

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA KERN

**IZRAŽANJE miR-195-5p IN miR-204-5p TER NJUNIH POTENCIALNIH TARČNIH
GENOV V KOSTNEM TKIVU BOLNIKOV Z OSTEOPOROZO IN
OSTEOARTROZO**

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA KERN

**IZRAŽANJE miR-195-5p IN miR-204-5p TER NJUNIH POTENCIJALNIH TARČNIH
GENOV V KOSTNEM TKIVU BOLNIKOV Z OSTEOPOROZO IN
OSTEOARTROZO**

**EXPRESSION OF miR-195-5p, miR-204-5p AND THEIR POTENTIAL TARGET
GENES IN BONE TISSUE OF PATIENTS WITH OSTEOPOROSIS AND
OSTEOARTHRITIS**

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Barbari Ostanek, mag. farm., ker mi je omogočila opravljanje magistrske naloge. Hvala za zaupanje v moje delo in za nasvete ter pomoč pri pisanju magistrske naloge. Prav tako se tudi zahvaljujem somentorici asist. dr. Simoni Mencej Bedrač, mag. farm. za pomoč pri eksperimentalnem delu in pri reševanju nastalih težav. Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za prijazno pomoč. Zahvaljujem pa se tudi prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. za njeno zaupanje in spodbudo tako med študijem kot tudi med opravljanjem magistrske naloge.

Posebna zahvala za vso spodbudo in podporo gre pa tudi moji družini in prijateljem.

IZJAVA

Magistrsko naložbo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo, Fakultete za farmacijo. Izjavljam, da sem magistrsko naložbo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Simone Mencej Bedrač, mag. farm.

Barbara Kern

VSEBINA

POVZETEK	I
ABSTRACT	III
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD.....	1
1.1 Osteoporoz.....	1
1.1.1 Osteoporoz in genetika	1
1.1.2 Osteoporoz in epigenetika	2
1.2 Osteoartroza	3
1.2.1 Osteoartroza in genetika	3
1.2.2 Osteoartroza in epigenetika	4
1.3 miRNA.....	5
1.3.1 Biogeneza in dozorevanje miRNA	5
1.3.2 Mehanizem delovanja miRNA	6
1.3.3 Uravnavanje biogeneze miRNA	6
1.4 miRNA in osteoporoz	8
1.5 miRNA in osteoartroza	9
1.6 miR-204-5p in miR-195-5p	11
2 NAMEN	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 Preiskovanci	14
3.1.1 Merjenje mineralne kostne gostote	14
3.1.2 Merjenje serumskih plazemskih kazalcev	14
3.1.3 Označevalci pridobljeni z metodo mikro-računalniške tomografije	14
3.1.4 Označevalci pridobljeni z metodo kostne histomorfometrije	15

3.2	Materiali.....	15
3.2.1	Reagenti	15
3.2.2	Aparature	15
3.2.3	Delovni pribor	16
3.3	Določitev količine RNA	16
3.4	Obratna transkripcija.....	16
3.4.1	Priprava reakcijske zmesi in izvedba obratne transkripcije za prepis RNA..	16
3.4.2	Priprava reakcijske zmesi in izvedba obratne transkripcije za prepis miRNA	17
3.5	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času.....	18
3.5.1	Merjenje izražanja genov <i>ALPL</i> , <i>SPARC</i> , <i>BMP1</i> , <i>ELOVL6</i> , <i>CYP26B1</i> , <i>GSTCD</i> in <i>MYB</i> z uporabo interkelirajočega barvila in hidrolizirajočih sond	19
3.5.1.1	Kvantifikacija izražanja genov ALPL, SPARC, BMP1, ELOVL6, CYP26B1, GSTCD in MYB	22
3.5.2	Izbor referenčnih miRNA	22
3.5.3	Merjenje izražanja miR-195-5p in miR-204-5p z uporabo interkelirajočega barvila.....	23
3.5.3.1	Kvantifikacija izražanja miR-195-5p in miR-204-5p	24
3.6	Statistična analiza rezultatov s pomočjo programa SPSS.....	24
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1	Rezultati optimizacije metod za analizo izražanja genov in miRNA	26
4.1.1	Rezultati optimizacije analize izražanja genov z uporabo interkelirajočega barvila in hidrolizirajočih sond.....	26
4.1.2	Rezultati optimizacije analize izražanja miRNA z uporabo interkelirajočega barvila.....	31
4.2	Izbor referenčnih miRNA	31
4.3	Opis in primerjava preiskovanih skupin	32

4.4 Izražanje miR-195-5p in miR-204-5p ter genov <i>ALPL</i> , <i>SPARC</i> , <i>BMP1</i> , <i>ELOVL6</i> , <i>CYP26B1</i> , <i>GSTCD</i> in <i>MYB</i> v preiskovanih skupinah.....	33
4.4.1 Izražanje miR-195-5p in miR-204-5p v preiskovanih skupinah	35
4.4.2 Izražanje genov <i>ALPL</i> , <i>SPARC</i> , <i>BMP1</i> , <i>ELOVL6</i> , <i>CYP26B1</i> , <i>GSTCD</i> in <i>MYB</i> v preiskovanih skupinah	37
4.5 Odnos med miRNA in njunimi tarčami	38
4.6 Odnos med izražanju genov.....	40
4.7 Odnos med izražanjem miRNA oziroma genov in mineralno kostno gostoto, biokemijskimi kazalci ter označevalci, pridobljeni z metodama mikro-računalniške tomografije in kostne histomorfometrije	41
4.7.1 Povezava med izražanjem miRNA oziroma genov in mineralno kostno gostoto	43
4.7.2 Povezava med izražanjem miRNA oziroma genov in biokemijskimi kazalci	43
4.7.3 Povezava med izražanem miRNA oziroma genov in označevalci pridobljeni z metodo mikro-računalniške tomografije.....	44
4.7.4 Povezava med miRNA oziroma mRNA in označevalci pridobljeni z metodo kostne histomorfometrije	45
5 SKLEP	46
6 LITERATURA	47
PRILOGA	53

KAZALO SLIK

Slika 1: Biogeneza miRNA.....	7
Slika 2: Vpliv genomske DNA na analizo.....	28
Slika 3: Talilna analiza.....	29

Slika 4: Talilne krivulje pri optimizaciji koncentracij oligonukleotidnih začetnikov za analizo gena <i>SPARC</i> z uporabo interkelirajočega barvila.	30
Slika 5: Grafična predstavitev povezave med izražanjem miRNA oziroma genov in mineralno kostno gostoto, biokemijskimi kazalci ter označevalci, pridobljeni z metodama mikro-računalniške tomografije in kostne histomorfometrije.	42

KAZALO TABEL

Tabela 1: Sestava reakcijske zmesi za prepis RNA v cDNA.	17
Tabela 2: Program za prepis RNA v cDNA.	17
Tabela 3: Sestava reakcijske zmesi za prepis miRNA v cDNA.	18
Tabela 4: Zaporedja oligonukletotidnih začetnikov za merjenje izražanja genov <i>SPARC</i> , <i>BMP1</i> , <i>ELOVL6</i> , <i>CYP26B1</i> , <i>GSTCD</i> in <i>MYB</i> z uporabo interkelirajočega barvila.	19
Tabela 5: Sestava reakcijske zmesi za merjenje izražanja genov <i>SPARC</i> , <i>BMP1</i> , <i>ELOVL6</i> , <i>CYP26B1</i> , <i>GSTCD</i> in <i>MYB</i> ter referečnih genov <i>RPLP0</i> in <i>GAPDH</i> z uporabo interkelirajočega barvila.	20
Tabela 6: Sestava reakcijske zmesi za merjenje izražanja <i>ALPL</i> z metodo hidrolizirajočih sond.....	21
Tabela 7: Program za merjenje izražanja genov z uporabo interkelirajočega barvila.	21
Tabela 8: Program za merjenje izražanja <i>ALPL</i> z metodo hidrolizirajočih sond.	21
Tabela 9: Sestava reakcijske zmesi za merjenje izražanja miRNA.	23
Tabela 10: Program za merjenje izražanja miRNA.	23
Tabela 11: Učinkovitosti pomnoževanja analize izražanja genov.....	27
Tabela 12: Kvantifikacijski cikli pri optimizaciji koncentracij oligonukleotidnih začetnikov za analizo gena <i>SPARC</i> z uporabo interkelirajočega barvila.	30
Tabela 13: Učinkovitosti pomnoževanja analize izražanja miRNA.....	31
Tabela 14: Vrednosti stabilnosti posamezne miRNA.....	32
Tabela 15: Opis preiskovanih skupin.	33

Tabela 16: Izražanje genov *ALPL*, *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB* ter miR-195-5p in miR-204-5p v kostnem tkivu pri preiskovancih z osteoporozo, osteoartrozo in zdravih preiskovancih..... 34

POVZETEK

Osteoporozna in osteoartroza dandanes predstavlja velik zdravstveni in ekonomski problem v razviti družbi. Preučevali so že mnogo mehanizmov nastanka bolezni, vendar ti še vedno niso v celoti pojasnjeni. Zato so potrebne nadaljnje raziskave novih mehanizmov in enega od bolj obetavnih predstavlja tudi delovanje miRNA, ki so 17-25 nukleotidov dolge nekodirajoče RNA endogenega izvora. Njihova naloga je uravnavanje izražanja genov, tako da razgradijo ali zavrejo translacijo tarčnih mRNA. Vpletene so tako v fiziološke kot tudi v patološke procese. Znano je, da imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka, kot tudi pri mnogih drugih boleznih. Na podlagi vsegenomske analize, opravljene v okviru projekta na Katedri za klinično biokemijo, Fakultete za farmacijo, kjer so določali profil mikroRNA v kostnih vzorcih bolnikov z osteoporozo in osteoartrozo, sta se kot zanimivi za preučevanje izkazali miR-195-5p in miR-204-5p. S pomočjo različnih programov, smo določili tudi njune potencialne tarčne gene. Izbrali smo gene, ki so zanimivi predvsem s stališča kostne biologije. Tarčni geni za miR-195-5p so *CYP26B1*, *ELOVL6*, *GSTCD* in *MYB*, za miR-204-5p pa *ALPL*, *SPARC*, *BMP1* in *ELOVL6*. Na izoliranih kostnih vzorcih smo izvedli prepis in s pomočjo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času merili izražanje miR-195-5p, miR-204-5p in genov pri 103 preiskovancih, in sicer preiskovancih z osteoporozo ($N=44$), preiskovancih z osteoartrozo ($N=44$) in zdravih preiskovancih ($N=15$). Statistična analiza je pokazala razliko v izražanju miR-195-5p ($p=0,00$), ne pa tudi miR-204-5p ($p=0,167$). Prav tako se med preiskovanimi skupinami razlikuje tudi izražanje genov *ALPL* ($p=0,019$), *SPARC* ($p=0,001$), *BMP1* ($p=0,002$), *ELOVL6* ($p=0,000$), *CYP26B1* ($p=0,001$), *GSTCD* ($p=0,000$) in *MYB* ($p=0,000$). Med izražanjem miR-195-5p in *ELOVL6* ($r_s=-0,371$, $p=0,001$), *GSTCD* ($r_s=-0,444$, $p=0,000$) in *MYB* ($r_s=-0,235$, $p=0,035$) je prisotna negativna povezava. Prisotna pa je tudi mejno značilna statistično negativna povezava med izražanjem miR-204-5p in *ELOVL6* ($r_s=-0,220$, $p=0,070$). Ugotovili smo tudi, da obstajajo povezave med izražanjem genov, in sicer pozitivna povezava med *ALPL* in *SPARC* ($r_s=0,766$, $p=0,000$), *BMP1* ($r_s=0,748$, $p=0,000$), *CYP26B1* ($r_s=0,743$, $p=0,000$) in *GSTCD* ($r_s=0,259$, $p=0,012$), med *SPARC* in *BMP1* ($r_s=0,847$, $p=0,000$) kot tudi *CYP26B1* ($r_s=0,770$, $p=0,000$), med *ELOVL6* in tako *GSTCD* ($r_s=0,660$, $p=0,000$) kot tudi *MYB* ($r_s=0,517$, $p=0,000$), med *CYP26B1* in *BMP1* ($r_s=0,796$, $p=0,000$) ter med *GSTCD* in *MYB* ($r_s=0,365$, $p=0,000$).

Opazili pa smo tudi negativno povezavo med *MYB* in *ALPL* ($r_s=-0,562$, $p=0,000$), *SPARC* ($r_s=-0,578$, $p=0,000$), *BMP1* ($r_s=-0,556$, $p=0,000$) in *CYP26B1* ($r_s=-0,517$, $p=0,000$). Izražanje nekaterih genov pa vpliva tudi na mineralno kostno gostoto, biokemijske kazalce in označevalce, pridobljene z metodama mikro-računalniške tomografije in kostne histomorfometrije. Zaključujemo z ugotovitvijo, da smo v okviru naše raziskave kot prvi opazili, da bi miR-195-5p lahko bila označevalka v kostnem tkivu pri osteoporosi oziroma osteoartrozi. Prav tako smo tudi dokazali, da obstaja negativna povezava med izražanjem miR-195-5p in genov *ELOVL6*, *GSTCD* in *MYB*, kar nakazuje, da bi miR-195-5p lahko uravnala izražanje teh genov.

KLJUČNE BESEDE: osteoporoza, osteoartroza, miR-195-5p, miR-204-5p, *ALPL*, *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD*, *MYB*

ABSTRACT

Osteoporosis and osteoarthritis represent a great economical and health problem in modern society. Many mechanisms of these two diseases have already been studied, but they are still not fully understood. Further research of new mechanisms is needed, one of more promising is the action of microRNAs, 17-25 nucleotides long endogenous RNA. They are involved in regulation of gene expression by inducing degradation or inhibition of translation of target mRNA. They affect physiological as well as pathological processes. Their role in cancer and many other diseases have already been studied. Based on the genome-wide analysis, which was performed as a part of a project at the Department of Clinical Biochemistry, Faculty for Pharmacy, two microRNAs miR-195-5p and miR-204-5p showed the most potential for study in bone tissue of patients with osteoporosis and osteoarthritis. Bioinformatics was used to select potential target genes. The selected genes are mostly involved in bone biology. Target genes for miR-195-5p are *CYP26B1*, *ELOVL6*, *GSTCD* and *MYB* and for miR-204-5p are *ALPL*, *SPARC*, *BMP1* and *ELOVL6*. Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction in real-time were performed on isolated samples of bone tissue of 103 participants who were divided in three groups; patients with osteoporosis (N=44), patients with osteoarthritis (N=44) and healthy individuals (N=15). Statistical analysis showed different expression of miR-195-5p ($p=0,000$), but not of miR-204-5p ($p=0,167$). Different gene expression of *ALPL* ($p=0,019$), *SPARC* ($p=0,001$), *BMP1* ($p=0,002$), *ELOVL6* ($p=0,000$), *CYP26B1* ($p=0,001$), *GSTCD* ($p=0,000$) and *MYB* ($p=0,000$) was noted between groups. A negative correlation between miR-195-5p and *ELOVL6* ($r_s=-0,371$, $p=0,001$), *GSTCD* ($r_s=-0,444$, $p=0,000$) and *MYB* ($r_s=-0,235$, $p=0,035$) expression was observed as well as statistically marginal negative correlation between miR-204-5p and *ELOVL6* ($r_s=-0,220$, $p=0,070$). The connections between the expression of genes was also noted. There was positive correlation between *ALPL* and *SPARC* ($r_s=0,766$, $p=0,000$), *BMP1* ($r_s=0,748$, $p=0,000$), *CYP26B1* ($r_s=0,743$, $p=0,000$) and *GSTCD* ($r_s=0,259$, $p=0,012$), between *SPARC* and both, *BMP1* ($r_s=0,847$, $p=0,000$) and *CYP26B1* ($r_s=0,770$, $p=0,000$), between *ELOVL6* and both, ($r_s=0,660$, $p=0,000$) and *MYB* ($r_s=0,517$, $p=0,000$), between *CYP26B1* and *BMP1* ($r_s=0,796$, $p=0,000$) and between *GSTCD* and *MYB* ($r_s=0,365$, $p=0,000$). We also noted negative correlation between *MYB* and *ALPL* ($r_s=-0,562$, $p=0,000$), *SPARC* ($r_s=-0,578$, $p=0,000$), *BMP1* ($r_s=-0,556$, $p=0,000$) and *CYP26B1* ($r_s=-0,517$, $p=0,000$). Expression of

some genes also affects bone mineral density, biochemical markers and parameters measured with micro-computed tomography and bone histomorphometry. To conclude, we were the first to notice that miR-195-5p could be the potential biomarker in bone tissue in osteoporosis or osteoarthritis. Moreover, negative correlation between *ELOVL6*, *GSTCD* and *MYB* genes and miR-195-5p expression indicates that miR-195-5p could regulate the expression of these genes.

KEY WORDS: osteoporosis, osteoarthritis, miR-195-5p, miR-204-5p, *ALPL*, *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD*, *MYB*

SEZNAM OKRAJŠAV

ALPL	alkalna fosfataza
BMP	kostni morfogeni protein
bp	bazni par
BV/TV	volumski delež kostnine (%)
BS/BV	razmerje kostne površine proti kostnemu volumnu (mm^{-1})
BS/TV	površinska gostota kosti (μm^{-1})
Conn.Dn	gostota povezanosti (angl. connectivity density [μm^{-3}])
CYP	citokrom P450
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
DA	stopnja anizotropije (angl. degree of architectural anisotropy)
DXA	dvoenergijska rentgenska absorpcijometrija
ELOVL6	ELOVL elongaza maščobnih kislin 6 (angl. ELOVL Fatty Acid Elongase 6)
GSTCD	C-terminalna domana vsebujoča glutation S-transferazo (angl. glutathione S-transferase C-terminal domain containing)
iPTH	intaktni paratiroidni hormon
ITM	indeks telesne mase
μCT	mikro-računalniška tomografija
MKG	mineralna kostna gostota
MYB	v-myb ptičji mieloblastozni homolog virusnega onkogena (angl. v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)
NOb	število osteoblastov
NOc	število osteklastov
NObBS	število osteoblastov na kostno površino
NOcBS	število osteklastov na kostno površino

nt	nukleotid
OA	osteoartroza
OP	osteoporoza
OPG	osteoprotegerin
OsS/BS	osteoidna površina
OsV/BV	osteoidni volumen
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RISC	RNA-inducirani utiševalni kompleks (angl. RNA-induced silencing complex)
RNA	ribonukleinska kislina
RT	obratna transkripcija
SMI	kazalec strukture modela (angl. structural model index)
SNP	polimorfizem enega nukleotida
SPARC	osteonektin
Tb.Th	debelina trabekul (μm)
Tb.Sp	razmakjenost trabekul (μm)
Tb.N	število trabekul (μm^{-1})
UTR	neprevedljiva regija
25(OH)D	25-hidroksivitamin D

1 UVOD

1.1 Osteoporoz

Osteoporoz (OP) predstavlja najpogostejo presnovno bolezen kosti, za katero sta značilni zmanjšana kostna masa in porušenje mikroarhitekture kostnega tkiva. To ima za posledico povečano krhkost kosti in OP zlome. Najpogosteji zlomi so zlom zapestja, kolka in vretenc. Dandanes predstavlja OP enega poglavitvenih zdravstvenih problemov v razviti družbi. Prizadene predvsem ženske, a zbolijo tudi moški in tveganje narašča s starostjo. V Sloveniji do 80 leta starosti zboli vsaka tretja ženska in vsak šesti moški [1].

OP lahko razdelimo v dve skupini: primarno in sekundarno. Pogosteja je primarna, kamor uvrščamo pomenopavzalno, senilno, juvenilno in nosečnostno OP. Sekundarna OP je posledica različnih zdravil in bolezni [1].

Med dejavnike tveganja uvrščamo spol, starost, raso, pomanjkanje estrogena, nizko telesno težo in indeks telesne mase (ITM), družinsko anamnezo, kajenje in predhodne zlome. Tudi alkohol in pijače, ki vsebujejo kofein, so povezane z zmanjšano kostno maso, medtem ko je telesna aktivnost povezana s povečano kostno maso [2].

Za diagnostiko OP so pomembni trije kriteriji. Prvi je merjenje mineralne kostne gostote (MKG) z metodo dvoenergijske rentgenske absorpciometrije (DXA). Slabost te metode je, da lahko spregleda pomemben del bolnikov, ki bodo utrpeli zlom, saj ne upošteva še drugih dejavnikov, ki pomembno prispevajo k tveganju za zlom. Njihov skupni vpliv vrednotimo s pomočjo računalniškega modela FRAX, ki je drugi kriterij. Tretji kriterij pa je predhodni zlom [3].

1.1.1 Osteoporoz in genetika

Primarna OP je multifaktorska bolezen, na katero vplivajo interakcije med dejavniki okolja in številnimi geni [4]. Da so pomembni genetski dejavniki, so dokazale družinske študije in študije na dvojčkih. Predvsem so proučevali dednost MKG in tveganja za zlome. MKG je dedna v zelo visokem odstotku, medtem ko vpliv dednosti na pojav zlomov s starostjo upada [5]. Kljub številnim študijam večina genetske variabilnosti še vedno ostaja nepojasnjena. Ker kostno presnovo uravnavajo različni geni, je veliko število kandidatnih genov, ki bi lahko imeli vpliv. Mednje spadajo geni, ki so vključeni v uravnavanje

presnove kosti in kalcija, potem geni, ki kodirajo kalciotropne in spolne hormone ter njihove receptorje, proteine kostnega matriksa, citokine, rastne dejavnike in lokalne mediatorje ter njihove receptorje in proteine, ki so vključeni v signalne poti v kostnih celicah [4].

S pomočjo asociacijskih študij na celotnem genomu in meta-analiz so določili 64 polimorfizmov enega nukleotida (SNP) znotraj 56 lokusov, ki so močno povezani z različicami MKG vratu stegnenice oziroma ledvenih vretenc. Večina genov, ki se nahajajo na teh lokusih, sodeluje v kostni biologiji, po drugi strani pa so odkrili tudi gene, ki niso povezani s kostno biologijo. Za 14 lokusov pa so ugotovili tudi povezavo s povečanim tveganjem za zlom [6].

