

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nika KLINEC

**VPELJAVA METODE DOLOČANJA MIKRO RNA V
SERUMU S KVANTITATIVNO VERIŽNO
REAKCIJO S POLIMERAZO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nika KLINEC

**VPELJAVA METODE DOLOČANJA MIKRO RNA V SERUMU S
KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**INTRODUCTION OF METHODS FOR DETERMINING THE
MICRORNA IN SERUM BY QUANTITATIVE POLYMERASE
CHAIN REACTION**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno v Specializiranem hematološkem laboratoriju na Kliničnem oddelku za hematologijo, v enoti za hemostazo in molekularno genetiko, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Blagajano HERZOG VELIKONJA, za somentorja as. mag. Tadeja PAJIČA, univ.dipl. inž, spec. med. biokem in za recenzenta doc. dr. Tomaža ACCETTA.

Mentorica: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Somentor: as. mag. Tadej Pajič, univ. dipl. inž, spec. med. biokem.

Recenzent: doc. dr. Tomaž Accetto

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: asist. mag. Tadej PAJIČ, univ. dipl. inž, spec. med. biokem.
Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za hematologijo, Specializirani hematološki laboratorij

Član: doc. dr. Tomaž ACCETTO
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno nemejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Nika Klinec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 577.21.088:616-079:616.12(043)=163.6
KG molekularna genetika/mikro RNA/cirkulirajoče mikro RNA/serum/izolacija mikro RNA/sinteza cDNA/qPCR/diagnostične metode/dilatativna kardiomiopatija/ishemična kardiomiopatija
AV KLINEC, Nika, dipl. mikrobiol. (UN)
SA HERZOG VELIKONJA, Blagajana (mentorica)/ PAJIČ, Tadej (somentor)/ ACCETTO, Tomaž (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2015
IN VPELJAVA METODE DOLOČANJA MIKRO RNA V SERUMU S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XI, 62 str., 17 pregl., 5 sl., 12 pril., 83 vir.
II sl
JI sl/en
AI Kratke nekodirajoče molekule mikro RNA (miRNA) imajo velik potencial, kot klinični biološki označevalci različnih bolezni, kar so že dokazali s številnimi raziskavami. Zaradi enostavne pridobitve vzorca za analizo, visoko občutljivih in specifičnih metod detekcije, hitre in natančne detekcije, lahko zaznamo miRNA v različnih bioloških vzorcih ter pridobimo informacije o številnih bolezenskih stanjih. Ker so kardiovaskularne bolezni velik svetovni problem, je iznajdba učinkovitejših metod za prepoznavanje predispozicij in začetnih faz bolezni, izjemnega pomena. Z našo raziskavo smo želeli razviti takšno metodo in preveriti, ali se v serumu bolnikov in zdravih oseb pojavljajo specifični profili miRNA. Zastavili smo protokol izolacije miRNA, sinteze komplementarne DNA (cDNA) ter kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR) in uspešno izolirali 5 različnih molekul miRNA, ki bi morda lahko bile uporabne za hitro prepoznavanje bolezenskih stanj ter pokazale morebitno (ne)odzivnost bolnikov na terapijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 577.21.088:616-079:616.12(043)=163.6
CX molecular genetics/microRNA/circulating microRNA/serum/microRNA isolation/cDNA synthesis/qPCR/diagnostic methods/dilatative cardiomyopathy/ischemic cardiomyopathy
AU KLINEC, Nika
AA HERZOG VELIKONJA, Blagajana (supervisor)/ PAJIČ, Tadej (co-advisor)/ ACCETTO, Tomaž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2015
TI INTRODUCTION OF METHODS FOR DETERMINING THE MICRORNA IN SERUM BY QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION
DT M. Sc Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XI, 62 p., 17 tab., 5 fig., 12 ann., 83 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Short non-coding microRNA molecules (miRNA) have a big potential to be used as clinical biological markers of various disease states, which has already been proven by different researches. Because of easily obtained samples for analysis, highly sensitive, specific, fast and accurate detection methods, miRNA can be detected in various biological samples and provide information on a number of disease states. Since cardiovascular diseases are a major global problem, the invention of more efficient methods for the identification of predispositions and early stages of the disease is of paramount importance. With our study, we wanted to develop such a method to see whether the serum of patients and healthy persons has specific miRNA profiles. We set the protocol of miRNA isolation, synthesis of complementary DNA (cDNA) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and successfully isolated 5 different miRNA molecules that could possibly serve for faster, more efficient identification of disease states and demonstrate whether patients will be responsive to therapy or not.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVARČEK.....	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 LASTNOSTI MOLEKUL miRNA.....	3
2.2 ODKRITJE IN ZGODOVINA MOLEKUL miRNA	4
2.3 BIOGENEZA miRNA PRI SESALCIH.....	6
2.4 DELOVANJE miRNA.....	8
2.5 CIRKULIRajoče miRNA.....	9
2.5.1 miRNA v membranskih veziklih.....	10
2.5.2 miRNA znotraj proteinskih kompleksov	11
2.5.3 miRNA v povezavi s HDL in LDL	11
2.6 METODE DETEKCIJE miRNA	11
2.6.1 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času	12
2.6.2 Normalizacija, kvantifikacija in referenčni geni.....	13
2.7 miRNA KOT BIOLOŠKI OZNAČEVALCI.....	15
2.7.1 miRNA in kardiovaskularna obolenja	15
2.8 CIRKULIRajoče miRNA PRI ZDRAVIH OSEBAH	16
2.9 KARDIOVASKULARNA OBOLENJA	17
2.9.1 Ishemična kardiomiopatija	18
2.9.2 Dilatativna kardiomiopatija	18
2.9.3 Zdravljenje s krvotvornimi matičnimi celicami.....	18
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 MATERIALI.....	19
3.1.1 Reagenti.....	19
3.1.2 Laboratorijski pripomočki.....	19

3.1.3 Laboratorijska oprema.....	21
3.2 METODE	21
3.2.1 Preiskovanci.....	22
3.2.2 Priprava vzorcev	23
3.2.3 Izolacija mikro RNA	23
3.2.4 Sinteza cDNA	25
3.2.5 Kvantitativni PCR.....	27
3.2.6 Delna validacija metod	29
3.2.6.1 Ponovljivost rezultatov qPCR meritev v seriji	29
3.2.6.2 Ponovljivost rezultatov qPCR meritev med serijami	29
3.2.7 Priprava rezultatov qPCR za statistično vrednotenje in kontrolo kakovosti.	29
3.2.7.1 Uravnava vrednosti Cq z notranjim kalibratorjem	29
3.2.7.2 Priprava rezultatov Cq miRNA za statistično vrednotenje.....	30
3.2.8 Test preverjanja hemolize v vzorcih seruma	30
3.2.9 Ugotavljanje uspešnosti izolacije miRNA in pripravljene cDNA	31
3.2.10 Statistično vrednotenje.....	31
4 REZULTATI	33
4.1 PONOVLJIVOST REZULTATOV qPCR MERITEV V SERIJI	33
4.2 PONOVLJIVOST REZULTATOV qPCR MERITEV MED SERIJAMI	35
4.3 PRIMERJAVA RAVNI miRNA V SERUMU PREISKOVANIH SKUPIN	37
4.3.1 Test hemolize	37
4.3.2 Raven kontrolnih molekul RNA v vseh preiskovanih vzorcih	38
4.3.3 Raven miRNA v vzorcih bolnikov in kontrolne skupine	39
5 RAZPRAVA	47
6 SKLEPI	53
7 POVZETEK	54
8 VIRI.....	55
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Prikaz rezultatov različnih študij, s katerimi so dokazali povezavo med miRNA in različnimi kardiovaskularnimi obolenji.	16
Preglednica 2:	Uporabljeni laboratorijski pripomočki.....	19
Preglednica 3:	Uporabljena laboratorijska oprema.....	21
Preglednica 4:	Prikaz priprave reakcijske mešanice za sintezo cDNA.....	26
Preglednica 5:	Prikaz vseh potrebnih reagentov za qPCR	28
Preglednica 6:	Prikaz rezultatov ponovljivosti qPCR v seriji	33
Preglednica 7:	Prikaz rezultatov ponovljivosti qPCR med serijami.....	35
Preglednica 8:	Rezultati parnih primerjav skupin vzorcev s statistično različnimi ravnimi miRNA med skupinami.....	39
Preglednica 9:	Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov (bolniki, odzivni in neodzivni, vzorci odvzeti pred začetkom zdravljenja) in K (kontrolna skupina, zdrave osebe) (razmerje vsi bolniki pred začetkom zdravljenja:K)	40
Preglednica 10:	Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov ZO (bolniki, odzivni, vzorci odvzeti pred začetkom zdravljenja) in K (kontrolna skupina, zdrave osebe) (razmerje ZO:K)	41
Preglednica 11:	Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov 6O (bolniki, odzivni, vzorci vzeti po 6. mesecih terapije) in K (kontrolna skupina, zdrave osebe) (razmerje 6O:K)	42
Preglednica 12:	Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov ZNO (bolniki, neodzivni na terapijo, vzorec vzet pred začetkom terapije) in K (kontrolna skupina, zdrave osebe) (razmerje ZNO:K).....	43
Preglednica 13:	Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov 6NO (bolniki, neodzivni na terapijo, vzorec vzet po 6. mesecih terapije) in K (kontrolna skupina, zdrave osebe) (razmerje 6NO:K).....	44
Preglednica 14:	Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov ZO (bolniki, odzivni na terapijo, vzorec vzet pred začetkom terapije) in 6O (bolniki, odzivni, vzorci vzeti po 6. mesecih terapije) (razmerje ZO:6O)	45
Preglednica 15:	Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov ZNO (bolniki, neodzivni na terapijo, vzorec vzet pred začetkom terapije) in 6NO (bolniki, neodzivni na terapijo, vzorec vzet po 6. mesecih terapije) (razmerje ZNO:6NO)	45
Preglednica 16:	Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov ZO (bolniki, odzivni na terapijo, vzorec vzet pred začetkom terapije) in ZNO (bolniki, neodzivni na terapijo, vzorec vzet pred začetkom terapije) (razmerje ZO:ZNO)	46
Preglednica 17:	Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov 6O (bolniki, odzivni, vzorci vzeti po 6. mesecih terapije) in 6NO (bolniki, neodzivni na terapijo, vzorec vzet po 6. mesecih terapije) (razmerje 6O:6NO).....	46

KAZALO SLIK

Slika 1:	Prikaz delovanja heterokronih genov in njihovo uravnavanje postembrionalnega razvoja gliste <i>C. elegans</i> (Reinhart in sod., 2000)	5
Slika 2:	Prikaz biogeneze miRNA ter njen vpliv na mRNA (Winter in sod., 2009)	8
Slika 3:	Shema poteka dela	22
Slika 4:	Grafični prikaz testa hemolize pri vseh preiskovanih vzorcih; na y osi so ΔC_q vrednosti in na x osi imena vzorcev	37
Slika 5:	Prikaz ravni kontrolnih molekul RNA v vseh preiskovanih vzorcih; os y prikazuje vrednosti C_q , os x pa imena vzorcev	38

KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Optimizacija izolacije miRNA
PRILOGA B: Protokol izolacije miRNA, kot ga navaja proizvajalec (Exiqon, Danska)
PRILOGA C: Dodatek A k protokolu izolacije za izločitev morebitne DNA v vzorcu
PRILOGA D: Postopek optimizacije izolacije miRNA
PRILOGA D1: Prikaz rezultatov qPCR za 3 različne protokole izolacije miRNA
PRILOGA E: Določitev najprimernejše koncentracije miRNA za sintezo cDNA
PRILOGA E1: Prikaz rezultatov titracije različnih volumnov miRNA pri sintezi cDNA
PRILOGA F: Določitev najprimernejše koncentracije barvila ROX v reakciji qPCR
PRILOGA F1: Prikaz rezultatov določitve najprimernejše koncentracije barvila ROX v reakciji qPCR
PRILOGA G: Prikaz razporeditve miRNA na ploščah (panel qPCR I)
PRILOGA H: Prikaz razporeditve miRNA na ploščah (panel qPCR II)
PRILOGA I: Uporabljeni ukazi pri statistični obdelavi podatkov v programu Limma v statističnem programskem okolju R/Bioconductor

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ago	proteini Argonaut
bp	bazni par
cDNA	komplementarna DNA (angl. <i>complementary DNA</i>)
c-miRNA	cirkulirajoča miRNA
DCM	dilatativna kardiomiopatija (angl. <i>dilative cardiomyopathy</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ds (DNA)	dvojerižna (deoksiribonukleinska kislina)
HDL	lipoprotein visoke gostote (angl. <i>high density lipoprotein</i>)
ICM	ishemična kardiomiopatija (angl. <i>ischemic cardiomyopathy</i>)
KMC	krvtvorne matične celice
LDL	lipoprotein nizke gostote (angl. <i>low density lipoprotein</i>)
LNA	zaklenjena nukleinska kislina (angl. <i>locked nucleic acid</i>)
miRNA	mikro RNA
NFκB	jedrni transkripcijski faktor
nt	nukleotid
RISC	s strani RNA spodbujeni utiševalni kompleks (angl. <i>RNA-induced silencing complex</i>)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNaza	nukleaza, katalizira hidrolizo RNA
ROX	5-karboksi-X-rodamin, barvilo uporabljeno pri reakciji qPCR
Rpm	obrati na minuto (angl. <i>rounds per minute</i>)
RT-qPCR	reverzna transkripcija in kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>)
ss (RNA)	enoverižna (ribonukleinska kislina)
Tm	temperatura taljenja (angl. <i>melting temperature</i>)
TWIST	transkripcijski faktor pri človeku, lahko deluje kot onkogen
UTR	neprevedena regija (angl. <i>untranslated region</i>)

SLOVARČEK

miRNA	~22 nt dolge endogene nekodirajoče enoverižne ribonukleinske kisline, ki delujejo kot genski regulatorji, z vezavo na tarčne elemente vplivajo na utišanje genov.
pri-miRNA	Nezrela oblika miRNA, 500 do 3000 baznih parov dolgi prekurzorji miRNA, ki imajo strukturo lasnice, v jedru celice se pri-miRNA procesirajo v pre-miRNA.
pre-miRNA	Nezrela oblika miRNA, 65-70 baznih parov dolge molekule, v obliki lasnice, pri-miRNA se procesirajo v pre-miRNA z mikropresorskim kompleksom, potujejo iz jedra v citosol; preko kompleksa RISC iz pre-miRNA nastane zrela molekula miRNA.
Mikropresorski kompleks	Sestavljata ga encim Drosha in njegov kofaktor DGCR8, zadolžen za procesiranje pri-miRNA v pre-miRNA.
c-miRNA	Cirkulirajoče molekule miRNA, ki jih celice s sekrecijo izločajo iz celic, prenašajo se s krvjo po telesu.
Eksosomi	Membranski veziki, veliki med 30 in 100 nm, nastanejo iz endosoma in se izločijo iz celic, ko se multivezikularno telesce zlige s plazemsko membrano.
cDNA	Komplementarna molekula DNA, miRNA prepišemo s pomočjo reverzne transkriptaze, rezultat česar je komplementarna veriga DNA.
RT-qPCR	Metoda reverzne transkripcije, s katero molekule RNA prepišemo v komplementarno verigo DNA, sledi kvantitativna verižna reakcija s polimerazo, kjer pomnožujemo in kvantificiramo nukleinske kisline.
Serum	Tekoča frakcija krvi, kateri so odstranjene krvne celice (bele ter rdeče krvničke) ter faktorji strjevanja krvi.
Cq	Cikel kvantifikacije, oznaka uporabljena pri reakciji qPCR, označuje cikel, ko izmerjena fluorescanca vzorca preseže nastavljeni prag.

1 UVOD

Vse več raziskav kaže, da so možnosti uporabe cirkulirajočih mikro RNA (miRNA) kot bioloških označevalcev pri različnih kardiovaskularnih in drugih obolenjih velike. Več raziskav kaže tudi na možnost uporabe miRNA za zdravljenje bolezni. Kljub vsemu je do danes narejenih premalo študij, zaradi česar rutinska uporaba miRNA v medicinske namene žal še ni mogoča. Pri identifikaciji in kvantifikaciji miRNA so težave v določitvi in izbiri primernih endogenih kontrol, saj so ekspresijski profili cirkulirajočih miRNA različni v odvisnosti od bolnika samega, bolezni in načina zdravljenja. Prav tako težavo predstavljajo različne uporabljene analizne metode študij, zaradi česar primerjava rezultatov ni mogoča. Menimo, da bi z uvedbo splošno sprejetih, natančnih in občutljivih metod lahko primerjali rezultate različnih laboratorijev med seboj, kar bi doprineslo k hitrejšim in pravilnejšim rezultatom ter uporabi teh označevalcev v redni klinični praksi. Z nalogo smo žeeli vpeljati natančno in zanesljivo metodo določanja mikro RNA, s katero bi lahko v vzorcih seruma bolnikov in zdravih ljudi preverili, ali ob njihovi primerjavi profilov in ravni miRNA prihaja do pomembnih razlik.

1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE

- Vpeljati metodo za izolacijo miRNA iz bioloških vzorcev, serumu preiskovancev, z vezavo miRNA na posebne kromatografske membrane v centrifugirnih kolonah.
- Vpeljati analizno metodo za identifikacijo in določitev ravni molekul miRNA v serumu preiskovancev z obratnim prepisovanjem in kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-qPCR).
- Delno validirati analizno metodo in preveriti na izbranih vzorcih preiskovancev ponovljivost izbrane analizne metode za določitev ravni miRNA v serumu.
- Z vpeljanimi metodami ugotoviti razlike v ravni izbranih molekul miRNA v serumu med bolniki s srčnim popuščanjem zaradi dilatativne ali ishemične kardiomiopatije in serumu zdravih oseb.
- Primerjati količine nastalih izbranih molekul miRNA v serumu pred in po zdravljenju srčnega popuščanja s krvotvornimi matičnimi celicami (KMC). Z vpeljanimi metodami pridobiti informacije o novih možnih označevalcih miRNA bolezni.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Domnevali smo, da:

- bomo z izbranimi reagenti za izolacijo, identifikacijo in določitev ravni različnih miRNA uspešno izolirali, identificirali in določili raven različnih miRNA v serumu preiskovancev.
- bomo ugotovili razlike v profilu molekul miRNA med zdravimi preiskovanci in bolniki z napredovalim srčnim popuščanjem zaradi dilatativne ali ishemične kardiomiopatije.
- bomo ugotovili razlike v profilu molekul miRNA med bolniki z napredovalim srčnim popuščanjem zaradi dilatativne ali ishemične kardiomiopatije, ki so odzivni na zdravljenje, za razliko od tistih, ki na zdravljenje niso odzivni.

2 PREGLED OBJAV

Od začetka devetdesetih let, ko so pri glisti *Caenorhabditis elegans* odkrili kratke regulatorne nekodirajoče molekule RNA, se je pogled na delovanje celic bistveno spremenil. Odkritje je povzročilo razmah raziskav, ki so močno poglobila znanje o celičnem delovanju. V času prvega odkritja miRNA smo že vedeli, da se v serumu pojavljajo nukleinske kisline in da se iz celic sproščata DNA in RNA, ki se prenašata po krvi, prav tako smo vedeli, da preko nukleinskih kislin poteka komunikacija med celicami. Nismo pa še vedeli, kako pomembno vlogo pri delovanju celic in medcelični komunikaciji imajo molekule mikro RNA, ki nadzorujejo delovanje več kot 60 % genov. Študije so pokazale, da naj bi miRNA sodelovale pri skoraj vseh procesih, ki tečejo znotraj celic (Ha in Kim, 2014). Danes je na temo mikro RNA napisanih že več kot 34.000 člankov (Web of Science, 2015), razvite so bile nove molekularne tehnike in globoko izpopolnjen način razmišljanja o naših najmanjših gradbenih enotah – celicah.

Kardiovaskularne bolezni so glavni vzrok smrti po celem svetu – letno največ ljudi umre zaradi kardiovaskularnih bolezni. V letu 2012 je zaradi srčnih obolenj umrlo kar 17,5 milijonov ljudi po celem svetu (WHO, 2015). S trenutnimi kliničnimi diagnostičnimi metodami ne moremo dokazati začetnih znakov kardiovaskularnega obolenja, zaradi česar lahko zdravniki začnejo s terapijo šele, ko ti postanejo klinično evidentni. S tem se zmanjša učinkovitost zdravljenja, podaljša čas zdravljenja in zmanjša kakovost bolnikovega življenja. Zato je iznajdba novih metod, s katerimi bi lahko prisotnost bolezni dokazali še pred pojavom kliničnih znakov, idealna rešitev. Tu pridejo v ospredje molekule miRNA (Vrtovec in Poglajen, 2011), katerih uporabo kot biološke označevalce, njihove lastnosti in delovanje bom opisala v svoji magistrski nalogi.

2.1 LASTNOSTI MOLEKUL miRNA

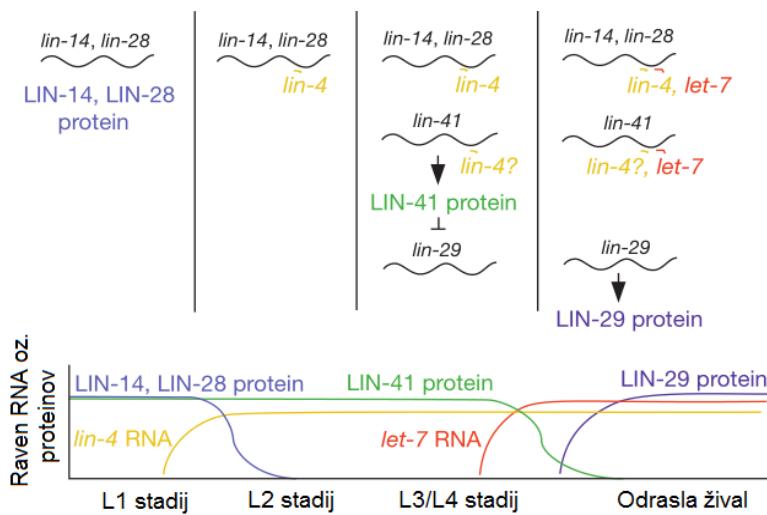
Molekule mikro RNA so endogene nekodirajoče enoverižne ribonukleinske kisline, dolge približno 22 nukleotidov (nt). Sodijo v nov razred genskih regulatorjev, ki jih najdemo pri rastlinah, živalih in nekaterih virusih. Z vezavo na tarčne elemente vplivajo na utišanje genov, največkrat post-transkripcijsko. Pri človeku najdemo molekule miRNA tako znotraj, kot tudi izven celic v številnih telesnih tekočinah, kot so kri, slina, urin, mleko, semenska plazma, solze in amnijska tekočina. miRNA se izven celic povežejo z lipidi, lipoproteinskimi kompleksi (npr. eksosomi, mikrovezikli, apoptotska telesa), ali pa tvorijo komplekse protein-miRNA, kar prepreči njihovo razgradnjo z RNazami. Spremembe v sestavi miRNA so lahko povezane z različnimi patološkimi stanji, zato lahko takšne miRNA uporabimo kot informativne biološke označevalce za prisotnost ali napovedovanje poteka bolezni (Buschati in Cohen, 2007; Taylor in Gercel-Taylor, 2013).

Molekule miRNA poimenujemo glede na organizem, vrsto molekule miRNA, iz katerega dela prekurzorja nastanejo, podeljena številka pa predstavlja zaporedno številko odkritja. Tako npr. v molekuli miRNA hsa-miR-208 prve tri črke predstavljajo organizem (hsa – *Homo sapiens*; poznamo še dme – *Drosophila melanogaster*, mmu – *Mus musculus*, cel – *Caenorhabditis elegans*, itd.), druge tri črke (miR) predstavljajo zrelo molekulo miRNA. Zapis z malimi črkami (npr. mir-208) predstavlja pre-miRNA in pri-miRNA obliko, zapis z velikimi črkami (npr. MIR-208) pa predstavlja gen. Visoko sorodnost zrelih molekul miRNA predstavljajo dodane posamezne črke, npr. hsa-miR-121a ter hsa-miR-121b. Označbi 5p in 3p na koncu imena označujejo, da obe molekuli miRNA nastaneta iz enakega prekurzorja (lasnice), vendar ena molekula nastane iz verige bliže 5' koncu in druga iz verige, ki je bliže 3' koncu prekurzorja (npr. hsa-miR-204-5p in hsa-miR-204-3p). Izjemo pri poimenovanju predstavljenata molekuli let-7 in lin-4, katerih imena smo obdržali iz zgodovinskih razlogov (Ambros in sod., 2003; Griffiths-Jones in sod., 2006).

2.2 ODKRITJE IN ZGODOVINA MOLEKUL miRNA

Molekule miRNA so prvič odkrili leta 1993 pri glisti *C. elegans*, ko so proučevali njene genetske poti razvoja. Heterokroni geni pri glisti delujejo kaskadno v različnih obdobjih rasti in so časovno nadzorovani, da določijo časovno razporeditev razvojnih dogodkov. Mutacije v teh genih lahko povzročijo, da so dogodki specifični za določeno obdobje razvoja izpuščeni ali ponovljeni. Pojavi se lahko prezgodnji razvoj, ko se začnejo pozne razvojne stopnje v zgodnjem larvnem obdobju oziroma zapoznel razvoj, kjer pride do podaljšanih zgodnjih razvojnih stopenj. Za pravilno rast so zato potrebni specifični geni in njihova ustrezna časovna regulacija (Lee in sod., 1993).

Pri proučevanju razvoja *C. elegans* so Rosalind C. Lee in sodelavci (1993) opazili, da imata velik pomen gena *lin-4* in *lin-14*. Oba sta nujno potrebna za časovno uravnavanje raznolikega post-embrionalnega razvoja glište *C. elegans*. Gen *lin-4* je aktivен v zgodnjem razvoju in skrbi za časovno uravnavanje dogodkov, specifičnih za larvo. Ob mutaciji tega gena pride do podaljšanih oz. ponovljenih stadijev razvoja, specifičnih za obdobje L1 v kasnejša razvojna obdobja L2 do L4. Ti razvojni vzorci vodijo do pomanjkanja odraslih struktur, kot sta odrasla kutikula in vulva. Gen *lin-14* je zadolžen za nastanek proteina LIN-14, ki je izjemno pomemben za zgodnjo stopnjo L1 razvoja larve. Protein zaznamo samo v zgodnji fazi L1, v pozni fazi L1 oziroma kasneje (L2-L4) ni več zaznaven. Mutacije *lin-14* pripeljejo do preskoka stopnje L1 direktno na stopnje razvoja L2, L3 in L4. Pri prevelikem izražanju gena *lin-14* pa prihaja do zakasnjenih zgodnjih razvojnih stopenj. Torej je pri razvoju visoka aktivnost *lin-14* pomembna v zgodnjih razvojnih stopnjah L1, nizka aktivnost *lin-14* pa v kasnejših stopnjah razvoja L2-L4 (Lee in sod., 1993).



Slika 1: Prikaz delovanja heterokronih genov in njihovo uravnavanje post-embrionalnega razvoja gliste *C. elegans* (Reinhart in sod., 2000).

Ker so raziskovalci ugotovili, da je število prepisov *lin-14* med razvojem konstantno, so se pojavila vprašanja, ali prihaja do negativne post-transkripcijske regulacije. Z opazovanjem fenotipov mutant so uspeli dokazati, da mutacija gena *lin-4* pripelje do nendaravno visokih koncentracij proteina LIN-14. To je sprožilo ugotavljanja, ali je gen *lin-4* vpletен pri izražanju gena *lin-14* oz. nastanku proteina LIN-14. Dokazali so, da lahko zmanjšanje koncentracije proteina LIN-14 dosežemo le ob prisotnosti 3' UTR konca molekule mRNA *lin-14* v *cis* orientaciji ter s prisotnim aktivnim genom *lin-4* v *trans* orientaciji. Rezultati so pripeljali do zaključka, da produkti gena *lin-4* direktno oz. indirektno vplivajo na translacijo mRNA *lin-14*. Zanimanje, kaj je produkt gena *lin-4*, ki vpliva na proces izražanja, je popeljalo raziskovalce v svet neodkritih molekul miRNA. Z genskim mapiranjem in metodo kromosomskega sprehajanja so uspeli identificirati produkt gena *lin-4*. Le-ta ni bil protein, kot bi pričakovali, temveč dva 22 in 62 nukleotidov dolga prepisa, ki sta bila komplementarna ponavlajočim zaporedjem na 3' UTR koncu *lin-14*. Nastal je nov model inhibicije izražanja genov – majhne molekule RNA lahko s komplementarnim parjenjem vplivajo na translacijo tarčne mRNA. Te sodijo v novo skupino regulatornih molekul, ki pa jih s standardnimi tehnikami težko odkrijemo in identificiramo, zato so bile do tedaj neodkrite (Lee in sod., 1993). Da bi odkrili še druge molekule miRNA, so raziskovalci s pomočjo bioinformatike določili gene, ki so kazali enake lastnosti, kot do sedaj poznane miRNA – (i) gene, ki imajo kot produkt prekurzor RNA z zanko, dolg približno 65 nukleotidov, (ii) katerega zorenje pripelje do 22 nukleotidov dolge zrele RNA, (iii) gene, ki so locirani v protein nekodirajočih regijah in (iv) gene z visoko homologijo zaporedij DNA z drugimi sorodnimi vrstami *C. elegans*. Odkrite molekule miRNA, kot so *let-7*, *mir-1*, *mir-2*, so zaznamovale začetek nadaljnjih raziskav miRNA pri drugih živalih in človeku (Lee in Ambros, 2001).

