

# Uloga molekula mikroRNA miR-16-5p i miR-107 u regulaciji ekspresije gena BRCA1 i BRCA2 u seroznom raku jajnika visokog stupnja malignosti

---

Perić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:217:384115>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Petra Perić

**Uloga molekula mikroRNA miR-16-5p i  
miR-107 u regulaciji ekspresije gena *BRCA1* i  
*BRCA2* u seroznom raku jajnika visokog  
stupnja malignosti**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za nasljedni rak na *Zavodu za molekularnu medicinu* Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Petra Ozretića te komentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić sa *Zavoda za animalnu fiziologiju* Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp.).

Rad je izrađen u okviru projekta „MIRnaGLI – Novi molekularni mehanizmi kao mete ciljanih terapija: Interakcije molekula mikroRNA i signalnog puta Hedgehog-GLI u seroznom karcinomu jajnika“ [HRZZ IP-2016-06-1268]; Voditeljica: prof. dr. sc. Sonja Levanat.

## ZAHVALE

---

*Prvo i najveće hvala mom mentoru, nasl. doc. dr. sc. Petru Ozretiću, na pruženoj prilici da izradim svoj diplomski rad u Laboratoriju za nasljedni rak. Hvala na strpljivosti i višestrukom ponavljanju i objašnjavanju svih nejasnoća s kojima sam se susretala. Hvala i na prenesenom znanju te pomoći pri pisanju i obradi rezultata ovoga rada. Ovo je trenutno moje najveće postignuće i neizmjerljivo sam zahvalna što ste bili moja prilika i poticaj da ga ostvarim.*

*Veliko hvala i mojoj komentorici, prof. dr. sc. Nadi Oršolić, na provjeri ovog diplomskog rada. Zahvalna sam jer su Vaša vrata uvijek bila otvorena i jer ste na svako moje pitanje odgovarali strpljivo i s puno razumijevanja. Na osobit način ističem zahvalnost na prenesenom praktičnom znanju tijekom moje laboratorijske stručne prakse.*

*Zahvalnost dugujem i Josipi Čonkaš. Hvala ti na beskrajnom strpljenju i što si, unatoč obavezama oko svog doktorata, uvijek bila tu za vrijeme eksperimentalnog dijela mog diplomskog rada, dijeleći sa mnom korisne savjete i prenoseći mi svoje znanje.*

*Svi zajedno, Vi ste oni bez kojih ovaj rad ne bi postojao, niti u konačnici bio ovakav kakav jest!*

\*\*\*

*Nekoliko hvala i onima koji nisu sudjelovali u izradi ovog diplomskog rada, ali su bili vječni vjetar u leđa na putu do njega.*

*Na prvom mjestu mojim roditeljima, majci i ocu – jer ste bili neiscrpni izvor ljubavi, podrške i ohrabrenja kroz cijeli moj studij, bez prestanka vjerujući u mene i moj uspjeh.*

*Mojoj sestri i braći – iako nam je vrijeme mog studija ukralo puno zajedničkih trenutaka, vaše postojanje i pomisao da ste uvijek tu za mene, činilo je veliku razliku.*

*Mojim prijateljima – jer ste vrijeme mog studija učinili predivnim, radosnim i nezaboravnim. Davalo mi je snagu naše međusobno bodrenje, ohrabrivanje, motiviranje i podržavanje.*

*Asistentici Dyani Odeh – hvala na bezuvjetnoj podršci, podijeljenom znanju i svim lijepim laboratorijskim uspomjenama koje imam sa svog diplomskog studija.*

*Na samom kraju, hvala dragom Bogu – na snazi, zaštiti i ljubavi.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Uloga molekula mikroRNA miR-16-5p i miR-107 regulaciji ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* u seroznom raku jajnika visokog stupnja malignosti

Petra Perić

*Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska*

Serozni rak jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) najčešći je i najsmrtonosniji podtip raka jajnika. Često je otkriven u uznapredovanoj fazi zbog izostanka jasnih i ranih simptoma, ali i nedostatka pouzdanih testova za rano otkrivanje. Glavni cilj ovog diplomskog rada je na proširenom setu uzoraka tkiva HGSOC i zdravih jajovoda odrediti ekspresiju mikroRNA hsa-miR-16-5p i hsa-miR-107 te gena *BRCA1* i *BRCA2*, za koje je utvrđeno da su njihovi ciljani geni, a čija bi poremećena ekspresija mogla biti uzrokovana poremećenom ekspresijom ovih mikroRNA. Određena je i dijagnostička vrijednost dobivenih ekspresija u razlikovanju tumorskog od zdravog tkiva. Osim toga, na staničnoj liniji karcinoma jajnika OVCAR-8 istražen je utjecaj tretmana mimicima i inhibitorima miR-16-5p i miR-107 na ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2*. Rezultati su pokazali da je ekspresija gena *BRCA2* i obje miRNA značajno povećana u raku jajnika, te da postoji pozitivna korelacija između ekspresija istraživanih gena, ali i miRNA, te miR-107 i *BRCA2*. Ovakav rezultat ujedno ukazuje na moguću povezanost u regulaciji njihove ekspresije. Najveću dijagnostičku vrijednost pokazale su ekspresije *BRCA2* i miR-107 (AUC > 0,8). Općenito, tretmani mimicima i inhibitorima su pokazali pozitivan utjecaj na ekspresiju oba gena, pri čemu je tretman inhibitorom miR-107 pokazao jednak utjecaj kao i mimik.

