

miRNA u molekularnoj dijagnostici

Kujavec, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:442584>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Kujavec

miRNA u molekularnoj dijagnostici

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ana Kujavec

miRNA in molecular diagnostics

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Petra Korać.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

miRNA u molekularnoj dijagnostici

Ana Kujavec

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

MikroRNA (miRNA) su kratke nekodirajuće molekule RNA koje imaju važnu regulacijsku ulogu u translaciji mRNA. Protekla dva desetljeća privukle su veliku pozornost u biomedicinskim istraživačkim krugovima zbog povezanosti s razvojem brojnih bolesti. Razine ekspresije miRNA su specifične za pojedina tkiva i povezuju se s različitim patološkim stanjima. Omogućuju pružanje informacija o podrijetlu, stupnju diferencijacije i podtipovima malignih tumora te su pronađene u većini bioloških tekućina. Navedena svojstva čine miRNA potencijalnim neinvazivnim dijagnostičkim i prognostičkim biomarkerima. U ovom radu izložene su glavne spoznaje o uključenosti miRNA u razvoju bolesti koje zahvaćaju veliki udio populacije. Rad daje pregled prednosti i nedostataka najčešćih metoda detekcija miRNA te ističe da nepostojanje standardizacije u svim koracima detekcije miRNA onemogućava njihovo rutinsko korištenje u molekularnoj dijagnostici. Također, pokazuje da je potrebno razviti nove metode koje će omogućiti detekciju cirkulirajućih miRNA te biti brze, visoko specifične i cjenovno dostupne kako bi se mogla napraviti translacija spoznaja o miRNA iz istraživačkih laboratorija u zdravstveni sustav i kako bi ona doprinijela suzbijanju izlječivih bolesti.

Ključne riječi: mikroRNA, molekularna dijagnostika, biomarkeri, maligni tumori, detekcija mikroRNA

(23 stranica, 2 slika, 0 tablica, 89 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Petra Korać

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

miRNA in molecular diagnostics

Ana Kujavec

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNA molecules that play an important regulatory role in mRNA translation. They have attracted great attention in the biomedical research community over the past two decades due to their involvement in the development of numerous diseases. The expression of miRNAs is tissue-specific and it is associated with various pathological conditions. miRNAs provide information about the origin, degree of differentiation, and subtypes of malignant tumors. They are found in most biological fluids. All mentioned properties make miRNAs potential non-invasive diagnostic and prognostic biomarkers. This paper presents main findings about the involvement of miRNAs in diseases that affect a large part of the population. It contains an overview of the advantages and disadvantages of the most common miRNA detection methods, and highlights the lack of standardization in all steps of miRNA detection which further prevents its routine use in molecular diagnostics. Therefore, it is necessary to develop new technologies that will enable the detection of circulating miRNAs and will be fast, highly specific, and affordable, thus enabling the translation of knowledge about miRNAs from research laboratories to the health system and making contribution to the suppression of curable diseases.

Keywords: microRNA, molecular diagnostics, biomarkers, malignant tumors, microRNA detection

(23 pages, 2 figures, 0 tables, 89 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. Petra Korać, PhD

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Molekularna dijagnostika	1
3. miRNA	2
3.1. Biogeneza miRNA.....	2
3.2. Uloga miRNA u genskoj regulaciji	3
4. miRNA kao biomarker	4
4.1. miRNA u dijagnostici malignih tumora	4
4.1.1. miRNA u dijagnostici karcinoma dojke.....	5
4.1.2. miRNA u dijagnostici karcinoma pluća	6
4.1.3. miRNA u dijagnostici drugih malignih tumora.....	6
4.2. miRNA u dijagnostici drugih bolesti.....	7
4.2.1. miRNA u dijagnostici kardiovaskularnih bolesti	7
4.2.2. miRNA u dijagnostici živčanog sustava	7
4.2.3. miRNA u dijagnostici infektivnih bolesti	8
5. Detekcija miRNA	9
5.1. Metode detekcije miRNA.....	10
5.2. Izazovi u detekciji miRNA	11
6. Zaključak	12
7. Literatura	13

1. Uvod

MikroRNA (miRNA) su kratke nekodirajuće molekule RNA koje su privukle veliku pozornost u biomedicinskim istraživačkim krugovima protekla dva desetljeća (Treiber i sur. 2019). Uzrok tome je njihova povezanost s razvojem brojnih bolesti zbog čega ih se već godinama smatra potencijalnim biomarkerima (Lagos-Quintana i sur. 2002). Njihova rutinska primjena u molekularnoj dijagnostici je potrebna kako bi se izlječive bolesti mogle rano dijagnosticirati i prikladno liječiti. Posljednjih godina učinjen je velik napredak u istraživanju funkcija i podrijetla miRNA kod različitih patoloških stanja. Njihov potencijal za korištenje u kliničkoj praksi usporava zahtjevna identifikacija i nepostojanje standardizacije u svim koracima detekcije miRNA (Kilic i sur. 2018).

2. Molekularna dijagnostika

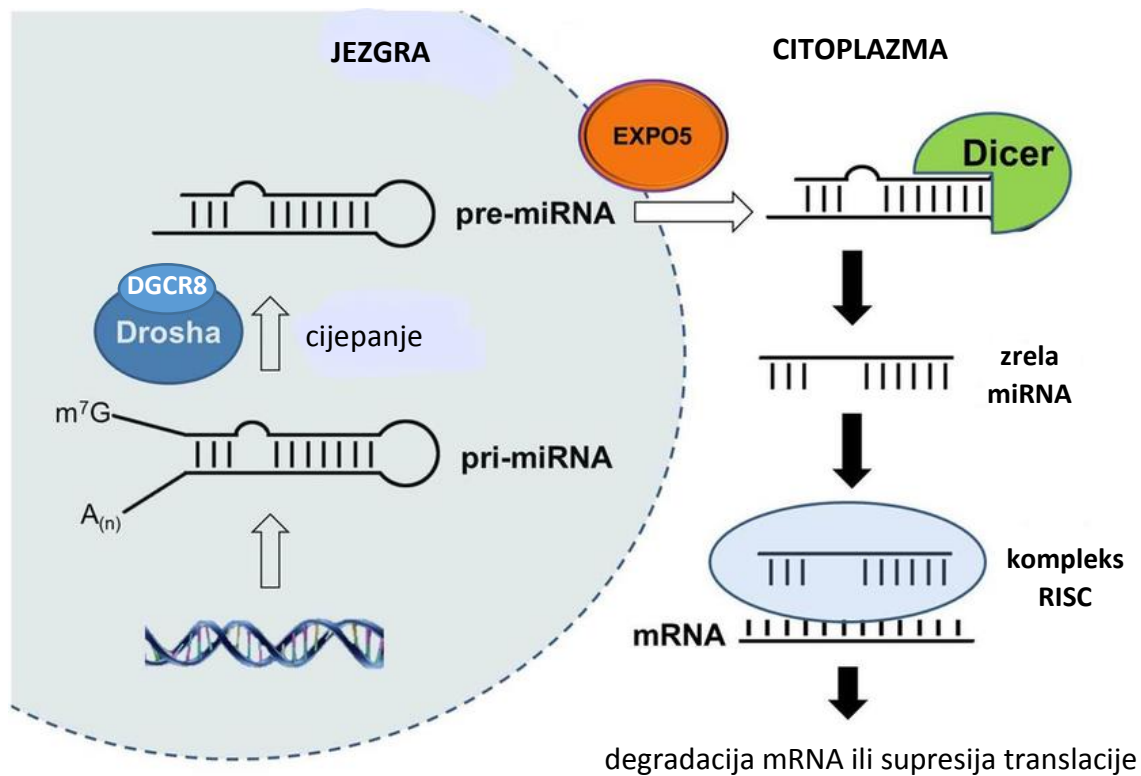
Molekularna dijagnostika uključuje uzimanje uzoraka nukleinskih kiselina, DNA ili RNA, ili proteina te njihovu analizu s ciljem detekcije specifičnih sljedova ili prisutnosti proteina koji ukazuju na razvoj bolesti što ih čini biomarkerima. Biomarkeri se koriste za dijagnosticiranje i klasificiranje patoloških stanja te za praćenje učinkovitosti terapija. Temelj ovakve vrste dijagnostike su znanja iz područja genetike, molekularne biologije i medicine. Razvoj tih znanosti omogućuje postupno širenje primjene molekularne dijagnostike u kliničkim pretragama. Primjena ove vrste dijagnostike ide u korak s razvojem novih tehnika s ciljem povećavanja specifičnosti i smanjenja troškova rutinske izvedbe (Patrinis i sur. 2017). Molekularna dijagnostika je ključan dio personalizirane medicine u kojoj se analizom genetskih podataka svakog pacijenta prilagođava liječenje koje je najprikladnije i najsigurnije za pojedinca (Singer 2005).