1.1.2 Osteoporozna in epigenetika

Epigenetski mehanizmi so pomembni uravnalci izražanja genov. Med njih uvrščamo posttranslacijske modifikacije histonov, metilacijo DNA in mikroRNA (miRNA). Eden izmed načinov modifikacije histonov je acetilacija. Za to sta pomembni dve skupini encimov, in sicer histonske acetiltransferaze (HAT), ki dodajo acilno skupino, in histonske deacetilaze (HDAC), ki acilno skupino odstranijo. Ti encimi igrajo pomembno vlogo v kostni biologiji, vendar pa so dejanski mehanizmi še vedno neznani, prav tako pa je malo znanega tudi o njihovi vlogi v patogenezi kostnih bolezni [7].

Tudi metilacija DNA igra pomembno vlogo v kostni homeostazi. Dokazali so, da metilacija DNA v osteoblastih vpliva na izražanje določenih genov, kot na primer *ALPL* (alkalna fosfataza), transkripcijska dejavnika *OSX* (angl. osteoblast-specific transcription factor) in *DLX5* (angl. distal-less homeobox 5), estrogenski receptor α ter osteopontin. Po drugi strani pa je malo znanega o vzorcih metilacije DNA v osteoklastih, prav tako pa tudi njena vloga pri OP [7].

Vedno več je dokazov, da dejavniki okolja, katerim smo izpostavljeni v maternici in v zgodnjem otroštvu, vplivajo preko epigenetskih mehanizmov na kasnejši razvoj. Med razvojem zarodka in ploda lahko pride do spremenjenih vzorcev metilacije DNA. To povzroči, da se določeni geni nepravilno izražajo v odrasli dobi, kar ima za posledico razvoj bolezni, kot na primer OP [8]. Epigenetsko uravnavanje kostne mase bi lahko opisali preko modela, ki opisuje vlogo materinega statusa vitamina D in prenosa kalcija preko posteljice. Tako kalcij kot vitamin D sta pomembna prehrambena dejavnika, ki

vplivata na razvoj kosti pri plodu. Študije na tem področju nakazujejo, da bi epigenetsko uravnavanje lahko pojasnilo, kako status vitamina D matere vpliva na kostno mineralizacijo pri novorojenčkih. Študije so še v začetnih stopnjah, večino raziskav pa se opravlja na živalskih modelih [9].

Preučujejo tudi vpliv miRNA, kar bomo podrobneje opisali v poglavju miRNA in osteoporoza.

1.2 Osteoartroza

Osteoartroza (OA) je najpogostejsa sklepna bolezen. Prizadene enega ali več sinovijskih sklepov okončin, lahko pa tudi hrbtenico. Prizadet ni le sklepni hrustanec, temveč tudi subhondralna kost, ligamenti, kapsula, sinovija, obsklepne mišice in živci. Razširjena je po vsem svetu in prizadene oba spola, vendar je prevalenca večja pri ženskah [10].

Razvrstimo jo v dve skupini: primarno in sekundarno. Primarna je pogostejša in njena etiopatogeneza še ni v celoti pojasnjena. Med dejavnike tveganja uvrščamo starost, mehanske obremenitve, preveliko telesno težo ter dedne, hormonske in vnetne vplive. Najpogosteje so prizadeti sklepi na roki, in sicer distalni interfalangealni sklepi, kar imenujemo tudi Heberdenova OA. Sekundarna OA je posledica vnetja, poškodb, endokrinih bolezni, nevtropatičnih motenj in kopičenja snovi v sklepnem hrustancu, kot so na primer urati, kri [10].

Simptomi se razvijajo počasi in se s časom poslabšajo. Mednje uvrščamo sklepno bolečino, okorelost, krepitacije, omejeno gibljivost ter zadebeljen in/ali razoblikovan sklep [11].

OA diagnosticiramo na podlagi anamneze in fizičnega pregleda. V pomoč nam je tudi rentgenska preiskava. Napredne slikovne tehnike, kot sta računalniška tomografija in magnetna resonanca, se redko uporabljajo za diagnostiko. Laboratorijski testi ponavadi niso potrebni [12].

1.2.1 Osteoartroza in genetika

OA je multifaktorska bolezen, na katero vplivajo tako genetski dejavniki kot tudi dejavniki okolja. Njihova interakcija je zelo pomembna, saj je lahko ključna pri kliničnem izražanju bolezni. Sama genetika bolezni je zelo kompleksna. V patogenezo je vključenih več genov, kar je tudi potrdilo veliko študij. Dejanski genetski mehanizmi pa so trenutno še vedno neznani [13].

Leta 1941 je bila izvedena prva študija, ki je dokazala, da je prevalenca Heberdenovih vozlov veliko večja pri dvojčkih v primerjavi z ostalo populacijo in bolj pogosta pri ženskah. Epidemiološke študije so dokazale, da je OA kolena dedna v 40 %, medtem ko je prispevek dednosti OA dlani in kolka 65 % [13].

Gene, ki so vpleteni v patogenezo, so poskušali poiskati s pomočjo asociacijskih študij na celotnem genomu in na kandidatnih genih. Asociacijske študije na celotnem genomu so razkrile povezavo med OA in 12 kromosomi, in sicer 1, 2, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 16, 19 in X. Nadaljne analize izvedene na kromosomih 2p, 2q, 7p, 11q in 16p, so določile pet lokusov. Velika verjetnost je, da so na teh lokusih geni, ki sodelujejo pri razvoju OA [13].

V okviru asociacijskih študij kandidatnih genov, je bilo do sedaj pregledanih več kot 80 genov, a je bila ugotovljena povezava z OA le za gen *GDF5* (angl. growth differentiation factor 5), ki kodira ekstracelularno signalno molekulo, z vlogo v razvoju, ohranjanju in popravljanju sinovijskega sklepnega tkiva. Z OA so povezali SNP v 3'-neprevedljivi regiji (3'-UTR), in sicer substitucijo nukleotida (nt) C s T [14].

Določali so tudi povezavo med haploskupinami mitohondrijske DNA (mtDNA) in multifaktorskimi boleznimi in staranjem. Študije na španski populaciji so dokazale, da je pri osebah, ki imajo haploskupino J mtDNA, manjša incidenca in pa resnost OA kolena, kot pri osebah s haploskupino U mtDNA [13].

1.2.2 Osteoartroza in epigenetika

Na tem področju so do sedaj opravili malo raziskav in večinoma so bile osredotočene na hrustanec. Kar nekaj študij nakazuje, da so pri patogenezi OA spremenjeni vzorci metilacije DNA. Opazili so prisotnost hipometilacije otočkov CpG znotraj promotorjev genov, ki kodirajo različne metaloproteazne encime, kar ima za posledico povečano izražanje le teh. Po drugi strani pa so opazili hipermetilacijo v promotorski regiji gena mitohondrijske *SOD2* (superoksid dismutaza 2), prav tako tudi gena *BMP7* (kostni morfogeni protein 7), slednja pa z leti narašča. Potrebne bodo še nadaljnje študije, ki bodo potrdile ali ovrgle, dejansko vlogo teh sprememb v patogenezi OA [14].

Preučevali so tudi modifikacije histonov. Z *in vitro* poskusi so dokazali, da interleukin-1 (IL-1) vpliva prek histonske metiltransferaze SET-1A na metilacijo histonov v hondroцитih. Ta se poveča v promotorski regiji *COX-2* (ciklooksigenaza 2) in *iNOS* (inducibilna NO

sintaza), kar ima za posledico povečano izražanje le teh. Oba proteina prispevata k razvoju OA [14].

V OA hondroцитih so opazili povišano izražanje HDAC 1, 2 in 7. Z dodatkom zaviralcev, so opazili zmanjšano izražanje katabolnih genov in povišano izražanje anabolnih genov, ki kodirajo pomembne zunajcelične komponente, kot so nekateri kolageni in agrekan [15].

Med epigenetske mehanizme uvrščamo tudi miRNA. Njeno vlogo pri nastanku OA, bomo podrobnejše pojasnili v poglavju miRNA in osteoartroza.

1.3 miRNA

miRNA so kratke, 17-25 nt dolge nekodirajoče RNA endogenega izvora, ki so evolucijsko ohranjene. Danes poznamo 28645 različnih miRNA, od tega so jih 2588 izolirali iz človeških celic [16, 17]. Njihova naloga je uravnavanje izražanja genov, tako da razgradijo ali zavrejo translacijo tarčnih mRNA. Ena miRNA lahko nadzoruje več različnih mRNA, pa tudi na eno mRNA se lahko veže več miRNA. Vpletene so v uravnavanje proliferacije, diferenciacije, apoptoze in celičnega razvoja. Tako sodelujejo v fizioloških in patofizioloških procesih. Znano je, da imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka, kot tudi pri mnogih drugih bolezni [18]. Izražanje določenih miRNA je lahko značilno za posamezno razvojno stopnjo celic, prav tako pa je lahko specifično tudi za posamezna tkiva in ker so prisotne tudi v telesnih tekočinah (npr. kri), bi nam miRNA lahko služile tudi kot biološki označevalci, poleg tega pa imajo velik potencial kot terapevstke tarče. Raziskave na tem področju so že v teku [19, 20, 21].

1.3.1 Biogeneza in dozorevanje miRNA

Zapise zanje najdemo na vseh kromosomih, z izjemo kromosoma Y. Približno ena tretjina genov za miRNA se nahaja v intronih protein-kodirajočih genov. Okoli 50 % vseh miRNA najdemo v skupkih. Slednje se prepišejo kot policistronski primarni transkript [18]. miRNA, ki se nahajajo v intronih protein-kodirajočih transkripcijskih enotah, imajo isto orientacijo kot mRNA in za transkripcijo ne potrebujejo svojega promotorja. [19].

Sintezo miRNA katalizirata dva encima RNA polimeraza II in III. Najpogosteje je prepis izveden s pomočjo RNA polimeraze II. Tvori se primarni transkript, imenovan pri-miRNA, ki vsebuje eno ali več lasnih struktur [18]. pri-miRNA nato cepi kompleks (angl. microprocessor complex), ki je sestavljen iz jedrnega encima Drosha, ki je endonukleazna

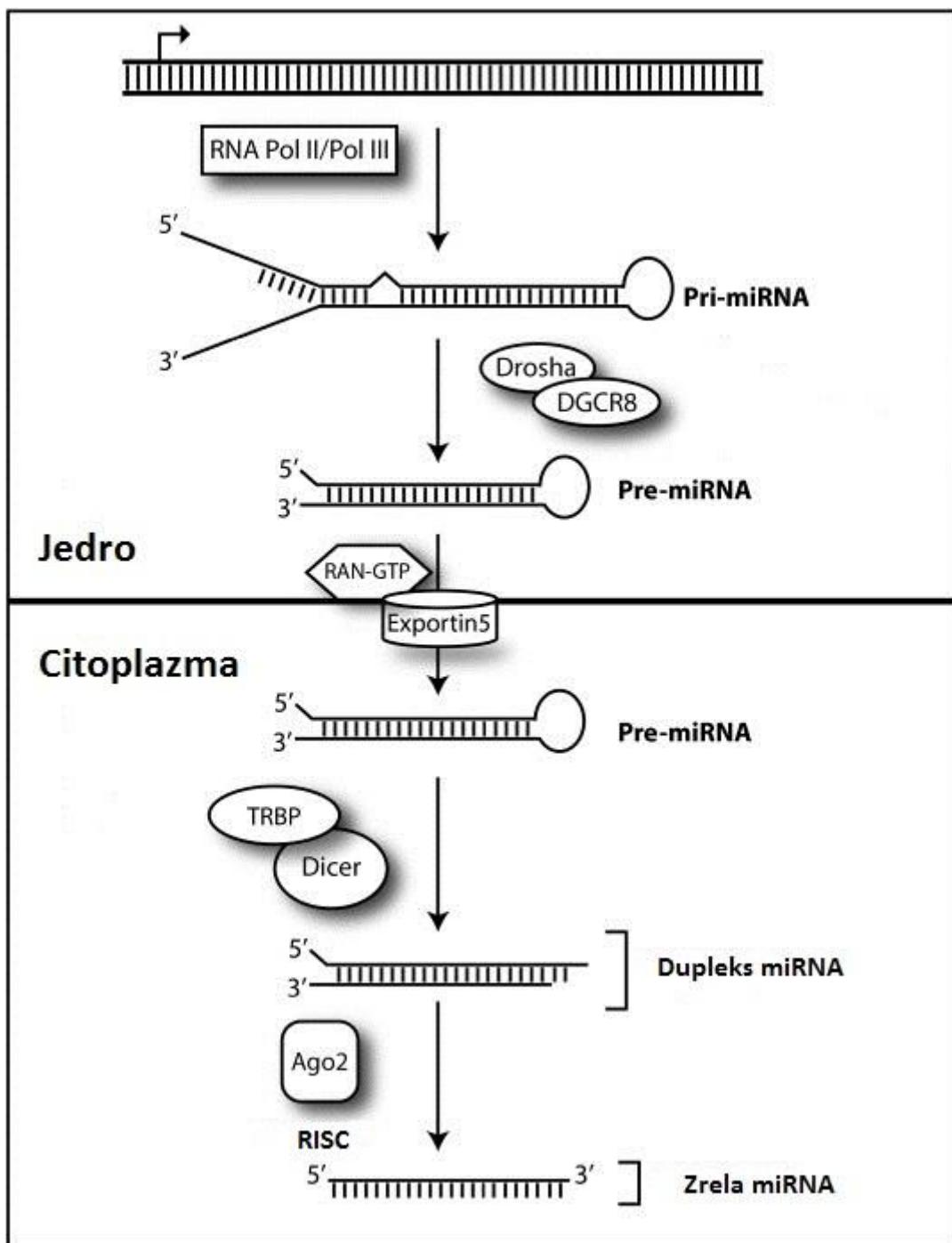
RNaza III, in DGCR8 (angl. DiGeorge syndrome critical region gene 8), ki veže miRNA. Pri tem nastane ~ 70 nt dolga prekurzorska pre-miRNA. Ta zankasta struktura ima na 5' koncu prosti fosfat in na 3' koncu dva dodatna nukleotida. Exportin-5, ki je jedernocitoplazemski transportni dejavnik, veže pre-miRNA in jo prek Ran-GTP-odvisnega mehanizma prenese v citoplazmo [19]. V citoplazmi delujeta na pre-miRNA encim Dicer, ki je citoplazemska RNaza III, in TRBP (angl. trans-activator RNA – binding protein), ki je katalitski partner encima Dicer, kar ima za posledico nastanek zrele miRNA, in sicer ~ 22 nt dolgega dupleksa miRNA, ki ima na 3' koncu dva dodatna nukleotida. Dupleks miRNA se nato veže v RISC (angl. RNA-induced silencing complex). RISC predstavlja citoplazemski kompleks proteinov, ki vežejo enoverižno miRNA, in vpliva na izražanje genov tako, da se veže na tarčne mRNA. Ena veriga dupleksa se odcepi s pomočjo proteina Ago2, druga veriga pa služi kot šablona, ki prepozna tarčo [18]. Biogeneza miRNA je prikazana na Sliki 1.

1.3.2 Mehanizem delovanja miRNA

miRNA, vezana v RISC, nadzoruje posttranskripcijsko izražanje genov na dva načina, in sicer tako, da zavre translacijo oziroma da razgradi tarčne mRNA. Mehanizem delovanja je določen na podlagi komplementarnosti med miRNA in njeno tarčno mRNA. Popolna komplementarnost ima za posledico razgradnjo mRNA. Za cepitev so odgovorni proteini Ago, ki so del RISC. V primeru delne komplementarnosti, katera je določena z nt 2-7 ali 2-8 na 5' koncu miRNA (angl. seed sequence), pa miRNA deluje na tarčno mRNA preko efektorskih proteinov, ki se vežejo na RISC, in na ta način zavre translacijo ali pa razgradi mRNA na način, ki je neodvisen od kompleksa RICS. Kateri proteini so odgovorni za zavoro translacije, je še vedno neznano, za razgradnjo mRNA so pa odgovorne deadenilaze [22]. Mesto vezave miRNA na tarčno mRNA je najpogosteje znotraj 3'-UTR. miRNA pa se lahko v redkih primerih veže tudi znotraj 5'-UTR in kodirajoče regije [18].

1.3.3 Uravnavanje biogeneze miRNA

Za ohranitev normalne celične funkcije je zelo pomembno, da so nivoji miRNA natančno uravnavani, saj je spremenjeno izražanje miRNA povezano z različnimi boleznimi. Zato so vsi koraki od sinteze pa do vezave na tarčno mRNA podvrženi strogemu uravnavanju. Biogeneza večine miRNA je uravnavana z negativno povratno zanko. Uravnavanje transkripcije pa je verjetno glavni kontrolni mehanizem [18].



Slika 1: Biogeneza miRNA [Prirejeno po 23]. Sintezo miRNA katalizirata dva encima RNA polimeraza II in III. Tvoji se primarni transkript pri-miRNA, katerega nato cepi kompleks (angl. microprocessor complex), ki je sestavljen iz jedrnega encima Drosha, ki je endonukleazna RNaza III, in DGCR8 (angl. DiGeorge syndrome critical region gene 8), ki veže miRNA. Nastane prekurzorska pre-miRNA, katero veže Exportin-5, ki je jedernocitoplazemski transportni faktor, in jo prek Ran-GTP-odvisnega mehanizma prenese v citoplazmo. V citoplazmi deluje na pre-miRNA encim Dicer, ki je citoplazemska RNaza III, in TRBP (angl. trans-activator RNA – binding protein), ki je katalitski partner encima Dicer. Nastane zrela miRNA, ki se nato veže v RISC (angl. RNA-induced silencing complex). Ena veriga dupleksa se odcepi s pomočjo proteina Ago2, druga veriga pa služi kot šablona, ki prepozna tarčo.

1.4 miRNA in osteoporoza

miRNA imajo pomembno vlogo pri uravnavanju rasti, diferenciacije in funkcije kostnih celic, saj nadzorujejo tako osteoblastogenezo kot osteoklastogenezo. Ker so pomembne pri normalnem razvoju in funkciji osteoblastov in osteoklastov, so preučevali tudi njihovo patološko vlogo. Dosedanje študije, ki povezujejo kostne bolezni z miRNA, so dokazale, da k razvoju OP prispevajo prek različnih mehanizmov [24].

Prva študija, ki je preučevala miRNA v povezavi z OP, je dokazala, da mutacija v pre-miR-2861 prispeva k razvoju primarne OP. Izražanje miR-2861 spodbuja izražanje *RUNX2* (šibko povezan transkripcijski faktor 2), tako da deluje zaviralno na izražanje *HDAC5*. Na ta način spodbuja diferenciacijo osteoblastov. Z *in vivo* študijami na mišjih modelih so dokazali, da odsotnost miR-2861 pomembno vpliva na zmanjšano MKG, kostno tvorbo, število osteoblastov in nivoje proteina RUNX2, nima pa vpliva na osteoklaste in kostno resorpcijo [7].

Na razvoj OP vplivajo tudi genetski polimorfizmi znotraj vezavnih mest miRNA v 3'-UTR tarčnih mRNA. Opazili so statistično povezano med variacijami MKG vratu stegnenice in tremi polimormorfizmi znotraj 3'-UTR mRNA, ki kodira protein FGF2 (fibroblastni rastni faktor 2). Ti polimorfizmi vplivajo na vezavo dveh miRNA, in sicer miR-146a in miR-146b [24].

Pred kratkim so objavili študijo, ki je dokazala, da povečano izražanje miR-214 v kostnem tkivu sovpada z zmanjšano kostno tvorbo. miR-214 zavre *ATF4* (angl. activating transcription factor 4), ki spodbuja privzem aminokislin, sintezo kolagena tipa I in izražanje genov specifičnih za osteoblaste. To ima za posledico zmanjšano aktivnost osteoblastov in mineralizacijo matriksa. Na kostno resorpcijo nima vpliva [7].

Preučevali so tudi izražanje miRNA v mononuklernih celicah periferne krvi. Ugotovili so povišano izražanje miR-133a in močno znižano izražanje miR-503 pri OP bolnikih. Zavora miR-503 ima za posledico povišane koncentracije proteina RANK (receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kappa B) in osteoklastogenezo, povečano kostno resorpcijo in zmanjšano kostno maso. Funkcija miR-133a še ni znana. Pri lupusnih pacientih z zmanjšano MKG so zaznali povečano izražanje miR-148a. Tako z *in vivo* kot *in vitro* poskusi so dokazali, da spodbuja osteoklastogenezo in kostno resorpcijo. Zaradi svoje

prisotnosti v mononuklearnih celicah, lahko vse tri miRNA služijo kot potencialni biološki označevalci za postmenopavzalno OP in povečano kostno resorpcijo [7].

Dosedaj so samo tri študije preučevale miRNA v kostnem tkivu. V analizo so vključili preiskovance z OP oziroma preiskovance z OA. Izbor in število preiskovancev se je med študijami razlikovalo. Najprej so na manjšem številu vzorcev določili profil miRNA v kostnem tkivu, razen pri eni študiji, kjer so ga določili v serumu. Za določitev profila so uporabili različne metode. Nato pa so miRNA, ki so imele najvišjo statistično vrednost, analizirali tudi na večjem številu vzorcev. V dveh študijah so določali tudi profil miRNA v osteoblastih. Prišli so do različnih ugotovitev. V prvi študiji so med preiskovanima skupinama opazili spremenjeno izražanje miR-187 in miR-518f, v drugi so se različno izražale miR-21, miR-23a, miR-24, miR-100 in miR-125b, v tretji pa miR-320a in miR-483-5p [25, 26, 27].

Vzorce kostnega tkiva redko pridobimo in, ker je kost dobro prekravljeno tkivo, lahko miRNA služi tudi kot dober neinvaziven biološki označevalc za kostne bolezni, saj jo lahko izoliramo iz vzorcev, kot so serum, plazma, slina in urin [7]. Posamezne študije so že preučevale miRNA tako v serumu, kot tudi v kostnem tkivu OP preiskovancev, ki so utrpeli zlom kolka. Pri tem so opazili povišane nivoje miR-21, miR-23a, miR-24, miR-100 in miR-125b v obeh vzorcih. Za miR-23a, miR-24 in miR-125b je znano, da zavrejo osteogenezo *in vitro*. Te miRNA, bi lahko služile kot biološki označevalci za kostne bolezni [28].

1.5 miRNA in osteoartroza

Več študij je že primerjalo izražanje miRNA v normalnem in OA hrustancu. Opazili so spremembe v izražanju različnih miRNA, ki niso vpletene le v uravnavanje hondrogeneze, temveč tudi v vnetne procese in debelost [29].

