

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LEA JEŠE

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LEA JEŠE

**OCENA POVEZANOSTI KONCENTRACIJE IZBRANIH mikro RNA V  
PLAZMI S KAZALCI TVEGANJA ZA RAZVOJ OSTEOPOROZE**

**ASSESSMENT OF ASSOCIATION BETWEEN SELECTED PLASMA micro RNAs  
CONCENTRATIONS AND OSTEOPOROSIS RISK FACTORS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani, na Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Simone Mencej Bedrač, mag. farm. Raziskovalno delo je del študije, ki jo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko, dne 13.12.2005.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorici, izr. prof. dr. Barbari Ostanek, mag. farm., in somentorici, asist. dr. Simoni Mencej Bedrač, mag.farm., za vodenje in pomoč pri eksperimentalnem delu ter pri pisanju magistrske naloge.

Zahvala gre tudi družini in fantu Matjažu za vso podporo, razumevanje, spodbujanje in potrpežljivost tekom študija. Posebna zahvala pa gre Urški J., Urški B., Kaji, Diani in Sari za vso pomoč in sodelovanje tekom študija.

Hvala vsem!

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Simone Mencej Bedrač, mag.farm.

Lea Ješe

# VSEBINA

KAZALO SLIK, PREGLEDNIC IN ENAČB .....	IV
POVZETEK .....	V
ABSTRACT .....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VII
1. UVOD .....	1
1.1 OPREDELITEV mikro RNA .....	1
1.2 BIOGENEZA mikro RNA .....	1
1.3 IZVENCELIČNA mikro RNA .....	3
1.3.1 Izvencelični vezikli (eksosomi, mikrovezikli in apoptotična telesca) .....	4
1.3.2 RNA-vezujoči proteini .....	4
1.3.3 Lipoproteinski kompleksi .....	5
1.4 IZVENCELIČNE mikro RNA IN MEDCELIČNA KOMUNIKACIJA .....	6
1.4.1 Mikro RNA kot mediator v medcelični komunikaciji .....	6
1.4.2 Ali mikro RNA in vivo res lahko deluje kot hormon? .....	10
1.5 PODROČJA UPORABE mikro RNA .....	10
1.5.1 Izvencelične mikro RNA kot biološki označevalec .....	10
1.5.2 Mikro RNA kot terapevtske tarče .....	11
1.5.3 Mikro RNA pri zdravljenju osteoporoze .....	11
1.6 DEFINICIJA OSTEOPOROZE .....	12
1.7 DIAGNOZA IN PRIČETEK ZDRAVLJENJA OSTEOPOROZE .....	12
1.8 VLOGA mikro RNA V KOSTNI PRESNOVI in OSTEOPOROZI .....	13
1.9 POTENCIALNA BIOLOŠKA VLOGA mikro RNA 574, 30d, 30e, 126, 148, 199 V KOSTNI PRESNOVI .....	14
2. NAMEN DELA .....	16
3. METODE IN MATERIALI .....	17
3.1 SPLOŠNA DOLOČILA .....	17
3.2 OPIS PREISKOVANK .....	17
3.3 REAGENTI, APERATURE IN DELOVNI PRIBOR .....	18
3.4 IZOLACIJA mikro RNA IZ PLAZME PREISKOVANK .....	20
3.5 SPEKTROFOTOMETRIČNA DOLOČITEV KOLIČINE IN ČISTOČE PLAZEMSKA RNA .....	22
3.6 PREPIS mikro RNA IZ PLAZME PREISKOVANK V KOMPLEMENTARNO DNA ...	22

3.7	KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU: MERJENJE KOLIČINE IZBRANIH mikro RNA V PLAZMI PREISKOVANK.....	24
3.8	KVANTIFIKACIJA mikro RNA.....	27
3.8.1	IZBOR ENDOGENIH REFERENČNIH GENOV .....	27
3.8.2	DOLOČITEV UČINKOVITOSTI PODMNOŽEVANJA mikro RNA S PROGRAMOM LinReg PCR .....	28
3.8.3	NORMALIZACIJA KOLIČINE PLAZEMSKIH mikro RNA S KVANTITATIVNO PRIMERJALNO METODO .....	29
3.9	ANALIZA REZULTATOV S PROGRAMSKO OPREMO SPSS .....	30
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	32
4.1	Preučevana populacija.....	32
4.2	Izolacija in spektrofotometrično vrednotenje izolirane RNA .....	34
4.3	Merjenje količine izbranih mikro RNA .....	35
4.3.1	Merjenje količine mikro RNA s pomočjo RT-qPCR .....	35
4.3.2	Kvantifikacija, izbor endogenih referenčnih genov, normalizacija.....	37
4.4	Določitev kliničnega pomena izbranih mikro RNA.....	41
4.4.1	Razlika izražanja mikro RNA med skupinama .....	42
4.4.2	Korelacija mikro RNA s parametri tveganja za razvoj osteoporoz .....	43
4.4.3	Določitev potencialnega mehanizma delovanja mikro RNA 30d – 5p , 30e – 5p, 126-3p ter 148a-3p in opis glavnih dveh signalnih poti .....	48
5.	SKLEP.....	52
6.	LITERATURA.....	53
7.	PRILOGE.....	i
	Priloga 1: Povprečne Cq vrednost ter standardni odkloni izražanj, ki smo jih pridobili z LightCycler-jem 480. Vz so vzorci .....	i
	Priloga 2: Rezultati Normfinderja, ki so podani kot stabilnostna vrednost, kot variacija med skupina in znotraj skupine, glavni rezultat pa je podan kot najboljši gen .....	vi
	Priloga 3: Prikaz statistično pomembnih korelacij med izbranimi mikro RNA.....	vii

## KAZALO SLIK, PREGLEDNIC IN ENAČB

Slika 1: Prikaz zorenja in delovanja mikro RNA .....	3
Slika 2: Oblike izvencelične mikro RNA .....	6
Slika 3: Postopek izolacije mikro RNA .....	20
Slika 4: Princip prepisa mikro RNA v komplementarno DNA .....	23
Slika 5: Princip poteka PCR reakcije, s pomočjo katere pomnožimo komplementarno DNA .....	24
Slika 6: Prikaz dejavnikov tveganja za razvoj osteoporoze .....	32
Slika 7: Talilna analiza .....	37
Slika 8: Signalna pot RANKL/RANK/OPG .....	48
Slika 9: Vpletenost mikro RNA-148a v osteoklastogenezo .....	49
Slika 10: Signalna pot $\beta$ -katenin/WNT .....	49
Slika 11: Diferenciacija osteoklastov po signalni poti Jak-STAT in vpletenost c-Fos transkripcijskega faktorja .....	50
Slika 12: Kanonična signalna pot $\beta$ -katenin /WNT .....	50
Preglednica 1: Povzetek študij, ki so preučevale vpletenost izvenceličnih mikro RNA na pojavnost osteoporoze. ....	14
Preglednica 2: Reakcijska zmes za prepis mikro RNA v cDNA .....	23
Preglednica 3: Priprava standardov za izdelavo umeritvene krivulje. ....	26
Preglednica 4: Priprava reakcijske zmesi za PCR .....	26
Preglednica 5: Program za izvedbo PCR reakcije .....	27
Preglednica 6: Osnovne značilnosti skupine bolnic z osteoporozo (1) in kontrolne skupine zdravih preiskovank (0) .....	33
Preglednica 7: Okvirne koncentracije in čistoča iz plazme izoliranih RNA. ....	34
Preglednica 8: Vrednosti stabilnosti za posamezno mikro RNA, pridobljene z Normfinderjem .....	38
Preglednica 9: Učinkovitost pomnoževanja pridobljena s pomočjo LinReg PCR .....	38
Preglednica 10: Normalizirane povprečne Cq vrednosti za vzorce .....	39
Preglednica 11: Izražanje mikro RNA v skupini preiskovank z osteoporozo ter v kontrolni skupini. ....	42
Preglednica 12: Rezultati t-testa normalno porazdeljenih kliničnih parametrov tveganja ter rezultati Mann-Whitney U testa nenormalno porazdeljenih kliničnih parametrov tveganja .....	44
Preglednica 13: Prikaz korelacij med mikro RNA in kliničnimi osteoporoznimi parametri. ....	45
Preglednica 14: Prikaz korelacij med mikro RNA .....	47
Enačba 1: Normalizirano relativno razmerje vzorca z eksterno sintetično kontrolo in kalibratorjem. ....	29
Enačba 2: Normalizirano relativno razmerje vzorca z endogenima referenčnima genoma in kalibratorjem. ....	29

## POVZETEK

Osteoporoza je sistemska bolezen skeleta, za katero je značilna znižana mineralna kostna gostota in spremenjena mikroarhitektura kosti ter posledično zvečano tveganje za pojav nizkoenergetskih zlomov. Zdravljenje zlomov poteka zelo počasi, kar se odraža v slabši kvaliteti življenja, zlom kolka pa se v 20-30 % lahko konča s smrtjo. V zadnjem času veliko preučujejo vpletenost epigenetskih mehanizmov v različne bolezni. Enega od epigenetskih mehanizmov predstavljajo tudi mikro RNA. Mikro RNA so majhne, 19-21 nukleotidov dolge RNA molekule, ki na posttranskripcijski ravni večinoma negativno uravnavajo izražanje genov. Mikro RNA so vpletene tako v fiziološke kot tudi patofiziološke procese. Pred kratkim odkrito dejstvo, da so izvencelične mikro RNA stabilne in da je njihovo spremenjeno izražanje posledica bolezni, je doprineslo nov vidik raziskovanja, kjer se mikroRNA preučujejo kot potencialni kazalci pri številnih boleznih - rak, srčne bolezni, tumorji ... Raziskav, ki bi preučevale vpletenost mikroRNA v razvoj osteoporoze, je zelo malo. Odkritje plazemskih mikro RNA, ki bi bile povezane s kazalci tveganja za razvoj osteoporoze, bi zato predstavljalo velik napredek, saj ima trenutno diagnostično orodje kar nekaj pomanjkljivosti. S tem namenom smo želeli ugotoviti, ali obstaja spremenjeno izražanje določenih mikro RNA pri osteoporoznih pomenopavznih bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino zdravih pomenopavznih žensk, in če obstaja povezava med mikro RNA ter kliničnimi kazalci osteoporoze. Iz plazme 97 preiskovank smo izolirali mikro RNA, jih prepisali v komplementarno DNA ter izmerili izražanje mikro RNA 30d-5p, 30e-5p, 126-3p, 148a-3p, 199a-3p in 574-5p s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Količino naštetih mikro RNA smo nato normalizirali na dva načina ter uporabili relativen način prikaza rezultatov. Ugotovili smo, da je izražanje mikro RNA-148a zvišano pri preiskovankah z osteoporozo, ter da mikro RNA 30d, 30e in 126 korelirajo s kazalci tveganja za razvoj osteoporoze, pri čemer je korelacija mikro RNA s FRAX šibko pozitivna, z mineralno kostno gostoto in TBS pa šibko negativna. S pomočjo podatkovnih baz Diana TOOLS in TargetScan smo določili potencialne mehanizme delovanja naštetih mikro RNA. Mikro RNA-148a je potencialno vključena v signalno pot RANKL/RANK/OPG, mikro RNA 30d, 30e in 126 pa v diferenciacijo osteoklastov ter signalno pot WNT.

Ključne besede: mikro RNA, osteoporoza, mineralna kostna gostota, FRAX, TBS

## **ABSTRACT**

Osteoporosis is a systemic skeletal disorder characterized by reduced bone mineral density and microarchitectural deterioration of bone tissue, resulting in increased low-energy bone fragility fractures. The treatment of osteoporosis fracture is slow, causing inferior quality of life, moreover 20–30 % of hip fractures, end with death. Recently, the involvement of epigenetic mechanisms in different diseases has been implicated. MicroRNAs present one of epigenetic mechanisms. They are small, 19–21 nucleotide long RNA molecules, which mainly negatively alter gene expression at the posttranscriptional level. MicroRNAs are involved in physiological and pathophysiological processes. Recently, it was discovered that extracellular microRNAs are stable and that different diseases can change their levels, which brings a new aspect to the research. MicroRNA is now under research as a biomarker of different diseases, such as cancer, heart diseases, tumors etc., but there is lack of research investigating involvement of plasma microRNAs in osteoporosis. Discovery of microRNAs that would be connected with osteoporosis would present a huge progress in diagnosis of osteoporosis, as current diagnosis methods have many limitations. Therefore we investigated whether there is a change in selected microRNAs expression in postmenopausal women with osteoporosis compared to healthy postmenopausal women and if there is an association between microRNAs and osteoporosis clinical parameters. We isolated microRNAs from the plasma of 97 postmenopausal women, transcribed them to complementary DNA and assessed the expression of microRNAs 30d-5p, 30e-5p, 126-3p, 148a-3p, 199a-3p and 574-5p by real time polymerase chain reaction. We used relative quantification to define quantities of selected microRNAs which were normalized with two methods. We found that the expression of microRNA 148a is higher in the osteoporosis group and that microRNAs 30d, 30e and 126 are correlated with osteoporosis clinical parameters. Correlation is positive between microRNA and FRAX and negative between microRNA and BMD and TBS. We also predicted the mechanism of action of microRNAs with databases TargetScan and Diana TOOLS. MicroRNA 148a could be involved in RANKL/RANK/OPG signaling pathway and microRNA 30d, 30e and 126 in osteoclast differentiation and WNT signaling pathway.

Key words: microRNA, osteoporosis, bone mineral density, FRAX, TBS



## SEZNAM OKRAJŠAV

AGO	protein iz družine argonavtov
cDNA	komplementarna DNA
Cq	kvantifikacijski cikel
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DXA	dvoenergijska rentgenska absorpciometrija
FRAX	orodje za izračun ocene tveganja za osteoporozni zlom (Fracture Risk Assessment Tool)
ITM	indeks telesne mase
LM	leta mene
miRNA	mikro RNA
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RANK	receptor, ki aktivira jedrni dejavnik $\kappa$ B
RANKL	ligand receptorja RANK
RISC	z RNA inducirani utiševalni kompleks
RUNX2	z Runt povezan transkripcijski dejavnik 2
Spike-in	eksogena sintetična kontrola
T	vrednost, opredeljena kot število enot, imenovanih standardna deviacija, s katero opredelimo zvišano/znižano vrednost MKG glede na povprečje
TBS	kazalec kvalitete kostnih trabekul
TM	telesna masa
TV	telesna višina

# 1. UVOD

## 1.1 OPREDELITEV mikro RNA

Termin mikro RNA (miRNA) je bil prvič uporabljen leta 2001 v članku Glimpses of a tiny RNA world (1), njeno odkritje pa sega v leto 1993, ko je bila iz okroglih črvov *C.elegans* naključno izolirana prva *lin-4* miRNA. MiRNA predstavljajo eno od podskupin nekodirajočih RNA. So evlucijsko ohranjene, kratke, enoverižne, endogene RNA molekule, dolge med 19 in 21 nukleotidov. Njihove tarčne molekule so mRNA in miRNA, večinoma kot negativni regulatorji na posttranskripcijski ravni, ki vplivajo na izražanje genov (2-4). Ta fenomen imenujemo RNA interferenca in je prisotna pri različnih vrstah, tudi pri sesalcih (5).

MiRNA predstavljajo največjo skupino regulatornih genov in vplivajo na izražanje več kot polovice protein-kodirajočih genov. Vključene so v uravnavanje večine fizioloških procesov v evkariontih (celična proliferacija in diferenciacija, vpliv na razvoj, celična smrt ...), njihovo spremenjeno izražanje pa lahko vodi v patofiziološko stanje organizma (2, 3, 6, 7).

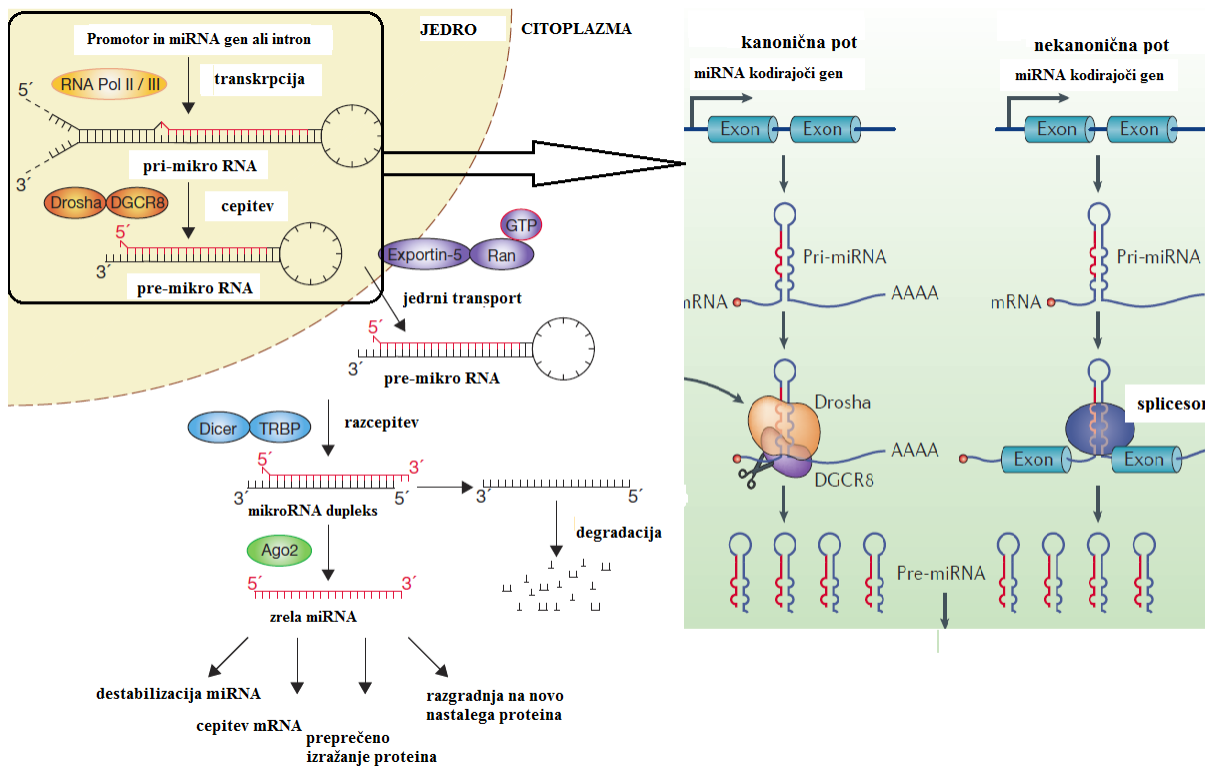
## 1.2 BIOGENEZA mikro RNA

Sinteza miRNA (slika 1) se prične v jedru celice s prepisom genov za miRNA, ki v večini primerov poteka s pomočjo encima RNA polimeraze II, včasih pa tudi z RNA polimerazo III. Tvori se pri-miRNA (primarna miRNA), ki je dolga več kot 1000 nukleotidov. Pri-miRNA zaradi delne komplementarnosti baz tvori sekundarno strukturo v obliki stebelne zanke (33-35 baznih parov dolgo steblo, terminalna nesparjena zanka ter na 5' in 3' koncu enoverižna RNA odseka, ki se končata s 7-metilgvanozinsko kapo in poliA repom). Naslednji korak zorenja v večini primerov poteka po glavni kanonični poti, in sicer sledi znotraj-jedrna cepitev pri-miRNA s pomočjo mikroprocesorskega kompleksa, ki ga sestavljata encim RNaza III, imenovan Droscha, ter esencialni kofaktor DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene) ali Pasha. DGCR8 ima funkcijo vezave dvoverižnih RNA, in DGCR8 tako prepozna lasnično strukturo pri-miRNA (steblo in nesparjene konce) ter usmeri Droscha RNAazo III endonukleazo tako, da cepi približno 11 baznih parov od začetka stebila. Nastane okoli 70 nukleotidov dolga lasnična struktura, imenovana pre-miRNA (prekurzorska miRNA) z značilnim dvonukleotidnim podaljškom na 3' koncu (3, 5, 6, 8).

1 % miRNA pa nastane po alternativni, nekanonični poti, ki poteka neodvisno od z Drosho posredovanega procesa. Pre-miRNA nastane s pomočjo splicesoma (izrezovalno-povezovalni kompleks), ki povzroči izrezovanje pri- miRNA in nastanek pre-miRNA (2). Po končanem jedrnem zorenju se pre-miRNA prenese v citoplazmo s pomočjo kompleksa med jedrnim membranskim proteinom Eksportinom 5 in GTP vezujočim jedrnim proteinom Ran-GTP, ki tvorita jedrno poro. Eksportin prepozna dvonukleotidni podaljšek ter dolžino pre-miRNA in tako s pomočjo Ran-GTP omogoči aktivni prenos pre-miRNA iz jedra v citoplazmo (6).

V citoplazmi drugi encim RNaza III, imenovan Dicer, cepi blizu terminalne zanke pre-miRNA in nastane približno 22 baznih parov dolg miRNA-dupleks. MiRNA-dupleks je sestavljen iz funkcionalne RNA verige, ki ima 5' segment manj ohlapno parjen, in predstavlja termodinamsko ugodnejšo strukturo - ter delno komplementarne spremljevalne verige. Funkcionalna veriga se poveže z večdomenskimi proteini iz družine argonavtov (AGO) v aktiven RISC kompleks (RNA induced silencing complex), medtem ko se spremljevalna veriga razgradi s pomočjo celičnih nukleaz. Funkcija miRNA v RISC kompleksu je prepoznavna in vezava na tarčno mRNA. MiRNA se preko 2-8 nukleotidov dolge regije na 5' koncu bazno pari s 3'-neprevedljivo regijo (3'UTRs) mRNA. AGO protein pa ima katalitično aktivnost. RISC lahko preko različnih mehanizmov prepreči izražanje mRNA. Pri sesalcih je destabilizacija mRNA (odstranitev 5'kape ali poliA repa) glavni mehanizem delovanja miRNA. Drugi mehanizmi pa so še preprečeno izražanje proteina z upočasnitvijo oziroma zaustavitvijo ribosomov, razgradnja na novo nastalega proteina, v primeru popolne komplementarnosti med miRNA in mRNA pa je mogoč mehanizem tudi cepitev mRNA (6, 9).

Posebnost miRNA je, da lahko ena miRNA molekula vpliva na izražanje več različnih mRNA, vsaka mRNA je lahko tudi uravnavana z večimi miRNA (9).



**Slika 1: Prikaz zorenja in delovanja mikro RNA. Prirejeno po (8) in (5).**

Več kot polovica miRNA genov se nahaja v intronih protein kodirajočih genov. Nemajhno število genov pa predstavljajo neodvisne transkripcijske regije (9). Točne lokacije promotorjev miRNA še niso znane, vemo pa, da si več kot polovica miRNA delijo promotorje skupaj z genom za protein in se zato sočasno izražajo, lahko pa imajo tudi lastne promotorje. Pomembno pa je tudi dejstvo, da ima isti miRNA gen običajno več mest, kjer se lahko začne transkripcija (6, 9).

Prikazan je proces linearne kanonične poti, ki v jedru vključuje tvorbo primarne miRNA z encimom RNA polimeraza in cepitev pre-miRNA s pomočjo mikroprocesorskega kompleksa Drosha in DGCR8. Nastala pre-miRNA se nato s pomočjo Exportin-5-Ran-GTP prenese iz jedra v citoplazmo. V citoplazmi poteka cepitev pre-miRNA s katalitično aktivnim proteinom Dicer in nastane miRNA dupleks. Spremljevalna veriga se razgradi, funkcionalna veriga miRNA pa se poveže z AGO proteini v RISC kompleks, ta pa povzroči utišanje tarčne mRNA po mehanizmu destabilizacije mRNA, zaviranja izražanja proteina, razgradnja na novo nastalega proteina ter cepitev mRNA (8, 10).

Zorenje miRNA po nekanonični poti poteka s pomočjo splicesoma (8).

### 1.3 IZVENCELICNA mikro RNA

Večinoma miRNA najdemo znotraj celic, leta 2009 pa so odkrili, da se precejšnje število miRNA nahaja tudi v vseh bioloških tekočinah – plazma, urin, solze, slina, materino mleko ... Zanimivo je dejstvo, da so miRNA v primerjavi z ostalimi vrstami RNA molekul (npr. mRNA, tRNA) dokaj stabilne in se ne razgradijo, ko pridejo v stik z nukleazno bogatim izvenceličnim prostorom, niti po izpostavljenosti visokim temperaturam, visokim/nizkim pH, shranjevanju na sobni temperaturi. Predlagan mehanizem zaščite je vključitev miRNA

v izvencelične vezikle, lipoproteinske komplekse ter povezava z RNA-vezujočimi proteini (11 – 13).

### **1.3.1 Izvencelični vezikli (eksosomi, mikrovezikli in apoptotična telesca)**

Izvencelični vezikli so klasificirani glede na velikost in način prehajanja iz celice, vendar so še vedno prisotne neenotnosti pri terminologiji (14). Vsem izvenceličnim veziklom je skupno, da jih obdaja fosfolipidni dvosloj.