3. miRNA

MikroRNA (miRNA) su mali endogeni nekodirajući sljedovi RNA duljine 20-25 nukleotida. Njihovo otkriće prije gotovo tri desetljeća u modelnom organizmu *Caenorhabditis elegans*, ukazalo je na njihovu važnu regulacijsku ulogu u translaciji mRNA te sudjelovanje u gotovo svim ključnim staničnim procesima (Treiber i sur. 2019; Lee i sur. 1993). Do sada je identificirano oko 2 600 miRNA u ljudskom genomu prema podacima na *online* repozitoriju miRNA (miRBase 2022).

3.1. Biogeneza miRNA

Biogeneza kratke miRNA, prikazana na Slici 1, započinje u jezgri stanice prepisivanjem primarne miRNA (pri-miRNA) duge nekoliko stotina nukleotida. Dobivena molekula sadrži komplementarne sljedove te formira strukturu ukosnice. Primarnu miRNA procesiraju dvije endoribonukleaze, Drosha i Dicer, koje pripadaju skupini RNaze III. Proteinski kompleks kojeg čine Drosha i kofaktor DGCR8 djeluje na pri-miRNA dok se još nalazi u jezgri i cijepa strukturu ukosnice pri čemu nastaje pre-miRNA duga 70-80 nukleotida. Dobivena pre-miRNA se prenosi u citoplazmu u kompleksu s proteinima exportin-5 (Exp5) i Ran GTPazom. Hidrolizom GTP-a otpušta se pre-miRNA, a proteini Exp5 i GTPaza se vraćaju u jezgru. U citoplazmi na pre-miRNA djeluje druga endonukleaza, Dicer, koja cijepa područje omče, dodaje kratak komplementarni slijed nukleotida i stvara dupleks miRNA. Komplementaran slijed uklanja RNA helikaza i tada ostaje zrela miRNA koja ulazi u interakciju s proteinom Argonaut. Formira se RISC (od eng. *RNA-induced silencing complex*) koji veže ciljanu mRNA što uzrokuje njezino cijepanje ili supresiju translacija (Nelson i Cox 2013; Treiber i sur. 2019). Kada su miRNA i mRNA gotovo u potpunosti komplementarne, mRNA biva pocijepana. U slučaju kada je komplementarnost djelomična, vezani kompleks sprječava translaciju ciljane mRNA (Nelson i Cox 2013).



Slika 1. Biogeneza mikroRNA. Preuzeto i prilagođeno prema Jung i Suh 2015.

3.2. Uloga miRNA u genskoj regulaciji

Glavna uloga miRNA je genska regulacija na posttranskripcijskoj razini putem degradacije mRNA ili blokiranjem translacije. miRNA ima važnu ulogu u svim osnovnim biološkim procesima kao što su diferencijacija i proliferacija stanica, stanični metabolizam, stanična signalizacija, imunitet i migracija stanica (Ng i sur. 2012; Brennecke i sur. 2003; Rayner i sur. 2011; Zhang i sur. 2012; Taganov i sur. 2006; Png i sur. 2012). Zbog sudjelovanja u navedenim procesima, poremećaji u ovakvoj regulaciji dovode do narušavanja homeostaze. Posljedično, aberacije u razini ekspresije miRNA mogu dovesti do različitih patoloških stanja (Wang i sur. 2016).

4. miRNA kao biomarker

Biomarker je objektivan i mjerljiv indikator normalnih bioloških i patogenih procesa (FDA-NIH Biomarker 2016). Karakteristike idealnog biomarkera su visoka osjetljivost, specifičnost, preciznost te moraju biti minimalno invazivni i pristupačni za široku primjenu (Taylor i sur. 2019). Kako se broj otkrivenih miRNA u ljudima povećavao, istraživanja su počela intenzivno proučavati poveznice između miRNA i bolesti. Otkriveno je da su razine ekspresije miRNA specifične za pojedina tkiva (Lagos-Quintana i sur. 2002) i da mogu ukazivati na fiziološko stanje stanica (Lim i sur. 2005). Iako se većina miRNA nalazi unutar stanice, znatan udio sudjeluje u međustaničnoj signalizaciji pa se one mogu naći i izvan stanica u tjelesnim tekućinama. Takve miRNA nazivamo cirkulirajućim miRNA i mogu se pronaći u uzorcima krvi, urina, sline, mlijeka te u peritonealnoj i cerebrospinalnoj tekućini (Weber i sur. 2010; Qu i sur. 2011; Liu i sur. 2012; Abdalla i Haj-Agmad 2012; Ayaz i sur. 2013; Wang i sur 2016). U cirkulaciju mogu ući i prilikom oštećenja tkiva, nekroze ili apoptoze, a osim toga mogu izlaziti iz stanica aktivnim transportom u vezikulama, egzosomima ili u kompleksu s proteinom (Kai i sur. 2013; O'Driscoll 2018; Vickers i sur. 2011). Stoga su cirkulirajuće miRNA stabilne jer su zaštićene od djelovanja RNaza za razliku od drugih molekula RNA. Također, miRNA u krvnoj plazmi ostaje stabilna nakon izloženosti različitim uvjetima poput visoke i niske vrijednosti pH, visoke i niske temperature te nakon dugotrajne pohrane na sobnoj temperaturi (Mitchell i sur. 2008; Chen i sur. 2008). Zbog navedenih svojstava miRNA predstavlja potencijalan dijagnostički i prognostički biomarker.