Ključne riječi: HGSOC, mikroRNA, *BRCA1*, *BRCA2*, ekspresija, qRT-PCR  
(71 stranica, 20 slika, 18 tablica, 156 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: Nasl. doc. dr. sc. Petar Ozretić  
Komentor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji:  
Prof. dr. sc. Nada Oršolić  
Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner  
Izv. prof. dr. sc. Petar Kružić

Rad prihvaćen: 9. veljače 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

### **The role of miR-16-5p and miR-107 microRNAs in the regulation of *BRCA1* and *BRCA2* gene expression in high-grade serous ovarian cancer**

Petra Perić

*Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia*

High-grade serous ovarian cancer (HGSOC) is the most common and deadliest subtype of ovarian cancer. It is often detected at an advanced stage due to the absence of clear and early symptoms, but also the lack of reliable tests for early detection. The main objective of this thesis was to determine the expression of microRNAs hsa-miR-16-5p and hsa-miR-107 and *BRCA1/2* genes, which were found to be their target genes, on an expanded set of HGSOC tissue samples and healthy fallopian tubes, and whose impaired expression could be caused by impaired expression of these microRNAs. The diagnostic value of the obtained expressions in distinguishing tumor from healthy tissue was also determined. In addition, the influence of treatment with miR-16-5p and miR-107 mimics and inhibitors on the expression of *BRCA1* and *BRCA2* genes was investigated on the OVCAR-8 ovarian cancer cell line. The results showed that the expression of the *BRCA2* gene and both miRNAs was significantly increased in ovarian cancer, and that there was a positive correlation between expression of investigated genes, but also miRNAs, and miR-107 and *BRCA2*. This result also indicates potential connection in the regulation of their expression. The highest diagnostic values were shown for the expressions of *BRCA2* and miR-107 (AUC > 0.8). Generally, treatments with mimics and inhibitors showed a positive effect on the expression of both genes, but inhibitor miR-107 treatment showed the same effect as the mimic.

Keywords: HGSOC, microRNA, *BRCA1*, *BRCA2*, expression, qRT-PCR  
(71 pages, 20 figures, 18 tables, 156 references, original in: Croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assist. Prof. Petar Ozretić, PhD  
Co-mentor: Prof. Nada Oršolić, PhD

Reviewers:

Prof. Nada Oršolić, PhD  
Assoc. Prof. Jasna Lajtner, PhD  
Assoc. Prof. Petar Kružić, PhD

Thesis accepted: February 9, 2023

# SADRŽAJ

---

## POPIS KRATICA

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. RAK JAJNIKA – „TIHI UBOJICA“</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. KLASIFIKACIJA NOVOTVORINA JAJNIKA.....	2
1.1.1.1. Serozni karcinom jajnika visokog stupnja malignosti .....	3
1.1.2. NASTANAK I PODRIJETLO SEROZNOG KARCINOMA VISOKOG STUPNJA MALIGNOSTI.....	4
<b>1.2. GENI <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i> I NJIHOVI PROTEINSKI PRODUKTI: ULOGE U ZAJEDNIČKOM PUTU</b> .....	<b>6</b>
1.2.1. FUNKCIONALNE DOMENE I ULOGE PROTEINA <i>BRCA1</i> .....	6
1.2.2. FUNKCIONALNE DOMENE I ULOGE PROTEINA <i>BRCA2</i> .....	8
1.2.3. NEFUNKCIONALNI GENI <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i> I RIZIK OD RAKA .....	9
<b>1.3. NEKODIRAJUĆE MOLEKULE RNA</b> .....	<b>11</b>
1.3.1. MOLEKULE mikroRNA.....	11
1.3.1.1. Uloga molekula miRNA u raku jajnika .....	14
1.3.1.2. Povezanost molekule miRNA i gena <i>BRCA1/2</i> .....	16
1.3.1.3. Korištenje miRNA u dijagnostici.....	18
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>20</b>
3.2.1. IZOLACIJA MOLEKULA RNA.....	20
3.2.1.1. Izolacija molekula RNA iz tkiva.....	20
3.2.1.2. Izolacija molekula RNA iz stanica .....	21
3.2.2. REVERZNA TRANSKRIPCija .....	22
3.2.2.1. Reakcija reverzne transkripcije za određivanje ekspresije mRNA.....	22
3.2.2.2. Reakcija reverzne transkripcije za određivanje ekspresije miRNA.....	24
3.2.3. KVANTITATIVNA LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU (qRT-PCR).....	28
3.2.3.1. Reakcija qRT-PCR za određivanje relativne ekspresije mRNA.....	28
3.2.3.2. Reakcija qRT-PCR za određivanje relativne ekspresije miRNA .....	30

