, drug-metabolizing enzyme. *J Mol Biol* 2003; 333(3):573-85.
- 8) Coulthard SA, Howell C, Robson J, Hall AG. The relationship between thiopurine methyltransferase activity and genotype in blasts from patients with acute leukemia. *Blood* 1998; 92(8):2856-62.
- 9) Karas-Kuželicki N, Šmid A, Tamm R, Metspalu A, Mlinarič-Raščan I. From pharmacogenetics to pharmacometabolomics: SAM modulates TPMT activity. *Pharmacogenomics* 2014; 15(11):1437-49.
- 10) Misdaq M, Ziegler S, von Ahsen N, Oellerich M, Asif AR. Thiopurines induce oxidative stress in T-lymphocytes: a proteomic approach. *Mediators Inflamm* 2015;

- 2015:434825.
- 11) SPC Puri-nethol 50mg tablete (2013). Aspen PharmaTrading Limited.
[http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/345000801ABC6A76C12579C2003F5894/\\$File/s-014048.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/345000801ABC6A76C12579C2003F5894/$File/s-014048.pdf). Dostop: 29-4-2016.
 - 12) SPC Tioguanine 40 mg Tablets (2016) Aspen PharmaTrading Limited.
<https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/24687>. Dostop: 29-4-2016.
 - 13) SPC Imuran (2013) Aspen PharmaTrading Limited.
[http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/2D32AD3AFE0824A2C12579C2003F5307/\\$File/s-012907.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/2D32AD3AFE0824A2C12579C2003F5307/$File/s-012907.pdf). Dostop: 29-4-2016.
 - 14) Coulthard SA, Hall AG. Recent advances in the pharmacogenomics of thiopurine methyltransferase. *The Pharmacogenomics Journal* 2001; 1, 254–261.
 - 15) Karran P, Attard N. Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nature Reviews Cancer* 2008; 8, 24-36.
 - 16) Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, Stein CM, Carrillo M, Evans WE, Klein TE. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2011.
 - 17) Favre-Bonté S, Ranjard L, Champier L, Cournoyer B, Nazaret S. Distribution and genetic diversity of bacterial thiopurine methyltransferases in soils emitting dimethyl selenide. *Biochimie* 2006; 88(11):1573-81.
 - 18) Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA Journal* 2014; 12(10):3846
 - 19) Azad GK, Tomar RS. Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. *Mol Biol Rep* 2014; 41(8):4865-79.
 - 20) Noguchi N. Ebselen, a useful tool for understanding cellular redox biology and a promising drug candidate for use in human diseases. *Arch Biochem Biophys* 2016; 595:109-12.
 - 21) Thangamani S, Younis W, Seleem MN. Repurposing ebselen for treatment of multidrug-resistant staphylococcal infections. *Sci. Rep.* 2015; 5, 11596.
 - 22) Zhou N, Xiao H, Li TK, Nur-E-Kamal A, Liu LF. DNA damage-mediated apoptosis induced by selenium compounds. *J Biol Chem* 2003; 278(32):29532-7.
 - 23) Ramoutar RR, Brumaghim JL. Effects of inorganic selenium compounds on

- oxidative DNA damage. *J Inorg Biochem* 2007; 101(7):1028-35.
- 24) Battin EE, Perron NR, Brumaghim JL. The central role of metal coordination in selenium antioxidant activity. *Inorg Chem* 2006; 45(2):499-501.
- 25) Ogra Y, Anan Y. Selenometabolomics explored by speciation. *Biol Pharm Bull* 2012; 35(11):1863-9.
- 26) Weekley CM, Harris HH. Which form is that? The importance of selenium speciation and metabolism in the prevention and treatment of disease. *Chem Soc Rev* 2013; 42(23):8870-94.
- 27) Bermingham E, Hesketh J, Sinclair B, Koolaard J, Roy N. Selenium-Enriched Foods Are More Effective At Increasing Glutathione Peroxidase (Gpx) Activity Compared With Selenomethionine: A Meta-Analysis. *Nutrients* 2014; 4002-4031.
- 28) Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 1996; 10(4): 471-480
- 29) Mlinaric-Rascan I, Milek M, Smid A, Karas Kuzelicki N. S-Adenosylmethionine: A Novel Factor in the Individualization of Thiopurine Therapy. *Clinical Applications of Pharmacogenetics* 2012.
- 30) Hasegawa T, Mihara M, Nakamuro K, Sayato Y. Mechanisms of selenium methylation and toxicity in mice treated with selenocystine. *Arch Toxicol* 1996; 71(1-2):31-8.
- 31) Dausch JG, Fullerton FR. Increased levels of S-adenosylmethionine in the livers of rats fed various forms of selenium. *Nutr Cancer* 1993; 20(1):31-9.
- 32) Deininger M, Szumlanski CL, Otterness DM, Van Loon J, Ferber W, Weinshilboum RM. Purine substrates for human thiopurine methyltransferase. *Biochem Pharmacol* 1994; 48(11):2135-8.
- 33) Krynetski E, Evans WE. Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene* 2003; 22(47):7403-13.
- 34) Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281-97.
- 35) Batkai S, Thum T. Analytical approaches in microRNA therapeutics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014; 964:146-52.
- 36) Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol* 2016; 231(1):25-30.
- 37) Simonson B, Das S. MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet Mini Rev