4.1. miRNA u dijagnostici malignih tumora

Maligni tumori su bolesti koje nastaju nekontroliranim rastom stanica koje se šire i oštećuju okolne stanice i tkiva (NIH National Cancer Institute 2022). Jedan od glavnih ciljeva, ali i izazova, u današnjim istraživanjima malignih tumora je otkrivanje stabilnih biomarkera koji bi se mogli rutinski mjeriti u kliničkim pretragama. miRNA su prvi puta korištene kao biomarkeri 2008. godine kada su ih Lawrie i sur. upotrijebili u ispitivanju difuznog B-velikostaničnog limfoma (Lawrie i sur. 2008). Razine ekspresije miRNA specifične su kod različitih malignih tumora i

omogućavaju uvid u njihovo podrijetlo, stupanju diferencijacije tumora te tip i podtip malignih tumora s obzirom na početno mjesto nastajanja (Lu i sur. 2005; Rosenfeld i sur. 2008).

miRNA mogu djelovati kao onkogeni i poticati tumorogenezu, uključujući procese proliferacije, invaziju i migraciju stanica te angiogenezu. Ekspresija takvih miRNA koje djeluju kao onkogeni je povećana. Primjer onkogenog djelovanja miRNA je miR-155 čija povećana ekspresija djeluje na tumor supresorski protein TP53INP1 i time inhibira njegovo protutumorsko djelovanje (Gironell i sur 2007; Gao i sur 2012). miRNA mogu djelovati i kao tumor supresori. Tumor supresori reguliraju stanični ciklus, apoptozu, diferencijaciju, popravak DNA, angiogenezu i metastaze. Njihova ekspresija u obuhvaćenim tkivima je smanjena ili u potpunosti utišana. Primjeri takvih miRNA su miR-15a, miRNA-16-1, miR-27b, miR-29, miR-31, miR-34, miR-96, miR-101, miR-125a, miR125b, miR-126, miR-145, miR-200c, miR-203 i miR-335 (Lawrie 2014; Wang i sur 2016).

4.1.1. miRNA u dijagnostici karcinoma dojke

Karcinom dojke predstavlja najčešći oblik malignog tumora kod žena te čini 11,6% (UICC 2018) svih dijagnosticiranih malignih tumora. Najistraženija miRNA kod karcinoma dojke je miR-10b. Iorio i sur. su prvi uočili da je ekspresija miR-10b značajno smanjena kod karcinoma dojke u odnosu na uzorke zdravog tkiva (Iorio i sur. 2005). Povećana ekspresije miR-10b uzrokuje invaziju i migraciju tumorskih stanica (Wang i sur. 2014). Utišavanje miR-10b inhibira metastaze kod ksenografskih modela miševa (Ma i sur. 2010). Karcinom dojke je vrlo heterogena bolest s obzirom na mehanizam nastajanja i invazivnost. Shin i sur. uočili su smanjenu ekspresiju miR-16, miR-21 i miR-199a-5p te povećanje razina miR-92a-3p i miR-342-3p u uzorcima krvi i tkiva prikupljenih kod pacijentica s trostrukim negativnim karcinomom dojke (TNBC, od eng. *triple-negative breast cancer*), (Shin i sur. 2015). U karcinomima dojke s prekomjernom ekspresijom HER2+, više je puta dokazano kako se miR-4728 koeksprimira s genom *HER2* te djeluje kao onkogen. HER-pozitivan karcinom dojke je vrsta karcinoma koji ima prekomjernu ekspresiju proteina HER2 (Newie i sur. 2014; Newie i sur. 2016; Floros i Lochmann 2018). Nadalje, Søkilde i sur. su uočili povećanu ekspresiju dviju drugih mi-RNA, miR-2115 i miR-7158, u malignim

tumorima koji su HER2+, a koje su inače vrlo slabo ekspirirane u odgovarajućem zdravom tkivu (Søkilde i sur. 2019).

4.1.2. miRNA u dijagnostici karcinoma pluća

Razine ekspresija miRNA različite su kod pacijenata oboljelih od karcinoma pluća i zdravih osoba te između dviju glavnih skupina samog karcinoma, karcinoma malih stanica i karcinoma pluća nemalih stanica (Sromek i sur. 2017). Poroyko i sur. pronašli su 13 miRNA kojima se mogu razlikovati karcinom pluća malih stanica i onaj nemalih pri čemu su neke, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-363-3p, pokazale visoku osjetljivost i specifičnost od 100% (Poroyko i sur. 2018). Osim toga, razine ekspresije miR-145, miR-20a, miR-21 i miR-223 su različite za stadije ove bolesti (Zhang, 2017).

pri-miRNA se također može koristiti kao biomarker za razlikovanje ranih stadija karcinoma pluća kod podtipova adenokarcinoma i planocelularnog karcinoma. Razina ekspresije pri-miRNA-3662 je znatno povećana kod pacijenata s adenokarcinomom u stadiju I i II, dok je ekspresija pri-miRNA-944 povećana kod pacijenata s planocelularnim karcinomom u ranim stadijima I i II (Powrozek i sur. 2017). Razlikovanje navedenih tipova karcinoma pluća je važno zbog odabira što efikasnije terapije za liječenje.

4.1.3. miRNA u dijagnostici drugih malignih tumora

Pojačana ekspresija miR-10b, miR-21, miR-103, miR-107, miR141, miR-155, miR-221, miR-222, miR-372, miR-373 i miR520c uočena je u različitim tipovima malignih tumora, uključujući limfome, leukemiju, neuroblastom, glioblastom, karcinom štitnjače, testisa, dojke, pluća, gušterače i debelog crijeva (Lawrie 2014; Shenouda i Alahari 2009).

4.2. miRNA u dijagnostici drugih bolesti

Budući da je aberantna ekspresija miRNA povezana s mnogim bolestima, potencijalna primjena miRNA u dijagnostici je vrlo široka.

4.2.1. miRNA u dijagnostici kardiovaskularnih bolesti

Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrti prema posljednjim podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO 2020). miRNA su dobri biomarkeri raznih kardiovaskularnih bolesti uključujući akutni infarkt miokarda, hipertrofiju, zatajenje srca, aritmiju i aterosklerozu (Small i Olsom 2011).

miR-1, miR-126, miR-197, miR-208a i miR-223 su potencijalni dijagnostički biomarkeri za akutni miokard (Ai i sur. 2010; Zampetaki i sur. 2012). Otkrivene su četiri miRNA koje pomažu u prognoziranju ishoda nakon akutnog infarkta miokarda: miR-16, miR-27a, miR-101, miR-150 (Devaux i sur. 2013).