3.2.4.	METODE PROVEDENE NA STANIČNOJ KULTURI OVCAR-8 .....	32
3.2.4.1.	Odmrzavanje stanica .....	32
3.2.4.2.	Održavanje stanica u staničnoj kulturi .....	33
3.2.4.3.	Presadivanje i razrjeđivanje stanica u staničnoj kulturi .....	33
3.2.4.4.	Pobrojavanje stanica i tretman stanica mimicima i inhibitorima miRNA miR-16-5p i miR-107 .....	34
3.2.5.	BIOINFORMATIČKA ANALIZA TRANSKRIPTOMSKIH PODATAKA IZ JAVNIH BAZA PODATAKA .....	36
3.2.6.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	36
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.</b>	<b>TKIVA .....</b>	<b>38</b>
4.1.1.	EKSPRESIJA miRNA miR-16-5p I miR-107 U SEROZNOM RAKU JAJNIKA VISOKOG STUPNJA MALIGNOSTI I ZDRAVIM JAJOVODIMA .....	38
4.1.2.	EKSPRESIJA GENA <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i> U SEROZNOM RAKU JAJNIKA VISOKOG STUPNJA MALIGNOSTI I ZDRAVIM JAJOVODIMA .....	41
4.1.3.	KORELACIJA IZMEĐU EKSPRESIJA ISTRAŽIVANIH miRNA I NJIHOVIH CILJNIH GENA .....	44
4.1.4.	DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST ISPITIVANIH EKSPRESIJA .....	45
<b>4.2.</b>	<b>STANIČNA KULTURA OVCAR-8 .....</b>	<b>47</b>
4.2.1.	UTJECAJ TRETMANA MIMIKA I INHIBIORA miR-16-5p I miR-107 NA EKSPRESIJU GENA <i>BRCA1</i> I <i>BRCA2</i> .....	47
4.2.2.	MORFOLOGIJA STANIČNE LINIJE OVCAR-8 PRIJE I NAKON TRETMANA .....	49
<b>4.3.</b>	<b>REZULTATI BIOINFORMATIČKE ANALIZE TRANSKRIPTOMSKIH PODATAKA .....</b>	<b>51</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>61</b>

## ŽIVOTOPIS



## POPIS KRATICA

---

<b>AUC</b>	engl. <i>area under curve</i> , površina ispod krivulje
<b>BRCA1</b>	engl. <i>breast cancer 1</i> , gen za karcinom dojke 1
<b>BRCA2</b>	engl. <i>breast cancer 2</i> , gen za karcinom dojke 2
<b>cDNA</b>	engl. <i>complementary DNA</i> , komplementarna DNA
<b>CA125</b>	engl. <i>cancer antigen 125</i> , karcinom antigen CA125
<b>CICs</b>	engl. <i>cortical inclusion cysts</i> , kortikalne inkluzijske ciste
<b>DDR</b>	engl. <i>DNA damage response</i> , odgovor na oštećenje DNA
<b>DSB</b>	engl. <i>double-strand breaks</i> , dvolančani lomovi DNA
<b>FBS</b>	engl. <i>fetal bovine serum</i> , fetalni goveđi serum
<b>FTE</b>	engl. <i>fallopian tube epithelium</i> , epitel jajovoda
<b>HGSOC</b>	engl. <i>high-grade serous ovarian cancer</i> , serozni karcinom jajnika visokog stupnja malignosti
<b>HR</b>	engl. <i>homologous recombination</i> , homologna rekombinacija
<b>HRD</b>	engl. <i>homologous recombination deficiency</i> , nedostatak homologne rekombinacije
<b>mRNA</b>	engl. <i>messenger RNA</i> , glasnička RNA
<b>miRNA</b>	engl. <i>microRNA</i> , mikroRNA
<b>ncRNA</b>	engl. <i>non-coding RNA</i> , nekodirajuća RNA
<b>NLS</b>	engl. <i>nuclear localization sequences</i> , nuklearne lokalizacijske sekvence
<b>NTC/NK</b>	engl. <i>no-template control</i> , negativna kontrola
<b>OSE</b>	engl. <i>ovarian surface epithelium</i> , površinski epitel jajnika
<b>PBS</b>	engl. <i>phosphate-buffered saline</i> , fosfatni puffer
<b>PCR</b>	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , lančana reakcija polimerazom
<b>qRT-PCR</b>	engl. <i>real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> , lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

