

Ekspresija microRNA u gama delta T limfocitima oboljelih od vulgarne psorijaze

Grujin, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:152:851072>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

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



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

Valentina Grujin

EKSPRESIJA microRNA U GAMA
DELTA T LIMFOCITIMA OBOLJELIH
OD VULGARNE PSORIJAZE

Diplomski rad

Osijek, 2022.

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

Valentina Grujin

EKSPRESIJA microRNA U GAMA
DELTA T LIMFOCITIMA OBOLJELIH
OD VULGARNE PSORIJAZE

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Rad je ostvaren u okviru HRZZ UIP-2019-04-3494 projekta, na arhivskim uzorcima RNA prikupljenim tijekom projekta VIF2018-MEFOS-8 i UNIOS-ZUP-2018-22. Svi eksperimenti učinjeni su u Laboratoriju za analizu DNA pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Stana Tokić

Neposredni voditelj: Maja Jirouš, mag.med.lab.diagn.

Rad ima 37 listova, 4 slike i 1 tablicu.

Veliko hvala mojoj mentorici, doc. dr. sc. Stani Tokić na iznimnom trudu, ogromnoj pomoći i podršci tijekom pisanja rada. Zahvaljujem joj na uloženom vremenu, brojnim savjetima te strpljenju pri brojnim upitima.

Zahvaljujem se i mag. med. lab. diagn. Maji Jirouš na pomoći pri radu u laboratoriju i obradi podataka.

Najveće hvala mojoj obitelji, roditeljima te sestri koji su mi omogućili obrazovanje te su mi bili najveća podrška i motivacija tijekom istog. Hvala im na strpljenju i povjerenju koje su mi iskazali.

Također se zahvaljujem i mom dečku Dini te šogoru Marku i svim prijateljima na podršci i pomoći tijekom studiranja. Hvala svima što ste bili uz mene!

Sadržaj:

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1 O psorijazi..... | 1 |
| 1.2 Etiologija..... | 2 |
| 1.2.1 Povezanost genetike i psorijaze | 2 |
| 1.2.2 Povezanost okolišnih čimbenika s razvojem psorijaze | 3 |
| 1.3 Imunopatogeneza psorijaze..... | 5 |
| 1.3.1 Os IL-17/IL-23 kao ključ razvoja psorijaze..... | 5 |
| 1.3.2 Uloga $\gamma\delta$ T stanica u razvoju psorijaze..... | 6 |
| 1.4 ULOGA microRNA U RAZVOJU PSORIJEZE | 7 |
| 1.4.1 Općenito o microRNA..... | 7 |
| 1.4.2 Uloga microRNA u psorijazi | 7 |
| 1.4.3 microRNA let-7..... | 8 |
| 1.4.4 microRNA-20a, microRNA-92b..... | 9 |
| 1.4.5 microRNA-29a..... | 10 |
| 2. HIPOTEZA | 11 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 12 |
| 4. MATERIJALI I METODE..... | 13 |
| 4.1 Materijali..... | 13 |
| 4.1.1 Ustroj istraživanja | 13 |
| 4.1.2 Ispitanici | 13 |
| 4.2 Metode..... | 14 |
| 4.2.1 Imunofenotipizacija perifernih $\gamma\delta$ T stanica protočnom citometrijom..... | 14 |
| 4.2.2 Sinteza cDNA | 15 |
| 4.2.3 Kvantitativna analiza microRNA ekspresije na PCR uređaju | 16 |
| 4.2.4 Relativna kvantifikacija metodom $\Delta\Delta$ CT..... | 17 |
| 4.2.5 Statistička obrada podataka | 18 |
| 5. REZULTATI..... | 19 |
| 5.1 Klinička i biokemijska obilježja ispitanika..... | 19 |
| 5.2 Ekspresijski profili hsa-microRNA-20a-5p, hsa-microRNA-92b-5p, hsa-microRNA-29a-3p te hsa-microRNA-let7c-5p..... | 20 |
| 5.3 Korelacijska analiza integriranog mRNA/microRNA ekspresijskog profila i frekvencijskih udjela perifernih $\gamma\delta$ T limfocita | 22 |
| 6. RASPRAVA | 24 |
| 7. ZAKLJUČAK | 27 |

| | |
|---------------------|----|
| 8. SAŽETAK | 28 |
| 9. SUMMARY | 29 |
| 10. LITERATURA..... | 30 |
| 11. ŽIVOTOPIS..... | 37 |

POPIS KRATICA

- BMI (*engl. Body mass index*) indeks tjelesne mase
- BSA (*engl. Body Surface Area*) indeks zahvaćenosti površine tijela
- CARD14 (*engl. Caspase recruitment domain family, member 14*) kaspaza – regrutirajuća domena
- CCL (*engl. C-C motif chemokine ligand*) kemokinski ligand
- CXCL (*engl. C-X-C motif chemokine ligand*) kemokinski CXC ligand
- DLQI (*engl. Dermatological Quality of Life Index*) dermatološki indeks kvalitete života
- EDC (*engl. Epidermal differentiation cluster*) epidermalni diferencijalni indeks
- iNKT (*engl. Invariant natural killer T cells*) invarijantne prirodno ubilačke stanice
- LCE (*engl. Late cornified envelope protein*) kasna kornificirana omotnica
- MAIT (*engl. mucosal-associated invariant T*) sluznicama pridružene invarijantne T stanice
- MAPK (*engl. Mitogen-activated protein kinase*) mitogen-aktivirana protein kinaza
- MHC (*engl. Major Histocompatibility Complex*) molekula glavnog sustava tkivne snošljivosti
- NF – κ B (*engl. nuclear factor kappa B*) nuklearni faktor kappa B
- PASI (*engl. Psoriasis Area and Severity Index*) indeks zahvaćenosti kože i težine kliničke slike
- PLZF (*engl. promyelocytic leukemia zinc finger*) promijelocitni leukemijski protein cinkovog prstena
- PSORS (*engl. psoriasis susceptibility gene*) lokus osjetljiv na psorijazu
- PV (*engl. psoriasis vulgaris*) vulgarna psorijaza
- ROR γ δ (*retinoid-related orphan receptor gamma*) faktor transkripcije obitelji nuklearnih receptora siročadi
- RUNX (*engl. runt-related transcription factor*) runt - povezani transkripcijski čimbenik

- TCR (*engl. T cell receptor*) T stanični receptor
- T-bet (*T-box transcription factor*) transkripcijski čimbenik
- TNF- α (*Tumor necrosis factor alpha*) faktor nekroze tumora alfa
- Th1 (*T helper cell*) T pomoćnička stanica
- UTR (*engl. untranslated region*) neprevedena regija

1. UVOD

1.1 O psorijazi

Psorijaza je kronična, proliferativna, upalna kožna bolest za koju nema definitivnog lijeka, a koja značajno utječe na kvalitetu života. Točna etiologija je nepoznata, no smatra se da je autoimuna bolest posredovana limfocitima T te da važnu ulogu u njezinu nastanku imaju geni uz brojne okolišne čimbenike (1, 2). Njezina prevalencija u svijetu u rasponu je 0,2 % – 4,8 %, a najčešći oblik oboljenja, vulgarna psorijaza, zahvaća gotovo 3 % svjetske populacije (1, 3). Kako je sama bolest kroničnog tijeka s brojnim remisijama i recidivima, negativno utječe na kvalitetu života oboljelih, kao i njihovih obitelji. Brojni oboljeli razvijaju depresiju i anksioznost, skloni su alkoholu i pušenju te često imaju suicidalne misli. Obično se javljaju i značajni komorbiditeti koji uključuju bolesti bubrega, srca i probleme sa zglobovima, od kojih je najznačajniji psorijatični artritis (1, 4).

Karakteristike psorijaze jesu eritematozne, ljuskave mrlje i plakovi, srebrnasto - bijele do crvene boje koji svrbe i najčešće se javljaju na području vlasišta, ekstremiteta i donjeg dijela leđa (**Slika 1.a i 1.b**), a mogu zahvatiti i oči, no to je rijetkost koja se javlja u 10 % oboljelih, najčešće žena (1, 2). Klasične značajke koje dovode do stvaranja psorijatičnih plakova jesu nekontrolirana proliferacija i disfunkcionalna diferencijacija keratinocita. Posljedično tome, dolazi do zadebljanja epiderme (akantoze) te hiperkeratoze i parakeratoze. Pojačava se vaskularizacija i angiogeneza, a samim time na koži nastaje eritem (2, 5).

Dijagnoza se postavlja na temelju dermatološkog pregleda uz biopsiju kože te histopatološku analizu. Klinički se bolest potvrđuje uklanjanjem, odnosno struganjem ljuskica gdje se vide točkice manjih krvarenja, poznatije kao Auspitzov znak. Često biopsija kože nije potrebna za karakterističnu kliničku sliku lezija, no histopatološka analiza pomaže u razlikovanju psorijaze od drugih kožnih bolesti, ukoliko nije moguće utvrditi točnu dijagnozu kliničkim pregledom. Ozbiljnost bolesti i zahvaćenost područja može se odrediti pomoću dva indeksa: PASI (od engl. *Psoriasis Area and Severity Index*) te BSA (od engl. *Body Surface Area*). PASI procjenjuje zahvaćenost kože psorijatičnim lezijama, stupanj eritema i ljuštenja lezija te je koristan u procjeni odgovora na liječenje. BSA govori o tome kolika je površina kože prekrivena psorijatičnim promjenama. Manje značajan za razvoj bolesti, ali bitan za tijek života oboljelih je DLQI (od engl. *Dermatological Quality of Life Index*), koji govori o utjecaju psorijaze na socijalni, psihički i fizički život oboljelih (1, 6, 7).



a)

b)

Slika 1. Eritematozne ljuskave mrlje i plakovi srebrnasto bijele do crvene boje. a), b) zastupljenost na laktovima. (izradila autorica)

1.2 Etiologija

1.2.1 Povezanost genetike i psorijaze

Psorijaza je multifaktorijalna, upalna kožna bolest na čiji razvoj utječe jaka genska predispozicija uz autoimune i okolišne čimbenike. U svijetu je pojavnost bolesti češća u članovima obitelji oboljelih, a u prilog tome govori i činjenica da genski čimbenici utječu na oko 70 % podložnosti bolesti. Također, studije provedene na blizancima pokazuju 2 – 3 puta veću učestalost psorijaze u monozigotnih blizanaca u odnosu na dizigotne (2, 8).