Kardiomiopatija Takotsubo (TTC, od eng. *Takotsubo cardiomyopathy*) vrsta neishemične kardiomiopatije koja nije povezana s akutnim infarktom miokarda vrlo je opasna. Prije otkrića specifičnih miRNA nije postojao biomarker za njenu ranu dijagnozu koji bi ujedno i razlikovao te dvije bolesti. Jaguszewski i sur. otkrili su nekoliko miRNA, miR-1, miR-16, miR-26a i miR-133a kojima je moguće detektirati ovu bolest u ranim fazama (Jaguszewski i sur. 2014).

4.2.2. miRNA u dijagnostici živčanog sustava

Aberantna ekspresija miRNA prisutna je u razvoju bolesti živčanog sustava kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, epilepsija, multipla skleroza, glioblastom i amiotrofična lateralna skleroza (Wang i sur. 2014; Scheltens i sur. 2016; Noebles 2015; Costa i sur. 2015; Sum i sur. 2015).

miR-9 i miR-134 su specifične za mozak i opsežno proučene u neurogenezi (Schratt et al., 2006; Zhao et al., 2009). Aberantna ekspresija tih dviju miRNA smanjuje diferencijaciju neurona i povezuje se s abnormalnim razvojem mozga i patogenezom nekoliko neuroloških bolesti uključujući Tourettov sindrom, Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest (Mehler i Mattick 2007; Abelson i sur. 2005).

U kori mozga pacijenta oboljelih od Alzheimerove bolesti uočena je smanjena ekspresija miR-107. Promjene miRNA u oboljelima od Alzheimerove bolesti mogu se detektirati u mozgu i cerebrospinalnoj tekućini pacijenata, kao i u biološkim tekućinama poput plazme i seruma, što ih čini potencijalnim neinvazivnim biomarkerima (Zendjabil 2018).

Smanjenje razine ekspresije miR-1 i miR-19b-3p mogu se koristiti za razlikovanje pacijenata s Parkinsonovom bolešću od zdravih osoba (Gui i sur. 2015). Također, miRNA reguliraju ekspresiju gena za protein α -sinuklein koji je povezan s Parkinsonovom bolešću (Wang i sur. 2008).

4.2.3. miRNA u dijagnostici infektivnih bolesti

miR-150 je molekula koja se eksprimira gotovo isključivo u imunosnim stanicama (Davidson-Moncada i sur. 2010). Niske razine miR-150 potencijalan je prognostički marker jer doprinosi u predviđanju razvoja kritičnih stanja uzrokovanih raznim infekcijama (Roderburg i sur. 2013). Također, velika prednost miRNA u molekularnoj dijagnostici infektivnih bolesti je što omogućava detektiranje infekcije za vrijeme latencije. Period latencije označava razdoblje od ulaska patogena do trenutka kada osoba postaje sposobna zaraziti ostale. Iako osoba djeluje zdravo, patogen se može reaktivirati u bilo kojem trenutku i uzrokovati teške simptome. Postoji vrlo malo rutinskih metoda koje mogu detektirati virus tijekom latentnog perioda. Otkrivene su miRNA koje su prve molekule s potencijalom da služe kao dijagnostički biomarkeri za latentnu infekciju tuberkuloze. Tuberkuloza je infektivna bolest koju uzrokuje bakterija *Mycobacterium tuberculosis* i druga je infektivna bolest po stopi smrtnosti u svijetu nakon COVID-19 (WHO 2021). Lyu i sur. pronašli su četiri miRNA u krvnom serumu čija je ekspresija povećana kod skupine pacijenata s latentnom infekcijom tuberkuloze: let-7d-5p, let-7e-5p, miR-450a-5p i miR-140-5p. Usporedba je rađena sa pacijentima s aktivom tuberkulozom i zdravom skupinom (Lyu i sur. 2019). Duffy i sur.

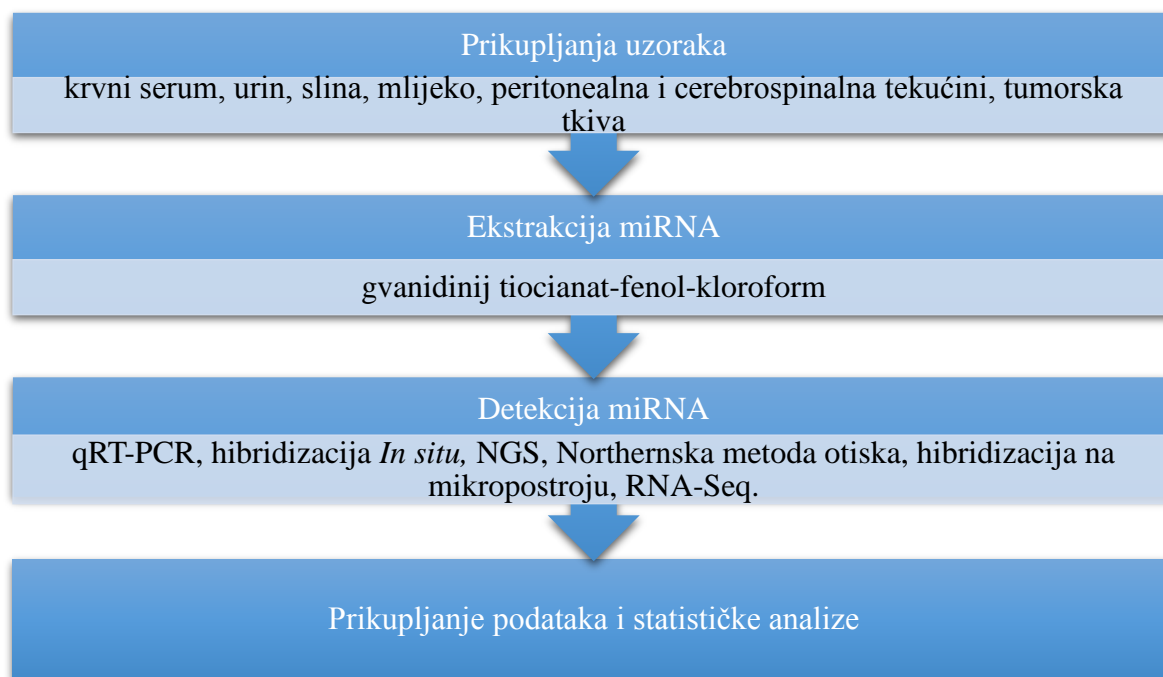
ukazali su na potencijalnu upotrebu istih miRNA kao prognostičke biomarkere tuberkuloze kojima se može predvidjeti hoće li unutar šest mjeseci latentna infekcija tuberkuloze prijeći u aktivnu i tako identificirati pacijente s visokim rizikom od težeg oboljenja (Duffy i sur. 2018).