#### Eksosomi

So majhni izvencelični vezikli s premerom/polmerom 40-120nm, ki nastanejo iz endosomov. Ti v naslednji stopnji tvorijo multivezikularna telesca, ta pa se nato s procesom eksocitoze zlijejo s celično membrano in tako pride do sproščanja eksosomov v izvencelični prostor (12, 15). Izločajo jih lahko različne celice, sestavlja pa jih lipidni dvosloj, znotraj katerega se nahajajo različni proteini, mRNA in miRNA (11, 15).

#### Mikrovezikli

Večina celic lahko izloča tudi nekoliko večje vezikle (0,1-1  $\mu\text{m}$ ), kot so eksosomi, ki imajo podobno sestavo kot eksosomi (lipidni dvosloj, znotraj katerega se nahajajo različni proteini, miRNA in mRNA, katerih razmerje in sestava je odvisna od celic, ki jih izločajo), vendar pa imajo drugačen mehanizem nastanka in sproščanja v izvencelični prostor. Nastanejo in sproščajo se z brstenjem iz celične membrane (11, 15, 16).

#### Apoptotska telesca

So večji delci heterogenih oblik (1-5  $\mu\text{m}$ ), ki nastanejo kot koprodukt iz normalnih apoptotskih celic ali pa patološko pri rakavih celicah. Apoptotske oziroma umirajoče celice sprostijo membranske vezikle, v katerih se nahajajo naključne miRNA (miRNA niso celično specifične), vezane na AGO2, v izvencelično okolje preko brstenja celične membrane (14 – 17).

### **1.3.2 RNA-vezujoči proteini**

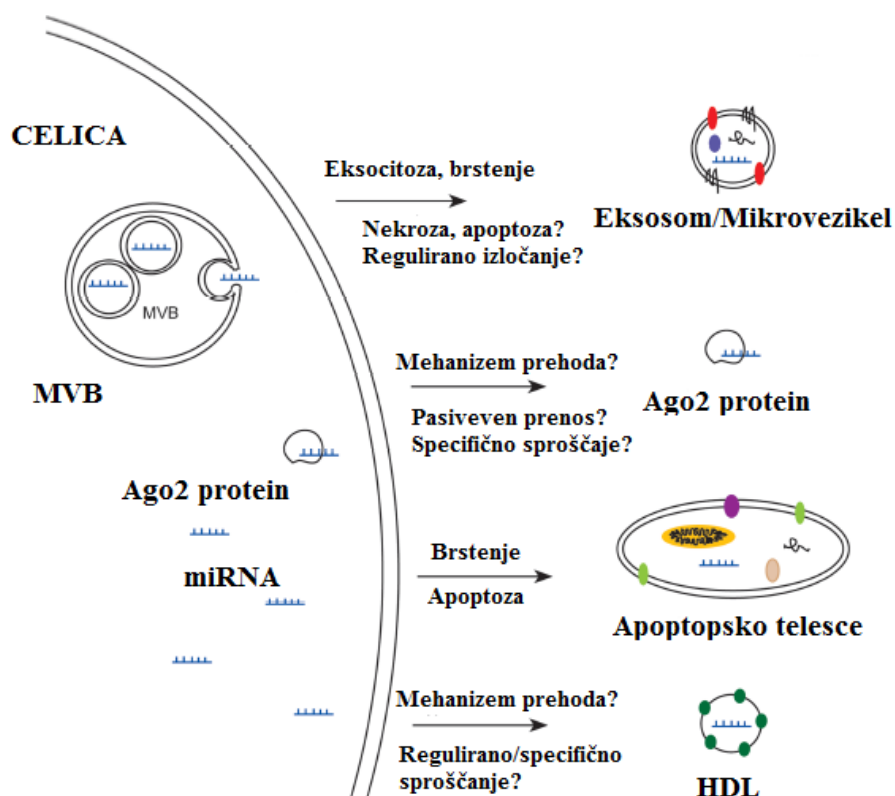
Več kot 90 % izvenceličnih miRNA je vezanih na RNA-vezujoče proteine, pri čemer jih je večina vezanih z AGO2 proteinom (redko AGO1) - protein znotrajceličnega RISC kompleksa. Ni še točno znano, kako se miRNA prenese iz celice v izvencelični prostor,

predvideva pa se, da se AGO-miRNA kompleksi pasivno prenesejo iz mrtvih ali apoptotskih celic in ostanejo v izvenceličnem prostoru zaradi velike stabilnosti AGO proteina. Obstaja pa tudi možnost, da obstajajo z membrano povezani kanalčki ali receptorji, ki omogočijo specifično sproščanje AGO-miRNA kompleksa (12).

*In vitro* (ne pa tudi *in vivo*) so potrdili, da se sintetična miRNA lahko poveže tudi z jedrnim fosfoproteinom nukleofosfinom 1 in tako prepreči razgradnjo z RNazo (18). NPM1 protein je vključen tudi v prenos RNA molekul in ribosomov iz jedra v citoplazmo ter tako vpliva na stabilnost miRNA (12).

### **1.3.3 Lipoproteinski kompleksi**

MiRNA se lahko prenaša po krvnem obtoku tudi vezana na HDL (high-density lipoprotein), redko LDL (low-density lipoprotein) (19). HDL delci so veliki med 8 in 12 nm. Predvidevamo, da se HDL v krvi preko divalentnega kationskega mostu lipidne komponente fosfatodiholina veže z miRNA v stabilen kompleks (12). Pomanjkljivost te hipoteze pa je, da bi v tem primeru v krvi morala obstajati tudi prosta miRNA, ki pa ni zaščitena pred RNazno aktivnostjo. Poleg tega miRNA v citoplazmi rajši tvorijo kompleks z AGO proteini kot s HDL, zato se postavlja vprašanje, kje in kdaj se sploh tvori kompleks HDL-miRNA (17).



**Slika 2: Oblike izvencelične mikro RNA. Prirejeno po (14).**

Eksosomi / mikrovezikli, apoptotska telesca, miRNA vezana na HDL in miRNA vezana na AGO2 protein ter predpostavljani načini sproščanja iz celice v izvencelični prostor.

#### **1.4 IZVENCELIČNE mikro RNA IN MEDCELIČNA KOMUNIKACIJA**

Za večcelične organizme je značilno, da so v evoluciji razvili različne mehanizme komunikacije - Celice lahko med seboj komunicirajo preko različnih vrst celičnih stikov (testni stik, povezovanje s filamentmi, presledkovni stik, kemične sinapse) ter preko krožečih telesnih tekočin. Kri prenaša številne biomolekule: hranila, hormone, peptide ter molekule, ki jih izločajo celice z namenom izvajanja različnih bioloških funkcij (18). Funkcija izvencelične miRNA pa še vedno ostaja neznana. Razvili so dve nasprotujoči si teoriji, ki sta podprti s številnimi dokazi. Prva zagovarja dejstvo, da je miRNA nespecifičen koprodukt celične aktivnosti in celične smrti. Druga teorija pa zagovarja dejstvo, da miRNA predstavljajo ključni medcelični mediator tako v fizioloških kot patoloških procesih (11, 20).

##### **1.4.1 Mikro RNA kot mediator v medcelični komunikaciji**

Dokazano je, da koncentracija miRNA v krvi močno naraste v primeru prizadetosti organa, kar je primer miRNA kot nespecifičnega produkta (11). Vendar pa bi lahko umirajoče

celice na tak način tudi komunicirale s sosednjimi celicami in opozarjale organizem o disfunkciji celic (14).

### **Komunikacija preko mikroveziklov in eksosomov**

Zaradi podobne velikosti eksosomov in mikroveziklov, ki jih z ultracentrifugo znanstveniki niso uspeli ločiti, zato se v večini raziskav uporablja izraz eksosomske miRNA, vendar ta izraz označuje miRNA, ki izhajajo iz eksosomov in mikroveziklov (11). Eksosomi imajo številne celično specifične vloge, ki jih pripisujejo predvsem proteinom na njihovi površini. Vpletenost eksosomske RNA v biološke procese *in vivo* pa ostaja vprašljiva kljub številnim raziskavam na celicah, ki so potrdile vpliv eksosomskih miRNA na izražanje genov prejemnih celic (11). Ekstrom s sod. je dokazal, da eksosomi lahko sodelujejo v komunikaciji med osteoblasti in osteoklasti. Iz človeških monocitov so po stimulaciji z lipopolisaharidom izolirali eksosome in jih dodali mezenhimskim zarodnim celicam. Poleg privzema mikroveziklov v celice so dokazali tudi povečano izražanje RUNX2 in BMP-2, kar dokazuje parakrino vlogo monocitnih eksosomov kot stimulatorjev osteogeneze, oziroma kostne regeneracije (21). Collino in sod. so inkubirali MSC in tubularne endotelijske celice ter tako prvi dokazali, da MSC izločajo eksosome, za katere je značilen specifičen profil miRNA. MiRNA znotraj eksosomov vplivajo na mRNA tarčne gene v tubularnih endotelijskih celicah, kar se odraža v znižanem izražanju proteinov (PTEN, ciklin D1, Bcl2) in posledično spremenjeni funkciji (11, 21, 22). Chen s sod. je dokazal, da MSC izločajo eksosome, ki vsebujejo pri-miRNA, ki niso bile povezane z AGO2 ali Dicer proteinom. Pri-miRNA pa se lahko povežejo v RISC kompleks v oddaljenih celicah in na tak način povzročijo odziv (12). Li s sod., 2012 pa je odkril, da se miRNA-AGO kompleks nahaja tudi znotraj mikroveziklov, zato so raziskovalci postavili hipotezo, da se lahko AGO2-miRNA skupaj z drugimi miRNA vključijo v eksosome in se nato po krvi prenesejo do prejemniških celic, kjer AGO2-miRNA lahko vplivajo na gensko izražanje celic, miRNA, ki pa niso vezane v kompleksu, pa se razgradijo in nimajo učinka (17, 22). Ugotovili so tudi, da se nekatere miRNA lahko nahajajo v eksosomih v višjih ali nižjih koncentracijah kot v izvorni celici, kar kaže, da miRNA niso naključno izločeni odpadni produkt celic. Mehanizem, ki določa selektivno prehajanje miRNA v eksosome še ni znan, čeprav ne moremo izključiti možnosti, da prehajanje miRNA v eksosome predstavlja mehanizem zaščite miRNA pred razgradnjo v celici in ni posledica specifičnega razvrščanja (14). Istočasno pa so znanstveniki tudi dokazali, da je sproščanje



eksosomske miRNA odvisno od encima nSMase (neutralna spingomielinaza), ki je vpleten v biosintezo ceramida – nSMase, saj povzroči hidrolizo spingomielina in tvori se ceramid, ta pa sodeluje v od ceramida odvisnih izločevalnih poteh. Ceramid je nujen pri tvorbi multivezikularnih veziklov. Povečana količina nSMase se odraža v povečani količini izvencelične miRNA, zaviranje nSMase pa povzroči zmanjšano izločanje eksosomov in miRNA, pri čemer pa ne vpliva na izražanje znotrajcelične miRNA. Še vedno pa ostaja neznanka, kakšen je način vgrajevanja miRNA v eksosome. Glede prenosa eksosomske miRNA v tarčne celice obstaja teorija, ki specifično delovanje eksosomov na tarčne celice pripisuje proteinom na eksosomih, ki prepoznajo receptorje na tarčni celici, domneven mehanizem privzema eksosomov je zlitje z membrano ali endocitoza, kar miRNA omogoča prehod v prejemniške celice in tako možnost sodelovanja v medcelični komunikaciji (11). Zanimivo pa je tudi dejstvo, da se profil miRNA, vezanih z izvenceličnimi vezikli, razlikuje od profila miRNA, ki se nahaja v kompleksu z AGO2 proteini ali pa z HDL, kar bi tudi lahko odražalo celično specifično delovanje izvenceličnih miRNA (12).

To je le nekaj od številnih primerov, ki potrjujejo vpletenost eksosomske miRNA v medcelično komunikacijo (11), kljub temu pa primanjkuje dokazi, ki bi lahko dokončno potrdili to hipotezo. Vprašljivo je, do kakšne mere lahko miRNA znotraj eksosomov *in vivo* vplivajo na izražanje, saj se večina izvencelične miRNA nahaja vezanih v proteinski kompleks in ne znotraj eksosomov (17).

### **Komunikacija preko apoptotskih telesc**

MiRNA v apoptotskih telescih predstavljajo koprodukt apoptoze in se neodvisno od celičnega tipa naključno razporejajo v apoptotska telesca, kar je tudi glavna razlika, ki jih loči od eksosomov in mikroveziklov (17). Z dokazi je podrt tudi možnost sodelovanja miRNA iz apoptotskih telesc v medcelični komunikaciji. Zernecke s sod. (2009) so dokazali, da apoptotska telesca lahko zavirajo napredovanje ateroskleroze preko miRNA-126. Protektivni efekt pripisujejo prenosu miRNA-126 iz apoptotskih telesc v prejemniške endotelijske celice, kjer zmanjšajo izražanje kemokina CXCL12 (15).

### **Komunikacija preko delcev HDL**

Hipotezo o sodelovanju HDL delcev v medcelični komunikaciji potrjuje raziskava, kjer so primerjali HDL pacientov s hiperholesterolemijo ter HDL zdravih oseb. Ugotovili so, da se

sestava in količina miRNA, vezanih na HDL, v obeh skupinah razlikuje ter da imajo drugačen vpliv na izražanje miRNA-105 v hepatocitih (12). Zvišano izražanje miRNA-105 v hepatocitih ob inkubaciji z miRNA-HDL bolnikov povzroči znižano izražanje tarčnih mRNA znotraj jetrnih celic, na katere deluje miRNA-105.

Dokazano je bilo tudi, da HDL lahko prenese miRNA do SRBI receptorjev v ledvicah in jetrih hrčkov. Celični SRBI receptorji vežejo HDL in omogočijo prehod holesterilestra ter miRNA v celico (11, 19). Vendar, ko so preučevali miRNA vezane na HDL, so ugotovili, da so miRNA bile dolge povprečno 22 nukleotidov, kar pomeni, da so zrele miRNA in da niso bile povezane z AGO proteinom. Zrele miRNA pa najverjetneje ne morejo povzročiti biološkega odziva, saj se le pre-miRNA, in ne zrele miRNA, lahko povežejo v RISC kompleks v oddaljenih celicah. Zato obstaja velika neznanka, kako lahko sploh miRNA, vezane na HDL, vplivajo na gensko izražanje (12).

Poleg tega so tudi ugotovili, da je miRNA-223 najbolj zastopana miRNA, ki se nahaja v kompleksu s HDL, vendar to predstavlja vseeno le 8 % glede na izvencelične miRNA (11). Našteta dejstva ne izključujejo vključenost HDL v medcelično komunikacijo, vendar pa verjetno tudi ne predstavljajo enega izmed glavnih mehanizmov regulacije (11, 19).

### **Komunikacija preko proteinov**

Kljub temu, da miRNA-AGO kompleks predstavlja najbolj zastopano obliko izvencelične miRNA, se je vseeno večina raziskovalcev osredotočilo na eksosome in mikrovezikle kot miRNA prenašalce (17, 23).

Teorijo, ki zagovarja vlogo miRNA-AGO v medcelični komunikaciji, podpira dejstvo, da imajo *C. elegans* proteinske transmembranske kanalčke SID-1, ki omogočajo prevzem dvoverižnih RNA in sintetičnih miRNA predhodnikov. Tudi pri sesalcih obstaja homolog SID proteina, vendar še ostaja nejasno, če lahko poteka prevzem miRNA-AGO kompleksa preko teh receptorjev (11).

Druga hipoteza pa zagovarja dejstvo, da je miRNA, ki je izključno povezana le z AGO proteini, nespecifičen ostanek fiziološkega delovanja celic in celične smrti. Kompleksi miRNA-AGO se pasivno sproščajo iz celic v izvencelični prostor, kjer se ne razgradijo, ker so AGO proteini v bogatem proteaznem okolju zelo stabilni in tam ostanejo tudi po tem, ko izvorna celica odmre (11).

#### **1.4.2 Ali mikro RNA in vivo res lahko deluje kot hormon?**

Kljub številnim fascinantnim primerom medcelične komunikacije preko miRNA *in vitro*, pa so *in vivo* koncentracije miRNA v bioloških tekočinah veliko nižje kot v okolici celic, zato je malo verjetno, da bi miRNA lahko delovale kot hormoni. Celotna koncentracija vseh miRNA v plazmi je znotraj 100 fM, koncentracija posamezne miRNA pa je še nižja. Hormoni, ki delujejo v najnižjih koncentracijah, pa se v krvi nahajajo v pM koncentracijah. Zaradi višjih lokalnih koncentracij izvenceličnih miRNA je verjetnejša njena parakrina vloga (11).

### **1.5 PODROČJA UPORABE mikro RNA**

Število raziskav na področju miRNA eksponentno narašča. Od leta 2005 do leta 2008 se je število objavljenih člankov povečalo za štirikrat, od leta 2005 do leta 2013 pa kar za osemnajstkrat (2). V MiRbase verzija 21 je zabeleženih že 2588 zrelih človeških miRNA, pri čemer vloga večine še ni poznana (6, 24). Dokazano pa so številne miRNA vpletene v regulatorne procese v skoraj vseh vrstah celic in tkiv v organizmu, kjer zavirajo izražanje tarčnih genov (24). Vpletenost miRNA je najbolj preučevana pri raku, kateremu so sledile študije povezanosti miRNA z vnetnimi boleznimi, virusnimi infekcijami, kardiovaskularnimi boleznimi, nevrodegenerativnimi boleznimi, osteoporozo, endometriozo, gastrointestinalnimi boleznimi, diabetesom (5, 23, 25, 26) ...

#### **1.5.1 Izvencelične mikro RNA kot biološki označevalec**

Eden glavnih izzivov je odkritje posameznih ali skupine miRNA, ki bi služile kot novi biokemični kazalci za diagnozo in spremljanje odziva na zdravljenje. Prednosti izvencelične miRNA so, da je prisotna v krvi in drugih telesnih tekočinah ter je zato njeno določanje manj invazivno. To je pomembno predvsem pri boleznih, ki prizadenejo tkiva, ki so težko dosegljiva, npr. kost. Dodatna prednost miRNA je stabilnost v plazmi pri sobni temperaturi tudi do 24 ur (12, 24). Izzivi pri uporabi izvenceličnih miRNA pa so: identificirati tisti nabor miRNA, ki najbolje odražajo patološki proces in niso podvržene vplivom drugih dejavnikov, npr. življenjskemu stilu. Prav tako pa tudi razvoj metod izolacije ter analize nizkih koncentracij, ki bodo dale zadovoljive in primerljive rezultate znotraj laboratorija in med laboratoriji (24).

V praksi se že uporablja set 64 miRNA, ki omogoča diagnosticiranje 42 različnih tumorjev (27).

### **1.5.2 Mikro RNA kot terapevtske tarče**

MiRNA predstavljajo tudi privlačno tarčo za iskanje novih zdravilnih učinkovin s ciljnim delovanjem. Osnovni princip je zaviranje povečanega izražanja določene miRNA, ali pa nadomeščanje miRNA, ki imajo nezadostno izražanje. MiRNA se veže na kratko zaporedje mRNA in ni gensko specifična, zato ena sama miRNA lahko vpliva na izražanje različnih genov ter tako regulira celotno pot, kar predstavlja privlačen način zdravljenja bolezni, v katero je vpletenih več genov, npr. rak (3). Inhibicija miRNA lahko poteka s pomočjo miRNA gob (zaporedje nukleotidov, ki vsebujejo več vezavnih mest za določeno miRNA), ki z vezavo miRNA preprečijo njeno delovanje ali s pomočjo komplementarnih oligonukleotidov, imenovanih antagomiri. Pomanjkanje določene miRNA pa se lahko nadomesti z mimiki miRNA (28).

Pomanjkljivost miRNA kot zdravilnih učinkovin pa je, da se lahko ena miRNA, poleg vezave na tarčne mRNA, veže še na druge mRNA, ali pa se lahko veže na tarčno mRNA, vendar v drugem tkivu, kjer si tega ne želimo. Ta problem pa se rešuje predvsem z uporabo različnih dostavnih sistemov z visoko stopnjo specifičnosti, ki bi omogočali ciljno delovanje le v določenem tkivu (29).

Primer uporabe miRNA kot zdravilne učinkovine najbolje prestavlja rak. Za različne rake je značilen različen profil miRNA in bi lahko z miRNA kot zdravilnimi učinkovinami dosegli specifično zdravljenje določene oblika raka ter s tem dosegli manjše neželene učinke v primerjavi s kemoterapijo. Terapija raka na osnovi miRNA je v predklinični fazi, saj obstaja še vedno problem s ciljno dostavo teh zdravilnih učinkovin.

V drugi fazi kliničnega testiranja pa je anti-miRNA-122 oligonukleotid kot potencialna zdravilna učinkovina za zdravljenje hepatitisa C (3). V predkliničnih testiranjih pa se nahajajo še miRNA, ki so vpletene v različne tipe rakov, v odpoved srca ter infarkt, inzulinsko rezistenco (5).

### **1.5.3 Mikro RNA pri zdravljenju osteoporoze**

Raziskave na živalih z uporabo anti-miRNA in miRNA mimikov nakazujejo njihov potencial pri zdravljenju osteoporoze (29). Odkrili so, da imajo miši z zvišanimi koncentracijami miRNA-34a, povečano kostno maso in manj zlomov, saj miRNA-34a deluje kot zaviralec razvoja osteoklastov in tako prepreči razgradnjo kosti. Zanimivo je tudi, da je mišja miRNA-34a identična človeški in tako predstavlja možnega kandidata za razvoj novega zdravila za zdravljenje osteoporoze (30). Količina miRNA-214 se s starostjo

povečuje in dokazano zavira osteoblastogenezo in mineralizacijo, njeni inhibitorji pa preprečijo izgubo kostne mase (29).

## **1.6 DEFINICIJA OSTEOPOROZE**

Osteoporoza je kronična, s starostjo povezana, degenerativna, progresivna, sistemska presnovna bolezen skeleta, za katero je značilna znižana mineralna kostna gostota in spremenjena mikroarhitektura kosti, kar se posledično odraža v povečani lomljivosti kosti, najpogosteje v zlomu vretenc, kolka in zapestja. Zgornja definicija svetovne zdravstvene organizacije (SZO) osteoporoze je nespecifična in ne vključuje mejnih vrednosti. V praksi se zato uporablja bolj natančna opredelitev, kjer je osteoporoza dodatno opredeljena s pomočjo mejnih vrednosti MKG (mineralne kostne gostote) in  $T^1$  vrednosti. Osteoporoza je prisotna, če je MKG izmerjena z DXA (dvoenergijska rentgenska absorpciometrija) zmanjšana za več kot 2,5 standardni deviaciji od pričakovane MKG vrednosti zdrave osebe v zgodnji odrasli dobi.

Na podlagi zgornje definicije so potekale epidemiološke študije, v katerih so ugotovili, da osteoporoza v Evropi, ZDA in na Japonskem skupno prizadene več kot 75 milijonov ljudi. Polovica vseh žensk in četrtnina vseh moških po 60. letu doživi osteoporozni zlom, 50-letna ženska ima približno 40-53 % tveganje za osteoporozni zlom, kar je primerljivo s tveganjem za pojav srčno-žilnih bolezni. Najbolj usoden je zlom kolka, kjer je smrtnost znotraj enega leta kar 30 %, tudi okrevanje po zlomu poteka počasi, kvaliteta življenja pa je slabša. Prognoza kaže, da bo do leta 2025 osteoporozni zlom doživelo kar 3 milijone ljudi, do leta 2050 pa se bo število obolelih podvojilo (31 – 33).

## **1.7 DIAGNOZA IN PRIČETEK ZDRAVLJENJA OSTEOPOROZE**

Bistvo zdravljenja osteoporoze je preprečevanje zlomov, vendar s klasično diagnozo osteoporoze, ki temelji zgolj na merjenju MKG, spregledamo velik del bolnikov, ki bodo utrpeli osteoporozni zlom. MKG je najpomembnejši posamezni dejavnik tveganja za zlom, vendar ne edini. Zato pri odločitvi za zdravljenje ni pomembna le MKG, vendar so kriteriji za pričetek zdravljenja trije:

- a) upoštevanje MKG, izražene s  $T$  vrednostjo, v kombinaciji z upoštevanjem starosti in spola

---

<sup>1</sup>  $T$  vrednost je opredeljena kot razlika med izmerjeno in pričakovano MKG pri zdravi osebi v zgodnji odrasli dobi, deljeno s SD (standarna deviacija) v populaciji.