Ena izmed njih je miR-140. Študije so dokazale, da se selektivno izraža v hrustancu, kjer nadzoruje njegov razvoj in homeostazo. Njena izguba bi lahko prispevala k razvoju OA. Deluje na več različnih tarč, kot na primer *HDAC4*, *IGFBP-5* (inzulinu podoben rastni faktor protein 5). Z *in vitro* študijami so dokazali, da IL-1 β lahko zavre izražanje miR-140. Transfekcija ds-miR-140 pa zavre z IL-1 β inducirano izražanje *ADAMTS5* (angl. a

disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5), po drugi strani pa spodbudi izražanje agrekana [30].

V OA hrustancu so opazili tudi zmanjšano izražanje miR-27a in miR-27b. miR-27a zavre diferenciacijo adipocitov in naj bi bila vpletena v deregulacijo maščevja pri debelosti, kar je tudi velik dejavnik tveganja za OA. Posredno pa naj bi tudi uravnavala nivoje *MMP-13* (matriks metaloproteinaza 13) in *IGFBP-5*. Izražanje miR-27b je značilno zmanjšano pri OA, njena tarča pa je *MMP-13* [30].

V hondroцитih, ki se nahajajo v zgornjih slojih hrustanca, in v začetnih stadijih OA je povečano izražanje miR-146a. Z napredovanjem bolezni pa se ta močno zmanjša. Opazili so tudi, da so pri močno izraženi miR-146a nivoji *MMP-13* zelo nizki [29].

Izvedli pa so tudi študijo, kjer so preučevali tudi kostno tkivo. Opazili so 30 miRNA, ki se spremenjeno izražajo v OA kostnem tkivu v primerjavi z normalnem. Najbolj so izstopale miR-27a, miR-34b in miR-98, katerih izražanje je bilo povečano, in miR-330, kjer so opazili nižje izražanje. miR-9 in miR-98 pa imata povečano izražanje tako v OA kostnem, kot tudi v hrustančnem tkivu in bi ju lahko funkcionalno povezali z vnetjem [31].

V patogenezi OA ima pomembno vlogo tudi vnetje. Več študij na makrofagih in monocitih je dokazalo, da ima aktivacija preko receptorjev Toll/IL-1 in TNF- α (tumor nekrotizirajoči faktor α) za posledico porast večih miRNA, mednje spada tudi miR-9. Povečano izražanje le te zmanjša z IL-1 β inducirano sintezo MMP-13. Povečano izražanje miR-9, miR-98 in miR-146 zmanjša z IL-1 β posredovano tvorbo TNF. To nakazuje, da imajo te miRNA zaščitno vlogo. miR-9 in miR-98 pa delujeta tudi na mnogo genov, ki so vpleteni v vnetne bolezni in mednje spada tudi OA [30].

Več miRNA ima spremenjeno izražanje v plazmi pri OA bolnikih v primerjavi z zdravimi, kar nakazuje, da bi cirkulirajoče miRNA lahko bile tudi diagnostični označevalec. Poleg plazme bi lahko določali miRNA tudi v mononuklearnih celicah periferne krvi. Slednje se kopijo v sinoviji, kjer proizvajajo provnetne citokine in proteinaze, ki so povezane z napredovanjem bolezni. V teh celicah so opazili povečano izražanje miR-146a, miR-155, miR-181a in miR-223 pri OA bolnikih v primerjavi z zdravo populacijo. Te miRNA bi lahko bile vpletene v patogenezo OA [29].

1.6 miR-204-5p in miR-195-5p

Na podlagi vsegenomske analize kostnih vzorcev bolnikov z OP in OA, opravljene v okviru projekta na Katedri za klinično biokemijo, Fakultete za farmacijo, sta se kot zanimivi za preučevanje izkazali miR-195-5p in miR-204-5p. S pomočjo različnih računalniških programov smo določili tudi potencialne tarčne gene, ki so zanimivi predvsem s stališča kostne biologije. Ti geni so *ALPL*, *SPARC*, *BMP1* in *ELOVL6* za miR-204-5p in *CYP26B1*, *ELOVL6*, *GSTCD* in *MYB* za miR-195-5p. V nadaljevanju sledi kratek opis vsakega izmed njih.

Zapis za miR-195-5p se nahaja na kromosomu 17p13.1 [32]. Uvrščamo jo v naddružino miR-15. Njeno izražanje so opazili v večih tkivih, in sicer v srcu, skeletnih mišicah, možganih, pljučih, ledvicah, jetrih, vranici in posteljici. Deluje kot tumorski zaviralec [33]. Njeni tarčni geni so proteini, ki so vpleteni celični cikel, apoptozo in proliferacijo. Opazili so spremenjeno izražanje miR-195-5p pri večih bolezni, in sicer pri različnih rakih, srčno-žilnih bolezni in shizofreniji [34].

miR-204-5p se nahaja na kromosomu 9q21.12. Izraža se v različnih tkivih, kot na primer v možganih, malih možganih, srcu, ledvicah in testisih [35, 36]. Deluje kot tumorski zaviralec. Opazili so njeno izgubo pri večih rakih, na primer raku ovarijev, otroških ledvičnih tumorjih in raku dojke. Deluje na različne gene, ki so vpleteni v tumorigenezo. Njena izguba vodi v migracijo rakastih celic in invazijo [37]. Vpletena je tudi v patogenezo različnih drugih bolezni, kot sta epilepsija in pljučna arterijska hipertenzija [38, 39].

Gen *ALPL* kodira tkivno nespecifično alkalno fosfatazo, ki jo najdemo v jetrih, kosteh in ledvicah. Je ena izmed štirih izoencimov in zapis zanjo se nahaja na kromosomu 1p36.12. Velikost gena je 69431 baznih parov (bp) in je sestavljen iz 15 eksonov. Dolžina transkripta pa je 2606 nt. *ALPL* je na membrano vezan glikoziliran encim. Njena funkcija še ni poznana, predvidevajo pa da je vključena v mineralizacijo matriksa [40]. Mutacije v genu povzročijo hipofosfatazijo, ki je redka dedna bolezen, za katero so značilne motnje v mineralizaciji kosti in zob [41].

Gen *SPARC* kodira osteonektin. Leži na kromosomu 5q31.3-q32. Velikost gena, ki vsebuje 10 eksonov, je 25959 bp. Opazili so tri različne transkripte, dolžine 3601, 3602 in 3604 nt, ki kodirajo različne izotipe [42]. Osteonektin se izloča v zunajcelični matriks, kjer uravnava morfogenezo, celično adhezijo/migracijo in diferenciacijo. Igra pomembno vlogo

pri razvoju zarodka, celjenju ran, kostni tvorbi, adipogenezi, angiogenezi, kataraktogenezi in pri napredovanju tumorja oziroma metastaziranju [43].

Gen *BMP1* kodira kostni morfogeni protein 1. Nahaja se na kromosomu 8p21.3. Velikost gena, katerega sestavlja 25 eksonov, je 47187 bp. Dolžina transkripta je 3835 nt [44]. Deluje kot metaloproteaza, ki cepi C-terminalne prokolagene tipa I, II in III, prav tako pa tudi sproži tvorbo kosti in hrustanca [45]. Mutacije v genu *BMP1* povzročijo avtosomno recesivno imperfektno osteogenezo [46].

Gen *ELOVL6* (angl. ELOVL Fatty Acid Elongase 6) vsebuje 8 eksonov, se nahaja na kromosomu 4q25. Velikost gena je 150127 bp [47]. Ima 8 transkriptov, trije od teh ne kodirajo proteina [48]. Encim se nahaja v endoplazemskem retikulumu in katalizira prvo reakcijo od štirih v ciklu podaljševanja dolgih verig maščobnih kislin [49]. Genetske spremembe v genu *ELOVL6* so povezane z občutljivostjo na inzulin [50].

Gen *CYP26B1* se nahaja na kromosomu 2p13.2. 18625 bp dolg gen vsebuje 8 eksonov. Dolžina transkripta je 4567 nt. Spada v naddružino monoooksigenaz citokrom P450, ki katalizirajo več reakcij. Vpletene so v presnovo zdravil in sintezo holesterola, steroidov in ostalih lipidov. *CYP26B1* se nahaja v endoplazemskem retikulumu in uravnava nivoje trans retinoične kisline. Mutacije v genu imajo za posledico skeletne in kraniofacialne spremembe, povišane koncentracije proteina pa so povezane z ateroskleroznimi lehami [51].

Gen *GSTCD* (angl. glutathione S-transferase C-terminal domain containing) je velik 138948 bp in se nahaja na kromosomu 4q24. Vsebuje 16 eksonov in tvori 11 transkriptov [52, 53]. Malo je znanega o tem proteinu, predvidevajo pa, da je vpletен v detoksifikacijo, tako da katalizira konjugacijo med glutationom in produkti oksidativnega stresa. S pomočjo asociacijskih študij na celotnem genomu pa so ugotovili, da je SNP znotraj gena *GSTCD* močno povezan s pljučno funkcijo [54].

Gen *MYB* (angl. v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog), ki je sestavljen iz 18 eksonov, se nahaja na kromosomu 6q22-q23. Velikost gena je 38193 bp in tvori 3681 nt dolg transkript. *MYB* je transkripcijski dejavnik, ki je sestavljen iz treh domen: N-terminalno DNA vezujočo domeno, centralno domeno, ki aktivira transkripcijo, in C-terminalno domeno, ki zavira transkripcijo. Igra pomembno vlogo pri uravnavanju hematopoeze, vpletten pa je tudi v razvoj tumorja [55].

2 NAMEN

Osteoporozna in osteoartroza dandanes predstavlja velik zdravstveni in ekonomski problem v razviti družbi. Do sedaj so preučevali že mnogo mehanizmov nastanka bolezni, vendar ti še vedno niso v celoti pojasnjeni. Zato so potrebne nadaljnje raziskave novih mehanizmov in enega od bolj obetavnih predstavlja tudi delovanje miRNA. Zaradi svoje pomembne vloge v uravnavanju izražanja genov v fizioloških in patoloških procesih predstavljajo obetavne diagnostične označevalce kot tudi nove terapevtske tarče.

Na podlagi vsegenomske analize kostnih vzorcev bolnikov z osteoporozo in osteoartrozo, opravljene v okviru projekta na Katedri za klinično biokemijo, Fakultete za farmacijo, sta se kot zanimivi za preučevanje izkazali miR-195-5p in miR-204-5p. S pomočjo različnih programov, smo določili tudi njune potencialne tarčne gene. Izbrali smo gene, ki so zanimivi predvsem s stališča kostne biologije. Tarčni geni za miR-195-5p so *CYP26B1*, *ELOVL6*, *GSTCD* in *MYB*, za miR-204-5p pa *ALPL*, *SPARC*, *BMP1* in *ELOVL6*.

Namen magistrske naloge bo ugotoviti pomen miR-195-5p in miR-204-5p pri razvoju osteoporoze in osteoartroze. V ta namen bomo na izoliranih kostnih vzorcih izvedli prepis in s pomočjo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času določili:

- nivo miR-195-5p in miR-204-5p v večjem številu kostnih vzorcev in preverili ali obstaja statistično značilna razlika v nivoju teh miRNA med tremi skupinami preiskovancev, in sicer skupino preiskovancev z osteoporozo, skupino preiskovancev z osteoartrozo in skupino zdravih preiskovancev;
- izražanje genov *ALPL*, *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB* ter preverili njihovo povezavo z miR-195-5p oziroma miR-204-5p.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Preiskovanci

V preiskavo smo vključili 103 preiskovance. Kostni vzorci 88 preiskovancev so bili odvzeti med operacijo polovične ali popolne zamenjave kolčnega sklepa zaradi zloma vratu stegnenice (N=44) ali OA (N=44) na Oddelku za travmatologijo Splošne bolnišnice Celje ozziroma v Ortopedski bolnišnici Valdoltra. Preiskovanci niso imeli sistemskih ali drugih presnovnih bolezni, ki bi lahko vplivale na kosti ali na presnovo mineralov. 12 mesecev pred operacijo niso prijemali farmakoloških hormonskih pripravkov ali dodatkov Ca^{2+} ionov ali vitamina D. Kostni vzorci zdravih preiskovancev (N=15) so bili pridobljeni med obdukcijo na Inštitutu za sodno medicino, Medicinske Fakultete Ljubljana. Etična komisija je uporabo kostnega tkiva v raziskovalne namene odobrila, preiskovanci pa so bili predhodno obveščeni in so tudi podpisali pristanek.

3.1.1 Merjenje mineralne kostne gostote

Preiskovance so diagnosticirali na podlagi merjenja MKG z dvoenergijsko rentgensko absorpciometrijo (DXA), kliničnega in radiografskega pregleda kolka v Splošni bolnišnici Celje. Preiskovancem so izmerili MKG kolka (MKGtot; angl. total hip bone mineral density), vratu stegnenice (MKGfn; angl. femoral neck bone mineral density) in področja ledvene hrbtenice (MKGls; angl. lumbar spine bone mineral density). Podatkov o MKG nimamo za zdrave preiskovance.

3.1.2 Merjenje serumskih plazemskih kazalcev

Preiskovancem so v Splošni bolnišnici Celje odvzeli kri in jim v serumu določili vrednosti Ca^{2+} in fosfatnih ionov. Intaktni paratiroidni hormon (iPTH) in 25-hidroksivitamin D (25(OH)D) so določili na Kliniki za nuklearno medicino, UKC Ljubljana. Na Katedri za klinično biokemijo, Fakultete za farmacijo so v serumu s pomočjo encimskoimunske metode izmerili osteoprotegerin (OPG). Vrednosti serumskih plazemskih kazalcev nimamo za zdrave preiskovance.

3.1.3 Označevalci pridobljeni z metodo mikro-računalniške tomografije

Na Inštitutu za genetiko in molekularno medicino, Univerze v Edinburgu so s pomočjo mikro-računalniške tomografije (μCT) določili sledeči označevalce, in sicer volumski delež kostnine (BV/TV [%]), razmerje kostne površine proti kostnemu volumnu (BS/BV

[mm⁻¹]), površinska gostota kosti (BS/TV [μm⁻¹]), debelina trabekul (Tb.Th [μm]), razmaknjenost trabekul (Tb.Sp [μm]), število trabekul (Tb.N [μm⁻¹]), kazalec strukture modela SMI (angl. structural model index), stopnja anizotropije DA (angl. degree of architectural anisotropy) in gostota povezanosti Conn.Dn (angl. connectivity density [μm⁻³]).

3.1.4 Označevalci pridobljeni z metodo kostne histomorfometrije

Na Inštitutu za genetiko in molekularno medicino, Univerze v Edinburgu so s pomočjo kostne histomorfometrije določili tudi označevalce, kot so osteoidna površina (OsS/BS), osteoidni volumen (OsV/BV), število osteoblastov in osteklastov (NOB in NOc) ter število osteoblastov in osteklastov na kostno površino (NOBBS in NOCBS).

3.2 Materiali

3.2.1 Reagenti

- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit z RNaznim inhibitorjem (Applied Biosystems,USA)
- SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems,USA)
- Oligonukleotidni začetniki za SPARC, BMP1, ELOVL6, CYP26B1, GSTCD, MYB, RPLP0 IN GAPDH (Sigma)
- Light Cycler® 480 Probes Master za analizo ALPL (Roche)
- miScript II RT Kit (QIAGEN®)
- miScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN®)
- Nukloetidni začetnik za posamezne miRNA (QIAGEN®)

3.2.2 Aparature

- Avtoklav
- NanoDrop Spectrophotometer ND-1000
- Centrifuge:
 - Centric 322A (Tehnica)
 - Centrifuge 5804R (Eppendorf)
 - FVL-2400N Combi – Spin (Biosan)
- Komora: DNA/RNA UV-CLEAR, UVC/T-M-AR (Biosan)
- Ciklični termostat: peqSTAR (peqlab)

- Ciklični termostat: Light Cycler® 480 II (Roche)

3.2.3 Delovni pribor

- Polavtomatske pipete: 0.1-2.5 µL, 2-20 µL, 20-200 µL in 100-1000 µL (Eppendorf)
- Nastavki za pipete
- Epice
- Mikrotitrski ploščice s 384 vdolbinicami in samolepilna folija (Sarstedt)

3.3 Določitev količine RNA

Koncentracijo RNA smo določili s pomočjo UV/VIS spektrofotometrije. 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. S pomočjo razmerij A_{260}/A_{280} in A_{260}/A_{230} pa določimo čistost RNA.

3.4 Obratna transkripcija

S pomočjo obratne transkripcije (RT) sintetiziramo komplementarno DNA (cDNA) na podlagi enoverižne matrice RNA. Začne se s prilaganjem oligonukleotidnih začetnikov na matrico RNA, nato obratna transkriptaza sintetizira cDNA. Pri tem nastane dupleks DNA:RNA. RNaza H razgradi RNA in temu sledi izgradnja komplementarne verige DNA, kar ima za posledico nastanek cDNA [56].

3.4.1 Priprava reakcijske zmesi in izvedba obratne transkripcije za prepis RNA

Pred izvedbo RT smo redčili vzorce na končno koncentracijo RNA 200 ng/µL in pripravili reakcijsko zmes. Pripravili smo tudi negativno kontrolo RT, kateri nismo dodali encima obratna transkriptaza. Negativna kontrola RT nam pri optimizaciji omogoči preveriti vpliv genomske DNA. Reakcijo smo pripravili na ledu in za prepis uporabili High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. V Tabeli 1 je prikazana sestava reakcijske zmesi. Prepis je potekal v cikličnem termostatu po programu, ki je prikazan v Tabeli 2. Po končanem prepisu smo vzorce shranili v zamrzovalniku na -80 °C.

Tabela 1: Sestava reakcijske zmesi za prepis RNA v cDNA.

Reagenti	Volumen (μ L)	
	vzorec	neg. kontrola RT
Pufer RT 10x	10	10
Zmes dNTP (100mM) 25x	4	4
Naključni oligonukleotidni začetniki 10x	10	10
Obratna transkriptaza	5	/
Inhibitor RNaze	5	5
dH₂O	16	21
RNA (200 ng/μL)*	50	50
	100	100

*priporočeno do 2 μ g celokupne RNA na 20 μ L celokupnega volumena reakcije

Tabela 2: Program za prepis RNA v cDNA.

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

3.4.2 Priprava reakcijske zmesi in izvedba obratne transkripcije za prepis miRNA

Vzorce smo redčili na končno koncentracijo RNA 100 ng/ μ L. Za pripravo reakcijske zmesi, katero smo pripravili na ledu, smo uporabili miScript II RT Kit. V reakcijsko zmes smo vključili tudi spike-in (cel-miR-248). Z njim preverjamo izkoristek izolacije, prepisa in prisotnost zaviralcev pri izvedbi qPCR, v našem primeru lahko preverjamo le prepis in prisotnost zaviralcev. Pripravili smo tudi reakcijsko zmes za negativno kontrolo RT. Sestava reakcijske zmesi je prikazana v Tabeli 3. Reakcija je bila izvedena v cikličnem termostatu, kjer je 60 min potekala inkubacija na 37 °C, nato pa 5 min na 95 °C, da se je inaktiviral encim. Vzorce smo nato shranili v zamrzovalniku na -80 °C.

Tabela 3: Sestava reakcijske zmesi za prepis miRNA v cDNA.

Reagenti	Volumen (μL)	
	vzorec	neg. kontrola RT
Pufer miScript HiSpec 5x	4	4
Zmes nukleotidov miScript 10x	2	2
Spike-in v H_2O	2	2
zmes miScript RT	2	/
d H_2O	/	2
RNA (100 ng/ μL)*	10	10
	20	20

*priporočeno do 1 μg celokupne RNA na 20 μL celokupnega volumna reakcije

3.5 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) nam omogoča kvantifikacijo nukleinskih kislin, tako da tekom reakcije meri količino produkta v vsakem ciklu. To dosežemo tako, da v reakcijo vključimo fluorescenčna barvila. Poznamo več načinov detekcije, in sicer specifično in nespecifično. Primer nespecifične detekcije je uporaba interkelirajočega barvila, kjer se fluorescenčno barvilo interkelira v dvoverižno DNA. S tem načinom detekcije, lahko določimo tudi nespecifične produkte, katerih prisotnost preverjamo s talilno analizo. Primer specifične detekcije so hidrolizirajoče sonde, ki imajo na enim koncu vezano reportersko barvilo, ki emitira fluorescenco, na drugem pa dušilec, ki fluorescenco prestreže. Sonde se specifično vežejo na tarčno DNA. V stopnji podaljševanja *Taq* DNA-polimeraza razgradi sondu, pri tem pa se razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem poveča in s tem se omogoči detekcija fluorescence [57].

Kinetika PCR vključuje tri faze: eksponentno, linearno in plato, vendar lahko samo v eksponentni fazi iz količine produkta PCR zanesljivo določimo začetno število kopij matrice v vzorcu. Zato na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto intenzitetu fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Za vsak vzorec določimo cikel, ko preseže ta prag. Ta cikel imenujemo kvantifikacijski cikel (c_q) [57].

3.5.1 Merjenje izražanja genov *ALPL*, *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB* z uporabo interkelirajočega barvila in hidrolizirajočih sond

Izražanje genov *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB* smo merili z uporabo interkelirajočega barvila, prav tako tudi izražanje referenčnih genov *RPLP0* in *GAPDH*, izražanje gena *ALPL* pa s hidrolizirajočimi sondami. Oligonukleotidne začetnike, katere smo uporabili pri analizi z uporabo interkelirajočega barvila, smo oblikovali sami. Njihova zaporedja so prikazana v Tabeli 4. Za analizo s hidrolizirajočimi sondami, smo uporabili komercialno dostopni komplet.