- Med Chem 2015; 15(6):467-74.
- 38) Masotti A, Caputo V, Da Sacco L, Pizzuti A, Dallapiccola B, Bottazzo GF. Quantification of Small Non-Coding RNAs Allows an Accurate Comparison of miRNA Expression Profiles. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009.
 - 39) Ludwig N, Leidinger P, Becker K, Backes C, Fehlmann T, Pallasch C, Rheinheimer S, Meder B, Stähler C, Meese E, Keller A. Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(8):3865-77.
 - 40) Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:D109-11.
 - 41) Goodall EF, Heath PR, Bandmann O, Shaw JK. Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 2013.
 - 42) Svoboda P. A toolbox for miRNA analysis. *FEBS Lett* 2015; 589(14):1694-701.
 - 43) King MW. <http://themedicalbiochemistrypage.org/gene-regulation.php> 1996–2016 themedicalbiochemistrypage.org. Zadnja posodobitev: 28. januar 2016. (17.02.2016)
 - 44) Mohr AM, Mott JL. Overview of MicroRNA Biology. *Semin Liver Dis* 2015; 35:3–11.
 - 45) Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2):215–233.
 - 46) Landgraf P, Rusu M, Sheridan R. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007; 129(7):1401–1414
 - 47) Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403(6772):901–906
 - 48) Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007; 318(5858):1931–1934
 - 49) Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(5):1608–1613
 - 50) Zhang D, Lee H, Cao Y, Dela Cruz CS, Jin Y. MiR-185 mediates lung epithelial cell death after oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016.
 - 51) Jing R, Chen W, Wang H, Ju S, Cong H, Sun B, Jin Q, Chu S, Xu L, Cui M. Plasma miR-185 is decreased in patients with esophageal squamous cell carcinoma and might suppress tumor migration and invasion by targeting RAGE. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 309(9):G719-29.

- 52) Goudarzi PK, Taheriazam A, Asghari S, Jamshidi M, Shakeri M, Yahaghi E, Mirghasemi A. Downregulation of miR-185 and upregulation of miR-218 expression may be potential diagnostic and prognostic biomarkers of human chondrosarcoma. *Tumour Biol* 2015.
- 53) Tang H, Liu Q, Liu X, Ye F, Xie X, Xie X, Wu M. Plasma miR-185 as a predictive biomarker for prognosis of malignant glioma. *J Cancer Res Ther* 2015;11(3):630-4.
- 54) Tan Z, Jiang H, Wu Y, Xie L, Dai W, Tang H, Tang S. miR-185 is an independent prognosis factor and suppresses tumor metastasis in gastric cancer. *Mol Cell Biochem* 2014; 386(1-2):223-31.
- 55) Yang M, Liu W, Pellicane C, Sahyoun C, Joseph BK, Gallo-Ebert C, Donigan M, Pandya D, Giordano C, Bata A, Nickels JT Jr. Identification of miR-185 as a regulator of de novo cholesterol biosynthesis and low density lipoprotein uptake. *J Lipid Res* 2014; 55(2):226-38.
- 56) Wang R, Tian S, Wang HB, Chu DP, Cao JL, Xia HF, Ma X. MiR-185 is involved in human breast carcinogenesis by targeting Vegfa. *FEBS Lett* 2014; 588(23):4438-47.
- 57) Maciel-Dominguez A, Swan D, Ford D, Hesketh J. Selenium alters miRNA profile in an intestinal cell line: evidence that miR-185 regulates expression of GPX2 and SEPSH2. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57(12):2195-205.
- 58) Meloche J, Le Guen M, Potus F, Vinck J, Ranchoux B, Johnson I, Antigny F, Tremblay E, Breuils-Bonnet S, Perros F, Provencher S, Bonnet S. miR-223 reverses experimental pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; 309(6):C363-72.
- 59) Eto K, Iwatsuki M, Watanabe M, Ishimoto T, Ida S, Imamura Y, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H. The sensitivity of gastric cancer to trastuzumab is regulated by the miR-223/FBXW7 pathway. *Int J Cancer* 2015; 136(7):1537-45.
- 60) Nishi H, Fisher EA. Cholesterol homeostasis regulation by miR-223: basic science mechanisms and translational implications. *Circ Res* 2015; 116(7):1112-4.
- 61) Li ZW, Yang YM, Du LT, Dong Z, Wang LL, Zhang X, Zhou XJ, Zheng GX, Qu AL, Wang CX. Overexpression of miR-223 correlates with tumor metastasis and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Med Oncol* 2014; 31(11):256.
- 62) Su JL, Chen PS, Johansson G, Kuo ML. Function and regulation of let-7 family

