

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **227931**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **402291**

(51) Int.Cl.  
**C12Q 1/68 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **28.12.2012**

(54) **Sposób określania zmian ekspresji cząsteczek miRNA *in vitro* w celu oznaczania wczesnych chorobowych zmian strukturalnych śródbłonka naczyń krwionośnych spowodowanych hiperhomocysteinemią**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**07.07.2014 BUP 14/14**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**31.01.2018 WUP 01/18**

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Poznań, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**DOROTA GURDA, Poznań, PL  
HIERONIM JAKUBOWSKI, Poznań, PL  
ANNA M. KIETRYS, Plewiska, PL  
LUIZA HANDSCHUH, Jerzykowo, PL  
MAREK FIGLEROWICZ, Borówiec, PL  
TOMASZ TWARDOWSKI, Kiekrz, PL  
JOANNA SUSZYŃSKA-ZAJCZYK, Poznań, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Rożkowicz**

**PL 227931 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób określania zmian ekspresji cząsteczek miRNA *in vitro* w celu oznaczania wczesnych chorobowych zmian strukturalnych śródbłonna naczyń krwionośnych spowodowanych hiperhomocysteinemią wywołaną podwyższonym poziomem tiolaktonu homocysteiny we krwi. Rozwiązanie według wynalazku charakteryzuje się innowacyjnym podejściem do problemu szybkiej i nieinwazyjnej diagnostyki ryzyka rozwoju chorób układu krążenia, które pozwoliłoby na ograniczenie negatywnych skutków pełnoobjawowego stanu chorobowego.

Mimo ogromnego postępu medycyny choroby układu krążenia są wciąż podstawowym zagrożeniem dla zdrowia i życia człowieka, szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych. W Polsce jest to najczęstsza przyczyna hospitalizacji. Hiperhomocysteinemia (stan, w którym stężenie całkowitej homocysteiny we krwi przekracza  $15 \mu\text{M}$ ) jest niezależnym, rozpoznanym czynnikiem ryzyka rozwoju chorób układu krążenia takich jak miażdżyca, choroba niedokrwienna serca, czy udar mózgu. Diagnostyka na wczesnym etapie choroby umożliwiłaby wprowadzenie odpowiedniego leczenia i profilaktyki, zanim dojdzie do poważnych powikłań i długotrwałego leczenia szpitalnego.

Homocysteina (Hcy) jest niebiałkowym aminokwasem – pod względem budowy strukturalnej przypominającym białkowy aminokwas metioninę, od której różni się brakiem grupy metylowej. W organizmie człowieka może ona powstawać jedynie z metioniny dostarczanej wraz z pokarmem. Metionina uwolniona z białek podczas procesu trawienia, wykorzystywana jest przez maszynię komórkową do syntezy nowych białek oraz S-adenozylometioniny (SAM), która pełni rolę uniwersalnego donora grupy metylowej. W wyniku reakcji metylacji SAM przekształcana jest do S-adenozylhomocysteiny, która następnie hydrolizowana jest do homocysteiny i adenozyliny.

Hcy jest reutilizowana poprzez remetylację do metioniny bądź jest przekształcana w reakcji transsulfurylacji do cysteiny. Hcy może również ulegać konwersji do cyklicznego tioestru – tiolaktonu homocysteiny (HTL). Szlak ten staje się dominującym, gdy remetylacja i transsulfurylacja zostają zaburzone poprzez wystąpienie defektów genetycznych enzymów zaangażowanych w metabolizm Hcy, takich jak syntaza metioniny (MS), syntaza  $\beta$  cystationiny (CBS) czy reduktaza metylotetrahydrofolianu (MTHFR) lub też na skutek niedoboru kwasu foliowego, witaminy B<sub>6</sub> i B<sub>12</sub> w diecie.

Homocysteina ze względu na swoje strukturalne podobieństwo do metioniny, może być błędnie rozpoznana przez syntetazę metionyno-tRNA w reakcji aminoacylacji. Jednak dzięki aktywności korekcyjnej tego enzymu, nigdy nie dochodzi do wbudowania Hcy do cząsteczki białka w procesie translacji. W wyniku reakcji korekcyjnej syntetazy metionyno-tRNA z Hcy powstaje tiolakton homocysteiny [1, 2].