- b) izračun visokega tveganja za zlom v nadaljnjih 10 letih s pomočjo prosto dostopnega računalniškega modela FRAX (Fracture Risk Assessment Tool). Visoko tveganje za zlom je prisotno, če je verjetnost za skupek osteoporoznih zlomov  $\geq 20\%$  ali pa verjetnost za zlom kolka  $\geq 3\%$ . Program v izračunu poleg starosti in spola upošteva tudi skupni vpliv drugih kliničnih dejavnikov tveganja, kot so predhodni osteoporozni zlom, indeks telesne mase, zlom kolka pri starših, revmatoidni artritis, kronična uporaba glukokortikoidov, pretirano uživanje alkohola, kajenje ter, če je na voljo tudi podatek o MKG vrednosti vratu stegenice (34).
- c) dokazan osteoporozni zlom<sup>2</sup>, ne glede na FRAX in MKG, lahko zadošča za diagnozo osteoporoze in pričetek njenega zdravljenja (34).

Pomanjkljivost FRAX programa je, da ni primeren za moške, mlajše od 50 let, in ženske pred menopavzo, ter da ne upošteva vseh dejavnikov tveganja – na primer ne upošteva števila in vrste zlomov ter odmerka in trajanja zdravljenja z glukokortikoidi. (34) Dodatna pomanjkljivosti z DXA metode izmerjene MKG pa je še izpostavljenost sevanju.

Zato je velika želja po odkritju novih kazalcev, ki bi samostojno ali v kombinaciji z drugimi obstoječimi kazalci pripomogli k boljši diagnostiki osteoporoze. Tak potencial ima plazemska miRNA (24).

## **1.8 VLOGA mikro RNA V KOSTNI PRESNOVI in OSTEOPOROZI**

Pri kostni prenovi imajo glavno vlogo trije tipi specifičnih celic: osteociti, osteoklasti in osteoblasti v kosteh. Za vzdrževanje homeostaze je pomembno ravnotežje med razgradnjo in tvorbo kostnega tkiva, ki je uravnavano preko različnih signalnih poti. V proces homeostaze so vključeni številni citokini, transkripcijski dejavniki, rastni dejavniki, hormoni, adipozne celice, intermedianti iz signalnih poti ... Objavljene raziskave potrjujejo tudi vpletenost miRNA v rast, diferenciacijo in delovanje kostnih celic. MiRNA je tako dokazano vpletena v vsako stopnjo tvorbe kosti in v procese vzdrževanja homeostaze kosti, kjer ima vpliv na izražanje vseh zgoraj naštetih dejavnikov, ki so vpleteni v različne signalne poti in tako pozitivno ali negativno uravnavajo osteoblastogenezo in osteoklastogenezo (35). Znano je, da deregulacija diferenciacije ostoklastov in osteoblastov, ki lahko nastanejo kot posledica z miRNA povzročene epigenetske spremembe v genskem izražanju, vodi v različne skeletne bolezni: Pagetova

---

<sup>2 2</sup> Osteoporozi zlom je zlom, ki nastane zaradi podobne ali manjše sile kot je prisotna pri padcu iz stojne višine

bolezen, osteopetroza, osteoporozna in osteoartritis (4, 24) ... Objavljenih je več kot 600 raziskav, ki preučujejo povezanost miRNA ter kosti in hrustanca (36). Zaradi obstoječih trdnih dokazov vpletenosti miRNA v osteoporozo je smiselno izvajati tovrstne študije tudi na ljudeh. Do danes je bilo objavljenih le pet študij, ki preučujejo vpletenost izvenceličnih miRNA v osteoporozo. (preglednica 1)

**Preglednica 1: Povzetek študij, ki so preučevale vpletenost izvenceličnih mikro RNA na pojavnost osteoporozne.**

<b>Avtor</b>	<b>vzorčna skupina/kontrolna skupina</b>	<b>vzorec</b>	<b>rezultati raziskave</b>
<b>Li et al (24)</b>	osteoporozne preiskovanke/osteopenične preiskovanke	plazma	Povečano izražanje miRNA-133a, zmanjšano izražanje miRNA-21-5p, nespremenjeno izražanje miRNA-146a-5p Korelacija med miRNA-21, miRNA-133a ter MKG, 146-5p ni izkazovala te korelacije
<b>Seeliger et al (26)</b>	osteoporozni preiskovanci z zlomom/osteoporozni preiskovanci brez zloma	serum	Povečano izražanje miRNA-21-5p, miRNA-23a-3p, miRNA-24-3p, miRNA-93-5p, miRNA-100-5p, miRNA-122a, miRNA-124-3p, miRNA-125b-5p in miRNA-148a-3p
<b>Weilner et al (61)</b>	pomenopavzne ženske do 14 dni po zlomu/zdrave, enako stare preiskovanke	serum	Povečano izražanje določenih serumskih miRNA-10a-5p, miRNA-10b-5p, miRNA-133b, miRNA-22-3p, miRNA-328-3p in let-7g-5p.
<b>Panach et al (69)</b>	osteoporozne preiskovanke z zlomom kolka/preiskovanke z osteoartritisom kolka	serum	Povečano izražanje miRNA-122-5p, miRNA-125b-5p, miR-21-5p
<b>Meng et al (24)</b>	pomenopavzne preiskovanke z osteoporozo/po menopavzne osteopenične preiskovanke	kri	Povečano izražanje miRNA-130b-3p, miRNA-151a-3p, miRNA-151-b, miR-194-5p, miRNA-590-5p Korelacija med miRNA-130b-3p, miRNA-151a-3p, miRNA-151-b, miRNA-194-5p in MKG

## **1.9 POTENCIALNA BIOLOŠKA VLOGA mikro RNA 574, 30d, 30e, 126, 148, 199 V KOSTNI PRESNOVI**

V nadaljnje so predstavljene miRNA, ki smo jih preučevali v okviru magistrske naloge. Opisi so pridobljeni s pomočjo pregleda člankov na Pubmedu. Kot kriterij iskanja smo izbrali celotno ime miRNA (primer: miRNA-574-5p), nato pa smo se pri pregledu člankov osredotočili predvsem na vpletenost miRNA v glavne signalne poti, ki so pomembne pri osteoporozni.

**miRNA-574-5p** – Dokazana je vpletenost miR574-5p v  $\beta$ -katenin /Wnt signalno pot. Povečano izražanje miR-574-5p zmanjša izražanje QKI proteina, kar se odraža v povečanem izražanju  $\beta$ -katenina. Inhibicija miR-574-5p tako zavira rast tumorja (37). Motnja v  $\beta$ -katenin /Wnt signalni poti vodi lahko v razvoj osteoporoze.

**miRNA-30d-5p** – Dosedanje raziskave so odkrile, da miR-30d-5p deluje kot negativni regulator diferenciacije osteoblastov v kanonični  $\beta$ -katenin/Wnt signalni poti. Povečano izražanje miR-30d zmanjša izražanje transkripcijskega faktorja Runx2 in usmeri razvoj v maščobne celice (prepreči pretvorbo zarodnih celic v osteoblaste) (38 – 40).

**miRNA-30e-5p** – Izražanje miR-30e je zelo pomemben dejavnik za vzdrževanje ravnotežja med adipociti in osteoblasti, in sicer preko inhibitornega delovanja na LRP6, ki je vpleten v kanonično  $\beta$ -katenin /Wnt signalno pot (41).

**miRNA-126-3p** – Raziskava potrjuje posredno vpletenost miR-126-3p v izražanje RANKL v mielomičnih celicah (povečano izražanje miR-126 povzroči zmanjšano izražanje DNMT1, ta pa povzroči demetilacijo promotorja RANKL in izražanje RANKL) (42). Ena glavnih signalnih poti pri osteoporozi je RANK/RANKL/OPG signalna pot, ki nadzoruje osteoklastogenezo (43).

**miRNA-148a-3p** – Odkrili so, da je miR-148a-3p bolj izražena v serumu in v vzorcih kostnega tkiva pri preiskovancih z osteoporozo v primerjavi s preiskovanci brez osteoporoze. MiR-148 spodbuja osteoklastogenezo in posledično osteoporozo posredno preko delovanja na RANKL (26).

**miRNA-199a-3p** – Dokazana je vpletenost v spermatogenezo, saj je miRNA-199a možna tarča delovanja rastnega faktorja TGF  $\beta$ 1 (44). TGF $\beta$  pa je vpleten v osteoporozo, kjer vpliva na vzdrževanje ravnotežja med osteoklasti in osteoblasti (45).



## 2. NAMEN DELA

Osteoporozna je degenerativna, s starostjo povezana bolezen, katere prevalenca se zaradi vedno daljše življenjske dobe povečuje in posledično predstavlja enega večjih zdravstvenih in ekonomskih problemov. Njena patogeneza je kompleksna in vključuje preplet genetskih, okoljskih ter epigenetskih dejavnikov, med katere uvrščamo tudi miRNA. Trenutni pristopi, ki se uporabljajo za diagnozo osteoporoze, imajo kar nekaj pomanjkljivosti, miRNA pa bi zaradi enostavne dostopnosti in svoje stabilnosti v plazmi lahko predstavljale nov, obetaven biokemični kazalec osteoporoze.

V okviru projekta na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo je bila izvedena vsegenomska analiza kostnih vzorcev bolnikov z osteoporozo in osteoartrozo z metodo Nanostring, ki je pokazala razlike v profilu izraženih miRNA. Zato smo se odločili izmeriti koncentracije v kostnem tkivu diferencialno izraženih miRNA 30d-5p, 30e-5p, 126-3p, 148a-3p, 199a-3p in 574-5p v plazmi večjega števila preiskovancev. Namen našega dela bo preučiti vlogo izbranih miRNA pri osteoporozi ter oceniti njihovo možnost uporabe kot potencialnih neinvazivnih biokemičnih kazalcev osteoporoze. V ta namen bomo:

- zbrali in združili pridobljene podatke preiskovank (krvne preiskave, MKG, vprašalniki)
- izolirali miRNA iz plazme 97 pomenopavznih preiskovank
- izvedli prepis izbranih miRNA v cDNA z metodo reverzne transkripcije
- s pomočjo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času izmerili količino izbranih miRNA
- določili učinkovitost pomnoževanja izbranih miRNA
- izbrali ustrezne endogene referenčne gene, s pomočjo katerih bomo izvedli normalizacijo količin izbranih plazemskih miRNA s kvantitativno primerjalno metodo
- z uporabo statističnih analiz preučili, ali se izražanje miRNA loči med skupino preiskovank z osteoporozo in skupino zdravih preiskovank ter ovrednotili povezanost med miRNA in izbranimi kazalci tveganja za razvoj osteoporoze, kot so: MKG, TBS in FRAX
- z uporabo prosto dostopnih programskih orodij, kot so Diana TOOLS in Targetscan, določili potencialen mehanizem delovanja tistih miRNA, ki bi bile lahko potencialni kazalec osteoporoze.

### **3. METODE IN MATERIALI**

Magistrska naloga je del študije, ki se izvaja na Kliniki za sladkorno bolezen in presnovne bolezni na Univerzitetnem kliničnem centru (UKC) v Ljubljani in na Fakulteti za farmacijo. Preiskovanke so se zavestno odločile, da bodo sodelovale v raziskavi, in s tem namenom so podpisale pristopno izjavo, pri čemer pa podatki preiskovank ostanejo tajni in se uporabijo zgolj v raziskovalne namene.

#### **3.1 SPLOŠNA DOLOČILA**

Pred samim delom smo potrebne epruvetke različnih volumnov in nastavke za pipete avtoklavirali. Pri delu smo uporabljali rokavice iz lateksa za enkratno uporabo, nosili smo zaščitno haljo. Delo smo izvajali v komori z laminarnem pretokom zraka.

Pri vseh korakih rokovanja z miRNA smo upoštevali načela protokola, ki opisuje pogoje dela brez prisotnosti RNaz. Zato smo pred delom z miRNA površino komore ter potreben pribor vedno pobrisali z RNaz-up čistilom in komoro s priborom osvetljevali z UV lučko še 20 minut. Tekom dela smo pazili na čistočo in si večkrat očistili roke z RNaz-up čistilom, z namenom, da bi se izognili kontaminaciji vzorcev in reagentov.

Pred delom s cDNA smo komoro in pribor očistili z vodikovim peroksidom ter etanolom in jo osvetljevali z UV lučko še 20 minut (46).

#### **3.2 OPIS PREISKOVANK**

Izbranim preiskovalkam smo med 8:00 in 10:00 odvzeli kri z namenom izvedbe osnovnih biokemičnih in hematoloških testov ter za analizo miRNA. Z DXA metodo smo jim izmerili MKG ter nato izračunali T vrednost, FRAX in TBS. S pomočjo vprašalnika smo ovrednotili ostale dejavnike tveganja za nastanek osteoporoze.

V študijo so bile vključene preiskovanke, ki so ustrezale naslednjim kriterijem:

- starost manj kot 70 let
- pomenopavzno obdobje
- ne prejemajo nobenih zdravil za zdravljenje osteoporoze (lahko jemljejo preventivno kalcij ali vitamin D)
- se niso v preteklosti več kot 3 mesece skupaj zdravile s sistemskimi glukokortikoidi
- nimajo znanih bolezni jeter, ledvic in endokrinih bolezni (npr. sladkorna bolezen)

### 3.3 REAGENTI, APERATURE IN DELOVNI PRIBOR

#### Reagenčni kompleti, reagenti in kemikalije

- miRNeasy Mini reagenčni komplet (Qiagen, Nizozemska)
  - QIAzol® Lysis Reagent 50 mL – reagent za lizo
  - RNase-free voda 10 mL – voda, ki ne vsebuje ribonukleaz
  - Pufer RWT 15 mL
  - Pufer RPE 11 mL
  - RNeasy mini membranske kolone, pakirane z 2 mL zbiralnimi epruvtkami (50)
  - 2 mL zbiralne epruvtke (50)
  - 1,5 mL zbiralne epruvtke (50)
  
- miScript® II RT reagenčni komplet (Qiagen, Nizozemska)
  - miScript Reverse Transcriptase Mix - zmes poli(A)polimeraze in reverzne transkriptaze 100 µL
  - miScript Nucleics Mix - zmes nukleotidov, ATP, začetni oligo-dT nukleotid, notranja sintetična RNA kontrola, s katero bi potencialno lahko ocenili potek transkripcije 200 µL
  - miScript HiSpec Buffer - pufer za selektivni prepis zrelih miRNA 400 µL
  - voda, ki ne vsebuje ribonukleaz (RNase-Free) 1,9 mL
  
- miScript SYBR Green PCR komplet – osnovna zmes za PCR
  - HotStarTaq® DNA Polymerase – termostabilna polimeraza
  - QuantiTect SYBR Green PCR Buffer - pufer
  - dNTP mix, including dUTP – mešanica nukleotidov, ki vsebujejo tudi dUTP
  - SYBR Green I - fluorescenčno barvilo
  - ROX<sup>tm</sup> passive reference dye - fluorescenčno barvilo
  - 5 mM MgCl<sub>2</sub>
  
- miScript Universal Primer – univerzalen začetni oligonukleotid
- miScript Primer Assay – specifični začetni oligonukleotidi za posamezno miRNA

Hs\_miRNA-126\_1 miScript Primer Assay, MS00003430  
Hs\_miRNA-148a\_1 miScript Primer Assay, MS00003556  
Hs\_miRNA-199a-3p\_1 miScript Primer Assay, MS00007602  
Hs\_miRNA-30d\_2 miScript Primer Assay, MS00009387  
Hs\_miRNA-30e\_1 miScript Primer Assay, MS00009401  
Hs\_miRNA-574-5p\_2 miScript Primer Assay, MS00043617  
Hs\_let-7a\_2 miScript Primer Assay, MS00031220  
Hs\_miRNA-16\_2 miScript Primer Assay, MS00031493  
Ce\_miRNA-248\_1 miScript Primer Assay, MS00019516

- pufer TrisEDTA (pH=8,0) (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Čistilo RNaz-up (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Umetni eksterni sintetični kontroli (spike in kontroli): -cel-miRNA-248 (iz C.elegans) C = 20 pg/μL -ath- miRNA-159a (iz A.thaliana) C = 5 pg/μL
- Kloroform, Ph. Eur za analizo (CAS: 67-66-3)
- 100 % etanol, Ph. Eur. za analizo (CAS:67-66-3)
- Ultračista voda W4502 (Sigma-Aldrich, ZDA)
- 3 % raztopina hipoklorita za čiščenje komore
- 70 % etanol za čiščenje komore

### **Aparature in računalniški programi**

- Avtoklav
- Spektrofotomer Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific, ZDA)
- Mikrocentrifuga in vrtinčasto mešalo Combspin FVL-2400N (Biosan, Latvija)
- Centrifuga 5430R (Eppendorf, Nemčija)
- Centrifuga Centric 322A (Domel, Slovenija)
- Komora: DNA/RNA UV-CLEAR, UVC/T-M-AR (Biosan, Latvija)
- Ciklični termostat Termocycler Primus 96 (Peqlab, Nemčija)
- Ciklični termostat Lighcycler 480II (Roche, Švica)
- Aplikacija Normfinder za Microsoft Excel (Moma, Danska)
- Računalniški program Excel (Microsoft, ZDA)
- LinReg PCR (Academic Medical Center-Amsterdam, Nizozemska)

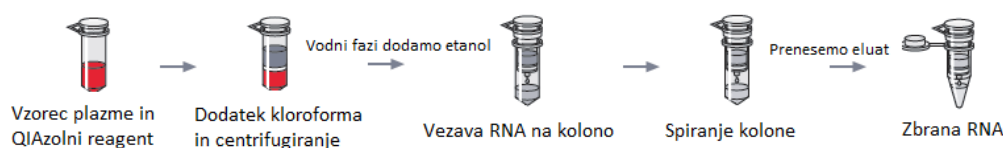
- SPSSv20 (IBM, ZDA)

### **Delovni pribor**

- Polavtomatske pipete: 0,1-2,5  $\mu$ L, 2-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L in 100-1000  $\mu$ L (Eppendorf)
- Nastavki za pipete
- RNaz- free pipetni nastavki (Star Lab, ZDA)
- 0,5 in 1,5 in 2 mL avtoklavirane epruvetke (Eppendorf, Nemčija)
- Mikrotiterske ploščice s 384 vdolbinicami in samolepilna folija (Starstedt)

### **3.4 IZOLACIJA mikro RNA IZ PLAZME PREISKOVANK**

Izolacijo miRNA smo izvedli s pomočjo MiRNeasy Mini reagenčnega kompleta, ki vključuje organsko ekstrakcijo iz plazme ter čiščenje RNA s pomočjo membranskih kolon. Sprva dodamo QIAzolni reagent, ki je enofazna raztopina fenola in gvanidin tiocianata, ter predstavlja ustrezno okolje za miRNA, saj zavira RNaze, poleg tega pa po dodatku kloroforma omogoča organsko ekstrakcijo, kjer pride do ločitve zgornje vodne faze, srednje vmesne faze in spodnje organske faze. V vodni fazi se nahaja RNA, v vmesni fazi DNA, proteini pa v vmesni in organski fazi. Vodno fazo odstranimo in ji dodamo absolutni etanol, ki obori miRNA in tako zagotovimo ustrezne pogoje za vezavo miRNA na kolono. Dobljeno raztopino naneseemo na kolono, pri čemer se miRNA veže na kolono, fenol in ostale nečistoče pa s pomočjo pufrov RWT ter RPE speremo iz kolone. V zadnjem koraku smo z vodo, ki ne vsebuje ribonukleaz, sprali izolirano miRNA iz kolone (47).



**Slika 3: Postopek izolacije mikro RNA. Prirejeno po (47).**

### **Postopek izolacije mikro RNA iz plazme:**

Postopek izolacije miRNA je v osnovi prevzet po protokolu v priročniku miRNeasy Mini Handbook (47), ki je bil nato modificiran.

Vzorci plazme, zamrznjene na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , smo odtajali na sobni temperaturi ( $15\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in jih nato premešali z obračanjem, na hitro centrifugirali in prenesli  $450\text{ }\mu\text{L}$  plazme v čisto  $1,5\text{ mL}$  epruvetko. Centrifugirali smo  $5\text{ min}$  na  $16.000\text{ g}$  in  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ter tako odstranili morebitne krioprecipitate.

1. V dve  $2\text{ mL}$  epruvetki smo prenesli po  $200\text{ }\mu\text{L}$  istega vzorca plazme in dodali  $5\text{x}$  volumen QIAzola ter nato vortreksirali in inkubirali  $5\text{ min}$ .
2. V vmesnem času smo pri sobni temperaturi z ultračisto vodo razredčili obe eksterni sintetični kontroli v razmerju  $1:10$ .
  - a) Cel-miRNA-248,  $C = 20\text{ pg}/\mu\text{L}$ : Po redčenju dobimo  $C = 2\text{ pg}/\mu\text{L}$ . V vsak alikvot istega vzorca dodamo  $5\text{ }\mu\text{L}$  redčene eksterne sintetične kontrole, tako dobimo v vsakem alikvotu po  $10\text{ pg}$ , skupno v vzorcu pa  $20\text{ pg}$ .
  - b) Ath-miRNA-159a,  $C = 5\text{ pg}/\mu\text{L}$ : Po redčenju dobimo  $C = 0,5\text{ pg}/\mu\text{L}$ . V vsak alikvot istega vzorca dodamo  $5\text{ }\mu\text{L}$  redčene eksterne sintetične kontrole, tako dobimo v vsakem alikvotu po  $2,5\text{ pg}$ , skupno v vzorcu pa  $5\text{ pg}$ .
3. Vzorce smo nato premešali s stresanjem in inkubirali  $5\text{ min}$ .
4. Sledil je dodatek enake količine kloroforma, kot je bilo izhodiščnega vzorca.
5. Epruvetke smo dobro zaprli in stresali  $20\text{ s}$ . Nato smo inkubirali  $3\text{ min}$  na sobni temperaturi ter ponovno stresali  $20\text{ s}$  ter inkubirali  $3\text{ min}$  na sobni temperaturi. Pred nadaljnjim centrifugiranjem smo odprli pokrovček epruvetke, z namenom, da bi morebitni kloroform na robu pokrovčka stekel v notranjost epruvetke. Sledilo je  $15\text{ min}$  centrifugiranje vzorca na  $12.000\text{ g}$  pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nato smo zopet odprli pokrovček in pogledali, če je kloroform iz pokrovčka stekel v vodno fazo. V primeru, da se je to zgodilo, smo še enkrat centrifugirali  $5\text{ min}$  na  $12.000\text{ g}$  pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
6. Centrifugo smo ogreli na sobno temperaturo.
7. V nove  $2\text{-ml}$  epruvetke smo prenesli največ  $600\text{ }\mu\text{L}$  ( $6 \times 100\text{ }\mu\text{L}$ ) vodne faze in dodali  $1,5\text{-kratnik}$   $100\text{ }\%$  EtOH. Preden smo dodali etanol, smo omočili pipetni nastavek ter po dodatku vzorec počasi in previdno premešali s pipetiranjem.
8. Oba alikvota istega vzorca smo nato združili na isti koloni in sicer tako, da smo na kolono pipetirali maksimalno  $700\text{ }\mu\text{L}$  vzorca ter nato centrifugirali  $1\text{ min}$  na  $12.000\text{ g}$  pri sobni T. Eluat smo zavrgli in postopek nadaljevali, dokler ni zmanjkalo obeh alikvotov istega vzorca.
9. Dodali smo  $700\text{ }\mu\text{L}$  pufra RWT, narahlo zaprli epruvetko in centrifugirali  $1\text{ min}$  na  $12.000\text{ g}$  pri sobni T. Eluat smo zavrgli. Na kolono smo dodali  $500\text{ }\mu\text{L}$  pufra RPE,

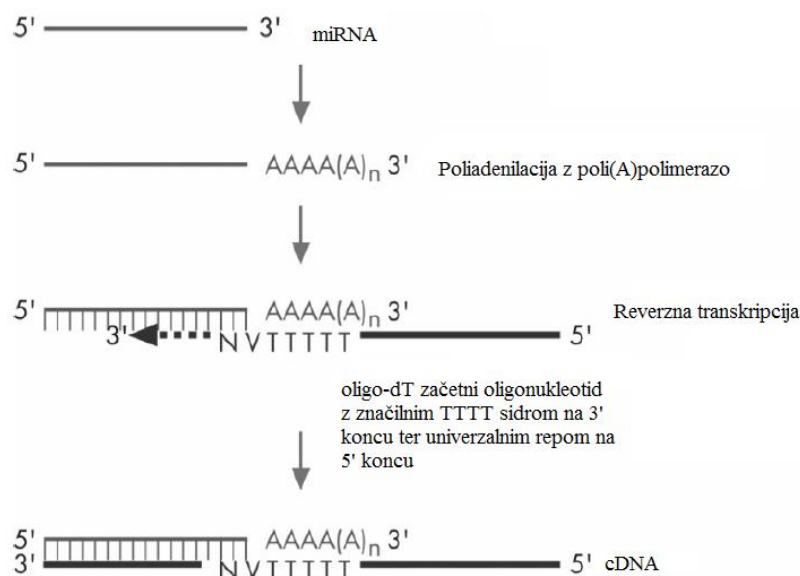
- narahlo zapri epruvetke in centrifugirali 1 min na 12.000 g pri sobni T in nato eluat zavrgli. Postopek z RPE pufrom smo še enkrat ponovili. Nato smo še tretjič dodali 500  $\mu$ L pufra RPE in centrifugirali 3 min na 12.000 g pri sobni T in dobljeni eluat zavrgli.
10. Kolono smo nato prenesi v novo 2-mililitrsko epruvetko in centrifugirali 3 min na 16.000 g pri sobni T. Sledilo je 1-minutno sušenje odprtih kolon.
  11. Kolone smo nato prenesli v čisto 1,5-mililitrsko epruvetko, dodali 30  $\mu$ L vode, ki ne vsebuje ribonukleaz, inkubirali kolono 15 min na sobni temperaturi in centrifugirali 2 min na 12.000 g pri sobni T.
  12. Eluat smo ponovno prenesi na kolono, inkubirali 15 min in centrifugirali 2 min pri 12.000 g, oboje pri sobni temperaturi.
  13. V 0,5-mililitrsko epruvetko smo odpipetirali 3,3  $\mu$ L eluata za meritev na Nanodropu, ostalo pa zamrznili na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.5 SPEKTROFOTOMETRIČNA DOLOČITEV KOLIČINE IN ČISTOČE PLAZEMSKÉ RNA**

Koncentracijo miRNA smo določili s pomočjo Nanodropa, ki deluje po principu UV/VIS sprektrofotometrije. Absorbanco smo merili pri treh valovnih dolžinah, in sicer 230, 260 in 280 nm. Nukleinske kisline absorbirajo pri 260 nm, zato pri tej dolžini določamo koncentracijo RNA, pri čemer upoštevamo Beer-Lambertovega zakon. S pomočjo razmerij  $A_{260}/A_{280}$  in  $A_{260}/A_{230}$  pa določimo čistost RNA (48).