Kod psorijaze je identificirano devet različitih kromosomskih regija, PSORS (od engl. *psoriasis susceptibility gene*) (1 - 9), od kojih je PSORS1 (od engl. *psoriasis susceptibility gene 1*) pronađena u svim skupinama oboljelih od psorijaze (9). Lokus PSORS1 nalazi se na kratkom kraku 6. kromosoma (6p21.3), unutar regije glavnog kompleksa gena tkivne snošljivosti (MHC, od engl. *Major Histocompatibility Complex*). Najznačajniji alel rizika

povezan s patogenezi psorijaze na lokusu PSORS1 je HLA-C*06:02. HLA-C uključen je u imuni odgovor kože kroz prezentaciju antigena glavnim upalnim CD8⁺ T limfocitima dok migriraju u epidermu, što doprinosi razvoju psorijaze (10). Prisutnost HLA-C*06:02 pronađena je u gotovo 60 % oboljelih što znači da pozitivan nalaz značajno povećava rizik za razvoj bolesti. Gledajući obiteljsku anamnezu, rezultat tipizacije HLA-C*06:02 gena te težinu kliničke slike, razlikuju se dva tipa oboljenja. Tip I javlja se u ranoj životnoj dobi, a karakteriziran je pozitivnom obiteljskom anamnezom i pozitivnim nalazom HLA-C*06:02 s težim kliničkim obilježjima. Tip II javlja se u starijoj životnoj dobi, uz negativnu obiteljsku anamnezu i negativan nalaz HLA-C*06:02 te s blažim simptomima bolesti. Stoga nalaz HLA-C*06:02 može biti koristan u razlikovanju varijanti oboljenja (11). Uz navedenu regiju, od značajnijih u patogenezi psorijaze jesu i PSORS2 (od engl. *psoriasis susceptibility gene 2*) te PSORS4 (od engl. *psoriasis susceptibility gene 4*). PSORS2 smješten je na dugom kraku 17. kromosoma (17q25) i sadrži gen CARD14 (od engl. *caspase recruitment domain family, member 14*) koji kodira adapterski protein visoko izražen u keratinocitima. Taj protein posreduje u aktivaciji puta nuklearnog faktora κ B (NF – κ B, od engl. *nuclear factor kappa B*), koji ima značajnu ulogu u aktivaciji i proliferaciji stanica, a odnosi se na patofiziologiju psorijaze. Mutacija u genu CARD14, dovodi do upalnog odgovora u epidermi, povećava aktivaciju NF- κ B što posljedično dovodi do transkripcije brojnih gena i pojačane proizvodnje upalnih kemokina, uključujući CCL20 (od engl. *C-C motif chemokine ligand 20*) i CXCL8 (od engl. *C-X-C motif chemokine ligand 8*). Međutim kako se mutacije u genu CARD14 javljaju u malom broju vrsta psorijaza, potrebno je otkriti dodatne gene odgovorne za monogene oblike bolesti (4, 9, 10). Za razvoj psorijaze značajan je još i PSORS4, smješten na dugom kraku prvog kromosoma (1q21). Lokus sadržava epidermalni diferencijacijski klaster EDC (od engl. *Epidermal differentiation cluster*), genomski sačuvani dio koji se sastoji od više od 60 gena, uglavnom izraženih u gornjim slojevima epiderme, uključenih u terminalnu diferencijaciju keratinocita. Delecija dvaju gena LCE3B (od engl. *Late cornified envelope protein 3B*) i LCE3C (od engl. *Late cornified envelope protein 3C*), smještenih unutar EDC regije identificirana je kao genski čimbenik rizika za psorijazu zbog toga što dovodi do poremećaja funkcije kožne barijere, uklanjajući pojačivač važan za diferencijaciju keratinocita (9, 10).

1.2.2 Povezanost okolišnih čimbenika s razvojem psorijaze

Uz gensku predispoziciju, značajnu ulogu u nastanku psorijaze imaju i okolišni čimbenici, uključujući infekcije, debljinu, pušenje, alkohol, lijekove te stres (4, 12).

Bakterijske infekcije javljaju se kao najčešće u oboljelih od psorijaze. Brojnim istraživanjima utvrđeno je kako se mikrobiološka flora kože bolesnika s psorijazom razlikuje od zdravih osoba. Tako se u svim slojevima kože oboljelih od psorijaze najčešće nalaze *Staphylococcus* i *Streptococcus*, a osim njih s psorijazom se povezuju i *Malessezia furfur* te *Candida* (12). One uzrokuju poremećaj u mikrobiološkoj flori kože oboljelih te dovode do imunosne reakcije koju provode T - stanice proizvodeći IL-22 koji pogoršava već postojeću upalu kože i simptome bolesti. Osim kožne flore, *Streptococcus pyogenes* uzrokuje infekciju tonzila, a istraživanjima je dokazano da infekcije gornjih dišnih puteva mogu također pogoršati već postojeće lezije psorijaze ili potaknuti njezin nastanak (4, 12).

Osim infekcija, tjelesna težina i prehrambene navike također se povezuju s patogeneom psorijaze te mogu potaknuti razvoj ili uzrokovati napredovanje bolesti. Istraživanjima je potvrđeno da je oko 50 % bolesnika s psorijazom pretilo, a i PASI indeks kojim se procjenjuje težina bolesti raste s porastom tjelesne težine (12). Također, najčešće se istražuje i povezuje uloga adipokina leptina s razvojem psorijaze. Leptin regulira unos hrane u organizam, a ima i imunomodulatorni učinak na makrofage da proizvode proupalne citokine kao što su TNF- α (od engl. *Tumor necrosis factor alpha*) i IL-6 i može inducirati proliferaciju Th1 stanica (od engl. *T helper cell*). Stoga se u oboljelih radi navedenog nalaze i povišene koncentracije leptina u serumu u usporedbi sa zdravom populacijom. Prekomjernom proizvodnjom TNF- α dolazi do brzog razmnožavanja stanica kože, a to utječe i na težinu psorijatičnih lezija, osobito u pretilih pacijenata zbog prekomjerne ekspresije u masnom tkivu. Promjenom prehrambenih navika te smanjenjem tjelesne težine moguće je umanjiti tegobe bolesti (12).

Također, pušenje cigareta te konzumacija alkoholnih pića može utjecati na razvoj psorijaze. Neki patofiziološki mehanizmi objašnjavaju povezanost pušenja i psorijaze. Uzrokujući oksidativni stres i proizvodnju opasnih slobodnih radikala, pušenje ometa signalne putove relevantne za psorijazu kao što su mitogen – aktivirana protein kinaza (MAPK, od engl. *Mitogen-activated protein kinase*) i nuklearni faktor κ B (NF- κ B) te povećava lučenje citokina bitnih za psorijazu, kao što su IL-2, IL-12 te TNF- α . Osim što je povezano s pojavom psorijaze, pušenje također vežemo uz ozbiljnost bolesti. Istraživanjima na ljudima utvrđeno je da oboljeli koji puše više od 20 cigareta dnevno imaju dvostruko veći rizik za pojavu težih simptoma bolesti u odnosu na osobe koje puše manje od 20 cigareta dnevno (12, 13). Osim pušenja, konzumacija alkoholnih pića pogoršava već postojeću bolest, povećanom proizvodnjom proupalnih citokina kao što je TNF- α pospješujući proliferaciju limfocita, što doprinosi upalnom procesu (12, 14).

Za određene lijekove dokazano je kako pogoršavaju postojeće simptome bolesti, a u nekim slučajevima psorijaza može biti izazvana lijekovima, a njihovim ukidanjem simptomi bolesti se postepeno povlače. Od lijekova za koje je provjereno dokazano da induciraju psorijazu ili pogoršavaju simptome bolesti izdvajaju se: beta blokatori, antivirusni lijekovi, lijekovi za liječenje depresije, litiji, antimalarici te nesteroidni protuupalni lijekovi. Kao i u velikoj većini bolesti, stres doprinosi i razvoju psorijaze. Psihološki stres dovodi do promjena u regulaciji imunskog sustava i aktivaciji abnormalnih T stanica, a to utječe na razvoj bolesti. Pojavom kožni lezija dolazi do zabrinutosti i mogućnosti nastanka psihičkih poremećaja od kojih su najčešći anksioznost, depresija te poremećaj osobnosti (12).

1.3 Imunopatogeneza psorijaze

1.3.1 Os IL-17/IL-23 kao ključ razvoja psorijaze

Psorijaza nastaje kao rezultat složene interakcije između različitih populacija imunskih stanica, uključujući, dendritičke stanice, keratinocite te limfocite. Neravnoteža imunskog sustava kože dovodi do nekontrolirane proliferacije epidermalnih keratinocita koja se održava otpuštanjem različitih citokina iz patogenih T limfocita te dermalnih dendritičkih stanica koje infiltriraju kožu. Kao najznačajniji upalni citokini javljaju se interleukin 23 (IL-23) i IL-17 koji uzrokuju karakteristične molekularne, stanične te strukturne promjene kože oboljelih. U početku razvoja bolesti, upala nastaje djelovanjem vanjskih podražaja (trauma ili infekcija) ili gubitkom tolerancije (aktivacijom autoantigena). U stanjima upale, pojačano se luče citokini poput TNF- α te interferona (INF)- γ što uzrokuje naknadnu aktivaciju dermalnih dendritičkih stanica važnih za proizvodnju IL-23. U prisutnosti IL-23, dolazi do klonalne ekspanzije adaptivnih CD4+ pomoćničkih T stanica (Th17) koje luče IL-17 koji pospješuje već postojeću upalu kože te ubrzava proliferaciju keratinocita (15). IL-17 sinergistički djeluje s TNF- α kako bi pojačao IL-17-induciranu transkripciju nekoliko proupalnih gena (TNF, IL1 β , IL6, IL8) koji aktiviraju mijeloidne dendritičke stanice i time potiču diferencijaciju Th17 stanica u koži i drenažnim limfnim čvorovima. Kod psorijaze, IL-17 sposoban je regrutirati neutrofile i makrofage inducirajući keratinocite na proizvodnju CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 i CXCL8. Također, uz navedeno IL-17, zajedno sa IL-22 te TNF- α stimulira ekspresiju CCL20 u keratinocitima. CCL20 privlači Th17 i dendritičke stanice i na taj način održava upalni odgovor kroz pozitivnu kemotaktičku povratnu spregu. U psorijazi, keratinociti proizvode tromboцитni faktor rasta, angiopoetin-2 i faktor rasta vaskularnog endotela što rezultira eritematoznim lezijama kože (16). Upravo hiperproliferacija keratinocita te njihova nenormalna diferencijacija dovode do nekoliko karakterističnih histopatoloških značajki psorijaze

uključujući zadebljanje epiderme (akantoza) te gubitak epidermalnog granularnog sloja i parakeratoze (15).

1.3.2 Uloga $\gamma\delta$ T stanica u razvoju psorijaze

$\gamma\delta$ T stanice mala su, nekonvencionalna populacija T limfocita, koja na svojoj površini ima izražen T- stanični receptor (TCR, od engl. *T cell receptor*), koji se sastoji od jednog γ i jednog δ lanca. Rjeđe su zastupljena skupina stanica u odnosu na postojeće $\alpha\beta$ T stanice, ali značajno obogaćuju mukozna i epitelna tkiva uključujući kožu, dišni, probavni te reproduktivni trakt. Važne su stanice u obrani domaćina, imunosnom nadzoru te homeostazi imunološkog sustava (17). Na temelju raznolikosti V δ lanca $\gamma\delta$ TCR receptora postoje dvije glavne podskupine $\gamma\delta$ T limfocita u ljudi: V δ 2 (najčešće V γ 9) i V δ 1 (18). V δ 1 T stanice obitavaju u timusu i perifernim tkivima gdje sudjeluju u održavanju integriteta epitela u slučaju oštećenja, infekcije ili maligne transformacije stanica na način da reagiraju na molekularne biljege stresa koje izražavaju pogođene stanice. V δ 2 čine glavninu krvne populacije $\gamma\delta$ T limfocita u zdravih odraslih ljudi (50 % - 90 %). One najčešće koeksprimiraju V γ 9 lanac te prepoznaju fosforilirane nepeptidne molekule, najčešće metaboličke intermedijere biosinteze izoprenoida (19, 20). Nakon aktivacije $\gamma\delta$ T limfociti izlučuju citokine (IL-17, IFN- γ), kemokine (CCL20, CCL21, CXCL10) i kemokinske receptore (IL7R, IL18R1, IL23R, CCR7, CCR6, CXCR3) ključne upalne medijatore u patogenezi psorijaze. Proizvode značajne razine IL-17 kao odgovor na stimulaciju IL-23 koja potiče razvoj i progresiju bolesti. Efektorskim programom $\gamma\delta$ T stanica te migracijskim i citotoksičnim kapacitetom koordinirano pak upravljaju transkripcijski čimbenici poput ROR γ t (od engl. *retinoid-related orphan receptor gamma*), PLZF (od engl. *promyelocytic leukemia zinc finger*), RUNX3 (od engl. *runt-related transcription factor 3*), T-bet (od engl. *T-box transcription factor*) i Eomesodermin, kao izravni posrednici u kontroli ekspresije IL-17 te IFN- γ , kemokinskog receptora CCR6 te granularnih proteaza (21). CCL20, koji je jedinstveni ligand CCR6, posreduje u kožnoj infiltraciji $\gamma\delta$ T stanica i dendritičkih stanica koje proizvode IL-17. Brojna su istraživanja dokazala da CCL20/CCR6 regulira migraciju T stanica iz dermisa u epidermis te potiče agregaciju neutrofila i time pogoršava upalu (17). Također, značajno je da bolesnici s psorijazom pokazuju pojačano usmjeravanje V γ 9V δ 2 T stanica iz krvi u kožu što ukazuje na to da mobilizacija $\gamma\delta$ T stanica u upaljenoj koži i njihova efektorska funkcija doprinose patogenezi psorijaze (21). Uz to dermalne V γ 9V δ 2 T stanice pronađene u bolesnika s psorijazom izlučuju više IFN- γ , TNF- α i IL-17A potičući regrutiranje krvnih imunskih stanica te kemokina CCL3, CCL4, CCL5 koji imaju važnu ulogu u aktivaciji keratinocita te kemotaksiji perifernih efektorskih stanica (22, 23).