Čeprav so odkrili miRNA že leta 1993, so njihovo prisotnost pri vretenčarjih dokazali šele v letu 2001, v rastlinah pa leto dni kasneje (Lagos Quintana in sod., 2001; Reinhart in sod., 2002). Z izolacijo in identifikacijo miRNA iz različnih organizmov so ugotovili, da so nekatere miRNA vrstno specifične, nekatere pa se na primer pojavljajo tako pri *C. elegans*, *D. melanogaster* in človeku. Takšne miRNA so evolucijsko ohranjene in nastanejo iz prepisa ortolognih genov, njihov razvoj je potekal skupaj s tarčnimi molekulami mRNA. Takšne molekule miRNA imajo zato lahko še vedno podobne oziroma enake razvojne ali fiziološke vloge v različnih taksonih (Lee in Ambros, 2001).

Leta 2008 so Chim in sodelavci odkrili, da se miRNA pojavljajo tudi izven celic v krvi – odkrili so placentalne miRNA v serumu nosečnic (Chim in sod., 2008). Prav tako so v približno istem času Lawrie in sodelavci (2008) zaznali miRNA v serumu bolnikov z limfomom. Nato so Hunter in sodelavci (2008) ugotovili, da se miRNA v krvi nahajajo znotraj različnih mikrodelcev, da so zavarovane pred delovanjem RNaz. Kmalu za tem so raziskovalci našli miRNA tudi v drugih telesnih tekočinah, kot so slina, urin, solze in cerebrospinalna tekočina (Weber in sod., 2010). Z razvojem novih bolj občutljivih in natančnih metod za detekcijo kratkih nukleinskih kislin, je raziskovalcem uspelo poleg miRNA odkriti še veliko drugih krajiših in daljših molekul RNA, ki sodijo v skupino siRNA in piRNA (Taylor in Gercel-Taylor, 2013).

V tem trenutku je pri človeku znanih približno 2.588 različnih miRNA, vseh do sedaj odkritih zrelih molekul miRNA v živalih, rastlinah in virusih (skupaj v 223 različnih vrstah) pa je 35.828 (miRBASE, 2014).

2.3 BIOGENEZA miRNA PRI SESALCIH

miRNA iz različnih delov genoma sesalcev prepisuje RNA-polimeraza II, redko RNA-polimeraza III. Njihova transkripcija teče v treh različnih regijah:

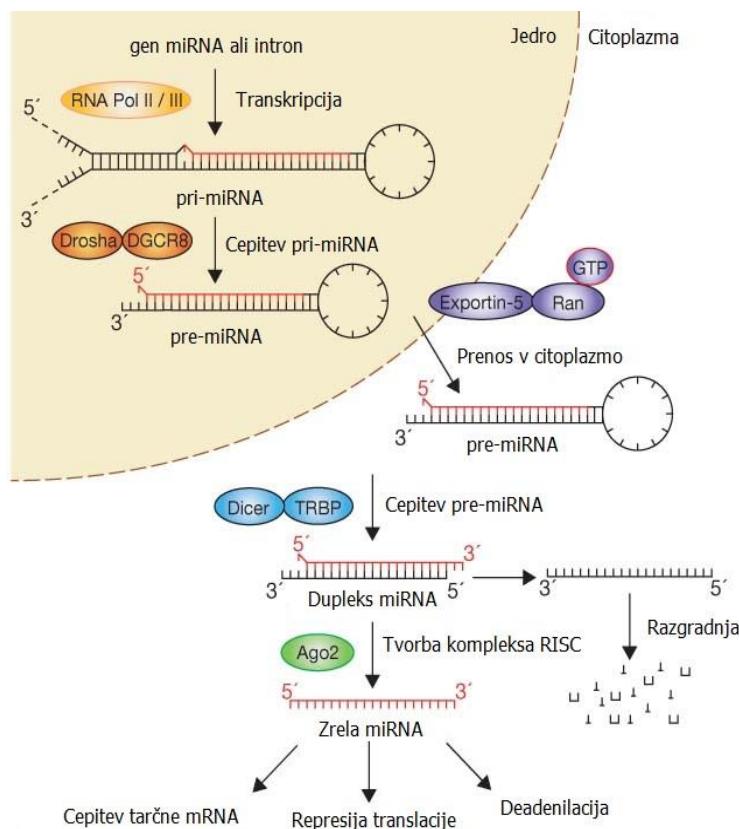
- v intronskih regijah genoma,
- v eksonskih regijah genoma ali
- v intergenskih regijah genoma (O'Carroll in Schaefer, 2013).

Ob prepisu nastanejo daljši, 500 do 3000 baznih parov dolgi prekurzorji miRNA, ki imajo strukturo lasnice – imenujemo jih pri-miRNA. Tipična molekula pri-miRNA je zgrajena iz 33 baznih parov dolgega steba, terminalne zanke ter enoverižnih končnih repov, kjer je na 5' koncu metilirana kapa, na 3' koncu pa poli-A rep (Bushati in Cohen, 2007). V jedru celice se pri-miRNA procesirajo v pre-miRNA, za kar sta zadolžena encima ribonukleaza tipa III Drosha in njen kofaktor DGCR8, ki skupaj tvorita mikroprocesorski kompleks. Za vezavo mikroprocesorskega kompleksa so nujni enoverižni repi ter točka spoja dveh verig

RNA. DGCR8 ima vezavno domeno za dvoverižno RNA (dsRNA), imenovano dsRBD in se veže na dvoverižno pri-miRNA. Drosha pa se nato poveže z dsRNA tako, da je njen aktivno mesto oz. katalitični center ~11 bp oddaljeno od stičišča dveh verig RNA (slika 2). Po cepitvi nastane molekula pre-miRNA, ki ima na 3' koncu za dva bazna para dolg štrleči konec, na 5' koncu pa fosfatno skupino. Možno je, da pride do vezave mikropresorskega kompleksa na strani zanke – tudi v tem primeru pride do cepitve verig ~11 bp stran od stičišča, vendar je to manj verjetno, saj se v tem delu pri-miRNA pojavlja notranje izbokline ter nepopolna komplementarnost dveh verig, kar zmanjša možnost vezave Droshe in proteina DGCR8 (Gregory in sod., 2005; Siomi H in Siomi MC, 2009; O'Carroll in Schaefer, 2013).

Po cepitvi nastanejo 65-70 baznih parov dolge molekule pre-miRNA. Te so še vedno v obliki lasnice in potujejo iz jedra v citosol s karioferinom iz družine proteinov Eksportin-5 (Exp-5). Prenos je odvisen od mehanizma Ran-GTP (Bushati in Cohen, 2007). Receptor Exp-5 se v jedru specifično veže na protein RAN-GTP (RAS proteinu soroden jedrni protein z vezanim GTP-jem), prav tako pa specifično reagira z dvoverižnimi molekulami RNA, daljšimi od 14 baznih parov in s 3' štrlečimi konci. Po nastanku kompleksa pre-miRNA/Exp-5/RAN-GTP se le-ta veže na nukleoporine in se skozi jedrno poro prenese v citoplazmo. Encim RAN-GTP (z GTPazno aktivnostjo) povzroči hidrolizo molekule GTP (produkt je RAN-GDP), ta pa sprostitev pre-miRNA v citoplazmo (Bohsack in sod., 2004; Güttler in Görlich, 2011).

V citosolu se pre-miRNA poveže z encimom Dicer (DCL1, encim RNaza III), proteini Argonaute (Ago) in proteini TRBP (angl. *TAR RNA binding protein*), ki skupaj tvorijo t.i. nakladalni kompleks RISC (angl. *RISC loading kompleks* ali *RLC*). Znotraj RISC Dicer odcepi zanko lasnice in nastane približno 22 nukleotidov dolg dvoverižni dupleks miRNA, na katerem sta 3' štrleča konca, dolga dva bazna para. Dupleks miRNA se poveže s proteini Ago, ki razvijejo obe verigi, sledi od proteinov TRBP odvisna vstavitev v kompleks RISC. Vezava miRNA v kompleks RISC posredujeta domena PAZ proteina Ago, ki se poveže s 3' koncem miRNA in domena MID proteina Ago, ki se poveže s 5' koncem miRNA. Katera veriga dvoverižne pre-miRNA se bo vgradila v kompleks RISC je odvisno od tega, na katero verigo se vežejo proteini Ago, kar pa je odvisno od termodinamske stabilnosti verige na 5' koncu. Veriga z manj termodinamično stabilnim 5' koncem se vgradi v kompleks RISC (Siomi H in Siomi MC, 2009). V kompleks RISC se poleg proteinov Ago in miRNA vežejo tudi drugi proteini, na primer helikaza MOV10, p72 ali p68 (Winter in sod., 2009), protein eIF6 in drugi (Chendrimada in sod., 2007). Ena veriga dupleksa miRNA je zrela miRNA, ki s pomočjo komplementarnosti z mRNA prepozna tarčno mesto, druga veriga pa se razgradi (Siomi H in Siomi MC, 2009).



Slika 2: Prikaz biogeneze miRNA ter njen vpliv na mRNA (Winter in sod., 2009).

2.4 DELOVANJE miRNA

Zrele molekule miRNA se komplementarno vežejo največkrat na 3' konec mRNA in sicer na neprevedljivo regijo, ki se nahaja takoj za stop kodonom (3' UTR, angl. *three prime untranslated region*), možna je vezava tudi na 5' koncu ter na kodirajočih regijah mRNA. Z vezavo na ta mesta miRNA regulira gensko ekspresijo tako, da povzroči razpad tarčne mRNA ali zavira translacijo. Od skladnosti miRNA in mRNA je odvisno, kakšno bo post-transkripcijsko zaviranje translacije (O'Carroll in Schaefer, 2013).

Za uspešno vezavo miRNA na tarčno mRNA je najpomembnejših prvih 2 do 8 baz na 5' koncu miRNA, saj te določijo tarčo vezave in se popolno vežejo z mRNA. Popolna komplementarnost med celotno verigo miRNA in mRNA vodi v endonukleolitično cepitev s proteinimi Ago2 oz. njihovo domeno PIWI, ki ima RNazi H podobno endonukleazno aktivnost in pride do popolnega uničenja mRNA (Siomi H in Siomi MC, 2009; Krol in sod., 2010). Takšen način razgradnje mRNA se v organizmih pojavlja redko, saj se večinoma ne pojavlja 100 % skladnost v območju 10. in 11. baznega para. Zaradi te neskladnosti pride do drugečnega načina zaviranja genske ekspresije, tako da se destabilizira mRNA ter zavre njena translacija. Destabilizacija mRNA poteka z deadenilacijo s proteinom GW182 in nato odstranjevanjem metilirane kape na 5' koncu

mRNA. Protein GW182 se z amino koncem poveže s proteinom Ago2, s karboksilnim koncem pa s proteinom PABP (poli(A) vezavni protein). Z vezavo je omogočena priključitev deadenilaz CCR4 in CAF1. Proces preprečitve translacije naj bi tekel na dva načina in sicer s preprečitvijo iniciacije ter elongacije translacije, zaradi interakcij med Ago2 in drugimi proteini (npr. Dcp1/Dcp2, RCK/p54 helikaza), katerih vezava prepreči vezavo ribosomov na mRNA in s tem translacijo (Bushati in Cohen, 2007; Krol in sod., 2010; O'Carroll in Schaefer, 2013). Ker se tarčne mRNA v celici nahajajo v povezavi z nukleoproteini, je torej dostopnost mRNA odvisna tudi od sodelovanja miRNA oz. kompleksa RISC s temi proteini. Ti vplivajo na samo mesto vezave miRNA ter na sam potek post-transkripcijske regulacije. Odvisno od vrste proteina, ki sodeluje z miRNA, pride do različne regulacije, torej cepitve mRNA, preprečitve translacije ali pospešitve razgradnje mRNA (Siomi H in Siomi MC, 2009). Neprevedene mRNA se shranjujejo v t.i. P-telescih. Ta služijo kot skladišče za neprevedene mRNA ali za njihovo razgradnjo. Znotraj P-telesc najdemo proteine, ki so zadolženi za deadenilacijo, odstranjevanje metilirane kape ter razgradnjo mRNA. P-telesca so dinamične strukture, saj proteini in molekule mRNA v njih stalno vstopajo in izstopajo, posledično se spreminja velikost in tudi število P-telesc (Krol in sod., 2010).

Posamezna molekula miRNA je pomemben regulatorni dejavnik, saj lahko vpliva na ekspresijo več sto različnih genov. Posamezna miRNA se lahko veže na različne molekule mRNA in različne molekule miRNA se lahko vežejo na enako mRNA (D'Alessandra in sod., 2010). Molekule miRNA ne delujejo enako v vseh tkivih in celicah – določena miRNA lahko nastaja v neki celici v velikih količinah, v drugi pa v manjših oz. sploh ne nastane. miRNA naj bi vplivale na kar 60 % vseh protein kodirajočih genov v celici. Sodelujejo pri najpomembnejših celičnih procesih, kot so apoptoza, nekroza ter skoraj vse glavne celične funkcije, npr. proliferacija, diferenciacija, preživetje celic. Njihova pomembna (pato)fiziološka vloga se kaže z njihovo evolucijsko ohranitvijo. miRNA imajo pomemben vpliv na različne bolezni, vplivi pa so lahko tako pozitivni kot negativni (Cheng in sod., 2010; Krol in sod., 2010; Reid in sod., 2011; Ha in Kim, 2014).

2.5 CIRKULIRAJOČE miRNA

Cirkulirajoče miRNA (c-miRNA) so tiste miRNA, ki jih celice s sekrecijo izločajo. Zaradi prisotnosti RNaz v krvi, ki imajo visoko sposobnost razgradnje ribonukleinskih kislin (molekule RNA razgradijo v nekaj sekundah), proste miRNA v krvi ne morejo obstajati in potovati po telesu. Pred razpadom jih zato ščitijo različne biološke molekule in mikrovezikli. V telesnih tekočinah so miRNA prisotne v različnih oblikah – (i) nevezane, kot proste miRNA (neobstojne), (ii) vezane s proteini Ago2, (iii) vezane z vezikli (eksosomi, mikrovezikli) ali (iv) vezane z lipoproteini visoke gostote (HDL). Določene miRNA so lahko zaščitene izključno s proteini, druge pa so vstavljeni v eksosome,

mikrovezikel ali apoptotska telesca. Znanstveniki sklepajo, da je od načina zaščite molekul miRNA odvisna njihova vloga v telesu oz. katere celice so njihova tarča. Ker so c-miRNA v krvi obstojne in jih lahko zaznamo z različnimi preiskovalnimi metodami, jih lahko uporabimo kot biološke označevalce za nekatere bolezni (Creemers in sod., 2012; Taylor in Gercel-Taylor, 2013).

2.5.1 miRNA v membranskih veziklih

Med membranske vezikle sodijo eksosomi, mikrovezikli ter apoptotska telesca. Med seboj se ločijo po velikosti, gostoti in načinu nastanka. Eksosomi (veliki 30-100 nm) nastanejo iz endosoma in se izločijo iz celic, ko se multivezikularno telesce zlige s plazemske membrano. Mikrovezikli (veliki 0,1-1 µm) nastanejo iz plazemske membrane celic z brstenjem, apoptotska telesca (velika 1-4 µm) pa nastanejo med programirano celično smrto in so produkti apoptoze. Eksosomi in mikrovezikli se izločajo iz skoraj vseh tipov celic. Izločajo se med normalnimi in bolezenskimi stanji celic ter poleg miRNA vsebujejo tudi druge nukleinske kisline, proteine in signalne molekule (Turchinovich in sod., 2012). V membranskih veziklih je miRNA zaščiten pred razpadom in tako kroži po krvnem obtoku. Najverjetnejše je na ta način vpletena v izmenjavo epigenetskih informacij med celicami (Etheridge in sod., 2013). miRNA naj bi se v vezikle izločale selektivno – celice specifično izbirajo katere miRNA se bodo izločile in katere zadržale znotraj celic (Pigati in sod., 2010).

Odkritje cirkulirajočih molekul miRNA kaže na njihovo vlogo pri bioloških funkcijah tudi izven celic in pri medcelični komunikaciji. Raziskave kažejo, da ta najverjetnejše poteka z vstavljivo miRNA v eksosome ali mikrovezikle, ki delujejo kot signalni kompleksi. Proteini membrane veziklov se povežejo s površinskimi receptorji tarčnih celic, čemur sledi fuzija ali internalizacija, kar sproži znotrajcelično stimulacijo zaradi sprostitev vsebine mikroveziklov v citosol (Taylor in Gercel-Taylor, 2013). Eksosomi lahko v celice vstopajo z endocitozo, sledi zlitje z endosomi ter kasneje izpust vsebine v citosol, ali pa zlitje z lizosomi. Možen je vstop v celice tudi z zlitjem s celično membrano in izlitjem vsebine direktno v citosol (Gupta in sod., 2010). Komunikacijo med celicami z eksosomi so dokazali Valadi in sodelavci leta 2007, kjer so s pomočjo mišjih in človeških celičnih linij sledili označenim molekulam RNA iz eksosomov mastocitov ter ugotovili, da se eksosomi prenesejo po telesu do drugih mastocitov, v katerih je sledila translacija označenih molekul mRNA. Komunikacija se je vrnila samo med mastociti in ne med celicami CD4⁺, kar je dokaz specifične kontrolirane komunikacijske poti (Valadi in sod., 2007). Yuan in sodelavci (2009) so pri miših dokazali prenos miRNA iz zarodnih matičnih celic do zarodnih fibroblastov. miRNA so bile znotraj mikroveziklov v visokem številu in z njimi naj bi tekla komunikacija.

2.5.2 miRNA znotraj proteinskih kompleksov

Nekatere raziskave kažejo, da naj bi bila večina cirkulirajočih miRNA vezanih na proteinske komplekse in ne znotraj veziklov. Znano je, da se miRNA poveže s proteini Ago med biosintezo, zato ni presenetljivo, da se lahko miRNA zavarujejo z njimi, poleg tega so proteini Ago zelo stabilni v okolju z visoko koncentracijo nukleaz in proteaz (Turchinovich in sod., 2012).

2.5.3 miRNA v povezavi s HDL in LDL

Delci HDL so veliki v povprečju med 8 in 12 nm in vsebujejo lipide, kot je na primer fosfatidilholin, za katerega je znano, da lahko tvori stabilne komplekse z nukleinskimi kislinami. Poleg tega vsebujejo tudi apoliprotein AI, ki se pri živalskih modelih uporablja za sistemsko dostavo siRNA in morda se enak način uporablja za prenos miRNA pri človeku. Kako se molekule miRNA povežejo s HDL še ni povsem znano, teorija pravi, da se HDL enostavno veže na zunajcelično miRNA z divalentnim kationskim mostom. Primer takšne miRNA, ki naj bi se povezovala s HDL, je miR-223, čeprav se 92 % miR-223 v telesu pojavlja znotraj mikroveziklov in v povezavi s proteini (Vickers in sod., 2011; Creemers in sod., 2012; Turchinovich in sod., 2013).

Delci LDL so večji od HDL in merijo približno 22 nm. Imajo podobne fizikalne in kemične lastnosti kot HDL, vendar so iz drugačnih proteinov, tudi proces nastanka LDL je drugačen. V delcih LDL so odkrili molekule miRNA, vendar je bil profil miRNA v delcih LDL bolj podoben profilu eksosomov, kot delcev HDL (Vickers in sod., 2011).

2.6 METODE DETEKCIJE miRNA

Obstaja več načinov izolacije, kvantifikacije in identifikacije cirkulirajoče miRNA (c-miRNA) iz različnih vzorcev. Molekule miRNA najlažje zaznamo v plazmi ali serumu oz. izoliranih eksosomih in drugih mikroveziklih. Uporaba seruma in plazme za izolacijo miRNA je primerana zato, ker se vzorec pridobi na enostaven in hiter način, poseg ni invaziven za bolnika. Izolacija iz mikroveziklov oz. eksosomov potrebuje kompleksnejšo predpripravo vzorca, dobimo pa bolj specifične populacije mikro RNA, kar nam da bolj natančne rezultate, še posebej v povezavi z različnimi boleznimi (Reid in sod., 2011).

Da lahko zagotovimo čim bolj natančne in primerljive rezultate je pomembno, da pazimo na številne dejavnike med odvzemom, shranjevanjem in obdelavo vzorca. Izjemno pomembno je, da so vzorci pridobljeni na enak način, torej z enakimi medicinskim pripomočki, shranjeni pri enaki temperaturi, odmrznjeni po enakem postopku in po odtalitvi obdelani v enakem časovnem intervalu ter na enak način. Izjemnega pomena je

preprečitev hemolize, saj le ta močno vpliva na končne rezultate koncentracije in prisotnosti specifičnih molekul miRNA (Kirschner in sod., 2013). Farina in sodelavci (2014) so v študiji dokazali, da do največjih razlik pri rezultatih prihaja ravno zaradi različnega ravnjanja z vzorci, saj to vpliva na različno stabilnost molekul miRNA. Med obdelavo vzorca je potrebno zagotoviti okolje brez RNaz. Najboljše rezultate dobimo, če vse površine in pripomočke, kot so npr. pipete in stojala, steriliziramo in da delo poteka v laminarju, namenjenem za delo z nukleinskimi kislinami. Tudi pipetni nastavki in mikrocentrifugirke morajo biti proste nukleaz. Pomembno je, da uporabljamo reagente, ki imajo certifikat, da ne vsebujejo RNaz (McAlexander in sod., 2013).

Najpogosteje uporabljena in najbolj občutljiva metoda za kvantifikacijo miRNA je kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. *real time quantitative polymerase chain reaction, qPCR*). Poleg omenjene metode sta najbolj v uporabi še sekvenciranje ter metoda mikromrež. Vsaka metoda ima svoje prednosti in slabosti. Kvantitativna PCR se najbolj pogosto uporablja zaradi hitrosti, visoke občutljivosti in zaradi omejenega števila znanih molekul miRNA. Pomanjkljivosti predstavljalata specifičnost in različna učinkovitost amplifikacije pripravljenih začetnih oligonukleotidov. Mikromreže imajo pri analizi miRNA dve pomanjkljivosti – nizke koncentracije molekul miRNA ter visoka podobnost zaporedij. Pri sekvenciranju naslednje generacije (angl. *NGS*) pa kratka in visoko podobna zaporedja ne predstavljajo težav, poleg tega metoda ni odvisna od predhodno pripravljenih začetnih oligonukleotidov, tako da lahko identificiramo nova zaporedja miRNA. Pomanjkljivost postopka NGS je pristranskost pri pripravi sekvenčnih knjižnic. Kateri postopek poda najnatančnejše rezultate ne moremo zagotovo trditi, saj so rezultati odvisni od več dejavnikov, torej metode dela, vrste vzorca, čistosti vzorca, izbire normalizacijskih genov, itd. (Mestdagh in sod., 2009; Reid in sod., 2011).

2.6.1 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Prvi korak kvantifikacije miRNA je sinteza komplementarne DNA (cDNA) s pomočjo reverzne transkriptaze. Ta ima aktivnost RNaze H, kar pomeni, da je zmožna razgradnje RNA v dupleksu DNA-RNA, rezultat česar je komplementarna veriga DNA. Ker je reverzna transkriptaza inhibitorna za PCR, mora biti njena koncentracija čim nižja, vendar še vedno dovolj velika, da opravi uspešno sintezo cDNA. Na začetku sinteze cDNA je potrebno dodati poli-A rep na 3' konec verige miRNA, kar omogoči prileganje univerzalnih začetnih oligonukleotidov poli-T. S postopkom dodajanja poli-A repa (s pomočjo polimeraze Poly(A) bakterije *Escherichia coli*) povečamo specifičnost vezave in natančnost metode, saj so molekule miRNA drugače prekratke in bi lahko dobili napačne rezultate. Poleg tega posamezna miRNA redko vsebuje specifično zaporedje, katero bi lahko uporabili za vezavo začetnega oligonukleotida. Metoda je uporabna, kadar moramo

analizirati več različnih molekul miRNA, drugače se pri nizkem številu znanih miRNA s specifičnimi zaporedji lahko uporablja specifične začetne oligonukleotide, možna pa je tudi kombinacija obeh metod (Benes in Castoldi, 2010; Kroh in sod., 2010; Exiqon, 2013b).

Po sintezi cDNA sledi kvantifikacija s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Za še večjo specifičnost qPCR uporabimo začetne oligonukleotide LNA (angl. *Locked nucleic acid*). Glavna struktturna lastnost takšnih oligonukleotidov je metilenski most med O2' in C4' atomom, ki stabilno zaklene ribozo oligonukleotidov v najbolj ugodno N-konformacijo (3' endo, North). Z vezavo takšnih oligonukleotidov ne prihaja do spremicanja med S- (5' endo, South) in N-konformacijo, kar vodi do višje afinitete vezave, višje specifičnosti vezave in višje temperaturne stabilnosti dupleksa. Takšni začetni oligonukleotidi so za kratka zaporedja, kot so miRNA, izjemno uporabni in podajo natančnejše rezultate (Kennedy in sod., 2006; Doessing in Vester, 2011). Zaznavanje koncentracije miRNA v vzorcu poteka s pomočjo posebnih fluorescentnih barvil (npr. barvilo SYBR® Green) oz. posebnih fluorescentnih sond. Posebna fluorescentna barvila so DNA-vezavna barvila in se vežejo z dvostransko DNA. Njihova intenzivnost svetlobe korelira s količino miRNA oz. DNA v vsakem ciklu amplifikacije – torej več pomnoženih nukleinskih kislin, več oddanega signala. Vezava z dvostransko DNA je nespecifična, kar predstavlja negativno stran uporabe tovrstnih barvil, saj se lahko vežejo na nespecifične produkte in dimere začetnih oligonukleotidov. Za preverjanje kakovosti vezave barvila znotraj specifičnih produktov PCR, se zato opravlja analiza temperaturne točke taljenja (angl. *melting point analysis*). S povečevanjem temperature povzročimo razpad dupleksov DNA ter s tem upad fluorescence. Ker je točka taljenja odvisna od dolžine in sestave zaporedja, se različni produkti PCR razcepijo ob različnih temperaturah. Kot rezultat dobimo negativni prvi odvod talilne krivulje po temperaturi, kar nam poda homogenost produktov qPCR (Benes in Castoldi, 2010).

2.6.2 Normalizacija, kvantifikacija in referenčni geni

Da lahko uporabimo miRNA kot biološke označevalce, moramo imeti dovolj občutljive in natančne metode, da jih zaznamo. Z metodami moramo pridobiti takšne rezultate, da jih lahko med seboj primerjamo. Ker je vsak korak postopka povezan z določenimi napakami laboranta ter naprav in ker prihaja do razlik v protokolih, velikokrat primerjava rezultatov ni pravilna. Poleg tega se v raziskavah uporablja različne vzorce (kri, serum, plazma, mikrovezikli) z različnimi lastnostmi – sem sodijo predvsem različne koncentracije miRNA, kar ima velik vpliv na kvantifikacijo. Na sam donos miRNA med ekstrakcijo ima velik vpliv tudi količina proteinov v krvi – ti otežijo ekstrakcijske postopke, zaradi česar so potrebne modifikacije v protokolu. Količine proteinov in molekul miRNA se lahko

razlikujejo od posameznika do posameznika, še posebej v povezavi z določenimi bolezenskimi stanji (Reid in sod., 2011).

Zaradi številnih variabilnosti, na katere bolj ali manj ne moremo vplivati, se poslužujemo metode analize sintetičnih molekul miRNA ter normalizacije, ki razločita med eksperimentalno vnesenimi variacijami in relevantnimi biološkimi spremembami.

Za določitev mesta eksperimentalno vnesenih variacij in preverjanje kakovosti postopkov se uporablja sintetične molekule miRNA. Te dodamo vzorcu med izolacijo in sintezo cDNA, na koncu pa primerjamo izražanje pri vseh vzorcih med seboj. Takšne sintetične miRNA, ki prikažejo razlike med vzorci intra- in interindividualno, imenujemo molekule »Spike-in«. Sintetične molekule miRNA se ne uporablja za normalizacijo rezultatov, saj so to eksogene in ne endogene kontrole.

