

miRNA kao regulator izražaja antioksidativnih enzima u mononuklearnim stanicama periferne krvi

Lagator, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:291854>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Maja Lagator

miRNA KAO REGULATOR IZRAŽAJA
ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U
MONONUKLEARNIM STANICAMA
PERIFERNE KRVI

Diplomski rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Maja Lagator

miRNA KAO REGULATOR IZRAŽAJA
ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U
MONONUKLEARNIM STANICAMA
PERIFERNE KRVI

Diplomski rad

Osijek, 2024.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Zavod za fiziologiju i imunologiju

Mentorica rada: prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med.

Neposredni voditelj: doc. dr. sc. Petar Šušnjara, mag. med. lab. diag.

Rad ima 28 listova, 1 tablicu i 3 slike.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med. na vođenju i pomoći prilikom pisanja ovog rada.

Također veliko hvala doc. dr. sc. Petru Šušnjari, mag. med. lab. diag. na pomoći tijekom izvođenja eksperimenta i na strpljenju i savjetima.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i roditeljima koji su mi omogućili studiranje i bili podrška. Naposljetku, želim zahvaliti Danijelu za svaku podršku, slušanje i savjete u posljednje dvije godine.

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Biogeneza miRNA | 1 |
| 1.1.1. Regulacija biogeneze miRNA | 2 |
| 1.1.2. IsomiR | 2 |
| 1.2. Mehanizam djelovanja miRNA | 3 |
| 1.2.1. Prepoznavanje ciljane mRNA | 3 |
| 1.2.2. Inhibicija i cijepanje ciljnog transkripta | 3 |
| 1.3. Biološke funkcije miRNA | 4 |
| 1.3.1. Uloga miRNA u međustaničnoj komunikaciji | 4 |
| 1.3.2. Uloga miRNA u epigenetici | 4 |
| 1.4. miRNA u ljudskim bolestima | 5 |
| 1.4.1. Kardiovaskularne bolesti | 5 |
| 1.4.2. Metaboličke bolesti | 5 |
| 1.4.3. Tumori | 6 |
| 1.5. Antioksidativni enzimi | 6 |
| 1.5.1. miRNA i antioksidativni enzimi | 7 |
| 2. HIPOTEZA | 8 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 9 |
| 4. MATERIJAL I METODE | 10 |
| 4.1. Ustroj studije | 10 |
| 4.2. Materijal | 10 |
| 4.3. Metode | 10 |
| 4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi | 10 |
| 4.3.2. Izolacija miRNA | 10 |
| 4.3.3. Sinteza cDNA i PCR u stvarnom vremenu | 11 |
| 4.4. Statističke metode | 12 |
| 5. REZULTATI | 13 |
| 5.1. Uvodavanje metode detekcije miRNA | 13 |
| 5.2. Utvrđivanje sekvenci miRNA za gene antioksidativnih enzima i genski izražaj miRNA | 13 |
| 6. RASPRAVA | 15 |
| 7. ZAKLJUČCI | 18 |
| 8. SAŽETAK | 19 |
| 9. SUMMARY | 20 |

| | | |
|-----|------------------|----|
| 10. | LITERATURA | 21 |
| 11. | ŽIVOTOPIS | 27 |

POPIS KRATICA I AKRONIMA

AGO – Argonaute protein

ARPE - engl. *retinal pigment epithelial cell line*

ATF4 – aktivirajući faktor transkripcije

CAT – katalaza

CCR4-NOT – engl. *carbon catabolite repression 4 – negative on TATA-less*

DGCR8 – engl. *Digeorge syndrome critical region gene 8*

DMSO – dimetil sulfoksid

DNMT – DNA metiltransferaza (engl. *DNA methyltransferase*)

eIF4E – faktor inicijacije eukariotske translacije 4E (engl. *eukaryotic translation initiation factor 4E*)

EXP5- eksportin 5

FBS – fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*)

GPx – glutation peroksidaza

HDAC – histon deacetilaza (engl. *histone deacetylase*)

HDL – lipoprotein visoke gustoće (engl. *high density lipoprotein*)

HLE – humane epitelne stanice leće (engl. *human lens epithelial cells*)

HUVEC- endotelne stanice humane pupčane vrpce (engl. *human umbilical vein endothelial cells*)

MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza

MDM2 - engl. *mouse double minute 2*

miRISC – miRNA – inducirani utišavajući kompleks (engl. *miRNA-induces silencing complex*)

MRE - engl. *miRNA response element*

MSA – multipla sistemska atrofija

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NOX – NADPH oksidaza

ORF – otvoreni okviri čitanja (engl. *open reading frame*)

PABP – poli-A vezujući protein (engl. *poly-A binding protein*)

PAN – poli-A nukleaza

PAX6 – engl. *paired box 6*

PAZ – Piwi-Argonaute-Zwille

RBP – RNA vezujući proteini (engl. *RNA-binding protein*)

RNS – reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

SOD – superoksid dismutaza

TENT – terminalna nukleotidiltransferaza (engl. *terminal nucleotidyl transferase*)

TGFβ2 - engl. *transforming growth factor-β receptor 2*

TNF – tumorski faktor nekroze (engl. *tumour necrosis factor*)

TNRC6 - engl. *trinucleotide repeat-containing gene 6 protein family*

TRBP – engl. *transactivation response RNA binding protein*

TXNIP – protein koji djeluje na tioredoksin (engl. *thioredoxin interacting protein*)

TXNRD2 – tioredoksin reduktaza 2 (engl. *thioredoxin reductase 2*)

UTR – netranslatirana regija (engl. *untranslated region*)

1. UVOD

Male RNA (engl. *small RNA*) su regulatorne nekodirajuće RNA (engl. *non-coding RNA*, ncRNA) (1). Postoji nekoliko vrsta malih RNA u čovjeka: mikro RNA (miRNA), male intereferirajuće RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) i Piwi-interaktivna RNA (engl. *PIWI-interacting RNA*, piRNA). miRNA su kromosomski kodirane kratke dvolančane RNA od otprilike 22 nukleotida te čine većinu ukupnih malih RNA u skoro svim somatskim tkivima (2,3). Prva ljudska miRNA, let-7, otkrivena je 2000. godine i do 2024. upisano je 2693 humanih zrelih miRNA u miRBase bazu podataka (4,5). Većina zrelih miRNA nalazi se unutar introna ili egzona nekodirajuće RNA, ali i unutar introna pre-mRNA (4).

1.1. Biogeneza miRNA

Poznato je četiri osnovnih procesa nastanka miRNA: transkripcija primarnog miRNA (pri-miRNA) transkripta, obrada primarnog transkripta u prekursorsku miRNA (pre-miRNA), prijenos pre-miRNA u citoplazmu te obrada u zreli miRNA. Svaki korak procesa nastanka miRNA je vrlo reguliran te disregulacija može dovesti do raznih bolesti, uključujući rak, neurodegenerativne poremećaje i kardiovaskularne poremećaje (6). Većina miRNA nastaje kanonskim ili klasičnim putem. Za transkripciju većine miRNA gena odgovorna je RNA polimeraza II (Pol II). Transkripcijom DNA nastaje velika RNA koja se naziva pri-miRNA (4). Nakon transkripcije slijedi obrada pri-miRNA u pre-miRNA pomoću Mikroprocesorskog kompleksa koji se sastoji od jezgrinih proteina Drosha i DGCR8 (engl. *Digeorge syndrome critical region gene 8*) te brojnih kofaktora. Svaka pri-miRNA ima barem jednu regiju koja sadrži strukturu poput ukosnice i služi kao supstrat za Mikroprocesorski kompleks. Drosha ima dvije domene RNaze III od kojih svaka cijepa jedan lanac pri-miRNA što dovodi do oslobađanja petlje odnosno pre-miRNA duge oko 60 nukleotida. Eksportin 5 (Exp5), Ran-GTP ovisan protein, prenosi pre-miRNA u citoplazmu gdje se dalje obrađuje pomoću enzima Dicer koji je, kao i Drosha, endonukleaza, a sastavljen je od helikazne domene, DUF283 domene, PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) domene, dvije RNaza III domene i dsRNA-vezujuće domene. Uz protein Dicer kompleks čini i TRBP (engl. *transactivation response RNA binding protein*). Dicer cijepa oba lanca pre-miRNA u blizini petlje te nastaje miRNA:miRNA* dupleks veličine ~ 20 nukleotida. Jedan lanac miRNA dupleksa je zrela miRNA koja se veže za Argonaute protein (AGO) pomoću ATP-ovisnih šaperon proteina HSC70/HSP90, te formira miRNA-inducirani utišavajući kompleks (engl. *miRNA-induces silencing complex*, miRISC) uz TNRC6 (engl. *trinucleotide repeat-containing gene 6 protein family*), dok se drugi lanac miRNA* razgrađuje.