1.4 ULOGA microRNA U RAZVOJU PSORIJAZE

1.4.1 Općenito o microRNA

microRNA, male su nekodirajuće RNA molekule, sastavljene od 18 do 24 nukleotida, poprilično očuvane u eukariotskih organizama. Djeluju na posttranskripcijskoj razini, regulirajući ekspresiju mnogih gena u različitim biološkim procesima. Svoje inhibitorne učinke provode vežući se na komplementarne sekvence na 3' kraju (UTR, od engl. *untranslated region*) ciljane mRNA na način da ih utišavaju degradacijom kroz cijepanje mRNA ili sprječavanjem sinteze proteina pri čemu jedna microRNA može vezati, a samim time i inhibirati translaciju više stotina ciljnih mRNA (24, 25). Također se pokazalo da izvanstanične microRNA provode međustaničnu regulaciju putem nekonvencionalnog mehanizma koji se sastoji od interakcije s urođenim imunosnim RNA sensorima, kao Toll receptori 7 i 8 (TLR7, TLR8) (26). Nadalje, microRNA uključene su u imunosni odgovor, staničnu proliferaciju te diferencijaciju i apoptozu. Obzirom na navedeno, microRNA reguliraju širok raspon bioloških procesa te su potencijalno važne u patogenezi imunosnih poremećaja uključujući psorijazu (24, 25).

1.4.2 Uloga microRNA u psorijazi

U psorijazi, microRNA posreduju važne učinke u regulaciji hiperproliferacije, abnormalne diferencijacije keratinocita i poremećene imunosne aktivacije. Primjerice sudionici MAPK1, FGFR2 i SOCS-3 signalnih puteva koji moduliraju proliferaciju keratinocita, česte su microRNA mete u psorijatičnim lezijama. U skladu s navedenim, u keratinocitima oboljelih zabilježena je smanjena ekspresija microRNA-424 i microRNA-125b, te posljedični gubitak kontrole nad translacijom pozitivnih regulatora staničnog rasta i proliferacije poput MAPK1, ciklina E1, i faktora rasta FGF2 (27, 28). U psorijatičnoj koži zabilježeni su i promijenjeni ekspresijski obrasci microRNA-21, microRNA-205, microRNA-221 i microRNA-222, kao i njihovih direktnih mRNA meta (PDCD4, TPM1, P57, C-KIT, RTN4, SHIP2, TIMP3, RECK i NFIB) u neposrednoj kontroli staničnog rasta, proliferacije, apoptoze i degradacije izvanstaničnog matriksa. (29). Druge različito izražene microRNA u psorijazi uključuju varijante koje reguliraju hematopoezu infiltrirajućih imunosnih stanica (microRNA-142-3p i microRNA-223/223*), i pojačanu angiogenezu (microRNA-21, microRNA-378, microRNA-100, microRNA-31) u oboljelim dijelovima kože (30, 31). Među njima, povećana ekspresija microRNA-21 posreduje anti-apoptotske učinke u aktiviranim T limfocitima, a prekomjerna ekspresija microRNA-31 doprinosi pojačanoj proizvodnji upalnih medijatora izravnom inhibicijom serin-treonin kinaze 40 (STK40), negativnog regulatora NF- κ B signalnog puta u keratinocitima (32, 33). U psorijazi je značajna i ekspresija microRNA-203, posebice u

diferencijaciji i stratifikaciji kožnog epitela. Njezina pojačana regulacija u psorijazi negativno utječe na ekspresiju proupalnih citokina TNF- α i IL24, te na supresor signalizacije citokina 3 (SOCS3), koji pak inhibira p63 transkripcijski čimbenik u kontroli proliferativnog potencijala keratinocita (34, 35). Potencijalno važnu ulogu u psorijatičnim lezijama ima i povećana ekspresija microRNA-146a, preferencijalno izražena u infiltrirajućim imunosnim stanicama (34). microRNA-146a inhibira ekspresiju proteina IRAK-1 i TRAF-6, važnih u regulaciji ekspresije citokinskih i Toll-nalik receptora, svojstvenih prirodnom imunosnom odgovoru (36). microRNA kandidati koji su dijelom ovog istraživanja (hsa-microRNA-let7c-5p, hsa-microRNA-20a-5p, hsa-microRNA-29a-3p, hsa-microRNA-92b-5p), prethodno su analizirani u punoj krvi (37), zdravoj koži i psorijatičnim lezijama (29, 31, 38), te dermalnim upalnim infiltratima (39) oboljelih, primjenom različitih metodoloških pristupa uključujući microarray (29) i Nanostring nCounter tehnologiju, te RNASeq analizu tkivnih biopata (31) i mikrodisektiranih stanica (38). U tom kontekstu, u psorijatičnim lezijama i upalnom dermalnom infiltratu zabilježena je povišena ekspresija microRNA-20a i microRNA-29a (29, 31, 34, 38, 39), dok je ekspresija let-7c bila snižena u psorijatičnoj koži (38, 39) i keratinocitima (40), ali povišena u krvi (37) oboljelih od psorijaze. Po dosadašnjim saznanjima, ekspresija microRNA-92b u kontekstu psorijaze, analizirana je u okviru dvije studije. U usporedbi sa zdravim kontrolama, Joyce i sur. zabilježili su povišenu ekspresiju microRNA-92b u nezahvaćenim dijelovima kože oboljelih (31), dok Srivastava i sur. bilježe povišene razine microRNA-92b-3p u keratinocitima psorijatičnih lezija (40). Međutim, uloga navedenih microRNA kandidata u regulaciji transkriptoma i perifernih udjela $\gamma\delta$ T stanica u oboljelih od psorijaze, do danas nije istražena.

1.4.3 microRNA let-7

Obitelj microRNA let-7 najzastupljenija je u humanom genomu, te igra važnu ulogu u razvoju prirodnih limfocitnih linija poput $\gamma\delta$ T limfocita, MAIT (od engl. *mucosal-associated invariant T*) i iNKT (od engl. *invariant natural killer cells*) stanica. microRNA let-7 usmjerava diferencijaciju tip 1 stanica koje proizvode INF- γ (41, 42). Inhibicija regulacije let -7 microRNA omogućava ovim stanicama da zadrže visoke razine PLZF transkripcijskog čimbenika, i time pogoduje razvoju tip 2 i tip 3 imunološkog odgovora koje obilježava proizvodnja IL-4, odnosno IL-17. Osim toga, navedena obitelj microRNA izravno posreduje u smanjenoj proizvodnji IL-10 te IL-13 u CD4+ T stanicama (41, 42). Let-7b kao član obitelji let-7 ima ulogu u proliferaciji i diferencijaciji neuralnih matičnih stanica te stimulira

diferencijaciju i sprječava metaplaziju reguliranjem ekspresije HNF6 u acinarnim stanicama gušterače. Sve se više potvrđuje i uloga let-7b u rastu kose, zacjeljivanju rana na koži, ali i u kožnim bolestima. U psorijazi, let-7b inhibira migraciju keratinocita neizravnim mehanizmom regulacije IGF2BP2, a sudjeluje i u razvoju zloćudnih bolesti poput karcinoma jetre i štitnjače (43). U psorijatičnim lezijama prethodno je zabilježena snižena ekspresija microRNA-let7c i let-7e (31, 38, 39), te povišene razine let-7g i let-7i (29), dok su let-7c i let-7d u povišenim razinama uočene u krvi oboljelih (37), ukazujući na raznolike, tkivno-specifične uloge srodnih microRNA u psorijazi.

1.4.4 microRNA-20a, microRNA-92b

microRNA-20a, zajedno s microRNA-17, microRNA-18a, microRNA-19a, microRNA-19b-1 i microRNA-92a-1 pripada klasteru microRNA-17-92 te je eksprimirana u CD4+ i CD8+ T stanicama. Prekomjerna ekspresija microRNA-17-92 u T stanicama dovodi do limfoproliferacije te poremećaja sličnih autoimunim oboljenjima (44). U CD4+ T stanicama s nedostatkom Drosha kofaktora DGCR8, i posljedičnog gubitka microRNA ekspresije, članovi obitelji microRNA-17 i microRNA-92 ispravljaju gubitak proliferativnog kapaciteta DGCR8-deficijentnih limfocita (45). Obitelj microRNA-17-92 utječe i na diferencijaciju Th1 stanica, posebice microRNA-19b koja potiče proliferaciju i proizvodnju IFN- γ (46). Članovi microRNA-17-92 obitelji također moduliraju citostatične učinke TGF- β signalizacije u brojnim tipovima stanica, uključujući stanične linije neuroblastoma i glioblastoma, djelujući kao indirektni prigušivači ekspresije tumor supresora p21 i pro-apoptotskog čimbenika Bim (47).

U usporedbi za zdravom i nezahvaćenom kožom oboljelih, u psorijatičnim lezijama zabilježena je povećana ekspresija svih članova microRNA-17-92 klastera, koji direktno inhibiraju translaciju tumor supresora CDKN2B, potičući nekontroliranu proliferaciju keratinocita (48). Pojačanu ekspresiju microRNA-17-92 klastera u psorijazi stimuliraju upalni citokini, putem STAT1 signalne kaskade, što dovodi do gubitka kontrole staničnog ciklusa u keratinocitima. Klaster microRNA-17-92 regulira i proizvodnju CXCL9 i CXCL10 u keratinocitima, i tako upravlja kemosijsijom i udomljavanjem efektorskih T limfocita u koži i potencijalno, doprinosi razvoju bolesti. Povišene razine microRNA-20a, članice klastera microRNA-17-92, ranije su opisane u psorijatičnim lezijama i upalnom dermalnom infiltratu oboljelih, i vjerojatno značajno doprinose patogenezi psorijaze (29, 38, 39).

microRNA-92b je disregulirana u karcinomima, čiju proliferaciju, migraciju i invaziju pospješuje direktnom inhibicijom translacije ciljnih gena poput RECK proteaznog inhibitora. Također, potiče aktivaciju NF – κ B signalizacije putem regulacije NLK (49). Njezina uloga u psorijazi testirana je u okviru dvije studije, koje su zabilježile povećanu ekspresiju microRNA-92b u nezahvaćenju i zahvaćenju koži oboljelih od psorijazi (31, 40). Osim u psorijazi, microRNA-92b se spominje i u podlozi multiple skleroze, ali u sniženim razinama u odnosu na zdrave ispitanike (50).