Podwyższony poziom Hcy we krwi (powyżej  $15 \mu\text{M}$ ) jest czynnikiem ryzyka wielu chorób, w tym chorób układu krążenia i neurodegeneracyjnych. W 1997 roku zaproponowano hipotezę, według której konwersja Hcy do HTL inicjuje szlak metaboliczny prowadzący do zmian patologicznych w organizmie [3].

Tiolakton homocysteiny jest cząsteczką wysoce reaktywną i może spontanicznie reagować z białkami, tworząc wiązanie amidowe z  $\epsilon$ -aminową grupą reszt lizyny w białku. N-homocysteinyłacja białek powoduje upośledzenie ich funkcji poprzez zmiany w drugorzędowej strukturze białek. Funkcja N-Hcy-białka jest tym bardziej zaburzona, im większy procent reszt lizynowych jest zmodyfikowanych przez tiolakton Hcy. Ponadto N-Hcy-białka stają się bardziej podatne na agregację, oraz na uszkodzenia spowodowane utlenianiem [4,5]. Patofizjologiczne konsekwencje N-homocysteinyłacji białek obejmują: odpowiedź autoimmunologiczną, toksyczność komórkowa, stres siateczki śródplazmatycznej, aktywację odpowiedzi na niesfałdowane białka [3,5,6] na podstawie danych pochodzących z eksperymentów z użyciem kultur komórkowych dowiedziono, że modyfikacje potranslacyjne białek komórkowych poprzez N-homocysteinyłację, inicjują uszkodzenia komórkowe, co może prowadzić do powstawania stanów patologicznych. N-homocysteinyłacja białek jest procesem specyficznym wyłącznie dla homocysteiny, ponieważ HTL może powstać w organizmie ludzkim wyłącznie z Hcy [3,5].

Warstwa komórek śródbłonna naczyń krwionośnych odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie układu krwionośnego. Jedną z cech charakterystycznych dla wczesnych stadiów rozwoju miażdżycy jest uszkodzenie warstwy komórek śródbłonna. Wykrycie zmian w funkcjonowaniu śródbłonna jest możliwe dużo wcześniej, niż zaobserwowanie zmian strukturalnych tej tkanki. Wyniki badań przeprowadzonych *in vitro* oraz *in vivo*, wskazują, że HTL jest bardziej toksyczny dla komórek śródbłonna niż Hcy. Powoduje on wiele zmian morfologicznych, wywołuje stan zapalny, a także indukuje apoptozę [8,9].

MikroRNA (miRNA) to krótkie, niekodujące cząsteczki RNA, których występowanie potwierdzono u wielu organizmów. Są one zaangażowane w regulację ekspresji informacji genetycznej. Cząsteczki miRNA w komórkach ssaków mają długość około 22 nukleotydów. Prekursory miRNA, zwane pri-miRNA, transkrybowane są przez polimerazę III RNA w jądrze i są znacznie dłuższe niż dojrzałe cząsteczki. Na końcu 5' mają czapkę (*ang. cap*) oraz sekwencję poli(A) na końcu 3'. Podlegają one obróbce enzymatycznej przy udziale enzymów Drosha i Pasha, co prowadzi do powstania pre-miRNA. Następnie cząsteczki te przenoszone są przez białko eksportynę 5 do cytoplazmy, gdzie enzym Dicer przycina je do pełnej długości, dojrzałych miRNA. Dojrzałe miRNA włączane jest do rybonukleoproteinowego kompleksu RISC, dzięki czemu może oddziaływać z sekwencją komplementarną w mRNA, powodując jej przecięcie lub zahamowanie translacji. Jedna cząsteczka miRNA może posiadać wiele sekwencji docelowych w mRNA, a także pojedyncza sekwencja mRNA może zawierać wiele miejsc wiązania dla różnych miRNA [10,13].

Z danych literaturowych wiadomo, że miRNA ulegają wysokiej ekspresji w układzie sercowo-naczyniowym. Biorą one udział w regulacji procesów komórkowych takich jak różnicowanie, wzrost czy apoptoza. Przy pomocy eksperymentów z użyciem enzymów kluczowych dla powstawania miRNA (Dicer i Drosha) wykazano, iż cząsteczki te pełnią główne funkcje w regulacji takich procesów jak angiogeneza, proliferacja czy procesy zapalne w obrębie naczyń krwionośnych. Zaburzenia w funkcjonowaniu tych cząsteczek mogą prowadzić do powstania stanów chorobowych [11, 12, 13, 14, 15, 16].