Zrela miRNA u miRISC kompleksu veže ciljane mRNA i regulira sintezu proteina (6,7). Zrela miRNA može nastati iz bilo kojeg lanca ukosnice, ali gotovo uvijek nastaje iz lanca koji ima manje stabilan 5' kraj zbog samog uklapanja u miRISC. Međutim, u rijetkim slučajevima kada oba lanca imaju sličnu stabilnost, jednako učestalo postaju zrela miRNA (8). Postoji i nekoliko alternativnih ili nekanonskih puteva biogeneze miRNA koji nisu ovisni o enzimima Drosha i Dicer. Primjerice, određeni introni mogu djelovati kao pre-miRNA ukosnice čije krajeve cijepaju spliceosomi umjesto Droshe. RNA koje su istodobno introni i pre-miRNA se nazivaju mirtroni. Mirtroni se također prenose u citoplazmu pomoću XPO5 (4).

1.1.1. Regulacija biogeneze miRNA

Biogeneza miRNA izrazito je regulirana. Transkripciju mogu regulirati transkripcijski čimbenici koji se vežu za specifične promotore. Primjerice, tumor supresor TP53 koji potiče izražaj miR-34 obitelji ili MYC onkogen koji stimulira izražaj onkogenih miRNA poput miR-17-92. Količina zrele miRNA ovisi i o učinkovitosti enzima DROSHA i DICER koja je određena strukturalnim obilježjima pre-miRNA. Osim toga, specifični RNA-vezujući proteini (engl. *RNA-binding protein*, RBP) mogu prepoznati sekvence unutar pre-miRNA i regulirati njezinu obradu (9). Primjer takvog posttranskripcijskog regulatornog puta je čimbenik matičnih stanica Lin28 koji blokira izražaj miR-let 7 obitelji. Lin28 prepoznaje specifičan slijed pre-let-7 te regrutira enzim terminalnu uridiltransferazu koja dodaje kratki poli-U rep na 3' kraj pre-miRNA te tako sprječava daljnju obradu pomoću enzima DICER. Poli-U rep zatim prepoznaje 3'-5' egzonukleaza i pre-miRNA se raspada. Let-7 miRNA potiču staničnu diferencijaciju, a Lin28 može sudjelovati u preokretanju diferencijacije tijekom indukcije pluripotentnih matičnih stanica. S druge strane, dodatak jednog nukleotida na kraj pre-miRNA može potaknuti njezinu obradu (7). miRNA može biti regulirana i procesom RNA uređivanja (engl. *RNA editing*). Protein ADAR1 može pretvoriti molekule adenzina u inozin koji se povezuje s citozinom. RNA uređivanje se može odvijati na pri-miRNA, pre-miRNA kao i na zreloj miRNA te može izmijeniti ciljane gene ili smanjiti afinitet za enzim Drosha ili DICER (10).

1.1.2. IsomiR

Iz jednog gena koji kodira za miRNA može nastati više izoformi miRNA koje se nazivaju isomiR. Postoji nekoliko načina stvaranja takvih varijacija jedne molekule miRNA. Tijekom sazrijevanja miRNA različiti enzimi, uključujući Droshu i Dicer, mogu neprecizno cijepati pri-miRNA i/ili pre-miRNA na 5' ili 3' kraju. IsomiR molekule mogu nastati i supstitucijom nukleotida, dodavanjem nukleotida na 3' krajeve pomoću enzima terminalne nukleotid

transferaze ili delecijom nukleotida pomoću 3' egzonukleaze. Također, izoforme nastale od istog prekursora mogu imati različitu osnovnu sekvencu (engl. *seed sequence*) što im omogućuje ciljanje različitih mRNA te tako proširuju svoj opseg posttranskripcijske regulacije. Osnovna sekvenca je kratka, specifična regija unutar molekule miRNA koja ima ulogu u prepoznavanju i vezanju ciljane mRNA te duga od 2 do 8 nukleotida (4,11).

1.2. Mehanizam djelovanja miRNA

1.2.1. Prepoznavanje ciljane mRNA

Zrela miRNA u miRISC kompleksu funkcionalno je podijeljena u četiri domene: osnovna, središnja, suplementarna i područje repa. U klasičnom ili kanonskom putu biogeneze miRNA prepoznavanje ciljane mRNA odvija se pretežno Watson-Crick sparivanjem između nukleotida 2-7 odnosno osnovne sekvence miRNA i 3' netranslatirane regije (engl. *3' untranslated region*, 3' UTR) mRNA (12,13). Specifična sekvenca na mRNA molekuli komplementarna osnovnoj sekvenci miRNA naziva se MRE (engl. *miRNA response element*) te se, osim na 3' UTR, može nalaziti na 5' UTR kraju molekule ili u otvorenim okvirima čitanja (engl. *open reading frame*, ORF) (14). U alternativnom putu, jedan od šest nukleotida mRNA nije komplementaran osnovnoj sekvenci miRNA. Kako bi se kompenziralo nesavršeno sparivanje dolazi do dodatnog sparivanja na 3' regiji miRNA, obično oko nukleotida 13-16 (7).

1.2.2. Inhibicija i cijepanje ciljnog transkripta

Molekule miRNA koje dijele istu osnovnu sekvencu pripadaju istoj obitelji miRNA koje mogu regulirati izražaj istih gena (15). Putem tih sekvenci miRNA u miRISC kompleksu osiguravaju specifičnost za određenu metu, dok TNRC6 veže PIWI domenu AGO proteina i posreduje regrutaciju deadenilacijskog kompleksa. Poli-A nukleaza (PAN) i CCR4-NOT (engl. *carbon catabolite repression 4 – negative on TATA-less*) kompleks skraćuju poli-A rep ciljane molekule mRNA, nakon čega slijedi destabilizacija preko procesa uklanjanja mRNA kape pomoću holoenzima DCP1/DCP2 te naposljetku 5' → 3' egzonukleolitičko raspadanje posredovano egzoribonukleazom 1 (16,17). Osim raspadanja, miRNA može posredovati i translacijsku represiju mRNA. miRISC kompleks promovira disocijaciju poli-A vezujućeg proteina (engl. *poly-A binding protein*, PABP) s poli-A repa ciljane mRNA i tako inhibira inicijaciju translacije (16). Još jedan mehanizam translacijske represije je pomoću TNRC6 i CCR4-NOT kompleksa koji pridonose aktivaciji RNA helikaze DDX6 koja dolazi u interakciju s faktorom inicijacije eukariotske translacije 4E (engl. *eukaryotic translation initiation factor 4E*, eIF4E) te tako blokira translaciju ciljane mRNA (6).

1.3. Biološke funkcije miRNA

Istraživanja biološke funkcije pojedinih miRNA obično se izvode na životinjskim „knock-out“ modelima (modelima koji imaju deleciju određenog gena) i pokusima prekomjerne ekspresije (18). Pokazalo se kako je potrebna inaktivacija nekoliko članova jedne miRNA obitelji kako bi se mogla vidjeti fenotipska posljedica. Iznimke su genski lokusi miR-96 i miR-17~92 kod kojih delecija samo jedne kopije može uzrokovati abnormalnosti. Gubitak jedne kopije miR-96 uzrokuje gluhoću, dok gubitak jedne kopije grupe gena miR-17~92 može uzrokovati skeletne anomalije, poteškoće u rastu i učenju (7). Genska inaktivacija miRNA može dovesti do smanjene represije ciljanih mRNA. U nekim slučajevima i blagi prekomjerni izražaj ciljanih mRNA može rezultirati teškim fenotipskim posljedicama. Primjerice, delecija miR-128 u miševa dovodi do smrtonosne epilepsije zbog prekomjernog izražaja nekoliko mRNA (19). Stoga možemo zaključiti da individualne miRNA održavaju homeostazu tkiva (18).