1.4.5 microRNA-29a

microRNA-29a inhibira proizvodnju IFN- γ u pomoćnim T stanicama, direktnim vezanjem za visoko očuvana microRNA-29 vezna mjesta u 3'UTR regiji TBX21 i EOMES mRNA molekula. T-bet i Eomesodermin su ključni čimbenici u kontroli diferencijacije tip 1 imunološkog odgovora, i njemu karakterističnog IFN- γ . microRNA-29 izravno veže i inhibira translaciju ovih transkripcijskih čimbenika (45). U psorijatičnim lezijama zabilježena je povišena ekspresija microRNA-29a, no njezin profil u perifernim $\gamma\delta$ T limfocitima oboljelih ostao je neistražen (25, 51).

2. HIPOTEZA

1. Ekspresijski profili microRNA koji reguliraju proliferativni i funkcijski kapacitet sortiranih $\gamma\delta$ T limfocita razlikuju se između zdravih ispitanika i bolesnika oboljelih od vulgarne psorijaze.
2. Promjene u ekspresiji ispitivanih microRNA povezane su s promjenom perifernih udjela $\gamma\delta$ T stanica u perifernoj krvi oboljelih, upalnim biokemijskim biljezima i s fenotipskim obilježjima psorijaze, poput veličina PASI i DLQI indeksa.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati, opisati i usporediti ekspresiju hsa-microRNA-let7c-5p, hsa-microRNA-20a-5p, hsa-microRNA-29a-3p, hsa-microRNA-92b-5p u perifernim sortiranim $\gamma\delta$ T limfocitima oboljelih i zdravih ispitanika.
2. Ustanoviti transkripcijske profile ispitivanih microRNA u kontrolnoj i oboljeloj skupini te odrediti njihovu povezanost s antropometrijskim, biokemijskim i fenotipskim obilježjima vulgarne psorijaze.

4. MATERIJALI I METODE

4.1 Materijali

4.1.1 Ustroj istraživanja

Istraživanje parova (*case-control*).

4.1.2 Ispitanici

Istraživanjem su obuhvaćeni arhivski uzorci RNA, izolirani iz perifernih sortiranih $\gamma\delta$ T limfocita 16 zdravih ispitanika i 16, po spolu i dobi podudarnih, punoljetnih, nesrodnih osoba oboljelih od vulgarne psorijaze. Probir ispitanika kontrolne i oboljele skupine te prikupljanje, sortiranje i imunofenotipizacija perifernih $\gamma\delta$ T stanica, kao i izolacija ukupne RNA iz sortiranih $\gamma\delta$ T stanica, prethodno su provedeni u okviru studije koja je odobrena odlukom Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek (Potvrda br. R2/9042/2018) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku (Potvrda br. 2158-61-07-18-135).

Probir zdravih kontrola i oboljelih ispitanika proveden je nasumičnim redosljedom pregleda u okviru standardne dijagnostičke obrade na Zavodu za dermatologiju i venerologiju KBC Osijek. Oboljeli ispitanici izabrani su na temelju klinički i histološki potvrđene dijagnoze vulgarne psorijaze, a težina bolesti određena je pomoću skale PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*) i DLQI (*Dermatology Life Quality Index*). Isključeni su bolesnici na sustavnoj biološkoj, citostatskoj, fotokemoterapiji (psoralen, UVA zračenje) ili fototerapiji (uskospektralno UVB zračenje), s pridruženim autoimunim, malignim i infektivnim oboljenjima ili dokumentiranom epizodom alergijske reakcije unutar 6 tjedana prije dijagnostičke obrade.

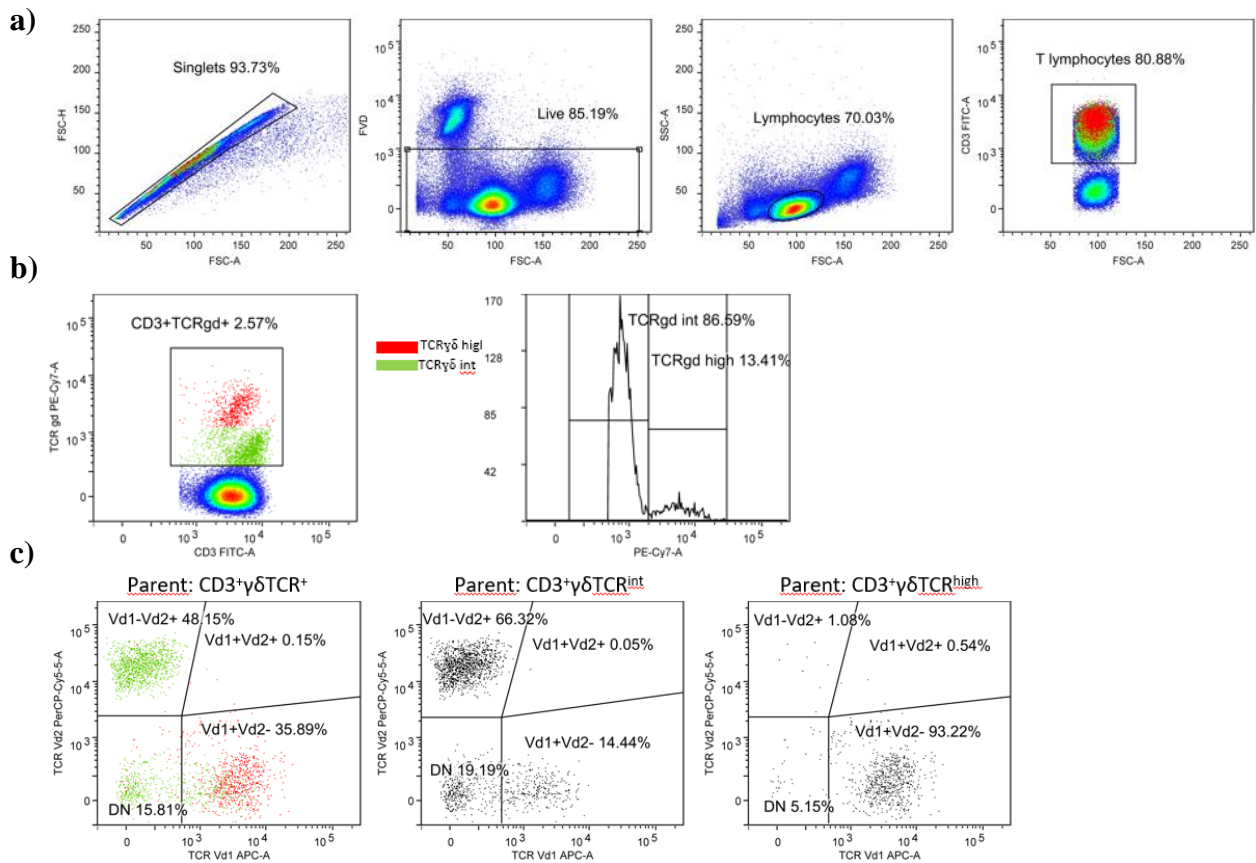
Kontrolna skupina je sastavljena od odraslih, nesrodnih, zdravih ispitanika, po dobi i spolu prilagođenih skupini oboljelih, koji su odabrani tijekom redovite dermatološke skrbi benignih, neinfektivnih ili imunološki neutralnih promjena na koži, bez sustavne medikamentozne ili fototerapije, povijesti alergijskih, malignih ili autoimunih oboljenja.

Prilikom izuzimanja uzoraka krvi zabilježeni su osnovni identifikacijski i demografski podaci (ime, prezime i dob) i učinjena antropometrijska mjerenja (visina i težina ispitanika) s ciljem određivanja indeksa tjelesne mase (BMI).

4.2 Metode

4.2.1 Imunofenotipizacija perifernih $\gamma\delta$ T stanica protočnom citometrijom

Citometrijska definicija perifernih subpopulacija $\gamma\delta$ T stanica učinjena je u okviru prethodne studije (52), primjenom CD3 ϵ FITC (1:250, clone UCHT1 gamma, donacija prof. Peter Balogh, Odjel za Imunologiju i Biotehnologiju, Sveučilišta u Pečuhu), TCR $\gamma\delta$ PE-Cy7 (1:100, clone B1, BioLegend), TCRV δ 1 APC (1:100, clone TS8.2, eBiosciences) i TCRV δ 2 PerCP/CY5.5 (1:200, clone B6, BioLegend) monoklonalnih protutijela (**Slika 2**). Unutar CD3 $^{+}\gamma\delta$ TCR $^{+}$ populacije, najprije su identificirane $\gamma\delta$ T stanice s većom ($\gamma\delta$ TCR high) i manjom ($\gamma\delta$ TCR int) ekspresijom $\gamma\delta$ T staničnog receptora (**Slika 2b**). Ove su subpopulacije zatim dodatno profilirane na temelju upotrebe TCR δ lanca, u V δ 1 $^{+}$, V δ 2 $^{+}$ i dvostruko negativne V δ 1 $^{-}$ V δ 2 $^{-}$ $\gamma\delta$ T stanice (**Slika 2c**).



Slika 2. Dizajn višeparametrijske protočne citometrije za imunofenotipizaciju perifernih $\gamma\delta$ T stanica. a) Jednostrane stanice izdvojene su analizom FSC-A i FSC-H parametara, dok su mrtve stanice isključene na temelju bojanja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (FVD). Subpopulacije perifernih $\gamma\delta$ T stanica definirane su na temelju površinske ekspresije b) CD3 glikoproteina i $\gamma\delta$ TCR receptora, c) TCRV δ 1 i TCRV δ 2 staničnih biljega. Slika je preuzeta iz Plužarić i sur. (slika prikazana uz suglasnost autora i vlasnika autorskih prava rada Plužarić i sur., objavljenog u časopisu otvorenog pristupa, koji se distribuira pod uvjetima licence Creative Commons Attribution (CC BY) (52)).

4.2.2 Sinteza cDNA

Sinteza microRNA cDNA napravljena je iz ukupne RNA pomoću komercijalnog kita „TaqMan Advanced microRNA cDNA Synthesis Kit“, prema uputama proizvođača. U prvom koraku, zrele molekule microRNA modificirane su dodatkom poly(A) slijeda na 3' kraju te ligacijom oligonukleotidnih adaptera na 5' kraju. Modificirane microRNA molekule prevedene su u cDNA djelovanjem enzima reverzne transkriptaze (RT), a dodatne količine novonastalih cDNA kopija umnožene su u posljednjem koraku preamplifikacije.

Postupak:

U prvom koraku poliadenilacije, u tubice volumena 1,5 ml, dodano je 2 μL uzorka ukupne RNA (10 ng) i 3 μL reakcijske smjese Poly(A), sastavljene od 0,5 μL 10X Poly(A) Buffera, 0,5 μL ATP-a, 0,3 μL Poly(A) enzima te 1,7 μL RNaza – free vode. Smjesa je potom vorteksirana, centrifugirana i inkubirana na 37 °C, 45 minuta, te potom 10 minuta na 65 °C. U sljedećem koraku, u tubice s produktima poliadenilacije (5 μl), dodano je 10 μL ligacijske smjese, prethodno vorteksirane i centrifugirane kako bi se komponente spustile te uklonili mjehurići. Ligacijska smjesa pripremljena je od 3 μL 5X DNA ligaza Buffera, 4,5 μL 50 % PEG 8000, 0,6 μL 25X ligacijskog adaptora, 1,5 μL RNA ligaze te 0,4 μL RNaza – free vode. Ukupni volumen novonastale smjese bio je 15 μL po tubici. Novonastala smjesa je vorteksirana, centrifugirana te potom inkubirana 60 minuta na temperaturi od 16 °C. Zatim je učinjena reverzna transkripcija. Reakcijska smjesa za reverznu transkripciju ukupnog volumena 15 μL , sastavljena od 6 μL 5X RT Buffera, 1,2 μL dNTP miksa, 1,5 μL 20x univerzalnih RT početnica, 3 μL 10x RT enzimskog miksa te 3,3 μL RNaza – free vode. Pripremljena RT smjesa je vorteksirana je i centrifugirana te dodana u tubice s produktima reakcije ligacije na ukupni volumen od 30 μL . Nakon dodatka, smjesu je vorteksirana, centrifugirana i inkubirana najprije 15 minuta na 42 °C, a potom 5 minuta na 85 °C. U sljedećem koraku preamplifikacije, 5 μL produkta reverzne transkripcije združeno je s 45 μL reakcijske smjese mi-Amp, sastavljene od 25 μL 2x miR-Amp master miksa, 2,5 μL 20x miR-Amp primera te 17, 5 μL RNaza – free vode. Preamplifikacija je provedena u uređaju Quant Studio 5 Real- Time PCR, u sljedećim temperaturnim uvjetima: 1. ciklus (5 minuta na temperaturi 95 °C, aktivacija enzima), 14 ponavljajući ciklusa (95 °C, 3 s, te 60 °C, 30 s), 15. ciklus (99 °C, 10 min) i 16. završna reakcija (4 °C, ∞).