Pri normalizaciji rezultatov kvantitativne verižne reakcije s polimerazo je zlati standard uporaba referenčnih genov. Za razliko od celične RNA, ki se lahko direktno primerja z endogenimi vzdrževalnimi geni, imajo cirkulirajoče miRNA malo specifičnih predstavnikov, ki se izven celic pri vseh pojavljajo v enakih količinah in bi jih lahko uporabili za primerjavo izražanja. Da se lahko zanesemo na podatke, potrebujemo invariantne endogene kontrole oz. referenčne gene, ki jih uporabimo za normalizacijo. Pred vsako analizo rezultatov je zato potrebno določiti najustreznejše referenčne gene za preizkus. S tem zmanjšamo variacijo med vzorci, določimo natančnost in učinkovitost metode ter določimo mesto, kjer je prišlo do napake (Farina in sod., 2014; Exiqon, 2013b). Idealni referenčni geni sodijo v različne funkcionalne razrede, saj se tako zmanjša možnost skupne regulacije. Večkrat je težko izbrati en gen, zato se večinoma odločimo za več genov, ki se v proučevanih tkivih, celicah, izvencelični tekočini ter med posamezniki enako izražajo (Mestdagh in sod., 2009; Reid in sod., 2011). Možna strategija normalizacije je tudi uporaba povprečja in kvantilna normalizacija (angl. *global mean and quartile normalisation*), ki sta zelo primerni za veliko količino podatkov. Pred analizo rezultatov, je potrebno najprej določiti najustreznejši način normalizacije, saj so za različne študije primerni različni načini (Farina in sod., 2014).

Analiza cirkulirajočih miRNA še vedno predstavlja izziv v biomedicinskih raziskavah. Potrebujemo diagnostične metode, s katerimi lahko zaznamo miRNA v plazmi in serumu s takšno občutljivostjo in natančnostjo, da so rezultati klinično uporabni. Dosledni in ponovljivi protokoli za izolacijo in detekcijo cirkulirajočih miRNA so še vedno dokaj velik problem; zaradi nizke koncentracije miRNA v vzorcih, pomanjkanja kvantifikacijskih metod, ustreznih endogenih kontrol oz. referenčnih genov, ustrezne kontrole kvalitete vzorcev in postopkov. Poleg tega lastnosti miRNA, kot so kratka zaporedja, raznolika vsebnost parov GC (kar vpliva na različne Tm dupleksov), pomanjkanje specifičnih zaporedij, ki bi olajšale selektivno izolacijo (npr. poli-A repov), prisotnost miRNA v treh oblikah (pri-miRNA, pre-miRNA, zrela miRNA) ter razlikovanje med različnimi miRNA v majhnem številu nukleotidov (miRNA znotraj posamezne družine se lahko razlikujejo v

samo enem nukleotidu), ne pripomorejo k lažji analizi. Zato je konstantno iskanje novih metod, novih načinov s katerimi bi zgornje težave odpravili, ključno, da pridobimo klinično pomembne ugotovitve (Benes in Castoldi, 2010; Kroh in sod., 2010).

2.7 miRNA KOT BIOLOŠKI OZNAČEVALCI

Lastnosti idealnega biološkega označevalca so, da:

- (i) lahko vzorec pridobimo na lahek in neinvaziven način,
- (ii) omogoča občutljivo zaznavo,
- (iii) ga zaznamo hitro in natančno,
- (iv) razlikuje med različnimi bolezenskimi stanji in
- (v) ima v vzorcu dolg razpolovni čas (Creemers in sod., 2012).

Molekule miRNA imajo velik potencial kot klinični biološki označevalci, saj bi lahko rekli, da za njih velja večina zgoraj omenjenih lastnosti. Odvzem krvi je enostaven in za bolnika neinvaziven, miRNA lahko z današnjimi metodami zaznamo z visoko specifičnostjo in občutljivostjo, tudi časovno je celoten postopek identifikacije relativno kratek. Prav tako so dokazali, da se profili miRNA razlikujejo med zdravimi in bolezenskimi stanji (Cheng in sod., 2010; Reid in sod., 2011). V serumu in plazmi so miRNA stabilne pri sobni temperaturi, zamrzovanju, večkratnih ciklih zamrzovanja in odtajanja, po shranjevanju vzorcev dlje časa, pri segrevanju vzorca ter pri nizki in visoki pH vrednosti (Reid in sod., 2011). Vseeno je delo z miRNA težko, saj je bolezensko stanje včasih težko vključiti v laboratorijske raziskave, če ne poznamo profilov miRNA zdravih oseb. Poleg tega prihaja zaradi različnega ravnjanja z vzorci in nezavednih napak laboranta ter naprav do razlik, ki nam podajo napačne ali neprimerljive rezultate (Cheng in sod., 2010; Fichtlscherer in sod., 2011).

2.7.1 miRNA in kardiovaskularna obolenja

Z odkritjem vloge cirkulirajočih in tkivnih miRNA, se je število raziskav v smeri ugotavljanja njihove povezave z boleznimi močno povečalo, še posebej na področju kardiovaskularnih in rakavih obolenj. V številnih študijah navajajo specifične miRNA, ki bi jih lahko v ne tako daljni prihodnosti rutinsko uporabljali za zgodnje odkrivanje bolezenskih stanj (Gupta in sod., 2010). Nekaj rezultatov takšnih študij je navedenih v preglednici 1.

Preglednica 1: Prikaz rezultatov različnih študij, s katerimi so dokazali povezavo med miRNA in različnimi kardiovaskularnimi obolenji.

Bolezen	Zmanjšana raven miRNA	Povečana raven miRNA	Vir
Koronarna bolezen srca	miR-155, miR-199a, miR-145, miR-126, miR-17, miR-92a	miR-133a, miR-208a	Fichtlscherer in sod., 2010
Akutni miokardni infarkt	miR-1, miR-122, miR-375	miR-133a, miR-133b, miR-208a, miR-499-5b	Ai in sod., 2010; D'Alessandra in sod., 2010
Srčno popuščanje		miR-24, miR-125b, miR-195, miR-199a, miR-214	Van Rooij in sod., 2006
DCM	miR-19a/b, miR-28, miR-101, miR-106a, miR-222	let-7b/c, miR-15b, miR-23a, miR-30e-5p, miR-214	Ikeda in sod., 2007
ICM	miR-126, miR-222, miR-422b	let-7b/c, miR-23a, miR-24, miR-27a,	Ikeda in sod., 2007
DCM	let-7i		Bao in sod., 2013
ICM		let-7c	Bao in sod., 2013
DCM		miR-30c	Wijnen in sod., 2014

Legenda: DCM – dilatativna kardiomiopatija; ICM – ishemična kardiomiopatija.

2.8 CIRKULIRajoče miRNA PRI ZDRAVIH OSEBAH

Pri raziskovanju prisotnosti in ravni miRNA pri bolezenskih stanjih, je potrebno opraviti tovrstne preiskave tudi pri zdravih osebah. V raziskavi Chena in sodelavcev iz leta 2008 so iz seruma zdravih oseb (10 moških in 11 žensk) izolirali vse RNA krajše od 30 nukleotidov ter jih sekvencirali. Večina zaporedij je bilo dolgih med 21 in 23 nukleotidov, kar je v skladu z dolzinami zrelih molekul miRNA. Izolirane miRNA različnih raziskav so se v večini prekrivale, signifikantnih razlik med osebami niso dokazali (Chen X. in sod., 2008; Hunter in sod., 2008; Mitchell in sod., 2008; Turchinovich in sod., 2013). Če sklepamo, da so bili vsi osebki v raziskavah resnično zdravi, potem lahko začnemo graditi sliko o tem, kakšen je spekter miRNA v naravnem fiziološkem stanju.

Med moškimi in ženskami do danes raziskovalci niso odkrili statistično signifikantnih razlik v prisotnosti in izražanju cirkulirajočih molekul miRNA. V prvo raziskavo je bilo vključenih 10 moških in 11 žensk, katerim so odvzeli serum in sekvencirali izolirane miRNA (Chen X. in sod., 2008). V drugi raziskavi je bilo vključenih 27 moških in 24 žensk, pri katerih so izolirali mikrovezikle ter proučili miRNA znotraj le-teh. Med vzorci niso bile opažene pomembne razlike, prav tako niso dokazali razlik med vzorci osebkov različnih starostnih skupin in razlik v ravneh miRNA (Hunter in sod., 2008). Pri ženskah se pomembne razlike pojavljajo le med nosečnostjo (Chen X. in sod., 2008).

2.9 KARDIOVASKULARNA OBOLENJA

Srčno popuščanje je velik zdravstveni problem po celiem svetu, svetovna prevalenca naj bi znašala kar 23 milijonov oziroma 2-3 % celotne populacije. Samo v Ameriki letno odkrijejo 550.000 novih bolnikov s srčnim popuščanjem. V Ameriki je pri 20 % vseh smrti kot primarni vzrok navedeno srčno popuščanje. Obolevnost in smrtnost se iz leta v leto povečujeta, kar predstavlja veliko breme za zdravstveni sistem, predvsem zaradi velikega števila hospitalizacij, ponovnih sprejemov in denarnih stroškov (Bui in sod., 2011; Roger, 2013).

Srčno popuščanje je klinični sindrom, katerega karakteristike so odvisne od starosti, spola, rase, genetske zasnove in načina življenja. K obolenju so bolj nagnjeni starejši ljudje (več kot 80 % smrti, povzročenih zaradi srčnega popuščanja se zgodi pri osebah starejših od 65 let), največkrat moški. K nastanku srčnega popuščanja pospešeno vodi debelost, kajenje, premajhna telesna aktivnost, stres, bakterijske, virusne in parazitske okužbe, prekomerno uživanje alkohola in drog, bolezni srca in ožilja (npr. kardiomiopatija, hipertenzija, miokardni infarkt, diabetes) ter druge bolezni (Dickstein in sod., 2008; Bui in sod., 2011).

Srčno popuščanje je bolezensko stanje, ko srce ni zmožno zagotoviti zadostne količine kisika ter hranilnih snovi celicam, oziroma ni zmožno prečrpati zadostne količine krvi, glede na trenutne presnovne potrebe v organizmu. Zaradi zmanjšanega iztisnega volumna srce poskuša s pospešenim delovanjem nadomestiti potrebe, kar je dolgoročno za srčno mišico nevarno. Če se stanje razvija počasi, v daljšem časovnem obdobju, govorimo o kroničnem srčnem popuščanju, ob hitrem pojavu kliničnih znakov srčnega popuščanja pa govorimo o akutnem srčnem popuščanju, katerega simptomi so izrazitejši (Vrtovec in Poglajen, 2011; Roger, 2013). Glavni znaki srčnega popuščanja so:

- tahikardija (povečan srčni utrip),
- tahipneja (pospešeno dihanje),
- hropenje,
- plevralni izliv (nabiranje tekočine v poprsni votlini),
- povečan krvni tlak,
- hepatomegalija (povečanje jeter),
- kardiomegalija (povečanje srca),
- šum srca. (Dickstein in sod., 2008; Bui in sod., 2011)

Ob napredovaljem srčnem popuščanju bolezen napreduje do te mere, da se učinkovitost zdravljenja ne more doseči samo z zdravili, ampak s kombiniranim zdravljenjem s krvotvornimi matičnimi celicami, srčnim spodbujevalnikom ali v zadnjem koraku s presaditvijo srca. Kardiomiopatije so definirane kot bolezni srčne mišice povezane s srčno disfunkcijo (Vrtovec in Poglajen, 2011).

2.9.1 Ishemična kardiomiopatija

Ishemična kardiomiopatija je najpogostejsa oblika kardiomiopatije in najpogostejsi vzrok srčnega popuščanja (60-70 % primerov). Največkrat do ishemične kardiomiopatije pripeljejo miokardni infarkti ali bolezni koronarnih arterij (npr. aterosklerotična koronarna bolezen in arterijska hipertenzija), ki lahko vodijo do brazgotinjenja srčne mišice, izgube miokarda ter preoblikovanja levega prekata. Rezultat nastalega stanja je ishemija oz. zmanjšanje sposobnosti delovanja srca za črpanje krvi po telesu zaradi zmanjšanja prekrvavitve srčne mišice. Ker se glavna srčna črpalna komora (levi ventrikkel) poveča in postane šibka, lahko pride do srčnega popuščanja. Iztisni delež takšnega levega ventrikla je lahko manjši od 40 % (Gradecki, 2009). Ishemična kardiomiopatija je sindrom, ki ga velikokrat odkrijejo pozno po začetku koronarnih obolenj in ima zato slabšo prognozo zdravljenja (Androulakis in sod., 2000).

2.9.2 Dilatativna kardiomiopatija

Pri tej obliki srčnega popuščanja pride do enakih kliničnih znakov, kot pri ishemični kardiomiopatiji, torej povečanja in šibkosti levega ventrikla ter s tem zmanjšanja delovanja srčne mišice. Vzroki za nastanek bolezenskega stanja pa so drugačni, kot pri ishemični kardiomiopatiji in sicer gre največkrat za (i) bolezni srčnih zaklopk, (ii) virusne okužbe, (iii) alkoholizem in uživanje drog, (iv) bolezni šeitnice ali (v) diabetes. Dilatativna kardiomiopatija pri določenih osebah ne povzroča simptomov, pri drugih pa je lahko smrtno nevarna. Ker so znaki dilatativne in ishemične kardiomiopatije zelo podobni, sta obe velikokrat obravnavani skupaj (Mayo Clinic, 2014).

2.9.3 Zdravljenje s krvotvornimi matičnimi celicami

Temeljna sposobnost krvotvornih matičnih celic (KMC) je transdiferenciacija, kar pomeni sposobnost preobrazbe v novo celično linijo v ustreznom okolju. S KMC poteka zdravljenje srčnega popuščanja na način, da se lastne KMC bolnika (natančneje matične celice CD34+, ki se nahajajo v kostnem mozgu) vstavi na prizadeto območje, torej na območje oslabljenega delovanja srčne mišice. S preoblikovanjem KMC v kardiomiocite, gladkomišične celice in endotelne celice, se nadomesti propadlo srčno tkivo ter poveča gostota kapilar v miokardu. Posledično se zmanjša koncentracija vnetnih citokinov, poveča koncentracija rastnih dejavnikov, faktorjev angiogeneze in zaviralcev apoptoze nativnih kardiomiocitov, kar pripomore k izboljšanemu delovanju tkiva (Vrtovec in Poglajen, 2011).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti

Pri raziskavi smo uporabljali reagente, ki so bili v reagenčnem kompletu podjetja Exiqon (Danska) – Exiqon's miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids, Universal cDNA Synthesis kit II ter miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR. Proizvajalec ni podal sestave reagentov (Exiqon, 2013a; Exiqon, 2013b).

3.1.2 Laboratorijski pripomočki

Med raziskavo smo v laboratoriju uporabljali pripomočke, ki so navedeni v preglednici 2.

Preglednica 2: Uporabljeni laboratorijski pripomočki

Naziv	Oznaka modela	Referenčna številka	Proizvajalec	Država proizvodnje
Serumska epruveta	Vacutube	4.12.1.3	Lab. tehnika Burnik	Slovenija
Mikrocentrifugirke	Safe lock tubes	0030 121.589	Eppendorf	Nemčija
Mikrocentrifugirke	LoBind tubes	0030 108.051	Eppendorf	Nemčija
Nastavki za pipete	Dual filter tips 0,1-10 µl	70.1130.215	Eppendorf	Nemčija
Nastavki za pipete	Dual filter tips 100-1000 µl	70.762.216	Eppendorf	Nemčija
Nastavki za pipete	Biosphere Filter tips 2-100 µl	70.760.217	Eppendorf	Nemčija
Nastavki za pipete	Combitips	0030 069 455	Eppendorf	Nemčija
Pipeta	Research 0,1 µl	3111 000.114	Eppendorf	Nemčija
Pipeta	Research 10 µl	311 000.122	Eppendorf	Nemčija
Pipeta	Reference 100 µl	4920 000.059	Eppendorf	Nemčija
Pipeta	Reference 1000 µl	4920 000.083	Eppendorf	Nemčija
Multipipeta	Multipette Stream	4986 000.017	Eppendorf	Nemčija
Centrifugirke Falcon	Falcon	352070	BD Biosciences	ZDA
Reagenčni komplet za izolacijo miRNA	miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids (50)	EQ-300112	Exiqon	Danska
Reagenčni komplet za sintezo cDNA	Universal cDNA Synthesis kit II (8-64 rxns)	EQ-203301	Exiqon	Danska
Reagenčni komplet za qPCR	ExiLENT SYBR Green master mix, 20 ml (4000 rxns of 10 µl)	EQ-203420	Exiqon	Danska

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2: Uporabljeni laboratorijski pripomočki

Naziv	Oznaka modela	Referenčna številka	Proizvajalec	Država proizvodnje
Komplet sintetičnih (spike-in) molekul RNA	RNA Spike-in kit, UniRT	EQ-203203	Exiqon	Danska
Začetni oligonukleotidi za kontrolno miRNA	Hsa-miR-103, LNA PCR primer set, UniRT, 200rxns	EQ-204063	Exiqon	Danska
Začetni oligonukleotidi za kontrolno miRNA	Hsa-miR-191, LNA PCR primer set, UniRT, 200rxns	EQ-204306	Exiqon	Danska
Začetni oligonukleotidi za sintetične molekule RNA (Spike-in)	UniSp2, LNA control primer set, UniRT, 200rxns	EQ-203950	Exiqon	Danska
Začetni oligonukleotidi za sintetične molekule RNA (Spike-in)	UniSp4, LNA control primer set, UniRT, 200rxns	EQ-203953	Exiqon	Danska
Začetni oligonukleotidi za sintetične molekule RNA (Spike-in)	UniSp5, LNA control primer set, UniRT, 200rxns	EQ-203951	Exiqon	Danska
Začetni oligonukleotidi za sintetične molekule RNA (Spike-in)	Cel-miR-39-3p, LNA control primer set, 200rxns	EQ-203952	Exiqon	Danska
Zaščitne folije	MicroAmp Optical Adhesive film	4311971	Applied Biosystems	ZDA
Plošče za qPCR	MicroAmp Fast 96-well reaction plate	4346907	Applied Biosystems	ZDA
Plošče za qPCR	microRNA Ready-to-use PCR, Human panel I+II (V3.M)	EQ-203611	Exiqon	Danska
Barvilo ROX	Rox reference dye	12223-012	Invitrogen	ZDA
Rokavice	Soft PF Latex	/	MaiMed	Nemčija
Hladilne plošče	PCR Cooler	/	Eppendorf	Nemčija

3.1.3 Laboratorijska oprema

Med raziskavo smo v laboratoriju uporabljali opremo, ki je navedena v preglednici 3.

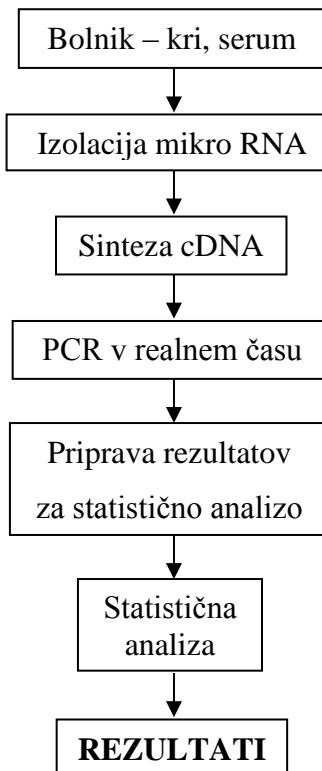
Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema

Naziv	Oznaka modela	Proizvajalec	Država proizvodnje
Centrifuga	Biofuge pico	Heraeus	Nemčija
Centrifuga	Labofuge 400	Heraeus	Nemčija
Stresalnik 1	Vibromix 10	Tehtnica	Slovenija
Stresalnik 2	Multispin MSC-6000	Biosan	Latvija
Hladilnik		Gorenje	Slovenija
Zamrzovalnik	F6098W	Gorenje	Slovenija
Zamrzovalnik	Korting	Gorenje	Slovenija
Aparatura za PCR	Veriti thermal cycler	Life technologies	ZDA
Aparatura za qPCR	ViiA7	Applied biosystems	ZDA
Laminarij 1	PIO DIG12	Iskra	Slovenija
Laminarij 2	PIO LFVP12	Iskra	Slovenija
Laminarij 3	LaminAir	Heto Holten	Danska
Laminarij 4	UVC/T-M-AR	Biosan	Latvija

3.2 METODE

Raziskavo pod številko 136/03/11 je Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje odobrila dne 7. 12. 2009. Od preiskovancev smo dobili ustni pristanek pred pričami. Rezultati raziskav niso vplivali na zdravljenje bolnikov. Izvedeni postopki so bili v skladu z načeli Helsinskih deklaracij o biomedicinskih raziskavah na človeku iz leta 1975.

Pridobili smo kri in pripravili serum preiskovancev zdravih oseb in bolnikov z dilatativno ali ishemično kardiompatijo pred in po 6. mesecih od zdravljenja s KMC. Delo je nato potekalo v dveh fazah. V prvi fazi smo optimizirali pogoje izolacije miRNA, sinteze cDNA in napravili delno validacijo metod. Za analize smo uporabili sintetične molekule miRNA (UniSp6, UniSp5, UniSp4, UniSp2, cel-miR-39-3p) ter dve izbrani miRNA (hsa-miR-191-5p in hsa-miR-103a-3p), ki sta po podatkih proizvajalca najbolj pogosti in stabilno izraženi miRNA v serumu preiskovancev. V drugi fazi smo ugotavljali prisotnost in raven 752 različnih miRNA v serumu preiskovancev s qPCR in primerjali rezultate različnih skupin med seboj. Potek dela prikazuje slika 3.



Slika 3: Shema poteka dela

3.2.1 Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 6 zdravih oseb, 3 ženske in 3 moške. Vzorce zdravih oseb smo dobili iz Specializiranega hematološkega laboratorija kliničnega oddelka za hematologijo, iz Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (UKC Ljubljana). Mediana starosti je bila 58 let, razpon od 38 let do 59 let.

V preiskavo smo vključili 10 bolnikov z dilatativno ali ishemično kardiomiopatijo. Od tega je bilo 9 moških in 1 ženska. Mediana starosti je bila 56 let, razpon od 42 do 68 let. Diagnozo bolezni so postavili na Kliničnem oddelku za kardiologijo, UKC Ljubljana. Bolniki so bili zdravljeni z lastnimi krvotvornimi matičnimi celicami (KMC) CD34+, ki so jih po posebnem postopku pridobili iz njihovega kostnega mozga. Krvotvorne matične celice so vstavili v srce na prizadeto območje, na območje oslabljenega delovanja srčne mišice. Kriterij za uspešnost zdravljenja srčnega popuščanja s KMC je povečanje iztisnega deleža levega prekata za 5 % od vrednosti pred zdravljenjem.

Z raziskavo smo želeli preveriti kakšen je profil molekul miRNA pri odzivnih in neodzivnih bolnikih ter pred in po prejetem zdravljenju srčnega popuščanja s KMC, zato

smo v analizo vključili vzorce, vzete pred začetkom zdravljenja in po 6. mesecih od prejete terapije. Tako smo imeli pet različnih skupin vzorcev, katere smo med seboj primerjali:

- ZO – vzorci odzivnih bolnikov, odvzeti pred začetkom terapije
- ZNO – vzorci neodzivnih bolnikov, odvzeti pred začetkom terapije
- 6O – vzorci odzivnih bolnikov, odvzeti po 6. mesecih terapije
- 6NO – vzorci neodzivnih bolnikov, odvzeti po 6. mesecih terapije
- K – kontrolna skupina zdravih ljudi

3.2.2 Priprava vzorcev

Serum smo pridobili tako, da smo bolnikom odvzeli kri v epruveto za pridobitev seruma. Odvzem smo opravili med 9. in 11. uro dopoldan. Kri smo pustili stati pokončno pri sobni temperaturi (+18 do +25 °C) eno uro, da je nastal strdek. Nato smo epruvete centrifugirali 10 minut pri $1200 \times g$ in sobni temperaturi (+18 do +25 °C) v centrifuggi Labofuge 400 (Heraeus). Serum smo zamrznili v 0,6 ml odmerkih (-20 °C; za daljše shranjevanje pri -80 °C) v sterilnih mikrocentrifugirkah z V (volumen) 1,5 ml. Zamrzeni serum smo pred začetkom analize odtalili pri temperaturi 37 °C. Vzorce seruma smo pustili v termostatirani komori 5 minut oz. dokler se vzorec seruma ni popolnoma odtajal. Pred izolacijo miRNA smo serum dobro premešali (Exiqon, 2013a).

3.2.3 Izolacija mikro RNA

Pri izolaciji miRNA smo uporabljali reagenčni komplet podjetja Exiqon (Danska) – Exiqon's miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids. V postopku smo pridobili celokupno RNA, ki vsebuje tudi miRNA. Protokol za izolacijo miRNA sestavlja pet glavnih korakov. Prvi korak je liza delcev z membrano, ki so v serumu, s pomočjo liznegra pufra. V drugem koraku je obarjanje proteinov s pomočjo precipitacijskega pufra. Po centrifugiranju dobimo supernatant, kateremu dodamo izopropanol, ki zagotovi ustrezno sestavo raztopine za optimalno vezavo miRNA na kromatografsko kolono. V tretjem koraku mešanico prenesemo na kolono, sledi čiščenje vezanih miRNA. Na koloni se molekule RNA zadržijo na način, ki je odvisen od ionske koncentracije, proteini pa se s spiranjem izločijo iz vzorca ali obdržijo na površju membrane. V četrtem koraku spiramo vezano RNA s pomočjo pufra I in II za spiranje, da odstranimo še druge nečistoče. V zadnjem petem koraku izperemo RNA z membrane s pomočjo vode, ki je brez RNaz. Reagenčni komplet vsebuje vse potrebne reagente, mikrocentrifugirke, zbiralne mikrocentrifugirke in kolone (Exiqon, 2013a).

Pred začetkom dela je bilo potrebno pripraviti reagente in pufre. V izolacijskem kompletu podjetja Exiqon je bil pufer II za izpiranje kot koncentrat, pred uporabo smo mu dodali 80 ml > 99,8 % etanola. Potrebno je bilo ustrezno pripraviti sintetične molekule RNA, ki so bile v kompletu v liofilizirani obliki, zato smo jih raztopili v vodi brez nukleaz. Komplet ni vseboval izopropanola (Exiqon, 2013a).

Pri izolaciji miRNA smo dodali kontrolne molekule RNA (angl. *Spike-in*) s katerimi smo na osnovi rezultatov qPCR preverili uspešnost izolacije RNA. Te molekule so bile UniSp2, UniSp4 in UniSp5. Pri izolaciji miRNA smo uporabili tudi RNA bakteriofaga MS2, ki je služila kot nosilec, da se miRNA ne bi vezale na površine. Z njo smo povečali izkoristek izolacije in zmanjšali tehnične variacije med pomnožki pri qPCR. Sintetične molekule RNA nismo smeli dodati direktno v plazmo oz. serum zaradi prisotnih prostih RNaz, zato smo jih dodali k liznemu oz. denaturacijskemu pufru (Exiqon, 2013a).

Pred začetkom analize vzorcev, smo opravili optimizacijo izolacije miRNA, s katero smo želeli ugotoviti, kateri izmed zastavljenih protokolov nam poda najbolj optimalne rezultate. Spodaj je naveden končni protokol, za katerega smo se odločili na podlagi pridobljenih rezultatov. Protokoli in rezultati optimizacije izolacije miRNA so v prilogah A, B, C, D in D1.

Protokol izolacije miRNA:

- **Korak 1 – priprava vzorcev:** vzorce seruma odtalimo in centrifugiramo pri $3000 \times g$ 5 minut pri sobni temperaturi.
- **Korak 2 – liza:** 200 μl supernatanta iz koraka 1 prenesemo v novo mikrocentrifugirko. V drugi mikrocentrifugirki zmešamo 60 μl liznega pufra, kateremu dodamo 1 μl RNA Spike-in in 1 ng oz. 1,25 μl nosilne RNA bakteriofaga MS2, premešamo na mešalu vorteks. Nato prenesemo lizni pufer z dodano RNA Spike-in ter RNA MS2 v centrifugirko s 200 μl supernatanta vzorca. Premešamo vzorec s pipetiranjem ($10\times$), dodatno premešamo na mešalu vorteks 10 sekund ter nato inkubiramo 3 minute pri sobni temperaturi.
- **Korak 3 – obarjanje proteinov:** vzorcu dodamo 20 μl precipitacijskega pufra za proteine ob steni mikrocentrifugirke. Premešamo s pipetiranjem ($10\times$), na mešalu vorteks 10 sekund ter inkubiramo 1 minuto pri sobni temperaturi. Centrifugiramo 3 minute pri $11.000 \times g$.
- **Korak 4 – prenos supernatanta:** supernatant prenesemo v novo 2 ml zbirno mikrocentrifugirko.
- **Korak 5 – prilagoditev pogojev vezave:** supernatantu dodamo 270 μl izopropanola ter premešamo s pipeto ($10\times$) ter na mešalu vorteks 10 sekund.