1.3.1. Uloga miRNA u međustaničnoj komunikaciji

Cirkulirajuće miRNA otkrivene su 2008. godine i dosad su napravljena mnoga istraživanja o njihovoj ulozi (20). Pokazalo se da donorske stanice mogu izlučiti molekule miRNA koje prelaze u stanice primatelje gdje onda imaju funkciju endogene miRNA te mogu utjecati na gensku ekspresiju (21). In vivo istraživanja su pokazala da se cirkulirajuće miRNA mogu ponašati kao hormoni, ponajviše u kontekstu raka i metabolizma. Makrofagi adipoznog tkiva luče egzosome u kojima se nalazi miRNA koje mogu imati ulogu endokrinih signala u regulaciji homeostaze glukoze (22). Također, molekule miRNA mogu djelovati kao signalne molekule i u kardiovaskularnom sustavu. miR-223 koja se luči iz leukocita, pronađena je u vaskularnim glatkim mišićnim stanicama gdje se inače ne izražava, te sudjeluje u regulaciji njihove proliferacije, apoptoze i migracije. Prilikom aterosklerotskih uvjeta u krvnim žilama, sekrecije miR-223 se povećava i štiti ih protiv aterogeneze (23). Smatra se da je, osim egzosomima, prijenos miRNA iz jedne stanice u drugu moguć pomoću mikrovezikula, apoptotičkih tijela, lipoproteina ili pak samostalno unutar AGO proteina. Također, prijenos između susjednih molekula moguć je pasivno preko propusne veze (engl. *gap junction*) (4). Najsnažniji dokaz hipoteze u postojanju uloge izvanstanične miRNA u međustaničnoj komunikaciji je represija ciljanih mRNA nakon tretmana stanica domaćina s izvanstaničnom miRNA (24).

1.3.2. Uloga miRNA u epigenetici

Epigenetika se definira kao nasljedne promjene ekspresiji gena odnosno fenotipa, ali bez promjena u DNA slijedu odnosno genotipu. miRNA gene su mete epigenetičkih promjena kao

što je DNA metilacija, ali i regulatori epigenetičkih modifikatora. Određena skupina miRNA, epi-miRNA, može direktno ili indirektno utjecati na izražaj nekoliko epigenetičkih regulatora kao što su DNA metiltransferaze (engl. *DNA methyltransferase*, DNMT) i histon deacetilaze (engl. *Histone deacetylase*, HDAC). Porodica miR-29 može inducirati reaktivaciju utišanih tumor supresor gena tako što utišava DNMT1 gen (4). miR-124/9 regulira HDAC5 čija je funkcija inhibicija elongacije aksona u primarnim neuronima (25).

1.4. miRNA u ljudskim bolestima

Tkivno-specifične miRNA su često povezane s bolestima određenih tkiva. Otkriveni su tkivno-specifični genski izražaji miR-122 u jetri, miR-7 u hipofizi, miR-124 u mozgu, miR-514a-3p u testisima, miR-205-5p u koži te miR-192-5p u debelom crijevu (26). Disregulacija miRNA prisutna je u raznim bolestima uključujući rak, kardiovaskularne, nefrološke i metaboličke bolesti (27).

1.4.1. Kardiovaskularne bolesti

Nekoliko miRNA ima ulogu u napredovanju kardiovaskularnih bolesti. miR-21 važan je posrednik mnogih upalnih puteva, a povećana ekspresija korelira s povećanim upalnim stanjem krvnih žila te većom nestabilnosti aterosklerotskog plaka (28). Egzogeni miR-223-3p potječe iz polimorfonuklearnih stanica ili makrofaga, a prenosi se lipoproteinima visoke gustoće (engl. *high density lipoprotein*, HDL). Također se nalazi i u hepatocitima, te održava homeostazu kolesterola tako što utišava gene povezane sa sintezom, prijenosom i metabolizmom kolesterola (29). In vitro istraživanja su pokazala kako povećani izražaj miR-29 inducira hipertrofiju primarnih srčanih miocita (4). Određene miRNA se mogu otpuštati iz kardiomiocita kao odgovor na stres ili ozljedu pa potencijalno mogu poslužiti kao srčani biomarkeri (30).

1.4.2. Metaboličke bolesti

miRNA su povezane s nekoliko metaboličkih puteva. Ciljano smanjenje miR-122 dovodi do smanjenja razine kolesterola i triglicerida u životinjskim modelima. Let-7 i porodica miR-103/107 su povezani s metabolizmom glukoze (18). Pretjerana ekspresija miR-130a, miR-130b, miR-152 u beta stanicama Langerhansovih otočića gušterače inhibira sintezu i lučenje inzulina tako što smanjuju razinu glukokinaze i E1 podjedinice piruvat dehidrogenaze. miRNA može direktno regulirati inzulin. miR-7 inhibira transkripciju inzulinskog gena tako što utišava ekspresiju PAX6 (engl. *Paired box 6*) gena (31).

1.4.3. Tumori

Disregulirane miRNA u kontekstu tumora kategoriziraju se kao onkogeni ili tumor supresori. miRNA onkogeni su u raku povećanog broja te utišavaju njihove ciljane tumor supresor gene. Suprotno od toga, miRNA tumor supresori se stvaraju manje u slučaju tumora i kao posljedica njihovi ciljani onkogeni se prekomjerno eksprimiraju. Neke miRNA, kao što je let-7, mogu istovremeno biti i onkogeni i tumor supresori (4). Kao onkogen, miR-155 je upreguliran u nekoliko agresivnih zloćudnih tumora. Njegova prekomjerna ekspresija potiskuje ekspresiju TGF β R2 (engl. *transforming growth factor- β receptor 2*) i potiče staničnu proliferaciju i migraciju stanica raka želuca (32). Istraživanje provedeno na stanicama raka pluća pokazalo je kako tumor supresor miR-660-5p kontrolira ekspresiju miR-486-5p preko onkoproteina MDM2 (engl. *mouse double minute 2*) i tumor supresora p53. miR-660 utišava MDM2 gen što posljedično dovodi do povećanja p53. Pošto je p53 transkripcijski čimbenik uključen u miRNA biogenezu, njegova aktivacija uslijed utišavanja MDM2 inicira transkripciju miR-486-5p. Snižene razine miR-486-5p u cirkulaciji indiciraju progresiju raka pluća i metastaze te potencijalno može služiti kao biomarker (33).

1.5. Antioksidativni enzimi

Antioksidansi su molekule ključne u eliminaciji reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) koje nastaju prilikom staničnih procesa, najviše iz mitohondrija prilikom oksidativne fosforilacije, ali i djelovanjem vanjskih čimbenika kao što su UV zračenje i izloženost teškim metalima. Prekomjerno nakupljanje slobodnih radikala, odnosno ROS i reaktivnih dušikovih vrsta (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), dovodi do oksidativnog stresa koji uzrokuje oksidativnu štetu kemijskim strukturama u stanici te može dovesti do raznih bolesti (34). Antioksidativni enzimi su endogeni antioksidansi poput superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx). SOD se može klasificirati u citoslonu CuZn-SOD, mitohondrijsku Mn-SOD i izvanstaničnu SOD, te ima ulogu katalizacije pretvorbe superoksidnog radikala u kisik i vodikov peroksid. CAT može neutralizirati vodikov peroksid tako što ga pretvara u molekularni kisik i vodu (35). Porodica GPx enzima pripada u selenoenzime, odnosno sadrže aminokiselinu selenocistein koja je potrebna za katalitičku aktivnost enzima. Poznato je osam izoformi GPx (GPx1-Gpx8) od kojih pet (GPx1-GPx4 i GPx6) sadrže selenocistein te imaju antioksidativnu sposobnost. GPx1 se nalazi i u citoplazmi i mitohondrijima, a katalizira glutation za redukciju toksičnih peroksida. GPx2 se najviše izražava u gastrointestinalnom sustavu i pokazalo se kako služi kao prva linija obrane protiv

oksidativnog stresa uzrokovanog hranom ili crijevnom florom. GPx3 je najvećim dijelom prisutna u plazmi, a dolazi iz epitelnih stanica renalnih tubula. GPx4 uglavnom štiti stanične membrane od oksidativne štete tako što katalizira pretvorbu lipidnih hidroperoksida kao što su fosfolipidi i kolesterol te vodikovog peroksida. GPx5 umjesto selenocisteina u aktivnom centru sadrži cistein te se pokazao kao zaštita od toksičnosti vodikovog peroksida u mišjem sjemenu. GPx6 je bliski homolog GPx3. GPx7 i GPx8 u središtu imaju cistein. GPx7 potencijalno može poboljšati nealkoholni steatohepatitis regulacijom oksidativnog stresa. GPx8 može inhibirati odgovor na oksidativni stres u stanicama hepatocelularnog karcinoma (36).