<b>RCF</b>	engl. <i>relative centrifugal force</i> , relativna centrifugalna sila
<b>RT</b>	engl. <i>reverse transcription</i> , reverzna transkripcija
<b>STIC</b>	engl. <i>serous tubal intra-epithelial carcinoma</i> , serozni intraepitelni karcinom jajovoda
<b>UTR</b>	engl. <i>untranslated region</i> , netranslatirana regija

# 1. UVOD

---

## 1.1. RAK JAJNIKA – „TIHI UBOJICA“

Rak jajnika obuhvaća heterogenu skupinu zloćudnih bolesti koje se razlikuju po etiologiji, patologiji, molekularnoj biologiji, ali i brojnim drugim karakteristikama. Čini 2,5 % svih zloćudnih bolesti kod žena, ali i 5 % uzroka smrti od raka kod žena, što je uglavnom potaknuto kasnim dijagnozama (Torre i sur. 2018). Epitelno-serozni tip raka jajnika ujedno je i najčešći uzrok smrti kod žena s ginekološkim zloćudnim bolestima (Jelovac i Armstrong 2011). Njegova pojavnost učestalija je u razvijenim zemljama, a rizik nastanka raste sa starosnom dobi, pri čemu je najzastupljeniji kod žena u postmenopauzi u šestom i sedmom desetljeću života (Jelovac i Armstrong 2011). Prema posljednjim dostupnim podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, rak jajnika u Hrvatskoj 2019. godine zauzeo je sedmo mjesto po učestalosti, sa stopom pojavnosti 21,9 na 100 000 stanovnica i 459 novooboljelih, te peto mjesto po smrtnosti (Šekerija 2021).

Budući da u ranoj fazi ove bolesti, odnosno u trenutku kada je ona lokalizirana isključivo na jajnike, izostaju očiti simptomi, rak jajnika je obično dobro uznapredovao u trenutku dijagnosticiranja zbog čega se smanjuju šanse za dugoročno izlječenje (Dexheimer i Cochella 2020). Zbog toga se rak jajnika često naziva i *tihim ubojicom*. Simptomi se najčešće očituju kroz umor, difuznu abdominalnu bol, promjene u navikama pražnjenja crijeva i mokraćnog mjehura, gubitak tjelesne mase, a u kasnijoj fazi i masivno oticanje abdomena. Iz tog razloga, pacijenti se najčešće prvo konzultiraju s liječnikom obiteljske medicine, a ne ginekologom (Burges i Schmalfeldt 2011; Langhe 2015).

Uzrok nastanka raka jajnika još uvijek predstavlja veliku nepoznanicu, premda nekoliko čimbenika ukazuje na povezanost s razvojem ovog raka. Ti čimbenici uključuju prvenstveno dob, pa tako rizik od nastanka raka raste sa starosnom dobi. Osim toga, povećani rizik donose i rana prva menstruacija kao i kasna menopauza, sindrom policističnih jajnika te endometriozna (Sueblinvong i Carney 2009). Također, nekoliko čimbenika smanjuje rizik od razvoja bolesti, a među njima se ističu kronična anovulacija, dojenje, kao i trudnoća kod koje se sa svakim djetetom rizik smanjuje 15 – 20 % (Riman i sur. 2004).

Poražavajuća je procjena da se samo 15 % novotvorina jajnika otkrije dok je lokalizirano na jajniku, 17 % regionalno, a visokih 62 % se dijagnosticira kao bolest s udaljenim

metastazama (Goff i sur. 2000). Glavni razlog leži u vrlo ograničenoj dijagnostici ranog stadija bolesti zbog nepostojanja standardiziranih testova kao i neosjetljivih alata koji su odobreni za tu svrhu (Langhe 2015). Prema podacima iz 2019. godine, u Republici Hrvatskoj je samo 8,3 % novotvorina jajnika otkriveno u prvom stadiju bolesti (Šekerija 2021).