Zgłoszenie patentowe US 2008/0305507 (publ. 2008–11–12) dotyczy enzymatycznej metody oznaczania poziomu całkowitej homocysteiny w próbkach biologicznych, takich jak osocze czy surowica krwi, która charakteryzuje się wysoką specyficznością.

Zgłoszenie patentowe CA2783536 (publ. 2011–06–16) opisuje metodę oceny ryzyka rozwoju chorób układu krążenia, w oparciu o oznaczenie poziomu przynajmniej dwóch biomarkerów miRNA i/lub przynajmniej trzech biomarkerów białkowych (wybranych z listy podanej przez autorów zgłoszenia patentowego), w badanych próbkach. Poziom oznaczonych markerów molekularnych koreluje z poziomem ryzyka rozwoju chorób układu krążenia człowieka.

Zgłoszenie patentowe WO2010103015 opisuje wykorzystanie miRNA jak i antysensowych oligonukleotydów skierowanych przeciwko konkretnym miRNA, jako narzędzie do diagnostyki i leczenia chorób układu krążenia. Narzędzie to można również stosować również do poszukiwania/selekcji biologicznie aktywnych cząsteczek w celu leczenia i zapobiegania rozwojowi chorób układu krążenia lub w celu określenia predyspozycji rozwoju tej grupy chorób.

Choroby układu krążenia to bardzo poważny problem zdrowotny, zwłaszcza w krajach wysoko rozwiniętych. Obecnie stosowana diagnostyka jest w stanie wykryć jedynie zaawansowane stadia choroby, a także wymaga hospitalizacji pacjenta. Niezwykle ważne jest wcześniejsze wykrycie ognisk choroby poprzez zastosowanie łatwiejszych i szybszych technik diagnostycznych. Z punktu widzenia wprowadzania wczesnej profilaktyki zastosowanie biomarkerów pozwoliłoby uniknąć konieczności stosowania długotrwałych i kosztownych terapii leczniczych.

Pomimo zwiększających się co roku nakładów na ochronę zdrowia i wdrażanych programów profilaktycznych, nie ma narzędzi diagnostycznych, które umożliwiłyby szybką diagnozę. Opracowany na podstawie wytypowanych biomarkerów test diagnostyczny nie tylko umożliwiłby postawienie szybkiej diagnozy, ale również pozwoliłby znacznie obniżyć koszty badania oraz zapobiegać wysokim kosztom leczenia szpitalnego, a także skrócić czas oczekiwania na wydanie wyniku i zwiększyć ilość jednorazowo analizowanych prób.

Celem wynalazku jest opracowanie metody umożliwiającej opracowanie i wytypowanie narzędzia diagnostycznego do wykrywania wczesnych stadiów chorób układu krążenia, dającego podstawy do opracowania testów diagnostycznych stosowanych dla zapobiegania chorobom układu krążenia.

Nieoczekiwanie okazało się, że opracowana według wynalazku metoda daje możliwość szybszej i bardziej precyzyjnej diagnostyki, a przede wszystkim daje możliwość wykrycia zmian na poziomie molekularnym, przed pojawieniem się zmian strukturalnych śródbłonna naczyń krwionośnych (stan chorobowy).

Przedmiotem wynalazku jest sposób określania zmian ekspresji cząsteczek miRNA *in vitro* w celu oznaczania wczesnych chorobowych zmian strukturalnych śródbłonna naczyń krwionośnych spowodowanych hiperhomocysteinemią wywołaną podwyższonym poziomem tiolaktonu homocysteiny we krwi, obejmujący pomiar ekspresji cząsteczek miRNA wybranych z grupy składającej się z hsa-miR 30e o długości 22nt i SEKW NR ID 2, hsa-miR 331 5p o długości 22nt i SEKW NR ID 5 lub hsa-miR 331 3p o długości 21nt i SEKW NR ID 6, przy czym co najmniej czterokrotny wzrost ekspresji

rzeczonych cząsteczek miRNA w porównaniu z próbką kontrolną stanowi wskaźnik wczesnych chorobowych zmian strukturalnych śródbłonka naczyń krwionośnych spowodowanych hiperhomocysteinemią wywołaną podwyższonym poziomem tiolaktonu homocysteiny we krwi.

Na figurze 1 przedstawiono przykładowe widmo dla pomiaru absorbancji w zakresie UV-VIS próbek miRNA wyznakowanych barwnikami fluorescencyjnymi Cy3 i Cy5.

W celu lepszego zrozumienia wynalazku poniżej przedstawiono przykładowe rozwiązania.