Kada je domaćin zaražen virusom, ekspresija gena domaćina, uključujući ekspresiju miRNA domaćina, se mijenja. miRNA su potencijalni biomarkeri infekcija koje uzrokuju niz virusa poput *Hendra henipavirus*, *Zaire ebolavirus*, virus humane imunodeficijencije (HIV, od eng. *human immunodeficiency virus*) te virusi roda *Plasmodium* koji uzrokuju malariju: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae* (Stewart i sur. 2013; Duy i sur. 2016; Zhang i sur. 2013; Li i sur. 2018; Biswas i sur. 2019). Otkrivene su miRNA virusnog podrijetla (v-miRNA) čija je funkcija posttranskripcijska regulacija gena domaćina, ali isto tako i virusnih gena. Virus koristi mehanizme stanice domaćina, poput endonukleaza Droshe i Dicer, za ekspresiju vlastitih miRNA (Grundhoff i Sullivan, 2011). Virusne mi-RNA identificirane su do sada kod nekoliko virusnih porodica: *Retroviridae*, *Herpesviridae*, *Papovaviridae*, *Polyomaviridae* (Omoto i sur. 2004; Pfeffer i sur. 2004; Kincaid i sur. 2012). Prvu v-miRNA otkrili su Pfeffer i sur. 2004. u staničnoj liniji inficiranoj s virusom Epstein-Barr (EPV, od eng. *Epstein-Barr virus*). EBV pripada porodici *Herpesviridae* i povezan je s razvojem nekoliko malignih tumora kod ljudi poput Burkittovog i Hodgkinovog limfoma. Većina v-miRNA virusa Epstein-Barr se prepisuje sa regije BART i BHRF₁. Uočeno je da se ekspresija različitih miRNA sa tih regija mijenja nakon infekcije te je tako, primjerice, ekspresija miR-BART22 povećana tijekom latentne infekcije EBV-om. Pokazano je da miR-BART22 blokira translaciju proteina LMP2A koji je virusni antigen kojeg prepoznaju limfociti T. Posljedično, ekspresija ove miRNA omogućava izbjegavanje imunosnog odgovora domaćina (Lung i sur. 2010; Kang i Kieff. 2015). miR-BART22 je stoga potencijalan dijagnostički biomarker za detekciju infekcije EBV-om.

5. Detekcija miRNA

Precizna detekcija miRNA u kliničkim uzorcima je ključna za široku primjenu miRNA u molekularnoj dijagnostici. Glavni koraci upotrebe miRNA u molekularnoj dijagnostici prikazani su na Slici 2 te uključuju prikupljanje uzoraka, ekstrakciju miRNA, detekciju miRNA, prikupljanje

podataka i statističke analize. Razvoj specifičnih i osjetljivih metoda detekcije miRNA predstavlja izazov koji se pokušava prevladati unapređenjem postojećih metoda i razvijanjem novih.



Slika 2. Shematski prikaz glavnih koraka upotrebe miRNA u molekularnoj dijagnostici: prikupljanje uzoraka, ekstrakcija miRNA, detekcija miRNA, prikupljanje podataka i statističke analize. Prilagođeno prema Gustafson i sur. 2016; Sempere i sur 2020.

5.1. Metode detekcije miRNA

Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu s prethodnom reverznom transkripcijom (qRT-PCR) je široko primijenjena metoda u molekularnoj dijagnostici. Ova metoda uključuje reverznu transkripciju korištenjem enzima reverzne transkriptaze, specifično umnažanje pomoću pažljivo dizajniranih početnica proba i detekciju dobivenog produkta fluorescentnim bojama. Prednost detekcije miRNA metodom qRT-PCR je kvantitativna analiza i visoka specifičnost, no kod ove metode je velik rizik od kontaminacije (Chen i sur. 2005).

Hibridizacija *In situ* uključuje detekciju miRNA označavanjem miRNA komplementarnim probama. Koristi se za vizualizaciju i lokalizaciju miRNA u smrznutim uzorcima stanica i tkiva.

Metoda uključuje dizajniranje proba, fiksaciju, permeabilizaciju, hibridizaciju, posthibridizacijsko ispiranje i detekciju signala (Nelson i sur. 2006). Glavna prednost ove metode je mogućnost praćenja distribucije miRNA što je značajno kod malignih tumora s intratumorskom heterogenosti koja označava pojavu subpopulacije tumorskih stanica koje se značajno razlikuju unutar istog tumora i otežavaju liječenje (Filder 1978; Hanna i sur. 2012).

Sekvenciranje novih generacija (NGS, od eng. *Next-Generation Sequencing*) omogućava analiziranje svih miRNA prisutnih u uzorku. Nije potrebno poznavanje ciljne miRNA ni dizajniranje početnica ili proba. Trenutno je ovo najbolja metoda za otkrivanje miRNA, no glavni nedostaci uključuju visoku cijenu za rutinsku upotrebu i potrebu za digitalnom infrastrukturom za analizu i interpretaciju dobivenih podataka (Moldovan i sur. 2014).

Northernaska metoda otiska je godinama vrlo raspostranjena metoda u molekularnoj dijagnostici. Prvi korak je odvajanje RNA u uzorku po veličini provođenjem denaturirajuće gel-elektroforeze. Željeni fragmenti se zatim prenose na najlonsku ili nitroceluloznu membranu na kojoj se nalazne specifične RNA probe koje komplementarno vežu denaturirane molekule RNA formirajući dvolančane molekule. Za detekciju se mogu koristiti neradioaktivne ili radioaktivne probe poput izotopa ^{32}P . Ova metoda omogućuje analizu razine ekspresije pojedine miRNA u uzorku. Njena glavna prednost je to što omogućava istovremeno detektiranje zrelih miRNA i njezinih prekursora (Bohm-Hostatter i sur. 2010).

5.2. Izazovi u detekciji miRNA

Trenutačne metode koje se koriste za kvantificiranje miRNA u kliničkim uzorcima često su skupe, temelje se na protokolima s velikim brojem koraka i zahtijevaju visoko specijalizirano osoblje, a nisu visoko specifične. Sve to sprječava njihovu širu primjenu i čini ih nepraktičnim za rutinsku upotrebu. Stoga, mnogi znanstvenici pokušavaju razviti nove tehnologije koje bi omogućile ekstrakciju i detekciju miRNA u prijenosnim uređajima. U tome im veliki izazov stvara niska koncentracija miRNA u većini bioloških tekućina. S obzirom da većinu patoloških stanja karakteriziraju promjene u razini ekspresije ne jedne, nego više specifičnih miRNA, potrebno je razviti testove koji će istovremeno detektirati veći broj različitih miRNA (Tribolet i sur. 2020).

Glavni nedostatak koji koči translaciju spoznaja o miRNA u kliniku je nepostojanje standardizacije u svim koracima detekcije miRNA prikazanih na Slici 2, od skupljanja uzoraka, ekstrakcije, pohranjivanja do statističkih analiza (Kilic i sur. 2018). Potrebno je razviti alternativne pristupe koji će omogućiti mjerenje cirkulirajućih miRNA te koji će biti brzi, specifični i cjenovno dostupni.