1.5.1. miRNA i antioksidativni enzimi

Većina gena koji kodiraju za antioksidativne enzime sadrže ciljane sekvence za vezanje miRNA. MnSOD (SOD2) je meta nekoliko miRNA uključujući, miR-17p, miR-23a, miR-212, miR-222 i miR-335. U raku prostate miR-17-3p utišava gene za SOD2, GPx2 i tioredoksin-reduktazu 2 (engl. *thioredoxin reductase 2*, TXNRD2) što dovodi do nakupljanja ROS-a. Inhibicija SOD2 preko mir-23a dovodi do apoptoze u kardiomiocitima (37). miR-21 također utječe na metabolizam superoksida i vodikovog peroksida ciljajući SOD3 i putem tumorskog čimbenika nekroze alfa (engl. *tumour necrosis factor α* , TNF α) neizravno smanjuje razinu SOD2 u bronhalnom epitelu (38). miR-532-3p utišava gen za protein koji djeluje na tioredoksin (engl. *thioredoxin interacting protein*, TXNIP) i tako posreduje upali i piroptozu stanice. SOD2 izravno dolazi u interakciju s miR-532-3p te ublažava supresiju TXNIP gena i smanjuje upalni proces (39). miR-30b i miR-551 inhibiraju gene koji kodiraju za katalazu. Inhibicijom miR-181a koja utišava gen za GPx1 smanjuje se apoptoza inducirana vodikovim peroksidom i proizvodnja ROS-a u kardiomiocitima. GPx1 je također povezan sa smanjenim oksidativnim odgovorom u endotelnim stanicama kada je reguliran miR-185. Prekomjerno izražen miR-196a utišava GPx3 gen u raku pluća nemalih stanica što dovodi do slabljenja tumorogenosti i do rasta stanica raka (37). Sjemene miR-122, miR-181a i miR-34c5 su bile značajno snižene kod neplodnih oligoastenoteratozoospermičnih muškaraca u usporedbi s plodnim normozoospermičnim muškarcima. Dodatno, navedene miRNA pozitivno koreliraju s GPx (40). Inhibiranje izražaja gena koji kodiraju za antioksidativne enzime dovodi do povećane razine ROS što negativno utječe na stanice i može uzrokovati njihovu smrt. U nekim stanicama kao što su stanice raka dojke, pluća ili leukemije smanjenje antioksidativnih enzima ne dovodi do apoptoze stanice nego ima suprotni učinak (37).

2. HIPOTEZA

miRNA ima sposobnost utišavanja gena koji kodiraju za antioksidativne enzime.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Primarni cilj je uhodati metodu miRNA pomoću miRNA Taqman assay-a na humanim mononuklearnim stanicama periferne krvi. Sekundarni cilj je istražiti sekvence miRNA za gene antioksidativnih enzima te pokazati izražaj ciljanog gena hsa-miR-532-3p (glutation peroksidaza 4) u odnosu na hsa-miR-16 (housekeeping gen), hsa-miR-423-3p (housekeeping gen).

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je provedena kao presječna studija.

4.2. Materijal

Materijal su tri tehnička replikata mononuklearnih stanica izoliranih iz periferne krvi mladog, zdravog ispitanika.

4.3. Metode

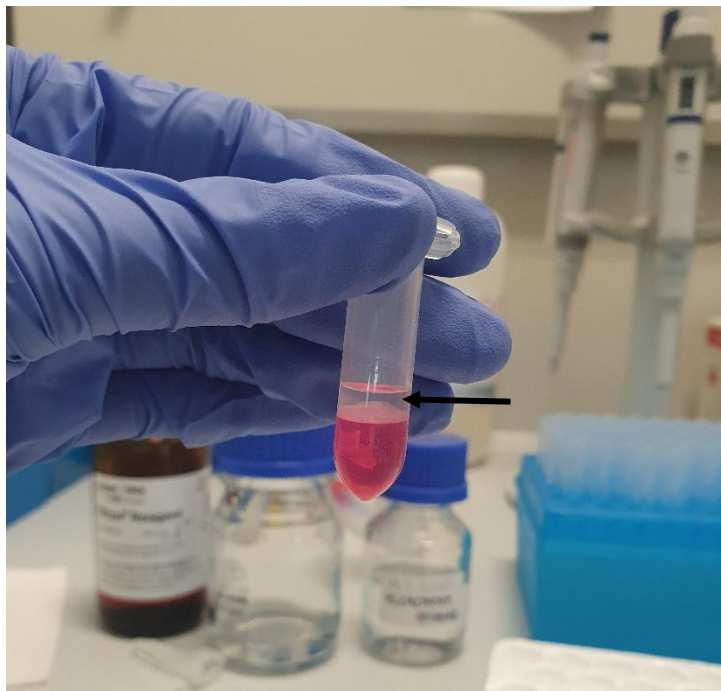
4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi

Približno 10 mL pune krvi sakupljeno je u epruvete za venepunkciju koje sadrže EDTA (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, SAD) te razrijeđeno s 1x fiziološkom otopinom puferiranom s fosfatom (PBS) u omjeru 1:1. Razrijeđeni uzorak je nadslojen na Ficoll-Paque® PLUS medij za centrifugiranje (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska) te centrifugiran na 800G 25 minuta. Prilikom centrifugiranja uzorak se razdvaja u dva sloja: žuti sloj što predstavlja plazmu i bezbojni medij. Slojeve razdvajaju mononuklearne stanice vidljive kao mutni oblačić odnosno prsten koje se zatim skupljaju pipetom i ispiru dva puta u 1x PBS. Broj stanica i vitalnost procijenjeni su brojanjem pomoću Bürker-Türk komore, a prethodno su obojane 0,4%-tnom otopinom tripan plavog (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka). Ohlađeni reagensi i puferi korišteni u izolaciji zagrijani su na sobnu temperaturu prije izolacije. Za potrebe krioprezervacije koristila se mješavina dimetil sulfoksida (DMSO) i fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) u omjeru 1:9. Kriotubice u kojima se pohranio uzorak složene su u Mr. Frosty spremnik za zamrzavanje koji sadrži izopropilni alkohol te spremljene u zamrzivač na -80 °C.

4.3.2. Izolacija miRNA

Klasična metoda za izolaciju miRNA iz mononuklearnih stanica krvi je izolacija s kiselim gvanidin-tiocijanatom i fenol-kloroform koju su preporučili Chomczynski i Sacchi (41). Stanice su odvojene centrifugiranjem, a supernatant odbačen. Zatim je u uzorak dodano 1 mL trizola, odnosno smjese gvanidin-tiocijanata i fenola koji služi za odvajanje DNA i RNA od ostalih elemenata stanice. 1-brom-3-klor-propan koristi se za odvajanje slojeva (Slika 1) te se uzorak vorteksira i inkubira osam minuta na sobnoj temperaturi nakon čega se centrifugira 15 minuta

na 12 000 okretaja. U sterilne tubice odvaja se supernatant te se dodaje izopropanol i uzorci se ponovno inkubiraju na sobnoj temperaturi osam minuta prije centrifugiranja i ispiranja 75%-tnim etanolom. Taj postupak se ponavlja još dva puta. Zadnji korak je dodavanje čiste vode bez nukleaza (engl. *Nuclease-Free Water*, NFW) i mjerenje koncentracije RNA pomoću nanofotometra IMPLEN.