Tabela 4: Zaporedja oligonukletotidnih začetnikov za merjenje izražanja genov *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB* z uporabo interkelirajočega barvila. (F – smerni, R – protismerni)

Gen	Smer	Zaporedje	Tm (°C)
<i>SPARC</i>	F	5'-ATTGACGGGTACCTCTCCCCA-3'	65,5
	R	5'-GAAAAAGCGGGTGGTGCAAT-3'	68,0
<i>ELOVL6</i>	F	5'-CAAAGCACCCGAACTAGGAGA-3'	65,3
	R	5'-GGAGCACAGTGATGTGGTGA-3'	65,1
<i>GSTCD</i>	F	5'-GAGGCGAGTGGTCTGCG-3'	66,3
	R	5'-TTCATTGGGTCACCTGGTCG-3'	68,3
<i>MYB</i>	F	5'-GCAGGTGCTACCAACACAGA-3'	64,0
	R	5'-GCAGAGATGGAGTGGAGTGG-3'	65,0
<i>BMP1</i>	F	5'-GCCACGTTCCATCGTTCG-3'	68,8
	R	5'-AGAATGTGTTCCGAGCGTAATG-3'	65,0
<i>CYP26B1</i>	F	5'-TGGACCTCCTCATTGAGAGCA-3'	67,2
	R	5'-GGCATAGGCCGCAAAGATCA-3'	69,2

Pred izvedbo qPCR smo pripravili standarde, kalibrator in redčili vzorce za analizo 9 genov. Za merjenje izražanja genov *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB* z uporabo interkelirajočega barvila smo uporabili koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov 200 nM, za referenčna gena *RPLP0* in *GAPDH* pa 100 nM. Iz vseh vzorcev, katere smo vključili v analizo, smo pripravili zmes cDNA z izhodiščno koncentracijo 100 ng/µL. Iz zmesi smo pripravili šest standardov, katerih koncentracije so bile 0,157, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5 in 5 ng/µL cDNA, prav tako pa tudi kalibrator. Kalibrator je vzorec, ki

nam pomaga pri relativni kvantifikaciji, kjer primerjamo izražanje tarče v preiskovanem vzorcu in kalibratorju. Ima vrednost 1, vse ostale količine, pa so izražene kot n-kratnik kalibratorja [57]. Vzorce in kalibrator smo redčili na koncentracijo 2,5 ng/ μ L. Redčene vzorce in standarde smo hranili v hladilniku, kalibrator pa v zamrzovalniku do 5 dni na -80 °C.

Za pripravo reakcijske zmesi smo uporabili SYBR® Select Master Mix ali Light Cycler® 480 Probes Master. V Tabelah 5 in 6 sta prikazani sestavi reakcijskih zmesi za analizo qPCR z interkelirajočim barvilkom in s hidrolizirajočimi sondami. Priprava reakcijske zmesi za analizo s hidrolizirajočimi sondami je potekala na ledu. Po pripravi reakcijske zmesi, smo epico narahlo premešali in centrifugirali ter nanesli na mikrotitrsko ploščico. Nato smo po shemi, katero smo predhodno pripravili, v trojniku nanesli še cDNA in vodo, ki nam je služila kot negativna kontrola. Ploščico smo pokrili s samolepilno folijo, jo centrifugirali 3 minute na 2500 r.p.m. in vstavili v ciklični termostat, na katerem smo predhodno nastavili program. Programa za analizo z uporabo interkelirajočega barvila oziroma hidrolizirajočih sond sta prikazana v Tabelah 7 in 8.

Tabela 5: Sestava reakcijske zmesi za merjenje izražanja genov *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB* ter referečnih genov *RPLP0* in *GAPDH* z uporabo interkelirajočega barvila.

Konc. oligonukleotidnih začetnikov	100 nM	200 nM	300 nM	600 nM
Reagenti	Volumen (μ L)			
Univerzalna mešanica reagentov (SYBR Select) 2x	7,5	7,5	7,5	7,5
F – oligonukleotidni začetnik (20 μ M)	0,15	0,075	0,225	0,45
R – oligonukleotidni začetnik (20 μ M)	0,15	0,075	0,225	0,45
dH ₂ O	2,2	2,35	2,05	1,6
cDNA (2,5 ng/ μ L)*	5,0	5,0	5,0	5,0
	15	15	15	15

* priporočeno do 100 ng cDNA za 10 ali 20 μ L celokupnega volumena reakcije

Tabela 6: Sestava reakcijske zmesi za merjenje izražanja *ALPL* z metodo hidrolizirajočih sond.

Reagenti	Volumen (μL)
Univerzalna mešanica reagentov (LightCycle Probes Master) 2x	5
Sonde 20x	0,5
dH ₂ O	2
cDNA (2,5 ng/ μL)*	2,5
	10

* priporočeno od 50 pg do 50 ng cDNA na reakcijo.

Tabela 7: Program za merjenje izražanja genov z uporabo interkelirajočega barvila.

	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Trajanje
Aktivacija UDP	50	2 min
Aktivacija AmpliTaq DNA polimeraze	95	2 min
Denaturacija	95	15 s
Prileganje/podaljševanje	60	1 min

Tabela 8: Program za merjenje izražanja *ALPL* z metodo hidrolizirajočih sond.

	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Trajanje	Čas spremnjanje temperature ($^{\circ}\text{C}/\text{s}$)
Pre-inkubacija	95	10 min	4,8
Pomnoževanje	95	10 s	4,8
	60	30 s	2,5
	72	1 s	4,8
Hlajenje	40	30 s	2,5

3.5.1.1 Kvantifikacija izražanja genov *ALPL*, *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB*

Izvedli smo relativno kvantifikacijo po metodi standardne krivulje. S pomočjo umeritvene krivulje smo določili koncentracije vzorcev. Ker smo nanašali v trojniku, smo upoštevali povprečno koncentracijo. Normalizacijo smo izvedli na dva referenčna gena, in sicer *RPLP0* in *GAPDH*, zato smo upoštevali geometrično sredino. Razmerje smo izračunali po Enačbi 1:

$$\text{razmerje} = \frac{C_t}{\sqrt{Cr_1 * Cr_2}} \quad (1)$$

Pri tem je c_t koncentracija tarče, c_{r1} koncentracija referenčnega gena 1 in c_{r2} koncentracija referenčnega gena 2 [57,58].

3.5.2 Izbor referenčnih miRNA

Kot kandidatne referenčne miRNA smo izbrali RNU6, SNORD96a, let-7a in miR-16, in sicer na podlagi literature, ter miR-140 in miR-32. Slednja smo izbrali glede na rezultate analize Nanostring. Njuno izražanje je bilo stabilno v kostnem tkivu, prav tako pa ni bilo razlike v izražanju pri preiskovancih z OP oziroma OA.

Iz vseh vzorcev, katere smo vključili v analizo, smo pripravili zmes cDNA z izhodiščno koncentracijo 50 ng/ μ L. Iz zmesi smo pripravili standarde, katerih koncentracije so bile 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 in 200 pg/ μ L cDNA. V analizo smo vključili 5 vzorcev preiskovancev z OP in 5 vzorcev preiskovancev z OA ter negativno kontrolo RT, s katero smo preverjali vpliv genomske DNA. Vse smo redčili na koncentracijo 4,5 ng/ μ L. Standarde in vzorce smo hranili v hladilniku.

Za pripravo reakcijske zmesi smo uporabili miScript SYBR Green PCR Kit. Njena sestava je prikazana v Tabeli 9. Po pripravi smo jo narahlo premešali in nanesli na mikrotitrsko ploščico. Nato smo po shemi, katero smo predhodno pripravili, v trojniku nanesli še cDNA in vodo, ki nam je služila kot negativna kontrola. Ploščico smo prekrili s samolepilno folijo, jo centrifugirali 3 minute na 2500 r.p.m. in vstavili v ciklični termostat, na katerem smo predhodno nastavili program, zapisan v Tabeli 10.

Tabela 9: Sestava reakcijske zmesi za merjenje izražanja miRNA.

Reagenti	Volumen (μL)
Univerzalna mešanica reagentov (QuantiTect Sybr Green MM) 2x	5
Univerzalni oligonukleotidni začetniki 10x	1
Oligonukleotidni začetnik 10x	1
dH ₂ O	2
cDNA (4,5 ng/ μL)*	1
	10

* priporočeno od 50 pg do 3 ng cDNA na reakcijo

Tabela 10: Program za merjenje izražanja miRNA.

	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Trajanje	Št. ciklov
Začetna aktivacija	95	15 min	
Denaturacija	94	15 s	
Prilagajanje	55	30 s	
Podaljševanje	70	30 s	
Ohlajanje	4	∞	

Po končani analizi smo rezultate zbrali v Excelu in jih analizirali s pomočjo programa NormFinder [59].

3.5.3 Merjenje izražanja miR-195-5p in miR-204-5p z uporabo interkelirajočega barvila

Pred analizo smo pripravili standarde, kalibrator in vzorce za merjenje izražanja štirih miRNA, in sicer miR-195-5p, miR-204-5p, SNORD 96a in let-7a. Iz zmesi cDNA smo pripravili kalibrator in standarde, katerih koncentracije so bile 125, 250, 500, 1000, 2000 in 4000 pg/ μL . Vzorce in kalibrator smo redčili na koncentracijo 4,5 ng/ μL . Standarde in vzorce smo hranili v hladilniku, kalibrator pa v zamrzovalniku do 5 dni na -80 °C.

Priprava reakcijske zmesi, nanos na mikrotitrsko ploščico in program analize so opisani v poglavju Izbor referenčnih miRNA.

3.5.3.1 Kvantifikacija izražanja miR-195-5p in miR-204-5p

Izvedli smo relativno kvantifikacijo po Pfafflovi metodi, kjer smo primerjali vrednosti c_q tarčne in referenčne endogene miRNA za vzorec in kalibrator, upoštevali pa smo tudi učinkovitosti pomnoževanj tako tarčne kot referenčne miRNA. Razmerje smo izračunali po Enačbi 2:

$$\text{razmerje} = \frac{E_t^{Cqt(\text{kalibrator})-Cqt(\text{vzorec})}}{E_r^{Cqr(\text{kalibrator})-Cqr(\text{vzorec})}} \quad (2)$$

Pri tem je E_t učinkovitost pomnoževanja tarčne miRNA, c_{qt} kvantifikacijski cikel tarčne miRNA, E_r učinkovitost pomnoževanja referenčne miRNA in c_{qr} kvantifikacijski cikel referenčne miRNA [60]. Ker smo nanašali v trojniku, smo upoštevali povprečno vrednost. To razmerje pa predstavlja normalizacijo na samo eno referenčno miRNA, mi smo pa izvedli normalizacijo na dve miRNA, in sicer SNORD 96a in let-7a, zato smo upoštevali geometrično sredino, kot je prikazano v Enačbi 3:

$$\text{razmerje} = \frac{T}{\sqrt{R_1 * R_2}} \quad (3)$$

Pri tem T predstavlja $E_t^{Cqt(\text{kalibrator})-Cqt(\text{vzorec})}$, $R_1 E_r^{Cqr(\text{kalibrator})-Cqr(\text{vzorec})}$ za referenčno miRNA 1 in $R_2 E_r^{Cqr(\text{kalibrator})-Cqr(\text{vzorec})}$ za referenčno miRNA 2 [58].

3.6 Statistična analiza rezultatov s pomočjo programa SPSS

Statistično analizo smo izvedli z računalniškim programom SPSS/PASW v. 18.0.0 (IBM, Chicago, IL, USA). Preiskovance smo razdelili v tri skupine, in sicer v skupino preiskovancev z OP, skupino preiskovancev z OA ter skupino zdravih preiskovancev.

Izvedli smo naslednje teste:

- ANOVA – za tri ali več normalno porazdeljenih spremenljivk
- t-test – za dve normalno porazdeljeni spremenljivki
- test Kruskal-Wallis – za tri ali več nenormalno porazdeljene spremenljivke
- test Mann-Whitney – za dve nenormalno porazdeljeni spremenljivki
- Spearmanov korelacijski koeficient (r_s) – neparametrična meritev statistične korelacije med dvema spremenljivkama

Pri ANOVA smo izvedli tudi teste Post hoc, ki omogočajo določanje povezanosti izbranih spremenljivk, ki se porazdeljujejo normalno. Izvedli smo naslednje teste:

- test Scheffe
- test Games-Howell

Vrednost statistične analize (p), ki je manjše od 0.050, smo opredelili kot statistično značilno razliko.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Rezultati optimizacije metod za analizo izražanja genov in miRNA

4.1.1 Rezultati optimizacije analize izražanja genov z uporabo interkelirajočega barvila in hidrolizirajočih sond

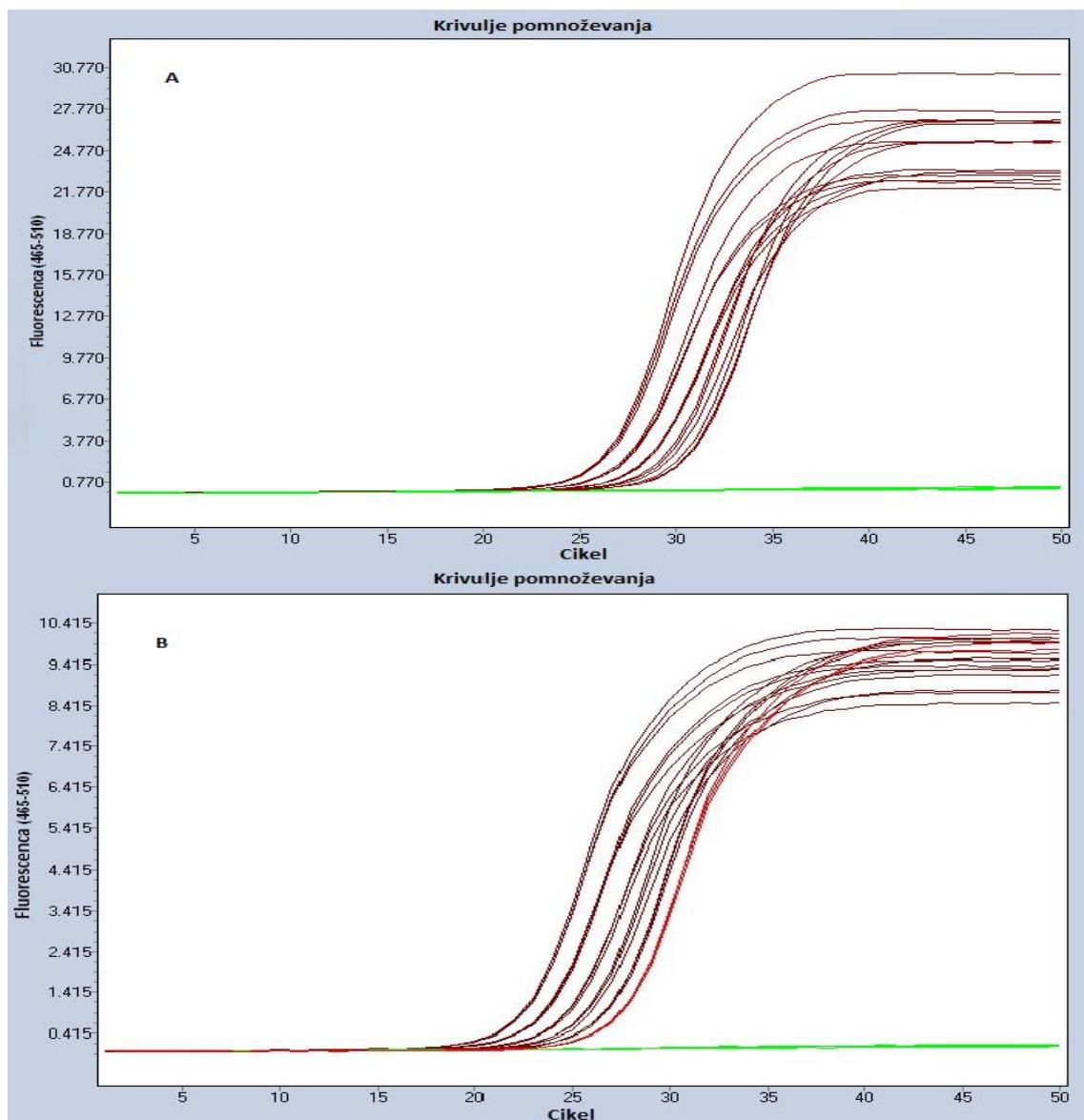
Pred analizo vzorcev, smo izvedli optimizacijo analize izražanja mRNA z uporabo interkelirajočega barvila. Optimizacija je potrebna, saj z njo dosežemo najbolj učinkovito pomnoževanje. Optimizirali smo koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov, s standardi oblikovali umeritveno krivuljo, s katero smo preverili učinkovitost reakcije, preverjali pa smo tudi vpliv genomske DNA z negativno kontrolo RT, s talilno analizo pa smo določali prisotnost nespecifičnih produktov. Oligonukleotidne začetnike, s katerimi omejimo željen odsek pomnoževanja, smo oblikovali sami. Zaradi neustreznosti smo morali za analizo nekaterih genov oblikovati več različnih zaporedij oligonukleotidnih začetnikov. Najbolj problematičen je bil gen *ALPL*, tu smo se na koncu odločili za analizo s hidrolizirajočimi sondami. Za analizo smo uporabili komercialno dostopni komplet. Tudi tu smo izvedli optimizacijo, kjer smo preverjali vpliv genomske DNA in s standardi oblikovali umeritveno krivuljo. Zaporedja oligonukleotidnih začetnikov, katere smo uporabili za končno analizo vzorcev, so prikazana v poglavju Merjenje izražanja genov *ALPL*, *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB* z uporabo interkelirajočega barvila in hidrolizirajočih sond, zaporedja neustreznih oligonukleotidnih začetnikov pa se nahajajo v Prilogi 1.

Koncentracije standardov, na podlagi katerih smo oblikovali umeritveno krivuljo, so bile 0,157, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5 in 5 ng/ μ L cDNA. Učinkovitost pomnoževanja nam poda ciklični termostat, ki jo izračuna iz naklona premice iz grafa odvisnosti c_q od logaritma začetnega števila kopij. Zaželeno območje je med 1,8 in 2,1 [61]. Učinkovitosti pomnoževanja za zaporedja oligonukleotidnih začetnikih, katere smo uporabili za analizo vzorcev z uporabo interkelirajočega barvila in pa komercialno dostopnega kompleta za analizo po metodi s hidrolizirajočimi sondami so prikazana v Tabeli 11. Učinkovitosti pomnoževanja za posamezne gene so ustrezne, razen za gen *GSTCD*, kjer je bila učinkovitost rahlo nižja kot 1,8.

Tabela 11: Učinkovitosti pomnoževanja analize izražanja genov.

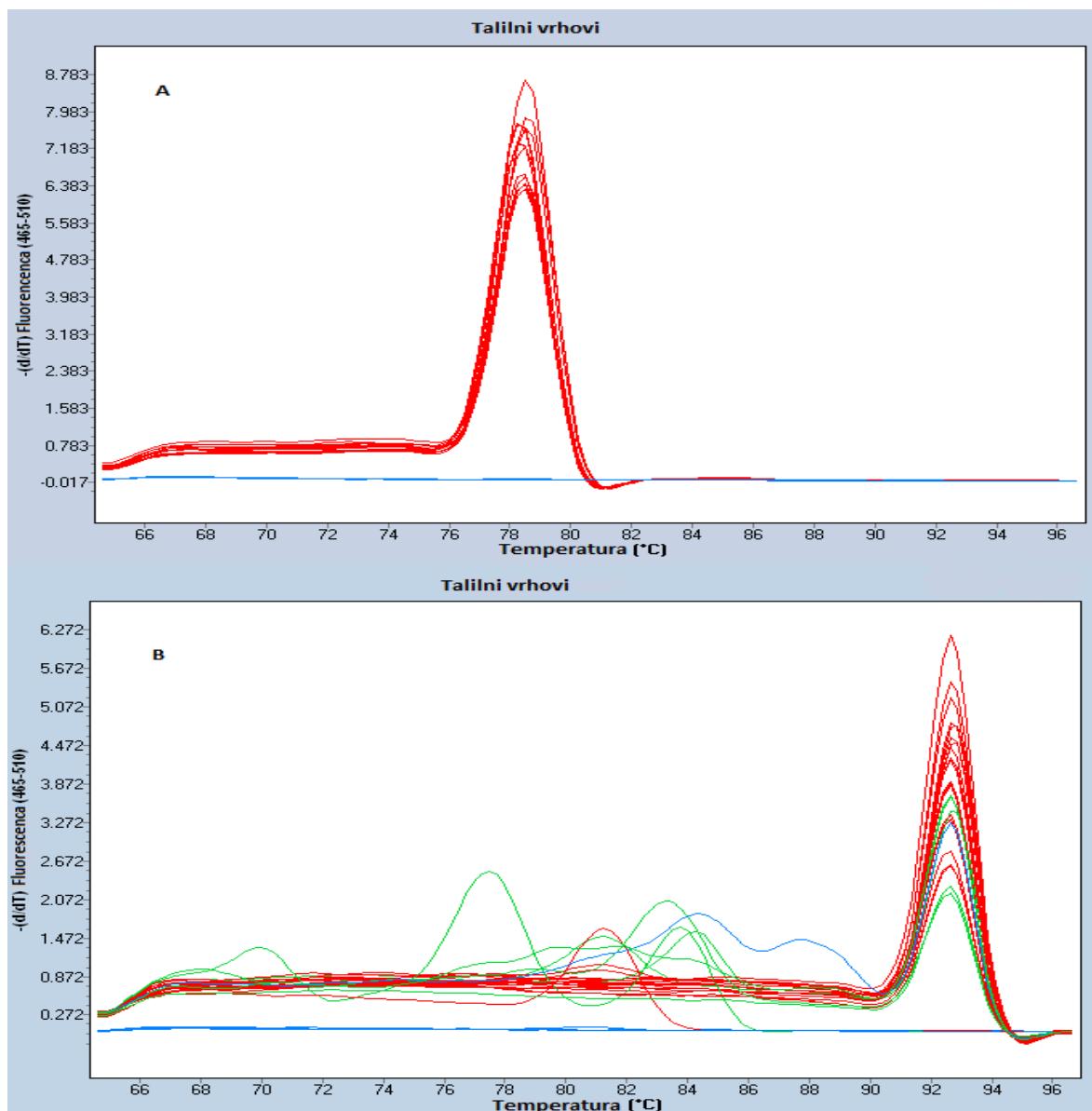
Gen	Učinkovitost pomnoževanja
<i>ALPL</i>	1,830
<i>SPARC</i>	1,984
<i>BMP1</i>	1,942
<i>ELOVL6</i>	1,965
<i>GSTCD</i>	1,773
<i>CYP26B1</i>	1,967
<i>MYB</i>	2,006

Z negativno kontrolo RT, kateri pri prepisu nismo dodali encima obratna transkriptaza, pa smo, tako pri analizi z uporabo interkelirajočega barvila kot tudi pri hidrolizirajočih sondah, preverjali vpliv genomske DNA. Na sliki 2A je prikazan primer, kjer genomska DNA ne vpliva na analizo in je bila tako kot negativna kontrola, ki je bila voda, negativna. Na sliki je predstavljeno kot zelena krivulja. Na Sliki 2B pa je primer, kjer genomska DNA vpliva na analizo. Na sliki je predstavljena kot rdeča krivulja. Ti oligonukleotidni začetniki, katere smo uporabili za analizo z uporabo interkelirajočih barvil, niso primerni, saj se poleg na cDNA vežejo tudi na genomsko DNA in jih zato ne moremo uporabiti za analizo vzorcev.