4.2.3 Kvantitativna analiza microRNA ekspresije na PCR uređaju

Kvantitativna analiza ekspresije ciljnih (hsa-microRNA-let7c-5p, hsa-microRNA-20a-5p, hsa-microRNA-29a-3p i hsa-microRNA-92b-5p) i referentne (hsa-microRNA-423-3p) microRNA, provedena je na uređaju QuantStudio 5 upotrebom TaqMan Advanced microRNA proba i početnica, lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*).

Postupak

Za provedbu PCR reakcije, korišteni su TaqMan Advanced microRNA Assay i TaqMan Fast Advanced Master Mix kompleti. cDNA je najprije razrijeđena u omjeru 1 : 5. Reakcijska

smjesa volumena 15 μL sastavljena je od 7,5 μL TaqMan Fast Advanced Master Mix (2x), 0,75 μL TaqMan Advanced microRNA Assay (20x) te 6.75 μL prethodno razrijeđene cDNA. PCR smjesa je pipetirana u mikrotitarsku ploču koja je zatim prekrivena folijom i centrifugirana 1 min na 3000 okretaja. Amplifikacija cDNA provedena je na uređaju QuantStudio 5 u sljedećim temperaturnim uvjetima: 1. ciklus (aktivacija enzima na temperaturi 95 °C, 20 sekundi), 40 ponavljajućih ciklusa (denaturacija, 1 s na 95 °C; spajanje lanaca/produživanje, 20 s na 60 °C). Analiza ekspresije hsa-microRNA-let7c-5p, hsa-microRNA-20a-5p, hsa-microRNA-29a-3p i hsa-microRNA-92b-5p napravljena je u odnosu na referentnu hsa-microRNA-423-3p, a svi uzorci analizirani su u triplicatu.

4.2.4 Relativna kvantifikacija metodom $\Delta\Delta\text{Ct}$

Metoda $\Delta\Delta\text{Ct}$ korištena je za relativnu kvantifikaciju microRNA ekspresije. $\Delta\Delta\text{Ct}$, poznata i kao komparativna metoda odnosi se na izravnu usporedbu Ct vrijednosti izmjerenih amplifikacijom ciljne i referentne microRNA u identičnom uzorku. Za referentnu microRNA korištena je microRNA-423-3p. U svakom uzorku provedena je qPCR amplifikacija cDNA sekvence ciljne i referentne microRNA te su Ct vrijednosti ciljne microRNA normalizirane u odnosu na Ct vrijednosti hsa-microRNA-423-3p.

Postupak:

Ct vrijednosti referentne hsa-microRNA-423-3p i ciljnih hsa-microRNA-let7c-5p, hsa-microRNA-20a-5p, hsa-microRNA-29a-3p, hsa-microRNA-92b-5p, dobivenih qPCR reakcijom korištene su za analizu razlike u ekspresiji ispitivanih microRNA kontrolnih i PV uzoraka, metodom $\Delta\Delta\text{Ct}$.

Ct vrijednosti ispitivanih microRNA normalizirane su u odnosu na Ct vrijednosti referentne hsa-microRNA-423-3p za svaki PV uzorak te kontrolni uzorak, koristeći navedene formule:

$$\Delta\text{CT (uzorak)} = \Delta\text{Ct (ciljna microRNA)} - \Delta\text{Ct (referentna microRNA)}$$

$$\Delta\text{CT (kontrola)} = \Delta\text{Ct (ciljna microRNA)} - \Delta\text{Ct (referentna microRNA)}$$

Nadalje, sve dobivene ΔCt vrijednosti korištene su za izračun $\Delta\Delta\text{Ct}$ vrijednosti. Ona je određena na temelju razlike ΔCT vrijednosti ispitivanog uzorka i srednje ΔCT vrijednosti svih kontrolnih uzoraka, prema sljedećoj formuli:

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT (uzorak)} - \Delta\text{CT (kontrola)}$$

Potom je normalizirana razina ekspresije ciljnih microRNA izračunata u svim uzorcima uz pomoć dolje navedene formule:

$$\text{Normalizirana razina ekspresije gena u uzorku} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Razlike u razini ekspresije microRNA između oboljelih (PV) ispitanika i zdravih kontrola određene su usporedbom normaliziranih vrijednosti.

4.2.5 Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka provedena je pomoću statističkog programa Rv4.1.0. Kategoričke varijable prikazane su apsolutnim frekvencijama i proporcijama, a omjerne varijable medijanom s interkvartilnim rasponom (IQR). Normalnost distribucije provjerena je Shapiro - Wilk testom. Statistička značajnost razlike među neovisnim skupinama testirana je neparametrijskim testom (Mann – Whitney), dok je za analizu tablica kontingencije korišten Fisherov egzaktni test. Dvostrani $P < 0,05$ predstavlja prag značajnosti. Povezanost kontinuiranih varijabli procijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije (ρ).

5. REZULTATI

5.1 Klinička i biokemijska obilježja ispitanika

Klinička i biokemijska obilježja ispitanika prikazana su u Tablici 1. Oboljeli i zdravi ispitanici nisu se značajno razlikovali po spolu, dobi, BMI indeksu te serumskim razinama CRP upalnog biljega (Tablica 1). Povezanost između titra anti-CMV i anti HBs virusnih protutijela i veličine PASI te DLQI indeksa također nije zabilježena.

Tablica 1. Demografska i klinička obilježja ispitanika. Vrijednosti izmjerene u skupini oboljelih (PV) te zdravih (CTRL) ispitanika.

| Skupina | PV (N=16) | CTRL (N=16) | P-vrijednost |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
| N (M/Ž omjer) | 16 (10/6) | 16 (10/6) | 1 *** |
| Dob (godine) | 37,5 (31 – 43,8) * | 35 (31 – 43) * | 0,611 ** |
| BMI (kg/ m ²) | 26,4 (21,4 – 30,0) * | 23,9 (20,0 – 25,7) * | 0,0731 ** |
| hsCRP (mg/L) | 2,15 (0,9 – 3,0) * | 0,8 (0,3 – 1,8) * | 0,0597 ** |
| PASI | 6,4 (5,3 – 11,3) * | - | - |
| DLQI | 2,5 (0,8 – 6,3) * | - | - |
| Anti-CMVIgG(AU/mL) | 156 (132 – 205,5) * | 136 (75,8 – 164) * | 0,303 ** |
| Anti-HBs IgG (mIU/ml) | 90,55 (26,8 – 432) * | 275,5 (137 – 496) * | 0,315 ** |
| | | | |

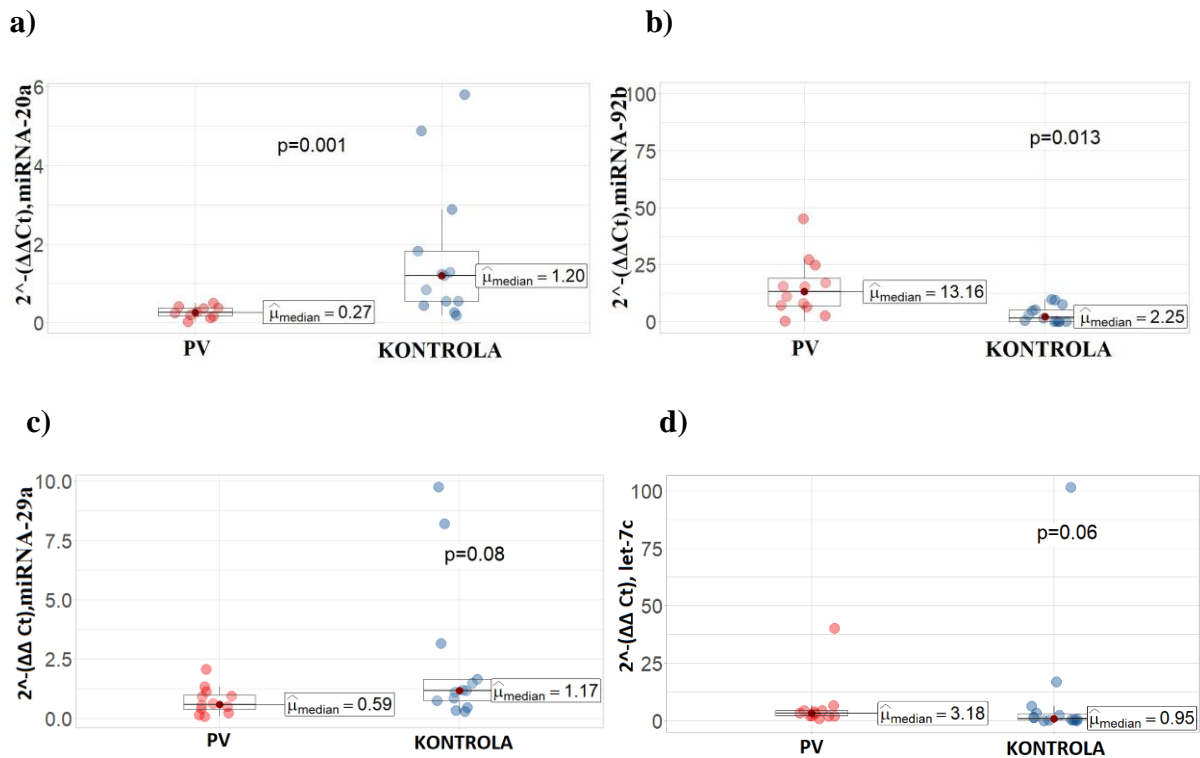
* medijan (interkvartilni raspon); ** Mann – Whitney U – test; *** Fisher exact test. Rezultati mjerenja prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR). N – broj ispitanika; BMI – indeks tjelesne mase; hsCRP – visoko osjetljivi C reaktivni protein; PASI – Psoriasis Area and Severity Indeks; DLQI – Dermatological Life Quality Indeks, CMV – citomegalovirus, IgG – imunoglobulin G, HBs – površinski antigen virusa hepatitisa B

5.2 Ekspresijski profili hsa-microRNA-20a-5p, hsa-microRNA-92b-5p, hsa-microRNA-29a-3p te hsa-microRNA-let7c-5p

Analiza ekspresijskih profila microRNA hsa-microRNA-20a-5p, hsa-microRNA-92b-5p, hsa-microRNA-29a-3p te hsa-microRNA-let7c-5p učinjena je usporedbom $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrijednosti kontrolnih (CTRL) i oboljelih (PV) ispitanika.