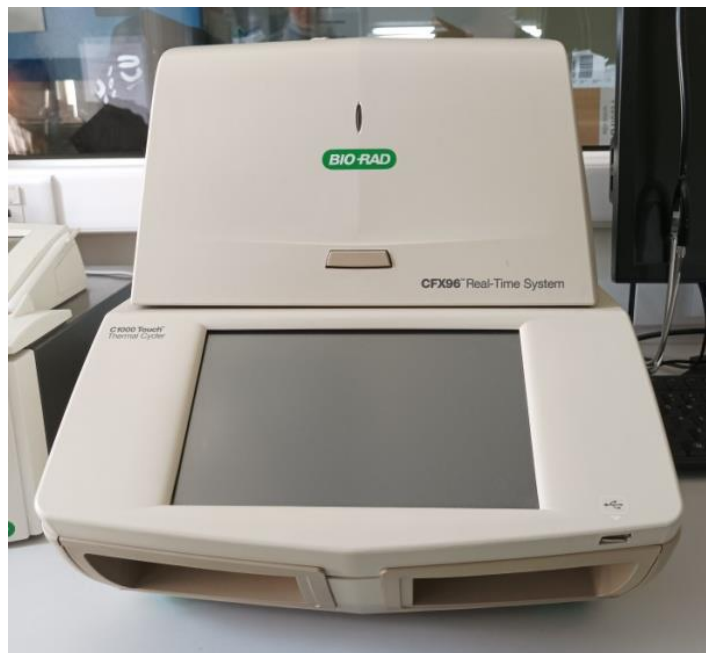


Slika 1. Prikaz slojeva nakon izolacije trizolom. U gornjem bezbojnom dijelu se nalazi RNA koja se odvaja u sterilnu tubicu (crna strelica). (izvor: original autorice rada)

4.3.3. Sinteza cDNA i PCR u stvarnom vremenu

Za detekciju i kvantifikaciju koristio se komercijalni kit Applied Biosystems™ TaqMan™ Small RNA Assay. Prvo se priprema reakcijska smjesa od 7 μL koja sadrži deoksinukleotid trifosfate, enzim reverznu transkriptazu, pufer i inhibitor RNaze. Reakcijska smjesa se zatim zajedno s 3 μL RT primera i 5 μL uzorka dodaje u jažice te se izvodi reverzna transkripcija miRNA u cDNA u termalnom cikleru čije su postavke namještene prema uputama proizvođača. Nakon toga slijedi priprema PCR reakcijske smjese koja sadrži TaqMan Small RNA Assay, PCR Master mix i NFW. Dodano je 18,67 μL PCR reakcijske smjese u svaku jažicu zajedno s 1,33 μL prethodno pripremljenog cDNA kalupa ili NFW za kontrole bez kalupa. Izražaj miRNA u triplikatnom uzorku odredio se real time PCR-om (BioRad, CFX96 Real-Time System) (Slika 2) te su postavke ponovno namještene prema uputi proizvođača koje ovise o vrsti korištenog PCR Master mix-a. Za normalizaciju korišteni su housekeeping geni hsa-miR-16 i hsa-miR-

423-3p. Housekeeping geni su stabilno prisutni u svim stanicama i uvjetima te sudjeluju u staničnom održavanju (42).



Slika 2. PCR BioRad, CFX96 Real-Time System (izvor: original autorice rada)

4.4. Statističke metode

Kategorijski podaci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabli su testirane χ^2 testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli je testirana Shapiro-Wilkovim testom. Numerički podaci su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju normalne raspodjele, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina su testirane Student t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Statističke analize provedene su korištenjem Graph Pad Prism v6.01 i Microsoft Excel 2016.

5. REZULTATI

5.1. Uvodavanje metode detekcije miRNA

Izolirana je miRNA iz mononuklearnih stanica periferne krvi mladog, zdravog ispitanika. Nakon izolacije, prema protokolu proizvođača komercijalnog kita Applied Biosystems™ TaqMan™ Small RNA Assay napravljena je detekcija i kvantifikacija te određen genski izražaj miRNA u tehničkom triplikatnom uzorku određen qRT-PCR-om. Metoda miRNA TaqMan assay uspješno je validirana.

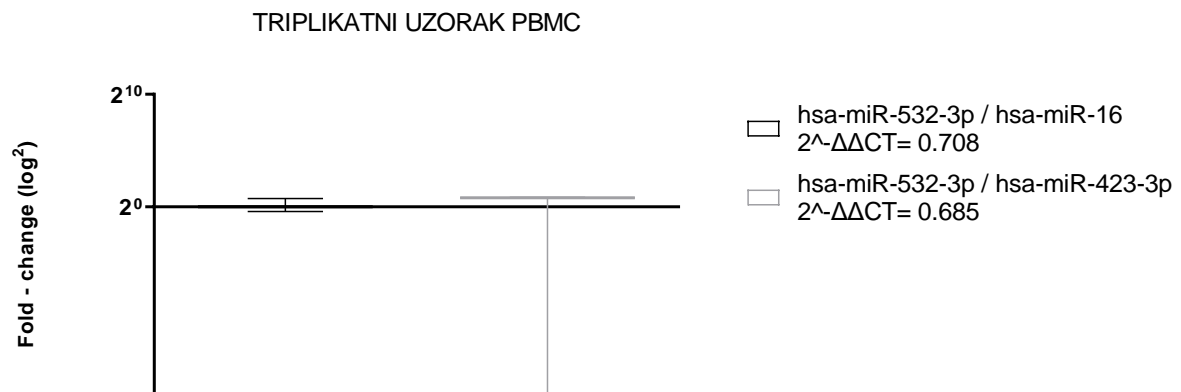
5.2. Utvrđivanje sekvenci miRNA za gene antioksidativnih enzima i genski izražaj miRNA
Za pronalazak sekvenci miRNA i predviđanje njihovih ciljanih gena koristila se baza podataka miRPathDB te web stranica proizvođača kita ThermoFisher (Tablica 1).

Tablica 1.

| Ime | mikroRNA | Sekvenca zrele miRNA* | ThermoFisher identifikacijski broj | miRPathDB link |
|-------------------------|----------------|---------------------------------|------------------------------------|---|
| Glutation peroksidaza 4 | hsa-miR-532-3p | CCUCCCACA CCCAAGGCU UGCA | 002355 | https://mpd.bioinf.uni-sb.de/mirna.html?mirna=hsa-miR-532-3p&organism=hsa |
| Housekeeping gen | hsa-miR-16 | UAGCAGCAC GUAAAUUU GGCG | 000391 | https://mpd.bioinf.uni-sb.de/mirna.html?mirna=hsa-miR-16-5p&organism=hsa |
| Housekeeping gen | hsa-miR-423-3p | AGCUCGGUC UGAGGCCCC UCAGU | 002340 | https://mpd.bioinf.uni-sb.de/mirna.html?mirna=hsa-miR-423-3p&organism=hsa |

* podebljani dio sekvence predstavlja osnovnu sekvencu miRNA

Rezultati qRT-PCR dobiveni su $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodom, a razina statističke značajnosti je $p < 0,05$. Rezultati su normalizirani housekeeping genima hsa-miR-16 i hsa-miR-423-3p. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ciljanog gena, hsa-miR-532-3p iznosila je 0,708 odnosno 0,685 (Slika 3). Vrijednost $2^{-\Delta\Delta Ct}$ manja od 1 ukazuje na downregulaciju genskog izražaja.



Slika 3. miRNA izražaj u triplikatnom uzorku mononuklearnih stanica periferne krvi
 Genski izražaj hsa-miR-532-3p smanjio se ~30% u odnosu na housekeeping gen hsa-miR-16 te ~32% u odnosu na housekeeping gen hsa-miR-423-3p. Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina prikazana kao kutija i standardna devijacija prikazana kao barovi.