Slika 2: Vpliv genomske DNA na analizo. A – primer, kjer genomska DNA nima vpliva; B – primer, kjer genomska DNA vpliva na analizo in je na sliki predstavlja rdečo krivuljo.

Prisotnost nespecifičnih produktov smo preverjali s talilno analizo. Na Sliki 3A je prikazan primer, kjer ni prisotnih nespecifičnih produktov, na Sliki 3B pa primer kjer so, to pomeni, da se oligonukleotidni začetniki niso vezali samo na tarčo, ampak tudi na nek drug odsek. Ti začetniki niso primerni za analizo vzorcev. Talilno analizo smo določali tudi med samo analizo vzorcev. Vse vzorce, ki so imeli prisotne nespecifične produkte, smo ponovno analizirali na enak način in če so bili še vedno prisotni nespecifični produkti, smo te vzorce izključili iz statistične analize.



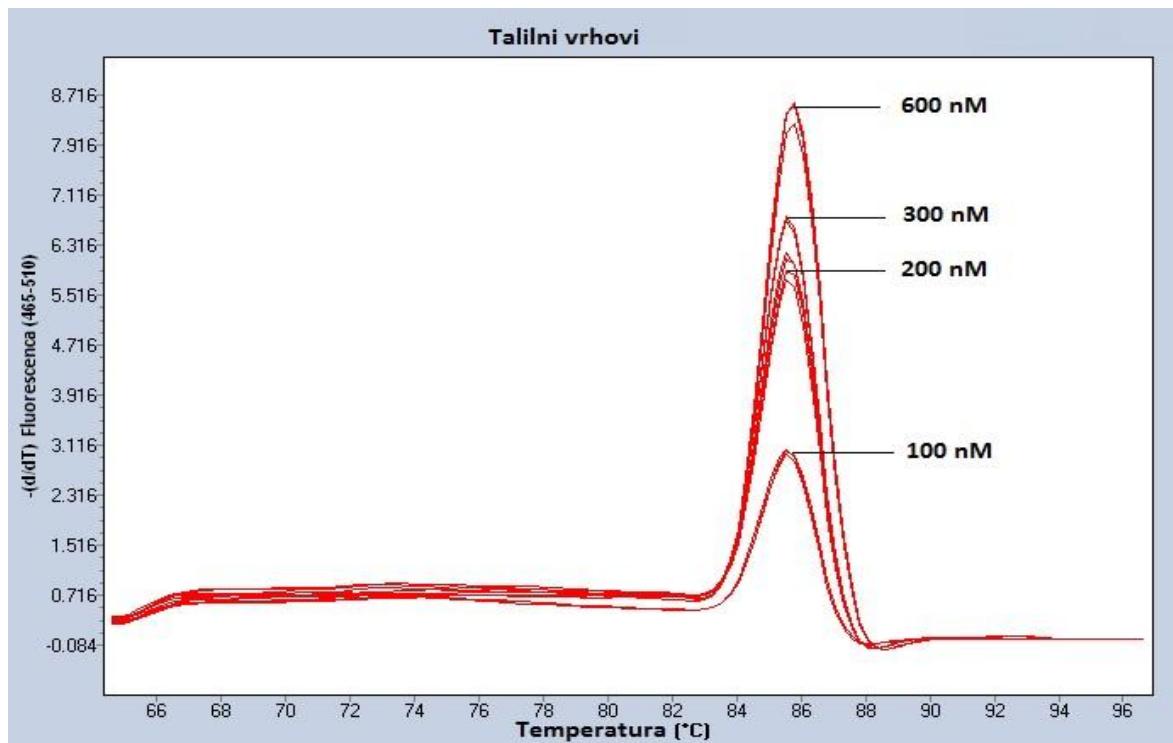
Slika 3: Talilna analiza. A – primer, kjer ni prisotnih nespecifičnih produktov; B – primer, kjer so prisotni nespecifični produkti.

Za optimizacijo koncentracij oligonukleotidnih začetnikov za analizo z uporabo interkelirajočega barvila, smo pripravili reakcijske zmesi s koncentracijami oligonukleotidnih začetnikov 100, 200, 300 in 600 nM. Optimalna je najnižja koncentracija začetnikov, ki da najnižje c_q . Kot primer je prikazana optimizacija oligonukleotidnih začetnikov za analizo gena *SPARC*. V Tabeli 12 so prikazani c_q za posamezne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov. Razlika med c_q je zelo majhna.

Tabela 12: Kvantifikacijski cikli pri optimizaciji koncentracij oligonukleotidnih začetnikov za analizo gena *SPARC* z uporabo interkelirajočega barvila. (c_q – kvantifikacijski cikel)

Koncentracija oligonukleotidnih začetnikov [nM]	c_q
100	19,58
200	19,80
300	19,63
600	19,66

Pri visokih koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov je večja verjetnost nastanka nespecifičnih produktov, zato smo prisotnost le teh preverjali s talilno analizo. Na Sliki 4 so prikazane talilne krivulje različnih koncentracij oligonukleotidnih začetnikov. Prisotnih ni nespecifičnih produktov. Na podlagi rezultatov smo se za analizo z uporabo interkelirajočega barvila odločili za koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov 200 nM. Podobno smo postopali tudi pri ostalih genih, kjer smo se na koncu prav tako odločili za koncentracijo 200 nM.



Slika 4: Talilne krivulje pri optimizaciji koncentracij oligonukleotidnih začetnikov za analizo gena *SPARC* z uporabo interkelirajočega barvila.

4.1.2 Rezultati optimizacije analize izražanja miRNA z uporabo interkelirajočega barvila

Izražanje miRNA smo merili z uporabo interkelirajočega barvila. Pred analizo vzorcev smo izvedli optimizacijo, kjer smo s standardi oblikovali umeritveno krivuljo, preverjali vpliv genomske DNA z negativno kontrolo RT in preverjali prisotnost nespecifičnih produktov, kot je opisano v poglavju Rezultati optimizacije analize izražanja genov z uporabo interkelirajočega barvila in hidrolizirajočih sond, le da so bile koncentracije standardov za določitev umeritvene krivulje 125, 250, 500, 1000, in 2000 pg/ μ L cDNA. Učinkovitosti pomnoževanja so prikazane v Tabeli 13. Optimizacija je bila uspešna, tako da smo te reagente lahko uporabili za analizo naših vzorcev, le učinkovitosti pomnoževanja so nižje od željenjega območja.

Tabela 13: Učinkovitosti pomnoževanja analize izražanja miRNA.

miRNA	Učinkovitost pomnoževanja
miR-195-5p	1,512
miR-204-5p	1,762

4.2 Izbor referenčnih miRNA

Kot kandidatne referenčne miRNA smo izbrali RNU6, SNORD96a, let-7a in miR-16, in sicer na podlagi literature, ter miR-140 in miR-32. Slednja smo izbrali glede na rezultate analize Nanostring. Njuno izražanje je bilo stabilno v kostnem tkivu, prav tako pa ni bilo razlike v izražanju pri preiskovancih z OP oziroma OA.

Po analizi z uporabo interkelirajočega barvila smo pregledali rezultate in zbrali koncentracije, katere smo pridobili iz umeritvene krivulje, v Excelu in jih analizirali s pomočjo programa NormFinder. V analizo nismo vključili miR-32, ker so bili prisotni nespecifični produkti. S pomočjo programa smo določili variabilnost izražanja znotraj posamezne skupine in med skupinami, določili pa smo tudi vrednost stabilnosti posamezne miRNA (angl. stability value), ki so prikazane v Tabeli 14. Nižja kot je vrednost, bolj je miRNA stabilna [59]. Najbolj stabilna miRNA je SNORD 96a, katere vrednost stabilnosti je bila 0,176.

Tabela 14: Vrednosti stabilnosti posamezne miRNA.

miRNA	Vrednost stabilnosti
miR-140	0,804
RNU6	0,781
SNORD96a	0,176
Let-7a	0,218
miR-16	0,301

Določili smo tudi najboljšo kombinacijo dveh miRNA, in sicer SNORD 96a in let-7, katerih vrednost stabilnosti je bila 0,148. Te miRNA, smo tudi uporabili za normalizacijo izražanja preiskovanih miRNA.

4.3 Opis in primerjava preiskovanih skupin

V preiskavo smo vključili vzorce kostnega tkiva 103 preiskovancev, od tega 68 žensk in 35 moških, starih od 49 do 88 let. Preiskovance smo razdelili v tri skupine, in sicer v skupino preiskovancev z OP (N=44), skupino preiskovancev z OA (N=44) in skupino zdravih preiskovancev (N=15). S pomočjo ustreznih statističnih testov smo ugotavljali razlike med skupinami v starosti, indeksu telesne mase (ITM), mineralne kostne gostote (MKG) in biokemijskimi kazalci. Prav tako smo vrednotili tudi rezultate mikro-računalniške tomografije (angl. micro-computed tomography, µCT) in kostne histomorfometrije. V Tabeli 15 so zbrani osnovni podatki o preiskovancih za posamezne skupine. Tabele, v katerih so predstavljeni biokemijski kazalci in označevalci pridobljeni z metodo µCT oziroma kostno histomorfometrijo za posamezne skupine, pa se nahajajo v Prilogah 2-4.

Tabela 15: Opis preiskovanih skupin. (ITM – indeks telesne mase, MKG-tot – mineralna kostna gostota kolka, MKG-fn – MKG vratu stegnenice, MKG-ls – MKG področja ledvene hrtenice, N – število preiskovancev, p – rezultat statistične analize)

	Osteoporoz	Osteoartroza	Zdravi	p
Spol (ženske/moški)	36/8	29/15	3/12	/
Starost (leta)*	75,8±6,2 (N=44)	71,8±6,5 (N=44)	69,9±10,2 (N=15)	0,006
ITM (kg/m²)*	25,1±3,0 (N=43)	29,0±4,2 (N=44)	25,3±3,1 (N=14)	0,000
MKG-tot (kg/m²)**	0,71±0,15 (N=33)	0,90±0,16 (N=40)	/	0,000
MKG-fn (kg/m²)***	0,61 (0,54;0,68) (N=33)	0,75 (0,67;0,88) (N=40)	/	0,000
MKG-ls (kg/m²)***	0,82 (0,74;0,91) (N=35)	1,007 (0,80;1,16) (N=42)	/	0,002

*ANOVA, **t-test, ***test Mann-Whitney

Skupine se razlikujejo po starosti in ITM. S pomočjo testov Post hoc smo opazili, da se skupina preiskovancev z OP v starosti statistično razlikuje od skupine preiskovancev z OA ($p=0,012$). Pri ITM pa se skupina preiskovancev z OA statistično razlikuje tako od skupine preiskovancev z OP ($p=0,000$), kot tudi od skupine zdravih preiskovancev ($p=0,004$). MKG kolka, vratu stegnenice in področja ledvene hrtenice so bile pri preiskovancih z OP pričakovano nižje kot pri preiskovancih z OA.

4.4 Izražanje miR-195-5p in miR-204-5p ter genov *ALPL*, *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB* v preiskovanih skupinah

V okviru projekta na Katedri za klinično biokemijo, Fakultete za farmacijo, je bil s pomočjo tehnologije NanoString izveden profil miRNA na majhnem številu OP in OA kostnih vzorcih. Metoda, ki je zelo občutljiva, specifična in v celoti avtomatizirana, omogoča brez pomnoževanja hkratno direktno digitalno detekcijo do 800 miRNA. Pri tem sta se kot najbolj zanimivi za preučevanje miRNA izkazali miR-195-5p in miR-204-5p. Z vsegenomsko analizo lahko pridobimo dober vpogled v profil miRNA, vendar moramo rezultate nato še potrditi z metodo qPCR [62]. S pomočjo različnih programov pa smo

določili tudi potencialne tarčne gene, in sicer *CYP26B1*, *ELOVL6*, *GSTCD* in *MYB* za miR-195-5p ter *ALPL*, *SPARC*, *BMP1* in *ELOVL6* za miR-204-5p. Zanimalo nas je, ali obstaja statistična razlika v izražanju genov med preiskovanimi skupinami, zato smo s pomočjo qPCR merili izražanje miR-195-5p in miR-204-5p ter genov *ALPL*, *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* na večjem številu kostnih vzorcev preiskovancev z OP oziroma OA, v analizo pa smo vključili tudi zdrave preiskovance. V Tabeli 16 so zbrane mediane in percentili izražanja genov in miRNA za posamezne skupine, podana pa je tudi vrednost p, grafične predstavitev pa se nahajajo v Prilogah 5-10.

Tabela 16: Izražanje genov *ALPL*, *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB* ter miR-195-5p in miR-204-5p v kostnem tkivu pri preiskovancih z osteoporozo, osteoartrozo in zdravih preiskovancih. (N – število preiskovancev, p – rezultat statistične analize)

	Osteoporoza	Osteoartroza	Zdravi	p
<i>ALPL*</i>	1,557 (0,937;2,365) (N=44)	0,913 (0,389;2,118) (N=38)	0,754 (0,417;1,331) (N=12)	0,019
<i>SPARC*</i>	0,787 (0,458;1,773) (N=44)	0,583 (0,134;1,252) (N=38)	0,261 (0,100;0,484) (N=12)	0,001
<i>BMP1*</i>	1,018 (0,605;1,508) (N=44)	0,371 (0,224;0,947) (N=38)	0,525 (0,352;0,983) (N=12)	0,002
<i>ELOVL6*</i>	0,910 (0,767;1,204) (N=44)	1,318 (1,003;1,529) (N=38)	2,308 (1,504;3,125) (N=12)	0,000
<i>CYP26B1*</i>	1,167 (0,691;1,700) (N=44)	0,652 (0,264;1,174) (N=38)	0,371 (0,168;0,776) (N=12)	0,001
<i>GSTCD*</i>	0,743 (0,548;0,911) (N=44)	0,951 (0,701;1,113) (N=38)	2,682 (1,746;3,630) (N=12)	0,000
<i>MYB*</i>	0,596 (0,197;1,108) (N=43)	1,550 (1,083;1,834) (N=38)	2,097 (1,375;3,065) (N=11)	0,000
miR-195-5p*	0,853 (0,428;1,081) (N=40)	0,521 (0,240;0,865) (N=36)	0,205 (0,170;0,321) (N=15)	0,000
miR-204-5p*	0,775 (0,464;1,010) (N=35)	0,834 (0,424;1,137) (N=32)	0,070 (0,033;0,870) (N=8)	0,167

*test Kruskal-Wallis

4.4.1 Izražanje miR-195-5p in miR-204-5p v preiskovanih skupinah

Ugotovili smo, da se izražanje miR-195-5p statistično razlikuje med preiskovanimi skupinami, in sicer je bilo najvišje izražanje pri preiskovancih z OP, najnižje pa pri zdravih preiskovancih. Izražanje miR-204-5p se med skupinami ni razlikovalo.

Naše ugotovitve smo primerjali z dosedanjimi študijami. Do sedaj so bile objavljene samo tri študije, ki so preučevale miRNA v kostnem tkivu preiskovancev, ki so utrpeli OP zlom kolka. Ena izmed teh je bila študija, kjer so najprej s pomočjo qPCR na 16 vzorcih preiskovancev z OP oziroma OA določili 760 miRNA. Izražanje šestih miRNA, ki so se statistično najbolj razlikovale med skupinama, so merili s qPCR na večjem številu kostnih vzorcev. Dve miRNA sta se statistično različno izražali med preiskovanimi skupinama, in sicer miR-187, katere izražanje je bilo višje pri preiskovancih z OA, in miR-518f, katere izražanje pa je bilo višje pri OP preiskovankah. Njuno prisotnost so preverjali tudi na celični kulturi osteoblastov, katere so izolirali iz kostnega tkiva 16 preiskovancev z OP oziroma z OA, tako da so s qPCR merili njuno izražanje. Prisotni sta bili v 50 – 60 % vzorcev, njuno izražanje pa se med skupinama ni razlikovalo [25].

Druga študija je poskušala določiti specifične miRNA pri preiskovancih z OP zlomom v primerjavi s preiskovanci z neOP zlomom kolka. Izolirali so miRNA iz skupno 20 serumskih vzorcev preiskovancev z OP oziroma neOP zlomom kolka. S pomočjo metode PCR, ki omogoča merjenje 83 različnih miRNA v humanih serumskih oziroma plazemskih vzorcih, so določili 51 miRNA v serumu preiskovancev z OP zlomom kolka. Od teh so bili nivoji 11 miRNA značilno različni med skupinama, in sicer povišane nivoje so opazili pri preiskovancih z OP zlomom. Nivoje teh miRNA in miR-93 ter mR-637, so nato določali z metodo qPCR na večjem številu vzorcev, in sicer skupno 60 serumskih vzorcev preiskovancev z OP oziroma neOP zlomom, prav tako pa so tudi določali njihovo izražanje v kostnem tkivu skupno 40 vzorcev. Nivoji 9 miRNA so bili različni v serumskem vzorcu med obema skupinama. V kostnem tkivu pa so določili le 6 miRNA. Izražanje teh miRNA je bilo povečano pri preiskovancih z OP zlomom. Ko so primerjali rezultate analiz serumskih in kostnih vzorcev, so opazili povišane nivoje miR-21, miR-23a, miR-24, miR-100 in miR-125b v obeh tkivih pri preiskovancih z OP zlomom [26].

V tretji študiji, pa so poskušali določiti miRNA, ki se različno izražajo pri preiskovankah, ki so utrpele OP zlom, v primerjavi s tistimi, ki ga niso, slednje so imele OA. Skupini sta bili med seboj primerljivi po starosti, spolu in ITM. S pomočjo analize z mikromrežo, ki

omogoča hkratno določanje 1900 miRNA, so na 12 vzorcih preiskovank z OP oziroma OA določili 790 miRNA, od tega se jih je 82 drugačno izražalo med skupinama. Izbrali so 8 miRNA, katere so imele najnižjo p vrednost, in jih analizirali s qPCR. Izražanje dveh miRNA se je značilno razlikovalo med skupinama, in sicer miR-320a in miR-483-5p. Z mikromrežo pa so tudi določali profil miRNA v osteoblastih, katere so izolirali iz kostnega tkiva OA bolnic med operacijo kolena in jih nato gojili v celični kulturi. Določili so skupno 315 miRNA, od tega so jih 293 določili tudi v celokupnem kostnem vzorcu, med njimi tudi miR-320a in miR-483-5p [27].

Opazimo, da se ugotovitve med študijami ne ujemajo. Razlogov za to je več. Eden izmed njih je izbor in število preiskovancev. Večinoma so v analizo vključili OP in OA preiskovance, medtem ko smo mi vključili tudi zdrave preiskovance. V eni študiji so bili zelo pozorni pri izbiri preiskovancev, da so se ti ujemali v spolu, starosti in ITM, v naši raziskavi so se skupine razlikovale v spolu, starosti in ITM. Razlikovalo se je tudi število kostnih vzorcev. V analizo so vključili 12 oziroma 40 kostnih vzorcev, v našo raziskavo smo vključili 103 kostne vzorce. Tudi določanje profila miRNA se je med študijami razlikovalo, in sicer v uporabi metode in izbora vzorca, v eni študiji so profil določali v serumu. V eni študiji niso določali miRNA, katere so se izkazale kot najbolj obetavne, na večjem številu vzorcev, vendar samo v osteoblastih. Prisotnost najbolj obetavnih miRNA pa so določali na celični kulturi osteoblastov še v eni študiji. Zaradi vseh teh razlik se rezultati med študijami ne ujemajo. Lahko pa povzamemo, da je več miRNA vpletenih v patogenezo OP oziroma OA [25, 26, 27].

V okviru dveh študij, kjer so določali miRNA v serumu, kot potencialne biološke označevalke za OP zlome, so določali tudi miR-195-5p in miR-204-5p. miR-204-5p niso zaznali, medtem ko pa miR-195-5p so, vendar ni bilo prisotne statistične razlike med preiskovanima skupinama [26, 63]. Določali pa so tudi vlogo miR-195-5p v osteoblastih. Ugotovili so, da zavre diferenciacijo osteoblastov tako, da vpliva na signalno pot BMP [64]. Na podlagi rezultatov naše raziskave in dosedanjih ugotovitev vidimo, da bi miR-195-5p lahko bila vpletena v patologijo OP in bi lahko služila kot potencialna diagnostična tarča v kostnem tkivu, prav tako tudi kot terapevtska tarča.

4.4.2 Izražanje genov *ALPL*, *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB* v preiskovanih skupinah

V okviru naše raziskave smo ugotovili, da se izražanje genov *ALPL*, *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB* v kostnem tkivu razlikuje med preiskovanimi skupinami. Naše ugotovitve smo primerjali z dosedanjimi študijami. Malo je podatkov o profilu izražanja genov v OP kostnem tkivu. V eni študiji so primerjali izražanje 87 genov, katere so določili na podlagi literature, v kostnem tkivu glave stegnenice med skupino 7 preiskovank s postmenopavzalno OP in kontrolno skupino 10 preiskovank s primarno OA. Skupini se nista razlikovali po starosti. Vzorce so analizirali s qPCR, za detekcijo pa so uporabili hidrolizirajoče sonde. Ugotovili so, da se izražanje 9 genov statistično razlikuje med obema skupinama. Eden izmed teh je tudi gen *ALPL* [65]. Če primerjamo njihove rezultate z našimi, opazimo, da je prišlo do neujemanja rezultatov, in sicer izražanje gena *ALPL* je bilo v naši raziskavi povišano pri preiskovancih z OP v primerjavi s preiskovanci z OA. Prav tako je prišlo do neujemanj pri genih *SPARC* in *BMP1*. V njihovi študiji se njuno izražanje statistično ni razlikovalo med preiskovanima skupinama [65], medtem ko pa v naši raziskavi se je izražanje tako gena *SPARC*, kot tudi *BMP1* razlikovalo med skupinami. Izražanje gena *SPARC* je bilo najnižje pri preiskovancih z OP, najvišje pa pri zdravih preiskovancih. Pri genu *BMP1* pa je bilo najvišje izražanje pri preiskovancih z OP, najnižje pa pri preiskovancih z OA. Razlogi za neujemanje rezultatov bi lahko bilo število preiskovancev vključenih v analizo, spol preiskovancev, kjer smo mi vključili tudi moške, in pa dejstvo, da so se v naši raziskavi preiskovane skupine razlikovale v starosti [65].