6. Zaključak

Razine ekspresije miRNA su specifične za pojedina tkiva i povezuju se s različitim bolestima. Mogu pružati informacije o podrijetlu, razvojnom putu, stupnju diferencijacije i podvrstama malignih tumora te su pronađene u većini bioloških tekućina. Navedena svojstva čine miRNA potencijalnim neinvazivnim dijagnostičkim i prognostičkim biomarkerima. No, nepostojanje standardizacije u svim koracima detekcije molekula miRNA od skupljanja uzoraka, ekstrakcije, pohranjivanja do statističkih analiza onemogućava njihovo rutinsko korištenje u molekularnoj dijagnostici. Potrebno je razviti nove metode koje će pojednostaviti identifikaciju i omogućiti mjerenje cirkulirajućih miRNA, a ujedno biti brze, visoko specifične i jeftine. Razvoj takvih metoda će omogućiti implementaciju saznanja o miRNA iz istraživačkih laboratorija u zdravstveni sustav i doprinijeti suzbijanju izlječivih bolesti.

7. Literatura

Abdalla M.A., Haj-Ahmad Y. (2012): Promising candidate urinary microRNA biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma among highrisk hepatitis C virus Egyptian patients. *J Cancer*. 3: 19-31.

Abelson J.F., Kwan K.Y., O'Roak B.J., Baek D.Y., Stillman A.A., Morgan T.M., Mathews C.A., Pauls D.L., Rasin M.R., Gunel M., Davis N.R., Ercan-Sencicek A.G., Guez D.H., Spertus J.A., Leckman J.F., Dure L., Kurlan R., Singer H.S., Gilbert D.L., Farhi A., Louvi A., Lifton R.P., Sestan N., State M.W. (2005): Sequence variants in *SLITRK1* are associated with Tourette's syndrome. *Science*. 14: 317-20.

Ai J., Zhang R., Li Y., Pu J.L., Lu Y.J., Jiao J.D., Li K., Yu B., Li Z.Q., Wang R.R., Wang L.H., Li Q., Wang N., Shan H.L., Li Z.Y., Yang B.F. (2010): Circulating microRNA as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem. Biophys. Res Commun*. 391: 73–77.

Ayaz L., Görür A., Yaroglu H.Y., Ozcan C., Tamer L. (2013): Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 139: 1499–1506.

Bartel D.P. (2004): MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116: 281–297.

Biswas S., Haleyrigisetty M., Lee S., Hewlett I., Devadas K. (2019): Development and validation of plasma miRNA biomarker signature panel for the detection of early HIV-1 infection. *EBioMedicine*. 42: 307–316.

Blenkiron C., Goldstein L.D., Thorne N.P., Spiteri I., Chin S.F., Dunning M.J., Barbosa-Morais N. L., Teschendorff A. E., Green A. R., Ellis I. O., Tavaré S., Caldas C., Miska E. A. (2007): microRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*. 8.

Bohm-Hofstatter H., Tschernutter M., Kunert R. (2010): Comparison of hybridization methods and real-time PCR: their value in animal cell line characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 419–425.

Brennecke J., Hipfner D.R., Stark A., Russell R.B., Cohen S.M. (2003): bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell.* 113: 25–36.

Costa P.M., Cardoso A.L., Mano M., de Lima M.C. (2015): MicroRNAs in glioblastoma: Role in pathogenesis and opportunities for targeted therapies. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 14: 222–238.

Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. (2005): Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33.

Chen X., Ba Y., Ma L., Cai X., Yin Y., Wang K., Guo J., Zhang Y., Chen J., Guo X., Li Q., Li X., Wang W., Zhang Y., Wang J., Jiang X., Xiang Y., Xu C., Zheng P., Zhang J., Li R., Zhang H., Shang X., Gong T., Ning G., Wang J., Zen K., Zhang J., Zhang C.Y. (2008): Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18: 997–1006.

Davidson-Moncada J., Papavasiliou F.N., Tam W. (2010): MicroRNAs of the immune system: Roles in inflammation and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183: 183–194.

Devaux Y., Vausort M., McCann G.P., Kelly D., Collignon O., Ng L.L., Wagner D.R., Squire I.B. (2013): A panel of 4 microRNAs facilitates the prediction of left ventricular contractility after acute myocardial infarction. *PLoS One.* 8.

Duffy F.J., Thompson E., Downing K., Suliman S., Mayanja-Kizza H., Boom W.H., Thiel B., Weiner Iii J., Kaufmann S.H., Dover D., Tabb D.L., Dockrell H.M., Ottenhoff T.H., Tromp G., Scriba T.J., Zak D.E., Walzl G. (2018): A Serum Circulating miRNA Signature for Short-Term Risk of Progression to Active Tuberculosis Among Household Contacts. *Front. Immunol.* 9: 661.

Duy J., Koehler, J. W., Honko A. N., Schoepp R. J., Wauquier N., Gonzalez J. P., Pitt M.L., Mucker E.M., Johnson J.C., O'Hearn A., Bangura J., Coomber M., Minogue T.D. (2016): Circulating microRNA profiles of Ebola virus infection. *Sci. Rep.* 6.

FDA-NIH Biomarker Working Group (2016) BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) glossary. Version 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK338448> (pristupljeno 5. 08. 2022.).

Fidler I.J. (1978): Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 38: 2651-2660.

Floros, K.V., Lochmann T.L., Hu B., Monterrubio C., Hughes M.T., Wells J.D., Morales C.B., Ghotra M.S., Costa C., Souers A.J., Boikos S.A., Levenson J.D., Tan M., Serra V., Koblinski J.E., Arribas J., Prat A., Paré L., Miller T.W., Dozmorov M.G., Harada H., Windle B.E., Scaltriti M., Faber A.C. (2018): Coamplification of miR-4728 protects HER2-amplified breast cancers from targeted therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 115: 2594–2603.

Gao P., Xing A.Y., Zhou G.Y., Zhang T.G., Zhang J.P., Gao C., Li H., Shi D.B. (2012): The molecular mechanism of microRNA-145 to suppress invasion/metastasis cascade in gastric cancer. *Oncogene.* 32: 491-501.

Gironella M., Seux M., Xie M.J., Cano C., Tomasini R., Gommeaux J., Garcia S., Nowak J., Yeung M.L., Jeang K.T., Chaix A., Fazli L., Motoo Y., Wang Q., Rocchi P., Russo A., Gleave M., Dagorn C.J., Iovanna J.L., Carrier A., Pebusque M.J., Dusetti N.J. (2007): Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 16170–16175.

Grundhoff A, Sullivan CS. (2011): Virus-encoded microRNAs. *Virology.* 411: 325–343.

Gui Y., Liu H., Zhang L., Lv W., Hu X. (2015): Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget.* 6: 37043-37053.

Gustafson D., Tyryshkin K., Renwick N. (2016): microRNA-guided diagnostics in clinical samples. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 30: 563-575.

Hanna J.A., Wimberly H., Kumar S., Slack F., Agarwal S., Rimm D.L. (2017): Quantitative analysis of microRNAs in tissue microarrays by in situ hybridization. *Biotechniques.* 52: 235-245.

Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., Magri E., Pedriali M., Fabbri M., Campiglio M., Ménard S., Palazzo J.P., Rosenberg A., Musiani P., Volinia S., Nenci I., Calin G.A., Querzoli P., Negrini M., Croce C.M. (2005): MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 5: 7065–7070.