#### Przykłady

Badania prowadzono na komórkach ludzkiego śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC) ze źródeł komercyjnych (Lonza). Hodowlę komórek HUVEC prowadzono na pożywce EGM 2 (Lonza), z dodatkiem antybiotyku i czynników wzrostu. Badania prowadzono przez 24 h z dodatkiem do medium hodowlanego tiolaktonu homocysteiny w stężeniach 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{M}$ . Po zakończeniu inkubacji za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu przeprowadzono izolację kompletu próbek całkowitego RNA z komórek HUVEC (MirVana, Ambion). Całkowite RNA zostało również wyizolowane ze świeżej krwi obwodowej, pobranej na EDTA lub z frakcji leukocytarnej. W tym celu próbkę krwi zwirowano przez 10 min w temperaturze 4°C, 16000 g. Po odwirowaniu zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Wszystkie próbki całkowitego RNA scharakteryzowano pod względem czystości i jakości na bioanalizatorze Agilent 2100 (Eukaryote Total RNA Nano 6000 kit).

Do dalszych etapów wyselekcjonowano tylko próbki, dla których współczynnik RIN (*ang. RNA Integrity Number*) wynosił powyżej 8,0. W ten sposób zgromadzono bibliotekę próbek całkowitego RNA z dwóch powtórzeń biologicznego eksperymentu obrazującego wpływ tiolaktonu homocysteiny na zmiany w poziomie ekspresji miRNA. Pulę cząsteczek miRNA obecnych w próbkach całkowitego RNA wyznakowano barwnikami fluorescencyjnymi Cy3 i Cy5 przy pomocy zestawu komercyjnego (ULS microRNA lab eling Kit, Kreatech Diagnostics), zgodnie z protokołem:

Tabela 1  
Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji odwrotnej transkrypcji

<b>Składniki reakcji</b>	
całkowite RNA	2 $\mu\text{g}$
Cy3/Cy5	2 $\mu\text{l}$
10x labeling solution	2 $\mu\text{l}$
nuclease free water	do 20 $\mu\text{l}$
<b>85°C, 15min, 500rpm</b>	

Po inkubacji, próbki RNA oczyszczono na kolumnach KREApure columns (Kreatech Diagnostics) zgodnie z protokołem dołączonym przez producenta. Jakość wyznakowanych fluorescencyjnie próbek (stężenie cDNA oraz ilość przyłączonego barwnika fluorescencyjnego), oraz ich czystość sprawdzono przy pomocy spektrofotometru Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Do hybrydyzacji używano tylko próbki, w których do puli miRNA przyłączone zostało przynajmniej 100 pmoli barwnika fluorescencyjnego.

Tabela 2  
Wyniki pomiarów absorpcji w zakresie UV-VIS próbek miRNA wyznakowanych barwnikami fluorescencyjnymi Cy3 i Cy5

nazwa próbki	stężenie	jedn	typ próbki	barwnik1	stężenie	jedn	barwnik2	stężenie	jedn
k1 HTL Cy3	61,5	ng/μl	ssDNA	Cy3	5,5	pmol/μl	Cy5	-0,1	pmol/μl
k2 HTL Cy3	74,0	ng/μl	ssDNA	Cy3	6,6	pmol/μl	Cy5	0,0	pmol/μl
k3 HTL Cy3	92,6	ng/μl	ssDNA	Cy3	7,2	pmol/μl	Cy5	0,1	pmol/μl
k4 HTL Cy3	95,0	ng/μl	ssDNA	Cy3	8,1	pmol/μl	Cy5	0,0	pmol/μl
k5 HTL Cy3	46,8	ng/μl	ssDNA	Cy3	6,8	pmol/μl	Cy5	0,0	pmol/μl
1μM HTL Cy3	80,5	ng/μl	ssDNA	Cy3	5,7	pmol/μl	Cy5	0,0	pmol/μl
10μM HTL Cy3	110,9	ng/μl	ssDNA	Cy3	7,4	pmol/μl	Cy5	0,0	pmol/μl
100μM HTL Cy3	75,3	ng/μl	ssDNA	Cy3	3,5	pmol/μl	Cy5	0,0	pmol/μl
500μM HTL Cy3	79,4	ng/μl	ssDNA	Cy3	6,6	pmol/μl	Cy5	0,0	pmol/μl
1000μM HTL Cy3	77,8	ng/μl	ssDNA	Cy3	5,9	pmol/μl	Cy5	0,0	pmol/μl
K1 HTL Cy5	102,5	ng/μl	ssDNA	Cy3	1,1	pmol/μl	Cy5	8,6	pmol/μl
K2 HTL Cy5	69,6	ng/μl	ssDNA	Cy3	1,0	pmol/μl	Cy5	6,8	pmol/μl
K3 HTL Cy5	94,4	ng/μl	ssDNA	Cy3	0,8	pmol/μl	Cy5	8,3	pmol/μl
K4 HTL Cy5	79,2	ng/μl	ssDNA	Cy3	0,9	pmol/μl	Cy5	6,9	pmol/μl
K5 HTL Cy5	47,4	ng/μl	ssDNA	Cy3	1,2	pmol/μl	Cy5	7,0	pmol/μl
1μM HTL Cy5	83,8	ng/μl	ssDNA	Cy3	0,9	pmol/μl	Cy5	6,8	pmol/μl
10μM HTL Cy5	92,1	ng/μl	ssDNA	Cy3	0,1	pmol/μl	Cy5	6,2	pmol/μl
100μM HTL Cy5	83,5	ng/μl	ssDNA	Cy3	1,2	pmol/μl	Cy5	8,0	pmol/μl
500μM HTL Cy5	77,0	ng/μl	ssDNA	Cy3	0,9	pmol/μl	Cy5	6,8	pmol/μl
1000μM HTL Cy5	83,0	ng/μl	ssDNA	Cy3	1,0	pmol/μl	Cy5	7,0	pmol/μl