- **Korak 6 – nanos na membrano:** kolono kompleta Exiqon (microRNA Mini Spin Column BF) vstavimo v novo zbiralno mikrocentrifugirko in na kolono nanesemo vzorec. Inkubiramo 2 minuti pri sobni temperaturi. Centrifugiramo 30 sekund pri $11.000 \times g$. Zavržemo filtrat ter kolono položimo nazaj v zbiralno mikrocentrifugirko.
- **Korak 7 – spiranje in sušenje:** na kolono nanesemo $100 \mu l$ pufra I za spiranje, centrifugiramo 30 sekund pri $11.000 \times g$, zavržemo filtrat ter kolono ponovno vstavimo v zbiralno mikrocentrifugirko. Dodamo $700 \mu l$ pufra II za spiranje, centrifugiramo 30 sekund pri $11.000 \times g$, zavržemo filtrat ter kolono ponovno vstavimo v zbiralno mikrocentrifugirko. Dodamo $250 \mu l$ pufra II za spiranje, centrifugiramo 2 minuti pri $11.000 \times g$, da se membrana popolnoma posuši.
- **Korak 8 – izpiranje:** kolono z miRNA prenesemo v novo zbiralno mikrocentrifugirko z V $1,5 ml$ in z nizko afiniteto vezave nukleinskih kislin. Dodamo dvakrat po $25 \mu l$ vode proste RNaz, vmes inkubiramo 1 minuto pri sobni temperaturi ter centrifugiramo 1 minuto pri $11.000 \times g$. Končni volumen izprane miRNA je $50 \mu l$, kar je idealno za nadaljnjo sintezo cDNA.
- **Shranjevanje:** Vzorce lahko shranimo pri $-20^{\circ}C$ nekaj dni ali pri $-70^{\circ}C$ dlje časa (Exiqon, 2013a).

3.2.4 Sinteza cDNA

cDNA smo sintetizirali s pomočjo reagenčnega kompleta podjetja Exiqon (Universal cDNA synthesis kit II), po protokolu za človeški serum oz. plazmo – miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR (Exiqon, 2013b).

V protokolu sinteze cDNA so navedeni različni postopki priprave cDNA, odvisno od tega, koliko cDNA bi potrebovali v nadalnjih analizah. Postopki so povsem enaki, le koncentracije so ustrezno preračunane na manjše oz. večje število vzorcev. Mi smo za sintezo cDNA uporabili dva protokola. Enega med vpeljevanjem in optimizacijo postopkov, to je za oceno uspešnosti izolacije miRNA, sinteze cDNA in metode qPCR ter drugega za analizo vzorcev. Pri vpeljevanju in optimizaciji smo sledili protokolu A – Individual assays using serum/plasma samples, ki omogoča sintezo cDNA posameznih oz. manjšega števila vzorcev. Drugi protokol, protokol B – Human and Mouse & Rat and Serum/plasma Focus microRNA PCR Panels using serum/plasma samples, smo uporabili za pripravo cDNA, ki smo jo uporabili za identifikacijo in kvantifikacijo 752 različnih miRNA s qPCR v enem vzorcu. Analiza enega vzorca je tekla na dveh mikrotitrskih ploščicah s 384 luknjicami (microRNA Ready-to-use PCR, panel I+II, V3.M), zato smo potrebovali večjo količino vzorca cDNA (Exiqon, 2013b).

Pred začetkom analize vzorcev smo opravili optimizacijo sinteze cDNA, s katero smo želeli preveriti, kateri volumen vnesene RNA doprinese najnižje vrednosti Cq (cikel kvantifikacije) pri qPCR in nam s tem poda najboljši izkoristek ne da bi prišlo do inhibicije reakcije. Spodaj je zapisan končni protokol sinteze cDNA, ki smo ga določili na podlagi pridobljenih rezultatov. Protokol optimizacije sinteze cDNA ter rezultati so zapisani v prilogi E in E1.

Pred začetkom sinteze cDNA smo za preverjanje kakovosti sinteze cDNA dodali v vzorec sintetični molekuli RNA in sicer UniSp6 ter cel-miR-39-3p. Po opravljeni reakciji qPCR smo tako lahko preverili, ali je bila sinteza cDNA uspešno opravljena. V reakciji sinteze cDNA polimeraza Poly(A) doda poli-A repe na 3' konec molekul miRNA. S tem se omogoči večja specifičnost vezave poli-T začetnih oligonukleotidov (Exiqon, 2013b).

Postopek sinteze cDNA (celoten postopek poteka v ledeni komori):

- **Korak 1 – priprava reagentov:** počasi odtalimo 5x reakcijski pufer in vodo brez nukleaz ter ju postavimo v ledeno kopel. Kontrolne molekule RNA (Spike-in) raztopimo in jih pustimo stati v ledeni kopeli 15-20 minut. Takoj pred uporabo odmrznemo mešanico encimov, jo premešamo z obračanjem in shranimo v ledeni kopeli. Vse reagente pred uporabo premešamo na mešalu vorteks ter za kratek čas zavrtimo v centrifugi.
- **Korak 2 – mešanje reagentov:** pripravimo si reakcijsko mešanico za več vzorcev – zmešamo 5x reakcijski pufer, mešanico encimov ter kontrolne RNA v količinah, ki so zapisane v preglednici 4. Mešanice razporedimo v mikrocentrifugirke proste nukleaz ter jim dodamo vzorce miRNA (Exiqon, 2013b).

Preglednica 4: Prikaz priprave reakcijske mešanice za sintezo cDNA.

Reagenti	96 panel (V - μ l)	384 panel (V - μ l)
5x reakcijski pufer	4	8
Voda prosta nukleaz	7	14
Mešanica encimov	2	4
RNA Spike-in	1	2
Nosilna miRNA	6	12
Skupni volumen	20	40

- **Korak 3 – mešanje in centrifugiranje:** mešanico nežno zmešamo na mešalu vorteks ter nato kratko centrifugiramo, da zberemo tekočino na dnu mikrocentrifugirke.
- **Korak 4 – inkubacija ter toplotna inaktivacija:** inkubiramo pri 42 °C 60 minut, sledi toplotna inaktivacija reverzne transkriptaze pri 95 °C 5 minut. Vzorce lahko shranimo pri 4 °C, jih zamrznemo pri -20 °C ali za daljše shranjevanje pri -80 °C (Exiqon, 2013b).

3.2.5 Kvantitativni PCR

Uporabili smo reagenčni komplet podjetja Exiqon (Danska) – ExiLENT SYBR® Green master mix. Pri postopku qPCR smo sledili dvema protokoloma – A protokolu (Individual assays using serum/plasma samples) smo sledili med vpeljevanjem in optimizacijo postopkov, to je za oceno uspešnosti izolacije miRNA, sinteze cDNA in metode qPCR. Protokol A smo uporabljali za analizo posameznih oz. manjšega števila vzorcev. Protokol B (Human and Mouse & Rat and Serum/plasma Focus microRNA PCR Panels using serum/plasma samples) smo uporabili za identifikacijo in kvantifikacijo 752 različnih miRNA v enem vzorcu s qPCR. Analiza enega vzorca je tekla na dveh mikrotitrskih ploščicah, s po 384 luknjicami na vsaki plošči. Uporabili smo plošče MicroRNA Ready-to-use PCR, panel I+II, V3.M (Exiqon, 2013b).

Mikrotitrskie plošče (MicroRNA Ready-to-use PCR panel I+II, V3.M) so bile vnaprej pripravljene in so vsebovale liofilizirane začetne oligonukleotide LNA. Vsaka luknja mikrotitrskie plošče je vsebovala drugačne začetne oligonukleotide LNA za posamezno molekulo miRNA, večkratnih ponovitev za posamezno miRNA nismo imeli. S tem je bila omogočena identifikacija posamezne miRNA v vsaki luknji. Na ploščah so bili zbrani začetni oligonukleotidi tistih molekul miRNA, ki se v krvi najpogosteje pojavljajo, katerih delovanje je najbolj specifično pri bolezenskih stanjih in tiste miRNA, ki jih najpogosteje navajajo v literaturi. Plošča je poleg začetnih oligonukleotidov za zaznavo miRNA v vzorcu vsebovala tudi prazne luknjice, ki so bile kot negativna kontrola, začetne oligonukleotide potencialnih referenčnih genov, začetne oligonukleotide za endogene kontrole (služile za kalibracijo plošče) ter začetne oligonukleotide sintetičnih kontrolnih molekul miRNA (Spike-in) za analizo uspešnosti izolacije miRNA in sinteze cDNA. Preglednica razporeditve začetnih oligonukleotidov na mikrotitrski plošči je vidna v prilogah G in H (Exiqon, 2013a; Exiqon, 2013b). Ocenujemo, da so se vsi amplifikoni pomnoževali s podobno učinkovitostjo (Mestdagh in sod., 2014; Exiqon, 2013c).

Za qPCR smo potrebovali reakcijsko mešanico (Master mix), ki je vsebovala potrebne deoksinukleotide za pomnoževanje, pufer za primerno vrednost pH, barvilo SYBR® Green za kvantifikacijo pomnožkov, ione potrebne za encimsko aktivnost, Taq polimerazo za pomnoževanje nukleinskih kislin in vodo (Exiqon, 2013b). Potrebovali smo tudi barvilo ROX, ki je bilo kot pasivna referenca za normalizacijo fluorescentnega signala reporterskega barvila (v našem primeru SYBR® Green), kar pomeni, da se njegova fluorescensa ni spremenjala v odvisnosti od pomnoževanja nukleinskih kislin. Z barvilm ROX smo zagotovili primerjavo amplifikacijskega signala čez celotno ploščo, ugotovili, ali v qPCR prihaja do nihanj fluorescence zaradi drugih vplivov, ki niso v povezavi s PCR in normalizirali nihanja v fluorescenci med različnimi luknjicami, ki se pojavljajo zaradi različnih koncentracij reagentov ali zaradi različnih volumnov. Prav tako smo s tem zmanjšali napake, ki so se pojavile pri branju inštrumenta. Barvilo ROX je izredno

uporabno, saj ne moti qPCR, njegov signal pa z lahkoto ločimo od signala reporterja (Life technologies, 2012).

Pred začetkom analize vzorcev smo opravili titracijo barvila ROX, s katero smo želeli določiti najbolj ustrezen količino dodanega barvila. Želeli smo določiti katera količina barvila ROX bi nam prinesla najnižje vrednosti Cq in ob tem ne bi prišlo do inhibicije reakcije. Postopki titracije in pridobljeni rezultati so prikazani v prilogi F in F1.

Postopek qPCR:

- **Korak 1 – priprava reagentov za qPCR:** vzorce cDNA, vodo prosto nukleaz, barvilo ROX in reakcijsko mešanico za PCR (Master Mix) postavimo v ledeno kopel za 15-20 minut, da se počasi odtali. Pri tem moramo paziti, da reakcijsko mešanico za PCR zavarujemo pred svetlobo. Pred uporabo reakcijsko mešanico za PCR, vzorce cDNA, barvilo ROX in vodo nežno premešamo ter kratko centrifugiramo. Plošči oz. panela I in II neposredno pred uporabo kratko zavrtimo v centrifugi. Pri protokolu A je potrebna 40x redčitev cDNA z vodo prosto nukleaz, pri protokolu B pa 50x redčitev. Pripravimo si potrebne količine reagentov in vzorcev za nadaljnjo analizo, vse količine so zapisane v preglednici 5. Zaradi izgub med pipetiranjem si pripravimo 10 % več reakcijske mešanice.
- **Korak 2 – vnos v luknjice plošč:** Pri protokolu A najprej zmešamo reakcijsko mešanico za PCR, začetne oligonukleotide in barvilo ROX, za kratek čas centrifugiramo in nato vnesemo 6,02 µl v posamezno luknjico. Na koncu vsake luknjici dodamo 3,98 µl 40x redčene cDNA. Po protokolu B najprej zmešamo reakcijsko mešanico za PCR, vodo in barvilo ROX in za kratek čas centrifugiramo. Dodamo 40 µl cDNA, zmešamo in za kratek čas centrifugiramo. V vsako luknjico dodamo po 10 µl reakcijske mešanice.
- **Korak 3 – PCR v realnem času:** denaturacija je tekla pri 95 °C 10 minut, amplifikacija je tekla s 40 cikli pri 95 °C po 10 sekund ter 60 °C po 1 minuto (Exiqon, 2013b).

Preglednica 5: Prikaz vseh potrebnih reagentov za qPCR.

Reagenti	Za posamezne vzorce (V - µl)	384 panel (V - µl)
Master mix PCR	5	2000
Voda	-	1952
Začetni oligo.PCR	1	-
cDNA (redč.)	3,98	40
Barvilo ROX	0,02	8
Skupni volumen	10	4000

3.2.6 Delna validacija metod

Na izbranih vzorcih preiskovancev in molekulah miRNA smo določili natančnost analizne metode za določanje ravni miRNA v serumu preiskovancev. To smo storili s preverjanjem ponovljivosti rezultatov meritev v seriji in med serijami.

3.2.6.1 Ponovljivost rezultatov qPCR meritev v seriji

Za ponovljivost rezultatov v seriji smo iz enega vzorca izolirali miRNA, sintetizirali cDNA, pripravili 3 ločene reakcijske mešanice za qPCR ter nato opravili qPCR v triplikatih. Skupaj smo tako imeli 9 reakcij. S tem smo pregledali variacije na nivoju qPCR. Kot vzorec smo uporabili serum bolnika, za analizo miRNA pa smo uporabili začetne oligonukleotide sintetičnih molekul RNA UniSp6, UniSp5, UniSp4, UniSp2, cel-miR-39-3p ter začetne oligonukleotide za hsa-miR-191-5p in hsa-miR-103a-3p. Pri analizi smo sledili protokolu A – Individual assays using serum/plasma samples (Exiqon, 2013b).

3.2.6.2 Ponovljivost rezultatov qPCR meritev med serijami

Za ponovljivost rezultatov meritev med serijami smo iz vzorca enega bolnika trikrat ločeno izolirali miRNA, opravili sintezo cDNA vsakega vzorca v triplikatih ter iz vsakega vzorca opravili qPCR v triplikatih – skupaj smo tako imeli 27 reakcij. S tem smo pregledali variacije na nivoju izolacije miRNA, sinteze cDNA in qPCR. Kot vzorec smo uporabili serum bolnika, za analizo miRNA pa smo uporabili začetne oligonukleotide za hsa-miR-191-5p in hsa-miR-103a-3p. Med analizo smo sledili protokolu A – Individual assays using serum/plasma samples (Exiqon, 2013b).

3.2.7 Priprava rezultatov qPCR za statistično vrednotenje in kontrola kakovosti

3.2.7.1 Uravnava vrednosti Cq z notranjim kalibratorjem

Pri nekaterih instrumentih za qPCR je opazna večja variabilnost rezultatov qPCR meritev med serijami. Zaradi tega se priporoča, da v raziskavah, ko se rezultati qPCR meritev pridobijo v več serijah, npr. na več mikrotitrskih ploščicah, uporabi notranji kalibrator za uravnavo rezultatov qPCR. Vsaka mikrotitrska ploščica, ki smo jo uporabili v naših preizkusih (microRNA Ready-to-use PCR, Human panel I+II, V3.M), je vključevala t.i. notranji kalibrator, ki je specifična DNA (angl. *inter-plate calibrator - IPC*). Uporabili smo jo za uravnavo vrednosti Cq pomnoženih miRNA v različnih serijah meritev z metodo qPCR. Vsaka mikrotitrska ploščica je vsebovala notranji kalibrator v triplikatu. V qPCR se je specifična DNA pomnožila in dobili smo vrednosti Cq. Vrednosti se med seboj niso

smele razlikovati za več kot 0,5 Cq. Nato smo izračunali povprečno vrednost notranjega kalibratorja mikrotitrsko ploščico (NKplošča). Ko smo opravili vse meritve določanja miRNA v serumu preiskovancev z metodo qPCR, smo izračunali celokupno povprečno vrednost Cq notranjega kalibratorja (NKcelokupno). To je povprečje vseh vrednosti Cq notranjega kalibratorja vseh analiziranih mikrotitrskih ploščic. Iz obeh vrednosti Cq smo izračunali kalibracijski faktor. To je razlika med povprečno vrednostjo Cq kalibratorja mikrotitrsko ploščice in celokupno povprečno vrednostjo notranjega kalibratorja (NKcelokupno) vseh mikrotitrskih plošč (Kalibracijski faktor = NKplošča – NKcelokupno). Nato smo uravnali vrednosti Cq pomnoženih miRNA na posameznih ploščicah tako, da smo od vsake vrednosti Cq posamezne miRNA na ploščici odšteli kalibracijski faktor.

3.2.7.2 Priprava rezultatov Cq miRNA za statistično vrednotenje

V statistično vrednotenje smo vključili vse miRNA, ki so imele vrednost Cq manjšo od 38. Rezultate Cq preiskovanih molekul miRNA smo normalizirali. Normalizacija vrednosti Cq posameznih miRNA je bila potrebna, da smo zmanjšali vpliv na statistično vrednotenje rezultatov zaradi variabilnosti, ki so bile vnesene med postopkom, to je od izolacije miRNA do qPCR. Normalizirane vrednosti Cq za posamezno miRNA smo dobili tako, da smo od povprečne vrednosti Cq, ki smo jo dobili iz Cq vseh miRNA, katerih vrednost Cq je bila manjša od 34,0 odšteli vrednost Cq za posamezno miRNA ($CqNORM = CqPovprečna - CqPosamična$). Normalizacijo smo izvedli v programu GenEx (verzija 6.0.1.612.), podjetja MultiD Analyses (Exiqon, 2014).

3.2.8 Test preverjanja hemolize v vzorcih serumu

Kakovost vzorca seruma za analize ravni miRNA smo ugotavljali s t.i. testom hemolize. Z njim smo želeli ugotoviti, ali je v katerem izmed vzorcev prišlo do lize rdečih krvnih celic, ki vsebujejo svoje miRNA, kar se največkrat zgodi ob odvzemuh in pripravi vzorca. Hemoliza spremeni profil miRNA v vzorcu in tako neposredno vpliva na rezultate. Enostaven test za hemolizo je merjenje vrednosti ΔCq med hsa-miR-23a-3p in hsa-miR-451a, ki sta indikatorja hemolize. Hsa-miR-451a je miRNA, specifična za rdeče krvne celice, hsa-miR-23a-3p pa je miRNA, na katero hemoliza ne vpliva. Vrednosti ΔCq manjše od 5 so optimalne, od 5 do 7 so sprejemljive, vrednosti nad 7 pa kažejo na hemolizo vzorca, zato se takšne vzorce lahko izloči iz študije. Obe miRNA, hsa-miR-451a in hsa-miR-23a-3p, sta bili vključeni v panel miRNA na mikrotitrskih ploščicah, ki smo jih uporabili pri naših preizkusih (Exiqon, 2013b; Exiqon, 2013c).

3.2.9 Ugotavljanje uspešnosti izolacije miRNA in pripravljene cDNA

Uspešnost izolacije miRNA in pripravljene cDNA smo preverili z ugotavljanjem morebitnih osamelih vrednosti Cq dodanih sintetičnih molekul RNA po qPCR. Na dveh različnih mestih v postopku smo dodali sintetične molekule RNA (Spike-in) – UniSp2, UniSp4 in UniSp5 pred izolacijo miRNA, cel-miR-39-3p in UniSp6 pa ob pripravi cDNA. V vse vzorce smo dodali enako količino sintetičnih molekul in ker smo uporabili povsod enake količine vzorca, bi morala biti raven sintetičnih molekul miRNA povsod enaka. Sintetične molekule RNA so bile vključene v panel miRNA na mikrotitrskih ploščah, ki smo jih uporabili pri naših preizkusih (microRNA Ready-to-use PCR, Human panel I+II, V3.M). Po qPCR smo rezultate analizirali z Grubbsovim statističnim testom in tako preverili ali v katerem izmed vzorcev katera vrednost Cq odstopa, v primerjavi z drugimi vzorci (Exiqon, 2013b).

3.2.10 Statistično vrednotenje

Za opisno statistiko in določitev ponovljivosti metode qPCR smo uporabili program Microsoft Excel 2010. Izračunali smo povprečne vrednosti in standardne odklone Cq. Ponovljivost rezultatov qPCR meritev v seriji in med serijami smo podali s standardnim odklonom (Bustin in sod., 2009).

Za analizo osamelih vrednosti pri ugotavljanju uspešnosti izolirane miRNA, cDNA in izvedene qPCR smo uporabili Grubbsov test. Pri tem testu je osamela vrednost določena kot vrednost, pri kateri velja $Z > G$ in $SD > SD_0$, kjer je:

$$Z = \frac{|X - \bar{X}_{\text{skupine}}|}{SD_{\text{skupine}}} \quad \dots(1)$$

$$G = \frac{N-1}{\sqrt{N}} \sqrt{\frac{\frac{t^2 \alpha}{(2N)^{-2}}}{N-2 + \frac{t^2 \alpha}{(2N)^{-2}}}} \quad \dots(2)$$

X = vrednost predpostavljenega osamelca

\bar{X}_{skupine} = povprečna vrednost skupine

N = število meritev v skupini

SD_0 = vrednost, ki jo vnesemo sami (standardna deviacija)

$t_{\alpha/(2N), N-2}$ = zgornja kritična vrednost t-testa (prostostna stopnja N-2 in stopnja signifikantnosti $\alpha/(2N)$)

Preliminarno smo naredili test diferencialno izraženih miRNA z združevanjem v gruče (angl. *clustering*), ki vrstice (eksperimentalne osebe) združuje po podobnosti v stolpcih (normirani podatki o ravni miRNA), kjer so podobnosti izračunane z evklidskimi razdaljami v 292 dimenzijah. Idealno bi bilo, če bi nastalo pet gruč, ki bi odgovarjale eksperimentalnim skupinam. Tega nismo dobili, kar pomeni, da je bil šum v podatkih velik in zato je bilo potrebno uporabiti statistično modeliranje za izbor majhnega števila miRNA, na podlagi katerih bodo razlike med skupinami, če te obstajajo, jasne. Diferencialno izražanje smo analizirali s paketom Limma v statističnem programskem okolju R/Bioconductor. Gre za uveljavljeni in standardni paket statističnih metod za analizo razlik v izražanju genov, tudi genov za miRNA z linearimi modeli (uporabljeni ukazi se nahajajo v prilogi I) (Ritchie in sod., 2015). Za nas je bilo bistveno parno statistično vrednotenje razlik v izražanju, ravni preučevanih miRNA, ki smo ga opravili z moderiranim t-testom. Napako zaradi večkratnega testiranja (angl. *false discovery rate*) smo korigirali z metodo Benjamina in Hochberga (Benjamini in Hochberg, 1995). Po tem postopku smo dobili korigirano *p*-vrednost. Razlike smo označili kot statistično značilne v primeru, ko je bila korigirana *p*-vrednost < 0.05 . Da smo dobili končne vrednosti v obliki *n*-kratne višje ali nižje ravni molekul miRNA v vzorcih, smo pridobljene vrednosti logFC antilogaritmirali.

V preglednicah z rezultati parnih statističnih primerjav (pregl. 9-17) je v stolpcih podana vrednost *t*, nepopravljena *p*-vrednost in korigirana *p*-vrednost. Vrednost *t* je definirana kot moderirana statistika *t* in se je uporabila za izračun *p*-vrednosti. Pri *p*-vrednostih, ki niso popravljene zaradi večkratnega testiranja, je potrebno biti pri interpretaciji zelo pazljiv. Zaradi velikega števila miRNA in ogromnega števila parnih primerjav, napaka zaradi večkratnega testiranja zelo naraste, zato se za zanesljivejše rezultate uporablja korigirana *p*-vrednost, ki smo jo dobili po metodi Benjamina in Hochberga (Benjamini in Hochberg, 1995).

4 REZULTATI

4.1 PONOVLJIVOST REZULTATOV qPCR MERITEV V SERIJI

V preglednici 6 so prikazani rezultati ponovljivosti v seriji, s katero smo želeli pregledati variacije na nivoju cDNA in qPCR. Z rezultati standardne deviacije smo analizirali razpršenost vzorcev, želeli smo pridobiti čim nižje vrednosti standardne deviacije. Ugotovili smo, da je standardna deviacija pri vsaki skupini vzorcev sprejemljiva, razen pri skupini vzorcev, kjer smo uporabili začetne oligonukleotide za sintetične molekule UniSp6. Opazili smo razlike pri dveh vzorcih (v preglednici 6 sta ti dve vrednosti prečrtani), kjer se vrednosti Cq razlikujeta za več kot en cikel od najnižje vrednosti Cq v isti skupini vzorcev. Ker je bila standardna deviacija prevelika (st. dev.=1,430), smo omenjeni vrednosti izločili iz izračunov. Ker je bila kljub temu standardna deviacija prevelika (st. dev=1,191), smo to skupino vzorcev izločili iz skupne analize. Negativne kontrole se niso pomnožile. Z rezultati smo dokazali ponovljivost meritev v seriji in natančnost metode qPCR.

Preglednica 6: Prikaz rezultatov ponovljivosti qPCR v seriji.

Vzorec	Spike-in	Vrednost Cq	Povprečna vrednost Cq	Skupno povprečje vrednosti Cq	St. dev.
246: 1	UniSp6	22,798	21,117	21,005	1,340
246: 1	UniSp6	21,519			
246: 1	UniSp6	22,034			
246: 2	UniSp6	21,374	21,554		
246: 2	UniSp6	22,180			
246: 2	UniSp6	21,109			
246: 3	UniSp6	19,297	19,343		
246: 3	UniSp6	19,292			
246: 3	UniSp6	19,441			
246: 1	UniSp5	31,886	32,058	31,568	0,808
246: 1	UniSp5	32,606			
246: 1	UniSp5	31,682			
246: 2	UniSp5	32,717	31,966		
246: 2	UniSp5	31,376			
246: 2	UniSp5	31,804			
246: 3	UniSp5	30,406	30,681		
246: 3	UniSp5	30,550			
246: 3	UniSp5	31,086			
246: 1	UniSp4	24,629	24,614	24,916	0,387
246: 1	UniSp4	24,561			
246: 1	UniSp4	24,652			
246: 2	UniSp4	25,159	25,373		
246: 2	UniSp4	25,472			

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 6: Prikaz rezultatov ponovljivosti qPCR v seriji.

Vzorec	Spike-in	Vrednost Cq	Povprečna vrednost Cq	Skupno povprečje vrednosti Cq	St. dev.
246: 2	UniSp4	25,488			
246: 3	UniSp4	24,570	24,760		
246: 3	UniSp4	24,634			
246: 3	UniSp4	25,076			
246: 1	UniSp2	17,944	17,899	18,464	0,470
246: 1	UniSp2	17,912			
246: 1	UniSp2	17,841			
246: 2	UniSp2	18,348	18,513		
246: 2	UniSp2	18,508			
246: 2	UniSp2	18,682			
246: 3	UniSp2	19,454	18,982		
246: 3	UniSp2	18,729			
246: 3	UniSp2	18,762			
246: 1	cel-miR-39-3p	25,753	25,674	25,827	0,455
246: 1	cel-miR-39-3p	25,663			
246: 1	cel-miR-39-3p	25,607			
246: 2	cel-miR-39-3p	25,675	25,588		
246: 2	cel-miR-39-3p	25,546			
246: 2	cel-miR-39-3p	25,541			
246: 3	cel-miR-39-3p	25,784	26,220		
246: 3	cel-miR-39-3p	27,004			
246: 3	cel-miR-39-3p	25,873			
246: 1	HSA-miR-191-5p	28,887	28,631	29,031	0,680
246: 1	HSA-miR-191-5p	28,913			
246: 1	HSA-miR-191-5p	28,092			
246: 2	HSA-miR-191-5p	28,524	28,681		
246: 2	HSA-miR-191-5p	28,963			
246: 2	HSA-miR-191-5p	28,555			
246: 3	HSA-miR-191-5p	29,784	29,782		
246: 3	HSA-miR-191-5p	30,329			
246: 3	HSA-miR-191-5p	29,233			
246: 1	HSA-miR-103a-3p	27,988	27,856	27,507	0,412
246: 1	HSA-miR-103a-3p	27,900			
246: 1	HSA-miR-103a-3p	27,682			
246: 2	HSA-miR-103a-3p	27,274	27,389		
246: 2	HSA-miR-103a-3p	27,401			
246: 2	HSA-miR-103a-3p	27,493			
246: 3	HSA-miR-103a-3p	26,934	27,274		
246: 3	HSA-miR-103a-3p	26,924			
246: 3	HSA-miR-103a-3p	27,966			

Legenda: Cq – cikel kvantifikacije; St. dev. – standardna deviacija.