V drugi študiji pa so določali razliko v izražanju genov v trabekularni kostnini zgornjega roba črevnice pri bolnikih z OA. V študijo so vključili tri skupine preiskovancev, in sicer skupino 16 preiskovancev z OA, skupino 11 mlajših preiskovancev in skupino 8 starejših preiskovancev, ki niso utrpeli predhodnih zlomov, prav tako pa tudi niso imeli OP. Skupine so se razlikovale po starosti. Kandidatne gene so določili na podlagi rezultatov analize z mikromrežami, katero so izvedli na manjšem številu vzorcev preiskovancev z OA in mlajših preiskovancev. Po pregledu rezultatov so izbrali 23 genov, katere so nato analizirali s qPCR. Ugotovili so, da je izražanje 5 genov povišano v kostnem tkivu preiskovancev z OA v primerjavi s starejšimi preiskovanci, med njimi tudi *BMP1* [66]. Zopet je prišlo do neujemanja rezultatov, izražanje *BMP1* v naši raziskavi pri preiskovancih z OA v primerjavi z zdravimi je bilo nižje. Razlogi za neujemanje so lahko

starost, v naši raziskavi med skupinama ni bilo starostne razlike, potem število preiskovancev, kateri so bili vključeni v analizo, ter mesto odvzema kostnega tkiva [66].

Za ostale gene nismo našli podatkov o izražanju v kostnem tkivu v povezavi z OP ali OA. Smo pa preverili, če so kako drugače povezani s kostno biologijo oziroma boleznimi. Za gen *CYP26B1* je znano, da igra pomembno vlogo pri uravnavanju koncentracij retinoične kisline. Znano je, da je prekomeren vnos vitamina A povezan s povečanim tveganjem za zlome pri ljudeh. Mutacije v genu pa povzročijo hude skeletne in kraniofacialne spremembe [67]. Tudi gen *MYB* igra pomembno vlogo pri razvoju kosti, tako da vpliva na diferenciaciji kostnih celic in na pozitivno izražanje genov, ki so specifični za osteoblaste [68]. Za gena *ELOVL 6* in *GSTCD* pa v literaturi nismo zasledili povezanosti s kostno biologijo oziroma boleznimi. Znano pa je, da se *ELOVL6* izraža v maščobnem tkivu in vpliva na presnovo lipidov [50], medtem ko je o genu *GSTCD* malo znanega, predvidevajo pa, da je vpletен v detoksifikacijo, in sicer tako da katalizira konjugacijo med glutationom in produkti oksidativnega stresa [54].

Rezultati naše raziskave kažejo, da se izražanje genov razlikujejo med preiskovanimi skupinami, vendar je prišlo do neujemanj z dosedanjimi študijami, gena *ELOVL 6* in *GSTCD* pa sta bila prvič raziskana v kostnem tkivu.

4.5 Odnos med miRNA in njunimi tarčami

Naloga miRNA je uravnavanje izražanja genov. Pri tem se lahko ena miRNA veže na več različnih tarč. Poznamo več različnih način določitve teh tarčnih genov. Prvi je način določitve je na podlagi bioinformatike, kjer s pomočjo različnih računalniški programov določimo potencialne tarčne gene. Drugi način je merjenje izražanja miRNA in tarčnih genov z mikromrežami ali pa s qPCR, kjer preverjamo povezavo med miRNA in geni. Lahko pa tudi določamo spremembe na nivoju proteinov. Tretji način je *in vitro* analiza UTR. Pri tem 3'-UTR regijo tarčne mRNA kloniramo na luciferazni reporter. Sprememba v izražanju luciferaze nam pove, ali se miRNA veže na UTR in uravnava izražanje gena [62].

V naši raziskavi smo s pomočjo različnih računalniških programov določili potencialne tarčne gene za miR-195-5p in miR-204-5p. Izbrali smo gene, ki so zanimivi predvsem s stališča kostne biologije. Potencialni tarčni geni za miR-195-5p so *CYP26B1*, *ELOVL6*, *GSTCD* in *MYB*, za miR-204-5p pa *ALPL*, *SPARC*, *BMP1* in *ELOVL6*. Njihovo izražanje

smo merili v kostnem tkivu z metodo qPCR in nato s testom neparametrične povezave določali povezavo z miRNA. Ugotovili smo, da obstaja statistično značilna negativna povezava med izražanjem miR-195-5p in *ELOVL6* ($r_s=-0,371$, $p=0,001$), *GSTCD* ($r_s=-0,444$, $p=0,000$) in *MYB* ($r_s=-0,235$, $p=0,035$). To pomeni, da bi miR-195-5p lahko uravnavala izražanje teh genov. Med izražanjem miR-204-5p in *ELOVL6* pa obstaja mejno značilna negativna povezava ($r_s=-0,220$, $p=0,070$). Če bi hoteli zanesljivo potrditi razliko, bi morali analizo ponoviti na večjem številu vzorcev. Opazili smo pa tudi pozitivno povezavo med izražanjem miR-195-5p in miR-204-5p ($r_s=0,584$, $p=0,000$).

Naše ugotovitve smo primerjali z literaturo. Do sedaj še niso preučevali povezave med miR-195-5p oziroma miR-204-5p in geni, katere smo določili kot potencialne tarče v naši raziskavi. Smo pa preverili, če so že znane tarče teh miRNA in kako so jih določali. Kot primer je študija, ki je preučevala vpliv miR-204-5p na izražanje *DVL3* (angl. dishevelled segment polarity protein 3), ki je pomemben uravnalec signalne poti WNT/ β -katenin. Znano je, da miR-204-5p v mezenhimskih matičnih celicah (MMC) zavre osteogenezo v prid adipogeneze. V ta namen so izolirali humane v adipocitno vrsto usmerjene MMC. Med adipocitno diferenciacijo so v celicah določali izražanje miR-204-5p in *DVL3* s qPCR v različnih časovnih obdobjih. Med diferenciacijo je izražanje miR-204-5p postopoma naraščalo, izražanje *DVL3* pa padalo. Za potrditev so izvedli tudi *in vitro* analizo UTR. Opazili so 47 % zmanjšano aktivnost luciferaze. Določali pa so tudi izražanje *DVL3* po dodatku antagonirov oziroma agomirov. Po dodatku antagonira, se je izražanje *DVL3* povišalo, medtem ko se je po dodatku agomirov znižalo. To nakazuje, da je *DVL3* direktna tarča miR-204-5p [69].

Preučevali so tudi miR-195-5p in ugotovili, da uravnava diferenciacijo osteoblastov tako, da deluje na signalno pot BMP, ki sproži osteogenezo. Vlogo miR-195-5p so določali na mišjem kostnem tkivu, kateremu so pred izolacijo RNA odstranili kostni možeg in kri. Izolirali so tudi primarne osteoblaste iz kalvarije. Izražanje miR-195-5p so določali v kostnem tkivu v različnih časih po rojstvu miš in ugotovili, da izražanje s starostjo narašča. Njeno izražanje so določili tudi na osteoblastni celični liniji. Tarče so določili s pomočjo programa TargetScan in jih nato analizirali z mikromrežo, ki določa profil izražanja genov. Osredotočili so se predvsem na gene, ki so vpletene v signalno pot BMP, prav tako pa tudi na gen *Furin*. Vpliv miR-195-5p na tarče so preverjali tako, da so izvedli transfekcijo celic z mimiki miR-195-5p oziroma kontrolo in humanim rekombinantnim genom *BMP2* ter

nato določali izražanje genov. Ugotovili so, da povišani nivoji miR-195-5p znižajo izražanje večih genov, ki so vpleteni v signalno pot BMP, in sicer gene večih receptorjev, molekul znotraj signalne kaskade, transkripcijskih faktorjev, ki sodelujejo s SMAD, in druge ter tudi gena za proteazo Furin, ki cepi pro-BMP [63].

Dokazali smo, da obstaja negativna povezava med izražanjem miR-195-5 in genov *ELOVL6*, *GSTCD* in *MYB*. Da pa so ti geni dejanske tarče miR-195-5p, pa bi morali potrditi z *in vitro* analizo UTR.

4.6 Odnos med izražanju genov

Zanimalo nas je tudi, če obstaja statistično značilna povezava med izražanju genov. Test neparametrične povezave je pokazal pozitivno povezavo med izražanjem *ALPL* in *SPARC* ($r_s=0,766$, $p=0,000$), *BMP1* ($r_s=0,748$, $p=0,000$), *CYP26B1* ($r_s=0,743$, $p=0,000$) in *GSTCD* ($r_s=0,259$, $p=0,012$), med izražanjem *SPARC* in *BMP1* ($r_s=0,847$, $p=0,000$) in *CYP26B1* ($r_s=0,770$, $p=0,000$), izražanjem *ELOVL6* in *GSTCD* ($r_s=0,660$, $p=0,000$) in *MYB* ($r_s=0,517$, $p=0,000$), med izražanjem *CYP26B1* in *BMP1* ($r_s=0,796$, $p=0,000$) ter izražanjem *GSTCD* in *MYB* ($r_s=0,365$, $p=0,000$). Opazili pa smo tudi negativno povezavo med izražanjem *MYB* in *ALPL* ($r_s=-0,562$, $p=0,000$), *SPARC* ($r_s=-0,578$, $p=0,000$), *BMP1* ($r_s=-0,556$, $p=0,000$) in *CYP26B1* ($r_s=-0,517$, $p=0,000$).

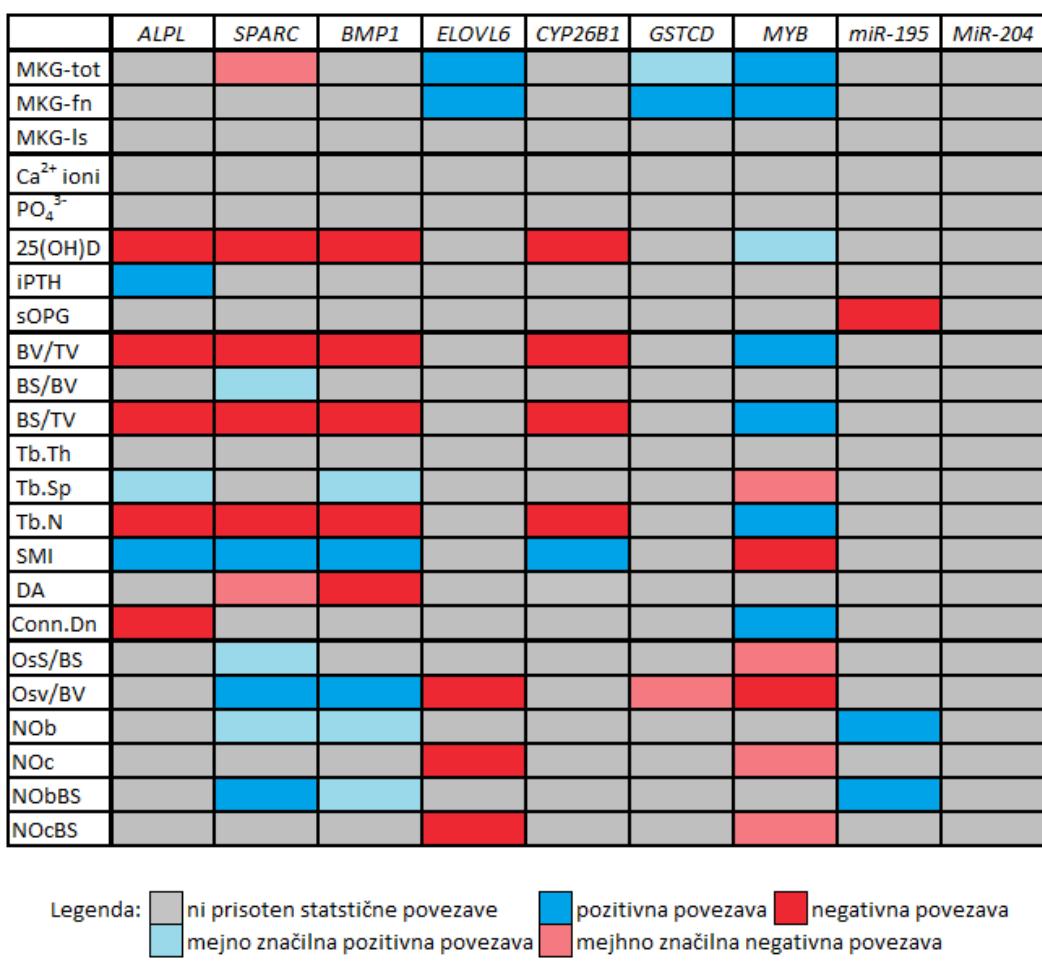
V literaturi nismo zasledili študije, ki bi namensko preučevala povezavo med temi geni. Smo pa našli dve študiji, kjer so preučevali negativne učinke mutacij v genu *CYP26B1* oziroma vitamina A, za njegov metabolizem je odgovoren *CYP26B1*, na skelet in pri tem ugotovili, da je prišlo do spremembe v izražanju dveh genov, in sicer *ALPL* in *SPARC*. V študiji, ki je preučevala negativne učinke vitamina A na skelet, so ugotovili, da povišane koncentracije retinoične kisline, zavrejo izražanje *ALPL*. Pri tem so preosteoblastne celične linije glodavcev tretirali s povečanimi koncentracijami retinoične kisline in nato določali izražanje genov s qPCR. Po dodatku zaviralcev, ki delujejo na specifični jedrni receptor retinoične kisline, pa se je izražanje *ALPL* povečalo [66]. V drugi študiji pa so preučevali posledice mutacij v genu *CYP26B1* na skelet. Dokazali so, da mutacija v genu, kjer pride do zamenjave aminokisline arginin z levcinom na 363 mestu, vpliva na matriks osteida. Na rezini kostnega tkiva, katerega so izolirali pri navadni cebrici s prisotno mutacijo, so izvedli *in situ* hibridizacijo. Pri tem so ugotovili zmanjšano izražanje genov, ki kodirajo osteidne kolagene, in gena *SPARC* [70]. To nakazuje, da *CYP26B1* posredno, preko

uravnavanja koncentracije retinoične kisline v celici, pozitivno vpliva na izražanje *ALPL* in *SPARC*, kar se sklada tudi z rezultati naše raziskave.

Potrebne pa bodo še nadaljne študije, ki bodo raziskale vlogo teh genov in njihovo povezanost med seboj. Pri tem gre lahko za neposreden ali posreden vpliv na izražanje, po drugi strani pa lahko njihovo izražanje uravnava neka druga skupna molekula.

4.7 Odnos med izražanjem miRNA oziroma genov in mineralno kostno gostoto, biokemijskimi kazalci ter označevalci, pridobljeni z metodama mikro-računalniške tomografije in kostne histomorfometrije

S testom neparametrične povezave smo preverjali tudi povezavo med izražanjem miRNA oziroma genov v kostnem tkivu, in MKG, biokemijskimi kazalci ter označevalci, pridobljeni z metodama μ CT in kostne histomorfometrije. Na Sliki 5 je prikazana grafična predstavitev rezultatov.



Slika 5: Grafična predstavitev povezave med izražanjem miRNA oziroma genov in mineralno kostno gostoto, biokemijskimi kazalci ter označevalci, pridobljeni z metodama mikro-računalniške tomografije in kostne histomorfometrije. (MKG-tot – mineralna kostna gostota kolka, MKG-fn – MKG vratu stegnenice, MKG-Is – MKG področja ledvene hrbitenice; biokemijski označevalci: 25(OH)D – 25-hidroksivitamin D, iPTH – intaktni paratiroidni hormon, sOPG – serumski osteoprotegerin; označevalci, pridobljeni z mikro-računalniško tomografijo: BV/TV – volumski delež kostnine, BS/BV – razmerje kostne površine proti kostnemu volumnu, BS/TV – površinska gostota kosti, Tb.Th – debelina trabekul, Tb.Sp – razmakanjenost trabekul, Tb.N – število trabekul, SMI – kazalec strukture modela, DA – stopnja anizotropije, Conn.Dn – gostoto povezanosti, označevalci, pridobljeni s kostno histomorfometrijo: OsS/BS – osteoidna površina, OsV/BV – osteoidni volumen, NOb – število osteoblastov, NOc – število osteklastov, NOBBS – število osteoblastov na kostno površino, NOcBS – število osteklastov na kostno površino.)

4.7.1 Povezava med izražanjem miRNA oziroma genov in mineralno kostno gostoto

S pomočjo asociacijskih študij je bilo določenih že več lokusov, ki vplivajo na MKG, vendar je njihov vpliv majhen. Da bi bolje razumeli biološki mehanizem OP, so s pomočjo mikromrež preučevali tudi profile izražanja genov, ki vplivajo na MKG pri ženskah. Te so določali predvsem v perifernih krvnih monocitih, limfocitih B in na kostnih biopsijah. Izvedli so meta-analizo, ki je združila te študije in tako pridobila večjo statistično moč. Ugotovili so, da je spremenjeno izražanje 58 genov v povezavi z MKG [71].

V okviru naše raziskave smo določali povezavo med MKG kolka, vratu stegnenice in ledvenih vretenc ter izražanjem miRNA in genov. Pri MKG kolka smo opazili pozitivno povezavo z izražanjem *ELOVL6* ($r_s=0,296$, $p=0,013$) in *MYB* ($r_s=0,349$, $p=0,003$) ter dve mejno statistično značilni povezavi, in sicer pozitivno z izražanjem *GSTCD* ($r_s=0,215$, $p=0,075$) ter negativno z izražanjem *SPARC* ($r_s=-0,199$, $p=0,099$). Če bi hoteli zanesljivo potrditi razliko, bi morali analizo izvesti na večjem številu preiskovancev. Prisotna je bila tudi pozitivna povezava med MKG vratu stegnenice in izražanju *ELOVL6* ($r_s=0,326$, $p=0,006$), *GSTCD* ($r_s=0,317$, $p=0,008$) in *MYB* ($r_s=0,390$, $p=0,001$).

Ugotovili smo, da izražanje genov *ELOVL6*, *GSTCD* in *MYB* pozitivno vpliva na MKG.

4.7.2 Povezava med izražanjem miRNA oziroma genov in biokemijskimi kazalci

Preiskovancem so v serumu izmerili sledeče biokemijske kazalce Ca^{2+} in fosfatni ioni, 25-hidroksivitamin D (25(OH)D) ter intaktni paratiroidni hormon (iPTH). Z njimi se preverja homeostazo Ca^{2+} ionov, prav tako pa so določili tudi serumski osteoprotegerin (sOPG), ki je lokalni regulator kostne premene. Med njimi in izražanjem miRNA oziroma genov smo določali povezavo. Pri tem smo opazili, da je 25(OH)D v negativni povezavi z izražanjem *ALPL* ($r_s=-0,645$, $p=0,001$), *SPARC* ($r_s=-0,592$, $p=0,004$), *BMP1* ($r_s=-0,548$, $p=0,008$) in *CYP26B1* ($r_s=-0,473$, $p=0,026$) ter mejno značilni pozitivni povezavi z izražanjem *MYB* ($r_s=0,376$, $p=0,084$). Za potrditev razlike, bi morali analizo ponoviti na večjem številu vzorcev. Prisotna pa je bila tudi pozitivna povezava med iPTH in izražanjem *ALPL* ($r_s=0,483$, $p=0,014$) ter negativna med sOPG in izražanjem miR-195-5p ($r_s=-0,644$, $p=0,007$).

Vitamin D uravnava izražanje različnih genov tako, da vpliva pozitivno kot tudi negativno na kostno resorpcijo in tvorbo [72]. Naši rezultati nakazujejo, da obstaja povezava med

vitaminom D in izražanju genov *ALPL*, *SPARC*, *BMP1* in *CYP26B1*, kar pomeni, da bi vitamin D lahko uravnaval izražanje teh genov.

4.7.3 Povezava med izražanjem miRNA oziroma genov in označevalci pridobljeni z metodo mikro-računalniške tomografije

μ CT predstavlja zlati standard za kvantitativno 3D oceno kostne morfologije in mikroarhitekture pri miših in drugih modelih malih živali *ex vivo*. Uporablja se pri študijah kostne mase in morfologije, pri analizah rasti in razvoja kosti, preučevanju genetsko spremenjenih miši ter pri živalskih modelih različnih bolezenskih stanj, kot na primer OP [73]. Z μ CT so bili preiskovancem določeni označevalci, kot so volumski delež kostnine (BV/TV [%]), razmerje kostne površine proti kostnemu volumnu (BS/BV [mm^{-1}]), površinsko gostoto kosti (BS/TV [μm^{-1}]), debelina trabekul (Tb.Th [μm]), razmaknjnost trabekul (Tb.Sp [μm]), število trabekul (Tb.N [μm^{-1}]), kazalec strukture modela SMI (ang. structural model index), stopnja anizotropije DA (ang. degree of architectural anisotropy) in gostota povezanosti Conn.Dn (ang. connectivity density [μm^{-3}]). Zanimala nas je povezava med temi označevalci in izražanjem miRNA oziroma genov. Za označevalce BV/TV, BS/TV oziroma Tb.N smo opazili negativno povezano z izražanjem *ALPL* ($r_s=-0,504; -0,462; -0,553$, $p=0,003; 0,008; 0,001$), *SPARC* ($r_s=-0,457; -0,424; -0,467$, $p=0,009; 0,016; 0,007$), *BMP1* ($r_s=-0,381; -0,382; -0,400$, $p=0,031; 0,031; 0,023$) in *CYP26B1* ($r_s=-0,469; -0,409; -0,434$, $p=0,007; 0,020; 0,013$) ter pozitivno z izražanjem *MYB* ($r_s=0,435; 0,496; 0,505$, $p=0,014; 0,005; 0,004$). Pri označevalcu SMI pa ravno obratno, pozitivna povezava je bila prisotna z izražanjem *ALPL* ($r_s=0,444$, $p=0,011$), *SPARC* ($r_s=0,452$, $p=0,009$), *BMP1* ($r_s=0,404$, $p=0,022$) in *CYP26B1* ($r_s=0,407$, $p=0,021$) ter negativna z izražanjem *MYB* ($r_s=-0,494$, $p=0,005$). Pri Conn.Dn smo opazili pozitivno povezavo z izražanjem *MYB* ($r_s=0,557$, $p=0,001$) ter negativno z izražanjem *ALPL* ($r_s=-0,461$, $p=0,008$). Pri DA je bila prisotna negativna povezava z izražanjem *BMP1* ($r_s=-0,364$, $p=0,040$), prav tako pa tudi mejno značilna negativna povezava z izražanjem *SPARC* ($r_s=-0,310$, $p=0,084$). Mejno značilno pozitivno povezavo smo opazili tudi med BS/BV in izražanjem *SPARC* ($r_s=-0,309$, $p=0,085$), potem med Tb.Sp in izražanjem *ALPL* ($r_s=0,336$, $p=0,060$) in *BMP1* ($r_s=0,311$, $p=0,083$), negativno pa med Tb.Sp in izražanjem *MYB* ($r_s=-0,339$, $p=0,062$). Za potrditev razlike bi morali analizo ponoviti in vključiti večje število vzorcev.