U odnosu na razine ciljnih microRNA u CD3+ $\gamma\delta$ TCR+ limfocitima zdravih ispitanika, $\gamma\delta$ T stanice oboljelih od vulgarne psorijaze izražavale su snižene razine hsa-microRNA-20a-5p [CTRL vs. PV; $M_e = 1,20$ (IQR (0,50 – 2,35) vs. $M_e = 0,27$ (IQR (0,16 – 0,39); $P = 0,001$, Mann – Whitney test] (**Slika 3a**), dok su razine hsa-microRNA-92b-5p bile značajno povišene [CTRL vs. PV; $M_e = 2,25$ (IQR (0,04 – 8,066) $M_e = 13,16$ (IQR (6,67 – 22,98); $P = 0,013$] (**Slika 3b**).

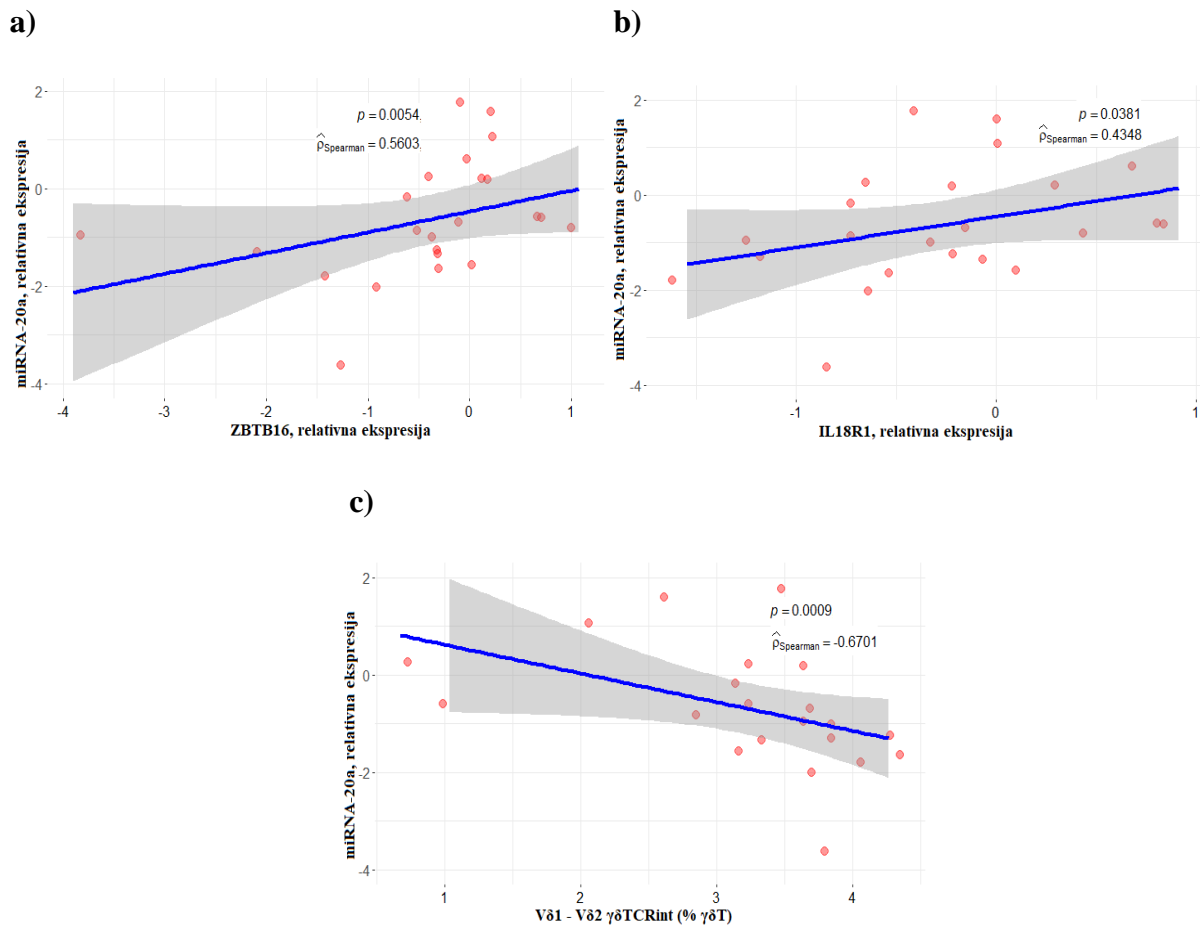
Suprotno, razina hsa-microRNA-29a-3p [CTRL vs. PV; $M_e = 1,17$ (IQR (0,60 – 2,39) vs. $M_e = 0,59$ (IQR (0,27 – 1,07; $P = 0,08$] nije se značajno razlikovala između $\gamma\delta$ T stanica zdravih i oboljelih ispitanika (**Slika 3c**). S druge strane, razina hsa-microRNA-let7c-5p bila je nominalno veća u $\gamma\delta$ T limfocitima oboljelih ispitanika (**Slika 3d**), ali statistički značajna razlika između testiranih skupina nije ostvarena [PV vs. CTRL; $M_e = 3,18$ (IQR (2,01 – 4,42) vs. $M_e = 0,96$ (IQR (0,22 – 4,80); $P = 0,06$].



Slika 3. Relativna ekspresija hsa-microRNA-20a-5p, hsa-microRNA-92b-5p u $\gamma\delta$ T limfocitima periferne krvi oboljelih od vulgarne psorijaze te zdravih ispitanika. Ekspresija a) hsa-microRNA-20a-5p, b) hsa-microRNA-92b-5p, c) hsa-microRNA-29a-5p, d) microRNA-let7c-5p izmjerena je metodom qRT-PCR u 16 oboljelih te 16 zdravih ispitanika, grafički prikazana pravokutnim ili box-plot dijagramom. Horizontalna linija koja se nalazi unutar svakog box-plota predstavlja vrijednost medijana. Gornju i donju liniju box-plota čine interkvartilni rasponi (IQR). Vertikalne linije predstavljaju 1,5X IQR. Prag značajnosti definiran je kao dvostrani $P < 0,05$.

5.3 Korelacijska analiza integriranog mRNA/microRNA ekspresijskog profila i frekvencijskih udjela perifernih $\gamma\delta$ T limfocita

U svrhu procjene funkcionalnih učinaka promijenjene microRNA ekspresije u perifernim $\gamma\delta$ T limfocitima oboljelih, učinjena je analiza povezanosti microRNA ekspresijskog profila s promjenama koje su u okviru ranije studije (52) uočene na razini $\gamma\delta$ T transkriptoma i periferne frekvencije $V\delta 2^+ \gamma\delta$ TCR^{high} i $V\delta 1-\delta 2^- \gamma\delta$ TCR^{int} T limfocita. Slijedom navedenog, zabilježena je pozitivna međuovisnost između razine microRNA-20a-3p i mRNA ekspresije transkripcijskog čimbenika ZBTB16 (**Slika 4a**) i IL-18 receptora (**Slika 4b**). Osim navedenog, zabilježena je i inverzna korelacija između smanjene razine microRNA-20a-3p i brojnosti dvostruko negativnih $V\delta 1-V\delta 2^- \gamma\delta$ TCR^{int} stanica (**Slika 4c**), čija je povećana frekvencija ranije opisana u perifernoj krvi iste populacije oboljelih muških ispitanika (40). Međutim, povezanost drugih ispitivanih microRNA s ranije opaženim transkripcijskim i numeričkim promjenama perifernog odjeljka $\gamma\delta$ T stanica, nije otkrivena.



Slika 4. Korelacija relativne ekspresije hsa-microRNA-20a-5p s relativnom ekspresijom
 a) ZBTB16 (pozitivna korelacija); $n = 23$, b) IL-18R1 (pozitivna korelacija); $n = 23$, te c) populacijom $V\delta 1$ - $V\delta 2$ - $\gamma\delta$ int T stanica (negativna korelacija); $n = 21$, oboljeli ispitanici + kontrolna skupina. ρ =Spearmanov korelacijski koeficijent; prag značajnosti dvostrani $P < 0,05$. Plava linija predstavlja uvjetnu sredinu linearnog modela predviđanja frekvencijskih udjela $V\delta 1$ - $V\delta 2$ - $\gamma\delta$ int T stanica u odnosu na izmjerene vrijednosti microRNA-20a-5p ekspresije, gdje osjenčano područje označava 95 % interval pouzdanosti.

6. RASPRAVA

Posttranskripcijska regulacija genske ekspresije putem microRNA ključni je mehanizam u aktivaciji, diferencijaciji i homeostazi imunskih stanica koje se nalaze u osnovi mnogih autoimunih i upalnih oboljenja. Među njima, $\gamma\delta$ T limfociti česti su posrednici brzih, citotoksičnih imunskih odgovora u perifernim tkivima poput kože, crijeva i pluća, i stoga čine važne mete u istraživanju sistemskih oboljenja, kao što je vulgarna psorijaza. Razvoj, tkivna lokalizacija, proliferativna i efektorska funkcija T stanica, usko su povezani s microRNA, međutim, ekspresija i uloga microRNA u $\gamma\delta$ T stanicama gotovo je u potpunosti neistražena.

U okviru ranije studije, opisani su relativni frekvencijski udjeli i transkripcijski profil $\gamma\delta$ T limfocita, sortiranih iz periferne krvi zdravih kontrola i oboljelih od vulgarne psorijaze. Isti arhivski RNA uzorci, ovdje su iskorišteni kako bi ranija saznanja nadogradili parnom analizom microRNA ekspresijskih profila (hsa-microRNA-let7c-5p, hsa-microRNA-20a-5p, hsa-microRNA-29a-3p, hsa-microRNA-92b-5p) u kontroli prethodno istraživanih transkripcijskih čimbenika (*PLZF/ZBTB16*, *RUNX3*, *RORC*, *TBX21*, *EOMES*, *IL-18R*, *CCR6*, *CCR10*, *CLA*), i frekvencijskih udjela perifernih $V\delta 1^+$, $V\delta 2^+$ i $V\delta 1\delta 2^-$ T staničnih populacija.

Inicijalna analiza demografskih i kliničkih obilježja podskupine originalne populacije oboljelih i zdravih ispitanika, nije zabilježila značajne razlike u odnosu na dob, spol, BMI status, titar anti-CMV IgG te anti-HBs IgG protutijela. Vrijednosti CRP upalnog parametra bile su također podjednake u obje skupine, ukazujući na blage upalne simptome u oboljelih ispitanika.