6. RASPRAVA

miR-532 je molekula s nekoliko funkcija te ima važnu ulogu u biološkim procesima. Primjerice, miR-532 smanjuje apoptozu kardiomiocita uzrokovanu hipoksijom tako što cilja kompleks piruvat dehidrogenaze koji je povezan s energetsom homeostazom srca. Također je važna molekula u patogenezi nekoliko bolesti središnjeg živčanog sustava, uključujući ishemijski moždani udar. Oksidativni stres je jedan od glavnih uzroka cerebralne ishemije. Pokazalo se da miR-532-3p direktno utišava izražaj NADPH oksidaze 2 (NOX2). Cerebralna ishemija uzrokuje smanjen izražaj miR-532-3p u moždanom tkivu štakora što dovodi do povećanog izražaja NOX2 i posljedično povećane razine ROS-a koja pridonosi apoptozi neurona (43). miR-652 također znatno utišava izražaj NOX2 i proizvodnju ROS-a u mozgu štakora s cerebralnom ishemijom (44). Snižena razina GPx3 u papilarnom karcinomu štitnjače djelomično je uzrokovana prekomjernim genskim izražajem miR-146b-5p koja utišava mRNA koja kodira za GPx3. Smanjenje GPx3 narušava uklanjanje unutarstaničnog superoksida te njegovo nakupljanje može dovesti do loše prognoze raka štitnjače (45). Prekomjerna izražaj miR-433 u endotelnim stanicama humane pupčane vrpce (engl. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) doveo je do downregulacije sinteze GPx1 što je rezultiralo smanjenim antioksidativnim potencijalom. miR-92a-3p se više puta spominje u kontekstu oksidativnog stresa i endotelnog starenja te je identificirana kao regulator izražaja GPx3 (46). miR-214-3p smanjuje izražaj glutation reduktaze i citokrom P450 oksidoreduktaze te promovira oksidativni stres induciran alkoholom u stanicama jetre (47). Pojedine miRNA mogu regulirati izražaj nekoliko enzima, primjerice miR-185-5p koja regulira šest od osam GPx. Ova miRNA je osjetljiva na selen te može imati ulogu u povratnoj kontroli genskog izražaja selenoproteina (48). Inhibicija miR-34a i miR-383 može smanjiti oksidativni stres i poboljšati funkciju endotelnih stanica u hiperglikemičnim uvjetima povećavajući aktivnost SOD1 i CAT te izražaj gena za sirtuin 1 (SIRT1), protein ključan za regulaciju metabolizma glukoze i lipida u jetri (49). Prekomjerni izražaj miR-126 u ishemijskom moždanom udaru promovira SIRT1/Nrf2 signalni put, umanjuje citotoksičnost i apoptozu, smanjuje proizvodnju ROS te povećava aktivnost SOD i GPx (50). U istraživanju učinka miR-34a-5p na oksidativni stres, znanstvenici su tretirali humane epitelne stanice leće (engl. *human lens epithelial cells*, HLE-B3) vodikovim peroksidom što je dovelo do upregulacije miR-34a-5p koja je inducirala staničnu apoptozu i oksidativnu štetu. Kvantitativnim PCR-om se dokazalo da miR-34a-5p negativno regulira GPx3. Povećan oksidativni stres u HLE-B3 stanicama oslabio je prilikom prekomjernog genskog izražaja GPx3 (51). Unutarstanični antioksidativni odgovor na visoku

koncentraciju glukoze posredovan je SOD1 i 2, CAT te GPx1. Prilikom izlaganja humanih endotelnih stanica konstantno visokoj razini glukoze, razina GPx1 se povećala, dok se kod oscilirajućeg izlaganja glukozi razina nije promijenila. Pokazalo se da miR-185 ima ulogu u takvoj disregulaciji GPx1. Upotrebom anti-miR-185 inhibitora došlo je do povećanog izražaja GPx1 pri oscilaciji glukoze (52). Kod oksidativne štete inducirane povišenim ROS uzrokovane tretmanom osteoblasta vodikovim peroksidom došlo je do smanjenog izražaja miR-214. Nadalje, apoptoza izazvana visokom razinom ROS-a poništena je povećanim izražajem miR-214. Sposobnost kontroliranja apoptoze pomoću miR-214 je preko regulacije izražaja aktivirajućeg faktora transkripcije 4 (ATF4) koji inducira apoptozu. Stoga, miR-214 ima zaštitnu ulogu u šteti uzrokovanoj vodikovim peroksidom (53). miRNA može biti disregulirana u multiploj sistemskoj atrofiji (MSA) te modificirati razine glutationa čija je razina snižena u neurodegenerativnim bolestima. Kao takva miRNA ima potencijal služiti kao biomarker u diferencijalnoj dijagnozi MSA (54). Kod nealkoholne masne bolesti jetre povišen je TXNIP i circSOD2 (engl. *circular RNA superoxide dismutase 2*), dok je izražaj miR-532-3p smanjen. TXNIP je uključen u upalni odgovor i piroptozu hepatocita, a miR-532-3p ga regulira. circSOD2 dolazi u interakciju miR-532-3p i tako smanjuje njegovu sposobnost utišavanja TXNIP (55). Funkcionalna analiza pokazala je da miR-30b cilja mRNA koja kodira za katalazu. miR-30b znatno smanjuje izražaj katalaze dok inhibitor miR-30b (miR-30b antagomir) štiti ARPE-19 (engl. *retinal pigment epithelial cell line*) od oksidativne štete inducirane vodikovim peroksidom tako što povećava razinu katalaze. Svih pet članova miR-30 porodice eksprimirani su u humanim ARPE stanicama, a samo su miR-30b i miR-30d osjetljivi na vodikov peroksid. miR-30b se veže na 3'UTR regiju te inhibira izražaj katalaze na razini mRNA i proteina. miR-30b antagomiri mogu djelovati kao terapeutici za in vivo liječenje očnih bolesti posredovanih oksidativnim stresom (56). Prekomjerman genski izražaj miR-125b-5p smanjuje stanični antioksidativni kapacitet i aktivnost CAT i SOD u stanicama jetre. S druge strane, represija miR-125-5p ima suprotan učinak (57). miR-551b posreduje utišavanje gena za katalazu i dovodi do povećanog oksidativnog stresa u stanicama sa stečenom otpornošću na apoptozu (engl. *acquired apoptosis resistance, AR*) te povećava izražaj onkoproteina Mucin-1 (MUC1). MUC1 ima nekoliko uloga u razvoju tumora i pretpostavlja se da pridonosi stečenoj kemorezistenciji koja predstavlja izazov u terapiji raka. Osim povećanog izražaja MUC1, ROS održava njegovu stabilnost supresijom lizosomalne degradacije. Intervencijom protiv miR-551b/CAT/ROS puta koji rezultira prekomjernim izražajem MUC1 mogla bi se prevladati stečena kemorezistencija i pospješiti terapija (58). miR-141 i miR-200a inhibiraju p38 mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK). P38 MAPK signalni put je povezan sa

staničnom proliferacijom, diferencijacijom, apoptozom i upalom te ima važnu ulogu senzora oksidativnog stresa u ljudskim tumorima. Izražaj mir-141 i miR-200a stimuliran je oksidativnim stresom, a njihovo nakupljanje korelira s niskom razinom p38 α podjedinicom, važnim moderatorom oksidativnog stresa, te povećanom malignosti i razinom ROS-a (59).

7. ZAKLJUČCI

1. Metoda miRNA Taqman assay uspješno je validirana za analizu izražaja miRNA u humanim mononuklearnim stanicama periferne krvi što omogućuje daljnju primjenu ove metode u istraživanjima vezanim za miRNA ekspresiju.

2. Rezultati pokazuju da je genski izražaj hsa-miR-532-3p smanjen za približno 30% u odnosu na oba housekeeping gena, što ukazuje na značajnu down-regulaciju ovog gena u mononuklearnim stanicama periferne krvi te nam omogućuje razumijevanje regulacije antioksidativnih enzima i može imati implikacije u istraživanju oksidativnog stresa i povezanih bolesti.

3. S obzirom na ulogu hsa-miR-532-3p u regulaciji antioksidativnih enzima, daljnja istraživanja mogu pružiti uvid kako ova miRNA utiče na ekspresiju gena poput glutation peroksidaze 4.

4. Housekeeping gen hsa-miR-423-3p pokazao se manje pogodnim za normalizaciju genskog izražaja hsa-miR-532-3p od housekeeping gena hsa-miR-16 zbog velike standardne devijacije.

8. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA: Primarni cilj je uhodati metodu microRNA pomoću miRNA Taqman assay-a na humanim mononuklearnim stanicama periferne krvi. Sekundarni cilj je istražiti sekvence miRNA za gene antioksidativnih enzima te istražiti njihovu učinkovitost u utišavanju ciljanog gena hsa-miR-532-3p (GPx4).

NACRT STUDIJE: Presječna studija.

MATERIJALI I METODE: Materijal je uzorak mononuklearnih stanica izoliranih iz periferne venske krvi zdravog, mladog ispitanika. Za izolaciju miRNA iz mononuklearnih stanica krvi koristila se metoda s kiselim gvanidin-tiocijanatom i fenol-kloroform. Za detekciju i kvantifikaciju koristio se komercijalni kit Applied Biosystems™ TaqMan™ Small RNA Assay. Izražaj miRNA u triplikatnom uzorku odredio se real time PCR-om (BioRad, CFX96 Real-Time System). Rezultati su normalizirani housekeeping genima i prikazani kao preklopna promjena ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Statističke analize provedene su korištenjem Graph Pad Prism v6.01 i Microsoft Excel 2016.