### **3.6 PREPIS mikro RNA IZ PLAZME PREISKOVANK V KOMPLEMENTARNO DNA**

Prepis miRNA v cDNA smo izvedli s pomočjo miScript® II RT reagenčnega kompleta. Izbor pufra znotraj kompleta vpliva na selektivnost pretvorbe. Uporabili smo miScript HiSpec pufer, ki omogoča le pretvorbo krajših RNA molekul (zrela miRNA, majhna jedrna RNA) v cDNA (49). Pufer močno zavira reakcijo dodajanja A pri drugih molekulah, npr. pri daljših RNA molekulah (50).



**Slika 4: Princip prepisa mikro RNA v komplementarno DNA. Prirejeno po (49).**

V prvem koraku se zreli miRNA doda poliadeninski rep s pomočjo encima poli(A)polimeraza. Sledi reverzna transkripcija s pomočjo encima reverzne transkriptaze in začetnega oligonuleotida, za katerega je značilno, da ima 3' del komplementaren poliadeninskemu repu, zato pride do vezave. Ima pa tudi univerzalen rep, ki je pomemben pri pomnoževanju cDNA v qPCR koraku. Končni produkt te reakcije je cDNA (49).

### **Postopek dela**

1. Pri sobni temperaturi smo odtajali vzorce miRNA ter komponente miScript® II RT reagenčnega kompleta. Nato smo vsako raztopino narahlo premešali z obračanjem ter na kratko centrifugirali na minicentrifugi. Tekom dela smo material ves čas hranili na ledu.
2. Pripravili smo reakcijsko zmes za reverzno transkripcijo – brez vzorca miRNA (preglednica 2). Pomembno je, da encim reverzno transkriptazo dodamo nazadnje in jo takoj vrnemo nazaj na led.

**Preglednica 2: Reakcijska zmes za prepis mikro RNA v komplementarno DNA (49).**

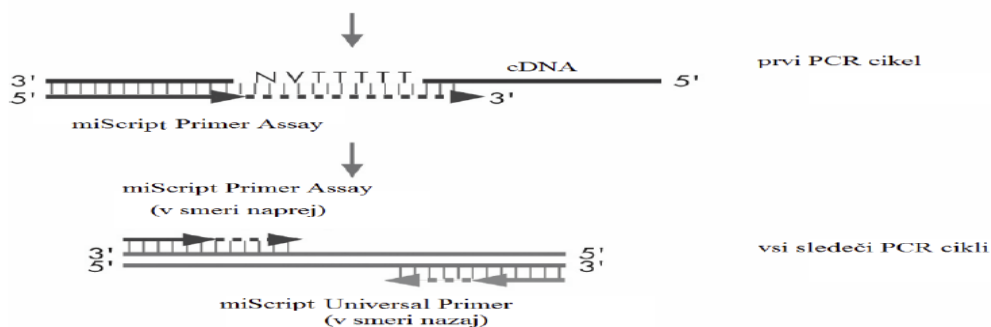
<b>Reakcijska zmes</b>	<b>Volumen dodatka</b>
<b>Specifični pufer</b>	4 µl
<b>Mešanica nukleotidov</b>	2 µl
<b>Voda, ki ne vsebuje ribonukleaz</b>	Za vzorce 0 µL, za standarde 1 µL
<b>Osnovna mešanica za prepis</b>	2 µl
<b>Vzorci, ki vsebujejo miRNA</b>	Za vzorce 12 µL, za standarde 1 µL
<b>Skupni volumen</b>	20 µl



3. V epruvetke smo dodali reakcijsko zmes za reverzno transkripcijo ter vzorce miRNA, oziroma standardno raztopino miRNA (pripravili smo jo iz vzorca kosti) glede na vrednosti preglednice 1. Epruvetke smo narahlo premešali, na kratko centrifugirali in shranili na led.
4. Tako pripravljene epruvetke smo prenesli v ciklični termostat.
5. Inkubirali smo 60 min, pri 37 °C. V tem času je potekel prepis miRNA v cDNA.
6. Inkubirali smo 5 min pri 95 °C in tako inaktivirali mešanico za reverzno transkripcijo. Vzorec smo na ledu prenesli na -80 °C (49).

### 3.7 KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU: MERJENJE KOLIČINE IZBRANIH mikro RNA V PLAZMI PREISKOVANK

Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (q-PCR) je zanesljiva in enostavna tehnika, ki se uporablja za kvantifikacijo miRNA. Princip poteka PCR reakcije je prikazan na sliki 5.



**Slika 5: Princip poteka PCR reakcije, s pomočjo katere pomnožimo komplementarno DNA. Prirejeno po (49).**

V prvem koraku (95 °C, 15 min) pride do aktivacije DNA polimeraze, ki je termostabilna molekula. Potem sledi cikel, ki se ponavlja in je sestavljen iz treh korakov. Najprej pride do temperaturne denaturacije cDNA (15 s, 94 °C), kjer pride do razprtja molekule cDNA in nastaneta dve enoverižni DNA. Sledi prileganje obeh začetnih oligonukleotidov (30 s, 55 °C). Začetni oligonukleotidi se podaljšujejo (30 s, 70 °C) s pomočjo termostabilne DNA polimeraze, in tako pride do izgrajevanja komplementarne verige cDNA. Ta cikel se nato ponavlja 50-krat in teoretično bi morali dobiti  $2^{50}$  število cDNA. Količina cDNA je nato določena fluorimetrično, s pomočjo barvila SYBR Green (51).

S pomočjo reagenčnega kompleta miScript SYBR Green PCR, individualnih miScript Primer Assay, miScript Universal Primer ter real-time PCR protokola proizvajalca (Qiagen), smo namnožili količino določene cDNA v vzorcu (50).

Vloga QuantiTect SYBR Green PCR pufra je, da zagotavlja optimalne pogoje za potek PCR reakcije (51, 52). Vloga DNA polimeraze je podaljševanje DNA verige tako, da dodaja komplementarne nukleotide. Specifičen začetni oligonukleotid se veže na 3' konec cDNA, kjer prepozna specifično zaporedje cDNA, univerzalen začetni oligonukleotid pa se veže na 5'konec glede na cDNA verigo, kjer je bil v postopku transkripcije dodan univerzalen rep oligo-dT začetnega oligonukleotida. Določitev koncentracije cDNA po končanem ciklu pa omogoča SYBR Green fluorescenčno barvilo, ki se kot interkalator veže v dvovertično DNA, detektor pa nato izmeri oddano fluorescenco (51, 52).

Pri delu smo uporabili 384 mikrotitrsko ploščico, kamor smo nanесли standarde, vzorce, kalibrator in kontrole. Standarde smo pripravili iz standardov cDNA iz kosti, ki smo jih redčili. MiRNA iz kosti smo izbrali zato, ker je koncentracija miRNA v kosteh višja v primerjavi s plazmo, saj je koncentracija miRNA v plazmi tako nizka, da standardov ne bi mogli še dodatno redčiti (46).

Kalibrator smo pripravili kot kombinacijo petih cDNA standardov iz kosti. Pomembno je, da je sestava kalibratorja pri vseh serijah poskusov enaka, kar smo dosegli tako, da smo pripravili večjo količino kalibratorja ter ga razdelili na več enakih delov v epruvetke ter jih zamrznili, ob nanosu na mikrotitrsko ploščico pa odmrznili le eno epruvetko. Kalibrator nanesimo na vsako ploščico posebej in tako lahko vzorce primerjamo med seboj (53, 54).

Na mikrotitrsko ploščico smo nanесли tudi kontroli – negativno kontrolo iz reverze transkripcije ter slepo raztopino PCR. Zmes za negativno kontrolo reverzne transkripcije smo pripravili tako, da smo v reakcijsko zmes za reverzno transkripcijo namesto reverzne transkriptaze dodali vodo, ostale komponente so ostale enake. Tako smo dokazali, da je reverzna transkriptaza tista komponenta, ki je odgovorna za prisotnost DNA, v primeru odziva pa je prisoten drug vir DNA (50). Slepo raztopino za PCR pa smo pripravili tako, da smo namesto vzorca cDNA dodali vodo. Tako smo dokazali, da se v našem vzorcu pomnožuje le cDNA in ni drugih komponent DNA, ki bi lahko vplivale na količino oddane svetlobe barvila ter posledično na določanje količine miRNA v vzorcu (50).

### Postopek dela

1. Pri sobni temperaturi smo odtajali osnovno zmes za PCR, univerzalen začetni oligonukleotid, specifičen začetni oligonukleotid<sup>3</sup>, vzorce cDNA in vodo brez ribonukleaz.
2. Pri sobni temperaturi smo pripravili standarde različnih koncentracij. Standarde smo pripravili iz kostnih cDNA vzorcev. Osnovno standardno raztopino smo razredčili v razmerju 1:250. Preglednica 3 prikazuje pripravo standardov različnih koncentracij. S pomočjo standardov narišemo umeritveno krivuljo.

**Preglednica 3: Priprava standardov za izdelavo umeritvene krivulje.**

<b>Standard</b>	<b>Koncentracija (pg/μL)</b>	<b>Volumen cDNA (μL)</b>	<b>Volumen vode (μL)</b>	<b>Končni volumen (μL)</b>	<b>Prenos za naslednje redčenje (μL)</b>
<b>St0</b>	200	1 HOS 372	249	250	125
<b>St1</b>	100	125	125	250	125
<b>St2</b>	50	125	12	250	125
<b>St3</b>	25	125	125	250	125
<b>St4</b>	12,5	125	125	250	125
<b>St5</b>	6,25	125	125	250	125
<b>St6</b>	3,125	125	125	250	125
<b>St7</b>	1,563	125	125	250	125
<b>St8</b>	0,7813	125	125	250	125
<b>St9</b>	0,3906	125	125	250	125

3. Vse reagentne smo nato narahlo premešali z obračanjem. Sledila je priprava reakcijske zmesi za vsak gen posebej kot prikazuje preglednica 4. Dodali smo vse spojine razen cDNA ter zoper narahlo premešali z obračanjem.

**Preglednica 4: Priprava reakcijske zmesi za PCR.**

<b>Reakcijska zmes</b>	<b>Volumen za 1 vzorec</b>
<b>Osnovna reakcijska zmes</b>	5 μL
<b>Univerzalni oligonukleotidni začetnik</b>	1 μL
<b>Specifični oligonukleotidni začetnik</b>	1 μL
<b>Voda, ki ne vsebuje ribonukleaz</b>	2 μL
<b>Vzorci (cDNA) - 11-krat redčeni</b>	1 μL
<b>Skupni volumen</b>	10 μL

<sup>3</sup> Specifični začetni oligonukleotid je v obliki liofilizata, zato smo ga pred začetkom prve uporabe redčili s 550 μL pufru TE. Tako pripravljeno raztopino smo dobro premešali z vorteksiranjem.

4. Reakcijsko zmes za posamične gene smo odpipetirali v posamezne vdolbinice 384 mikrotitrne ploščice.
5. V vdolbinice 384 mikrotitrne ploščice smo odpipetirali vzorce cDNA, ki smo jih predhodno razredčili za faktor 11 (1,3  $\mu$ L vzorca smo dodali 13  $\mu$ L vode brez ribonukleaz). Dodali smo tudi RT kontrolo (zmes kjer ni dodan encim reverzna transkriptaza) ter NTC kontrolo (namesto vzorca cDNA smo dodali vodo) in kalibrator.
6. Mikrotitrne ploščice smo natančno prekrili s folijo in pazili, da ni bilo prisotnih mehurčkov zraka, ki bi lahko motili določitev koncentracije miRNA.
7. Na centrifugi Centric smo mikrotitrne ploščice centrifugirali 1 min na 3300 vrt./min pri sobni temperaturi.
8. Na cikličnem termostatu Lightcycler 480 smo izbrali program SYBR Select MM, ki je vseboval v preglednici 5 predstavljen program. Nato smo ploščico vstavili v aparat in počakali, da se je program končal ter odčitali rezultate (49).

#### **Preglednica 5: Program za izvedbo PCR reakcije.**

<b>Korak</b>	<b>Čas</b>	<b>Temperatura</b>	
<b>Aktivacija DNA polimeraze</b>	15 min	95 C	
<b>Denaturacija cDNA</b>	15 s	94 C	
<b>Prileganje oligonukleotidnega začetnika</b>	30 s	55 C	<b>1 cikel</b>
<b>Podaljševanje verige</b>	30s	70 C	
<b>Število ciklov</b>	<b>50 ciklov + talilna analiza (T<sub>m</sub>)</b>		

### **3.8 KVANTIFIKACIJA mikro RNA**

#### **3.8.1 IZBOR ENDOGENIH REFERENČNIH GENOV**

Ena izmed pogosto uporabljenih metod za normalizacijo pri relativni kvantifikaciji (3.8.3) je izbor endogenih referenčnih genov, ki se stabilno izražajo v uporabljenih vzorcih. Za določitev endogenega referenčnega gena se najprej izvede testiranje večjega števila genov, ki se jih določi na osnovi literature ali obstoječih podatkov in naredi pilotno študijo na majhnem številu vzorcev ter nato določi najboljše endogene referenčne gene s pomočjo programske opreme Normfinder (55). Normfinder je algoritem za določitev optimalnega endogenega referenčnega gena iz skupine kandidatnih endogenih referenčnih genov. Deluje tako, da avtomatsko za vsak gen posebej oceni variiranje C (koncentracija) znotraj

posamične skupine ter med skupinama vzorcev ter nato rezultat poda kot stabilnostno vrednost, ki se izračuna na podlagi inter in intravariabilnost. Ker vemo, da se noben gen ne izraža popolnoma enako znotraj in med različnih tipi vzorcev, upoštevamo stabilnostno vrednost, ki predstavlja sistemsko napako, in zato čim nižja stabilnostna vrednost predstavlja najboljši endogeni referenčni gen. Normfinder nam kot rezultat poda najboljši endogeni referenčni gen in najboljšo kombinacijo dveh endogenih referenčnih genov (56, 57).

### **Postopek dela**

1. S pomočjo literature in s pomočjo rezultatov raziskave, ki je preučevala izražanje miRNA v kosteh in plazmi s pomočjo metode Nanostring (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana), smo izbrali potencialne kandidate za endogene referenčne gene: SNORD96A, miRNA-1226, RNU-6, miRNA-338, let-7a, miRNA-16, miRNA-140, miRNA-32.
2. Glede na izmerjene T vrednosti smo naključno izbrali 5 vzorcev preiskovalk, ki imajo po definiciji izraženo osteoporozo ter 5 vzorcev preiskovank, ki nimajo osteoporoze.
3. Nato smo izvedli PCR reakcijo po zgoraj opisanem protokolu. (protokol 3.7)
4. Koncentracije miRNA smo vnesli v Excel in zagnali program Normfinder, ki nam je podal rezultat (57).

### **3.8.2 DOLOČITEV UČINKOVITOSTI POMNOŽEVANJA mikro RNA S PROGRAMOM LinReg PCR**

LinReg PCR je program za analizo podatkov RT-qPCR. V program uvozimo surove RT-qPCR podatke, ki nimajo določene bazne linije. Program potem sam določi bazno linijo za vsak vzorec posebej, določi okvir linearnosti in potem uporabi linearno regresijo za določitev povprečne učinkovitosti pomnoževanja za vse vzorce za določen gen – miRNA (58).

### **Postopek dela**

1. Podatke smo izvozili iz LightCycler 480 v txt obliki ter jih nato pretvorili v Excel.
2. Izbrane podatke (le vzorce) iz Excela smo uvozili v program LinReg PCR ter uporabili program MJ Research.
3. Izbrali smo opcijo Determine Baseline in program nam je izračunal povprečno učinkovitost pomnoževanja (58).

### **3.8.3 NORMALIZACIJA KOLIČINE PLAZEMSKIH mikro RNA S KVANTITATIVNO PRIMERJALNO METODO**

Normalizacija je postopek, s katerim odpravimo neenotnosti v količini miRNA, ki niso posledica bioloških sprememb, temveč nastanejo kot posledica variacije različnih parametrov - variacija v količini začetnega vzorca, v postopku pridobitve vzorca, v postopku izolacije miRNA in njeni učinkovitosti, v učinkovitosti encimskih reakcij – reverzna transkripcija in qPCR, inter-individualne razlike v splošnem izražanju miRNA v plazmi. Pravilna normalizacija omogoča primerljivost rezultatov in je kritična za analizo ter interpretacijo rezultatov dobljenih s pomočjo PCR, saj le na tak način lahko vzorce med seboj primerjamo (55, 56, 59). Normalizacijo smo izvedli z uporabo kvantitativne primerjalne  $\Delta\Delta C_t$  metode (enačba 1 in 2), ki upošteva učinkovitost pomnoževanja za posamezni gen ter povprečne  $C_q$  vrednosti kalibratorja, endogenih referenčnih genov (enačba 2), oziroma eksterne sintetične kontrole (enačba 1) ter vzorcev.

$$NRR = \frac{V_z(n)}{R(n)} = \frac{E_{vz}^{(C_q(vz)kal - C_q(vz)vz)}}{E_{si}^{(C_q(si)kal - C_q(si)vz)}}$$

#### **Enačba 1: Normalizirano relativno razmerje vzorca z eksterno sintetično kontrolo in kalibratorjem.**

$V_{z(n)}$  je vzorec n, R je referenca,  $E_{vz}$  je učinkovitost pomnoževanja izbranega gena,  $E_{si}$  je učinkovitost pomnoževanja eksterne sintetične kontrole,  $C_q(vz)_{vz}$  je povprečna vrednost  $C_q$  posameznega vzorca za izbrani vzorčni gen,  $C_q(vz)_{kal}$  je povprečna vrednost  $C_q$  kalibratorja za izbrani vzorčni gen,  $C_q(si)_{kal}$  je povprečna  $C_q$  vrednost kalibratorja za eksterno sintetično kontrolo,  $C_q(si)_{vz}$  je povprečna  $C_q$  vrednost vzorca za eksterno sintetično kontrolo.

$$NRR = \sqrt{\left(\frac{V_z}{R_1} \times \frac{V_z}{R_2}\right)}$$

$$NRR = \sqrt{\frac{E_{vz}^{(C_q(vz)kal - C_t(vz)vz)}}{E_{r1}^{(C_q(r1)kal - C_q(r1)vz)}} \times \frac{E_{vz}^{(C_q(vz)kal - C_q(vz)vz)}}{E_{r2}^{(C_q(r2)kal - C_q(r2)vz)}}}$$

#### **Enačba 2: Normalizirano relativno razmerje vzorca z endogenima referenčnima genom in kalibratorjem.**

$E_{vz}$  je učinkovitost pomnoževanja izbranega gena,  $E_{r1}$  je učinkovitost pomnoževanja endogenega referenčnega gena 1,  $E_{r2}$  je učinkovitost pomnoževanja endogenega referenčnega gena 2,  $C_q(vz)_{kal}$  je povprečna vrednost  $C_q$  kalibratorja za izbrani vzorčni gen,  $C_q(vz)_{vz}$  je povprečna vrednost  $C_q$  posameznega vzorca za izbrani vzorčni gen,  $C_q(r1)_{kal}$  je povprečna  $C_q$  vrednost kalibratorja za endogeni referenčni gen 1,  $C_q(r2)_{kal}$  je povprečna  $C_q$  vrednost kalibratorja za endogeni referenčni gen 2,  $C_q(r1)_{vz}$  je povprečna  $C_q$  vrednost vzorca za endogeni referenčni gen 1,  $C_q(r2)_{vz}$  je povprečna  $C_q$  vrednost vzorca za endogeni referenčni gen 2.

### **Postopek dela**

1. Izračunali smo povprečno  $C_q$  vrednost ter standardne odklone (STD) na osnovi treh meritev za tarčne gene (miRNA-30d, miRNA-30e, miRNA-126, miRNA-148a, miRNA-199 ter miRNA-574,), endogena referenčna gena (miRNA-16 in let-7a) ter eksterno sintetično kontrolo (cel-miRNA-248) ter dobljene rezultate vnesli v program Excel.
2. V Excel smo dodali s pomočjo LinReg PCR izračune učinkovitosti pomnoževanja, ki smo jih določili za vsak gen posebej.
3. Enačbo 3 in 4 smo vnesli v Excel ter v enačbo vstavili ustrezne podatke.
4. Rezultate enačbe 3 in 4 smo nadaljnje uporabili v SPSS izračunih.

### **3.9 ANALIZA REZULTATOV S PROGRAMSKO OPREMO SPSS**

Podatke o preiskovancih (telesna masa, telesna višina, leta mene, MKG, FRAX, TBS, T) ter pridobljene podatke o količini miRNA v plazmi preiskovancev smo kvantitativno obdelali s pomočjo ustreznih statističnih metod ter z uporabo računalniškega statističnega programa SPSS (ang. Statistical Package for the Social Sciences).

Vrednosti ( $p$ ), manjše od 0,050, smo opredelili kot statistično značilno razliko.

### **Postopek dela**

1. V program SPSS smo uvozili podatke o preiskovancih ter rezultate relativne kvantifikacije (koncentracije miRNA v plazmi) – Pri čemer smo izračunane vrednosti normalizirane glede na eksterno sintetično kontrolo označili s črko  $s$ , izračunane vrednosti, normalizirane s pomočjo endogenih referenčnih genov, pa s črko  $r$ .

2. Vse vnesene podatke smo transformirali z pomočjo logaritemske, kvadratne, korenske in recipročne transformacije (60).
3. S pomočjo Shapiro-Willk testa smo preverili normalnost porazdeljevanja vnesenih podatkov (61). Izračun je osnovan na primerjavi vrednosti naših vzorcev s teoretično normalno porazdeljenim oziroma teoretično logaritmsko, korensko, kvadratno in recipročno normalno porazdeljenim setom podatkov. V primeru normalne porazdelitve ( $p > 0,05$ ) smo v nadaljnjih analizah uporabili parametrične teste, v primeru nenormalne porazdelitve ( $p < 0,05$ ) pa neparametrične teste (60).
4. S pomočjo neodvisnega t-testa smo testirali domneve o povprečnih vrednostih spremenljivk med preiskovanima skupinama, in sicer za parametre, ki se porazdeljujejo normalno (60).
5. Z Mann Whitney U testom smo testirali domneve o povprečnih vrednostih spremenljivk med preiskovanima skupinama, in sicer za parametre, ki se porazdeljujejo nenormalno (60).
6. S Spearmanovim dvostranskim neparametričnim testom smo ocenili odnos podatkov o preiskovancih (MKG, FRAX, TBS) v povezavi s plazemskimi koncentracijami miRNA. Koeficient korelacije pa nam pove, kakšna je korelacija in ima lahko vrednosti med  $-1 < \rho < 1$ . Pri čemer 1 pomeni popolno pozitivno korelacijo, kar pomeni, da če ena spremenljivka naraste, tudi druga spremenljivka naraste za enak delež. Vrednost -1 pa pomeni perfektna negativna korelacija, torej če ena spremenljivka naraste, se druga spremenljivka za isto količino zniža. 0 pa pomeni, da ni linearne povezave (60).