U perifernoj krvi oboljelih s blagom kliničkom slikom psorijaze, sortirani $\gamma\delta$ T limfociti izražavali su snižene razine hsa-microRNA-20a-5p, bez potvrde pretpostavljenih negativnih regulatornih učinaka microRNA-20a-5p u kontroli ekspresije eksperimentalno ili *in silico* potvrđenih mRNA meta poput *RUNX3* ili *ROR $\gamma\delta$* (TargetScan, miRPathDB) (53). Snižena ekspresija microRNA-20a-5p ranije je opisana u najbrojnijem odjeljku krvnih $\gamma\delta$ T limfocita ($V\gamma 9V\delta 2$) oboljelih od reumatoidnog artritisa (54), te u punoj krvi pacijenata s multiplom sklerozom (55), ukazujući na povezanost smanjene ekspresije microRNA-20a i redistribucije krvnih imunskih populacija u autoimunim bolestima. Štoviše, mehanicistički učinci snižene razine microRNA-20a ranije su vezani uz pojačanu TCR signalizaciju, ekspresiju CD69 aktivacijskog biljega i proizvodnju citokina u aktiviranim CD4⁺ T limfocitima (56), ukazujući na važne regulatorne učinke microRNA-20a u kontroli proliferativnog i funkcijskog kapaciteta perifernih T stanica. U tom kontekstu, zabilježena je nekolicina pozitivnih korelacija između

microRNA-20a ekspresijskog profila i ranije analiziranih numeričkih i transkripcijskih obilježja perifernog $\gamma\delta$ T odjeljka. Gubitak ekspresije microRNA-20a bio je značajno vezan uz povećanje perifernog udjela V δ 1-V δ 2- subpopulacije unutar $\gamma\delta$ TCR^{int} stanične populacije ($\gamma\delta$ T stanice sa smanjenom ekspresijom $\gamma\delta$ TCR), potencijalno odražavajući posljedice redistribucije drugih $\gamma\delta$ TCR^{int} stanica, posebice V δ 2+ vrsta koje čine većinski udio perifernog $\gamma\delta$ TCR^{int} odjeljka (52). Tome u prilog govore i pozitivne korelacije zabilježene između microRNA-20a-5p, i ekspresijskog profila IL-18 citokinskog receptora i transkripcijskog čimbenika PLZF (kodiran genom ZBTB16), čije su mRNA razine, u okviru prethodne studije, u istoj populaciji RNA uzoraka, prepoznate kao pozitivne kovarijate perifernog udjela V δ 2+ $\gamma\delta$ TCR^{int} stanica (52). Među njima, PLZF transkripcijski čimbenik djeluje kao ključni regulator diferencijacije i funkcije $\gamma\delta$ T stanica (57), uključujući većinski krvni razred V γ 9V δ 2 T limfocita (58), čija je redistribucija iz krvi u kožu ranije opisana u oboljelih od psorijaze (59). Nominalno veća, ali ne i značajno različita ekspresija *let-7c*, izravnog inhibitora PLZF ekspresije (60), čije su snižene razine prethodno zabilježene u istom RNA bazenu (52), moguće dijelom također odražava opisanu preraspodjelu perifernih V δ 2+ vrsta u psorijazi. Ovi potencijalno važni microRNA učinci, zahtijevaju međutim, dodatne analize integriranog mRNA/microRNA profila u sortiranim linijama V δ 2+ stanica oboljelih.

S druge strane, izostanak korelacije između microRNA-20a-5p i smanjene ekspresije RUNX3, prethodno utvrđene u ukupnoj populaciji perifernih $\gamma\delta$ T stanica (52), moguće ukazuje na ulogu microRNA molekula koje nisu testirane u okviru ovog istraživanja. Poznato je da RUNX3, u okviru svoje uloge regulatora citotoksičnog kapaciteta perifernih limfocita (61), zajedno s transkripcijskim čimbenicima T-bet i Eomesodermin stimulira ekspresiju INF- γ i perforina (62) te pospješuje diferencijaciju Th1 i Th22 stanica u psorijazi (63). U sortiranim $\gamma\delta$ T limfocitima združene populacije ispitanika, zabilježeni su međutim različiti korelacijski obrasci na relaciji RUNX3-TBX21 i RUNX3-EOMES (52), potencijalno kao posljedica različitih regulacijskih mehanizama u kontroli razvoja perifernih $\gamma\delta$ T populacija. U prilog navedenom, moguće svjedoči izostanak očekivane povezanosti microRNA-29a transkripcijskog profila s mRNA razinama izravnih microRNA-29a meta, točnije TBX21 i EOMES. Štoviše, u oboljelih od psorijaze uočena je nominalno manja, ali ne statistički značajno različita ekspresija microRNA-29a, bez dokaza o povezanosti ove microRNA s ranije opisanom redistribucijom $\gamma\delta$ limfocita u oboljelih, ukazujući na manje važne učinke microRNA-29a-3p u reorganizaciji perifernog $\gamma\delta$ odjeljka u psorijazi.

Suprotno, ekspresija hsa-microRNA-92b-5p bila je statistički značajno veća u $\gamma\delta$ T limfocitima oboljelih ispitanika, u odnosu na zdrave kontrole. Povišena ekspresija microRNA-92b ranije je zabilježena u nelezijskoj koži (31), i lezijskim keratinocitima oboljelih od psorijaze (40), te u pozadini regulacije proliferativnog i migracijskog kapaciteta različitih karcinoma (64, 65), ukazujući na potencijalno važne učinke microRNA-92b u psorijazi i tumorskim oboljenjima. Promjene u ekspresijskom profilu microRNA-92b-5p međutim, nisu korelirale s numeričkim i transkripcijskim obilježjima perifernih $\gamma\delta$ T limfocita oboljelih, pa točna uloga microRNA-92b-5p u reorganizaciji perifernih $\gamma\delta$ T populacija u psorijazi, ostaje nerazjašnjena.

Unatoč očitim ograničenjima ove studije, koja uključuju mali broj ispitanika blažeg kliničkog statusa, kod kojih je ekspresijski microRNA profil perifernih $\gamma\delta$ T stanica istraživan na malom broju, visokoizraženih microRNA molekula, zabilježeni su novi, potencijalno važni microRNA učinci u regulaciji perifernih $\gamma\delta$ T stanica. Za potvrdu ostvarenih rezultata potrebna su međutim, nastavna istraživanja u vidu RNASeq analize integriranog mRNA/microRNA repertoara, u različitim subpopulacijama $\gamma\delta$ T limfocita.

7. ZAKLJUČAK

- U odnosu na oboljele od vulgarne psorijaze i zdrave ispitanike, $\gamma\delta$ T limfociti oboljelih ispitanika pokazuju značajno snižene razine hsa-microRNA-20a-5p, dok su razine hsa-microRNA-92b-5p značajno povišene
- Razine ekspresije hsa-microRNA-29a-3p te hsa-microRNA-let7c-5p nisu se značajno razlikovale između skupina
- Pozitivna korelacija zabilježena je između razine hsa-microRNA-20a-5p i mRNA ekspresije transkripcijskog čimbenika ZBTB16 te IL-18R1 receptora
- Gubitak ekspresije hsa-microRNA-20a-5p povezan je s povećanom brojnosti dvostruko negativnih V δ 1-V δ 2 $\gamma\delta$ TCRint stanica

8. SAŽETAK

Uvod: Vulgarna psorijaza kronična je autoimuna kožna bolest posredovana limfocitima T. $\gamma\delta$ T stanice posreduju važne upalne učinke u zahvaćenim dijelovima kože, ponajviše prilagodbom funkcije i migracijskih obrazaca na relaciji krv-koža. Male nekodirajuće microRNA molekule (hsa-microRNA-let7c, hsa-microRNA-20a, hsa-microRNA-29a, hsa-microRNA-92b), ključni su regulatori ovih staničnih procesa, ali je njihova uloga u perifernim $\gamma\delta$ T limfocitima oboljelih od psorijaze u potpunosti neistražena.

Cilj istraživanja: Ispitati transkripcijske profile hsa-microRNA-let7c, hsa-microRNA-20a, hsa-microRNA-29a te hsa-microRNA-92b u $\gamma\delta$ T stanicama periferne krvi oboljelih od vulgarne psorijaze i ustanoviti njihovu povezanost s kliničkim, biokemijskim te antropometrijskim obilježjima vulgarne psorijaze

Materijali i metode: Istraživanjem su obuhvaćeni arhivski uzorci RNA izolirani iz perifernih sortiranih $\gamma\delta$ T limfocita 16 zdravih kontrola i 16 ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze. Sinteza cDNA provedena je pomoću komercijalnog kompleta "TaqMan advanced cDNA synthesis kit". Kvantitativna analiza ekspresije microRNA provedena je na uređaju QuantStudio5 lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR) upotrebom TaqMan Advanced microRNA proba i početnica.

Rezultati: U odnosu na zdrave ispitanike, periferni $\gamma\delta$ T limfociti oboljelih od vulgarne psorijaze pokazuju znatno snižene razine microRNA hsa-20a-5p, dok je ekspresija hsa-microRNA-92b-5p bila značajno povišena. Gubitak ekspresije hsa-microRNA-20a-5p vezan je uz povećanje perifernog udjela V δ 1-V δ 2- subpopulacije unutar $\gamma\delta$ TCR^{int} stanične populacije, a ekspresijski profil hsa-microRNA-20a-5p pozitivno je korelirao s ekspresijom gena ZBTB16 i IL18R.

Zaključak: Oboljeli od psorijaze s blažim kliničkim simptomima pokazuju promjene u ekspresiji određenih microRNA, potencijalno važnih u regulaciji perifernih $\gamma\delta$ T limfocita.

Ključne riječi: psorijaza; $\gamma\delta$ T limfociti; miR-20a, miR-29a, miR-92

9. SUMMARY

MICRORNA EXPRESSION IN GAMMA DELTA T LYMPHOCYTES OF PSORIASIS VULGARIS PATIENTS

Introduction: Psoriasis vulgaris is a chronic autoimmune skin disease mediated by T lymphocytes. $\gamma\delta$ T cells mediate important inflammatory effects in the affected parts of skin, mostly by adjusting the function and migration patterns at the blood – skin interface. Small non-coding microRNA molecules (hsa-microRNA-let7c, hsa-microRNA-20a, hsa-microRNA-29a, hsa-microRNA-92b) are key regulators of these cellular processes, but their role in peripheral $\gamma\delta$ T lymphocytes of psoriasis patients is completely unexplored.

Aim of the research: To examine transcriptional profiles of hsa-microRNA-let7c, hsa-microRNA-20a, hsa-microRNA-29a te hsa-microRNA-92b in $\gamma\delta$ T cells of peripheral blood of patients with psoriasis vulgaris and to establish their association with clinical, biochemical and anthropometric characteristics of psoriasis vulgaris.

Material and method: The study included archival samples of RNA isolated from peripheral sorted $\gamma\delta$ T lymphocytes of 16 healthy controls and 16 subjects suffering from psoriasis vulgaris. cDNA synthesis was performed using „TaqMan advanced cDNA synthesis kit“. Quantitative analysis of microRNA expression was performed on a QuantStudio 5 device by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using TaqMan Advanced microRNA probes and primere.

Results: Compared to healthy subjects, peripheral $\gamma\delta$ T lymphocytes of patients with psoriasis vulgaris show significantly reduced levels of microRNA hsa-20a-5p, while the expression of hsa-microRNA-92b-5p was significantly elevated. Loss of hsa-microRNA-20a-5p expression was associated with an increase in the peripheral share of V δ 1-V δ 2- subpopulation within the $\gamma\delta$ TCR^{int} cell population and the expression profile of hsa-microRNA-20a-5p was positively correlated with ZBTB16 and the IL-18R gene expression.

Conclusion: Psoriasis patients with milder clinical symptoms show changes in the expression of certain microRNAs, potentially important in the regulation of peripheral $\gamma\delta$ T lymphocytes.