4.2 PONOVLJIVOST REZULTATOV qPCR MERITEV MED SERIJAMI

Preglednica 7 prikazuje rezultate ponovljivosti meritev med serijami, s čimer smo pregledali variacije na nivoju izolacije miRNA, sinteze cDNA in qPCR. Iz oznake vzorca (1., 2. in 3.) vidimo, da smo opravili tri ločene postopke izolacije miRNA iz istega vzorca serum, opravili tri ločene postopke sinteze cDNA (npr. 1.1, 1.2 in 1.3.) iz vsake izolirane miRNA ter opravili qPCR v triplikatih (npr. 1.1, 1.1 in 1.1). Ker smo preverjali ponovljivost rezultatov qPCR med serijami, smo enak postopek opravili trikrat. Ponovljivost rezultatov med serijami smo potrdili, saj so bile vrednosti standardne deviacije pod 1. Pri vzorcih, kjer smo uporabili začetne oligonukleotide za sintetične molekule HSA-miR-191-5p je bila standardna deviacija 0,909, pri HSA-miR-103a-3p pa je bila 0,844. Negativne kontrole se niso pomnožile, razen v enem primeru meritev ponovljivosti med serijami ($C_q = 36,254$). Vse negativne kontrole smo delali v triplikatih in ker sta bili ostali dve kontroli negativni, smo nadaljevali z delom. S tem smo dokazali zanesljivost metode na nivoju izolacije miRNA, sinteze cDNA in qPCR. Laboratorijsko delo je bilo dobro opravljeno, zato smo lahko nadaljevali z analizo vzorcev.

Preglednica 7: Prikaz rezultatov ponovljivosti qPCR med serijami.

Št. vzorca	Spike-in	1. ponovitev med serijami	2. ponovitev med serijami	3. ponovitev med serijami
		Vrednost Cq	Vrednost Cq	Vrednost Cq
1,1	HSA-miR-191-5p	31,512	31,266	31,932
1,1	HSA-miR-191-5p	32,099	30,589	31,244
1,1	HSA-miR-191-5p	32,135	30,990	31,215
1,2	HSA-miR-191-5p	32,338	31,212	32,052
1,2	HSA-miR-191-5p	31,949	31,818	31,450
1,2	HSA-miR-191-5p	32,665	31,264	32,266
1,3	HSA-miR-191-5p	32,671	31,359	31,313
1,3	HSA-miR-191-5p	32,779	30,980	31,521
1,3	HSA-miR-191-5p	32,538	31,465	31,486
1,1	HSA-miR-103a-3p	30,379	31,205	30,952
1,1	HSA-miR-103a-3p	30,432	29,713	29,557
1,1	HSA-miR-103a-3p	30,585	29,397	29,732
1,2	HSA-miR-103a-3p	31,125	30,560	30,686
1,2	HSA-miR-103a-3p	31,574	30,113	30,331
1,2	HSA-miR-103a-3p	31,865	29,617	29,893
1,3	HSA-miR-103a-3p	31,690	29,289	29,734
1,3	HSA-miR-103a-3p	31,520	29,021	30,253
1,3	HSA-miR-103a-3p	30,264	29,325	29,936

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 7: Prikaz rezultatov ponovljivosti qPCR med serijami.

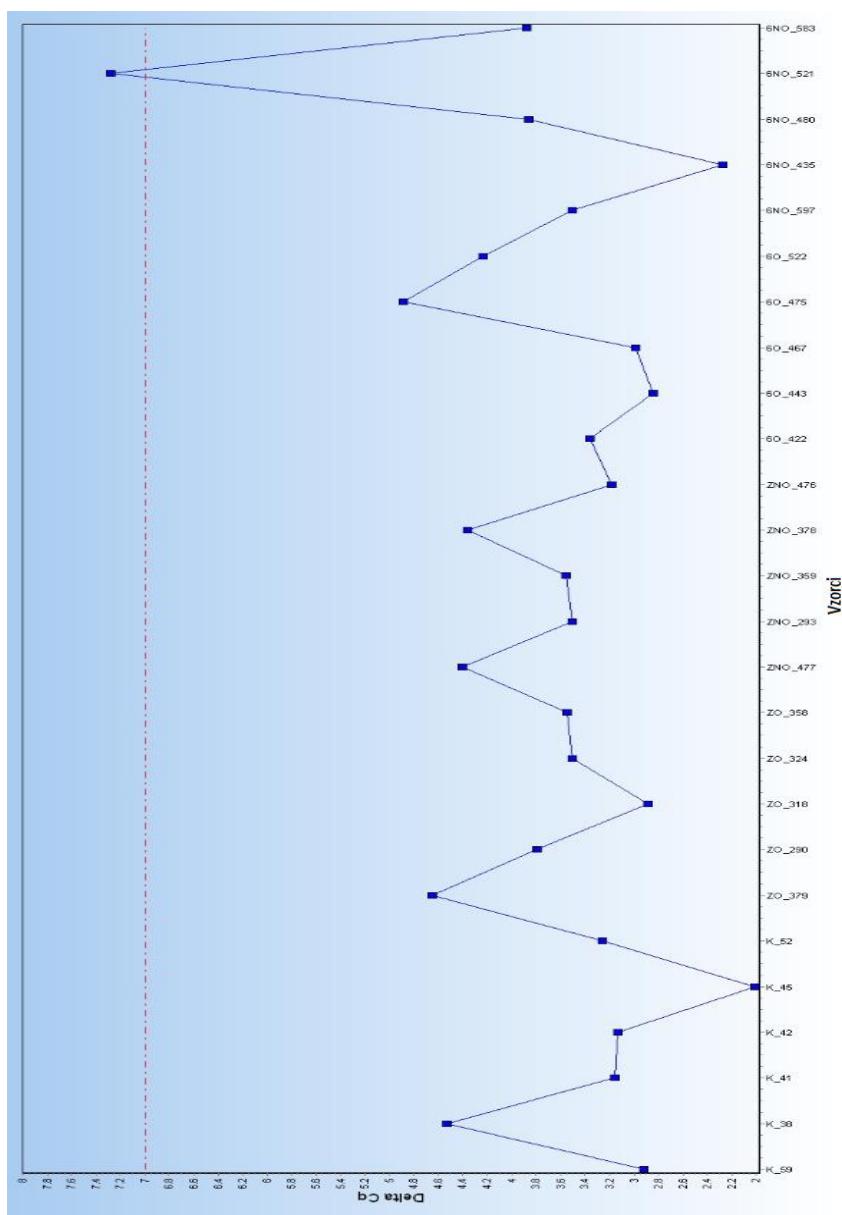
Št. vzorca	Spike-in	1. ponovitev med serijami	2. ponovitev med serijami	3. ponovitev med serijami
		Vrednost Cq	Vrednost Cq	Vrednost Cq
2,1	HSA-miR-191-5p	31,458	31,348	30,172
2,1	HSA-miR-191-5p	32,015	30,898	31,951
2,1	HSA-miR-191-5p	31,376	31,299	31,631
2,2	HSA-miR-191-5p	32,502	30,949	30,959
2,2	HSA-miR-191-5p	31,650	31,054	30,186
2,2	HSA-miR-191-5p	32,447	31,511	31,153
2,3	HSA-miR-191-5p	31,890	32,060	31,490
2,3	HSA-miR-191-5p	31,981	30,951	31,105
2,3	HSA-miR-191-5p	32,450	32,759	31,425
2,1	HSA-miR-103a-3p	30,551	29,547	29,833
2,1	HSA-miR-103a-3p	30,905	29,174	30,414
2,1	HSA-miR-103a-3p	30,348	29,690	29,491
2,2	HSA-miR-103a-3p	30,836	30,134	28,945
2,2	HSA-miR-103a-3p	30,691	32,594	28,981
2,2	HSA-miR-103a-3p	30,652	30,021	28,741
2,3	HSA-miR-103a-3p	30,522	28,456	29,432
2,3	HSA-miR-103a-3p	30,504	31,045	29,432
2,3	HSA-miR-103a-3p	30,701	28,760	29,708
3,1	HSA-miR-191-5p	31,279	34,348	31,857
3,1	HSA-miR-191-5p	31,157	36,270	30,792
3,1	HSA-miR-191-5p	31,759	34,316	31,161
3,2	HSA-miR-191-5p	32,010	31,461	30,968
3,2	HSA-miR-191-5p	31,072	31,243	31,086
3,2	HSA-miR-191-5p	31,321	31,130	31,004
3,3	HSA-miR-191-5p	31,670	30,393	31,195
3,3	HSA-miR-191-5p	31,435	31,045	30,367
3,3	HSA-miR-191-5p	31,067	30,881	30,316
3,1	HSA-miR-103a-3p	30,152	Und.	29,742
3,1	HSA-miR-103a-3p	30,814	Und.	29,435
3,1	HSA-miR-103a-3p	30,300	Und.	29,360
3,2	HSA-miR-103a-3p	29,749	28,985	29,385
3,2	HSA-miR-103a-3p	30,226	28,852	29,086
3,2	HSA-miR-103a-3p	29,505	29,610	29,229
3,3	HSA-miR-103a-3p	30,307	28,992	28,644
3,3	HSA-miR-103a-3p	30,254	29,039	28,894
3,3	HSA-miR-103a-3p	29,886	Und.	28,597

Legenda: Cq – cikel kvantifikacije; St. dev. – standardna deviacija; Und. – ni pomnožkov.

4.3 PRIMERJAVA RAVNI miRNA V SERUMU PREISKOVANIH SKUPIN

4.3.1 Test hemolize

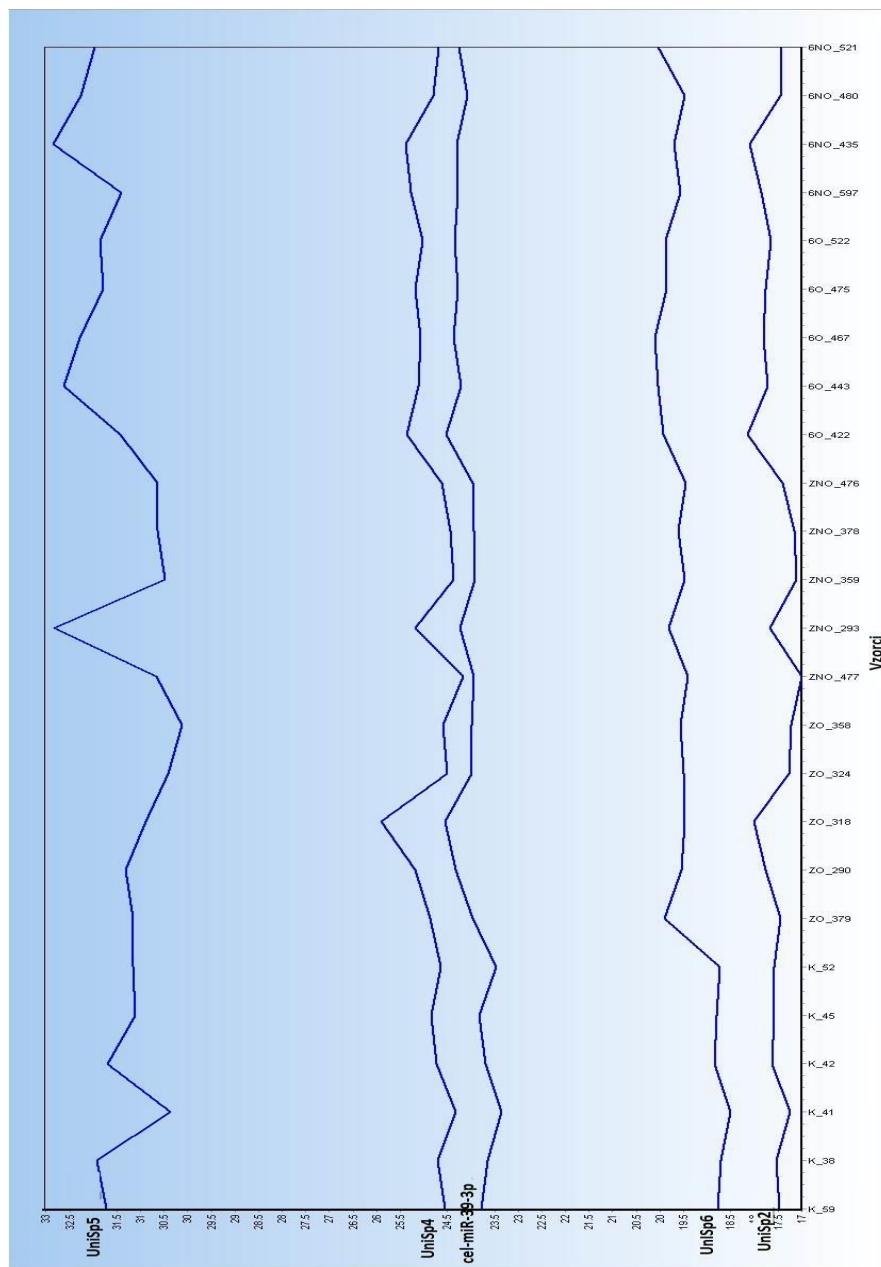
Hemolizo smo testirali, kot je opisano v poglavju 3.2.8. Graf prikazuje na osi y vrednosti ΔCq in na osi x imena vzorcev. Rezultat testa hemolize je pokazal, da pri naših vzorcih do hemolize ni prišlo, saj so bile vse vrednosti ΔCq pod 5, kar je optimalno. Le pri enem vzorcu iz skupine 6NO je bila vrednost ΔCq približno 7,3, kar kaže na možno hemolizo (slika 4). Vseeno smo vzorec pustili v analizi, saj smo se posvetovali s strokovnimi sodelavci, ki so zagotovili, da je razlika dovolj majhna, da vzorec obdržimo v analizi.



Slika 4: Grafični prikaz testa hemolize pri vseh preiskovanih vzorcih; na y osi so ΔCq vrednosti in na x osi imena vzorcev.

4.3.2 Raven kontrolnih molekul RNA v vseh preiskovanih vzorcih

Po postopku opisanem v poglavju 3.2.9 smo preverili uspešnost izolacije miRNA, sinteze cDNA in qPCR. S statistično analizo smo želeli preveriti, ali se v skupini vzorcev pojavljajo vrednosti, ki močno izstopajo (t.i. osamelci), katere bi izločili iz analize za dosego pravilnejših rezultatov. Analiza ravni kontrolnih molekul RNA v vseh preiskovanih vzorcih je pokazala, da pri vzorcih ni bilo osamelih vrednosti, Grubbsov test je bil negativen (slika 5). V analizo smo tako vključili vse vzorce.



Slika 5: Prikaz ravni kontrolnih molekul RNA v vseh preiskovanih vzorcih; os y prikazuje vrednosti Cq, os x pa imena vzorcev.

4.3.3 Raven miRNA v vzorcih bolnikov in kontrolne skupine

V preglednicah od 9 do 17 so prikazani rezultati parnih statističnih primerjav, ki smo jih pridobili z analizo vzorcev bolnikov ter zdravih oseb (poglavlje 3.2.1). V preglednicah so v prvem stolpcu imena molekul miRNA, ki smo jih analizirali. V drugem stolpcu je vrednost, ki predstavlja spremembo (\log_2) v ravni miRNA v primerjavi z drugo skupino. Pomen vrednosti t , nekorigirane p -vrednosti in korigirane p -vrednosti je opisan v poglavju 3.2.10. Predstavljeni so rezultati z nekorigirano p -vrednostjo manjšo kot 0,05. Vrednosti s korigirano p -vrednostjo manjšo od 0,05 so v preglednicah podčrtane.

Primerjave so pokazale 5 miRNA v statistično različnih ravneh znotraj različnih skupin, rezultati so prikazani v preglednici 8.

Preglednica 8: Rezultati parnih primerjav skupin vzorcev s statistično različnimi ravnimi miRNA med skupinami.

Primerjalna skupina	miRNA
Vsi bolniki pred začetkom terapije : K	hsa-miR-362-5p, hsa-miR-10b-5p
ZO : K	hsa-miR-10b-5p
6NO : K	hsa-let-7g-3p
ZNO : 6NO	hsa-let-7g-3p
ZO : ZNO	hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-31-5p

Legenda: K – kontrolna skupina; ZO – bolniki odzivni na terapijo, vzorci odvzeti pred začetkom zdravljenja; 6O – bolniki odzivni na terapijo, vzorci odvzeti 6. mesecev po začetku zdravljenja; ZNO – bolniki neodzivni na terapijo, vzorci odvzeti pred začetkom zdravljenja; 6NO - bolniki neodzivni na terapijo, vzorci odvzeti 6. mesecev po začetku zdravljenja.

Preglednica 9: Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov (bolniki, odzivni in neodzivni, vzorci odvzeti pred začetkom zdravljenja) in K (kontrolna skupina, zdrave osebe) (razmerje vsi bolniki pred začetkom zdravljenja:K).

	logFC	t	p-vred.	Korig. p-vred.
hsa.miR.362.5p	-4,128	-5,254	0,0001	<u>0,026</u>
hsa.miR.10b.5p	-1,412	-4,609	0,0003	<u>0,046</u>
hsa.miR.199a.3p	0,824	4,325	0,001	0,055
hsa.miR.486.5p	-1,075	-3,906	0,001	0,096
hsa.miR.548j	3,688	3,810	0,002	0,096
hsa.miR.98.5p	0,983	3,405	0,004	0,172
hsa.miR.95	-3,884	-3,363	0,004	0,172
hsa.miR.221.3p	0,589	3,123	0,007	0,248
hsa.miR.1913	-3,281	-3,028	0,008	0,256
hsa.miR.101.3p	-0,551	-2,965	0,009	0,256
hsa.miR.423.3p	0,601	2,953	0,010	0,256
hsa.miR.23b.3p	0,469	2,865	0,012	0,260
hsa.miR.29b.2.5p	4,348	2,863	0,012	0,260
hsa.miR.10a.5p	-3,246	-2,736	0,015	0,269
hsa.miR.342.3p	0,570	2,720	0,016	0,269
UniSp6	0,773	2,715	0,016	0,269
hsa.miR.151a.5p	0,457	2,699	0,016	0,269
hsa.miR.210	-0,890	-2,687	0,017	0,269
hsa.miR.487b	3,301	2,579	0,021	0,300
hsa.miR.133a	1,287	2,560	0,021	0,300
hsa.miR.539.5p	3,830	2,554	0,022	0,300
hsa.miR.582.5p	-0,948	-2,512	0,024	0,300
hsa.miR.1	2,206	2,511	0,024	0,300
hsa.miR.374b.5p	-0,603	-2,461	0,026	0,318
hsa.let.7g.5p	0,427	2,400	0,029	0,344
hsa.miR.548c.5p	0,725	2,346	0,033	0,368
hsa.miR.551b.3p	2,533	2,302	0,036	0,385
hsa.miR.340.3p	2,078	2,228	0,041	0,429
hsa.miR.143.3p	0,489	2,178	0,045	0,440
hsa.miR.146a.5p	0,334	2,157	0,047	0,440
hsa.miR.25.3p	-0,402	-2,153	0,047	0,440
hsa.miR.133b	1,252	2,146	0,048	0,440

Legenda: logFC – sprememba (\log_2 fold change) v ravni miRNA; t – moderirana statistika t; p-vred. – p-vrednost; Korig. p-vred. – korigirana p-vrednost.

Preglednica 10: Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov ZO (bolniki, odzivni, vzorci odvzeti pred začetkom zdravljenja) in K (kontrolna skupina, zdrave osebe) (razmerje ZO:K).

	logFC	t	p vred.	Korig. p vred.
hsa.miR.10b.5p	-1,471	-5,028	0,0002	<u>0,049</u>
hsa.miR.10a.5p	-4,761	-4,521	0,0004	0,065
hsa.miR.199a.3p	0,827	3,529	0,003	0,311
hsa.let.7g.5p	0,492	3,097	0,008	0,366
UniSp6	0,993	3,052	0,008	0,366
hsa.miR.98.5p	1,115	2,985	0,010	0,366
hsa.miR.362.5p	-3,621	-2,959	0,010	0,366
hsa.miR.486.5p	-0,973	-2,866	0,012	0,366
hsa.miR.31.5p	4,005	2,861	0,012	0,366
hsa.miR.128	0,640	2,812	0,014	0,366
hsa.miR.374b.5p	-0,836	-2,772	0,015	0,366
hsa.miR.548j	3,778	2,716	0,016	0,366
hsa.miR.539.5p	4,607	2,691	0,017	0,366
hsa.miR.423.3p	0,566	2,681	0,018	0,366
hsa.miR.133b	1,870	2,639	0,019	0,371
hsa.miR.485.3p	0,922	2,606	0,020	0,371
hsa.miR.95	-3,417	-2,471	0,027	0,455
hsa.miR.29b.2.5p	4,575	2,351	0,033	0,542
cel.miR.39.3p	0,654	2,229	0,042	0,563
hsa.miR.627	-2,808	-2,229	0,042	0,563
hsa.miR.191.5p	-0,510	-2,226	0,042	0,563
hsa.miR.24.2.5p	-0,991	-2,226	0,042	0,563
hsa.miR.30d.5p	-0,404	-2,169	0,047	0,581
hsa.miR.1908	3,120	2,163	0,048	0,581

Legenda: logFC – sprememba (\log_2 fold change) v ravni miRNA; t – moderirana statistika t; p-vred. – p-vrednost; Korig. p-vred. – korigirana p-vrednost.

Preglednica 11: Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov 6O (bolniki, odzivni, vzorci vzeti po 6. mesecih terapije) in K (kontrolna skupina, zdrave osebe) (razmerje 6O:K).

	logFC	t	p vred.	Korig. p vred.
hsa.miR.221.3p	0,686	3,486	0,003	0,481
hsa.miR.10a.5p	-3,551	-3,372	0,004	0,481
hsa.miR.95	-4,515	-3,264	0,005	0,481
hsa.miR.425.3p	-0,568	-2,900	0,011	0,481
hsa.miR.337.5p	3,477	2,832	0,013	0,481
hsa.miR.663a	-1,292	-2,825	0,013	0,481
hsa.miR.551b.3p	3,499	2,768	0,015	0,481
hsa.miR.130b.3p	0,750	2,655	0,018	0,481
hsa.miR.103a.3p	0,562	2,631	0,019	0,481
hsa.miR.107	0,625	2,611	0,020	0,481
hsa.miR.2110	-1,286	-2,591	0,021	0,481
hsa.miR.889	3,367	2,551	0,023	0,481
hsa.miR.195.5p	-1,043	-2,522	0,024	0,481
UniSp6	0,795	2,443	0,028	0,481
hsa.miR.10b.5p	-0,707	-2,417	0,029	0,481
hsa.miR.1	3,128	2,385	0,031	0,481
hsa.miR.340.3p	2,782	2,378	0,032	0,481
hsa.miR.421	1,204	2,374	0,032	0,481
hsa.miR.146a.5p	0,523	2,354	0,033	0,481
hsa.miR.337.3p	3,855	2,321	0,035	0,481
hsa.miR.382.5p	1,576	2,310	0,036	0,481
hsa.miR.574.3p	0,749	2,286	0,038	0,481
hsa.miR.219.5p	3,311	2,280	0,038	0,481
hsa.miR.490.3p	-0,739	-2,263	0,040	0,481
hsa.miR.335.3p	3,107	2,210	0,044	0,510
hsa.miR.151a.3p	0,456	2,185	0,046	0,515

Legenda: logFC – sprememba (\log_2 fold change) v ravni miRNA; t – moderirana statistika t; p-vred. – p-vrednost; Korig. p-vred. – korigirana p-vrednost.

Preglednica 12: Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov ZNO (bolniki, neodzivni na terapijo, vzorec vzet pred začetkom terapije) in K (kontrolna skupina, zdrave osebe) (razmerje ZNO:K).

	logFC	t	p vred.	Korig. p vred.
hsa.miR.362.5p	-4,635	-4,347	0,001	0,119
hsa.miR.1913	-4,826	-4,202	0,001	0,119
hsa.miR.10b.5p	-1,353	-3,821	0,002	0,171
hsa.miR.151a.5p	0,658	3,419	0,004	0,250
hsa.miR.328	1,177	3,238	0,006	0,250
hsa.miR.487b	4,599	3,150	0,007	0,250
hsa.miR.548j	3,598	3,119	0,007	0,250
hsa.miR.199a.3p	0,821	3,111	0,007	0,250
hsa.miR.30a.3p	4,019	3,089	0,008	0,250
U6.snRNA	-1,550	-2,845	0,013	0,335
hsa.miR.23b.3p	0,686	2,844	0,013	0,335
hsa.miR.181c.3p	4,555	2,799	0,014	0,335
hsa.miR.95	-4,351	-2,755	0,015	0,335
hsa.miR.551b.3p	4,175	2,723	0,016	0,335
hsa.miR.210	-1,077	-2,658	0,018	0,353
hsa.miR.28.3p	0,902	2,620	0,020	0,353
hsa.miR.106b.3p	2,535	2,599	0,021	0,353
hsa.miR.766.3p	0,996	2,504	0,025	0,368
hsa.miR.221.3p	0,832	2,482	0,026	0,368
hsa.miR.486.5p	-1,177	-2,454	0,027	0,368
hsa.miR.574.3p	0,869	2,451	0,027	0,368
hsa.miR.29b.2.5p	4,121	2,420	0,029	0,368
hsa.miR.139.5p	0,839	2,413	0,030	0,368
hsa.miR.340.3p	2,508	2,389	0,031	0,368
hsa.miR.144.5p	-1,131	-2,361	0,033	0,368
hsa.miR.98.5p	0,851	2,359	0,033	0,368
hsa.miR.143.3p	0,741	2,337	0,034	0,370
hsa.miR.25.3p	-0,555	-2,279	0,038	0,396
hsa.miR.133a	1,170	2,264	0,039	0,396
hsa.miR.26b.3p	1,316	2,235	0,042	0,405
hsa.miR.337.3p	3,471	2,208	0,044	0,412
hsa.miR.224.5p	3,252	2,179	0,046	0,414
hsa.miR.19a.3p	-0,500	-2,173	0,047	0,414

Legenda: logFC – sprememba (\log_2 fold change) v ravni miRNA; t – moderirana statistika t; p-vred. – p-vrednost; Korig. p-vred. – korigirana p-vrednost.

Preglednica 13: Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov 6NO (bolniki, neodzivni na terapijo, vzorec vzet po 6. mesecih terapije) in K (kontrolna skupina, zdrave osebe) (razmerje 6NO:K).

	logFC	t	p vred.	Korig. p vred.
hsa.let.7g.3p	4,469	5,150	0,0001	<u>0,038</u>
hsa.miR.1913	-3,784	-3,295	0,005	0,340
hsa.miR.16.1.3p	-1,374	-3,282	0,005	0,340
hsa.miR.362.5p	-3,369	-3,159	0,007	0,340
hsa.miR.221.3p	1,028	3,067	0,008	0,340
hsa.miR.574.3p	1,037	2,924	0,011	0,340
hsa.miR.576.5p	-3,277	-2,894	0,011	0,340
hsa.miR.30d.5p	0,746	2,793	0,014	0,340
hsa.miR.28.3p	0,960	2,788	0,014	0,340
hsa.miR.10a.5p	-3,779	-2,728	0,016	0,340
hsa.miR.223.3p	0,741	2,638	0,019	0,340
hsa.miR.101.3p	-0,880	-2,614	0,020	0,340
hsa.miR.21.5p	-0,476	-2,568	0,022	0,340
hsa.miR.126.5p	0,568	2,563	0,022	0,340
hsa.miR.320a	-0,668	-2,544	0,023	0,340
hsa.miR.342.3p	0,754	2,537	0,023	0,340
hsa.miR.23b.3p	0,612	2,537	0,023	0,340
hsa.miR.194.5p	-0,768	-2,535	0,023	0,340
hsa.miR.320d	-0,798	-2,532	0,023	0,340
hsa.miR.24.3p	0,815	2,518	0,024	0,340
hsa.miR.22.5p	3,233	2,487	0,026	0,340
hsa.miR.151a.5p	0,472	2,452	0,027	0,340
hsa.miR.539.5p	3,569	2,436	0,028	0,340
hsa.miR.589.5p	3,315	2,429	0,029	0,340
hsa.miR.142.5p	0,852	2,420	0,029	0,340
hsa.miR.551b.3p	3,665	2,390	0,031	0,347
hsa.miR.330.3p	3,646	2,358	0,033	0,348
hsa.miR.486.5p	-1,127	-2,350	0,033	0,348
hsa.miR.27a.3p	0,877	2,246	0,041	0,400
hsa.miR.423.3p	0,752	2,241	0,041	0,400
hsa.miR.1260a	-0,863	-2,208	0,044	0,412
hsa.miR.23a.3p	0,539	2,160	0,048	0,427

Legenda: logFC – sprememba (\log_2 fold change) v ravni miRNA; t – moderirana statistika t; p-vred. – p-vrednost; Korig. p-vred. – korigirana p-vrednost.