REZULTATI: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ciljanog gena, hsa-miR-532-3p iznosila je 0,708 odnosno 0,685. Vrijednost $2^{-\Delta\Delta Ct}$ manja od 1 ukazuje na downregulaciju genskog izražaja, u ovom je slučaju došlo do ~30% smanjenog genskog izražaja u odnosu na housekeeping gene.

ZAKLJUČAK: Metoda miRNA Taqman assay uspješno je validirana za analizu izražaja miRNA u humanim mononuklearnim stanicama periferne krvi. miRNA ima ulogu u regulaciji genskog izražaja antioksidativnih enzima.

KLJUČNE RIJEČI: Antioksidativni enzimi; glutathion peroksidaza; mononuklearne stanice; RNA, micro

9. SUMMARY

miRNA AS A REGULATOR OF ANTIOXIDATIVE ENZYME'S EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

OBJECTIVES: The aim of this study was to validate microRNA method using miRNA Taqman assay on human mononuclear cells. Secondary aim was to investigate miRNA sequences targeting antioxidant enzymes and their ability to regulate target genes such as GPx4.

STUDY DESIGN: Cross-sectional study.

MATERIALS AND METHODS: Material for this study was a sample of peripheral blood mononuclear cells isolated from a healthy, young participant. miRNA was isolated with acid guanidine-thiocyanate and phenol-chloroform method. For detection and quantification commercial kit Applied Biosystems™ TaqMan™ Small RNA Assay was used. miRNA expression was determined with real time PCR (BioRad, CFX96 Real-Time System). Results were normalized with housekeeping genes and shown as fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Significance level was set at $\alpha = 0.05$. Statistical analyzes were performed using Graph Pad Prism v6.01 and Microsoft Excel 2016.

RESULTS: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of the target gene, hsa-miR-532-3p was 0.708 in relation to housekeeping gene miR-16 and 0.685 in relation to housekeeping gene miR-423-3p. A value of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ less than 1 indicates a downregulation of gene expression, in this case there was ~30% reduced gene expression.

CONCLUSION: miRNA Taqman assay method was successfully validated for the analysis of miRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. miRNA plays a role in the regulation of gene expression of antioxidant enzymes.

KEY WORDS: Antioxidant enzymes; glutathione peroxidase; mononuclear cells; RNA, micro

10. LITERATURA

1. Veneziano D, Di Bella S, Nigita G, Laganà A, Ferro A, Croce CM. Noncoding RNA: Current Deep Sequencing Data Analysis Approaches and Challenges. *Hum Mutat.* 2016;37(12):1283-1298. doi:10.1002/humu.23066.
2. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(8):509-524. doi:10.1038/nrm3838.
3. Kilikevicius A, Meister G, Corey DR. Reexamining assumptions about miRNA-guided gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(2):617-634. doi:10.1093/nar/gkab1256.
4. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):5451-5465. doi:10.1002/jcp.27486.
5. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D155-D162. doi:10.1093/nar/gky1141.
6. Bofill-De Ros X, Vang Ørom UA. Recent progress in miRNA biogenesis and decay. *RNA Biol.* 2024;21(1):1-8. doi:10.1080/15476286.2023.2288741.
7. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* 2018;173(1):20-51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006.
8. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation [published correction appears in *Nat Rev Genet.* 2004 Aug;5(8):631]. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):522-531. doi:10.1038/nrg1379.
9. Treiber T, Treiber N, Plessmann U, et al. A Compendium of RNA-Binding Proteins that Regulate MicroRNA Biogenesis. *Mol Cell.* 2017;66(2):270-284.e13. doi:10.1016/j.molcel.2017.03.014.
10. King VM, Borchert GM. MicroRNA Expression: Protein Participants in MicroRNA Regulation. *Methods Mol Biol.* 2017;1617:27-37. doi:10.1007/978-1-4939-7046-9_2.
11. Jiang G, Reiter JL, Dong C, et al. Genetic Regulation of Human isomiR Biogenesis. *Cancers (Basel).* 2023;15(17):4411. Published 2023 Sep 4. doi:10.3390/cancers15174411.
12. Shi CY, Kingston ER, Kleaveland B, Lin DH, Stubna MW, Bartel DP. The ZSWIM8 ubiquitin ligase mediates target-directed microRNA degradation. *Science.* 2020;370(6523):eabc9359. doi:10.1126/science.abc9359.

13. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.
14. Xu W, San Lucas A, Wang Z, Liu Y. Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics*. 2014;15 Suppl 7(Suppl 7):S4. doi:10.1186/1471-2105-15-S7-S4.
15. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005;3(3):e85. doi:10.1371/journal.pbio.0030085.
16. Iwakawa HO, Tomari Y. Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Mol Cell*. 2022;82(1):30-43. doi:10.1016/j.molcel.2021.11.026.
17. Vijjamarri AK, Niu X, Vandermeulen MD, et al. Decapping factor Dcp2 controls mRNA abundance and translation to adjust metabolism and filamentation to nutrient availability. *Elife*. 2023;12:e85545. Published 2023 Jun 2. doi:10.7554/eLife.85545.
18. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;87:3-14. doi:10.1016/j.addr.2015.05.001.
19. Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol*. 2015;25(3):137-147. doi:10.1016/j.tcb.2014.11.004.
20. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-10518. doi:10.1073/pnas.0804549105.
21. Bär C, Thum T, de Gonzalo-Calvo D. Circulating miRNAs as mediators in cell-to-cell communication. *Epigenomics*. 2019;11(2):111-113. doi:10.2217/epi-2018-0183.
22. Ying W, Riopel M, Bandyopadhyay G, et al. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity. *Cell*. 2017;171(2):372-384.e12. doi:10.1016/j.cell.2017.08.035.
23. Shan Z, Qin S, Li W, et al. An Endocrine Genetic Signal Between Blood Cells and Vascular Smooth Muscle Cells: Role of MicroRNA-223 in Smooth Muscle Function and Atherogenesis. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(23):2526-2537. doi:10.1016/j.jacc.2015.03.570.
24. Turchinovich A, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Extracellular miRNA: A Collision of Two Paradigms. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(10):883-892. doi:10.1016/j.tibs.2016.08.004.

25. Gu X, Fu C, Lin L, et al. miR-124 and miR-9 mediated downregulation of HDAC5 promotes neurite development through activating MEF2C-GPM6A pathway. *J Cell Physiol.* 2018;233(1):673-687. doi:10.1002/jcp.25927.
26. Ludwig N, Leidinger P, Becker K, et al. Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(8):3865-3877. doi:10.1093/nar/gkw116.
27. Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, et al. Interplay between miRNAs and human diseases. *J Cell Physiol.* 2018;233(3):2007-2018. doi:10.1002/jcp.25854.
28. Parahuleva MS, Lipps C, Parviz B, et al. MicroRNA expression profile of human advanced coronary atherosclerotic plaques. *Sci Rep.* 2018;8(1):7823. Published 2018 May 18. doi:10.1038/s41598-018-25690-4.
29. Zhang MW, Shen YJ, Shi J, Yu JG. MiR-223-3p in Cardiovascular Diseases: A Biomarker and Potential Therapeutic Target. *Front Cardiovasc Med.* 2021;7:610561. Published 2021 Jan 20. doi:10.3389/fcvm.2020.610561.
30. Hailu FT, Karimpour-Fard A, Neltner B, et al. Circulating and Cardiac Tissue miRNAs in Children with Dilated Cardiomyopathy. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2023;10(9):391. Published 2023 Sep 11. doi:10.3390/jcdd10090391.
31. Agbu P, Carthew RW. MicroRNA-mediated regulation of glucose and lipid metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(6):425-438. doi:10.1038/s41580-021-00354-w.
32. Qu Y, Zhang H, Sun W, et al. MicroRNA-155 promotes gastric cancer growth and invasion by negatively regulating transforming growth factor- β receptor 2 [published correction appears in *Cancer Sci.* 2020 Jul;111(7):2656]. *Cancer Sci.* 2018;109(3):618-628. doi:10.1111/cas.13472.
33. Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. *Dis Model Mech.* 2021;14(4):dmm047662. doi:10.1242/dmm.047662.
34. Hernández-Cruz EY, Arancibia-Hernández YL, Loyola-Mondragón DY, Pedraza-Chaverri J. Oxidative Stress and Its Role in Cd-Induced Epigenetic Modifications: Use of Antioxidants as a Possible Preventive Strategy. *Oxygen.* 2022; 2(2):177-210. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020015>.
35. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(2):532-553. doi:10.1159/000485089.