Następnie zastosowano proces hybrydyzacji do mikromacierzy zawierających sondy specyficzne dla prekursorów ludzkich miRNA (pre-miRNA). Podczas hybrydyzacji stosowano podejście typu „dye swap”, tzn. że w pierwszym powtórzeniu próbkę kontrolną (miRNA pochodzące z komórek nie traktowanych tiolaktonem Hcy) wyznakowano Cy3 a próbkę badaną Cy5, a przy drugim powtórzeniu zamieniono barwniki, tak aby próba kontrolna wyznakowana została Cy5 a badana Cy3. Próby kontrolne połączono z odpowiadającymi im próbkami badanymi i zatężono do 20 μl. Proces hybrydyzacji przeprowadzono według poniższej tabeli. Po wysuszeniu płytki hybrydyzacyjne skanowano za pomocą skanera do mikromacierzy GenePix 4000AL. (Molecular Devices) z rozdzielczością 5 μM.

Tabela 3

Protokół hybrydyzacji, wraz z czasem trwania i składem buforów w poszczególnych etapach hybrydyzacji sond wyznakowanych fluorescencyjnie z płytkami mikromacierzowymi

ETAP I	płukanie; 5x SSC, 0,1% SDS, 1,5min, 42°C	
ETAP II	prehybrydyzacja 5x SSC, 0,1% SDS, 1h, 42°C	
ETAP III	płukanie	5 min., 42°C, woda milliQ
		1,5 min., 5x SSC, 0,1% SDS
ETAP IV	nałożenie próbki, miRNA OneArray hybridization buffer II	
ETAP V	hybrydyzacja 18h, 42°C	
ETAPVI	płukanie	4 min., 42°C, 5x SSC, 0,1 % SDS
		6 min., 23°C, 2x SSC, 0,1 % SDS
		2 min., 23°C, 0,2x SSC
ETAPVII	suszenie 2min, 30°C	

Przeprowadzono analizę mikromacierzy z wykorzystaniem oprogramowania GenePix Pro6.0. Dla każdej sondy umieszczonej na mikromacierzy (w tym dla sond kontrolnych) zliczono sygnały pochodzące od próby kontrolnej i badanej, a także wykluczono z dalszej analizy sygnały słabe oraz artefakty. Następnie przeprowadzono analizę statystyczną posługując się dostępnym komercyjnie oprogramowaniem R (<http://www.r-project.org>).

Na podstawie przeprowadzonych analiz wytypowano markery molekularne, które stanowią miRNA wykazujące przynajmniej czterokrotną różnicę w ekspresji pod wpływem tiolaktonu homocysteiny, w porównaniu do próbek kontrolnych (nie traktowanych tiolaktonem homocysteiny).