Preglednica 14: Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov ZO (bolniki, odzivni na terapijo, vzorec vzet pred začetkom terapije) in 6O (bolniki, odzivni, vzorci vzeti po 6. mesecih terapije) (razmerje ZO:6O).

	logFC	t	p vred.	Korig. p vred.
hsa.miR.30d.5p	-0,760	-3,909	0,001	0,281
hsa.miR.31.5p	5,528	3,781	0,002	0,281
hsa.miR.128	0,848	3,565	0,003	0,289
hsa.miR.337.5p	-4,018	-3,133	0,007	0,454
hsa.miR.151a.3p	-0,630	-2,888	0,012	0,454
hsa.miR.96.5p	3,568	2,836	0,013	0,454
hsa.miR.191.5p	-0,674	-2,815	0,013	0,454
hsa.miR.942	-3,906	-2,802	0,014	0,454
hsa.miR.98.5p	1,090	2,794	0,014	0,454
hsa.miR.590.3p	-3,210	-2,514	0,024	0,665
hsa.miR.10b.5p	-0,764	-2,500	0,025	0,665
hsa.miR.188.5p	3,910	2,378	0,032	0,772
hsa.miR.148a.3p	0,632	2,283	0,038	0,795
hsa.miR.627	-2,968	-2,255	0,040	0,795
hsa.miR.135a.5p	-3,176	-2,161	0,048	0,795
hsa.miR.505.5p	-2,818	-2,156	0,048	0,795
hsa.miR.1908	3,228	2,143	0,050	0,795

Legenda: logFC – sprememba (\log_2 fold change) v ravni miRNA; t – moderirana statistika t; p-vred. – p-vrednost; Korig. p-vred. – korigirana p-vrednost.

Preglednica 15: Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov ZNO (bolniki, neodzivni na terapijo, vzorec vzet pred začetkom terapije) in 6NO (bolniki, neodzivni na terapijo, vzorec vzet po 6. mesecih terapije) (razmerje ZNO:6NO).

	logFC	t	p vred.	Korig. p vred.
hsa.let.7g.3p	-4,558	-5,029	0,0002	0,048
hsa.miR.30a.3p	4,750	3,496	0,003	0,494
hsa.miR.576.5p	3,630	3,070	0,008	0,654
hsa.miR.93.3p	1,236	3,014	0,009	0,654
hsa.miR.328	0,956	2,519	0,024	0,832
hsa.miR.98.5p	0,940	2,496	0,025	0,832
hsa.miR.30d.5p	-0,690	-2,472	0,026	0,832
hsa.miR.330.3p	-3,966	-2,456	0,027	0,832
hsa.miR.106b.3p	2,480	2,434	0,028	0,832
hsa.let.7f.1.3p	0,900	2,431	0,028	0,832
hsa.miR.29a.5p	-1,782	-2,350	0,033	0,885
hsa.miR.22.5p	-3,106	-2,287	0,038	0,915
hsa.miR.582.5p	-2,702	-2,180	0,046	0,919
hsa.miR.485.3p	-0,898	-2,175	0,047	0,919

Legenda: logFC – sprememba (\log_2 fold change) v ravni miRNA; t – moderirana statistika t; p-vred. – p-vrednost; Korig. p-vred. – korigirana p-vrednost.

Preglednica 16: Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov ZO (bolniki, odzivni na terapijo, vzorec vzet pred začetkom terapije) in ZNO (bolniki, neodzivni na terapijo, vzorec vzet pred začetkom terapije) (razmerje ZO:ZNO).

	logFC	t	p vred.	Korig. p vred.
hsa.miR.30a.3p	-4,982	-4,420	0,0002	<u>0,031</u>
hsa.miR.31.5p	6,782	4,410	0,0002	<u>0,031</u>
hsa.miR.328	-1,106	-3,026	0,006	0,386
hsa.miR.141.3p	-1,910	-2,972	0,007	0,386
hsa.miR.485.3p	1,220	2,941	0,007	0,386
hsa.miR.885.3p	3,606	2,841	0,009	0,386
hsa.miR.126.5p	-0,596	-2,800	0,010	0,386
hsa.miR.1972	1,356	2,788	0,011	0,386
hsa.miR.125a.5p	-1,070	-2,705	0,013	0,408
hsa.miR.144.5p	1,182	2,665	0,014	0,408
hsa.miR.139.5p	-0,974	-2,563	0,018	0,430
U6.snRNA	1,506	2,533	0,019	0,430
hsa.miR.27b.3p	-0,670	-2,523	0,019	0,430
hsa.miR.154.5p	-3,778	-2,381	0,026	0,479
hsa.miR.28.3p	-0,796	-2,359	0,027	0,479
hsa.miR.337.5p	-3,414	-2,355	0,028	0,479
hsa.miR.151a.3p	-0,614	-2,351	0,028	0,479
hsa.miR.598	-2,230	-2,291	0,032	0,500
hsa.miR.1908	3,236	2,263	0,034	0,500
hsa.miR.10a.5p	-3,030	-2,253	0,034	0,500
hsa.miR.1913	3,090	2,213	0,037	0,500
hsa.miR.576.5p	-2,830	-2,209	0,038	0,500

Legenda: logFC – sprememba (\log_2 fold change) v ravni miRNA; t – moderirana statistika t; p-vred. – p-vrednost; Korig. p-vred. – korigirana p-vrednost.

Preglednica 17: Raven miRNA pri primerjalni skupini bolnikov 6O (bolniki, odzivni, vzorci vzeti po 6. mesecih terapije) in 6NO (bolniki, neodzivni na terapijo, vzorec vzet po 6. mesecih terapije) (razmerje 6O:6NO).

	logFC	t	p vred.	Korig. p vred.
hsa.let.7g.3p	-4,664	-4,137	0,0004	0,121
hsa.miR.30e.3p	-1,196	-3,329	0,003	0,435
hsa.miR.223.3p	-0,762	-2,970	0,007	0,677
hsa.miR.425.3p	-0,914	-2,601	0,016	0,801
hsa.miR.22.5p	-2,872	-2,552	0,018	0,801
hsa.miR.126.5p	-0,484	-2,273	0,033	0,801
hsa.miR.877.5p	-3,578	-2,264	0,034	0,801
hsa.miR.500a.5p	2,838	2,206	0,038	0,801
hsa.miR.582.5p	-2,280	-2,146	0,043	0,801
hsa.miR.195.5p	-1,354	-2,132	0,044	0,801

Legenda: logFC – sprememba (\log_2 fold change) v ravni miRNA; t – moderirana statistika t; p-vred. – p-vrednost; Korig. p-vred. – korigirana p-vrednost.

5 RAZPRAVA

Metodo določanja miRNA s qPCR v serumu bolnikov z dilatativno ali ishemično kardiomiotopijo smo delno validirali z določitvijo ponovljivosti rezultatov qPCR meritev v seriji in med serijami, kot je opisano v poglavjih 3.2.6.1 in 3.2.6.2. Dobili smo sprejemljive vrednosti povprečnih standardnih odklonov Cq, tako za ponovljivost rezultatov qPCR meritev v seriji, kot med serijami. Vrednosti so bile v vseh primerih ponovljivosti rezultatov qPCR v seriji, razen pri analizi z UniSp6, manjše od 1, kar je sprejemljivo (pregl. 6). Pri višjih vrednosti Cq je variabilnost večja in tako tudi standardni odklon, kar se kaže tudi v naših rezultatih določitve ponovljivosti meritev v in med serijami. V eksperimentih ugotavljanja ponovljivosti metode qPCR je bila večina naših vrednosti Cq okoli 30 cikla, to je pri vrednosti, kjer je variabilnost rezultatov lahko večja (Karlen in sod., 2007). Za oceno ponovljivosti metode qPCR sicer ne obstajajo natančno opredeljeni kriteriji, vendar nam nekateri podatki iz literature kažejo, da so naše vrednosti standardnih odklonov sprejemljive, saj so pod 1. Večjih odstopanj v variabilnosti rezultatov nismo ugotovili in menimo, da so rezultati sprejemljivi (Exiqon, 2013c).

S testom hemolize smo želeli preveriti kakovost vzorca za nadaljnje analize. Želeli smo ugotoviti ali je v katerem izmed vzorcev prišlo do hemolize (lize rdečih krvnih celic, ki vsebujejo svoje miRNA), kar se največkrat zgodi ob odvzemu vzorca in pripravi vzorca. Hemoliza spremeni profil miRNA v vzorcu in tako neposredno vpliva na rezultate. Enostaven test za hemolizo je merjenje vrednosti ΔCq med hsa-miR-23a-3p in hsa-miR-451a, ki sta indikatorja hemolize. Hsa-miR-451a je miRNA specifična za rdeče krvne celice, hsa-miR-23a-3p pa je miRNA, na katero hemoliza ne vpliva. Vrednosti ΔCq , ki so manjše od 5 so optimalne, od 5 do 7 so sprejemljive, vrednosti nad 7 pa kažejo na morebitno hemolizo vzorca (meja 7 ni točno določeno postavljena, velja za nekakšno okvirno mejo), zato se takšne vzorce lahko izloči iz študije. Pri določenih molekulah miRNA hemoliza nima vpliva na njihovo raven, zato je potrebno biti pri izločanju vzorcev iz študije zelo previden. Pri naših vzorcih je vidno, da do hemolize ni prišlo, saj so vse vrednosti ΔCq pod 5, kar je optimalno. Le pri enem vzorcu iz skupine 6NO je vrednost ΔCq približno 7,3, kar morda kaže na hemolizo (slika 4). Posvetovali smo se s strokovnimi sodelavci ter ugotovili, da lahko vzorec pustimo v študiji, saj je odstopanje še vedno zelo majhno.

Kakovost pripravljene miRNA in cDNA smo preverili s testom določanja ravni dodanih sintetičnih molekul RNA s qPCR (poglavlje 3.2.9). Statističen test ugotavljanja osamelih vrednosti Cq je pokazal negativen rezultat (slika 5). Na tak način smo izključili možnost, da bi v naših vzorcih bili prisotni inhibitorji, ki bi lahko vplivali na končno statistično analizo. Ker smo v vse vzorce dodali enako količino sintetičnih molekul RNA in ker smo uporabili povsod enake količine vzorca, bi morala biti raven sintetičnih molekul miRNA povsod enaka. Temu ni tako, kadar je delo laboratorijskega tehnika površno ali kadar so v vzorcu prisotni inhibitorji, ki znižajo določitev ravni miRNA. S testom vidimo katere

vzorce je morda bolje izločiti iz analize, saj bi preveč vplivali na rezultate. V naših rezultatih osamelih vrednosti ni bilo, torej je bilo laboratorijsko delo dobro opravljeno.

Po uspešni vpeljavi nove metode izolacije miRNA smo se lotili analize vzorcev. V raziskavo smo vključili odzivne in neodzivne bolnike na terapijo s KMC, ter kontrolno skupino zdravih ljudi. Ker smo želeli preveriti, ali se profil molekul miRNA v serumu posameznika spremeni po terapiji z matičnimi celicami, smo vsakemu bolniku odvzeli vzorec seruma pred in po terapiji. Skupaj smo tako imeli 26 vzorcev – 5 vzorcev serumu odzivnih ljudi na terapijo, vzorci so bili odvzeti pred terapijo (ZO), 5 neodzivnih ljudi na terapijo, katerih vzorci so bili vzeti pred terapijo (ZNO), 5 vzorcev serumu odzivnih ljudi na terapijo, vzorce smo vzeli 6. mesecev po terapiji (6O) in 5 vzorcev serumu neodzivnih ljudi na terapijo, vzorce smo vzeli 6. mesecev po terapiji (6NO). Vse skupine smo primerjali med seboj ter s kontrolno skupino (6 zdravih oseb; K):

- ZO in ZNO
- 6O in 6NO
- ZO in 6O
- ZNO in 6NO
- ZO in K
- ZNO in K
- 6O in K
- 6NO in K
- ZO, ZNO in K

Bistven rezultat naloge so parne primerjave ravni molekul miRNA. Ob analizi rezultatov smo kot parameter določanja statističnih razlik vzeli korigirano *p*-vrednost < 0,05. S tem smo zagotovili, da je možnost lažno pozitivnih rezultatov manjša od 5 %. Korigirano *p*-vrednost smo izračunali po metodi BH (Benjamini in Hochberg), ki je standardna metoda za korekcijo napake večkratnega testiranja in dobro deluje v primerih, ko podatki med seboj niso povsem neodvisni (Benjamini in Hochberg, 1995).

V primerjalni skupini **ZO-K** (vzorci odzivnih bolnikov, odvzetih pred začetkom zdravljenja v primerjavi s kontrolno skupino zdravih ljudi) smo odkrili, da ima molekula hsa-miR-10b-5p statistično različno raven. V skupini K je bila raven omenjene miRNA 2,77-krat višja kot v skupini ZO.

Hsa-miR-10b-5p je molekula miRNA, katere zapis je znotraj gruče genov *HOX*. Geni *HOX* imajo pomembno vlogo med embrionalnim razvojem. Kodirajo transkripcijske faktorje z visoko ohranjeno domeno »homeobox«, ki skrbijo za pravilni razvoj anteriorne ter posteriorne osi telesa. Ob prepisovanju genov *HOX* nastanejo tudi različne nekodirajoče molekule RNA, med katerimi sta pri sesalcih tudi miR-10a in miR-10b. Tarča molekul

miR-10a/b naj bi bili prepisi *HOX* genov – *HOXA1*, *HOXA3*, *HOXD10* ter *USF2*, *Ran*, *Pbp1* ter nekatere mRNA ribosomskih proteinov (Lund, 2010).

Do sedaj edina odkrita regulatorja molekul miR-10a in miR-10b sta proteina p65 in TWIST. p65 je podenota transkripcjskega kompleksa NF κ B (jedrni faktor κ B), ki skrbi za stresni in imunski odziv celic ter preživetje celic. p65 naj bi se vezal neposredno na promotor gena za miRNA ter s tem induciral ekspresijo, kar so dokazali v mišjih embrijskih matičnih celicah. V človeških aortnih endotelijskih celicah so pokazali, da se z zmanjšanjem ravni molekule miR-10a poveča količina p65 v jedru. Ker je le-ta zadolžen in nujno potreben za delovanje kompleksa NF κ B, je s tem morda povezana uspešnost zdravljenja srčnega popuščanja. Zanimivo je tudi odkritje, da ima miR-10a pomembno vlogo pri proteinski sintezi, saj je zmožna okrepliti translacijo mRNA, z vezavo na motiv TOP (angl. *5'-terminal oligopyrimidine*). Motiv TOP je *cis* regulatorni translacijski element molekul mRNA, ki kodirajo ribosomske proteine. To so dokazali v mišjih embrijskih matičnih celicah, kjer je povečana sinteza miR-10a pripeljala do povečane celične proteinske sinteze, z inhibicijo miR-10a pa se je sinteza določenih proteinov zmanjšala (Tehler in sod., 2011). Molekule miR-10 sodelujejo tudi pri angiogenezi, kar so dokazali *in vivo* pri zebrici (lat. *Danio rerio*) ter pri celični liniji HUVEC (angl. *human umbilical vein endothelial cells*). Izguba ali manjša raven miR-10 prizadene proces angiogeneze, ki je nujno potreben za popravljanje srčnih poškodb. Tarča molekul miR-10 naj bi bila mRNA, ki kodira FLT1 (receptor vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja) in sFLT1 (njegova topna različica), kar so dokazali pri zebrici. Dokazali so, da pomanjkanje molekul miR-10 pripelje do povečanih količin proteinov FLT1 in sFLT1. Aktivirani FLT1 in sFLT1 pripeljejo do napak angiogeneze in endotelijske celične proliferacije, kar nakazuje na pozitiven vpliv prisotnih molekul miR-10 pri patogenezi (Hassel in sod., 2012).

Ker je raziskav na področju delovanja miR-10b in vplivov na delovanje človeškega telesa premalo, lahko o njihovih vlogah le ugibamo. Zaenkrat so bile z raziskavami največkrat dokazane povezave med miR-10b in rakom (Lund, 2010; Tehler in sod., 2011), zato je naše odkritje morda pokazalo dodatno potencialno vlogo tudi pri srčnem popuščanju.

V primerjalni skupini **6NO-K** (vzorci odzivnih bolnikov, odvzeti 6. mesecev po terapiji v primerjavi s kontrolno skupino zdravih ljudi) smo odkrili statistično značilno drugačno raven miRNA hsa-let-7g-3p. Pri skupini vzorcev 6NO je bila raven omenjene miRNA v serumu 22,15-krat večja pri bolnikih kot v kontrolni skupini. Omenjeno miRNA smo odkrili tudi pri primerjavi **ZNO-6NO** (vzorci odvzeti neodzivnim bolnikom pred začetkom terapije, v primerjavi z vzorci vzetimi po 6. mesecih terapije), kjer je bila raven hsa-let-7g-3p v skupini 6NO 23,56-krat višja kot v skupini vzorcev ZNO. Pri primerjavi skupin **6O-6NO** smo ravno tako ugotovili različno raven let-7g miRNA, kjer je bila v skupini 6NO 25,35-krat višja kot v skupini 6O (čeprav rezultat ni statistično zanesljiv, saj je *p*-vrednost > 0,05). Pojavlja se torej vzorec povečane ravni let-7g miRNA v serumu skupine

neodzivnih bolnikov, zato bi lahko bila let-7g miRNA potencialni biološki označevalec neuspešnega zdravljenja srčnega popuščanja.

Družina molekul let-7 vsebuje 13 različnih molekul miRNA. Te miRNA v večjih količinah nastajajo v kardiomiocitih, gladkomišičnih celicah koronarnih žil in endotelnih celicah. miRNA let-7 naj bi imele pomembno regulatorno vlogo pri razvoju, funkcijah in boleznih kardiovaskularnega sistema (Cheng in sod., 2007; Bao in sod., 2013). Molekule let-7 so povezali z različnimi kardiovaskularnimi obolenji – hipertrofijo srca, srčno fibrozo, miokardnim infarktom, ishemično in dilatativno kardiomiopatijo ter srčnim popuščanjem (Bao in sod., 2013; Sun in Wang, 2011). Z *in vivo* študijo so pri 25 bolnikih z dilatativno kardiomiopatijo in 19 bolnikih z ishemično kardiomiopatijo opazili povečane ravni nekaterih molekul iz družine let-7 (Ikeda in sod., 2007). Njihov natančen način delovanja še ni poznan, vendar kljub vsemu iz leta v leto pridobivamo več informacij o potencialnih tarčah molekul let-7, s čimer spoznavamo njihov pomemben vpliv na delovanje človeškega telesa. Zaenkrat lahko le ugibamo, ali je molekula let-7 v naši raziskavi kazalec slabšega odziva bolnikov na zdravljenje srčnega popuščanja s KMC.

V primerjalni skupini **ZO-ZNO** (vzorci odzivnih bolnikov, odvzetih pred začetkom terapije v primerjavi z vzorci neodzivnih bolnikov, odvzetih po 6. mesecih terapije) smo odkrili dve molekuli miRNA, katerih raven je bila signifikantno drugačna med skupinama – hsa-miR-30a-3p in hsa-miR-31-5p. Pri hsa-miR-30a-3p je bila raven v skupini ZNO 31,6-krat višja kot pri ZO, raven hsa-miR-31-5p pa 110-krat višja pri ZO, v primerjavi z skupino ZNO.

Molekule hsa-miR-30a so v veliki količini v kardiomiocitih. V povezavi s srčnimi obolenji je bilo raziskav dokaj malo, miR-30a so do danes največkrat povezali z rakavimi obolenji. Kljub vsemu so vidne povezave tudi med miR-30a in srčnim popuščanjem, kar so dokazali Duisters in sodelavci leta 2009. Z *in vivo* študijami pri miših so pokazali vlogo miR-30a pri sintezi profibrotičnega rastnega faktorja (CTGF), kjer naj bi miR-30a delovale kot negativni regulatorji ekspresije. CTGF je nujen za sintezo zunajceličnega matriksa (ECM), ki je potreben za odziv na določene patološke dražljaje okolja. Pri srčnem popuščanju pride do različnih strukturnih sprememb, najbolj pogosta je hipertrofija miocit ter nakopičenje ECM. Molekule iz družine miR-30 naj bi v zdravem srcu skrbele za regulacijo sinteze CTGF, s tem uravnavače sintezo ECM in kolagenov ter usmerjale zdravo delovanje srca. Celice zdravega srca so sposobne razgrajevati komponente ECM ter jih na novo sintetizirati. Če ta mehanizem ne deluje dobro (če je npr. raven miR-30 spremenjena), lahko pride do premajhne potrebne količine ECM ali kopiranja proteinov ECM ter do porušenega ravnovesja proteinov, kar lahko vodi v bolezensko stanje (Duisters in sod., 2009).

Pomembno odkritje Wijnena in sodelavcev je povečano raven molekule miR-30c direktno povezano z dilatativno kardiomiopatijo *in vivo* pri transgenih miših. Dokazali so, da pride ob povečani ravni miR-30c v kardiomiocitih do motenega delovanja mitohondrijev oz.

oksidativnih fosforilacijskih kompleksov (OXPHOS). Kot zaključek so podali, da miRNA reprimirajo gene za nastanek proteinov kompleksa OXPHOS, zaradi česar pride do napačnega delovanja mitohondrijev v kardiomiocitih ter s tem nepravilnega delovanja srca (Wijnen in sod., 2014).

Iz literature lahko le sklepamo o resničnih vlogah miR-30a. Če sklepamo po podatkih iz literature, da je raven miRNA v serumu pokazatelj patoloških sprememb v telesu, je naš rezultat zanimiv. Morda kaže na to, da je v skupini neodzivnih bolnikov do neodzivnosti prišlo zaradi okvare mitohondrijev kardiomiocit.

Molekulo hsa-miR-31-5p so do sedaj največkrat povezovali z različnimi vrstami rakavih obolenj. Njeno kompleksno vlogo so pokazali rezultati raziskav vzorcev bolnikov z rakavim obolenjem, kjer so ponekod dokazali povečano, drugod zmanjšano raven hsa-miR-31. Prav tako so v določenih študijah navedli, da deluje kot onkogen, drugod pa da deluje kot zaviralec tumorjev (tumorski supresor). V literaturi so opisane povezave tudi z drugimi obolenji, tudi boleznimi srca in ožilja (Wang S. in sod., 2014).

miR-31 so povezali s koronarno boleznijo žil (CAD), kjer so v serumu bolnikov s CAD dokazali zmanjšano raven miR-31. miR-31 naj bi pozitivno vplivala na endotelne predniške celice (EPC, izvirajo iz kostnega mozga, sposobne diferenciacije v endotelne celice), ki igrajo pomembno vlogo pri popravljanju poškodb. Na primer – po srčni kapi EPC skrbijo za ponovno vzpostavitev krvnega dotoka, kar je ključno za izboljšanje bolnikovega stanja. Nepravilno delovanje endotelija in EPC, ki vzdržujejo homeostazo, vodi v nastanek različnih motenj in bolezenskih stanj. Na EPC naj bi miR-31 vplivala z represijo sinteze FAT4 (protokadherina 4) in TBXA4R (receptor tromboksan A2). Oba kažeta povečano raven v EPC pri bolnikih s CAD in naj bi negativno vplivala na angiogeno aktivnost EPC, visoke ravni TBXA2R pa so tudi že povezali z aterosklerozo in hipertenzijo. Višja raven miR-31 naj bi izboljšala angiogenezo in vaskulogenezo, torej naj bi se izboljšalo delovanje EPC, kar so dokazali z *in vivo* študijami pri miših (Wang H. W. in sod., 2014).

miR-31 naj bi bil regulator nastanka integrinov, njihova tarča so α podenote integrinov $\beta 1$ in $\beta 3$. Integrini so ključni pri nastanku medceličnih povezav, medcelični komunikaciji, pri znotrajceličnem preurejanju citoskeleta in migraciji celic. Integrini sodelujejo z ECM in omogočijo različne procese, kot je razvoj organov, zdravljenje poškodb, patološki odziv, itd.. Spremenjeno ravnovesje sinteze integrinov lahko vpliva na številne biološke poti, kar lahko posledično pripelje do bolezenskih stanj (Augoff in sod., 2011; Wang S. in sod., 2014).

Podobno kot za molekulo hsa-miR-30a lahko tudi za molekulo hsa-miR-31 sklepamo, da je odraz različnega dogajanja v telesu, v srcu. V našem primeru bi rezultati lahko pomenili, da zmanjšana raven hsa-miR-31 pripelje do neuspešnega zdravljenja, saj miR-31 ne vpliva na elemente popravljalnih poti, ki bi lahko pripeljali do izboljšanja zdravstvenega stanja ali

pa vpliva na sintezo integrinov (Wang H. W. in sod., 2014). Seveda lahko o vplivih le sklepamo, težko je napovedovati povezave z boleznimi, saj je zaenkrat narejeno pre malo raziskav.

Za našo študijo so morda najpomembnejši rezultati primerjave vzorcev vseh bolnikov (odzivnih in neodzivnih bolnikov, pred terapijo) s kontrolno skupino zdravih ljudi (**ZO, ZNO:K**). S primerjavo vzorcev smo dokazali statistično drugačno raven dveh molekul miRNA – hsa-miR-362-5p in hsa-miR-10b-5p. V skupini kontrolnih vzorcev, je bila raven hsa-miR-362-5p približno 17,48-krat višja, raven hsa-miR-10b-5p pa približno 2,66-krat višja, kot v skupini bolnikov.

Molekula hsa-miR-362-5p je slabo poznana miRNA, v literaturi je zelo redko navedena. Povezali so jo le z rakom na želodcu in karcinomom jeter. miR-362 naj bi z vezavo na mRNA, ki nosi zapis za tumorski supresor CYLD, inducirala proliferacijo in apoptozno rezistenco tumorskih celic z inaktivacijo signaliziranja NF κ B, kar so dokazali s pomočjo tumorskih celičnih linij in človeških tkivnih vzorcev (Xia in sod., 2014).

Iz naših rezultatov bi lahko sklepali, da sta miR-362 in miR-10b lahko potencialna biološka pokazatelja srčnega popuščanja. Ker je bila sinteza miR-10 v vzorcih bolnikov manjša, v kontrolnih vzorcih pa večja, bi lahko sklepali, da zmanjšana raven miR-10b posredno vpliva na nastanek srčnega popuščanja. Našo domnevo delno potrjujejo rezultati, kjer smo med seboj primerjali ZO in K ter dokazali nižjo raven v skupini bolnikov.

Morda bi bilo zanimivo pri bolnikih preveriti mutacije v genih, ki kodirajo proteine, ki sodelujejo pri zorenju molekul pri-miRNA in pre-miRNA. Dokazali so že, da mutacija gena, ki kodira encim Dicer, v srčnem tkivu pri miših pripelje do dilatativne kardiomiopatije, srčnega popuščanja in smrti (Chen J. F. in sod., 2008; Calway in Kim, 2015). Prav tako bi bil zanimiv vpogled v profile miRNA znotraj presajenih matičnih celic, saj imajo tudi te specifične molekule, ki morda vplivajo na delovanje srčnih celic in na izid zdravljenja.

Pomembno je vedeti, da je raven nekaterih miRNA specifična za določen organ in določeno bolezen, zato moramo biti pri podajanju zaključkov o delovanju molekul miRNA pazljivi. Da bi lahko podali končne rezultate in z gotovostjo potrdili vlogo teh molekul, bo potrebno razviti nove metode, opraviti številne raziskave ter pridobiti veliko znanja na različnih področjih, česar zaenkrat z današnjo tehnologijo še ni mogoče. Ker pa je v današnjem času napredek hiter, ne dvomimo, da bomo v prihodnosti znali odpraviti vse ovire in na enostaven, neinvaziven način s pomočjo miRNA določili nekatera bolezenska stanja ter predispozicije za njih. Menimo, da bodo raziskovalci v prihodnosti najverjetneje razvili načine zdravljenja, ki bodo vključevale miRNA.