Rezultati nakazujejo, da povišano izražanje kar nekaj genov negativno vpliva na kostno strukturo, in sicer izražanje *ALPL*, *SPARC*, *BMP1* in *CYP26B1*, po drugi strani pa ima izražanje gena *MYB* pozitiven vpliv.

4.7.4 Povezava med miRNA oziroma mRNA in označevalci pridobljeni z metodo kostne histomorfometrije

Kostna histomorfometrija je kvantitativna histološka metoda, s katero pridobimo informacije o kostni presnovi in strukturi. Uporablja se za preučevanje patogeneze presnovnih kostnih bolezni ali pa za ugotavljanje mehanizmov učinkovanja zdravil na kosti [74]. S pomočjo kostne histomorfometrije so bili za naše preiskovance določeni označevalci osteoidna površina (OsS/BS), osteoidni volumen (OsV/BV), število osteoblastov in osteoklastov (NOb in NOc) ter število osteoblastov in osteoklastov na kostno površino (NObBS in NOcBS). Preverili smo, če obstaja povezava med temi označevalci in izražanjem miRNA oziroma genov. Opazili smo, da je OsV/BV v pozitivni povezavi z izražanjem *SPARC* ($r_s=0,472$, $p=0,008$) in *BMP1* ($r_s=0,365$, $p=0,048$) ter negativni z izražanjem *ELOVL6* ($r_s=-0,391$, $p=0,032$) in *MYB* ($r_s=-0,503$, $p=0,005$), prav tako pa tudi v mejno značilni negativni povezavi z izražanjem *GSTCD* ($r_s=-0,321$, $p=0,084$). Pri OsS/BS smo opazili mejno značilni povezavi, in sicer pozitivno z izražanjem *SPARC* ($r_s=-0,332$, $p=0,073$) ter negativno z izražanjem *MYB* ($r_s=-0,347$, $p=0,060$). Pri NOc oziroma NOcBS smo opazili negativno povezavo z izražanjem *ELOVL6* ($r_s=-0,403$; $-0,403$, $p=0,027$; $0,027$), prisotna pa je bila tudi mejno statistično značilna negativna povezava z izražanjem *MYB* ($r_s=-0,321$; $-0,321$, $p=0,084$; $0,084$). Označevalca NOb oziroma NObBS sta bila v pozitivni povezavi z izražanjem miR-195-5p ($r_s=0,380$; $0,371$, $p=0,029$; $0,034$) ter mejno značilni pozitivni povezavi z izražanjem *BMP1* ($r_s=0,333$; $0,348$, $p=0,072$; $0,059$). Pozitivna povezava je bila tudi med NObBS in izražanjem *SPARC* ($r_s=0,370$, $p=0,044$), med NOb in izražanjem *SPARC* ($r_s=0,355$, $p=0,054$) pa mejno statistično značilna pozitivna povezava. Te analize bi morali ponoviti na večjem številu vzorcev, da bi zanesljivo potrdili razliko.

Rezultati kažejo, da izražanje večih genov vpliva na kostno presnovo, in sicer izražanje genov *SPARC* in *BMP1* ima pozitiven vpliv, medtem ko izražanje genov *ELOVL6* in *MYB* negativno vpliva na kostno presnovo. Povišano izražanje miR-195-5p pa vpliva pozitivno na število osteoblastov.

5 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo v kostnem tkivu merili izražanje miR-195-5p in miR-204-5p pri preiskovancih z osteoporozo, preiskovancih z osteoartrozo in zdravih preiskovancih. S pomočjo različnih programov smo določili tudi potencialne tarčne gene, in sicer *CYP26B1*, *ELOVL6*, *GSTCD* in *MYB* za miR-195-5p ter *ALPL*, *SPARC*, *BMP1* in *ELOVL6* za miR-204-5p, katerih izražanje smo prav tako merili v kostnem tkivu. Pri tem smo ugotovili:

- da se izražanje miR-195-5p statistično razlikuje med preiskovanimi skupinami. Najvišje izražanje smo opazili pri skupini preiskovancev z osteoporozo, najnižje pa pri zdravih preiskovancih;
- da se izražanje miR-204-5p statistično ne razlikuje med preiskovanimi skupinami;
- da se izražanje genov *ALPL*, *SPARC*, *BMP1*, *ELOVL6*, *CYP26B1*, *GSTCD* in *MYB* statistično razlikuje med preiskovanimi skupinami. Pri preiskovancih z osteoporozo smo opazili povišano izražanje genov *ALPL*, *SPARC*, *BMP1* in *CYP26B1*, medtem ko je bilo izražanje genov *ELOVL6*, *GSTCD* in *MYB* najnižje;
- da je prisotna negativna povezava med izražanjem miR-195-5p in genov *ELOVL6*, *GSTCD* in *MYB*;
- da obstaja mejno značilna statistično negativna povezava med izražanjem miR-204-5p in gena *ELOVL6* ($p=0,070$);
- da obstaja pozitivna povezava med izražanjem miR-195-5p in miR-204-5p;
- da obstaja statistična povezava med izražanji genov, in sicer pozitivna povezava med *ALPL* in *SPARC*, *BMP1*, *CYP26B1* in *GSTCD*, med *SPARC* in *BMP1* ter *CYP26B1*, *ELOVL6* in *GSTCD* ter *MYB*, med *CYP26B1* in *BMP1* ter med *GSTCD* in *MYB*. Opazili pa smo tudi negativno povezavo med *MYB* in *ALPL*, *SPARC*, *BMP1* in *CYP26B1*;
- da izražanje večih genov vpliva na mineralno kostno gostoto, biokemijske kazalce in označevalce, pridobljene z metodama mikro-računalniške tomografije in kostne histomorfometrije.

V okviru naše raziskave smo kot prvi opazili, da bi miR-195-5p lahko bila označevalka pri osteoporozi oziroma osteoartrozi. Prav tako smo tudi opazili negativno povezavo med miR-195-5p in izražanjem genov *ELOVL6*, *GSTCD* in *MYB*, kar nakazuje da bi miR-195-5p lahko uravnala izražanje teh genov.

6 LITERATURA

1. Preželj J, Kocjan T. Osteoporoz. V: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P. Interna medicina, 4. Izdaja, Littera picta, d.o.o., Ljubljana, 2011: 991-1001
2. <http://www.project-aware.org/Health/Osteo/osteо-risks.shtml>, dostopno: oktober 2015
3. Kocjan T, Preželj J, Pfeifer M, Jensterle Sever M, Čokolič M, Zavratnik A: Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. Zdrav vestn, 2013; 82: 207-17
4. Marini F, Brandi ML: Genetic Determinants of Osteoporosis: Common Bases to Cardiovascular Diseases? Int J Hypertens, 2010; 2010: 394579
5. Duncan EL, Brown MA: Genetic studies in osteoporosis – the end of the beginning. Arthritis Res Ther, 2008; 10 (5): 214
6. Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu Y-H, Duncan EL, Ntzani EE, Oei L, E OM: Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. Nat genet, 2012; 44(5): 491-501
7. Vrtačnik P, Marc J, Ostanek B. Epigenetic mechanisms in bone. Clin Chem Lab Med, 2014; 52 (5): 589-608
8. Holroyd C, Harvey N, Dennison E, Cooper C: Epigenetic influences in the developmental origins of osteoporosis. Osteoporos Int, 2012; 23: 401-410
9. Wood CL, Wood AM, Harker C, Embleton ND: Bone Mineral Density and Osteoporosis after Preterm Birth: The Role of Early Life Factors and Nutrition. Int J Endocrinol, 2013; 2013: 902513
10. Plešivnik Novljan M, Rotar Ž. Osteoartroza. V: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P. Interna medicina, 4. Izdaja, Littera picta, d.o.o., Ljubljana, 2011: 1445-1455
11. <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/osteoarthritis/basics/symptoms/conditionID-0014749>, dostopno: oktober 2015
12. Sinusas K: Osteoarthritis: Diagnosis and Treatment. Am Fam Physician, 2012; 85 (1): 49-56
13. Fernandez-Moreno M, Rego I, Carreira-Garcia V, Blanco FJ. Genetics in Osteoarthritis. Curr Genomics, 2008; 9: 542-547
14. Reynard LN, Loughlin J. Genetics and epigenetics of osteoarthritis. Maturitas, 2012; 71: 200-204

15. Barter MJ, Young DA. Epigenetic Mechanisms and Non-coding RNAs in Osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*, 2013; 15: 353
16. Nelson P, Kiriakidou M, Sharma A, Maniataki E, Mourelatos Z. The microRNA world: small is mighty. *Trends Biochem Sci*, 2003; 28 (10): 534-540
17. <http://www.mirbase.org/>, dostopno: oktober 2015
18. Melo CA, Melo SA. Biogenesis and Physiology of MicroRNAs. V: Fabbri M: Non-coding RNAs and Cancer. Springer, 2014: 5-24
19. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
20. Ciesla M, Skrzypek K, Kozakowska M, Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. MicroRNAs as biomarkers of disease onset. *Anal Bioanal Chem*, 2011; 401: 2051-2061
21. Liu Z, Sall A, Yang D. MicroRNA: an Emerging Therapeutic Target and Intervention Tool. *Int J Mol Sci*, 2008; 9: 978-999
22. Iwakawa H, Tomari Y: The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol*, 2015; 25 (11): 651-665
23. Tétreault N, De Guire V: miRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clinical Biochemistry*, 2013; 46: 842-845
24. Van Wijnen AJ, van de Peppel J, van Leeuwen JP, et al. MicroRNA Functions in Osteogenesis and Dysfunctions in Osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*, 2013; 11(2): 72-82
25. Garmilla-Ezquerra P, Sañudo C, Delgado-Calle J, Pérez-Nuñez MI, Sumillera M, Riancho JA. Analysis of the Bone MicroRNome in Osteoporotic Fractures. *Calcif Tissue Int*, 2015; 96: 30-37
26. Seeliger C, Karpinski K, Haug AT, Vester H, Schmitt A, Bauer JS, van Griensven M. Five Freely Circulating miRNAs and Bone Tissue miRNAs Are Associated With Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res*, 2014; 29 (8): 1718-1728
27. De-Ugarte L, Yoskovitz G, Balcells S, Güerri-Fernández R, Martinez-Diaz S, Mellibovsky L, Urreizti R, Nogués X, Grinberg D, García-Giralt N, Díez-Pérez A. MiRNA profiling of whole trabecular bone: identification of osteoporosis-related changes in MiRNAs in human hip bones. *BMC Med Genomics*, 2015; 8: 75
28. Papaioannou G, Mirzamohammadi F, Kobayashi T. MicroRNAs involved in bone formation. *Cell Mol Life Sci*, 2014; 71: 4747-4761

29. Le LTT, Swingler TE, Clark IM. The Role of MicroRNAs in Osteoarthritis and Chondrogenesis. *Arthritis Rheum*, 2013; 65 (8): 1963-1974
30. Yu C, Chen WP, Wang XH. MicroRNA in Osteoarthritis. *J Int Med Res*, 2011; 39: 1-9
31. Jones SW, Watkins G, Le Good N, Roberts S, Murphy CL, Brockbank SMV, Needham MRC, Read SJ, Newham P: The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF- α and MMP13. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009; 17: 464-472
32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406971>, dostopno: oktober 2015
33. Finnerty JR, Wang WX, Hebert SS, Wilfred BR, Mao G, Nelson PT. The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases. *J Mol Biol*, 2010; 402 (3): 491-509
34. He J-F, Luo Y-M, Wan X-H, Jiang D. Biogenesis of miRNA-195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis. *J Biochem Mol Toxicol*, 2011; 25 (6)
35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406987>, dostopno: oktober 2015
36. <http://www.bioinfo.mochsl.org.br/miriad/miRNA/hsa-mir-204/>, dostopno: oktober 2015
37. Imam JS, Plyler JR, Bansal H, Prajapati S, Bansal S, et al. Genomic Loss of Tumor Suppressor miRNA-204 Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Activating AKT/mTOR/Rac1 Signaling and Actin Reorganization. *PLoS ONE*, 2012; 7(12): e52397
38. Alsharafi WA, Xiao B, Abuhamed MM, Luo Z. miRNAs: biological and clinical determinants in epilepsy. *Front Mol Neurosci*, 2015; 8:59
39. Courboulin A, Paulin R, Giguere NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet ER, Biardel S, Provencher S, Côté J, Simard MJ, Bonnet S. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med*, 2011; 208 (3): 535-548
40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/249>, dostopno: oktober 2015
41. Mornet E. Hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis*, 2007; 2:40
42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6678>, dostopno: oktober 2015
43. Yan Q, Sage EH. SPARC, a Matricellular Glycoprotein with Important Biological Functions. *J Histochem Cytochem*, 1999; 47(12): 1495–1505
44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/649>, dostopno: oktober 2015

45. <http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=14478&showAllSites=true>, dostopno: oktober 2015
46. Martinez-Glez V, Valencia M, Caparrós-Martin JA, Aglan M, Temtamy S, Tenorio J, Pulido V, Lindert U, Rohrbach M, Eyre D, Giunta C, Lapunzina P, Ruiz-Perez VL. Identification of a Mutation Causing Deficient BMP1/mTLD Proteolytic Activity in Autosomal Recessive Osteogenesis Imperfecta. *Hum Mutat*, 2012; 33 (2): 343-350
47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79071>, dostopno: oktober 2015
48. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000170522;r=4:110045846-110199199;t=ENST00000394607, dostopno: oktober 2015
49. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ELOVL6>, dostopno: oktober 2015
50. Morcillo S, Martín-Núñez GM, Rojo-Martínez G, Almaraz MC, García-Escobar E, Mansego ML, de Marco G, Chaves FJ, Soriguer F. ELOVL6 Genetic Variation Is Related to Insulin Sensitivity: A New Candidate Gene in Energy Metabolism. *PLoS ONE*, 2011; 6 (6): e21198
51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56603>, dostopno: oktober 2015
52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79807>, dostopno: oktober 2015
53. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000138780;r=4:105708778-105847728, dostopno: oktober 2015
54. Repapi E, Sayers I, Wain LV, et al. Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function. *Nat Genet*, 2010; 42(1): 36-44
55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4602>, dostopno: oktober 2015
56. Ostanek B. Različne verižne reakcije s polimerazo. V: Černe D, Ostanek B. Biomedicinska analitika I. Učbenik za študente laboratorijske biomedicine, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012: 128-133
57. Ostanek B. Verižna reakcija s polimerazo v realnem času. V: Černe D, Ostanek B. Biomedicinska analitika I. Učbenik za študente laboratorijske biomedicine, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012: 136-147
58. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 2002; 3(7)

59. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft 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 or Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res*, 2004; 64: 5245-5250
60. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001; 26 (9)
61. Bio-Rad Laboratories Inc. Real-time PCR applications guide. Bulletin, 2006; 5279: 101
62. Van Rooij E. The art of MicroRNA Research. *Circ Res*, 2011; 108: 219-234
63. Panach L, Mifsut D, Tarín JJ, Cano A, García-Pérez MÁ. Serum Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Osteoporotic Fracture. *Calcif Tissue Int*, 2015; 97: 495-505
64. Grünhagen J, Bhushan R, Degenkolbe E, Jäger M, Knaus P, Mundlos S, Robinson PN, Ott C-E. MiR-497~195 Cluster MicroRNAs Regulate Osteoblast Differentiation by Targeting BMP Signaling. *J Bone Miner Res*, 2015; 30 (5): 796-808
65. Balla B, Kósa JP, Kiss J, Borsy A, Podani J, Takács I, Lazáry Á, Nagy Z, Bácsi K, Speer G, Orosz L, Lakatos P. Different Gene Expression Patterns in the Bone Tissue of Aging Postmenopausal Osteoporotic and Non-osteoporotic Women. *Calcif Tissue Int*, 2008; 82: 12-26
66. Sánchez-Sabaté E, Alvarez L, Gil-Garay E, Munuera L, Vilaboa N. Identification of differentially expressed genes in trabecular bone from the iliac crest of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009; 17: 1106-1114
67. Lind T, Sundqvist A, Hu L, Pejler G, Andersson G, Jacobson A, Melhus H. Vitamin A Is a Negative Regulator of Osteoblast Mineralization. *PLoS ONE*, 2013; 8:12: e82388
68. Bhattacharai G, Lee YH, Lee MH, Yi HK. Gene Delivery of c-myb Increases Bone Formation Surrounding Oral Implants. *J Dent Res*, 2013; 92 (9): 840-845
69. He H, Chen K, Wang F, Zhao L, Wan X, Wang L, Mo Z. miR-204-5p promotes the adipogenetic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by modulating DVL3 expression and suppressing Wnt/β-catenin signaling. *Int J Mol Med*, 2015; 35: 1587-1595

70. Laue K, Pogoda H-M, Daniel PB, van Haeringen A, Alanay Y, von Ameln S, Rachwalski M, Morgan T, Gray MJ, Breuning MH, Sawyer GM, Sutherland-Smith AJ, Nikkels PG, Kubisch C, Bloch W, Wollnik B, Hammerschmidt M, Robertson SP. Craniosynostosis and Multiple Skeletal Anomalies in Humans and Zebrafish Result from a Defect in the Localized Degradation of Retinoic Acid. *Am J Hum Genet*, 2011; 82: 595-606
71. He H, Cao S, Niu T, Zhou Y, Zhang L, Zeng Y, Zhu W, Wang Y, Deng H. Network-Based Meta-Analyses of Associations of Multiple Gene Expression Profiles with Bone Mineral Density Variations in Women. *PLoS ONE*, 2016; 11 (1): e0147475
72. Morris HA. Vitamin D Activities for Health Outcomes. *Ann Lab Med*, 2014; 34: 181-186
73. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *J Bone Miner Res*, 2010; 25 (7): 1468-1486
74. Moreira Kulak CA, Dempster DW. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2010; 54(2): 87-98

PRILOGA

Priloga 1: Zaporedja neustreznih oligonukleotidnih začetnikov za analizo z uporabo interkelirajočega barvila. (F – smerni, R – protismerni)

Gen	Smer	Zaporedje	Tm (°C)
ALPL	F	5'-CTTTATAAGGCAGCGGGGG-3'	69,2
verzija 1	R	5'-AACTGATGTTCCAATCCTGCG-3'	66,1
ALPL	F	5'-CGCTATCCTGGCTCCGTG-3'	67,0
verzija 2	R	5'-CCAAGACCTGCTTATCCCTGG-3'	67,3
ALPL	F	5'-ACTGGTACTCAGACAACGAGAT-3'	59,3
verzija 3	R	5'-ATCACGTCAATGTCCCTGATGTTAT-3'	66,2
BMP1	F	5'-TCTTCTCAGACAAGGACGAGTG-3'	63,5
	R	5'-GCGGCATTGGCACTCATAAC-3'	67,6
CYP26B1	F	5'-CTGCTGCTGGCCGTGT-3'	65,4
	R	5'-TGGAAGCCAGAACCCCTGC-3'	66,5

Priloga 2: Koncentracije Ca²⁺ in fosfatnih ionov, vitamina D, intaktnega paratiroidnega hormona in serumskega osteoprotegerina preiskovancev z osteoporozo ozira z osteoartrozo. (25(OH)D – 25-hidroksivitamin D, iPTH – intaktni paratiroidni hormon, sOPG – serumski osteoprotegerin, p – rezultat statistične analize)

	Osteoporoza	Osteoartroza	p
Ca²⁺ ioni (mmol/L)*	1,99±0,11 (N=16)	2,04±0,07 (N=14)	0,093
Fosfatni ioni (mmol/L)**	0,9 (0,8;1,0) (N=16)	0,9 (0,8;1,0) (N=14)	0,880
25(OH)D (nmol/L)**	37 (22;42) (N=15)	35 (17;43) (N=12)	0,981
iPTH (ng/L)**	56 (46;70) (N=16)	64 (35;87) (N=14)	0,901
sOPG (pmol/L)**	7,72 (5,88;10,79) (N=12)	9,71 (6,82;10,22) (N=6)	0,574

*t-test, **test Mann-Whitney

Priloga 3: Označevalci pridobljeni z metodo mikro-računalniške tomografije. (BV/TV – volumski delež kostnine, BS/BV – razmerje kostne površine proti kostnemu volumnu, BS/TV – površinska gostota kosti, Tb.Th – debelina trabekul, Tb.Sp – razmaknjenost trabekul, Tb.N – število trabekul, SMI – kazalec strukture modela, DA – stopnja anizotropije, Conn.Dn – gostoto povezanosti, p – rezultat statistične analize, N – število preiskovancev)

	Osteoporoz	Osteoartroza	Zdravi	p
BV/TV (%)**	7,31 (3,99;10,6) (N=11)	12,7 (10,1;17,8) (N=15)	10,5 (7,28;16,3) (N=15)	0,012
BS/BV (mm⁻¹)**	0,0227 (0,0215;0,0276) (N=11)	0,0208 (0,0186;0,0247) (N=15)	0,0225 (0,0178;0,025) (N=15)	0,446
BS/TV (μm⁻¹)*	0,0018±0,0008 (N=11)	0,0027±0,0007 (N=15)	0,0024±0,0007 (N=15)	0,006
Tb.Th (μm)**	161 (142;194) (N=11)	170 (133;189) (N=15)	157 (133;231) (N=15)	0,993
Tb.Sp (μm)**	1060 (847;1120) (N=11)	786 (679;906) (N=15)	862 (807;1060) (N=15)	0,076
Tb.N (μm⁻¹)*	(0,47±0,22)*10 ⁻³ (N=11)	(0,78±0,21)*10 ⁻³ (N=15)	(0,72±0,24)*10 ⁻³ (N=15)	0,004
SMI**	1,96 (1,67;2,07) (N=11)	1,15 (0,96;1,55) (N=15)	1,43 (0,697;1,79) (N=15)	0,001
DA*	1,84±0,25 (N=11)	2,45±0,55 (N=15)	2,26±0,76 (N=15)	0,038
Conn.Dn (μm⁻³)*	(0,28±0,16)*10 ⁻⁸ (N=11)	(0,32±0,19)*10 ⁻⁸ (N=15)	(0,32±0,12)*10 ⁻⁸ (N=15)	0,027