Key words: psoriasis; $\gamma\delta$ T lymphocytes; miR-20a, miR-29a, miR-92

10. LITERATURA

1. Naira PA, Badri T. Psoriasis. StatPearls. 2022 Apr 4. doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448194/>
2. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1475
3. Timis TL, Orsan RI. Understanding psoriasis: Role of miRNAs. *Biomed Rep.* 2018;9(5):367-374
4. Ayala-Fontanez N, Soler DC, McCormick TS. Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. *Psoriasis: Target and Therapy.* 2016;6:7-32
5. Lowes M, Suárez-Farinas M, Krueger JG. Immunology of Psoriasis. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:227-255
6. Kimmel GW, Lebwohl M. Psoriasis: Overview and Diagnosis. *Evidence-Based Psoriasis.* 2018:1-16
7. Kaštelan M. Smjernice za dijagnostiku i liječenje vulgarne psorijaze. *Liječ Vjesn.* 2013;135:195-200
8. Ogawa K, Okada Y. The current landscape of psoriasis genetics in 2020. *JDS.* 2020;2-8
9. Capon F. The Genetic Basis of Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2526
10. Ran D, Cai M, Zhang X. Genetics of psoriasis: a basis for precision medicine. *PCM.* 2019;2(2):120-130
11. Mak RKH, Hundhausen C, Nestle FO. Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis. *Acts Dermosifiliogr.* 2009;100:2-13
12. Roszkiewicz M, Dopytalska K, Szymańska E, Jakimiuk A, Walecka I. Environmental risk factors and epigenetic alternations in psoriasis. *Ann Agric Environ Med.* 2020;27(3):335-342
13. Naldi L. Psoriasis and smoking: links and risks. *Psoriasis (Auckl).* 2016;6:65-71

14. Szentkereszty-Kovács Z, Gáspár K, Szegedi A, Kemény L, Kovács D, Töröcsik D. Alcohol in Psoriasis- From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9):4987
15. Chan TC, Hawkes JE, Krueger JG. Interleukin 23 in the skin: role in psoriasis pathogenesis and selective interleukin 23 blockade as treatment. *Threv Adv Chronic Dis.* 2018;9(5):111-119
16. Tokuyama M, Mabuchi T. New Treatment Addressing the pathogenesis of Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9)
17. Qi C, Wang Y, Li P, Zhao J. Gamma Delta T Cells and their pathogenic role in psoriasis. *Front Immunol.* 2021;12:627139
18. Fonseca S, Pereria V, Lau C, Teixeira MdA, Antunes MB, Lima M. Human Peripheral Blood Gamma Delta T Cells: Report on a Serie of Healthy Caucasion Portuguese Adults and Comprehensive Rewiev of the Literature. *Cells.* 2020;9(3):729
19. Wu YL, Ding YP, Tanaka Y, Shen LW, Wei CH, Minato N i sur. $\gamma\delta$ T Cells and Their Pottential for Immunotherapy. *Int J Biol Sci.* 2014;10(2):119-135
20. Lawand M, Merville JD, Dieu-Nosjean MC. Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications. *Front Immunol.* 2017;8:761
21. Paul S, Shilpi, Lai G. Role of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells in autoimmunity. *J Leukoc Biol.* 2015;97(2):259-271
22. Castillo-González R, Cibrian D, Sánchez-Madrid F. Dissecting the complexity of $\gamma\delta$ T-cell subsets in skin homeostasis, inflammation and malignacy. 2021;147(6):2030-2042
23. Gatzka M, Hainzl A, Peters T, Singh K, Tasdogan A, Wlaschek M i sur. Reduction of CD18 promotes expansion of inflammatory $\gamma\delta$ T cells collaborating with CD4+ T cells in chronic murine psoriasiform dermatitis. *J Immunol.* 2013;191(11):5477-5488
24. Rocchi A, Chiti E, Maiese A, Turrilazzi E, Spinetti I. MicroRNAs: An Update of Applications in Forensic Science. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(1):32

25. Liu Q, Wu DH, Han L, Deng JW, Zhou L, He Rui, Lu CJ, Mi QS. Roles of microRNAs in psoriasis: Immunological functions and potential biomarkers. *Exp Dermatol.* 2017;26(4):359-367
26. Salvi V, Gianello V, Tiberio L, Sozzani S, Bosisio D. Cytokine Targeting by miRNAs in Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:15
27. Ichihara A, Jinnin M, Yamane K, Fujisawa A, Sakai K, Masuguchi S i sur. microRNA-mediated keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol.* 2011;165(5):1003-10
28. Xu N, Brodin P, Wei T, Meisgen F, Eidsmo L, Nagy N i sur. MiR-125b, a microRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2. *J Invest Dermatol.* 2011;131(7):1521-9
29. Zibert JR, Løvendorf MB, Litman T, Olsen J, Kaczkowski B, Skov L i sur. MicroRNAs and potential target interactions in psoriasis. *J Dermatol Sci.* 2010;58(3):177-85
30. Wang S, Olson EN. Angiomirs - - Key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19(3):205-211
31. Joyce CE, Zhou X, Xia J, Ryan C, Thrash B, Menter A. Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alternations in the psoriasis miRNAome. *Hum Mol Genet.* 2011;20(20):4025-40
32. Meisgen F, Xu N, Wei T, Janson PC, Obad S, Broom O i sur. MiR-21 is up-regulated in psoriasis and supresses T cell apoptosis. *Exp Dermatol.* 2012;21(4):312-4
33. Xu N, Meisgen F, Butler LM, Han G, Wang XJ, Söderberg-Nauclér C. MicroRNA-31 is overexpressed in psoriasis and modulates inflammatory cytokine and chemokine production in keratinocytes via targeting serine/threonine kinase 40. *J Immunol.* 2013;190(2):678-88
34. Sonkoly E, Wei T, Janson PCJ, Sääf Annika, Lundberg L, Tengvall – Linder M i sur. MicroRNA: Novel regulators invovled in pathogenesis of psoriasis. *PloS One.* 2007;2(7):e610

35. Lena AM, Shalom-Feuerstein R, Rivvetti di Val Crevo P, Aberdam D, Knight RA, Melino G i sur. mir-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ.* 2008;15(7):1187-95
36. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(33):12481-6
37. Atalas ET, Kara M, Dogan G, Belli AA. Blood microRNA expression in patients with mild to moderate psoriasis and the relationship between microRNAs and psoriasis activity. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2020;95(6):702-707
38. Delić D, Wolk K, Schmid R, Witte-Händel E, Baum P, Sabat R. Integrated microRNA/mRNAsaldjkasld expression profiling of the skin of psoriasis patients. *JDS.* 2019;97(1):1-20
39. Løvendorf MB, Mitsui H, Zibert JR, Røpke MA, Hafner M, Dyring-Anderson B. Laser capture mcirodissection followed by next-generation sequencing identifies disease-related microRNAs in psoriatic skin that reflect systemic microRNA changes in psoriasis. *Exp Dermatol.* 2015;24(3):187-93
40. Srivastava A i ostali. Next – generation sequencing identifies the keratinocyte – specific miRNA signature of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2019;139:2547-2550
41. Winter SJ, Krueger A. Development of Unconventional T Cells Controlled by microRNA. *Front Immunol.* 2019;10:2520
42. Amado T, Schmolka N, Metwally H, Silva-Santos B, Gomes AQ. Cross-regulation between cytokine and microRNA pathways in T cells. *European Journal of Immunology.* 2015;45(6):1584-1595
43. Wu Y, Liu L, Bian C, Diao Q, Nisar MF, Jiang X i sur. MicroRNA let-7b inhibits keratinocyte differentiation by targeting IL-6 mediated ERK signaling in psoriasis. *Cell Communication and Signaling.* 2018;16:58
44. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J i sur. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased mir-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol.* 2008;9(4):405-414

45. Steiner DF, Thomas MF, Hu JK, Yang Z, Babiarz JE, Allen CDC i sur. MicroRNA-29-regulates T-Box transcription factors and interferon- γ production in helper T cells. *Immunity*.2011.26;35(2):169-181
46. Jiang S, Li C, Olive V, Lykken E, Feng F, Sevilla J i sur. Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation. *Blood*. 2011;118(20):5487-97
47. Petrocca F, Visone R, Rapazzotti Onelli M, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I i sur. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell*. 2008;13(3):272-86
48. Zhang W, Yi X, An Y, Guo S, Li S, Song P and sur. MicroRNA-17-92 cluster promotes the proliferation and the chemokine production of keratinocytes: implication for the pathogenesis of psoriasis. *Cell Death & Disease*. 2018;9:567
49. Zhao C, Zhao E, Feng H, Xu S, Q G. MicroRNA-92b inhibits epithelial-mesenchymal transition-induced migration and invasion by targeting Smad3 in nasopharyngeal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(53):91603-91613
50. Qu Z, Li W, Fu B. MicroRNAs in autoimmune diseases. *Biomed Res Int*.2014;2014:527895
51. Hawkes JE, Nguyen GH, Fujita M, Forell SR, Duffin KC, Krueger GG i sur. microRNA in psoriasis. 2016;136(2):365-371
52. Plužarić V, Štefanić M, Mihalj M, Tolušić – Levak M, Muršić I, Glavaš-Obrovac Lj i sur. Differential skewing of circulating MR1-restricted and $\gamma\delta$ T cells in human psoriasis vulgaris. *Front Immunol*. 2020.3;11:572924
53. Wang X, Wei P, Yang L, Liu F, Tong X, Yang X i sur. MicroRNA-20a-5p regulates epithelial – mesenchymal transition of human hepatocellular carcinoma by targeting RUNX3. *Chin Med J (Engl)*. 2022 Feb 8. doi: 10.1097/CM9.0000000000001975.
54. Guggino G, Orlando V, Saieva L, Ruscitti P, Cipriani P, La Manna MP i sur. Downregulation of miRNA17-92 cluster marks $V\gamma 9V\delta 2$ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2018;20-236

55. Cox MB, Cairns MJ, Gandhi KS, Carroll AP, Moscovis S, Stewart GJ i sur. MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are underexpressed in MS Whole Blood. *PLoS One*. 2010;(5):8:e12132
56. Reddycherla AV, Meinert I, Reinhold A, Reinhold D, Schraven B, Simeoni L. miR-20a inhibits TCR-mediated signaling and cytokine production in human naïve CD4+ T cells. *PLoS One*. 2015;10(4):e0125311
57. Zhang S, Laouar A, Denzin LK, Sant' Angelo DB. Zbtb16 (PLZF) is stably suppressed and not inducible in non – innate T cells via T cell receptor-mediated signaling. *Sci Rep*. 2015;5:12113
58. Tan L, Fichtner AS, Bubke A, Odak I, Schultze-Florey C, Koenecke C i sur. A fetal wave of human type-3 $\gamma\delta$ T cells with restricted TCR diversity persists into adulthood. *bioRxiv*. 2020 Aug 14. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.14.248146>
59. Laggner U, Di Meglio P, Perera GK, Hundhausen C, Lacy KE, Ali N i sur. Identification of a novel proinflammatory human skin-homing V γ 9V δ 2 T cell subset with a potential role in psoriasis. *J Immunol*. 2011;187(5):2783-93
60. Pobezinsky LA, Etzensperger R, Jeurling S, Alag A, Kadakia T, McCaughy TM i sur. Let-7 miRNA target the lineage-specific transcription factor PLZF to regulate terminal NKT cell differentiation and effector function. *Nat Immunol*. 2015;16(5):517-524
61. Djuretic IM, Cruz-Guilloty F, Rao A. Regulation of gene expression in peripheral T cells by Runx transcription factors. *Adv Immunol*. 2009;104:1-23
62. Cruz-Guilloty F, Pipkin ME, Djuretic I, Levanon D, Lotem J, Lichtenheld MG i sur. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *Journal of Exp Med*. 2009;206(1):51-9
63. Fu D, Song X, Hu H, Sun M, Li Z, Tian Z. Downregulation of *RUNX3* moderates the frequency of Th17 and Th22 cells in patients with psoriasis. *Mol Med Rep*. 2016;13(6):4606-4612
64. Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res*. 2007;67(13):6031-43

65. Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Jr Diaz LA, Sjoblom T i sur. The colorectal microRNAome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(10):3687-3692

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Valentina Grujin

Datum i godina rođenja: 08. veljače 1998., Vinkovci

Adresa: H.V. Hrvatinića 23 a, 32 100 Vinkovci, Hrvatska

Mobitel: 098 967 27 70

E-mail adresa: valentinagrujin98@gmail.com

OBRAZOVANJE

2020. - 2022. Medicinski fakultet Osijek, Diplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika

2017. - 2020. Medicinski fakultet Osijek, Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika

2013. - 2017. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2005. - 2013. Osnovna škola Ivana Mažuranića, Vinkovci