6 SKLEPI

- Z zastavljenim protokolom smo uspešno izolirali miRNA in ugotovili kakšne so njihove ravni v serumu preiskovancev. Ponovljivost analizne metode smo dokazali s ponovljivostjo rezultatov meritev v seriji in med serijami.
- S testom hemolize smo dokazali, da so vsi naši vzorci sprejemljivi za nadaljnjo analizo, saj niso bili izpostavljeni hemolizi, torej so bili profili miRNA zanesljivi.
- Analiza ravni kontrolnih molekul RNA v vseh preiskovanih vzorcih je pokazala, da pri vzorcih ni bilo osamelih vrednosti. S tem smo dokazali ponovljivost izolacije, sinteze cDNA in reakcije qPCR.
- Ugotovili smo razlike v ravni nekaterih molekul miRNA v serumu med zdravimi preiskovanci in bolniki z napredovalim srčnim popuščanjem zaradi dilatativne ali ishemične kardiomiopatije.
- Ugotovili smo razlike v ravni nekaterih molekul miRNA v serumu med bolniki z napredovalim srčnim popuščanjem zaradi dilatativne ali ishemične kardiomiopatije, ki so odzivni na zdravljenje s krvotvornimi matičnimi celicami in bolniki, ki na zdravljenje niso odzivni.
- Odkrili smo 5 molekul miRNA, ki bi lahko bile potencialni biološki označevalci za srčno popuščanje ali za ne/uspešno zdravljenje srčnega popuščanja in sicer hsa-miR-10b-5p, hsa-let-7g-3p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-31-5p in hsa-miR-362-5p.
- hsa-miR-10b je lahko potencialni biološki pokazatelj srčnega popuščanja, saj zmanjšana raven morda lahko (glede na literaturo) posredno vpliva na nastanek srčnega popuščanja.
- let-7 miRNA morda kaže na neodzivnost bolnikov na terapijo, saj smo jo zaznali v primerjavnih skupinah ZNO-6NO, 6NO-K (korig. *p*-vrednost < 0,05) ter v skupini 6O-6NO (korig. *p*-vrednost > 0,05).
- hsa-miR-30a-3p in hsa-miR-31-5p sta morda pokazatelja (ne)uspešnega zdravljenja srčnega popuščanja z matičnimi celicami, saj se njune ravni razlikujeta med skupino odzivnih in neodzivnih bolnikov na terapijo.
- hsa-miR-362-5p in miR-10b sta morda pokazatelja srčnega popuščanja, saj se pojavljata pri skupini odzivnih in neodzivnih bolnikih v primerjavi s kontrolo.

7 POVZETEK

Molekule mikro RNA so endogene nekodirajoče enoverižne ribonukleinske kisline, dolge približno 22 nukleotidov. Z vezavo na tarčne elemente vplivajo na utišanje genov, največkrat post-transkripcijsko. Pri človeku najdemo molekule miRNA tako znotraj kot tudi izven celic v številnih telesnih tekočinah, kot je npr. serum. Spremembe v sestavi in ravni miRNA so lahko povezane z različnimi patološkimi stanji, zato lahko takšne miRNA uporabimo kot biološke označevalce za prisotnost ali napovedovanje poteka bolezni, tudi ishemične in dilatativne kardiomiopatije.

Z metodami reverzne transkripcije in kvantitativne verižne reakcije s polimerazo smo iz vzorcev seruma, odvzetih pred in po terapiji odzivnih in neodzivnih bolnikov, določili profile in raven različnih molekul miRNA. Pred obdelavo vzorcev je bilo potrebno optimizirati postopke sinteze cDNA ter qPCR, s čimer smo zagotovili najbolj optimalen izkoristek in natančne rezultate. S ponovljivostjo meritev v in med serijami smo dokazali, da je naša metoda zanesljiva in primerna za uporabo na naših vzorcih.

S statistično obdelavo pridobljenih rezultatov smo odkrili 5 molekul miRNA, katerih raven je bila statistično različna med vzorci in ki bi potencialno lahko bile pokazatelji srčnega popuščanja, napredovanja bolezni ali ne/odzivnosti na terapijo. Te miRNA so hsa-miR-10b-5p, hsa-let-7g-3p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-31-5p in hsa-miR-362-5p. Z gotovostjo še vedno ne moremo potrditi njihove natančne vloge, vendar smo s študijo potrdili zastavljene hipoteze in dosegli cilje.

8 VIRI

- Ai J., Zhang R., Li Y., Pu J., Lu Y., Jiao J., Li K., Yu B., Li Z., Wang R., Wang L., Li Q., Wang N., Shan H., Li Z., Yang B. 2010. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391, 1: 73-77.
- Ambros V., Bartel B., Bartel D.P., Burge C.B., Carrington J.C., Chen X., Dreyfuss G., Eddy S.R., Griffiths-Jones S., Marshall M., Matzke M., Ruvkun G., Tuschl T. 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA Journal*, 9, 3: 277-279.
- Androulakis, A.E., Andrikopoulos G.K., Richter D.J., Tentolouris C.A., Avgeropoulou C.C., Adamopoulos D.A., Toutouzas P.K., Trikas A.G., Stefanadis C.I., Gialafos J.E. 2000. The role of carotid atherosclerosis in the distinction between ischaemic and non-ischaemic cardiomyopathy. *European Heart Journal*, 21, 11: 919-926.
- Augoff K., Das M., Bialkowska K., McCue B., Plow E.F., Sossey-Alaoui K. 2011. miR-31 is a broad regulator of beta1-integrin expression and function in cancer cells. *Molecular Cancer Research*, 9, 11: 1500-1508.
- Bao M.H., Feng X., Zhang Y.W., Lou X.Y., Cheng Y., Zhou H.H. 2013. Let-7 in cardiovascular diseases, heart development and cardiovascular differentiation from stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 11: 23086-23102.
- Benes V., Castoldi M. 2010. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*, 50, 4: 244-249.
- Benjamini Y., Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 57: 289–300.
- Bohnsack M.T., Czaplinski K., Gorlich D. 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10, 2: 185-191.
- Bui A.L., Horwitz T.B., Fonarow G.C. 2011. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nature Reviews (Cardiology)*, 8, 1: 30-41.
- Bushati N., Cohen S.M. 2007. microRNA functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23: 175-205.
- Bustin S.A., Benes, V., Garson, J.A. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time pcr experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 4: 611–622.

- Calway T., Kim G.H. 2015. Harnessing the therapeutic potential of microRNAs for cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 20, 2: 131-143.
- Chen J.F., Murchison E.P., Tang R., Callis T.E., Tatsuguchi M., Deng Z., Rojas M., Hammond S.M., Schneider M.D., Selzman C.H., Meissner G., Patterson C., Hannon G.J., Wang D.Z. 2008. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 6: 2111-2116.
- Chen X., Ba Y., Ma L., Cai X., Yin Y., Wang K., Guo J., Zhang Y., Chen J., Guo X., Li Q., Li X., Wang W., Zhang Y., Wang J., Jiang X., Xiang Y., Xu C., Zheng P., Zhang J., Li R., Zhang H., Shang X., Gong T., Ning G., Wang J., Zen K., Zhang J., Zhang C.Y. 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18, 10: 997-1006.
- Chendrimada T.P., Finn K.J., Ji X., Baillat D., Gregory R.I., Liebhhaber S.A., Pasquinelli A.E., Shiekhattar R. 2007. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, 447, 7146: 823-828.
- Cheng Y., Ji R., Yue J., Yang J., Liu X., Chen H., Dean D.B., Zhang C. 2007. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *American Journal of Pathology*, 170, 6: 1831-1840.
- Cheng Y., Tan N., Yang J., Liu X., Cao X., He P., Dong X., Qin S., Zhang C. 2010. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clinical Science*, 119, 2: 87-95.
- Chim S.S., Shing T.K., Hung E.C., Leung T.Y., Lau T.K., Chiu R.W., Lo Y.M. 2008. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clinical Chemistry*, 54, 3: 482-490.
- Creemers E.E., Tijsen A.J., Pinto Y.M. 2012. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circulation Research*, 110, 3: 483-495.
- D'Alessandra Y., Devanna P., Limana F., Straino S., Di Carlo A., Brambilla P.G., Rubino M., Carena M.C., Spazzafumo L., De Simone M., Micheli B., Biglioli P., Achilli F., Martelli F., Maggiolini S., Marenzi G., Pompilio G., Capogrossi M.C. 2010. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European Heart Journal*, 31, 22: 2765-2773.

- Dickstein K., Cohen-Solal A., Filippatos G., McMurray J.J., Ponikowski P., Poole-Wilson P.A., Strömberg A., van Veldhuisen D.J., Atar D., Hoes A.W., Keren A., Mebazaa A., Nieminen M., Priori S.G., Swedberg K. 2008. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008. European Journal of Heart Failure, 10, 10: 933-989.
- Doessing H., Vester B. 2011. Locked and unlocked nucleosides in functional nucleic acids. *Molecules*, 16, 6: 4511-4526.
- Duisters R.F., Tijsen A.J., Schroen B., Leenders J.J., Lentink V., van der Made I., Herias V., van Leeuwen R.E., Schellings M.W., Barenbrug P., Maessen J.G., Heymans S., Pinto Y.M., Creemers E.E. 2009. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circulation Research*, 104, 2: 170-178.
- Etheridge A., Gomes C.P., Pereira R.W., Galas D., Wang K. 2013. The complexity, function and applications of RNA in circulation. *Frontiers in Genetics*, 4: 115, doi: 10.3389/fgene.2013.00115: 8 str.
- Exiqon. 2014. Data Analysis Guide: For the miRCURY LNA™ Universal RT microRNA Ready-to-Use PCR panels using Exiqon GenEx software. Vedbaek, Exiqon: 55 str.
- Exiqon. 2013a. miRCURY™ RNA Isolation Kit - Biofluids (Instruction manual V1.2). Vedbaek, Exiqon: 28 str.
- Exiqon. 2013b. miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR - serum/plasma and other biofluid samples (Instruction manual v5.2). Vadbaek, Exiqon: 70 str.
- Exiqon. 2013c. Profiling of microRNA in serum/plasma and other biofluids - Guidelines for the miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR System, version 3.1. Vadbaek, Exiqon: 12 str.
- Farina N.H., Wood M.E., Perrapato S.D., Francklyn C.S., Stein G.S., Stein J.L., Lian J.B. 2014. Standardizing analysis of circulating microRNA: clinical and biological relevance. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115, 5: 805-811.
- Fichtlscherer S., De Rosa S., Fox H., Schwietz T., Fischer A., Liebetrau C., Weber M., Hamm C.W., Röxe T., Müller-Ardogan M., Bonauer A., Zeiher A.M., Dimmeler S. 2010. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation Research*, 107, 5: 677-684.
- Fichtlscherer S., Zeiher A.M., Dimmeler S. 2011. Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardiovascular diseases? *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 31, 11: 2383-2390.

- Gradecki I. 2009. Diagnostična obravnava ishemične kardiomiopatije v bolnišnici. V: Ishemična kardiomiopatija - celovita obravnava bolnika. Četrti posvet o kronični koronarni bolezni, Novo mesto, 9. maj 2009. Bunc M., Gradecki I. (ur.). Novo mesto, Društvo za izobraževanje in raziskovanje v medicini: 13-17.
- Gregory R.I., Chendrimada T.P., Cooch N., Shiekhattar R. 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123, 4: 631-640.
- Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S., Bateman A., Enright A.J. 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34: 140-144.
- Gupta S.K., Bang C., Thum T. 2010. Circulating microRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease. *Circulation (Cardiovascular Genetics)*, 3, 5: 484-488.
- Güttler T., Görlich D. 2011. Ran-dependent nuclear export mediators: a structural perspective. *EMBO Journal*, 30, 17: 3457-3474.
- Ha M., Kim V.N. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews (Molecular Cell Biology)*, 15, 8: 509-524.
- Hassel D., Cheng P., White M.P., Ivey K.N., Kroll J., Augustin H.G., Katus H.A., Stainier D.Y., Srivastava D. 2012. MicroRNA-10 regulates the angiogenic behavior of zebrafish and human endothelial cells by promoting vascular endothelial growth factor signaling. *Circulation Research*, 111, 11: 1421-1433.
- Hunter M.P., Ismail N., Zhang X., Aguda B.D., Lee E.J., Yu L., Xiao T., Schafer J., Ting Lee M.L., Schmittgen T.D., Nana Sinkam S.P., Jarjoura D., Marsh C.B. 2008. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, 3, 11: e3694, doi.:10.1371/journal.pone.0003694: 11 str.
- Ikeda S., Kong S.W., Lu J., Bisping E., Zhang H., Allen P.D., Golub T.R., Pieske B., Pu W.T. 2007. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiological Genomics*, 31, 3: 367-373.
- Karlen Y., McNair A., Perseguers S., Mazza C., Mermod N. 2007. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8, 131, doi:10.1186/1471-2105-8-131: 16 str.
- Kennedy B., Arar K., Reja V., Henry R.J. 2006. Locked nucleic acids for optimizing displacement probes for quantitative real-time PCR. *Analytical Biochemistry*, 348, 2: 294-299.

- Kirschner M. B., Edelman J.J., Kao S.C., Vallely M.P., van Zandwijk N., Reid G. 2013. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers. *Frontiers in Genetics*, 4: 94, doi: 10.3389/fgene.2013.00094: 13 str.
- Kroh E.M., Parkin R.K., Mitchell P.S., Tewari M. 2010. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 50, 4: 298-301.
- Krol J., Loedige I., Filipowicz W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 11, 9: 597-610.
- Lagos Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294, 5543: 853-858.
- Lawrie C.H., Gal S., Dunlop H.M., Pushkaran B., Liggins A.P., Pulford K. 2008. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, 141, 5: 672-675.
- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75, 5: 843-854.
- Lee R.C., Ambros V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 5543: 862-864.
- Life technologies. 2012. Real-time PCR handbook. Waltham, Life Technologies Corporation: 70 str.
- Lund A.H. 2010. miR-10 in development and cancer. *Cell Death and Differentiation*, 17, 2: 209-214.
- Mayo Clinic. 2014. Diseases and conditions - dilated cardiomyopathy. Rochester, Mayo Clinic: 6 str.
<http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/dilated-cardiomyopathy/basics/definition/con-20032887> (29. sept. 2015)
- McAlexander M.A., Phillips M.J., Witwer K.W. 2013. Comparison of methods for miRNA extraction from plasma and quantitative recovery of RNA from cerebrospinal fluid. *Frontiers in Genetics*, 4: 83, doi: 10.3389/fgene.2013.00083, str: 8.
- Mestdagh P., Van Vlierberghe P., De Weer A., Muth D., Westermann F., Speleman F., Vandesompele J. 2009. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biology*, 10, 6: R64, doi: 10.1186/gb-2009-10-6-r64: 10 str.

Mestdagh P., Hartmann N., Baeriswyl L. Andreasen D., Bernard N., Chen C., Cheo D., D'Andrade P., DeMayo M., Dennis L., Derveaux S., Feng Y., Fulmer-Smentek S., Gerstmayer B., Gouffon J., Grimley C., Lader E., Lee K.Y., Luo S., Mouritzen P., Narayanan A., Patel S., Peiffer S., Rüberg S., Schroth G., Schuster D., Shaffer JM., Shelton E.J., Silveria S., Ulmanella U., Veeramachaneni V., Staedtler F., Peters T., Guettouche T., Wong L., Vandesompele J. 2014. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nature Methods*, 11, 8: 809-815.

miRBASE. 2014. The miRBase Sequence Database - release 21. Manchester, University of Manchester: baza podatkov.
<ftp://mirbase.org/pub/mirbase/CURRENT/README>. (16. mar. 2015)

Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Fritz B.R., Wyman S.K., Pogosova-Agadjanyan E.L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K.C., Allen A., Lin D.W., Urban N., Drescher C.W., Knudsen B.S., Stirewalt D.L., Gentleman R., Vessella R.L., Nelson P.S., Martin D.B., Tewari M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 30: 10513-10518.

O'Carroll D., Schaefer A. 2013. General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology*, 38, 1: 39-54.

Pigati L., Yaddanapudi S.C., Iyengar R., Kim D.J., Hearn S.A., Danforth D., Hastings M.L., Duelli D.M. 2010. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One*, 5, 10: e13515, doi: 10.1371/journal.pone.0013515: 13 str.

Reid G., Kirschner M.B., van Zandwijk N. 2011. Circulating microRNAs: association with disease and potential use as biomarkers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 80, 2: 193-208.

Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Pasquinelli A., Bettinger J., Rougvie A., Horvitz H.R., Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, 6772: 901-906.

Reinhart B.J., Weinstein E.G., Rhoades M.W. Bartel B., Bartel D.P. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes and Development*, 16,13: 1616-1626.

Ritchie M., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K. 2015. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43, 7: e47, doi: 10.1093/nar/gkv007: 13 str.

Roger V.L. 2013. Epidemiology of heart failure. *Circulation Research*, 113, 6: 646-659.

- Siomi H., Siomi M.C. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457, 7228: 396-404.
- Sun H., Wang Y. 2011. Restriction of big hearts by small RNA. *Circulation Research*, 108, 3: 274-276.
- Taylor D.D., Gercel-Taylor C. 2013. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Frontiers in Genetics*, 4: 142, doi: 10.3389/fgene.2013.00142: 12 str.
- Tehler D., Hoyland-Kroghsbo N.M., Lund A.H. 2011. The miR-10 microRNA precursor family. *RNA Biology*, 8, 5: 728-734.
- Turchinovich A., Samatov T.R., Tonevitsky A.G., Burwinkel B. 2013. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Frontiers in Genetics*, 4: 119, doi: 10.3389/fgene.2013.00119: 10 str.
- Turchinovich A., Weiz L., Burwinkel B. 2012. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends in Biochemical Sciences*, 37, 11: 460-465.
- Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9, 6: 654-659.
- van Rooij E., Sutherland L.B., Liu N., Williams A.H., McAnally J., Gerard R.D., Richardson J.A., Olson E.N. 2006. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 48: 18255-18260.
- Vickers K.C., Palmisano B.T., Shoucri B.M., Shamburek R.D., Remaley A.T. 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature Cell Biology*, 13, 4: 423-433.
- Vrtovec B., Poglajen G. 2011. Sodobni načini zdravljenja srčnega popuščanja. *Zdravniški vestnik*, 80: 302–315.
- Wang H.W., Huang T.S., Lo H.H., Huang P.H., Lin C.C., Chang S.J., Liao K.H., Tsai C.H., Chan C.H., Tsai C.F., Cheng Y.C., Chiu Y.L., Tsai T.N., Cheng C.C., Cheng S.M. 2014. Deficiency of the microRNA-31–microRNA-720 pathway in the plasma and endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 34, 4: 857-869.
- Wang S., Hu J., Zhang D., Li J., Fei Q., Sun Y. 2014. Prognostic role of microRNA-31 in various cancers: a meta-analysis. *Tumour Biology*, 35, 11: 11639-11645.

- Web of Science. 2015. New York, Thomson Reuters: baza podatkov.
http://apps.webofknowledge.com.nukweb.nuk.uni-lj.si/Search.do?product=WOS&SID=V16uAzueqiTV28zjFA6&search_mode=GeneralSearch&prID=b5c95db8-7d43-45c7-85a3-24dfc959b7e0 (28. nov. 2015)
- Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S., Huang D.Y., Huang K.H., Lee M.J., Galas D.J., Wang K. 2010. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, 56, 11: 1733-1741.
- WHO. 2015. Cardiovascular diseases (CVDs) - facts sheet. Geneva, World Health Organisation: 6 str.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. (18. feb. 2015)
- Wijnen W.J., van der Made I., van den Oever S., Hiller M., de Boer B.A., Picavet D.I., Chatzispyrou I.A., Houtkooper R.H., Tijsen A.J., Hagoort J., van Veen H., Everts V., Ruijter J.M., Pinto Y.M., Creemers E.E. 2014. Cardiomyocyte-specific miRNA-30c over-expression causes dilated cardiomyopathy. *PLoS One*, 9, 5: e96290, doi: 10.1371/journal.pone.0096290: 11 str.
- Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R.I., Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11, 3: 228-234.
- Xia J.T., Chen L.Z., Jian W.H., Wang K.B., Yang Y.Z., He W.L., He Y.L., Chen D., Li W. 2014. MicroRNA-362 induces cell proliferation and apoptosis resistance in gastric cancer by activation of NF-κB signaling. *Journal of Translational Medicine*, 12: 33, doi: 10.1186/1479-5876-12-33: 12 str.
- Yuan A., Farber E.L., Rapoport A.L., Tejada D., Deniskin R., Akhmedov N.B., Farber D.B. 2009. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One*, 4, 3: e4722, doi:10.1371/journal.pone.0004722: 8 str.

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila vsem, ki so mi pomagali na poti do cilja in mi pri tem svetovali, me spodbujali in učili. Najprej bi se zahvalila somentorju asist. mag. Tadeju Pajiču, mentorici doc. dr. Blagajani Herzog Velikonja ter recenzentu doc. dr. Tomažu Accettu. Hvala za sodelovanje, znanje in vse nasvete. Hvala tudi ostalim, ki so sodelovali pri oblikovanju in popravljanju naloge.

Iskreno bi se rada zahvalila dr. Bojanu Vrtovcu, ki me je vključil v projekt in mi predstavil zelo zanimiv svet molekul mikro RNA. Prav tako mi je ponudil veliko različnih priložnosti za napredovanje in učenje.

Zahvalila bi se vsem zaposlenim v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo (še posebej Urški Ribič, Leonidi Kovačič, Špeli Žula in Nejcu Lamovšku), ki so mi nudili pomoč na vsakem koraku. Zahvala gre tudi podjetju Genialis, ki mi je pomagalo pri statistični obdelavi podatkov.

Na koncu bi se rada zahvalila še svoji družini in Janu, ki so me vsak dan spodbujali ter mi bili v oporo. Hvala za vse, kar ste mi omogočili in mi pomagali pri uresničitvi mojega cilja. Hvala tudi za potrpežljivost in ker ste mi včasih pomagali na stvari pogledati iz drugega zornega kota.

PRILOGE

PRILOGA A: Optimizacija izolacije miRNA

V skladu z navodili proizvajalca (Exiqon, 2013a) smo pred začetkom analize vzorcev žeeli optimizirati postopek izolacije tako, da bi dobili najboljši izkoristek miRNA. Zato smo opravili izolacijo miRNA po treh različnih postopkih. Za vzorce smo uporabili serume treh bolnikov, za analizo miRNA pa smo uporabili začetne oligonukleotide za sintetične molekule RNA (UniSp6, UniSp5, UniSp4, UniSp2, cel-miR-39-3p) ter začetne oligonukleotide za molekuli hsa-miR-191-5p in hsa-miR-103a-3p, s katerima smo preverjali kakovost vzorca. Vse vzorce smo delali v duplikatih. Preizkusili smo naslednje 3 protokole:

- 1) Prvi protokol se od izvirnega protokola, zapisanega v prilogi B, razlikuje po tem, da smo po dodatku liznega pufra vzorec dodatno premešali s pipetiranjem, po dodatku precipitacijskega pufra s pipetiranjem ter daljšim mešanjem na mešalu vortkes (10-20 sekund), po dodatku izopropanola pa z dodatnim pipetiranjem in obračanjem. Omenjene korake smo dodali, saj smo žeeli izboljšati homogenost vzorca. Protokol je opisan pod točko 3.2.3.
- 2) Drugi protokol vsebuje dodatek A, ki ga proizvajalec reagenčnega kompleta (podjetje Exiqon) navaja kot potreben korak, če pride v vzorcu RNA do kontaminacije z DNA (protokol v prilogi C).
- 3) Tretji protokol je postopek, kjer smo natančno sledili navodilom proizvajalca reagenčnega kompleta. Protokol je opisan v prilogi B (Exiqon, Danska – Exiqon's miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids (Exiqon, 2013a).

PRILOGA B: Protokol izolacije miRNA, kot ga navaja proizvajalec (Exiqon, Danska)

- **Korak 1 – priprava vzorcev:** vzorce plazme ali seruma odtalimo in centrifugiramo pri $3000 \times g$ 5 minut pri sobni temperaturi.
- **Korak 2 – liza:** 200 μl supernatanta iz koraka 1 prenesemo v novo mikrocentrifugirko. V drugi mikrocentrifugirki zmešamo 60 μl liznega pufra, kateremu dodamo 1 μl RNA Spike-in in 1 ng oz. 1,25 μl nosilne RNA bakteriofaga MS2, premešamo na mešalu vorteks. Nato prenesemo lizni puffer z dodano RNA Spike-in ter RNA MS2 v centrifugirko z 200 μl supernatanta vzorca. Premešamo vzorec z mešalom vorteks 5 sekund ter nato inkubiramo 3 minute pri sobni temperaturi.
- **Korak 3 – obarjanje proteinov:** vzorcu dodamo 20 μl precipitacijskega pufra za proteine ob steni mikrocentrifugirke. Premešamo na mešalu vorteks 5 sekund ter inkubiramo 1 minuto na sobni temperaturi. Centrifugiramo 3 minute pri $11.000 \times g$.
- **Korak 4 – prenos supernatanta:** supernatant prenesemo v novo zbirno mikrocentrifugirko z V 2 ml.
- **Korak 5 – prilagoditev pogojev vezave:** supernatantu dodamo 270 μl izopropanola ter premešamo na mešalu vorteks 5 sekund.
- **Korak 6 – nanos na membrano:** kolono kompleta Exiqon microRNA Mini Spin Column BF vstavimo v zbiralno mikrocentrifugirko in na kolono nanesemo vzorec. Inkubiramo 2 minuti pri sobni temperaturi. Centrifugiramo 30 sekund pri $11.000 \times g$. Zavržemo filtrat ter kolono položimo nazaj v zbiralno mikrocentrifugirko.
- **Korak 7 – spiranje in sušenje:** na kolono nanesemo 100 μl pufra I za spiranje, centrifugiramo 30 sekund pri $11.000 \times g$, zavržemo filtrat ter kolono ponovno vstavimo v zbiralno mikrocentrifugirko. Dodamo 700 μl pufra II za spiranje, centrifugiramo 30 sekund pri $11.000 \times g$, zavržemo filtrat ter kolono ponovno vstavimo v zbiralno mikrocentrifugirko. Dodamo 250 μl pufra II za spiranje, centrifugiramo 2 minuti pri $11.000 \times g$, da se membrana popolnoma posuši.
- **Korak 8 – izpiranje:** kolono z mikro RNA prenesemo v novo zbiralno mikrocentrifugirko z V 1,5 μl in nizko afiniteto vezave nukleinskih kislin. Dodamo dvakrat po 25 μl vode brez RNaz, vmes inkubiramo 1 minuto pri sobni temperaturi ter centrifugiramo 1 minuto pri $11.000 \times g$. Končni volumen izprane miRNA je 50 μl , kar je idealno za nadaljnjo sintezo cDNA (Exiqon, 2013a).

PRILOGA C: Dodatek A k protokolu izolacije za izločitev morebitne DNA v vzorcu

- Po 6. koraku protokola sledi dodajanje 700 µl pufra II za spiranje na kolono mikro RNA. Centrifugiramo 30 sekund pri 11.000 × g. Odvržemo filtrat in vstavimo kolono nazaj v zbiralno mikrocentrifugirko.
- Dodamo 200 µl spiralnega pufra 2, centrifugiramo 2 minuti pri 11.000 × g.
- Dodamo 50 µl rDNaze direktno na membrano kolone. Zapremo pokrovček mikrocentrifugirke in inkubiramo 15 minut pri sobni temperaturi.
- Nadaljujemo s 7. korakom (Exiqon, 2013a).

PRILOGA D: Postopek optimizacije izolacije miRNA

Ker se v vzorcih nahajajo nizke koncentracije miRNA, smo želeli razviti protokol izolacije, s katerim bi dosegli največji izkoristek. Zato smo preverili, s katerim izmed treh zastavljenih protokolov dobimo najvišje količine izolirane miRNA, kar se vidi pri qPCR kot najnižja vrednost Cq. Nižja kot je vrednost Cq, prej zaznamo miRNA v vzorcu, kar pomeni, da se miRNA hitreje pomnožujejo zaradi večjega števila molekul.

Po postopkih, ki so opisani v prilogi A smo ugotovili, da je najboljši 1. protokol izolacije miRNA. To smo ugotovili na osnovi rezultatov qPCR izbranih miRNA, kjer najnižja vrednost Cq pomeni največje število kopij. Prikaz rezultatov, ki smo jih pridobili s tremi različni protokoli izolacije miRNA, so zapisani v prilogi D1. Iz preglednice lahko razberemo, da največji izkoristek pridobitve miRNA prinese 1. protokol izolacije – v štirih primerih qPCR z uporabo različnih sintetičnih molekul RNA opazimo najnižje vrednosti Cq in sicer – pri uporabi UniSp5 znaša Cq 30,971, pri uporabi cel-miR-39-3p znaša Cq 25,257, pri uporabi HSA-miR-191-5p znaša Cq 28,676 in pri uporabi HSA-miR-103a-3p znaša 26,178. Iz preglednice v prilogi D1 je razvidno, da 2. protokol, ki vsebuje dodatek A, s katerim izločimo morebitno DNA v vzorcu, ni najboljši – poda najvišje vrednosti Cq, kar pomeni nižje koncentracije miRNA v vzorcu, torej slabši izkoristek med izolacijo. Če primerjamo 1. in 3. protokol lahko rečemo, da podata primerljive rezultate, saj ima 1. protokol najnižje vrednosti Cq pri štirih reakcijah v primerjavi z ostalima dvema protokoloma, 3. protokol pa trikrat najnižje vrednosti Cq. Vendar ob natančnejši analizi opazimo, da so razlike med 1. protokolom in drugima dvema veliko izrazitejše – včasih tudi za skoraj dva cikla oz. dve enoti Cq. Standardne deviacije so najnižje v primeru 1. in 3. protokola (standardna deviacija je znašala pri UniSp5 0,265, pri UniSp4 0,01 in pri UniSp2 0,090) in v treh primerih najdemo najnižje Cq vrednosti pri uporabi 3. protokola oziroma pri vzorcu 428 (standardna deviacija je znašala pri UniSp6 0,140, pri HSA-miR-191-5p je znašala 0,196 in pri HSA-miR-103a-3p je znašala 0,057). Najnižje vrednosti Cq in standardni odkloni so v preglednici odenbeljeni. Na koncu smo se odločili za 1. protokol, saj smo z njim pridobili najnižje vrednosti Cq in nizko razpršenost vzorcev.