Tabela 4

Wykaz miRNA wykazujących odmienną ekspresję pod wpływem tiolaktonu homocysteina. Wartości krotności zmiany przedstawione w tabeli odnoszą się do najwyższego stężenia HTL (1000  $\mu$ M)

miRNA	numer w bazie danych miRBase	Krotność zmiany (FC)
hsa-miR-200c	Acc:MI0000342	6,59
hsa-miR-192	Acc:MI0000234	5,47
hsa-miR-30e	Acc:MI0000749	15,9
hsa-miR-let 7b	Acc:MI0000650	20,11
hsa-miR-200b	Acc:MI0000650	6,38
hsa-miR-377	Acc:MI0000785	6,41
hsa-miR-34a	Acc:MI0000268	18,83
hsa-miR-331	Acc:MI0000812	6,24
hsa-miR-125 b1	Acc:MI0000446	-7,36

Spośród tej grupy miRNA wybrano te cząsteczki, których poziom ekspresji był najbardziej zmieniony w porównaniu do kontroli. Były to:

- hsa-miR 34a o długości 22nt i **SEQ. ID nr 1**;
- hsa-miR 30e o długości 22nt i **SEQ. ID nr 2**;
- hsa-miR 331 5p o długości 22nt i **SEQ. ID nr 3** oraz
- hsa-miR 331 3p o długości 21nt i **SEQ. ID nr 4**.

Następnie dla wybranych cząsteczek miRNA zaprojektowano primery typu spinki do włosów (*ang. stem loop*), przy pomocy miRNA Primer Desing Tool (<https://mirnadesigntool.astridresearch.com>), pozwalające na przepisanie miRNA na cDNA przy pomocy odwrotnej transkryptazy. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono według protokołu [17]:

Tabela 5

Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji odwrotnej transkrypcji z zastosowaniem primerów typu *stem loop*

składniki reakcji	ilość użyta do reakcji
całkowite RNA	100pg
<i>stem loop</i> primer	250pM
<b>70°C, 5 min</b> <b>0°C, 2 min</b>	
5x Reaction Buffer	1x
dNTP mix	2,5 $\mu$ M
M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/ $\mu$ l)	0,5U
RiboLock RNase Inhibitor (20U/ $\mu$ l)	0,04U
nuclease free water	do 15 $\mu$ l
<b>16°C 30 min</b> <b>42°C 60 min</b> <b>85°C 5min</b>	

Sekwencje primerów użyte do reakcji odwrotnej transkrypcji:

**SEQ. ID nr 5**

*stem loop* 331 5p

5' GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGGATCC 3'

**SEQ. ID nr 6**

*stem loop* 331 3p

5' GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTTCTAG 3'

**SEQ. ID nr 7**

*stem loop* 30e

5' GTTGGCTCTGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTTCCA 3'

**SEQ. ID nr 8**

*stem loop* 34a

5' GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACACAACC 3'

W celu określenia różnic w poziomie ekspresji miRNA przeprowadzono reakcję PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (*ang. Real-Time PCR*).

Sekwencje starterów użyte do reakcji Real-time PCR:

**SEQ. ID nr 9**

uniwersalny revers primera

5' GTGCAGGGTCCGAGGT 3'

**SEQ. ID nr 10**

331 5p forward

5' GTTCTAGGTATGGTCCCAG 3'

**SEQ. ID nr 11**

331 3p forward

5' TTGTGCCCTGGGCCTAT 3'

**SEQ. ID nr 12**

30e forward

5' GTTTGGTGTAACATCCTTGAC 3'

**SEQ. ID nr 13**

34a forward

5' GTGTGGCAGTGTCTTAGCT 3'

Tabela 6

Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji *real time PCR*

składniki reakcji	ilość użyta do reakcji
2x qPCR Mater Mix	10 µl
25µM ROX	0,2 µl
forward primer 1,5 µM	4µl
universal reverse primer 0,7 µM	1,87µl
cDNA	0,67 µl
nuclease free water	do 20µl

Tabela 7

Warunki amplifikacji cDNA w reakcji *real time PCR*; T<sub>m</sub> - temperatura topnienia primerów

temperatura	czas	ilość cykli
95°C	10 min	1
95°C	0:15 min	45
T <sub>m</sub>	1 min	
72°C	0:30 min	
95°C	1 min	1
55°C	0:30 min	1
95°C	0:30 min	1

Wszystkie reakcje przeprowadzono w dwóch powtórzeniach technicznych i trzech biologicznych.

Różnice w relatywnej ekspresji badanych cząsteczek miRNA pod wpływem homocysteiny określono na podstawie wartości Ct przy użyciu metody –  $\Delta\Delta Ct$  [18].