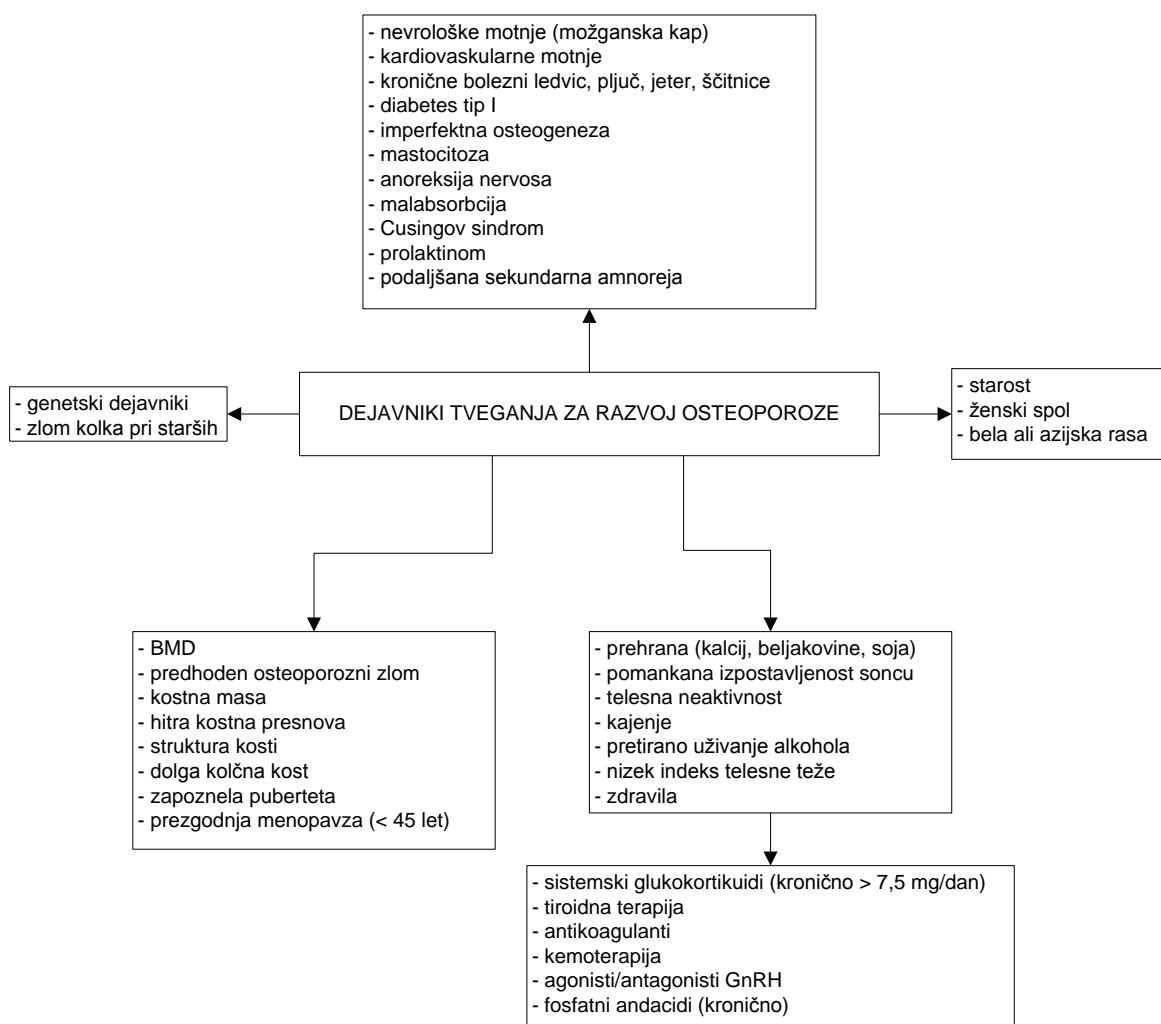


## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Preučevana populacija

Kot preiskovano populacijo smo izbrali pomenopavzne ženske, ki so najbolj prizadeta skupina pri osteoporozi. Ženske nad 50 let imajo namreč kar 4-krat večje tveganje za razvoj osteoporoze, kar je povezano s hitrejšo izgubo MKG v primerjavi z moškimi. Vzrok tega je upad koncentracije estrogenov v menopavzi, ki vodi do povečanja števila osteoklastov in s tem do povečane kostne razgradnje (62).

Na spodnji sliki so prikazani dejavniki tveganja, ki vplivajo na pojav osteoporoze in jih je večina zajetih tudi v vprašalniku.



**Slika 6: Prikaz dejavnikov tveganja za razvoj osteoporoze (34, 63 – 66).**

V naši študiji smo zbrali vzorce plazme skupno 102 pomenopavznih preiskovank, pri čemer smo statistično obdelali podatke 74 preiskovank. Razlog izključitve vzorcev je bil prisotnost hemolize v vzorcu, starost nad 70 let, prejemanje zdravil za zdravljenje osteoporoze ter neustreznost pridobljenih rezultatov (izključili smo vzorce, ki so imeli Cq vrednost eksterne sintetične kontrole nad 28). Na tak način smo izključili možnost prisotnosti miRNA iz drugih virov razen plazme, izključili smo možnost vpliva senilne in sekundarne osteoporoze na izražanje miRNA ter vzorce, kjer je prišlo do motnje kjerkoli v postopku vrednotenja miRNA. Preiskovanke smo nato glede na opredelitev osteoporoze razdelili v dve skupini: v skupino bolnic z osteoporozo (17 preiskovank) ter v kontrolno skupino (57 preiskovank), kamor smo vključili zdrave preiskovanke. Kriterij razdelitve v skupini je bila T vrednost, pri čemer smo preiskovanke z izmerjenim  $T \leq -2,5$  razvrstili v skupino bolnic z osteoporozo, vse ostale pa v kontrolno skupino.

S pomočjo t-testa neodvisnih spremenljivk smo preverili, ali obstajajo pomembne razlike v povprečni telesni masi, telesni višini in v letih menopavze med skupinama, kar bi lahko poleg izbranih miRNA vplivalo na pojavnost osteoporoze. Osnovne značilnosti obeh skupin so predstavljene v preglednici 6. Ugotovili smo, da se skupini med seboj ne razlikujeta glede na telesno višino in leta mene. Se pa skupini med seboj razlikujeta glede na povprečno telesno maso, in sicer imajo osteoporozne bolnice nižjo telesno maso kot preiskovanke iz kontrolne skupine. Nižja telesna masa je povezana z nižjo mineralno kostno gostoto. Ljudje z nižjo telesno maso imajo manjše zaloge maščob in posledično zmanjšano periferno pretvorbo androstendiona v estron, ki poteka v maščobnem tkivu. Zmanjšana količina estrogena pa se odraža v povečani kostni presnovi, ki vodi do izgube kostne mase. Drugi možni mehanizem vpliva večje telesne mase na višjo MKG pa je preko večje mehanske obremenitve sklepov (67).

**Preglednica 6: Osnovne značilnosti skupine bolnic z osteoporozo (1) in kontrolne skupine zdravih preiskovank (0).**

Podatki so predstavljeni kot mediana in kvartili, saj smo uporabili logaritemsko transformirane podatke, ki so se normalno porazdeljevali. P vrednost predstavlja signifikanco, pri čemer  $P < 0,05$  pomeni, da obstaja signifikatno pomembna razlika med obema skupinama.

TM- telesna masa; TV-telesna višina, LM-leta mene, OP-osteoporoza.

	Mediana skupine z OP (1)	1.kvartil skupine z OP (1)	3.kvartil skupine z OP (1)	Mediana kontrolne skupine (0)	1.kvartil kontrolne skupine (0)	3.kvartil kontrolne skupine (0)	P vrednost
<b>TM</b>	58	54	66	73	64	80	<0,001
<b>TV</b>	160	156	164,5	161	158	166	0,281
<b>LM</b>	13	7,5	24	8	5	15	0,058

Skupina osteoporoznih bolnic je precej manjša od kontrolne skupine, kar bo potencialno lahko vplivalo na rezultate, ki jih bomo dobili s statistično obdelavo podatkov. Poleg približno enako velikih skupin bi si želeli tudi večjega števila preiskovank (osteoporoznih in zdravih), saj bi tako lahko dobili bolj reprezentativen vzorec. Vseeno smo se odločili, da bomo študijo nadaljevali, saj menimo, da bomo kljub naštetim pomanjkljivostim dosegli zadovoljive rezultate.

#### 4.2 Izolacija in spektrofotometrično vrednotenje izolirane RNA

Zaradi hemolize smo pred izolacijo izključili 5 vzorcev, ter jo izvedli iz preostalih 97 vzorcev. Izolacija je v večini primerov potekla uspešno, saj smo uporabili že modificiran postopek, pri čemer smo upoštevali priporočila proizvajalca (68).

Nato smo s pomočjo Nanodropa ocenili uspešnost izolacije RNA. Določili smo okvirne koncentracije ter čistost izolirane RNA. Z merjenjem A pri 260 nm smo določili okvirno koncentracijo RNA. Koncentracija miRNA v vzorcu je premajhna, da bi lahko spektrofotometrično določili njeno točno koncentracijo (50), vendar je bil naš namen izločiti vzorce, kjer je bila koncentracija RNA močno povečana, saj bi le to pomenilo, da so poleg plazemske miRNA prisotne še miRNA iz drugih virov, npr. levkocitov in trombocitov (47).

S pomočjo izmerjenega razmerja  $A_{260}/A_{280}$  in  $A_{260}/A_{230}$  smo določili zaostanek proteinov in topil (fenol, EDTA ...) v vzorcu plazme. V preglednici 7 so prikazani rezultati, pridobljeni s pomočjo Nanodropa.

#### Preglednica 7: Okvirne koncentracije in čistoča iz plazme izoliranih RNA.

vzorec	koncentracija (ng/ $\mu$ l)	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
<b>33</b>	9,0	1,03	0,26
<b>53</b>	9,7	1,03	0,18
<b>56</b>	8,4	1,40	0,11
<b>62</b>	9,7	1,00	0,22

<b>64</b>	45,9	1,42	0,44
<b>77</b>	16,7	1,17	0,11
<b>84</b>	5,0	1,08	0,21
<b>86</b>	9,8	1,53	0,36
<b>87</b>	12,0	1,33	0,20
<b>89</b>	13,6	0,98	0,19
<b>96</b>	14,2	1,03	0,17
<b>97</b>	13,9	0,88	0,18

Razmerja absorbanc so nižja od zelenih vrednosti, ki znašajo približno 2 za izolacijo celičnih RNA (47), vendar so znotraj pričakovanih vrednosti za plazemske vzorce. Za plazemske vzorce je namreč značilno, da vsebujejo zelo nizke koncentracije miRNA in je posledično prispevek nečistoč večji, kar se odraža v znižanih razmerjih absorbanc.

Tudi v drugim primerljivih študijah, ki so preučevale vpletenost izvencelične miRNA na pojav osteoporoze, so uporabili spektrofotometrično določitev za določitev okvirne koncentracije in čistosti miRNA (26). Dodatno pa so izkoristili možnost uporabe Nanodropa za oceno hemolize. Izmerili so količino oksihemoglobina pri 414 nm in tako izključili vzorce z A, večjo od 0,2 (69).

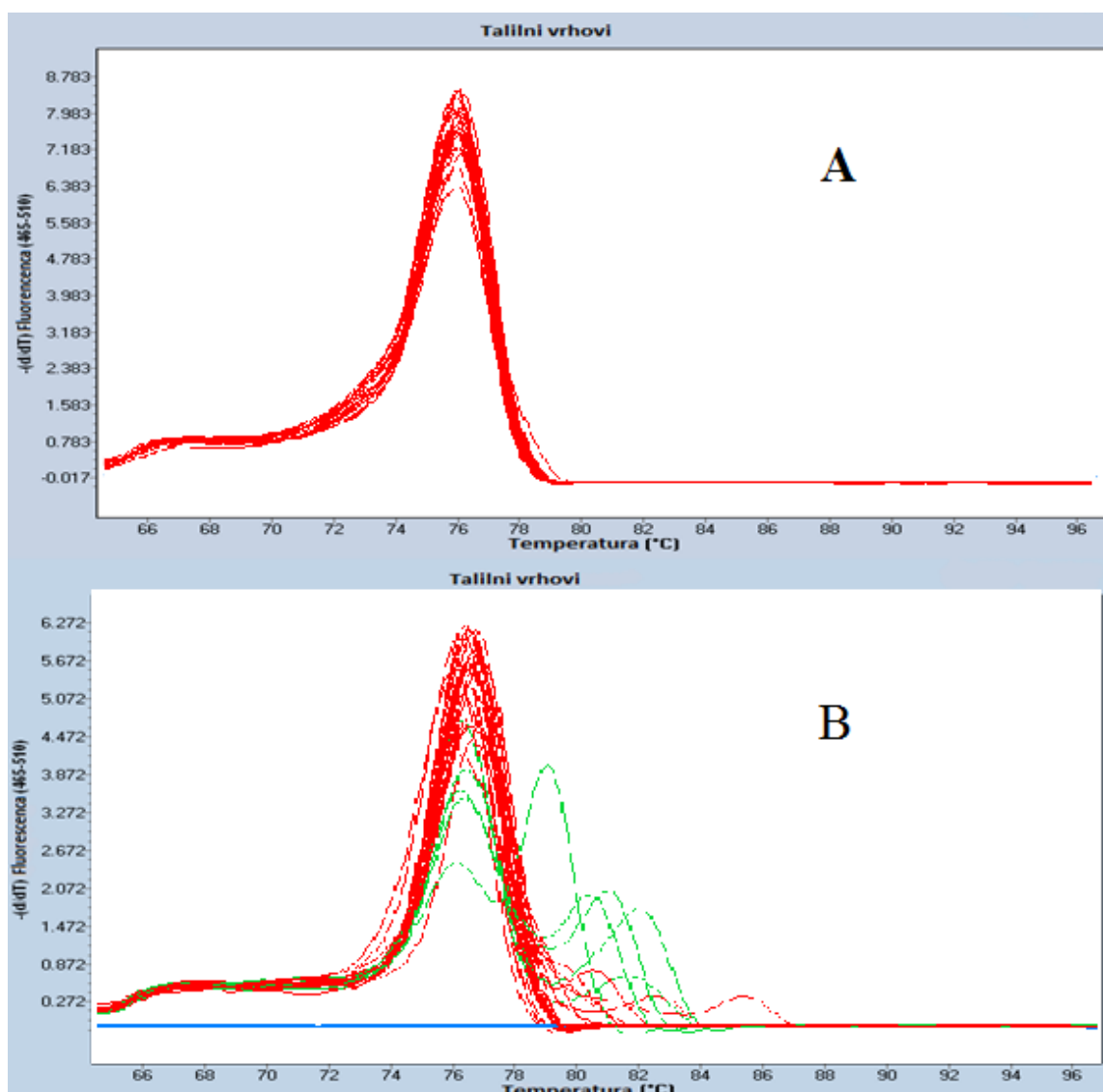
### **4.3 Merjenje količine izbranih mikro RNA**

#### **4.3.1 Merjenje količine mikro RNA s pomočjo RT-qPCR**

Za merjenje količine miRNA smo uporabili RT-qPCR metodo, ki predstavlja zlati standard za kvantifikacijo izvenceličnih miRNA v plazmi človeka (53, 68). Z uporabo univerzalne RT z dodajanjem poliA repa ter PCR reakcije s pomočjo specifičnih in univerzalnih oligonukleotitov smo dosegli specifičnost ter selektivnost reakcije. V primerjavi z gensko specifično RT pa zmanjšali količino začetnega vzorca in kompleksnost eksperimentalnih postopkov (70). Enak način določevanja količine miRNA so uporabile tudi primerljive študije, ki so preučevale vpletenost izvenceličnih miRNA na pojav osteoporoze (26, 61).

Nemodificiran proizvajalčev postopek prepisa miRNA v cDNA je potekal nemoteno. Dodatno bi lahko s qPCR določili notranjo sintetično kontrolo, oziroma pozitivno PCR kontrolo, ki je dodana miScript Nucleic mešanici in tako ocenili kvaliteto prepisa miRNA v cDNA ter uspešnost PCR reakcije (prisotnost inhibitorjev reverzne transkripcije in inhibitorjev PCR reakcije) (50, 55). Sledila je optimizacija pogojev PCR reakcije, s katero smo določili optimalno redčitev vzorcev. Vzorce plazme smo redčili 11-krat in 22-krat.

Ugotovili smo, da je 11-kratno redčenje bolj ustrezno, saj so bili rezultati bolj ponovljivi, zato smo v nadaljnjih analizah izražanja miRNA uporabili 11-kratno redčenje vzorcev. Redčenje je standardni postopek, ki se izvaja, kadar predhodno poteka univerzalna reverzna transkripcija, s čimer dosežemo zmanjšanje variacije med vzorci zaradi prisotnosti različnih inhibitorjev, saj njihov vpliv z redčenjem zmanjšamo (55). Sledilo je testiranje izražanja izbranih miRNA, pri čemer smo na 384 mikrotitrsko ploščico nanesti standarde, razredčene vzorce cDNA, kalibrator in dve kontroli. Detekcija produktov PCR je potekala s pomočjo barvila SYBR Green, ki se nespecifično veže na vse dvoverižne DNA, zato smo izvedli še talilno analizo in tako preverili prisotnost nespecifičnih produktov (slika 7).



**Slika 7: Talilna analiza.**

A – primer, kjer ni prisotnih nespecifičnih produktov; B – primer, kjer so prisotni nespecifični produkti.

S pomočjo dobljenih podatkov z LightCycler 480 smo za vsak vzorec odčitali  $C_q$  vrednost in na osnovi treh izmerjenih meritev istega vzorca rezultat podali kot povprečno vrednost  $C_q$  in standardno deviacijo. Rezultati so podani v prilogi 1. Rezultati so surovi, zato smo izvedli še kvantifikacijo z normalizacijo in statistično obdelavo podatkov.

**4.3.2 Kvantifikacija, izbor endogenih referenčnih genov, normalizacija**

Zaradi nizkih koncentracij miRNA v plazmi je kvantifikacija miRNA otežena in se pristopi med študijami razlikujejo (28, 72). Vseeno pa je pomembno, da podatke podamo tako, da imajo biološki pomen, kajti s podatkom, da naš vzorec na primer vsebuje 50 kopij miRNA, ne povemo kaj dosti (54). Vendar so kljub temu podatki v nekaterih študijah podani kot surovi podatki, npr. kot  $C_q$  za določeno miRNA (28). V nekaterih študijah pa so podatki podani kot število kopij (ali  $C_q$ ) miRNA na ngRNA ali kot število kopij miRNA (ali  $C_q$ ) na  $\mu$ l plazme, kar pa je bolj smiselno. Ta postopek se imenuje absolutna kvantifikacija, za katero potrebujemo sintetične standarde s točno določenim številom kopij. Pogostejše so študije, ki ne uporabljajo absolutnega pristopa kvantifikacije, ampak podajo rezultat kot razmerje miRNA v enaki količini vzorca, kar imenujemo relativna kvantifikacija. Tak primer je razmerje izražanja miRNA med bolezenskih stanjem in normalnim stanjem (28).

V naši raziskavi smo se odločili za uporabo metode relativne kvantifikacije. Izražanje tarčnih genov smo zato podali kot mnogokratnik glede na kalibrator (54). Izračun vključuje tudi normalizacijo, s katero smo dosegli medsebojno primerljivost vzorcev (54, 59). Odločili smo se, da bomo za normalizacijo uporabili endogene referenčne gene in eksterno sintetično kontrolo. Pri izboru endogenih referenčnih genov obstajajo neenotnosti, njihov izbor pa je ključen element v postopku normalizacije (28). S pomočjo literature smo izbrali 4 potencialne endogene referenčne gene, in sicer SNORD96A, RNU-6, let-7a in miRNA-16 (28, 50). Ostale 4 gene smo izbrali glede na predhodno opravljeno analizo miRNA s pomočjo metode Nanostring. Za plazmo sta bila najbolj primerna gena miRNA-1226 in miRNA-338, za kosti pa miRNA-140 in miRNA-32. Potencialne kandidatne endogene referenčne gene smo nato analizirali in ovrednotili s pomočjo programa Normfinder na desetih vzorcih (5 osteoporoznih in 5 zdravih preiskovank). Izkazalo se je, da se gen let-7a

najbolj stabilno izraža (ima najnižjo stabilnostno vrednost, in sicer 1,927), poleg tega pa smo se odločili, da bomo kot endogeni referenčni gen izbrali tudi miRNA-16, saj tako priporoča literatura. Rezultati so podani v preglednici 8 in prilogi 2.

**Preglednica 8: Vrednosti stabilnosti za posamezno mikro RNA, pridobljene z Normfinderjem.**

<b>miRNA</b>	<b>Vrednost stabilnosti</b>
miRNA-140	3,183
miRNA-338	2,015
RNU6	7,022
SNORD 96a	4,902
let-7a	1,927
miRNA-16	13,484
miRNA-32	22,070

Sledila je določitev učinkovitosti pomnoževanja izbranih endogenih referenčnih genov, eksterne sintetične kontrole ter izbranih miRNA v vzorcih in kalibratorju. Učinkovitost pomnoževanja smo določili s pomočjo programa LinReg PCR. Enak pristop so uporabili tudi v članku C. Roberts s sod. (73). Alternativni pristop bi bil določitev učinkovitosti pomnoževanja s pomočjo umeritvene krivulje, kar pa v naši raziskavi zaradi neustrezne umeritvene krivulje ni bilo mogoče (54). V preglednici 9 so podane učinkovitosti pomnoževanja različnih genov.

**Preglednica 9: Učinkovitost pomnoževanja pridobljena s pomočjo LinReg PCR.**

<b>gen</b>	<b>učinkovitost pomnoževanja</b>
cel-miRNA-248	1,866
let-7a	1,893
miRNA-16	1,873
miRNA-574	1,871
miRNA-30e	1,855
miRNA-30d	1,885
miRNA-126	1,886
miRNA-148	1,899
miRNA-199	1,881

Po pridobljenih zgornjih podatkih smo izražanje določenega gena glede na kalibrator določili s pomočjo kvantitativne primerjalne  $\Delta\Delta C_t$  metode, oziroma Pfafflove metode, pri čemer smo uporabili dva pristopa (54, 59). Izbrane gene miRNA smo normalizirali s pomočjo eksterne sintetične kontrole cel-miRNA-248 in kalibratorja (enačba 1) ter na tak način upoštevali razlike v izolaciji, prepisu in podvajanju miRNA. Zagovornik te metode je tudi Mitchell s sod. (28, 50). Normalizacijo smo izvedli tudi z uporabo dveh endogenih referenčnih genov – miRNA-16 in let-7a, pri čemer smo pri izračunu upoštevali geometrijsko sredino (enačba 2). Zagovornik te metode je Vandesomepele s sod. (74). Rezultati so prikazani v preglednici 10.

Izračuni se med seboj razlikujejo glede na uporabljeno metodo, kar potrjuje dejstvo, da je normalizacija zares pomembna. Ker pa še ni definirano, katera metoda je bolj primerna, smo se odločili, da bomo statistično analizo naredili ločeno za rezultate, pridobljene s pomočjo eksterne sintetične kontrole, ter za rezultate, pridobljene s pomočjo endogenih referenčnih genov.

**Preglednica 10: Normalizirane povprečne Cq vrednosti za vzorce.**

Oznaka r pomeni izračun normalizirane vrednosti na osnovi endogenih referenčnih genov, oznaka s pa izračun na osnovi eksterne sintetične kontrole. Vz pomeni vzorec.