### **1.1.1. KLASIFIKACIJA NOVOTVORINA JAJNIKA**

Kada govorimo o raku jajnika, opsežna znanstvena istraživanja provedena posljednjih nekoliko godina iznimno su doprinijela temeljnom razumijevanju biologije ovih novotvorina, a samim time i pokazala kako ona obuhvaća heterogenu skupinu malignih tumora koji se međusobno razlikuju patološki, etiološki, patogenetski, ali i prognostički (Meinhold-Heerlein i sur. 2016). Stoga ne iznenađuje kako postoji nekoliko različitih pristupa klasifikaciji ovih novotvorina. Većina klasifikacija nastala je od već postojećih standardiziranih klasifikacija koje su donijele Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) čija se podjela temelji na tipu tumora, te klasifikaciji Međunarodne federacije ginekologije i porodništva (engl. *The International Federation of Gynecology and Obstetrics*, FIGO) temeljenoj na diferencijaciji u stadije tumora (Meinhold-Heerlein i sur. 2016). Prema tome, sve novotvorine jajnika mogu se podijeliti u tri temeljne skupine: površinski epitelni tumori, tumori zametnih stanica te stromalni tumori spolne vrpce (Chen i sur. 2003). Epitelni tumori jajnika čine oko 60 % svih tumora jajnika i približno 90 % malignih tumora jajnika (Chen i sur. 2003; Jelovac i Armstrong 2011; Torre i sur. 2018), a obuhvaćaju pet glavnih podtipova: serozni, mucinozni, endometrioidni, karcinom svijetlih stanica i Brennerovi tumori. Osim toga, svaki od ovih podtipova dijeli se na benigne, maligne i granične tumore (Meinhold-Heerlein i sur. 2015). Benignim tumorima nedostaje opsežna stanična proliferacija i invazivno ponašanje, granični su oni kod kojih je postojana opsežna stanična proliferacija, ali nema invazivnog ponašanja, dok je kod zloćudnih prisutno i invazivno ponašanje (Chen i sur. 2003). Epitelni maligni tumori dalje su grupirani kao tip I ili tip II na temelju kliničko-patoloških čimbenika (Lengyel 2010; Torre i sur. 2018). Tumori tipa I najčešće se dijagnosticiraju u ranim stadijima, manje su agresivni i rijetko sadrže mutacije u genu *TP53*, dok su tumori tipa II obično agresivniji, otkrivaju se u uznapredovanim stadijima, genetski su nestabilni te često sadrže mutacije gena *TP53*, zbog čega obično imaju i lošiju prognozu (Prahm i sur. 2015). Također, rak jajnika moguće je podijeliti i na nasljedni i nenasljedni (sporadični) oblik. Sporadični rak jajnika karakteriziran je širom genetskom nestabilnošću povezanom s mutacijama i/ili promjenama u ekspresiji nekoliko gena (Toss i sur. 2015).

Serozni podtip je najčešći histološki tip karcinoma jajnika i obuhvaća više od dvije trećine svih karcinoma jajnika (Labidi-Galy i sur. 2017; Dexheimer i Cochella 2020). Oko 80 % ovih tumora dijagnosticira se u uznapredovanom stadiju, približno 51 % u stadiju III te 29 % u stadiju IV (Torre i sur. 2018), što ukazuje na njihovu agresivnu prirodu. Posljedično tome, petogodišnje preživljenje za ovaj podtip karcinoma je samo 9 – 35 % (Babarović i sur. 2016), u odnosu na ostale podtipove kojima je ista prognoza veća od 60 % (Torre i sur. 2018). Stoga, kada se izraz „rak jajnika“ koristi bez posebne elaboracije podtipa, najčešće se odnosi na serozni rak jajnika visokog stupnja malignosti (engl. *high-grade serous ovarian cancer*, HGSOC).

#### **1.1.1.1. Serozni karcinom jajnika visokog stupnja malignosti**

HGSOC je jedinstvena vrsta i dominantni podtip epitelnog raka jajnika (Torre i sur. 2018). Pokazano je da je desetogodišnje preživljenje pacijenata s dijagnosticiranim HGSOC-om u ranom stadiju 55 %, dok je za pacijente s uznapredovanom fazom bolesti to samo 15 % (Narod 2016). Da bi metastazirao, HGSOC ne zahtjeva limfu ili krv (Lisio i sur. 2019), nego se može širiti na okolna tkiva i drugim putem, npr. odvajanjem stanica od primarnog tumora ili izravnim metastaziranjem na okolna tkiva unutar peritonealne šupljine. Međutim, metastatske izrasline ovog raka zahvaćene organe često napadaju samo površinski (Lengyel 2010). Ipak, ako se podvrgnu epitelno-mezenhimalnom prijelazu, mogu se vezati za mezotelnu sluznicu ili prodrijeti dublje u peritonealne organe. Metastaze HGSOC-a na sekundarna mjesta odgovorne su za približno 90 % smrtnosti od ovoga raka (Nguyen i sur. 2020). Najčešće su metastaze u abdomenu koje se javljaju kod više od 70 % pacijenata, a mogući razlog tomu može biti i nedostatak anatomske barijere između zdjelice i abdomena (Kohn i Ivy 2017).