36. Pei J, Pan X, Wei G, Hua Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxitation. *Front Pharmacol.* 2023;14:1147414. Published 2023 Mar 2. doi:10.3389/fphar.2023.1147414.
37. Ciesielska S, Slezak-Prochazka I, Bil P, Rzeszowska-Wolny J. Micro RNAs in Regulation of Cellular Redox Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):6022. Published 2021 Jun 2. doi:10.3390/ijms22116022.
38. Zhang X, Ng WL, Wang P, et al. MicroRNA-21 modulates the levels of reactive oxygen species by targeting SOD3 and TNF α . *Cancer Res.* 2012;72(18):4707-4713. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0639.
39. Chen F, Xing Y, Chen Z, et al. Competitive adsorption of microRNA-532-3p by circular RNA SOD2 activates Thioredoxin Interacting Protein/NLR family pyrin domain containing 3 pathway and promotes pyroptosis of non-alcoholic fatty hepatocytes. *Eur J Med Res.* 2024;29(1):250. Published 2024 Apr 24. doi:10.1186/s40001-024-01817-4.
40. Mostafa T, Rashed LA, Nabil NI, Osman I, Mostafa R, Farag M. Seminal miRNA Relationship with Apoptotic Markers and Oxidative Stress in Infertile Men with Varicocele. *Biomed Res Int.* 2016;2016:4302754. doi:10.1155/2016/4302754.
41. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-159. doi:10.1006/abio.1987.9999.
42. Joshi CJ, Ke W, Drangowska-Way A, O'Rourke EJ, Lewis NE. What are housekeeping genes?. *PLoS Comput Biol.* 2022;18(7):e1010295. Published 2022 Jul 13. doi:10.1371/journal.pcbi.1010295.
43. Mao L, Zuo ML, Wang AP, et al. Low expression of miR-532-3p contributes to cerebral ischemia/reperfusion oxidative stress injury by directly targeting NOX2. *Mol Med Rep.* 2020;22(3):2415-2423. doi:10.3892/mmr.2020.11325.
44. Zuo ML, Wang AP, Song GL, Yang ZB. miR-652 protects rats from cerebral ischemia/reperfusion oxidative stress injury by directly targeting NOX2. *Biomed Pharmacother.* 2020;124:109860. doi:10.1016/j.biopha.2020.109860.
45. Zhang D, Deng JJ, Xu Q, Zeng Y, Jiang J. MiR-146b-5p regulates the scavenging effect of GPx-3 on peroxide in papillary thyroid cancer cells. *Heliyon.* 2023;9(8):e18489. Published 2023 Jul 20. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e18489.
46. Matoušková P, Hanousková B, Skálová L. MicroRNAs as Potential Regulators of Glutathione Peroxidases Expression and Their Role in Obesity and Related

- Pathologies. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1199. Published 2018 Apr 14.
doi:10.3390/ijms19041199.
47. Dong X, Liu H, Chen F, Li D, Zhao Y. MiR-214 promotes the alcohol-induced oxidative stress via down-regulation of glutathione reductase and cytochrome P450 oxidoreductase in liver cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 2014;38(1):68-77.
doi:10.1111/acer.12209.
48. Maciel-Dominguez A, Swan D, Ford D, Hesketh J. Selenium alters miRNA profile in an intestinal cell line: evidence that miR-185 regulates expression of GPX2 and SEPSH2. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57(12):2195-2205. doi:10.1002/mnfr.201300168.
49. Wu J, Liang W, Tian Y, et al. Inhibition of P53/miR-34a improves diabetic endothelial dysfunction via activation of SIRT1. *J Cell Mol Med.* 2019;23(5):3538-3548.
doi:10.1111/jcmm.14253.
50. Li J, Yang C, Wang Y. miR-126 overexpression attenuates oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and inflammatory response via the activation of SIRT1/Nrf2 signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells [published correction appears in *Mol Med Rep.* 2021 Jul;24(1):]. *Mol Med Rep.* 2021;23(2):165. doi:10.3892/mmr.2020.11804.
51. Wang S, Yu M, Yan H, Liu J, Guo C. MiR-34a-5p Negatively Regulates Oxidative Stress on Lens Epithelial Cells by Silencing GPX3 - A Novel Target. *Curr Eye Res.* 2022;47(5):727-734. doi:10.1080/02713683.2022.2029905.
52. La Sala L, Cattaneo M, De Nigris V, et al. Oscillating glucose induces microRNA-185 and impairs an efficient antioxidant response in human endothelial cells. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15:71. Published 2016 Apr 30. doi:10.1186/s12933-016-0390-9.
53. Lu XZ, Yang ZH, Zhang HJ, Zhu LL, Mao XL, Yuan Y. MiR-214 protects MC3T3-E1 osteoblasts against H₂O₂-induced apoptosis by suppressing oxidative stress and targeting ATF4. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(21):4762-4770.
54. Kinoshita C, Kubota N, Aoyama K. Glutathione Depletion and MicroRNA Dysregulation in Multiple System Atrophy: A Review. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):15076. Published 2022 Dec 1. doi:10.3390/ijms232315076.
55. Chen F, Xing Y, Chen Z, et al. Competitive adsorption of microRNA-532-3p by circular RNA SOD2 activates Thioredoxin Interacting Protein/NLR family pyrin domain containing 3 pathway and promotes pyroptosis of non-alcoholic fatty hepatocytes. *Eur J Med Res.* 2024;29(1):250. Published 2024 Apr 24.
doi:10.1186/s40001-024-01817-4.

56. Haque R, Chun E, Howell JC, Sengupta T, Chen D, Kim H. MicroRNA-30b-mediated regulation of catalase expression in human ARPE-19 cells. *PLoS One*. 2012;7(8):e42542. doi:10.1371/journal.pone.0042542.
57. Lin L, Chen X, Sun X, et al. MiR-125b-5p is targeted by curcumin to regulate the cellular antioxidant capacity. *Free Radic Res*. 2022;56(9-10):640-650. doi:10.1080/10715762.2022.2162393.
58. Xu X, Wells A, Padilla MT, Kato K, Kim KC, Lin Y. A signaling pathway consisting of miR-551b, catalase and MUC1 contributes to acquired apoptosis resistance and chemoresistance. *Carcinogenesis*. 2014;35(11):2457-2466. doi:10.1093/carcin/bgu159.
59. Dando I, Cordani M, Dalla Pozza E, Biondani G, Donadelli M, Palmieri M. Antioxidant Mechanisms and ROS-Related MicroRNAs in Cancer Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:425708. doi:10.1155/2015/425708.

11. ŽIVOTOPIS

Maja Lagator

Datum rođenja: 17. listopada 1998.

Adresa: K. Tomislava 36, 31401 Viškovci, Hrvatska

E-mail adresa: lagatormaja8@gmail.com

JMBAG: 0285007366

Obrazovanje:

rujan 2013. – lipanj 2017.: I. gimnazija Osijek

rujan 2019. – rujan 2022.: sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

rujan 2022. – danas: sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Članstvo i aktivnost u udrugama:

2020. – 2022.: član Udruge studenata Medicinsko laboratorijske dijagnostike

2021. – 2023.: Potpredsjednica Studenske sekcije za fiziologiju i imunologiju

2021. – 2022.: član Hrvatskog društva za hipertenziju

Nagrade:

Dekanova nagrada za akademsku godinu 2020./2021.

Zahvala Akademika Bojana Jelakovića, predsjednika Hrvatskog društva za hipertenziju, na projektu „Lov na tihog ubojicu“ 2021.

Dekanova nagrada za akademsku godinu 2021./2022.

Ostale aktivnosti:

svibanj 2021.: sažetak „Moždani udar kao posljedica hipertenzije“ za Dan hipertenzije

2021. – 2023.: aktivno sudjelovanje na javnozdravstvenom projektu *Lov na tihog ubojicu*

prosinac 2021.: volontiranje na uzimanju uzoraka za testiranje COVID-19

travanj 2022.: aktivno sudjelovanje na RECOOP kongresu s radom „mRNA expression of antioxidant enzymes in athletes consuming enriched hen eggs“

svibanj 2022.: voditelj radionice „Otkucaji života“ na Festivalu znanosti

travanj 2023.: aktivno sudjelovanje na Festivalu znanosti