VZORCI	miRNA-574		miRNA-30e		miRNA-30d		miRNA-126		miRNA-148a		miRNA-199	
	r	s	r	s	r	s	r	s	r	s	r	s
vz2	1,89	1,24	2,96	1,94	2,06	1,35	0,88	0,57	1,04	0,68	1,1	0,72
vz3			1,17	0,22	0,47	0,09	0,45	0,09	1,7	0,32	0,19	0,04
vz4	1,44	1,07	3	2,22	2,18	1,61	1,19	0,88	1,07	0,79	1,38	1,02
vz5	1,14	1,13	2,12	2,1	1,45	1,43	0,7	0,69	0,89	0,88	1,36	1,34
vz6	1,31	1,47	2,75	3,07	1,89	2,11	1,3	1,45	1,12	1,26	1,76	1,97
vz7	11,14	8,45	0,7	0,53	0,26	0,2	0,25	0,19	0,98	0,74	0,12	0,09
vz8	1,19	1,28	0,62	0,66	0,21	0,23	0,15	0,16	0,3	0,32	0,08	0,09
vz9	2,84	1,48	1,23	0,64	0,44	0,23	0,46	0,24	0,76	0,4	0,12	0,06
vz10	9,23	6,4	0,88	0,61	0,39	0,27	0,31	0,21	1,65	1,14	0,22	0,15
vz11	7,08	2,92	0,99	0,41	0,55	0,23	0,45	0,19	1,69	0,7	0,32	0,13
vz12	4,04	2,87	0,8	0,57	0,39	0,28	0,31	0,22	0,78	0,55	0,08	0,06
vz13	2,8	1,14	1,3	0,52	0,51	0,21	0,22	0,09	0,52	0,21	0,1	0,04
vz15	1,25	1,05	0,84	0,7	0,48	0,4	0,24	0,2	1,26	1,06	0,15	0,13
vz16	5,29	3,7	1,2	0,84	0,59	0,41	0,33	0,23	0,83	0,58	0,09	0,06
vz18	3,16	1,32	1,96	0,82	0,84	0,35	0,5	0,21	0,67	0,28	0,3	0,13
vz19			1,89	0,55	0,82	0,24	0,38	0,11	0,88	0,25	0,11	0,03
vz20	3,52	2,66	0,66	0,49	0,31	0,23	0,21	0,16	0,57	0,43	0,08	0,06



vz21	5,26	1,89	1,4	0,5	0,83	0,3	0,5	0,18	1,3	0,47	0,28	0,1
vz22	7,76	5,31	0,97	0,67	0,72	0,49	0,35	0,24	0,61	0,42	0,34	0,23
vz23	1,89	0,92	1,17	0,57	0,42	0,2	0,26	0,13	0,8	0,39	0,09	0,05
vz25	0,96	0,57	1,23	0,74	0,58	0,35	0,29	0,18	1,1	0,66	0,09	0,05
vz27	3,43	1,9	1,1	0,61	0,54	0,3	0,29	0,16	0,78	0,43	0,1	0,06
vz30	3,6	2,02	1,17	0,66	0,61	0,34	0,37	0,21	0,81	0,46	0,14	0,08
vz33	6,48	4,87	1,55	1,17	0,49	0,37	0,36	0,27	1,06	0,79	0,19	0,15
vz35			1,31	0,79	0,65	0,39	0,29	0,17	0,71	0,43	0,17	0,1
vz36	2,91	4,26	0,94	1,38	0,51	0,75	0,25	0,37	0,72	1,05	0,09	0,14
vz38	11,33	11,92	0,72	0,75	0,37	0,39	0,25	0,26	1,2	1,26	0,11	0,11
vz39	1,25	1,12	1,37	1,23	0,59	0,53	0,29	0,26			0,16	0,15
vz40	5,92	3,12	1,23	0,65	0,59	0,31	0,3	0,16	1,16	0,61	0,16	0,08
vz41	6,46	5,82	1,28	1,16	0,54	0,48	0,3	0,27	0,5	0,45	0,15	0,14
vz42	6,56	5,25	1,55	1,24	0,52	0,42	0,25	0,2	0,7	0,56	0,09	0,07
vz43	5,69	4,39	1,16	0,9	0,51	0,39	0,26	0,2	0,69	0,53	0,08	0,07
vz44	14,01	6,57	1,34	0,63	0,53	0,25	0,29	0,14	0,89	0,42	0,17	0,08
vz45	23,79	28,82	0,69	0,84	0,34	0,42	0,29	0,35	0,5	0,61	0,1	0,12
vz46	4,92	5,21	0,8	0,84	0,33	0,35	0,3	0,32	0,59	0,63	0,1	0,11
vz50	12,17	12,37	0,69	0,7	0,31	0,32	0,3	0,3	1,03	1,04	0,17	0,18
vz51	15,09	5,35	2,07	0,73	0,67	0,24	0,51	0,18	2,22	0,79	0,11	0,04
vz52			0,61	0,44	0,22	0,15	0,27	0,19	0,9	0,64	0,1	0,07
vz53	4,21	2,71	1,08	0,69	0,36	0,23	0,27	0,17	0,57	0,36	0,12	0,07
vz54	21,74	54,78					0,11	0,29	0,11	0,27		
vz55			0,98	0,5	0,39	0,2	0,55	0,28	1,11	0,57	0,09	0,05
vz56	4,05	1,93	1,25	0,6	0,49	0,23	0,42	0,2	0,77	0,37	0,16	0,08
vz57	9,21	13,63	0,57	0,85	0,38	0,56	0,42	0,62	1,04	1,54	0,39	0,58
vz60	9,05	13,4	0,49	0,72	0,22	0,33	0,22	0,33	0,89	1,32	0,11	0,17
vz61							0,12	0,28	0,1	0,23	0,02	0,05
vz62	4,94	1,38	1,31	0,37	0,47	0,13	0,35	0,1	0,8	0,22	0,11	0,03
vz63	36,64	27,62	0,66	0,5	0,27	0,2	0,24	0,18	0,9	0,68	0,16	0,12
vz64	6,4	1,67	1,47	0,38	0,53	0,14	0,36	0,09	0,88	0,23	0,12	0,03
vz65	31,51	40,01					0,15	0,19			0,03	0,04
vz66	13,43	5	1,54	0,57	0,68	0,25	0,72	0,27	1,42	0,53	0,21	0,08
vz67	7,46	6,25	0,84	0,7	0,49	0,41	0,41	0,34	0,94	0,79	0,1	0,09
vz68							0,05	0,12			0,06	0,13
vz69	10,28	4,05	1,03	0,41	0,34	0,13	0,37	0,15	0,8	0,32	0,15	0,06
vz70	6,03	16,73	0,46	1,29	0,22	0,6	0,19	0,52	0,55	1,54	0,07	0,19
vz71	7,14	6,3	0,65	0,57	0,38	0,33	0,36	0,32	1,22	1,08	0,05	0,05
vz72	4,24	2,92	0,86	0,59	0,38	0,26	0,41	0,29	1,21	0,83	0,22	0,15
vz73	16,92	10,94	0,53	0,34	0,36	0,24	0,33	0,21	1,28	0,83	0,22	0,14

vz74	6,96	4,19	0,71	0,43	0,42	0,25	0,33	0,2	1,04	0,63	0,19	0,11
vz75	8,85	4,56	0,76	0,39	0,34	0,17	0,46	0,24	1,42	0,73	0,2	0,1
vz76	6,74	8,73	0,52	0,68	0,24	0,32	0,42	0,55	0,82	1,06	0,36	0,47
vz77	5,42	2,63	1,57	0,76	0,52	0,25	0,34	0,16	0,76	0,37	0,12	0,06
vz78	5,71	6,93	0,61	0,74	0,29	0,35	0,3	0,36	1,1	1,33	0,24	0,29
vz79	17,69	10,06	1,16	0,66	0,68	0,39	0,57	0,32	2,59	1,47	0,43	0,25
vz80	15,49	5,13	1,65	0,55	0,78	0,26	0,74	0,24	1,68	0,56	0,42	0,14
vz86	5,24	1,3	1,69	0,42	0,45	0,11	0,45	0,11	0,86	0,21	0,14	0,04
vz87			1,24	0,74	0,46	0,27	0,4	0,24	0,84	0,5	0,17	0,1
vz88	2,77	1,92	0,71	0,49	0,33	0,23	0,31	0,22	1,05	0,73	0,08	0,06
vz89	17,27	13,09	0,72	0,55	0,33	0,25	0,27	0,2	0,66	0,5	0,1	0,08
vz90	6,91	3,91	0,76	0,43	0,36	0,2	0,37	0,21	1,09	0,61	0,14	0,08
vz92	14,34	16,73	0,73	0,85	0,39	0,46	0,57	0,66	1,61	1,87	0,3	0,35
vz93	2,5	1,23	0,9	0,44	0,44	0,22	0,43	0,21	0,67	0,33	0,11	0,06
vz95	2,6	2,17	0,95	0,79	0,47	0,39	0,37	0,31	1	0,84	0,13	0,11
vz96			1,12	0,69	0,49	0,3	0,3	0,19	0,71	0,44	0,04	0,02
vz97	3,77	1,46	1,27	0,49	0,44	0,17	0,32	0,12	0,89	0,35	0,07	0,03

#### 4.4 Določitev kliničnega pomena izbranih mikro RNA

Naš namen je bil ugotoviti, ali obstaja statistično pomembna razlika v izražanju miRNA 30d-5p, 30e-5p, 126-3p, 148a-3p, 199a-3p in 574-5p med skupino z osteoporozo ter kontrolno skupino, in če obstaja statistično pomembna povezava med plazemskimi koncentracijami izbranih miRNA ter kliničnimi kazalci osteoporoze – FRAX, TBS in MKG. S tem namenom smo izbrane neodvisne spremenljivke (količina izbranih miRNA, FRAX, TBS, MKG, telesna masa, telesna višina, leta mene) kvantitativno obdelali s pomočjo statističnega orodja SPSS.

Najprej smo vse podatke transformirali na 4 načine – s pomočjo logaritmiranja, korenjenja, kvadriranja in recipročnih vrednosti. Na tak način smo želeli doseči normalnost porazdeljevanja, kar bi nam omogočilo uporabo parametričnih testov, ki imajo večjo statistično moč (75). Nato smo preverili normalnost porazdelitve različnih parametrov za vsako transformacijo posebej, pri čemer smo uporabili bolj natančen Shapiro-Willkov test, saj v primerjavi z Kolmagorov-Smirnov testom ta uporabi strožje kriterije za normalnost porazdeljevanja (60). Porazdelitev je normalna, kadar je  $p > 0,05$  v obeh skupinah. Normalno so se porazdeljevali naslednji parametri: tel\_masa, MKG\_troch, MKG\_podlahti,

TBS, logTM, logTV, logLM, logMKG\_troch, logMKG\_inter, logMKG\_Is, logFRAX\_K\_brez, logFRAX\_K\_zMKG, logTBS, logmiRNA\_30e\_r, logmiRNA\_126\_r, logmiRNA\_574\_r, sqrtTM, sqrtTV, sqrtLM, sqrtMKG\_troch, sqrtMKG\_inter, sqrtTBS, sqrtmiRNA\_148\_s, obratno\_TM, obratno\_TV, obratno\_MKG\_fn, obratno\_MKG\_troch, obratno\_MKG\_th, obratno\_MKG\_Is, obratno\_TBS, obratno\_miRNA\_7d\_r, obratno\_miRNA\_30e\_s, obratno\_MKG\_miRNA\_30d\_r, square\_TV, square\_MKG\_podlaht ter square\_TBS. Vsi ostali parametri pa so se porazdeljevali nenormalno in smo pri nadaljnji analizi zanje uporabili neparametrične teste (60).

#### 4.4.1 Razlika izražanja mikro RNA med skupinama

Zanimalo nas je, ali se preučevani skupini razlikujeta v koncentracijah izbranih plazemskih miRNA. Signifikantna razlika med skupinama je zaželeno ( $p < 0,05$ ), saj si želimo, da bi lahko ločili osteoporozne od neosteoporoznih preiskovank glede na izražanje določenih miRNA.

Z uporabo neodvisnega t testa in Mann Whitney U testa smo preverili, ali se izražanje izbranih miRNA razlikuje med skupino preiskovank z osteoporozo in kontrolno skupino. Rezultati testov so prikazani v preglednici 11.

#### **Preglednica 11: Izražanje mikro RNA v skupini preiskovank z osteoporozo ter v kontrolni skupini.**

OP-osteoporozna, \* parametrični t test, \*\* neparametrični Mann Whitney U test

	Mediana skupine z OP (1)	1.kvartil skupine z OP (1)	3.kvartil skupine z OP (1)	Mediana kontrolne skupine (0)	1.kvartil kontrolne skupine (0)	3.kvartil kontrolne skupine (0)	P vrednost
miRNA_574_r*	7,0814	4,0387	14,3424	6,4418	3,4333	11,1079	0,504
miRNA_126_r*	0,3277	0,2926	0,5483	0,3287	0,2502	0,4066	0,147
miRNA_30e_r*	0,9833	0,73	1,5082	1,1209	0,6731	1,4101	0,586
miRNA_148_s*	0,7107	0,5512	1,2554	0,5308	0,3336	0,8306	0,044
miRNA_30d_r*	0,4721	0,3879	0,5939	0,4576	0,3222	0,5587	0,086
miRNA_30e_s*	0,8177	0,4917	1,233	0,6628	0,4962	0,7811	0,927
miRNA_30d_s**	7,0814	4,0387	14,3424	6,4418	3,4333	11,1079	0,164
miRNA_126_s**	0,3277	0,2926	0,5483	0,3287	0,2502	0,4066	0,244
miRNA_148_r**	0,9833	0,73	1,5082	1,1209	0,6731	1,4101	0,103

miRNA_199_r**	0,7107	0,5512	1,2554	0,5308	0,3336	0,8306	0,806
miRNA_199_s**	0,4721	0,3879	0,5939	0,4576	0,3222	0,5587	0,855
miRNA_574_s**	0,8177	0,4917	1,233	0,6628	0,4962	0,7811	0,299

Izražanje miRNA-148\_s se signifikantno loči med preučevanima skupinama, pri čemer je izražanje miRNA-148\_s v skupini z osteoporozo zvišano glede na kontrolno skupino. Tudi Seelinger s sod. je v svoji raziskavi dokazal zvišano izražanje miRNA-148a v skupini bolnic z osteoporozo v primerjavi s kontrolno skupino preiskovank brez osteoporoze (26). Posledično bi miRNA-148a lahko predstavljala potencialni kazalec za diagnozo osteoporoze.

Sellinger s sod. je delal raziskave tudi na kostnih vzorcih in dodatno dokazal zvišano izražanje miRNA-21, miRNA-23a, miRNA-24, miRNA-25, miRNA-100, miRNA-125b (26).

Ostale miRNA ne izkazujejo pomembno različnega izražanja v skupini bolnic z osteoporozo v primerjavi s kontrolno skupino. Razlog bi lahko bil posledica uporabe majhnega števila preiskovank z osteoporozo ter na splošno majhnega števila preiskovank, vključenih v raziskavo. Poleg tega pa se skupini med seboj pomembno ločita glede na telesno maso, telesna masa pa je eden izmed dejavnikov, ki vpliva na pojavnost osteoporoze, kar pa bi bilo potrebno upoštevati v nadaljnjih raziskavah.

Tudi Seelinger s sod. v svoji raziskavi ni dokazal statistično pomembne razlike v izražanju miRNA 30d, 30e in 126 v skupini z osteoporozo glede na kontrolno skupino zdravih preiskovank, pri čemer je pomanjkljivost tudi njegove raziskave majhen preučevani vzorec – 10 osteoporoznih in 10 zdravih preiskovank (26).

#### **4.4.2 Korelacija mikro RNA s parametri tveganja za razvoj osteoporoze**

Želeli smo preučiti ali obstaja statistično pomembna povezanost med izbranimi miRNA in parametri tveganja za razvoj osteoporoze v celotni populaciji preiskovank (60). Zato smo najprej preverili, ali se preučevani skupini razlikujeta v povprečnih vrednostih parametrov tveganja za razvoj osteoporoze. Signifikantna razlika med skupinama je zaželeno ( $p < 0,05$ ), saj si želimo, da bi lahko ločili osteoporozne od neosteoporoznih preiskovank s pomočjo parametrov tveganja za razvoj osteoporoze in bi tako s korelacijo med izbranimi miRNA in parametri tveganja za razvoj osteoporoze lahko določili miRNA, ki bi bile potencialno lahko vpletene v pojavnost osteoporoze.

S pomočjo neodvisnega t-testa ter Mann-Whitney U testa (neparametrično različico t testa) smo najprej preučili porazdelitev parametrov tveganja med skupinama. Rezultati so podani v preglednici 12 (60).

**Preglednica 12: Rezultati t-testa normalno porazdeljenih kliničnih parametrov tveganja ter rezultati Mann-Whitney U testa nenormalno porazdeljenih kliničnih parametrov tveganja.**

Obratno - rezultat pridobljen z recipročno transformacijo, MKG – mineralna kostna gostota kosti, fn - stegnenični vrat, troch - trohanter, inter – intertrohanter, th - torahalna vretenca, ls - ledvena vretenca, TBS – rezultat kvalitete kostne trabekule, (ang. Trabecular bone score), podlaht – podlahti, radius – 1/3 podlahti, FRAX – orodje za oceno tveganja zloma kosti, M – zlom drugih kosti, K – zlom kolka, brez – v FRAX izračunu se ne upošteva MKG, zMKG – v FRAX izračunu se upošteva MKG, OP-osteoporoza \* parametrični t test, \*\* neparametrični Mann-Whitney U test

	Mediana skupine z OP (1)	1.kvartil skupine z OP (1)	3.kvartil skupine z OP (1)	Mediana kontrolne skupine (0)	1.kvartil kontrolne skupine (0)	3.kvartil kontrolne skupine (0)	P vrednost
MKG_fn*	0,604	0,5625	0,6735	0,713	0,658	0,7745	0,001
MKG_troch*	0,573	0,515	0,6005	0,649	0,6085	0,696	<0,001
MKG_inter*	0,924	0,8775	0,969	1,07	0,9725	1,1375	<0,001
MKG_th*	0,76	0,73	0,811	0,895	0,8185	0,947	<0,001
MKG_ls*	0,715	0,656	0,7725	0,926	0,844	0,9985	<0,001
TBS*	1,304	1,1905	1,35	1,3165	1,25325	1,37925	0,071
MKG_podlaht**	0,463	0,423	0,499	0,541	0,50425	0,5775	<0,001
MKG_radius**	0,566	0,51	0,6095	0,641	0,62225	0,68875	<0,001
FRAX_M_brez**	9	6,3	14,5	5,95	4,15	11,75	0,054
FRAX_K_brez**	1,7	1,25	4,3	0,75	0,4	1,875	0,006
FRAX_M_zMKG**	8,2	6,15	16,5	6,15	4,6	11	0,037
FRAX_K_zMKG**	1,5	0,85	5,4	0,6	0,225	1,6	0,002

Kot smo pričakovali, se skupini med seboj pomembno ločita po vseh izmerjenih vrednostih MKG, saj je bila vrednost MKG, oziroma T vrednost, kriterij za razdelitev preiskovank v preiskovani skupini. Tudi vrednosti MKG so v skupini preiskovank brez osteoporoze pričakovano višje v primerjavi s skupino preiskovank z osteoporozo. Skupini smo med

seboj primerjali tudi glede na povprečne FRAX vrednosti. Opazimo lahko, da se osteoporozna in kontrolna skupina med seboj razlikujeta glede na večino FRAX vrednosti, pri čemer imajo osteoporozne bolnice višje FRAX vrednosti. Rezultat je v skladu s pričakovanjem, saj višja FRAX vrednost predstavlja večjo verjetnost za osteoporozni zlom. Pri FRAX\_M\_brez vrednosti pa ne opazimo signifikantne razlike med preiskovanima skupinama. Razlog bi lahko bil manj natančen izračun tovrstne FRAX vrednosti, saj izračun ne upošteva vrednosti MKG (76). Skupini pa se med seboj signifikantno ne ločita po TBS vrednostih, kar pa ni v skladu s pričakovanji, saj so TBS vrednosti povezane z mikroarhitekturo kostnega tkiva in verjetnostjo za osteoporozni zlom ter predstavljajo najnovejši klinični parameter, s katerim lahko opredelimo osteoporozo. Vrednosti TBS  $\geq 1,3$  pomenijo normalno mikroarhitekturo kosti, vrednosti TBS  $\leq 1,2$  pa spremenjeno mikroarhitekturo kosti (27). Vrednosti obeh skupin se gibljejo okoli 1,3, pri čemer so povprečne vrednosti TBS v skupini preiskovank brez osteoporoze nekoliko višje kot v skupini preiskovank z osteoporozo, vendar razlika statistično ni pomembna. Nesignifikantna razlika med skupinama bi lahko bila tudi posledica majhne populacije preiskovank.

Nadalje smo z uporabo Spermanovega neparametričnega testa preučili, ali obstaja statistično pomembna povezanost med izbranimi miRNA in parametri tveganja za razvoj osteoporoze v celotni populaciji preiskovank (60). Rezultati so prikazani v preglednici 13.

**Preglednica 13: Prikaz korelacij med mikro RNA in kliničnimi osteoporoznimi parametri.**

Sivo obarvana polja predstavljajo statistično pomembno korelacijo med določeno miRNA in kliničnim parametrom. miR pomeni miRNA

		miR_30d_r	miR_30d_s	miR_30e_r	miR_30e_s	miR_126_r	miR_126_s	miR_148_r	miR_148_s	miR_199_r	miR_199_s	miR_574_r	miR_574_s
MKG_fn	$\rho$	-,068	-,117	-,146	-,167	-,120	-,174	-,007	-,130	-,112	-,109	,057	-,022
	P	,607	,372	,266	,203	,343	,169	,955	,311	,379	,390	,663	,865
MKG_troch	$\rho$	-,237	-,267	-,213	-,271	-,191	-,247	-,118	-,188	-,171	-,087	,025	-,031
	P	,068	,039	,103	,036	,131	,049	,356	,141	,177	,496	,846	,813
MKG_inter	$\rho$	-,154	-,132	-,215	-,175	-,143	-,091	-,014	-,011	-,030	,055	,191	,110
	P	,241	,315	,099	,180	,261	,474	,911	,934	,813	,667	,140	,397
MKG_th	$\rho$	-,145	-,170	-,191	-,206	-,158	-,177	-,052	-,119	-,098	-,030	,097	,024
	P	,270	,194	,143	,115	,212	,162	,683	,353	,440	,817	,455	,851
MKG_ls	$\rho$	-,116	-,105	-,016	-,051	-,009	-,112	-,063	-,147	,019	,058	-,112	-,184
	P	,378	,425	,903	,701	,944	,378	,622	,250	,882	,647	,389	,155
MKG_podla	$\rho$	-,193	-,294	-,090	-,256	,074	-,028	,035	-,059	,032	,018	-,078	-,127

ht	P	,144	,024	,500	,051	,566	,828	,790	,648	,801	,891	,554	,334
MKG_radius	$\rho$	-,236	-,278	-,115	-,247	,147	,045	,173	,054	,063	,071	-,081	-,114
	P	,072	,033	,386	,060	,250	,729	,178	,678	,625	,581	,539	,387
FRAX_M_brez	$\rho$	,357	,239	,248	,205	-,007	-,040	-,074	-,151	,001	-,029	,074	,039
	P	,005	,066	,056	,116	,953	,756	,566	,238	,996	,818	,569	,767
FRAX_K_brez	$\rho$	,298	,296	,191	,270	-,004	,034	,022	-,038	,006	,045	,124	,126
	P	,021	,022	,144	,037	,978	,790	,864	,765	,962	,724	,341	,334
FRAX_M_zMKG	$\rho$	,280	,144	,236	,144	,015	-,026	-,099	-,132	,013	-,019	,064	,044
	P	,030	,273	,069	,274	,907	,836	,441	,304	,921	,883	,622	,733
FRAX_K_zMKG	$\rho$	,200	,195	,195	,215	,107	,138	,044	,078	,123	,123	,077	,106
	P	,126	,135	,135	,099	,402	,275	,731	,542	,334	,334	,556	,416
TBS	$\rho$	-,295	-,117	-,223	-,053	-,032	,168	,076	,171	,013	,228	,170	,213
	P	,023	,378	,089	,691	,803	,188	,558	,184	,917	,072	,194	,102

Iz rezultatov je razvidno, da med MKG\_troch ter miRNA\_30d\_s, miRNA\_30e\_s in miRNA\_126\_s ter med MKG\_podlaht in MKG\_radius ter miRNA\_30d\_s obstaja statistično pomembna povezava, pri čemer gre za šibko negativno korelacijo, kar pomeni, da gre za obratno sorazmeren odnos med spremenljivkama, iz česar lahko sklepamo, da so našete miRNA povezane s pojavnostjo osteoporoze, saj večje izražanje miRNA pomeni manjšo vrednost MKG, manjša MKG pa je povezana s pojavov osteoporoze. FRAX\_M\_brez, FRAX\_M\_zMKG ter TBS pa statistično pomembno korelirajo z miRNA\_30d\_r. Pomembna je tudi korelacija med FRAX\_K\_brez ter miRNA\_30d\_r, miRNA\_30d\_s ter miRNA\_30e\_s. Korelacija miRNA s FRAX parametri je šibko pozitivna, kar pomeni, da je povečano izražanje miRNA povezano z višjo FRAX vrednostjo, kar se odraža v povečanem tveganju za osteoporozni zlom. Korelacija med miRNA in TBS vrednostim pa je šibko negativna, kar je tudi v skladu s pojavnostjo osteoporoze in še dodatno potrjuje vpletenost naštetih miRNA v pojav osteoporoze. Zato menimo, da bi miRNA 30d, 30e in 126 lahko predstavljale potencialen diagnostični kazalec za osteoporozo, pri čemer pa bi bilo potrebno izražanje miRNA preučiti na večji populaciji preiskovank, saj bi si dodatno želeli, da bi se izražanje miRNA ločilo med skupino z osteoporozo in kontrolno skupino, kar je tudi osnovni pogoj, da določen parameter lahko uporabimo kot diagnostični kazalec.

Zanimala nas je tudi korelacija izražanja miRNA med seboj. Rezultati korelacije so prikazani v preglednici 14 in prilogi 3.