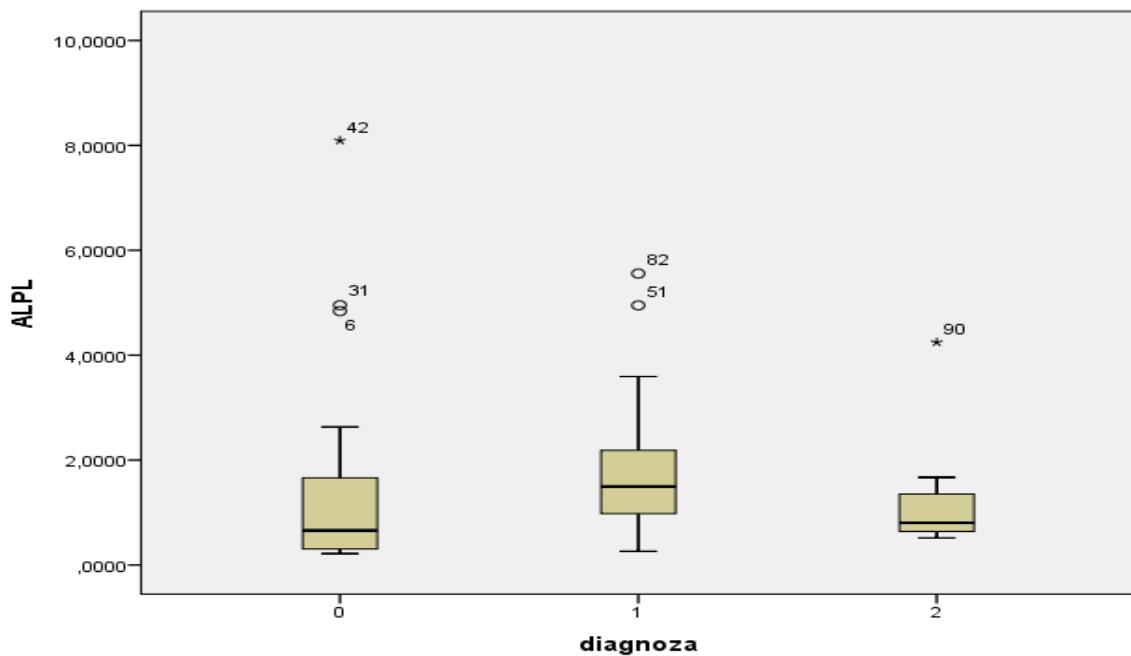
*ANOVA, **test Kruskal-Wallis

Priloga 4: Označevalci pridobljeni z metodo kostne histomorfometrije. (OsS/BS – osteoidna površina, OsV/BV – osteoidni volumen, NOb – število osteoblastov, NOc – število osteklastov, NObBS – število osteoblastov na kostno površino, NOcBS – število osteoklastov na kostno površino, p – rezultat statistične analize, N – število preiskovancev)

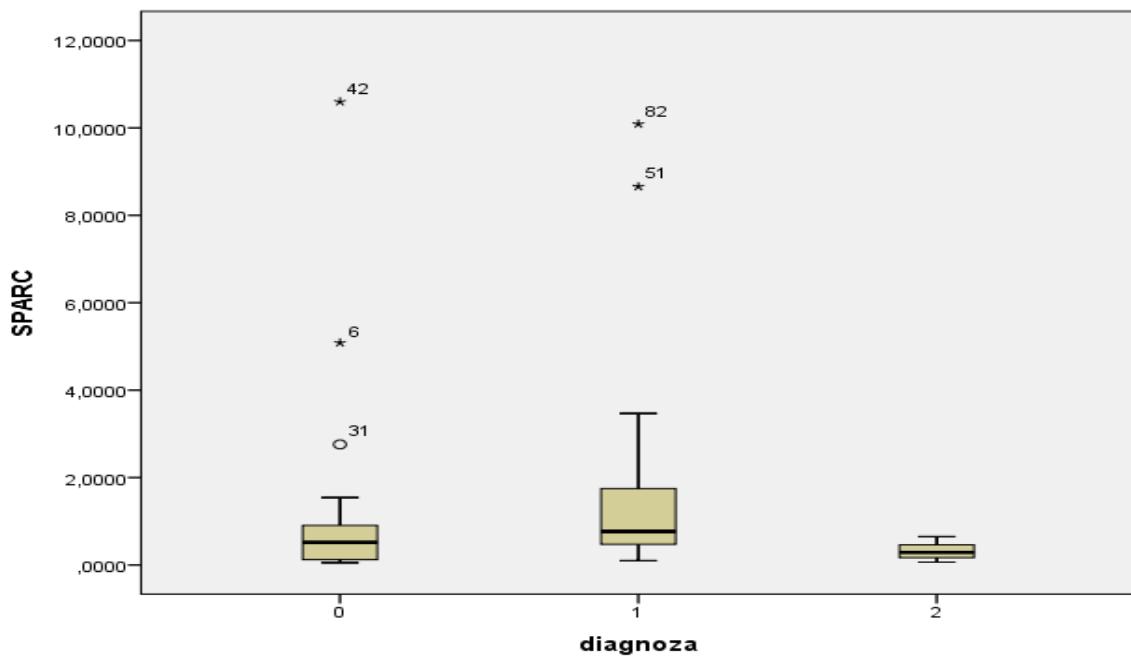
	Osteoporoza	Osteoartroza	Zdravi	p
OsS/BS*	0,414835±0,151113 (N=10)	0,297578±0,111878 (N=14)	0,260218±0,116422 (N=13)	0,017
OsV/BV**	0,013454 (0,010201;0,018759) (N=10)	0,005896 (0,00325;0,009172) (N=14)	0,003781 (0,003104;0,007356) (N=13)	0,005
NOb**	0 (0; 17) (N=10)	0 (0; 1) (N=14)	0 (0; 0) (N=13)	0,126
NOc**	0 (0;1) (N=10)	0 (0; 0) (N=14)	0 (0; 0) (N=13)	0,062
NObBS**	0,000000 (0,000000;0,000837) (N=10)	0,000000 (0,000000;0,000000) (N=14)	0,000000 (0,000000;0,000000) (N=13)	0,121
NOcBS**	0,000000 (0,000000;0,000019) (N=10)	0,000000 (0,000000;0,000015) (N=14)	0,000000 (0,000000;0,000000) (N=13)	0,062

*ANOVA, **test Kruskal-Wallis

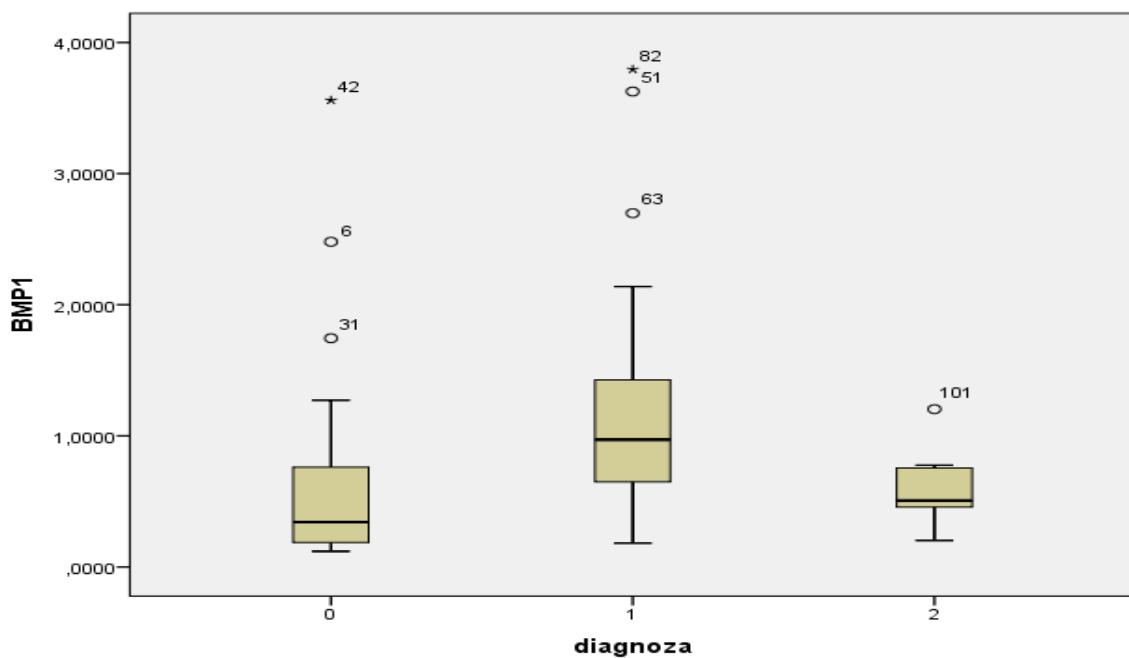
Priloga 5: Grafična predstavitev mediane in percentilov izražanja gena *ALPL* za posamezne skupine. (0 – osteoartroza, 1 – osteoporoz, 2 – zdravi)



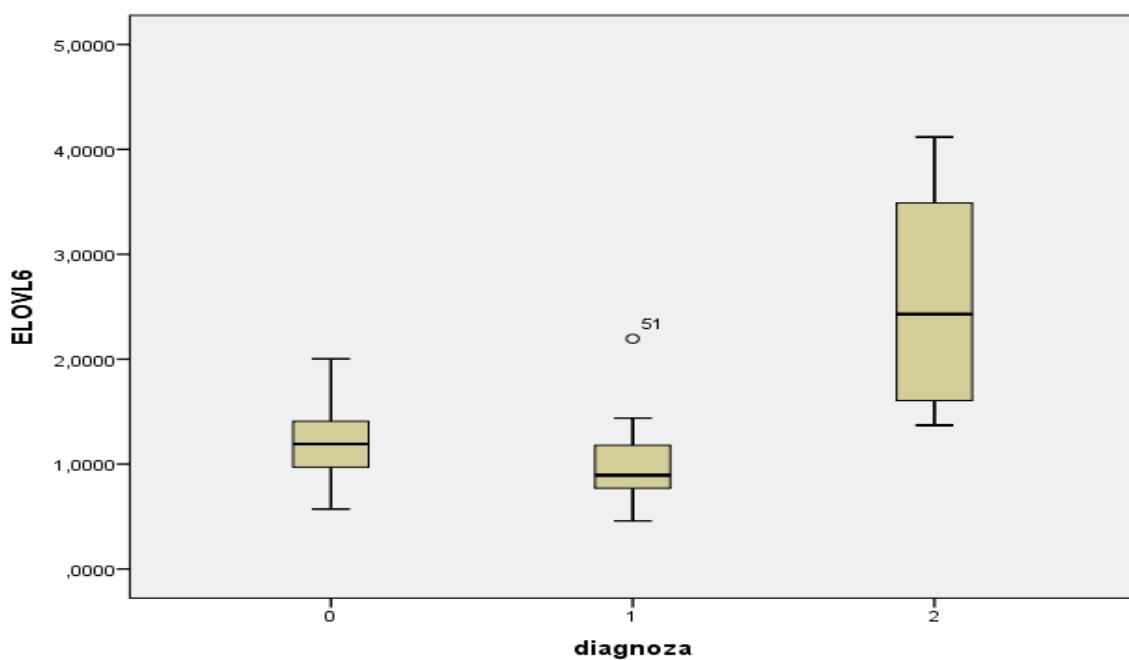
Priloga 6: Grafična predstavitev mediane in percentilov izražanja gena *SPARC* za posamezne skupine. (0 – osteoartroza, 1 – osteoporoz, 2 – zdravi)



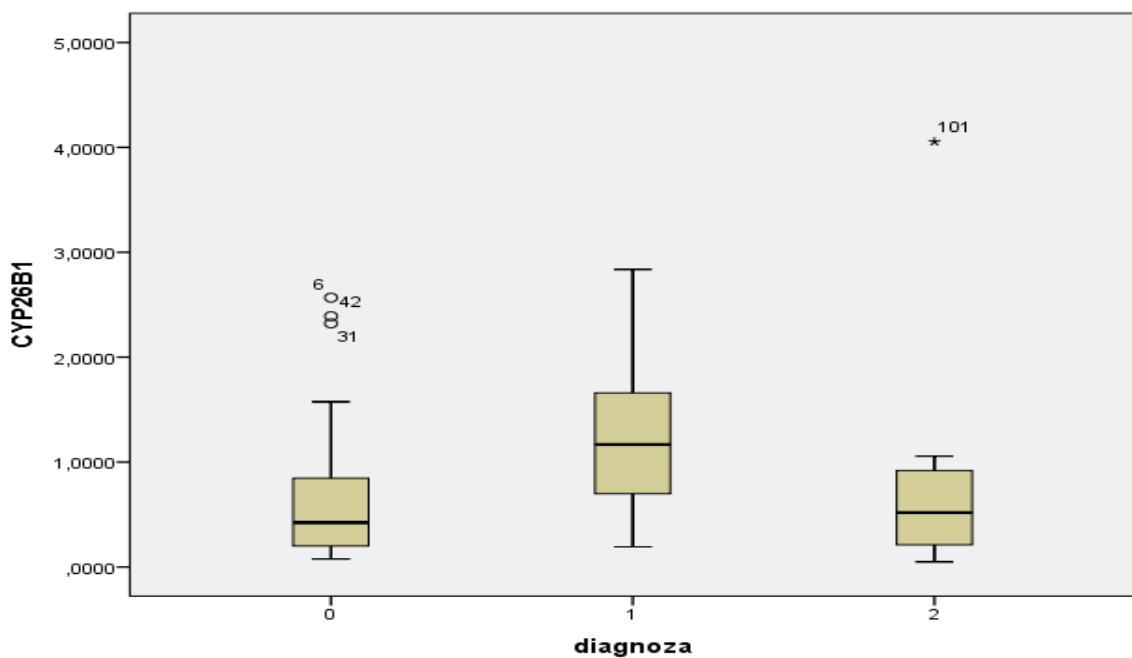
Priloga 7: Grafična predstavitev mediane in percentilov izražanja gena *BMP1* za posamezne skupine. (0 – osteoartroza, 1 – osteoporoz, 2 – zdravi)



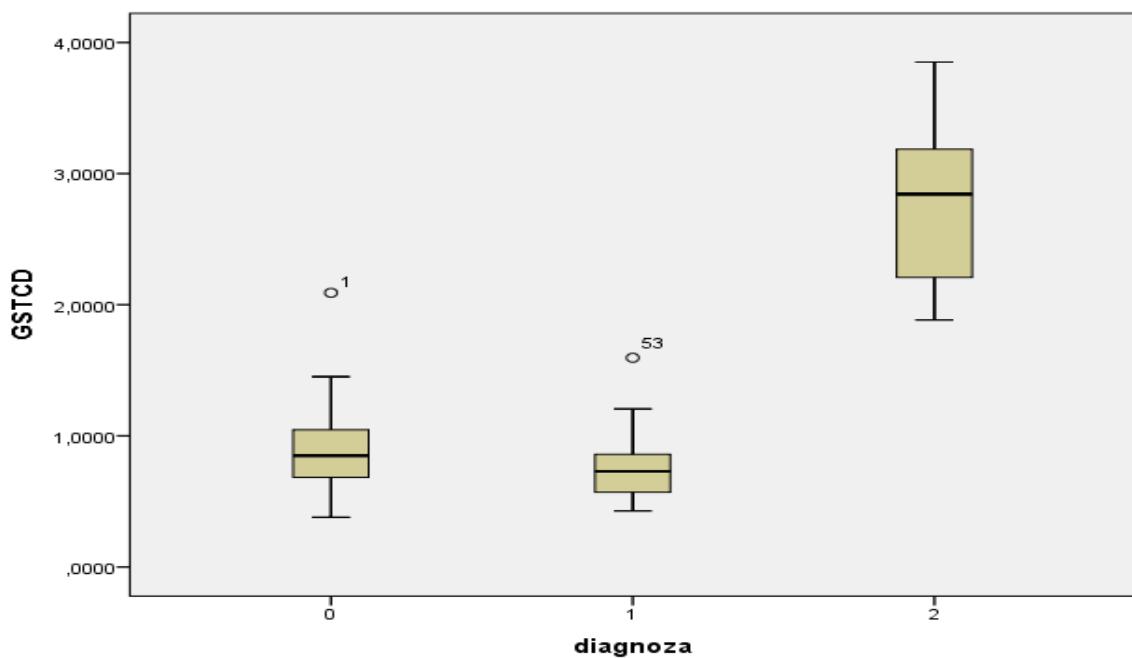
Priloga 8: Grafična predstavitev mediane in percentilov izražanja gena *ELOVL6* za posamezne skupine. (0 – osteoartroza, 1 – osteoporoz, 2 – zdravi)



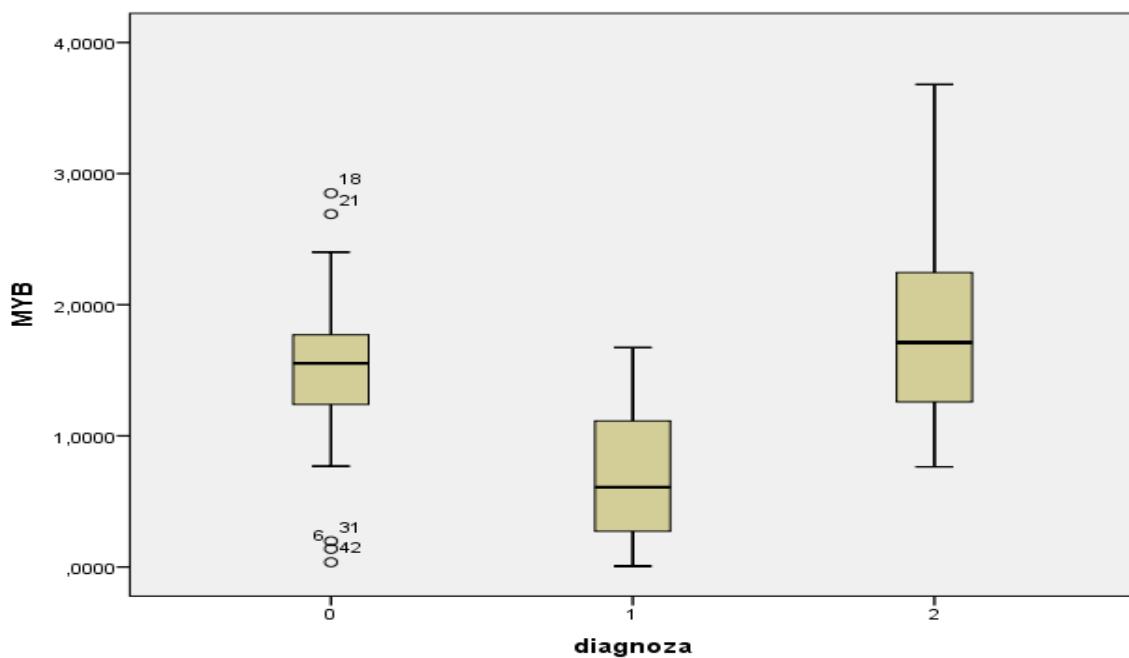
Priloga 9: Grafična predstavitev mediane in percetilov izražanja gena *CYP26B1* za posamezne skupine. (0 – osteoartroza, 1 – osteoporoz, 2 – zdravi)



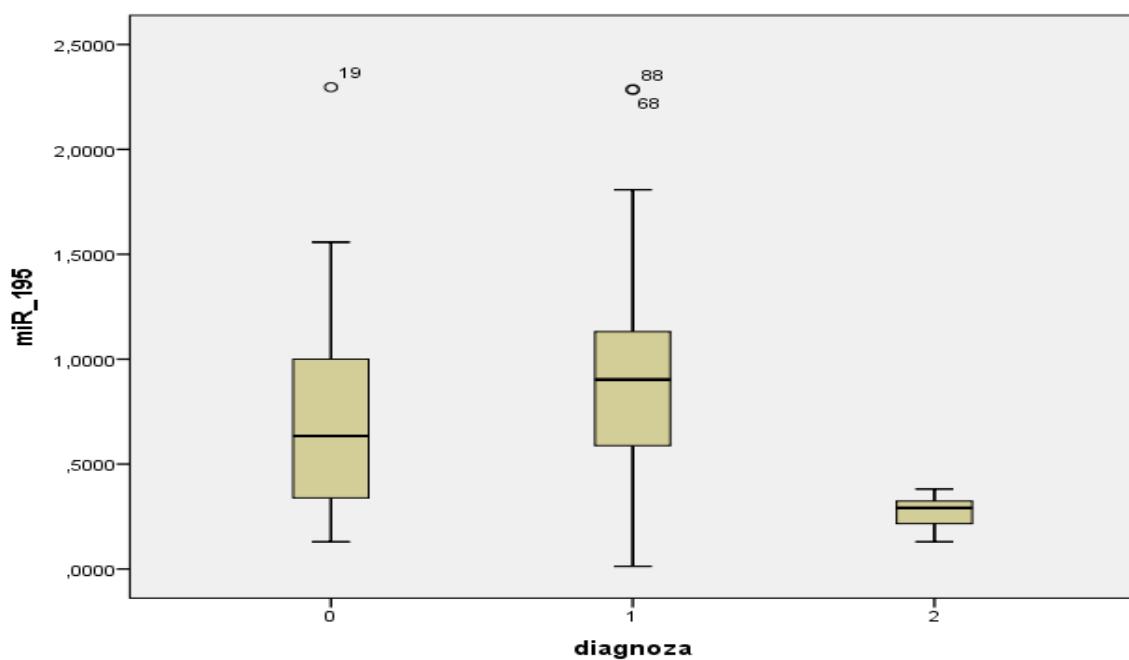
Priloga 10: Grafična predstavitev mediane in percetilov izražanja gena *GSTCD* za posamezne skupine. (0 – osteoartroza, 1 – osteoporoz, 2 – zdravi)



Priloga 11: Grafična predstavitev mediane in percetilov izražanja gena *MYB* za posamezne skupine. (0 – osteoartroza, 1 – osteoporiza, 2 – zdravi)



Priloga 12: Grafična predstavitev mediane in percetilov izražanja miR-195-5p za posamezne skupine. (0 – osteoartroza, 1 – osteoporiza, 2 – zdravi)



Priloga 13: Grafična predstavitev mediane in percetilov izražanja miR-204-5p za posamezne skupine. (0 – osteoartroza, 1 – osteoporoz, 2 – zdravi)