Genomske analize HGSOC-a pokazale su kako se genetske promjene događaju prvenstveno u genu *TP53*, zatim genima *BRCA1* i *BRCA2*, ali i brojnim drugim manje poznatim genima (Labidi-Galy i sur. 2017). HGSOC karakterizira manjkavost procesa popravaka dvolančanih lomova DNA homolognom rekombinacijom (engl. *homologous recombination deficiency*, HRD) gdje važnu ulogu imaju proteini *BRCA1* i *BRCA2* za koje kodiraju geni *BRCA1* i *BRCA2* (Konstantinopoulos i sur. 2015). Osim toga, danas je poznato da HGSOC može postojati i s divljim tipom gena *BRCA1* i *BRCA2* koji imaju prepoznatljivi HRD-fenotip (Kohn i Ivy 2017). Gubitak funkcije ovih gena posljedično dovodi do genomske nestabilnosti te univerzalne mutacije i gubitka normalne regulacije gena *TP53* (Jayson i sur. 2014; Kohn i Ivy 2017). Mutacije gena *BRCA1* i *BRCA2* uglavnom su nasljedne te su odgovorne za gotovo 40 % slučajeva raka jajnika u žena s obiteljskom poviješću te bolesti (Torre i sur. 2018). Osim

promjena koje su specifične za gen, različiti epigenetski mehanizmi poput metilacije DNA i modifikacija histona mogu diferencijalno regulirati ove gene i tako potaknuti promjene na razini njihove ekspresije (Reyes i sur. 2019).

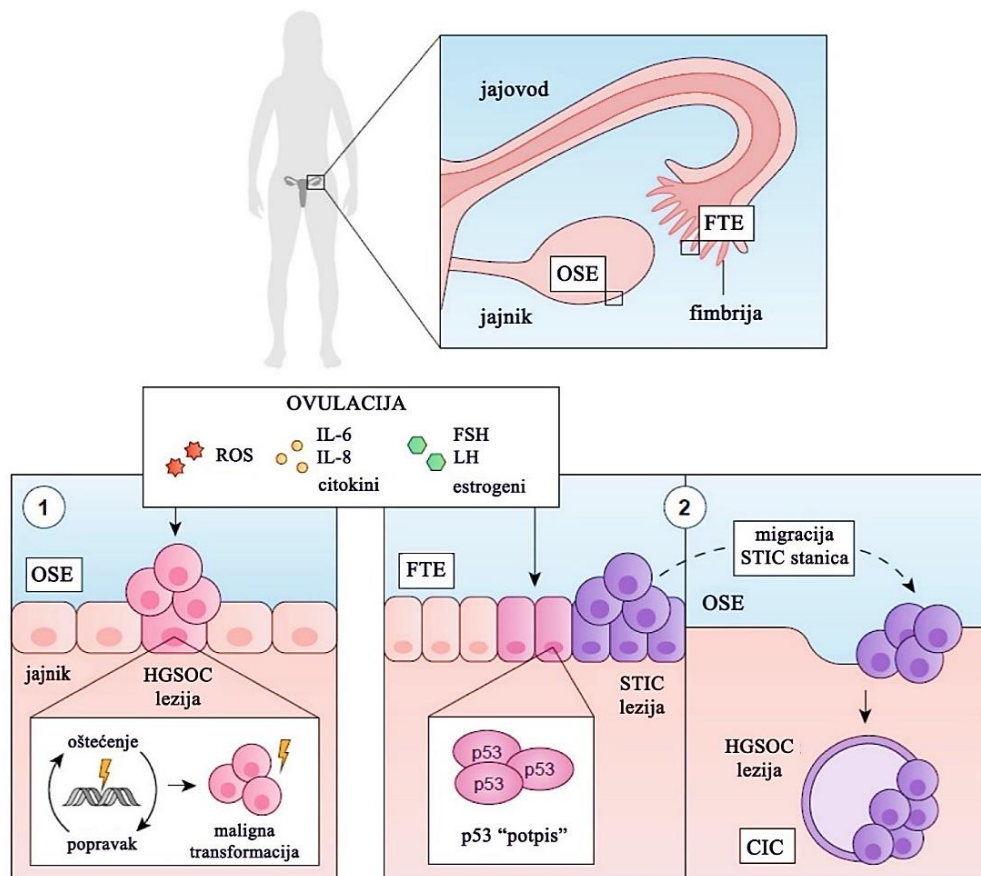
### 1.1.2. NASTANAK I PODRIJETLO SEROZNOG KARCINOMA VISOKOG STUPNJA MALIGNOSTI

HGSOC se općenito opisuje kao netipična, glomazna, multifokalna masa nejasne arhitekture smještena na jajnicima (Swisher i sur. 2016), s malignim pločastim stanicama i često povećanim i dismorfnim jezgrama (Kohn i Ivy 2017). S obzirom na to da se bolest često dijagnosticira u uznapredovanoj fazi kada je tumor metastazirao po peritonealnoj šupljini (Zhang i sur. 2019a; Colvin i Howell 2020), identifikacija stanica od kojih potječe HGSOC je otežana te predstavlja veliki izazov. Njihovo porijeklo među znanstvenicima i liječnicima i dalje je kontroverzno te nažalost tek treba biti utvrđeno, budući da nije prepoznata nikakva specifična prekancerogeneza (Punzón-Jiménez i sur. 2022).