Jaguszewski M., Osipova J., Ghadri J.R., Napp L.C., Widera C., Franke J., , Fijalkowski M., Nowak R., Fijalkowska M., Volkmann I., Katus H.A., Wollert K.C, Bauersachs J., Erne P., Lüscher T.F., Thum T., Templin C. (2014): A signature of circulating microRNAs differentiates Takotsubo cardiomyopathy from acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 35: 999–1006.

Jung H.J., Suh Y. (2015): Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Front. Genet.* 5: 472.

Kai K., Dittmar R.L., Sen, S. (2018): Secretory microRNAs as biomarkers of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 78: 22–36.

Kang M.S., Kieff E. (2015); Epstein-Barr virus latent genes. *Exp. Mol. Med.* 47:131.

Kilic, T. Erdem A., Ozsoz M., Carrara S. (2018): microRNA biosensors: Opportunities and challenges among conventional and commercially available techniques, *Biosens. Bioelectron.* 99: 525–546.

Kincaid R.P., Burke J.M., Sullivan C.S. (2012): RNA virus microRNA that mimics a B-cell oncomiR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 3077–3082.

Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A., Meyer J., Lendeckel W., Tuschl T. (2002): Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12: 735–739.

Lawrie C.H., Gal S., Dunlop H.M., Pushkaran B., Liggins A.P., Pulfor, K., Banham A.H., Pezzella F., Boulwood J., Wainscoat J.S., Hatton C.S., Harris A.L. (2008): Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 141: 672–675.

Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75: 843-854.

Li J. J., Huang M. J., Li Z., Li, W. Wang, F. Wang L., Li X.L., Zheng X., Zou Y. (2018): Identification of potential whole blood MicroRNA biomarkers for the blood stage of adult imported falciparum malaria through integrated mRNA and miRNA expression profiling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 506: 471–477.

Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engele P., Grimson A., Schelter J.M., Castle J., Bartel D.P., Linsley P.S., Johnson J.M. (2005): Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 433: 769–773.

Liu A.M., Yao T.J., Wang W., Wong K.F., Lee N.P., Fan S.T., Poon R.T., Gao C., Luk J.M. (2012): Circulating miR15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. *BMJ Open.* 2.

Lung R.W., Tong J.H., Sung Y.M., Leung P.S., Ng D.C., Chau S.L., Chan A.W., Ng E.K., Lo K.W., To K.F. (2009): Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART22. *Neoplasia.* 11: 1174-1784.

Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B.L., Mak R.H., Ferrando A.A., Downing J.R., Jacks T., Horvitz H.R., Golub T.R. (2005): MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nat. Cell Biol.* 435: 834–838.

Lyu L., Zhang X., Li C., Yang T., Wang J., Pan L., Jia H., Li Z., Sun Q., Yue L., Chen F., Zhang Z. (2019): Small RNA Profiles of Serum Exosomes Derived From Individuals With Latent and Active Tuberculosis. *Front. Microbiol.* 10: 1174.

Ma L., Reinhardt F., Pan E., Soutschek J., Bhat B., Marcusson E.G., Teruya-Feldstein J., Bell G.W., Weinberg R.A. (2010): Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat. Biotechnol.* 28: 341–347.

Mehler M.F., Mattick J.S. (2007): Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. *Physiol. Rev.* 87: 799–823.

miRBase (2022) miRBase: the micro RNA database. Version 22.1. <https://www.mirbase.org> (pristupljeno 3. 08. 2022.).

Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Fritz B.R., Wyman S.K., Pogosova-Agadjanyan E.L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K.C., Allen A., Lin D.W., Urban N., Drescher C.W., Knudsen B.S., Stirewalt D.L., Gentleman R., Vessella R.L., Nelson P.S., Martin D.B., Tewari M. (2008): Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 10513–10518.

Moldovan L., Batte K.E., Trgovcich J., Wisler J., Marsh C.B., Piper M. (2014): Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J. Cell Mol. Med.* 18: 371–390.

Nelson D.L., Cox M.M. (2013): *Lehninger principles of biochemistry*. Springer Nature, New York.

Nelson P.T., Baldwin D.A., Kloosterman W.P., Kauppinen S., Plasterk R.H., Mourelatos Z. (2006): RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *RNA.* 12: 187-191.

Newie I., Sokilde R., Persson H., Grabau D., Rego N., Kvist A., von Stedingk, K., Axelson, H., Borg A., Vallon-Christersson J. (2014): The HER2-encoded miR-4728-3p regulates ESR1 through a non-canonical internal seed interaction. *PLoS ONE.* 9, 97200.

Newie I., Sokilde R., Persson H., Jacomasso T., Gorbatenko A., Borg A., de Hoon M., Pedersen S.F., Rovira C. (2016): HER2-encoded mir-4728 forms a receptor-independent circuit with miR-21-5p through the non-canonical poly(A) polymerase PAPD5. *Sci. Rep.* 6.

Ng R., Song G., Roll G.R., Frandsen N.M., Willenbring H. (2012): A microRNA21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration. *J. Clin. Invest.* 122: 1097–10108.

NIH National Cancer Institute (2022) Dictionary of Cancer Terms. Version 2022. <https://www.cancer.gov> (pristupljeno 7.08. 2022.).

Noebel, J. (2015): Pathway-driven discovery of epilepsy genes. *Nat. Neurosci.* 18: 344–350.

Omoto S., Ito M., Tsutsumi Y., Ichikawa Y., Okuyama H., Brisibe E.A., Saksena N.K., Fujii Y.R. (2004): HIV1 nef suppression by virally encoded microRNA. *Retrovirology.* 1: 44.

Pfeffer S., Zavolan M., Grässer F.A., Chien M., Russo J.J., Ju J., John B., Enright A.J., Marks D., Sander C., Tuschl T. (2004): Identification of virus-encoded microRNAs. *Science.* 304: 734-736.

Png K.J., Halberg N., Yoshida M., Tavazoie S.F. (2012): A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature.* 481: 190–194.

Poroyko V., Mirzapoiiazova T., Nam A., Mambetsariiev I., Mambetsariiev B., Wu X., Husain A., Vokes E.E., Wheeler D.L., Salgia R. (2018): Exosomal miRNAs species in the blood of small cell and non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget.* 9: 19793–19806.

Powroze T., Kuznar-Kaminska B., Dziedzic M., Mlak R., Batura-Gabryel H., Sagan D., Krawczyk, P., Milanowski, J., Malecka-Massalska T. (2017): The diagnostic role of plasma circulating precursors of miRNA-944 and miRNA-3662 for non-small cell lung cancer detection. *Pathol. Res. Pract.* 213: 1384–1387.

Qu K.Z., Zhang K., Li H., Afdhal N.H., Albitar M. (2011): Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Gastroenterol.* 45: 355–60.

Rayner K.J., Esau C.C., Hussain F.N., McDaniel A.L., Marshall S.M., van Gils J.M., Ray T.D., Sheedy F.J., Goedeke L., Liu X., Khatsenko O.G., Kaimal V., Lees C.J., Fernandez-Hernando C., Fisher E.A., Temel R.E., Moore K.J. (2011): Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature.* 478: 404–407.