**Preglednica 14: Prikaz korelacij med mikro RNA.**

		miR_30d_r	miR_30d_s	miR_30e_r	miR_30e_s	miR_126_r	miR_126_s	miR_148_r	miR_148_s	miR_199_r	miR_199_s	miR_574_r	miR_574_s
miR_30d_r	$\rho$	1,000	,391**	,874**	,371**	,482**	-,063	,096	-,248	,288*	-,044	-,263	-
	P		,002	<0,001	,004	<0,001	,635	,472	,058	,025	,741	,057	,001
miR_30d_s	$\rho$	,391**	1,000	,151	,911**	,015	,649**	-,040	,550**	,190	,515**	-,158	,147
	P	,002		,248	<0,001	,909	<0,001	,763	<0,001	,145	<0,001	,259	,294
miR_30e_r	$\rho$	,874**	,151	1,000	,278*	,524**	-,190	,006	-	,225	-,145	-	-
	P	,000	,248		,031	<0,001	,146	,962	,430**	,001	,084	,270	,004
miR_30e_s	$\rho$	,371**	,911**	,278*	1,000	-,014	,579**	-,228	,381**	,088	,423**	-,243	,073
	P	,004	,000	,031		,917	<0,001	,083	,003	,506	,001	,080	,606
miR_126_r	$\rho$	,482**	,015	,524**	-,014	1,000	,192	,543**	,097	,636**	,221	-,162	-,341*
	P	<0,001	,909	<0,001	,917		,128	<0,001	,456	<0,001	,084	,234	,010
miR_126_s	$\rho$	-,063	,649**	-,190	,579**	,192	1,000	,189	,727**	,305*	,657**	,062	,365**
	P	,635	<0,001	<0,001	<0,001	,128		,144	<0,001	,016	<0,001	,651	,006
miR_148_r	$\rho$	,096	-,040	,006	-,228	,543**	,189	1,000	,518**	,658**	,430**	,145	,008
	P	,472	,763	,962	,083	<0,001	,144		<0,001	<0,001	,001	,297	,955
miR_148_s	$\rho$	-,248	,550**	-	,381**	,097	,727**	,518**	1,000	,409**	,767**	,181	,476**
	P	,058	<0,001	,430**	,001	,003	,456	<0,001	<0,001		,001	<0,001	,191
miR_199_r	$\rho$	,288*	,190	,225	,088	,636**	,305*	,658**	,409**	1,000	,706**	-,025	-,094
	P	,025	,145	,084	,506	<0,001	,016	<0,001	,001		<0,001	,854	,490
miR_199_s	$\rho$	-,044	,515**	-,145	,423**	,221	,657**	,430**	,767**	,706**	1,000	,042	,242
	P	,741	<0,001	,270	,001	,084	<0,001	,001	<0,001	<0,001		,757	,073
miR_574_r	$\rho$	-,263	-,158	-	-,243	-,162	,062	,145	,181	-,025	,042	1,000	,890**
	P	,057	,259	,384**	,004	,080	,234	,651	,297	,191	,854	,757	
miR_574_s	$\rho$	-	,147	-	,073	-,341*	,365**	,008	,476**	-,094	,242	,890**	1,000
	P	,453**	,294	,585**	,000	,606	,010	,006	,955	<0,001	,490	,073	<0,001

Opazimo lahko, da med izbranimi miRNA obstaja kar nekaj statistično pomembnih šibkih korelacij, kar pomeni, da je izražanje nekaterih miRNA pri osteoporozi sočasno. Lastnost sočasnega izražanja miRNA bi lahko izkoristili pri diagnostiki, saj če bi bile diagnostično



pomembne miRNA v korelaciji, ali pa če bi bile miRNA vključene v isto metabolično pot, bi lahko določali manjše število miRNA.

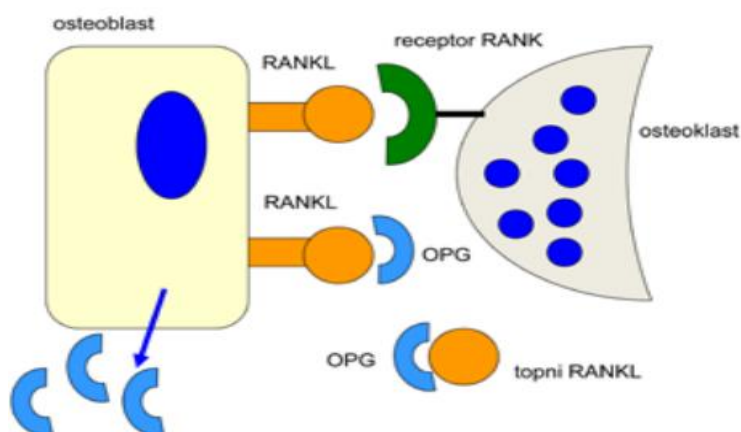
#### **4.4.3 Določitev potencialnega mehanizma delovanja mikro RNA 30d – 5p , 30e – 5p, 126-3p ter 148a-3p in opis glavnih dveh signalnih poti**

Zanimal nas je potencialni mehanizem vpletenosti miRNA 30d, 30e in 126 in 148a v osteoporozo, saj so našteje miRNA izkazale korelacijo s kazalci tveganja za razvoj osteoporoze, oziroma sta se preučevani skupini ločili glede na izražanje miRNA. Posledično bi našteje miRNA lahko služile kot potencialen klinični kazalec osteoporoze.

S pomočjo pregleda predvidenih tarčnih genov delovanja miRNA z bazo TargetScan (77) ter s pomočjo pregleda potencialne vpletenosti miRNA v signalne poti z bazo Diana TOOLS (78) smo določili potencialen mehanizem delovanja zgoraj naštetih miRNA.

MiRNA-148a-3p potencialno deluje na gen MAFB (V-maf muskuloaponevrotični fibrosarkom onkogen homolog B), kar smo ugotovili s pomočjo podatkovne baze TargetScan (77), kar je tudi skladno z raziskavo Seelinger s sod. (31). Seelinger je v raziskavi pojasnil tudi mehanizem delovanja miRNA (slika 9). MiRNA-148a naj bi delovala kot negativni regulator MAFB in tako posledično spodbuja regulatorni sistem RANKL/RANK/OPG ter diferenciacijo osteoklastov, kar pa je povezano z nastankom osteoporoze (31).

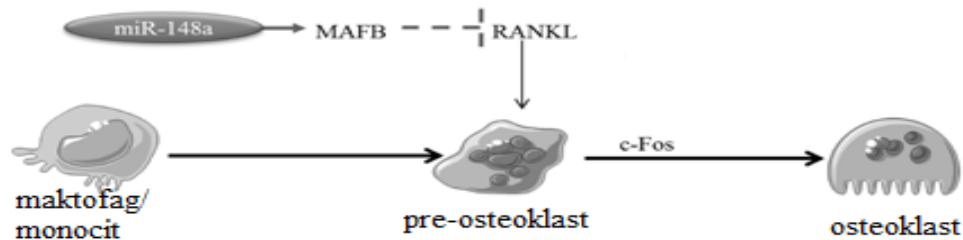
Signalna pot RANKL/RANK/OPG je glavni sistem, ki nadzoruje diferenciacijo osteoklastov. Podroben mehanizem delovanja je prikazan na sliki 8.



**Slika 8: Signalna pot RANKL/RANK/OPG. Prirejeno po (31).**

Osteoblasti izločajo RANKL (ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B) in OPG (osteoprotgerin). Po vezavi RANKL na receptor RANK (receptor za aktivacijo

jedrnega dejavnika  $\kappa B$ ), ki se nahaja na površini osteoklastov, pride do aktivacije jedrnega dejavnika  $\kappa B$ , ta pa aktivira NFATC1 in C-FOS – jedrna dejavnika, odgovorna za prepis osteoklastnih genov, kar vodi v diferenciacijo osteoklastov. OPG pa je inhibitor RANKL in prepreči osteoklastogenezo (4, 31).

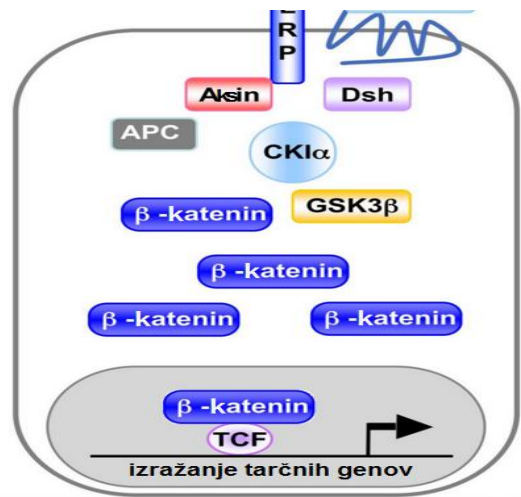


**Slika 9: Vpletenost mikro RNA-148a v osteoklastogenezo. Prirejeno po (31)**

MAFB negativno regulira RANKL, kar je povezano z zmanjšanim izražanjem RANKL in posledično zmanjšano aktivacijo jedrnega transkripcijskega faktorja c-Fos in tako zmanjšano diferenciacijo pre-osteoklastov v osteoklaste (79, 80). V primeru zaviralnega delovanja miRNA-148a pride do povečanega izražanja RANKL, kar vodi v osteoklastogenezo.

Potencialno vpletenost miRNA-126, miRNA-30d in miRNA-30e v signalno pot WNT ter v diferenciacijo osteoklastov smo določili s pomočjo podatkovne baze Diana Mirpath 2,0 (78).

Kanonična signalna pot  $\beta$ -katenin/WNT je ključna pri diferenciaciji in preživetju osteoblastov. Podroben mehanizem delovanja je predstavljen na sliki 10.

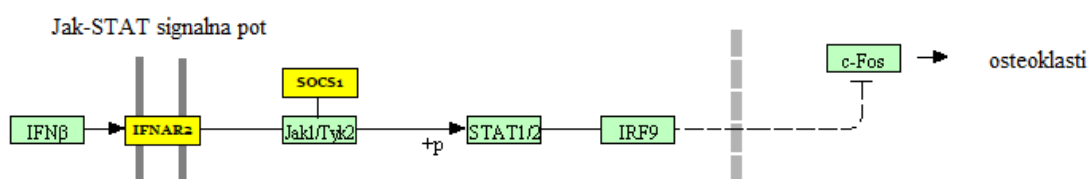


**Slika 10: Signalna pot  $\beta$ -katenin/WNT. Prirejeno po (81).**

WNT protein se veže na receptorski kompleks, ki ga sestavljata LRP in protein Frizzled. To vodi do nastanka kompleksa med aksinom, DSH in APC, kar vodi do inhibicije aktivnosti GSK3 $\beta$ , ki je odgovoren za fosforilacijo  $\beta$  katenina. Posledično se  $\beta$  katenina kopiči v citoplazmi in nato prehaja v jedro, kjer se veže na transkripcijske faktorje

TCF/LEF1 in tako sproži izražanje tarčnih genov, med drugim tudi OPG in RUNX2 (4, 31).

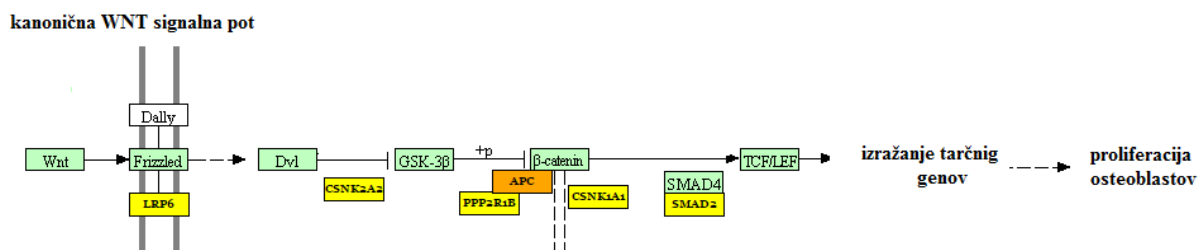
Slika 11 prikazuje normalen potek signalne poti Jak-STAT, ki predstavlja eno izmed signalnih poti, ki so vpletene v diferenciacijo osteoklastov. Z rumeno so označeni tarčni geni naštetih miRNA. Zmanjšano izražanje SOCS<sub>1</sub> in IFNAR<sub>2</sub> genov vodi v manjši zaviralen učinek IRF9 na c-Fos. Posledično se poveča izražanje transkripcijskega dejavnika c-Fos, ki je eden ključnih dejavnikov, odgovornih za pretvorbo preosteoklastov v osteoklaste (80). Poveča se število in aktivnost osteoklastov, kar pa je povezano s pojavom osteoporoze (78).



**Slika 11: Diferenciacija osteoklastov po signalni poti Jak-STAT in vpletenost c-Fos transkripcijskega faktorja. Prirejeno po (82).**

Po signalni poti Jak – STAT poteka prenos informacije iz izvenceličnega prostora do jedra, kjer vpliva na DNA transkripcijo in izražanje genov, ki sodelujejo v osteoklastogenezi. Glavne tri komponente signalne poti Jak-STAT so: receptor IFNAR2, JAK (kinaza) in STAT protein, ki se aktivira z fosforilizacijo ter nato integrira z jedrnimi proteini, kot je IRF9, ta pa negativno regulira transkripcijo c-Fos transkripcijskega faktorja, odgovornega za pretvorbo preosteoklastov v osteoklaste (82).

Slika 12 prikazuje normalen potek kanonične signalne poti β-katenin/WNT. Z rumeno in oranžno so označene potencialne tarče delovanja naštetih miRNA. Naštete miRNA negativno regulirajo izražanje označenih genov, kar vodi v zmanjšano proliferacijo osteoblastov in pojavnost osteoporoze (78).



**Slika 12: Kanonična signalna pot β-katenin /WNT. Prirejeno po (78).**

Aktivacija signalne poti WNT/β-katenin poteka preko tvorbe kompleksa WNT/LRP/protein Frizzled, kar povzroči fosforilizacijo LRP receptorja in nastanka receptorja za aksin, kamor se vežeta še GSK in APC. Nastali kompleks zavira aktivnost GSK, katerega funkcija je aktivacija β-katenina. Posledično se β-katenin kopiči v

citoplazmi in nato prehaja v jedro, kjer se  $\beta$ -katenin veže na transkripcijske dejavnike TCF/LEF in tako povzroči izražanje tarčnih genov ter proliferacijo osteoblastov, ki pa so udeleženi v tvorbi kostnine (31).

Dosedanje raziskave so eksperimentalno potrdile vpletenost miRNA 30d in 30e v kanonično signalno pot  $\beta$ -katenin/WNT. MiRNA-30d-5p in miRNA-30e-5p naj bi tako delovali kot negativni regulator na diferenciacijo osteoblastov (usmerita pretvorbo specifičnih zarodnih celic v maščobne celice). Tarčni molekuli miRNA-30d-5p sta Smad 1 in Runx2 (38 – 40).

Tarčna molekula miRNA-30e-5p pa je LRP6 (41). Vsi naštetih faktorji so vpleteni v osteoblastogenezo, njihovo zaviranje pa vodi v pojav osteoporoze.

Eksperimentalno potrjeni geni s pomočjo TARBASE Diana TOOLS za miRNA-30d-5p so Runx2, SOCS<sub>1</sub>, IFNAR<sub>2</sub> in LRP6, za miRNA-30e-5p pa SOCS<sub>1</sub>, IFNAR<sub>2</sub> in WNT5B (83).

## 5. SKLEP

V magistrski nalogi smo v plazmi določili izražanje miRNA 30d-5p, 30e-5p, 126-3p, 148a-3p, 199a-3p in 574-5p pri pomenopavzih preiskovankah z osteoporozo ter pri zdravih posameznicah. S pomočjo programskih orodij Diana Mirpath in TargetScan smo nato določili potencialen mehanizem delovanja miRNA 30d, 30e, 126 in 148a.

Ugotovili smo:

- da se preiskovani skupini statistično pomembno ločita glede na telesno maso, medtem ko je razlika v telesni višini in letih mene statistično nepomembna;
- da se izražanje miRNA 148a-3p med preiskovanima skupinama statistično razlikuje, pri čemer gre za povečano izražanje v skupini preiskovank z osteoporozo;
- da se izražanje posameznih miRNA 30d-5p, 30e-5p, 126-3p, 199a-3p in 574-5p ne loči med skupinama;
- dokazali smo statistično pomembno korelacijo med miRNA 30d, 30e in 126 ter kazalci tveganja za razvoj osteoporoze - FRAX, MKG, TBS. Pri tem miRNA korelirajo šibko pozitivno s FRAX in šibko negativno z MKG ter TBS;
- dokazali smo korelacijo med nekaterimi miRNA;
- da je miRNA-148a potencialno vpletena v RANKL/RANK/OPG signalno pot, miRNA 30d, 30e in 126 pa v osteoklastno diferenciacijo in kanonično  $\beta$ -katenin/WNT signalno pot;
- da kljub temu, da obstaja majhno število študij, se naši rezultati ujemajo s primerljivimi študijami;

Tako lahko zaključimo, da plazemske miRNA 148a, 126, 30d in 30e zaradi vpletenosti v osteoporozo lahko predstavljajo potencialen diagnostični kazalec osteoporoze, pri čemer bi bilo rezultate potrebno potrditi na večji populaciji preiskovank. Teoretične mehanizme delovanja miRNA pa bi bilo priporočljivo eksperimentalno potrditi.

## 6. LITERATURA

1. Jayaeaj GG, Nathan S, Maiti S: Nonconventional chemical inhibitors of microRNA: therapeutic scope. *Chem Commun* 2015; 51: 820-831.
2. Caitlin CM, Kerin MJ, Brown JA, Sweeney KJ: Evolution of a research field- a micro (RNA) example. *PeerJ* 2015.
3. Bratkovič T, Glavan G, Štukelj B, Živin M, Rogelj B: Exploiting microRNAs for cell engineering and therapy. *Biotechnology Advances* 2012; 30: 753-765.
4. Vrtačnik P, Marc J, Ostanek B: Epigenetic mechanisms in bone. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52: 589-608.
5. Li Z, Rana TM: Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nature Reviews Drug Discovery* 2014; 13: 622-638.
6. Ha M, Narry Kim V: Regulation of microRNA biogenesis. *Molecular Cell Biology* 2014.
7. Marsico A, Huska MR, Lasserre J, Hu H, Vucicevic D, Musahl A, Orom U, Vingron M: PROMiRNA: a new miRNA promoter recognition method uncovers the complex regulation of intronic miRNAs. *Genome Biol* 2013; 14 (8):R84.
8. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S: Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* 2009; 11: 228-234.
9. Cai Y, Yu X, Hu S Yu J: A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics & Bioinformatics* 2009; 7: 147-154.
10. Turchinovich A, Cho WC: The origin, function and diagnostic potencial of extracellular microRNA in human body fluids. *Progress in Biochemistry and Biophysics* 2013; 40: 603-616.
11. Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B: Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet* 2013; 4: 119.
12. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM: Circulating MicroRNAs Novel Biomarkes and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease? *Circ Res.* 2012; 110: 481-482.
13. Etheridge A, Lee I et al: Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutat Res* 2011; 717: 85-90.
14. Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A: Exosomal miRNAs as biomarkers for prostate cancer. *Front Genet* 2013; 4: 36.

15. Kinet V, Halkein J, et al: Cardiovascular extracellular microRNAs: emerging diagnostic markers and mechanism of cell-to-cell RNA communication. *Front Genet* 2013; 4: 214.
16. Chevillet JR, Lee I, Briggs HA et al: Issues and Prospects of microRNA-Based Biomarkers in Blood and Other Body Fluids. *Molecules* 2014; 19: 5.
17. Xu L, Yang B, Al J: MicroRNA transport: A new way in cell communication. *J. Cellular Physiology* 2013; 228: 1713-1719.
18. Etheridge A, Gomes CPC, Pereira RW, Galas D, Wang K: The complexity, function and applications of RNA in circulation. *Front Genet* 2013; 4: 115.
19. Wagner J, Riwanto M, Besler C et al: Characterization of levels and Cellular Transfer of Circulating Lipoprotein-bound MicroRNAs. *Arterioscler Thromb Biol* 2013; 33: 1392-1400.
20. Turchinovich A, Cho WC: The origin, function and diagnostic potential of extracellular microRNA in human body fluids. *Front Genet* 2014; 5: 30.
21. van der Eerden BC: MicroRNAs in the skeleton: Cell-restricted or potent intercellular communicators? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014; 561: 46-55.
22. Collino F, Deregibus MC, Bruno S et al: Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PloS One* 2010; 5: 7.
23. Kosaka N, Yoshioka Y et al: Trash or Treasure: extracellular microRNAs in cell to cell communication. *Front Genet* 2013; 4: 173.
24. Hackl M, Heilmeier U, Weilner S, Grillari J: Circulating microRNAs as novel biomarkers for bone disease – Complex signatures for multifactorial disease? *Mol Cell Endocrinol* 2015.
25. Cheng L, Quek CYJ et al: The detection of microRNA associated with Alzheimer's disease in biological fluids using next-generation sequencing technologies. *Frontiers in GENETIC* 2013; 4: 150.
26. Seeliger C, Karpinski K et al: Five Freely Circulating miRNAs and Bone Tissue miRNAs Are Associated With Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner RES* 2014; 29: 1718-1728.
27. Didier H: The ABC of Trabecular Bone Score (TBS). Center for Bone disease, DAL Lausanne University Hospital, Switzerland.
28. Jeker LT, Marone R: Targeting microRNAs for immunomodulation. *Current Opinion in Pharmacology* 2015; 23: 25-31.

29. Kim KM, Lim SK. Role of miRNAs in bone and their potential as therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol* 2014; 16: 133-141.
30. Krzeszinski JY, Wei W et al: miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature* 2014; 512: 431-435.
31. Mencej Bedrač S, Ostanek B, Mlakar V et al: Sodobni pogled na nastanek osteoporoze. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63: 269-278.
32. Kocijančič A: Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. *Zdravniški vestnik* 2002; 71: 571-3.
33. Mencej Bedrač S, Zupan J, Kocjan T, Ostanek B: Zdravljenje osteoporoze danes in jutri. *Farmacevtski vestnik* 2012.
34. Kocjan T, Preželj J, Pfeifer Sever M et al: Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. *Zdravniški vestnik* 2013; 82: 207-217.
35. Pi C, Li YP, Zhou X, Gao B: The expression and function of microRNAs in bone homeostasis. *Front Biosci* 2015; 20: 119-138.
36. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N: Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011; 80: 193-208.
37. Ji S, Ye G et al: miR-574-5p negatively regulates Qki6/7 to impact  $\beta$ -catenin/Wnt signalling and the development of colorectal cancer. *Gut* 2013; 62: 716-726.
38. Wu T, Zhou H et al: miR-30 Family Members Negatively Regulate Osteoblast Differentiation. *J Biol Chem* 2012; 287: 7503-7511.
39. Zaragosi LE, Wdziekonski B et al: Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis. *Genome Biol* 2011; 12: R64.
40. Meraviglia V, Azzimato V et al: Syngeneic Cardiac and Bone Marrow Stromal Cells Display Tissue-Specific microRNA Signatures and microRNA Subsets Restricted to Diverse Differentiation Processes. *PLoS One* 2014; 9: e107269.
41. Wang J, Guan X et al: miR-30e reciprocally regulates the differentiation of adipocytes and osteoblasts by directly targeting low-density lipoprotein receptor-related protein 6. *Cell Death Dis* 2013; 4: e845.
42. Yuan L, Chan GC, Fung KL, Chim CS: RANKL expression in myeloma cells is regulated by a network involving RANKL promoter methylation, DNMT1, microRNA and TNF $\alpha$  in the microenvironment. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843: 1834-1838.
43. Li WF, Hou SX et al: Genetics of Osteoporosis: Perspectives for Personalized Medicine. *Personalized Medicine* 2010; 7: 655-668.



44. Rong Z, Li D et al: Screening for miRNAs and their potential targets in response to TGF- $\beta$ 1 based on miRNA microarray and comparative proteomics analyses in a mouse GC-1 spg germ cell line. *Int J Mol Med* 2015; 35: 821-828.
45. Erlebacher A, Derynck R: Increased Expression of TGF-  $\beta$ 2 in Osteoblasts Results in an Osteoporosis-like Phenotype. *J Cell Biol* 1996; 132: 195-210.
46. McAlexander MA, Phillips MJ, Witwer KW: Comparison of methods for miRNA extraction from plasma and quantitative recovery of RNA from cerebrospinal fluid. *Front Genet* 2013; 4: 83.
47. QIAGEN© MiRNeasy Mini Handbook. Qiagen 2013.
48. Quantitation of nucleic acids using a microvolume spectrophotometer without the use of cuvettes or capillaries. *Current Protocols in Molecular Biology*; Supplement 76.
49. QIAGEN© miScript PCR System Handbook. Qiagen 2011.
50. Shaffer J, Schlumpberger M, Lader E: miRNA profiling from blood – challenges and recommendations. QIAGEN 2012.
51. SYBR® Advantage® qPCR Premix User Manual. Clontech 2012.
52. QIAGEN© OneStep RT-PCR Handbook. Qiagen 2012.
53. Marabita F, de Candia P et al: Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform* 2015.
54. Real –Time PCR Applications Guide . Bio-Rad Laboratories 2006.
55. Profiling of microRNA in serum/plasma and other biofluids. EXIQON Guidelines 2013.
56. Andersen CL, Jensen JL, Ørntorft TF: Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res* 2.
57. Andersen CL, Gundersen C, Adolf K: Documentation for NormFinder. MDL, Denmark, 2010.
58. Ruijter JM, van der Velden S, Ilgun A: LinReg PCR (2014.x) Analysis of quantitative RT-PCR data. Heart Failure Research Center & Academic Medical Center 2009.
59. qPCR Application Guide – Experimental Overview, Protocol, Troubleshooting, Fourth Edition. Integrated DNA Technologies 2015.
60. Field A: Discovering statistics using SPSS. Sage Publication 2009; poglavja 1, 2, 5, 9.