Povijesno gledano, kandidatom za podrijetlo stanica HGSOC, Fathalla (1971) prvi predlaže površinski epitel jajnika (engl. *ovarian surface epithelium*, OSE). Scully (1995) također bilježi kako rak jajnika nastaje zbog invaginacija OSE-a koje su posljedica normalnih ovulacijskih rana. Nakon što je ostao zarobljen unutar tzv. kortikalnih inkluzijskih cista (engl. *cortical inclusion cysts*, CICs) ovaj rak je prošao metaplaziju u epitel nalik na Müllerove kanale, gdje je nakupljao uzročne mutacije prije nego je napredovao u HGSOC. Međutim, rane lezije *in situ* koje nastaju iz OSE-a i napreduju do invazivnog HGSOC-a nikada nisu bile reproducibilno identificirane (Labidi-Galy i sur. 2017), iako takvo proupalno i prooksidativno okruženje može rezultirati oštećenjem stanica i DNA (**Slika 1(1)**) (Punzón-Jiménez i sur. 2022).

Patološka i molekularna istraživanja pružila su drugačiji pogled na epitelni rak jajnika u kojem se smatra da većina invazivnih tumora nastaje iz neovarijskog tkiva (Berns i Bowtell 2012). Tako se, počevši od kasnih 1990-ih, epitel jajovoda (engl. *fallopian tube epithelium*, FTE) pojavio kao najvjerojatnije (ili najčešće) mjesto nastanka HGSOC (Dexheimer i Cochella 2020). U ovulacijskim ciklusima, sekretorne i cilijarne stanice koje čine jednoslojni epitel jajovoda izložene su ponavljajućem genotoksičnom stresu, što može rezultirati oštećenjima DNA i različitim promjenama na razini gena. Uvidi u ovakvu patogenezu HGSOC-a proizašli su iz istraživanja prevalencije raka jajnika kod žena s germinativnim mutacijama gena *BRCA1/2* koje su podvrgnute profilaktičkim operacijama uklanjanja jajnika i jajovoda u svrhu smanjenja

rizika od raka i kod kojih je otkriveno da je većina genetskih promjena bila prisutna u prekursorskim lezijama (Lee i sur. 2007). Takve lezije, nazvane serozni intraepitelni karcinom jajovoda (engl. *serous tubal intra-epithelial carcinoma*, STIC), definirane su kao neoplazme *in situ* s povećanim proliferativnim kapacitetom. Također pokazuju i tzv. *p53-potpis*, odnosno mutantni jednostanični epitelni sloj karakteriziran intenzivnim bojenjem p53, što je dokaz njegove mutiranosti (**Slika 1(2)**) (Ducie i sur. 2017; Labidi-Galy i sur. 2017; Dexheimer i Cochella 2020). Važno je naglasiti kako *p53-potpis* može istaknuti prekursorske lezije STIC-a s obzirom na to da one također pokazuju genomsku nestabilnost poput HGSOE, te manjak telomera što je rani znak razvoja HGSOE. Prema ovoj teoriji *p53-potpis* može biti neophodan, ali ne i dovoljan za razvoj HGSOE (Punzón-Jiménez i sur. 2022).



**Slika 1. Dvije glavne teorije staničnog podrijetla HGSOE. (1)** Reaktivni radikali kisika (ROS), upalne molekule (IL-6, IL-8 i citokini) i hormoni (FSH, LH i estrogeni) koji se oslobađaju tijekom ovulacije induciraju stalne cikluse oštećenja tkiva i popravka. To dovodi do HGSOE na površini epitela jajnika (OSE), što također može biti potaknuto i stvaranjem kortikalnih inkluzijskih cista (CIC). **(2)** Maligna transformacija potaknuta proupalnim i prooksidativnim okruženjem stvara lezije seroznog tubularnog intraepitelnog karcinoma (STIC) u epitelu jajovoda (FTE), koje dovode do HGSOE nakon migracije i invaginacije u OSE kao CIC-ovi (slika je preuzeta i prilagođena iz Punzón-Jiménez i sur. (2022)).