PRILOGA D1: Prikaz rezultatov qPCR za 3 različne protokole izolacije miRNA

Št. vzorca	Spike-in	Vrednosti Cq	Povprečne vrednosti Cq	St. dev.
vz. 426	UniSp6	21,806	21,671	0,191
vz. 426	UniSp6	21,536		
vz. 427	UniSp6	21,769	21,647	0,173
vz. 427	UniSp6	21,524		
vz. 428	UniSp6	21,073	21,172	0,140
vz. 428	UniSp6	21,271		
vz. 426	UniSp5	30,783	30,971	0,265
vz. 426	UniSp5	31,158		
vz. 427	UniSp5	32,004	32,844	1,187
vz. 427	UniSp5	33,683		
vz. 428	UniSp5	31,155	31,522	0,519
vz. 428	UniSp5	31,889		
vz. 426	UniSp4	25,409	25,410	0,001
vz. 426	UniSp4	25,411		
vz. 427	UniSp4	25,909	25,937	0,040
vz. 427	UniSp4	25,965		
vz. 428	UniSp4	25,411	25,367	0,062
vz. 428	UniSp4	25,323		
vz. 426	UniSp2	18,338	18,402	0,090
vz. 426	UniSp2	18,465		
vz. 427	UniSp2	19,205	18,975	0,326
vz. 427	UniSp2	18,744		
vz. 428	UniSp2	18,460	18,305	0,219
vz. 428	UniSp2	18,150		
vz. 426	cel-miR-39-3p	25,095	25,257	0,229
vz. 426	cel-miR-39-3p	25,419		
vz. 427	cel-miR-39-3p	25,479	25,384	0,135
vz. 427	cel-miR-39-3p	25,288		
vz. 428	cel-miR-39-3p	25,187	26,098	1,288
vz. 428	cel-miR-39-3p	27,008		
vz. 426	HSA-miR-191-5p	28,519	28,676	0,222
vz. 426	HSA-miR-191-5p	28,833		
vz. 427	HSA-miR-191-5p	30,493	29,720	1,093
vz. 427	HSA-miR-191-5p	28,947		
vz. 428	HSA-miR-191-5p	30,009	30,148	0,196
vz. 428	HSA-miR-191-5p	30,286		
vz. 426	HSA-miR-103a-3p	26,131	26,178	0,066
vz. 426	HSA-miR-103a-3p	26,225		
vz. 427	HSA-miR-103a-3p	28,415	28,259	0,221
vz. 427	HSA-miR-103a-3p	28,103		
vz. 428	HSA-miR-103a-3p	27,984	27,944	0,057

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge D1: Prikaz rezultatov qPCR za 3 različne protokole izolacije miRNA

Št. vzorca	Spike-in	Vrednosti Cq	Povprečne vrednosti Cq	St. dev.
vz. 428	HSA-miR-103a-3p	27,903		
NTC	UniSp6	UND.		
NTC	UniSp5	UND.		
NTC	UniSp4	UND.		
NTC	UniSp2	UND.		
NTC	cel-miR-39-3p	UND.		
NTC	HSA-miR-191-5p	UND.		
NTC	HSA-miR-103a-3p	UND.		

Legenda: NTC – negativna kontrola; Cq – cikel kvantifikacije; St. dev. – standardna deviacija; UND – ni pomnožkov; z debelejšo pisavo so označene najnižje vrednosti Cq.

PRILOGA E: Določitev najprimernejše koncentracije miRNA za sintezo cDNA

Optimizacija sinteze cDNA je pomemben korak pri analizah ravni miRNA v različnih vzorcih preiskovancev z metodo qPCR. Pred začetkom analize vzorcev, smo zato določili najbolj optimalno količino vnesenega vzorca. Mislili bi, da več kot dodamo vzorca v reakcijsko mešanico za sintezo cDNA ter qPCR, boljši bo izkoristek, vendar temu ni tako. V krvi so namreč prisotni različni inhibitorji, ki lahko ovirajo ali zaustavijo proces verižne reakcije pomnoževanja miRNA s polimerazo. Zato je potrebno najti kompromis med količino vnesenega vzorca, da lahko dovolj dobro in natančno kvantificiramo miRNA, vendar ob tem ne vnesemo prevelikih količin inhibitorjev PCR, ki bi nam podali lažno negativne rezultate. S tem namenom smo opravili titracijo miRNA in preverili, kako različne količine miRNA vplivajo na qPCR. Iz preglednice v prilogi E1 lahko vidimo, da se najnižje vrednosti Cq največkrat pojavijo pri reakciji, kjer smo uporabili 12 µl vnesene miRNA (pri uporabi sintetične RNA UniSp6 znaša Cq 20,425, pri uporabi UniSp4 znaša Cq 25,403, pri uporabi UniSp2 znaša Cq 18,367 in pri uporabi HSA-miR-103a-3p znaša Cq 28,951). Z volumnom 12 µl smo dosegli detekcijo molekul miRNA v vzorcu in z izbrano količino nismo vplivali na potek reakcije qPCR (ni prišlo do inhibicije reakcije). V nadaljnjih poskusih in analizah smo na podlagi pridobljenih rezultatov uporabljali naslednje količine: 8 µl 5x reakcijskega pufra, 14 µl vode, 4 µl mešanice encimov, 2 µl sintetičnih molekul RNA in 12 µl izolirane miRNA.

PRILOGA E1: Prikaz rezultatov titracije različnih volumnov miRNA pri sintezi cDNA

Št. vzorca	Spike-in	Količina vnesene miRNA	Povprečna vrednost Cq	St. dev.
428	UniSp6	8 µl	21,276	0,271
428	UniSp6	12 µl	20,425	0,363
428	UniSp6	16 µl	20,579	0,263
428	UniSp5	8 µl	32,450	1,063
428	UniSp5	12 µl	31,105	0,466
428	UniSp5	16 µl	30,488	0,268
428	UniSp4	8 µl	26,537	0,467
428	UniSp4	12 µl	25,403	0,397
428	UniSp4	16 µl	26,141	0,414
428	UniSp2	8 µl	19,175	0,434
428	UniSp2	12 µl	18,367	0,133
428	UniSp2	16 µl	18,557	0,738
428	cel-miR-39-3p	8 µl	26,103	0,821
428	cel-miR-39-3p	12 µl	26,269	0,469
428	cel-miR-39-3p	16 µl	25,901	0,556
428	HSA-miR-191-5p	8 µl	32,751	0,943
428	HSA-miR-191-5p	12 µl	31,334	0,259
428	HSA-miR-191-5p	16 µl	30,772	0,169
428	HSA-miR-103a-3p	8 µl	29,887	0,371
428	HSA-miR-103a-3p	12 µl	28,951	0,146
428	HSA-miR-103a-3p	16 µl	29,434	0,263
428	UniSp6	0 µl	UND.	
428	UniSp5	0 µl	UND.	
428	UniSp4	0 µl	UND.	
428	UniSp2	0 µl	UND.	
428	cel-miR-39-3p	0 µl	UND.	
428	HSA-miR-191-5p	0 µl	UND.	
428	HSA-miR-103a-3p	0 µl	UND.	

Legenda: NTC – negativna kontrola; Cq – cikel kvantifikacije; St. dev. – standardna deviacija; UND – ni pomnožkov.

PRILOGA F: Določitev najprimernejše koncentracije barvila ROX v reakciji qPCR

Želeli smo določiti takšne količine barvila ROX, ki bi nam prinesle najnižje vrednosti Cq in ob tem ne bi prišlo do inhibicije reakcije. Količina dobavljenega barvila je znašala 500 μl in je vsebovala 25 μM sukcinimidil estra, 20 mM TrisHCl (pH 8,4), 0,1 mM EDTA in 0,01% Tween 20. Reakcijska mešanica 1 je vsebovala 0,2 μl vnesenega barvila ROX, reakcijska mešanica 2 pa 0,02 μl barvila ROX. Iz preglednice v prilogi F1 lahko opazimo, da je reakcijska mešanica 2, ki vsebuje 0,02 μl barvila ROX in 3,98 μl cDNA, bolj učinkovita od reakcijske mešanice 1. Vrednosti ROX reakcijske mešanice 1 so v enakem območju merjenja kot vrednosti reporterja, prav tako pa so vrednosti Cq veliko nižje pri vseh vzorcih, kot pri reakcijski mešanici 2. To pomeni, da se miRNA v tej mešanici hitreje pomnožuje, ne pride do inhibicije qPCR in zato molekule miRNA prej zaznamo. Tudi tu so rezultati zanesljivi, kar potrjujejo vrednosti standardne deviacije manjše od 1.

PRILOGA F1: Prikaz rezultatov določitve najprimernejše koncentracije barvila ROX v reakciji qPCR

Vzorec	Spike-in	Povprečne vrednosti Cq	St. dev.
Reakcijska mešanica 1	UniSp6	27,174	0,285
Reakcijska mešanica 2	UniSp6	21,234	0,021
Reakcijska mešanica 1	UniSp5	34,694	0,131
Reakcijska mešanica 2	UniSp5	31,316	0,233
Reakcijska mešanica 1	UniSp4	28,213	0,087
Reakcijska mešanica 2	UniSp4	25,733	0,105
Reakcijska mešanica 1	UniSp2	22,296	0,123
Reakcijska mešanica 2	UniSp2	18,693	0,082
Reakcijska mešanica 1	cel-miR-39-3p	29,644	0,092
Reakcijska mešanica 2	cel-miR-39-3p	25,707	0,041
Reakcijska mešanica 1	HSA-miR-191-5p	31,345	0,303
Reakcijska mešanica 2	HSA-miR-191-5p	28,920	0,336
Reakcijska mešanica 1	HSA-miR-103a-3p	30,268	0,142
Reakcijska mešanica 2	HSA-miR-103a-3p	26,672	0,218
NTC	UniSp6	UND	
NTC	UniSp5	UND	
NTC	UniSp4	UND	
NTC	UniSp2	UND	
NTC	cel-miR-39-3p	UND	
NTC	HSA-miR-191-5p	UND	
NTC	HSA-miR-103a-3p	UND	

Legenda: NTC – negativna kontrola; Cq – cikel kvantifikacije; St. dev. – standardna deviacija; Koef. var. – koeficient variacije; UND – ni pomnožkov.

PRILOGA G: Prikaz razporeditve miRNA na ploščah (panel qPCR I)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	hsa-miR-7-5p	hsa-miR-217	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-328	hsa-miR-374b-3p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-623	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-557	hsa-miR-218-5p	hsa-miR-136-5p	hsa-miR-127-5p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-31-3p	hsa-miR-20b-3p	hsa-miR-325	hsa-miR-509-3-5p	hsa-miR-210	hsa-miR-199b-5p	hsa-let-7g-5p	hsa-miR-203a	hsa-miR-181a-3p	hsa-miR-137	
B	hsa-miR-551b-3p	Blank (H2O)	hsa-miR-524-3p	UniSp2	hsa-miR-486-5p	UniSp4	hsa-miR-301b	UniSp5	hsa-miR-329	UniSp6	hsa-miR-487b	cel-miR-39-3p	hsa-miR-138-5p	hsa-miR-378a-3p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-890	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-221-3p	SNOR D38B	UniSp3 IPC	SNOR D49A	hsa-miR-550a-5p	U6 snRNA
C	hsa-miR-532-5p	hsa-miR-99a-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-98-5p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-25-3p	hsa-miR-524-5p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-765	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-425-5p	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-760	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-130b-3p	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-133b	UniSp3 IPC	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-518c-5p	hsa-miR-130a-3p
D	hsa-miR-933	hsa-miR-379-5p	hsa-miR-452-5p	hsa-miR-589-5p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-668	hsa-miR-934	hsa-miR-101-3p	hsa-miR-539-5p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-499a-5p	hsa-miR-888-5p	hsa-miR-330-3p	hsa-miR-570-3p	hsa-miR-518c-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-188-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-99b-5p	hsa-miR-431-5p	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-367-3p	
E	hsa-miR-505-3p	hsa-miR-18a-5p	hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-500a-5p	hsa-miR-887	hsa-miR-491-3p	hsa-miR-423-3p	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-421	hsa-miR-376b-3p	hsa-miR-302c-3p	hsa-miR-625-3p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-873-5p	hsa-miR-323a-3p	hsa-miR-181d	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-129-5p	UniSp3 IPC	hsa-miR-374b-5p	hsa-miR-302d-3p	hsa-miR-346	hsa-miR-151a-3p	
F	hsa-miR-493-3p	hsa-miR-122-5p	hsa-miR-99a-3p	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-202-3p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-503-5p	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-30d-5p	hsa-miR-301a-3p	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-30b-3p	hsa-miR-654-5p	hsa-miR-545-3p	hsa-miR-29b-2-5p	hsa-miR-491-5p	hsa-miR-92b-3p	hsa-miR-665	hsa-miR-506-3p	hsa-miR-363-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-651	hsa-miR-628-3p	hsa-miR-432-5p
G	hsa-miR-154-3p	hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-376c-3p	hsa-miR-940	hsa-miR-22-5p	hsa-miR-224-5p	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-320a	hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-187-3p	hsa-miR-516b-5p	hsa-miR-302c-5p	hsa-miR-548b-3p	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-186-5p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-107	hsa-miR-302b-3p	hsa-miR-662	hsa-miR-519d	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-337-3p	hsa-miR-494
H	hsa-miR-371a-3p	hsa-miR-637	hsa-miR-144-3p	hsa-miR-16-1-3p	hsa-miR-631	hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-211-5p	hsa-miR-454-3p	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-663a	hsa-miR-518e-3p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-658	hsa-miR-572	hsa-miR-802	hsa-miR-521	hsa-miR-433	hsa-let-7c	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-219-5p	
I	hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-526b-5p	hsa-miR-215	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-184	hsa-miR-422a	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-519a-3p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-129-2-3p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-214-3p	hsa-miR-32-5p	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-488-3p	hsa-miR-371a-5p	hsa-miR-455-5p	hsa-miR-891a	hsa-miR-549a	hsa-miR-205-5p	hsa-miR-518b	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-150-5p

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge G: Prikaz razporeditve miRNA na ploščah (panel qPCR I)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
J	hsa-miR-15a-5p	hsa-let-7d-3p	hsa-miR-608	hsa-miR-671-5p	hsa-miR-497-5p	hsa-miR-877-5p	hsa-miR-187-5p	hsa-miR-10b-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-202-5p	hsa-miR-652-3p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-181c-5p	hsa-miR-9-3p	hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-152	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-365a-3p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-372	hsa-miR-133a	hsa-miR-124-3p	hsa-miR-190a	
K	hsa-miR-302a-3p	hsa-miR-595	hsa-miR-602	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-627	hsa-miR-34b-3p	hsa-miR-410	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-376a-3p	hsa-miR-514a-3p	hsa-miR-512-5p	hsa-miR-449a	hsa-miR-148b-3p	hsa-miR-127-3p	hsa-miR-598	hsa-let-7d-5p	hsa-miR-135b-5p	hsa-miR-495-3p	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-34c-3p	hsa-miR-596	hsa-miR-744-5p			
L	hsa-miR-145-5p	hsa-miR-622	hsa-miR-516a-5p	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-96-3p	hsa-miR-185-3p	hsa-miR-615-3p	hsa-miR-128	hsa-miR-766-3p	hsa-miR-206	hsa-miR-298	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-449b-5p	hsa-miR-520d-5p	hsa-miR-192-5p	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-18a-3p	hsa-miR-383	hsa-miR-9-5p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-363-5p	hsa-miR-147b	hsa-miR-197-3p	hsa-miR-597	
M	hsa-miR-326	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-105-5p	hsa-miR-196b-5p	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-147a	hsa-miR-198	hsa-miR-375	hsa-miR-517a-3p	hsa-miR-361-3p	hsa-miR-21-3p	hsa-miR-373-3p	hsa-miR-518f-3p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-617	hsa-miR-154-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-miR-708-5p	hsa-miR-95	hsa-miR-517c-3p	hsa-miR-151a-5p	hsa-miR-502-5p	hsa-miR-345-5p	
N	hsa-miR-509-3p	hsa-miR-134	hsa-miR-382-5p	hsa-miR-490-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-181b-5p	hsa-miR-33a-5p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-874	hsa-miR-135a-5p	hsa-miR-26a-2-3p	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-412	hsa-miR-299-3p	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-584-5p	hsa-miR-377-3p	hsa-miR-216a-5p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-921	hsa-miR-513a-5p		
O	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-182-5p	hsa-miR-370	hsa-miR-425-3p	hsa-miR-576-5p	hsa-miR-411-5p	hsa-miR-450a-5p	hsa-miR-216b	hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-510	hsa-miR-212-3p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-576-3p	hsa-miR-583	hsa-miR-483-3p	hsa-miR-582-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-33b-5p	hsa-miR-193a-3p	
P	hsa-miR-153	hsa-let-7e-5p	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-100-5p	hsa-miR-629-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-429	hsa-miR-30c-2-3p	hsa-miR-518a-3p	hsa-miR-340-5p	hsa-miR-508-3p	hsa-miR-381-3p	hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-148a-5p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-149-5p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-373-5p	hsa-miR-149-5p	hsa-miR-31-5p	hsa-miR-451a	hsa-miR-620	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-523-3p	hsa-miR-374a-5p

PRILOGA H: Prikaz razporeditve miRNA na ploščah (panel qPCR II)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	hsa-miR-92a-1-5p	hsa-miR-219-1-3p	hsa-miR- -1913	hsa-miR-1245a	hsa-miR-522-3p	hsa-miR-571	hsa-miR-323a-5p	hsa-miR-592	hsa-miR-487a	hsa-miR-1249	hsa-miR-25-5p	hsa-miR-922	hsa-miR-124-5p	hsa-miR-1264	hsa-miR-504	hsa-miR-138-1-3p	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-490-5p	hsa-miR-567	hsa-miR-18b-3p	hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-653	hsa-miR-891b	hsa-miR-144-5p
B	hsa-miR-1538	hsa-miR-384	hsa-miR-196b-3p	hsa-miR-649	hsa-miR-143-5p	hsa-miR-1207-5p	hsa-miR-943	hsa-miR-675-3p	hsa-miR-200b-5p	hsa-miR-519e-5p	hsa-miR-942	hsa-miR-450b-3p	hsa-miR-553	hsa-miR-605	hsa-miR-24-2-5p	hsa-miR-23a-5p	hsa-miR-27b-5p	hsa-miR-759	hsa-miR-770-5p	hsa-miR-585	hsa-miR-376a-5p	hsa-miR-507	hsa-miR-520b	hsa-miR-302f
C	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-875-5p	hsa-miR-219-2-3p	hsa-miR-1183	hsa-miR-758-3p	hsa-miR-1244	hsa-miR-566	hsa-miR-1256	hsa-miR-516a-3p	hsa-miR-548c-5p	hsa-miR-496	hsa-miR-876-3p	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-654-3p	hsa-miR-659-3p	hsa-miR-135b-3p	hsa-miR-641	hsa-miR-2113	hsa-miR-1254	hsa-miR-661	hsa-miR-892a	hsa-miR-10b-3p	hsa-miR-122-3p	hsa-miR-100-3p
D	hsa-miR-769-3p	hsa-miR-300	hsa-miR-518e-5p	hsa-miR-489	hsa-miR-937-3p	hsa-miR-381-5p	hsa-miR-640	hsa-miR-148b-5p	hsa-miR-29c-5p	hsa-miR-499a-3p	hsa-let-7f-1-3p	hsa-miR-382-3p	hsa-miR-609	hsa-miR-10a-3p	hsa-let-7e-3p	hsa-miR-580	hsa-miR-761	hsa-miR-643	hsa-miR-618	hsa-miR-221-5p	hsa-miR-513b	hsa-miR-411-3p	hsa-miR-19a-5p	
E	hsa-miR-338-5p	hsa-miR-1914-3p	hsa-miR-323b-5p	hsa-miR-548i	hsa-miR-541-3p	hsa-miR-1272	hsa-miR-1205	hsa-miR-544a	hsa-miR-431-3p	hsa-miR-621	hsa-miR-556-5p	hsa-miR-1267	hsa-miR-141-5p	hsa-miR-1269a	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-15b-3p	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-222-5p	hsa-miR-601	hsa-miR-924	hsa-let-7a-2-3p	hsa-miR-520f	hsa-miR-101-5p	
F	hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-548	hsa-miR-517-5p	hsa-miR-448	hsa-miR-1296	hsa-miR-1537	hsa-miR-920	hsa-miR-1247-5p	hsa-miR-19b-2-5p	hsa-miR-558	hsa-miR-106b-3p	hsa-miR-619	hsa-miR-208a	hsa-miR-1258	hsa-miR-17-3p	hsa-miR-136-3p	hsa-miR-877-3p	hsa-miR-935	hsa-miR-224-3p	hsa-miR-624-3p	hsa-miR-767-5p	hsa-miR-559	hsa-miR-449b-3p	hsa-miR-205-3p
G	hsa-miR-604	hsa-miR-130b-5p	hsa-miR-149-3p	hsa-miR-1271-5p	hsa-miR-520h	hsa-miR-769-5p	hsa-miR-612	hsa-miR-1237-3p	hsa-miR-1908	hsa-miR-1260a	hsa-miR-182-3p	hsa-miR-365b-5p	hsa-miR-508-5p	hsa-miR-671-3p	hsa-miR-941	hsa-miR-23b-5p	hsa-miR-591	hsa-miR-26b-3p	hsa-miR-519b-3p	hsa-miR-30d-3p	hsa-miR-518d-5p	hsa-miR-212-5p	hsa-miR-520e	hsa-miR-646
H	hsa-miR-519e-3p	hsa-miR-626	hsa-miR-26a-1-3p	hsa-miR-190b	hsa-miR-1471	hsa-miR-548l	hsa-miR-586	hsa-miR-103b	hsa-miR-488-5p	hsa-miR-129-1-3p	hsa-miR-192-3p	hsa-miR-632	hsa-miR-181a-2-3p	hsa-miR-1909-3p	hsa-miR-573	hsa-miR-302d-5p	hsa-miR-194-3p	hsa-miR-302b-5p	hsa-miR-551b-5p	hsa-miR-635	hsa-miR-518d-3p	hsa-miR-569	hsa-miR-125b-1-3p	hsa-miR-218-2-3p
I	hsa-miR-519c-3p	hsa-miR-554	hsa-miR-938	hsa-miR-1243	hsa-miR-708-3p	hsa-miR-1185-5p	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-587	hsa-miR-603	hsa-miR-1184	hsa-miR-20a-3p	hsa-miR-588	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-582-3p	hsa-miR-409-5p	hsa-miR-452-3p	hsa-miR-19b-1-5p	hsa-miR-610	hsa-miR-511	hsa-let-7a-3p	hsa-miR-135a-3p	hsa-miR-520a-5p	hsa-miR-1468	

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge H: Prikaz razporeditve miRNA na ploščah (panel qPCR II)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
J	hsa-miR-628-5p	hsa-miR-552	hsa-miR-145-3p	Blank (H2O)	hsa-miR-378a-5p	hsa-miR-7-1-3p	hsa-miR-181c-3p	hsa-miR-195-3p	hsa-miR-578	hsa-miR-505-5p	hsa-miR-875-3p	hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-876-5p	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-624-5p	hsa-miR-27a-5p	hsa-miR-744-3p	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-138-2-3p	hsa-miR-655	hsa-miR-99b-3p	hsa-miR-581	hsa-miR-191-3p	hsa-miR-32-3p
K	hsa-miR-1204	hsa-miR-548j	hsa-miR-555	hsa-miR-1224-3p	hsa-miR-1539	hsa-miR-663b	hsa-miR-634	hsa-miR-1248	hsa-miR-889	hsa-miR-1227-3p	hsa-miR-548h-5p	hsa-miR-1255b-5p	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-1238-3p	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-589-3p	hsa-miR-125b-2-3p	hsa-miR-16-2-3p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-340-3p	hsa-miR-513a-3p	hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-639
L	hsa-let-7i-3p	hsa-miR-543	hsa-miR-645	hsa-miR-548d-5p	hsa-miR-33a-3p	hsa-miR-664a-3p	hsa-miR-34b-5p	hsa-miR-888-3p	hsa-miR-379-3p	hsa-miR-556-3p	hsa-miR-614	hsa-miR-616-5p	hsa-miR-93-3p	hsa-miR-1972	hsa-miR-616-3p	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-2110	hsa-miR-548a-3p	UniSp 3 IPC	hsa-miR-320c	hsa-miR-636	hsa-miR-606	hsa-miR-208b	hsa-miR-367-5p
M	hsa-miR-520d-3p	hsa-miR-1265	hsa-miR-1203	hsa-miR-548k	hsa-miR-1253	hsa-miR-615-5p	hsa-miR-607	hsa-miR-1208	hsa-miR-302e	hsa-miR-1206	hsa-miR-1270	hsa-miR-525-3p	hsa-miR-1200	hsa-miR-1911-5p	hsa-miR-33b-3p	hsa-miR-223-5p	UniSp 3 IPC	UniSp 3 IPC	hsa-miR-424-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-380-5p	hsa-miR-647	hsa-miR-518f-5p	
N	hsa-miR-92b-5p	hsa-miR-551a	hsa-miR-146a-3p	hsa-miR-218-1-3p	hsa-miR-593-5p	hsa-miR-561-3p	hsa-miR-767-3p	hsa-miR-526b-3p	hsa-let-7b-3p	hsa-miR-24-1-5p	hsa-miR-193b-5p	hsa-miR-335-3p	hsa-miR-541-5p	hsa-miR-30c-1-3p	hsa-miR-629-3p	hsa-miR-377-5p	hsa-miR-630	hsa-miR-548d-3p	hsa-miR-885-3p	hsa-miR-320d	hsa-miR-2053	hsa-miR-675-5p	hsa-miR-1252	hsa-miR-548e
O	hsa-miR-1914-5p	hsa-miR-513c-5p	hsa-miR-331-5p	hsa-miR-1182	hsa-miR-611	hsa-miR-1181	hsa-miR-638	hsa-miR-515-3p	hsa-miR-650	hsa-miR-1178-3p	hsa-miR-600	hsa-miR-599	hsa-miR-520g	hsa-miR-564	hsa-miR-132-5p	hsa-miR-577	hsa-let-7f-2-3p	hsa-miR-1911-3p	hsa-miR-155-3p	hsa-miR-105-3p	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-320b	hsa-miR-296-3p	hsa-miR-7-2-3p
P	hsa-miR-550a-3p	hsa-miR-380-3p	hsa-miR-593-3p	hsa-miR-1912	hsa-miR-493-5p	hsa-miR-432-3p	hsa-miR-454-5p	hsa-miR-936	hsa-miR-30a-3p	hsa-let-7g-3p	hsa-miR-214-5p	hsa-miR-183-3p	hsa-miR-1179	hsa-miR-562	hsa-miR-579	hsa-miR-590-3p	hsa-miR-130a-5p	hsa-miR-563	hsa-miR-200a-5p	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-15a-3p	hsa-miR-944	hsa-miR-92a-2-5p	hsa-miR-548n

PRILOGA I: Uporabljeni ukazi pri statistični obdelavi podatkov v programu Limma v statističnem programskem okolju R/Bioconductor

```
- biocLite()
- biocLite("limma")
- biocLite("statmod")
- biocLite("edgeR")
- library(limma)
- library(edgeR)
- datafilename = "./mir.dat"
- data=read.table(datafilename,header=T, sep="\t")
- data1 = data.frame(data, row.names=1)
- data1 = t(data1)
- cols = colnames(data1)
- cols1 = strsplit(cols, "_")
- types = sapply(cols1, paste)[1,]
- types1 = factor(c(types))
- modified <- data1
- design <- model.matrix(~0 + types1)
- colnames(design) <- names <- make.names(levels(types1))
- fit <- lmFit(modified, design)
- contrast.matrix1 <- makeContrasts(ZO-ZNO, X6O-X6NO, ZO-X6O, ZNO-X6NO, K,
  levels=design)
- fit2 <- contrasts.fit(fit, contrast.matrix1)
- # fit2 <- eBayes(fit2)
- itop <- topTable(fit3, coef=1, number = Inf, adjust.method="fdr")
- tabelo izvozimo z določenim imenom, ki ustreza primerjavi (npr.): write.table(itop,
  file="ranked_ZO-ZNO.tsv", sep="\t", col.names=NA)
```