Roderburg C., Luedde M., Vargas Cardenas D., Vucur M. Scholten D., Frey N., Koch A., Trautwein C., Tacke F., Luedde T. (2013): Circulating microRNA-150 serum levels predict survival in patients with critical illness and sepsis. *PLoS ONE.* 8.

Rosenfeld N., Aharonov R., Meiri E., Rosenwald S., Spector Y., Zepeniuk M., Benjamin H., Shabes N., Tabak S., Levy A., Lebanony D., Goren Y., Silberschein E., Targan N., Ben-Ari A.,

Gilad S., Sion-Vardy N., Tobar A., Feinmesser M., Kharenko O., Nativ O., Nass D., Perelman M., Yosepovich A., Shalmon B., Polak-Charcon S., Fridman E., Avniel A., Bentwich I., Bentwich Z., Cohen D., Chajut A., Barshack I. (2008): MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat. Biotechnol.* 26: 462–469.

Scheltens P., Blennow K., Breteler M.M., de Strooper B., Frisoni G.B., Salloway S., Van der Flier W.M. (2016): Alzheimer's disease. *Lancet* 388: 505–517.

Schratt G.M., Tuebing, F., Nigh E.A., Kane C.G., Sabatini M.E., Kiebler M., Greenberg M.E. (2006): A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature.* 439: 283–289.

Sempere L.F., Azmi A.S., Moore A. (2021): microRNA-based diagnostic and therapeutic applications in cancer medicine. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 12.

Serpico D., Molino L., Di Cosimo S. (2013): microRNAs in breast cancer development and treatment. *Cancer Treat. Rev.* 40: 595–604.

Singer E. (2005): Personalized medicine prompts push to redesign clinical trials. *Nat. Med.* 11: 462–462.

Shin V.Y., Siu J.M., Cheuk I., Ng E.K.O., Kwong A. (2015): Circulating cell-free miRNAs as biomarker for triple-negative breast cancer. *Br. J. Cancer.* 112: 1751–1759.

Small E.M., Olson E.N. (2011): Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 469: 336–342.

Søkilde R., Persson H., Ehinger A., Pirona A.C., Fernö M., Hegardt C., Larsson C., Loman N., Malmberg M., Rydén L., Saal L., Borg Å., Vallon-Christerson J., Rovira C. (2019): Refinement of breast cancer molecular classification by miRNA expression profiles. *BMC Genom.* 20.

Sromek M., Glogowski M., Chechlinska M., Kulinczak M., Szafron L., Zakrzewska K., Owczarek J., Wisniewski P., Wlodarczyk R., Talarek L., Turski M., Siwicki J.K. (2017): Changes in plasma miR-9, miR-16, miR-205 and miR-486 levels after non-small cell lung cancer resection. *Cell. Oncol.* 40: 529–536.

Stewart C. R., Marsh G. A., Jenkins K. A., Gantier M. P., Tizard M. L., Middleton D., Lowenthal J.W., Haining J., Izzard L., Gough T.J., Deffrasnes C., Stambas J., Robinson R., Heine H.G., Pallister J.A., Foord A.J., Bean A.G., Wang L.F. (2013): Promotion of Hendra virus replication by microRNA 146a. *J. Virol.* 87: 3782–3791.

Taganov K.D., Boldin M.P., Chang K.J., Baltimore D. (2006): NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 12481–12486.

Taylor C.R. (2019): Introduction to Predictive Biomarkers: Definitions and Characteristics. In *Predictive Biomarkers in Oncology: Applications in Precision Medicine*. Springer International Publishing, Switzerland.

Treiber T., Treiber N., Meister G. (2019): Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20: 5–20.

Tribolet L., Kerr E., Cowled C., Bean A., Stewart C.R., Dearnley M., Farr R.J. (2020): MicroRNA Biomarkers for Infectious Diseases: From Basic Research to Biosensing. *Front. Microbiol.* 11.

UICC global cancer control (2018) Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018. Version 2018. <https://www.uicc.org> (pristupljeno 14.08.2022.).

Wang G., van der Walt J.M., Mayhew G., Li Y.J., Züchner S., Scott W.K., Martin E.R., Vance J.M. (2008): Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *Am. J. Hum. Genet.* 82: 283–289.

Wang J., Chen J. Sen, S. (2016): microRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J. Cell. Physiol.* 231: 25–30.

Wang, J. Zhang K., Liu S., Sen S. (2014): Tumor-associated circulating microRNAs as biomarkers of cancer. *Molecules*. 19: 1912–1938.

Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S., Huang D.Y., Huang K.H., Lee M.J., Galas D.J., Wang K. (2010): The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem*. 56: 1733–1741.

WHO (2020) World Health Organization: The top 10 causes of death. Version 2020. <https://www.who.int> (pristupljeno 15. 08. 2022.).

WHO (2021) World Health Organization: Tuberculosis. Version 2021. <https://www.who.int> (pristupljeno 14. 09. 2022.).

Zampetaki A., Willeit P., Tilling L., Drozdov I., Prokopi M., Renard J.M., Mayr A., Weger S., Schett G., Shah A, Boulanger C.M., Willeit J., Chowienczyk P.J., Kiechl S., Mayr M. (2012): Prospective study on circulating microRNAs and risk of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol*. 60: 290–299.

Zendjabil M. (2018): Circulating microRNAs as novel biomarkers of Alzheimer’s disease. *Clin. Chim. Acta*. 484: 99–104.

Zhang P., Bill K., Liu J., Young E., Peng T., Bolshakov S., Hoffman A., Song Y., Demicco E.G., Terrada D.L., Creighton C.J., Anderson M.L., Lazar A.J., Calin G.G., Pollock R.E., Lev D. (2012): MiR155 is a liposarcoma oncogene that targets casein kinase-1a and enhances b-catenin signaling. *Cancer. Res*. 72: 1751–1762.

Zhang H., Mao F., Shen T., Luo Q., Ding Z., Qian L., Huang J. (2017): Plasma miR-145, miR-20a, miR-21 and miR-223 as novel biomarkers for screening early-stage non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett*. 13: 669–676.

Zhang X., Guo J., Fan S., Li Y. Wei L., Yang X., Jiang T., Chen Z, Wang C., Liu J., Ping Z., Xu D., Wang J., Li Z., Qiu Y., Li J.C. (2013): Screening and identification of six serum microRNAs as novel potential combination biomarkers for pulmonary tuberculosis diagnosis. *PLoS One*. 8.

Zhao C., Sun G., Li S., Shi Y. (2009): A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 365–371.

Životopis

Ana Kujavec rođena je 10. rujna 2000. u Slovenj Gradcu. Pohađala je osnovnu školu Izidora Poljaka u Višnjici. Završila je opću dvojezičnu gimnaziju i program međunarodne mature *International Baccalaureate* na Prvoj gimnaziji u Varaždinu. Trenutno je studentica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu i završava preddiplomski studij molekularne biologije što znači da voli provoditi vrijeme u laboratorijima. U slobodno vrijeme uči strane jezike i uživa u društvu životinja.