Zastosowanie tego rodzaju techniki umożliwi wprowadzenie szybkiego badania w laboratoriach diagnostycznych i szpitalnych. Jest to szczególnie istotne dla osób będących w grupie ryzyka rozwoju chorób układu krążenia, u których ewentualne zmiany w funkcjonowaniu śródbłonna naczyń krwionośnych są jeszcze na bardzo wczesnym etapie.

Rozwiązanie może służyć też do opracowania szybkich testów diagnostycznych wczesnych stanów chorobowych w zakresie chorób układu krążenia.

Zastosowanie opracowanej technologii umożliwia wykrywanie wczesnych zmian w funkcjonowaniu śródbłonna naczyń krwionośnych na poziomie molekularnym w stosunkowo krótkim czasie.

Wykorzystanie biomarkerów i wczesna identyfikacja niekorzystnych zmian w funkcjonowaniu śródbłonna naczyń krwionośnych, ma znaczenie dla:

- wprowadzenia szybkiego i łatwego do przeprowadzenia badania w laboratoriach diagnostycznych;
- charakterystyki molekularnej dla badań podstawowych.

Jednocześnie przy zastosowaniu proponowanego wynalazku lekarz/pracownik laboratorium diagnostycznego może realizować następujące cele:

- zastosować biomarkery do wykrywania wczesnych zaburzeń w funkcjonowaniu śródbłonna naczyń krwionośnych;
- skrócić czas potrzebny na wykonanie badania oraz zwiększyć ilość tego typu badań wykonywanych w ciągu doby;
- obniżyć koszty wykonania badania a także leczenia poprzez uniknięcie kosztownego pobytu pacjenta w szpitalu.

## Literatura

1. Jakubowski H., Fersht A. R.: Alternative pathways for editing non-cognate aminoacids by aminoacyl-tRNA synthetases; *Nucleic Acid Research*, 1981, vol9, no.13, 3105–3117
2. Perła-Kajan J., Twardowski T., Jakubowski H.: Mechanisms of homocysteine toxicity in humans; *Amino Acids* 2007; 32(4):561–72.
3. Jakubowski H.: Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures; *Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272, no 3, pp. 1935–1942.
4. Jakubowski H.: Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels; *FASEB Journal*, 1999 Dec, vol. 13: 2277–2283.
5. Jakubowski H.: Pathological consequences of homocysteine excess; *Journal of nutrition* 136: 1741S–1749S, 2006.
6. Perła J., Undas A., Twardowski T., Jakubowski H.: Purification of antibodies against N-homocysteinylation proteins by affinity chromatography on N $\omega$ -homocysteinylation-aminohexyl-agarose; *J. Chromatogr. B., Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2004 5; 807(2): 257–261.
7. Jakubowski H., Zhang L., Bardeguet A., Aviv A.: Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis; *Circulation Research* 2000; 87(1): 45–51.
8. Kerkeni M., Tnani M., Chuniaud L., Miled A., Maaroufi K., Trivin F. Comparative study on *in vitro* effect of homocysteine thiolactone and homocysteine on HUVEC cells: evidence for a stronger proapoptotic and proinflammatory homocysteine thiolactone; *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 219 (1–2): 119–126.
9. Suarez Y., Fernandez-Hernando C., Pober J., Sessa W.: Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells; *Circ Res* 2007; 100: 1165–1173.
10. Scalbert E., Bril A.: Implication of microRNA in the cardiovascular system; *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, 8 : 181–188.

11. Ji R., Cheng Y., Yue J., Yang J.: MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation; *Circ Res.* 2007; 100: 1579-1588.
12. Zhang C.: MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease; *Clinical Science* 2008, 114: 699–706.
13. Suarez Y., Fernandez-Hernando C., Pober J., Sessa W.: Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells; *Circ Res* 2007; 100: 1165–1173.
14. Kuehbach A., Urbich C., Zeiher A., Dimmler S.: Role of dicer and drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis; *Circ Res.* 2007; 101: 59–68.
15. Polse L., Tuccoli A., Mariani L., Evangelista M., Citti L., Woods K., Mercatanti A.: MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs; *Blond*, 2006 Nov1, vol 108 no9.
16. Jung M, Mollenkopf H J, Grimm C, Wagner I, Albrecht M, Waller T, Pilarsky C, Johannsen M, Stephan C, Lehrach H, Nietfeld W, Rudel T, Jung K, Kristiansen G.: MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy; *J Cell Mol Med* 2009, Sep; 13(9B): 3918–28.
17. M. Tefvik Dorak (ed.), 2006 Real-time PCR.