61. Weilner S, Skalicky S et al: Differentially circulating miRNAs after recent osteoporotic fractures can influence osteogenic differentiation. *Bone* 2015; 79: 43-51.
62. Riggs BL: The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest* 2000; 106: 1203-1204.
63. WHO Fracture Risk Assessment Tool. <http://www.shef.ac.uk/FRAX/> Dostop: 23-04-2015.
64. Kanis JA, McCloskey EV: Risk factors in osteoporosis. *Maturitas* 1998; 30: 229-233.
65. Park CY, Weaver CM: Vitamin D interactions with Soy isoflavones on Bone after menopause: a Review. *Nutrients* 2012; 4: 1610-1621.
66. Paradowska A, Lacki Jan K: Genetic aspects of osteoporosis: a Review. *Centr Eur J Immunol* 2007; 32: 172-180.
67. Asomaning K, Bertone Johnson ER et al: The Association between Body Mass Index and Osteoporosis in Patients Referred for a Bone Mineral Density Examination. *J Womens Health* 2006; 15: 1028-1034.
68. Wang Z, Luo H et al: A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 419-423.
69. Panach L, Mifsut D: Serum circulating microRNAs as Biomarkers of Osteoporotic Fracture. *Calcif Tissue Int* 2015; 97: 496-505.
70. Andreasen D, Fog JU et al: Improved microRNA quantification in total RNA from clinical samples. *Methods* 2010; 50: S6-9.
71. Kern B: Izražanje miR-195-5p in miR-204-5p ter njunih potencialnih tarčnih genov v kostnem tkivu bolnikov z osteoporozo in osteoartrozo. *Fakulteta za farmacijo* 2016.
72. Kirschner MB, van Zandwijk N, Ried G: Cell-free microRNAs: potential biomarkers in need of standardized reporting. *Front Genet* 2013; 4: 56.
73. Roberts TC, Coenen-Stass AM, Betts CA, Wood MJ: Detection and quantification of extracellular microRNAs in murine biofluids. *Biol Proced Online* 2014; 16: 5.
74. Vandesompele J, De Preter K et al: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: Research0034.
75. Frost J: Choosing Between A Nonparametric Test and a Parametric Test. *The minitab blog* 2015.

76. Leslie WD, Majumdar SR et al: High fracture probability with FRAX usually indicates densitometric osteoporosis: implications for clinical practice. *Osteoporos Int* 2012; 23: 391-397.
77. TargetScanHuman – Prediction of microRNA targets. <http://www.targetscan.org/>  
Dostop: 23-04-2015.
78. Vlachos IS, Kostoulas N et al: DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Research* 2012; 40: W498-504.
79. Cheng P, Chen C et al: miR-148a Regulates Osteoclastogenesis by Targeting V-maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog B. *J Bone Miner Res* 2013; 28: 1180-1190.
80. Boyce BF, Yamashita T et al: Roles for NF- $\kappa$ B and c-Fos in osteoclasts. *J Bone Miner Metab* 2005; 23: Suppl 11-5.
81. Eisenmann DM: WNT signaling. *WormBook* 2005; Department of Biological Sciences 2005, University of Maryland Baltimore County, Baltimore, USA.
82. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA: The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science* 2004; 117: 1281-1283.
83. Vlachos S et al: DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucl. Acids Res.* 2014.

## 7. PRILOGE

Priloga 1: Povprečne C<sub>q</sub> vrednost ter standardni odkloni izražanj, ki smo jih pridobili z LightCycler-jem 480. Vz so vzorci.

VZORCI	cel-miR-248(spike)		let-7a(R)		miR-16(R)		miR-574(T)	
	MeanCp	STD Cp	MeanCp	STD Cp	MeanCp	STD Cp	MeanCp	STD Cp
vz1	20,99	0,19	23,25	0,13	23,37	0,28	30,33	0,27
vz2	19,86	0,08	23,80	0,02	22,10	0,03	31,47	0,35
vz3	19,92	0,03	25,95	0,10	23,98	0,05		
vz4	19,08	0,03	22,80	0,10	21,20	0,05	30,95	0,24
vz5	19,72	0,03	22,51	0,16	21,84	0,06	31,48	0,18
vz6	18,81	0,04	21,34	0,09	20,84	0,05	30,17	0,06
vz7	24,34	0,16	26,90	0,26	27,40	0,07	32,88	0,13
vz8	20,21	0,03	22,79	0,16	22,24	0,05	31,77	0,11
vz9	20,63	0,08	25,05	0,08	23,10	0,07	31,96	0,15
vz10	20,67	0,12	24,38	0,10	22,95	0,06	29,66	0,13
vz11	21,48	0,05	25,88	0,04	24,69	0,02	31,72	0,13
vz12	20,68	0,09	24,33	0,09	22,94	0,02	30,95	0,03
vz13	20,09	0,05	25,07	0,24	22,80	0,02	31,84	0,15
vz14	25,70	0,07	25,65	0,18	29,13	0,10	30,64	0,07
vz15	20,92	0,06	23,81	0,03	23,42	0,06	32,80	0,34
vz16	21,19	0,10	24,85	0,19	23,49	0,05	31,06	0,20
vz17	19,11	0,06	25,31	0,48	21,19	0,06	29,76	0,19
vz18	19,79	0,06	24,70	0,17	22,51	0,03	31,31	0,18
vz19	19,43	0,08	25,73	0,14	21,88	0,03		
vz20	21,77	0,03	25,03	0,07	24,21	0,01	32,16	0,01
vz21	20,85	0,01	25,36	0,22	24,41	0,07	31,79	0,14
vz22	22,98	0,03	24,91	0,04	27,05	0,01	32,26	0,06
vz23	19,29	0,00	23,99	0,19	21,72	0,03	31,38	0,47
vz24	20,57	0,07	24,62	0,11	23,31	0,12	32,63	0,02
vz25	20,35	0,08	24,64	0,06	22,51	0,05	33,19	0,53
vz26	29,99	0,12	30,11	0,03	31,65	0,21		
vz27	20,28	0,04	24,76	0,05	22,50	0,02	31,22	0,09
vz28	23,29	0,01	24,73	0,05	25,62	0,03	31,89	0,12
vz29	22,36	0,09	25,16	0,02	24,44	0,02	31,74	0,19
vz30	21,74	0,06	25,61	0,17	24,51	0,03	32,57	0,34
vz31	29,55	0,14	28,18	0,05	32,36	0,24	33,22	0,16
vz32	33,22	0,15	35,11	0,00	33,16	0,25		
vz33	21,59	0,04	25,68	0,01	23,20	0,05	31,01	0,42
vz34	21,94	0,07	26,60	0,08	23,67	0,03	30,64	0,30

vz35	22,83	0,05	26,86	0,06	25,16	0,08		
vz36	22,86	0,04	24,92	0,05	24,37	0,12	32,49	0,02
vz37	28,55	0,07	26,60	0,04	30,61	0,27	33,02	0,05
vz38	24,61	0,08	26,20	0,03	27,61	0,08	32,60	0,04
vz39	21,68	0,12	24,82	0,05	23,68	0,04	33,44	0,34
vz40	22,30	0,13	26,08	0,08	25,35	0,12	32,44	0,27
vz41	22,95	0,07	25,55	0,04	25,46	0,18	32,09	0,09
vz42	21,50	0,02	25,65	0,18	22,87	0,02	30,81	0,11
vz43	21,47	0,02	25,41	0,11	23,15	0,04	31,06	0,10
vz44	21,82	0,04	26,54	0,04	24,29	0,02	30,76	0,15
vz45	24,69	0,03	26,57	0,13	26,94	0,08	31,26	0,29
vz46	21,96	0,04	24,62	0,04	23,92	0,01	31,27	0,25
vz47	29,14	0,13	28,30	0,27	29,90	0,06	34,80	0,01
vz48	29,60	0,10	28,45	0,14	31,03	0,03	33,14	0,20
vz49	30,06	0,19	30,77	0,15	31,09	0,22		
vz50	22,82	0,01	24,65	0,19	25,74	0,02	30,75	0,35
vz51	18,83	0,04	24,77	0,02	21,04	0,02	28,12	0,06
vz52	21,77	0,03	25,45	0,14	23,99	0,03		
vz53	20,53	0,03	24,69	0,06	22,59	0,08	30,89	0,01
vz54	27,05	0,09	26,44	0,20	29,43	0,10	32,59	0,36
vz55	22,33	0,20	26,61	0,21	24,95	0,03		
vz56	20,49	0,13	25,21	0,07	22,94	0,01	31,40	0,10
vz57	23,21	0,01	24,39	0,22	25,59	0,10	30,99	0,02
vz58	30,89	0,12	30,49	0,06	31,52	0,10	31,89	0,23
vz59	32,83	0,08	34,56	0,20	33,78	0,33		
vz60	21,90	0,03	23,36	0,18	24,02	0,01	29,71	0,28
vz61	25,82	0,07	25,11	0,05	28,55	0,06		
vz62	19,65	0,01	25,52	0,18	22,66	0,03	31,09	0,00
vz63	21,28	0,04	24,51	0,04	23,77	0,02	27,94	0,08
vz64	19,85	0,12	25,97	0,15	22,81	0,05	30,99	0,16
vz65	25,33	0,10	25,47	0,03	29,18	0,25	31,38	0,23
vz66	21,91	0,03	26,98	0,08	24,77	0,04	31,30	0,17
vz67	22,59	0,07	25,88	0,10	24,65	0,02	31,62	0,01
vz68	26,93	0,08	25,85	0,03	30,06	0,08		
vz69	20,24	0,05	25,15	0,25	23,12	0,02	29,97	0,08
vz70	25,04	0,03	24,69	0,02	26,90	0,10	32,48	0,01
vz71	22,73	0,04	24,94	0,06	25,71	0,03	31,74	0,13
vz72	22,88	0,05	25,30	0,20	26,43	0,13	33,11	0,56
vz73	22,80	0,06	24,94	0,19	26,83	0,13	30,93	0,05
vz74	21,85	0,07	25,21	0,08	24,90	0,01	31,52	0,03
vz75	21,04	0,05	24,82	0,03	24,20	0,03	30,58	0,12
vz76	23,21	0,02	24,09	0,07	26,30	0,03	31,70	0,08
vz77	19,83	0,04	24,86	0,06	21,94	0,02	30,25	0,26
vz78	23,19	0,05	24,95	0,04	25,60	0,06	32,05	0,11

vz79	21,74	0,01	24,50	0,07	25,59	0,02	30,01	0,13
vz80	21,51	0,03	25,61	0,13	25,73	0,02	30,86	0,10
vz81	22,08	0,06	24,23	0,12	24,48	0,04	30,41	0,20
vz82	28,07	0,02	28,88	0,28	30,15	0,04	33,42	0,24
vz83	28,59	0,09	28,02	0,08	28,68	0,03	34,29	0,29
vz84	21,29	0,13	25,64	0,09	23,77	0,03	30,62	0,18
vz85	28,91	0,14	29,06	0,10	30,44	0,30		
vz86	18,48	0,01	25,04	0,02	21,21	0,01	30,03	0,18
vz87	20,72	0,08	24,73	0,06	23,17	0,04		
vz88	20,57	0,04	23,94	0,13	23,20	0,04	31,49	0,15
vz89	21,82	0,02	25,14	0,14	24,18	0,05	29,67	0,01
vz90	20,64	0,02	24,37	0,06	23,55	0,01	30,42	0,31
vz91	21,11	0,04	24,09	0,01	23,92	0,00	29,71	0,11
vz92	23,54	0,02	24,98	0,21	26,38	0,08	30,98	0,12
vz93	21,01	0,05	25,12	0,19	23,97	0,05	32,63	0,26
vz94	29,53	0,31	29,64	0,04	31,47	0,20		
vz95	22,02	0,01	25,38	0,05	24,02	0,03	32,74	0,31
vz96	20,28	0,14	24,90	0,28	22,00	0,05		
vz97	19,29	0,03	24,73	0,15	21,71	0,02	30,65	0,08

	miR-30e(T)		miR-30d(T)		miR-126(T)		miR-148(T)		miR-199(T)	
VZOR CI	Mean Cp	STD Cp	Mean Cp	STD Cp	Mean Cp	STD Cp	Mean Cp	STD Cp	Mean Cp	STD Cp
vz1	24,90	0,02	24,02	0,04	22,95	0,03	26,01	0,10	24,77	0,12
vz2	24,94	0,04	24,33	0,12	23,57	0,13	26,72	0,09	25,90	0,06
vz3	28,50	0,24	28,66	0,14	26,64	0,05	27,95	0,06	30,73	0,20
vz4	23,94	0,04	23,29	0,05	22,13	0,01	25,74	0,17	24,59	0,11
vz5	24,67	0,07	24,10	0,31	23,13	0,07	26,19	0,10	24,79	0,02
vz6	23,14	0,05	22,60	0,03	21,08	0,12	24,76	0,05	23,29	0,25
vz7	31,57	0,09	31,75	0,16	29,73	0,15	30,96	0,16	33,64	0,22
vz8	27,03	0,03	27,48	0,25	25,88	0,02	28,23	0,19	29,60	0,17
vz9	27,51	0,18	27,89	0,21	25,70	0,04	28,33	0,18	30,52	0,06
vz10	27,63	0,14	27,67	0,09	25,94	0,13	26,71	0,02	29,19	0,09
vz11	29,10	0,05	28,73	0,26	26,94	0,08	28,27	0,24	30,19	0,03
vz12	27,76	0,14	27,64	0,05	25,89	0,11	27,85	0,05	30,69	0,11
vz13	27,29	0,06	27,51	0,03	26,70	0,11	28,78	0,17	30,74	0,25
vz14	31,81	0,18	30,70	0,07	30,58	0,08	32,80	0,36	38,52	5,62
vz15	27,65	0,14	27,29	0,05	26,24	0,00	27,07	0,07	29,71	0,07
vz16	27,65	0,01	27,53	0,05	26,32	0,06	28,27	0,21	31,09	0,21
vz17	25,89	0,16	26,12	0,01	25,20	0,08	27,56	0,04	30,24	0,30
vz18	26,28	0,20	26,39	0,11	25,11	0,06	28,06	0,06	28,61	0,13
vz19	26,55	0,08	26,63	0,06	25,73	0,12	27,84	0,02	30,42	0,08
vz20	29,09	0,15	28,99	0,09	27,51	0,17	29,32	0,03	31,71	0,18

vz21	28,14	0,14	27,70	0,04	26,37	0,10	28,28	0,22	30,03	0,05
vz22	29,82	0,12	28,99	0,07	28,02	0,15	30,53	0,19	30,78	0,04
vz23	26,34	0,11	26,75	0,01	25,39	0,11	27,04	0,06	29,72	0,22
vz24	27,16	0,15	27,09	0,01	26,09	0,12	27,95	0,20	29,86	0,09
vz25	27,00	0,12	26,95	0,07	25,92	0,08	27,25	0,15	30,48	0,25
vz26										
vz27	27,24	0,19	27,11	0,03	26,00	0,08	27,86	0,07	30,32	0,24
vz28	29,58	0,06	29,16	0,02	28,32	0,16	30,77	0,15	31,82	0,10
vz29	28,86	0,20	28,53	0,10	27,74	0,15	29,09	0,16	33,58	0,07
vz30	28,59	0,15	28,35	0,09	27,03	0,12	29,19	0,08	31,29	0,08
vz31							0,00	0,00	36,03	0,00
vz32							0,00	0,00		
vz33	27,52	0,09	28,08	0,05	26,46	0,05	28,17	0,07	30,14	0,13
vz34	28,27	0,10	28,42	0,21	26,76	0,08	29,54	0,13	32,75	0,08
vz35	29,39	0,20	29,20	0,05	28,38	0,11	30,34	0,21	31,91	0,27
vz36	28,52	0,20	28,22	0,02	27,22	0,12	28,97	0,04	31,50	0,40
vz37									35,89	0,29
vz38	31,28	0,21	30,98	0,13	29,49	0,21	30,40	0,09	33,56	0,35
vz39	27,51	0,08	27,58	0,09	26,59	0,07			30,24	0,27
vz40	29,19	0,15	29,06	0,18	28,00	0,10	29,28	0,19	31,76	0,23
vz41	28,90	0,17	28,99	0,07	27,79	0,07	30,37	0,40	31,61	0,23
vz42	27,33	0,11	27,80	0,11	26,82	0,07	28,62	0,02	31,14	0,22
vz43	27,82	0,09	27,87	0,14	26,83	0,06	28,68	0,04	31,30	0,14
vz44	28,75	0,11	28,92	0,06	27,76	0,04	29,40	0,20	31,33	0,19
vz45	31,17	0,13	30,94	0,16	29,12	0,20	31,60	0,27	33,48	0,06
vz46	28,41	0,14	28,51	0,16	26,58	0,10	28,90	0,11	30,97	0,03
vz47							34,30	0,00		
vz48							37,70	0,00		
vz49							0,00	0,00		
vz50	29,59	0,26	29,54	0,07	27,49	0,06	28,95	0,15	31,07	0,18
vz51	25,48	0,02	26,06	0,04	24,38	0,09	25,50	0,06	29,53	0,35
vz52	29,29	0,16	29,64	0,16	27,21	0,10	28,69	0,22	31,54	0,51
vz53	27,28	0,16	27,76	0,08	26,14	0,01	28,35	0,23	30,17	0,08
vz54					31,72	0,21	35,16	0,09		
vz55	29,62	0,14	29,77	0,17	27,13	0,06	29,41	0,24	32,65	0,14
vz56	27,49	0,13	27,73	0,09	25,83	0,02	28,30	0,15	30,11	0,04
vz57	29,67	0,09	29,02	0,09	26,76	0,03	28,72	0,12	29,56	0,05
vz58							0,00	0,00		
vz59							0,00	0,00		
vz60	28,61	0,09	28,55	0,10	26,45	0,09	27,68	0,10	30,25	0,16
vz61					30,57	0,25	34,23	0,01	36,08	0,09
vz62	27,43	0,19	27,79	0,05	26,15	0,06	28,27	0,09	30,66	0,16
vz63	28,58	0,28	28,71	0,20	26,77	0,15	28,11	0,15	30,15	0,33
vz64	27,55	0,12	27,92	0,05	26,40	0,05	28,41	0,08	30,85	0,06

vz65					30,70	0,07			35,77	0,06
vz66	28,99	0,18	28,99	0,16	26,79	0,08	29,12	0,13	31,47	0,20
vz67	29,34	0,22	28,89	0,02	27,07	0,12	29,16	0,09	31,95	0,08
vz68					32,95	0,08			35,61	0,04
vz69	27,85	0,08	28,37	0,19	26,10	0,05	28,29	0,90	30,24	0,36
vz70	30,84	0,12	30,71	0,10	28,81	0,04	30,50	0,19	33,17	0,05
vz71	29,81	0,03	29,35	0,12	27,33	0,21	28,81	0,13	33,12	0,07
vz72	29,91	0,11	29,89	0,13	27,64	0,04	29,35	0,09	31,36	0,09
vz73	30,73	0,25	29,98	0,17	28,03	0,11	29,29	0,26	31,38	0,19
vz74	29,40	0,13	28,92	0,16	27,20	0,08	28,80	0,04	30,83	0,18
vz75	28,73	0,14	28,74	0,07	26,12	0,07	27,78	0,05	30,17	0,22
vz76	30,03	0,10	29,92	0,11	26,95	0,08	29,30	0,24	29,91	0,07
vz77	26,43	0,08	26,95	0,10	25,53	0,04	27,66	0,15	29,88	0,26
vz78	29,87	0,08	29,74	0,10	27,59	0,09	28,92	0,14	30,62	0,24
vz79	28,58	0,06	28,16	0,09	26,33	0,12	27,35	0,17	29,46	0,12
vz80	28,67	0,13	28,56	0,04	26,55	0,08	28,66	0,16	30,13	0,34
vz81	29,43	0,12	29,24	0,04	27,50	0,03	29,04	0,21	31,44	0,17
vz82										
vz83					32,63	0,18				
vz84	28,09	0,18	28,34	0,15	26,86	0,11	28,78	0,17	30,74	0,13
vz85										
vz86	26,03	0,02	26,92	0,03	24,79	0,03	27,21	0,06	29,30	0,24
vz87	27,37	0,11	27,70	0,03	25,81	0,05	28,04	0,07	29,89	0,31
vz88	27,89	0,10	27,81	0,07	25,82	0,04	27,32	0,15	30,58	0,15
vz89	28,97	0,15	28,90	0,09	27,13	0,07	29,11	0,02	31,40	0,33
vz90	28,17	0,09	28,09	0,10	25,91	0,07	27,65	0,14	30,20	0,20
vz91	28,76	0,17	28,37	0,17	26,33	0,10	27,68	0,04	30,10	0,22
vz92	29,99	0,03	29,65	0,17	26,96	0,10	28,73	0,13	30,69	0,12
vz93	28,50	0,07	28,34	0,08	26,29	0,04	28,98	0,11	31,09	0,13
vz94							41,54	0,00		
vz95	28,57	0,07	28,41	0,09	26,69	0,11	28,51	0,03	31,08	0,12
vz96	27,03	0,05	27,11	0,02	25,75	0,05	27,82	0,12	31,74	0,00
vz97	26,59	0,09	27,03	0,12	25,42	0,12	27,24	0,16	30,44	0,13



Priloga 2: Rezultati Normfinderja, ki so podani kot stabilnostna vrednost, kot variacija med skupina in znotraj skupine, glavni rezultat pa je podan kot najboljši gen.

ime gena	stabilnostna vrednost
miR-140	3,183
miR-338	2,015
RNU6	7,022
SNORD 96a	4,902
let-7a	1,927
miR-16	13,484
miR-32	22,070

variacija znotraj skupine		
določitev skupine	2	1
miR-140	91,415	21,840
miR-338	14,424	27,181
RNU6	269,110	224,988
SNORD 96a	163,428	83,474
let-7a	14,424	23,215
miR-16	1761,920	335,910
miR-32	2610,580	2266,534

variacija med skupinama		
določitev skupine	2	1
miR-140	-1,293	1,293
miR-338	0,857	-0,857
RNU6	-1,441	1,441
SNORD 96a	-1,944	1,944
let-7a	-1,511	1,511
miR-16	6,887	-6,887
miR-32	-1,556	1,556

<b>najboljši gen</b>	let-7a
<b>stabilnostna vrednost</b>	1,927
<b>Najboljša kombinacija dveh genov</b>	miR-338 and let-7a
<b>stabilnostna vrednost za kombinacijo najboljših genov</b>	1,394

Priloga 3: Prikaz statistično pomembnih korelacij med izbranimi mikro RNA.  
miR - mikro RNA

<b>določena miRNA</b>	<b>korelacija</b>	<b>korelacija</b>	<b>korelacija</b>	<b>korelacija</b>	<b>korelacija</b>
<b>miR_30d_r</b>	miR_574_s	miR_30e_r miR_30e_s	miR_199_r	miR_126_r	
<b>miR_30d_s</b>	miR_199_s	miR_30e_s	miR_126_s	miR_148_s	
<b>miR_30e_r</b>	miR_30d_r	miR_574_s miR_574_r	miR_126_r	miR_148_s	
<b>miR_30e_s</b>	miR_30d_r miR_30d_s	miR_148_s	miR_199_s	miR_126_s	
<b>miR_126_r</b>	miR_30d_r	miR_30e_s miR_30e_r	miR_574_s	miR_148_r	miR_199_r
<b>miR_126_s</b>	miR_148_s	miR_30d_s	miR_199_r miR_199_s	miR_574_s	
<b>miR_148_r</b>	miR_126_r	miR_148_s	miR_199_r miR_199_s		
<b>miR_148_s</b>	miR_30e_s miR_30e_r	miR_30d_s	miR_574_s	miR_126_s	miR_199_r miR_199_s
<b>miR_199_r</b>	miR_30d_r	miR_126_r miR_126_s	miR_148_r miR_148_s		
<b>miR_199_s</b>	miR_30e_s	miR_30d_s	miR_126_s		
<b>miR_574_r</b>	miR_30e_r				
<b>miR_574_s</b>	miR_30d_r	miR_126_r miR_126_s	miR_30e_r	miR_148_s	