- microRNAs. *Microna* 2012; 1(1):34-9.
- 63) Xu C1, Sun X, Qin S, Wang H, Zheng Z, Xu S, Luo G, Liu P, Liu J, Du N, Zhang Y, Liu D, Ren H. Let-7a regulates mammosphere formation capacity through Ras/NF- κ B and Ras/MAPK/ERK pathway in breast cancer stem cells. *Cell Cycle* 2015; 14(11):1686-97.
- 64) Dai Y, Wang D, Tian X, Zhang L, Sui C, Meng F, Jiang S, Liu Y, Jiang Y. Insights into the application of let-7 family as promising biomarker in cancer screening. *Tumour Biol* 2015; 36(7):5233-9.
- 65) Serguienko A, Grad I, Wennerström AB, Meza-Zepeda LA, Thiede B, Stratford EW, Myklebost O, Munthe E. Metabolic reprogramming of metastatic breast cancer and melanoma by let-7a microRNA. *Oncotarget* 2015; 6(4):2451-65.
- 66) Bao MH, Feng X, Zhang YW, Lou XY, Cheng Y, Zhou HH. Let-7 in cardiovascular diseases, heart development and cardiovascular differentiation from stem cells. *Int J Mol Sci* 2013; 14(11):23086-102.
- 67) Shyh-Chang N, Locasale JW, Lyssiotis CA, Zheng Y, Teo RY, Ratanasirintra-woot S, Zhang J, Onder T, Unternaehrer JJ, Zhu H, Asara JM, Daley GQ, Cantley LC. Influence Of Threonine Metabolism On S-Adenosylmethionine And Histone Methylation. *Science* 2012; 222-226.
- 68) Nguyen LH, Zhu H. Lin28 And Let-7 In Cell Metabolism And Cancer. *Translational Pediatrics* 4.1 2015; 4.
- 69) Schaefer A, Jung M, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Erbersdobler A, Jung K. Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. *Exp Mol Med* 2010; 42(11): 749–758.
- 70) Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Research* 2015; D146-152.
- 71) Wang X. Improving microRNA target prediction by modeling with unambiguously identified microRNA-target pairs from CLIP-Ligation studies. *Bioinformatics* 2016.
- 72) Promega: CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS). https://worldwide.promega.com/products/cell-health-and-metabolism/cell-viability-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/ . Dostop: 26-6-2016.
- 73) Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and Ionic Strength on

- the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques* 1997; 22:474-481.
- 74) Chou CH, Chang NW, Shrestha S, Hsu SD, Lin YL, Lee WH, Yang CD, Hong HC, Wei TY, Tu SJ, Tsai TR, Ho SY, Jian TY, Wu HY, Chen PR, Lin NC, Huang HT, Yang TL, Pai CY, Tai CS, Chen WL, Huang CY, Liu CC, Weng SL, Liao KW, Hsu WL, Huang HD. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic acids research* 2016.
- 75) Hardikar AA, Farr RJ, Joglekar MV. Circulating microRNAs: Understanding the Limits for Quantitative Measurement by Real-Time PCR. *J Am Heart Assoc* 2014; 3(1): e000792.
- 76) Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, Filippidis C, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG., DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:169-73.
- 77) Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I, Hatzigeorgiou AG., Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* 2012.
- 78) Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos I, Anastasopoulos IL, Maniou S, Karathanou K, Kalfakakou D, Fevgas A, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucl Acids Res* 2014
- 79) Elefant N, Berger A, Shein H, Hofree M, Margalit H, Altuvia Y. RepTar: a database of predicted cellular targets of host and viral miRNAs. *Nucl Acids Res* 2010.
- 80) Miranda, KC. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006; 126, 1203-1217.
- 81) Agarwal V, Bell GW, Nam J, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 2015; 4:e05005.