**Lista sekwencji****SEQ. ID nr 1**

(hsa-miR 34a)

5'cuagguaugguccagggauc'3

**SEQ. ID nr 2**

(hsa-miR 30e)

5'uguaaacauccuugacuggaag'3

**SEQ. ID nr 3**

(hsa-miR 331 5p)

5'cuagguaugguccagggauc'3

**SEQ. ID nr 4**

(hsa-miR 331 3p)

5'aagauccuauccgggucccg'3

**SEQ. ID nr 5***stem loop 331 5p*

5' GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGGATCC3'

**SEQ. ID nr 6***stem loop 331 3p*

5' GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTTCTAG 3'

**SEQ. ID nr 7***stem loop 30e*

5' GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTTCCA 3'

**SEQ. ID nr 8***stem loop 34a*

5' GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACACAACC 3'

**SEQ. ID nr 9**

uniwersalny revers primer

5' GTGCAGGGTCCGAGGT 3'

**SEQ. ID nr 10**

331 5p forward

5' GTTCTAGGTATGGTCCCAG 3'

**SEQ. ID nr 11**

331 3p forward

5' TTGTGCCCTGGGCCTAT 3'

**SEQ. ID nr 12**

30e forward

5' GTTTGGTGTAACATCCTTGAC 3'

**SEQ. ID nr 13**

34a forward

5' GTGTGGCAGTGTCTTAGCT 3'

**Zastrzeżenie patentowe**

1. Sposób określania zmian ekspresji cząsteczek miRNA *in vitro* w celu oznaczania wczesnych chorobowych zmian strukturalnych śródbłonna naczyń krwionośnych spowodowanych hiperhomocysteinemią wywołaną podwyższonym poziomem tiolaktonu homocysteiny we krwi, obejmujący pomiar ekspresji cząsteczek miRNA wybranych z grupy składającej się z:
  - hsa-miR 30e o długości 22nt i SEKW NR ID 2
  - hsa-miR 331 5p o długości 22nt i SEKW NR ID 5 lub
  - hsa-miR 331 3p o długości 21nt i SEKW NR ID 6,przy czym co najmniej czterokrotny wzrost ekspresji rzeczonych cząsteczek miRNA w porównaniu z próbką kontrolną stanowi wskaźnik wczesnych chorobowych zmian strukturalnych śródbłonna naczyń krwionośnych spowodowanych hiperhomocysteinemią wywołaną podwyższonym poziomem tiolaktonu homocysteiny we krwi.

## Rysunek

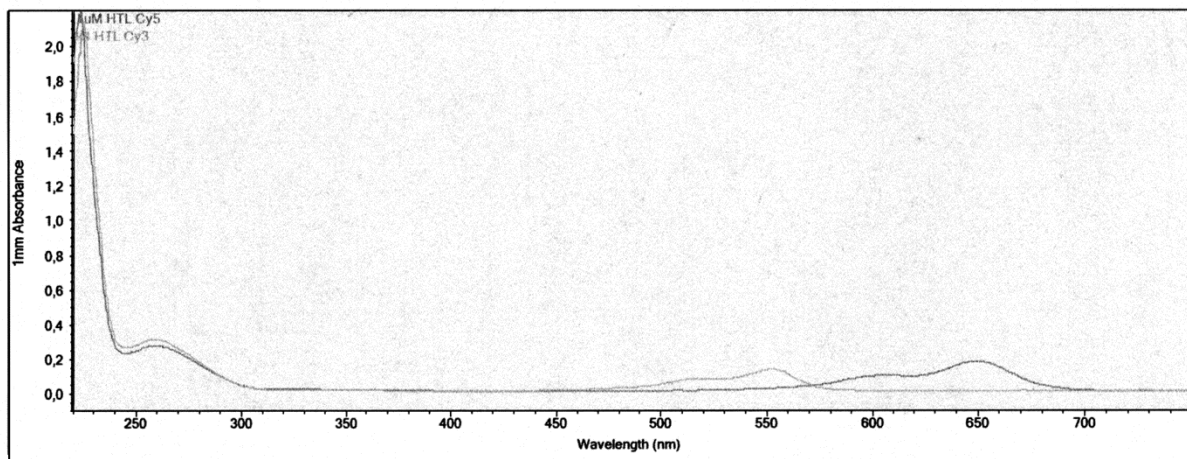


Fig. 1