## **1.2. GENI *BRCA1* I *BRCA2* I NJIHOVI PROTEINSKI PRODUKTI: ULOGE U ZAJEDNIČKOM PUTU**

Geni *BRCA1* i *BRCA2* su tumorski supresori čije mutacije stvaraju predispoziciju za razvoj raka dojke i jajnika, ali i povećavaju rizik od razvoja drugih vrsta raka uključujući rak prostate i gušterače, te različite hematopoetske vrste raka (Bertwistle i Ashworth 1998; Paul i Paul 2014). Kako bi zaobišle prijetnju različitih štetnih čimbenika poput ionizirajućeg zračenja, ultraljubičastog svjetla ili pogrešaka u replikaciji DNA koje mogu stvoriti citotoksične lezije DNA koji oštećuju samu molekulu, stanice su razvile vrlo složene i specifične procese. Ti procesi sudjeluju u otkrivanju, signaliziranju i popravljaju lezija nastalih tijekom staničnog ciklusa. Premda postoji mnoštvo puteva kojima se organizam štiti od štetnih utjecaja spomenutih lezija, u tom pogledu i geni *BRCA1/2* igraju bitnu ulogu u nekoliko puteva popravka DNA (Fradet-Turcotte i sur. 2016).

Istraživanja su pokazala da su proteinski produkti gena *BRCA1* i *BRCA2* uključeni u mnoštvo staničnih procesa, među kojima je integralna uloga u odgovoru na stanični stres putem aktivacije procesa popravka DNA i regulacije transkripcije kao odgovor na oštećenje DNA. Osim toga, proteinski produkti oba gena važni su u stabilnosti kromosoma, preciznije u kontroli pregradnje kromatina, čime se štiti genom od oštećenja, te u regulaciji staničnog ciklusa kao i apoptoze (Jazaeri i sur. 2002; Yoshida i Miki 2004). Stoga su regulatorne uloge gena *BRCA1/2* u kontroli kontrolnih točaka staničnog ciklusa i mehanizmima popravka DNA u visokoj korelaciji s njihovim aktivnostima supresije tumora (Paul i Paul 2014). Genomske regije *BRCA1* i *BRCA2* sadrže mnoštvo ponavljajućih elemenata DNA koji mogu pridonijeti genetskoj nestabilnosti (Welch i King 2001). Također, važno je istaknuti kako gotovo svi karcinomi jajnika povezani sa štetnim mutacijama u *BRCA1* i *BRCA2* su serozni karcinomi visokog stupnja malignosti (Jayson i sur. 2014).

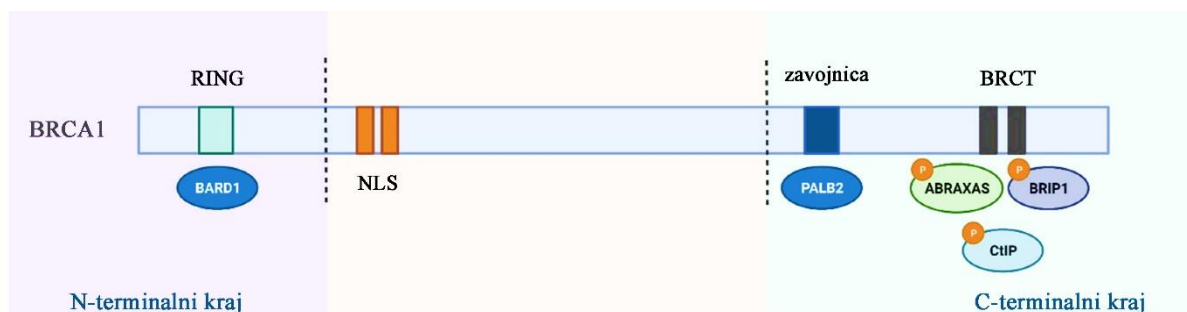
### **1.2.1. FUNKCIONALNE DOMENE I ULOGE PROTEINA *BRCA1***

Gen *BRCA1* kloniran je 1994. godine i smješten je na ljudskom kromosomu 17q12-21 (Miki i sur. 1994). Sastoji se od 24 kodirajuća egzona te kodira za protein od 1863 aminokiseline, a ima i nekoliko prepoznatljivih karakteristika (Bertwistle i Ashworth 1998). Na N-terminalnom kraju proteina *BRCA1* smještena je cink-vezujuća prstenasta domena RING (engl. *RING zinc finger domain*), kodirajuće regije egzona 11 – 13 sa posebnom važnosti od dvije nuklearne lokalizacijske sekvence (engl. *nuclear localization sequences*, NLS) smještene



na egzonu 11 koje kodiraju gotovo 60 % proteina BRCA1, te dvije C-terminalne domene BRCT (engl. *BRCA1 carboxyl terminus*) (Slika 2) (Venkitaraman 2002).

Mutacije u BRCA1 su povezane s povećanim životnim rizikom od raka dojke i jajnika. Kod osoba oboljelih od raka, takve mutacije su najčešće pronađene upravo u proteinskim domenama RING i BRCT, što ukazuje na to kako su one uključene i u suzbijanje njegovog nastanka. One su važne, ne samo zbog različitih proteinskih međureakcija koje ostvaruju, nego i zbog substancične lokalizacije BRCA1 (Roy i sur. 2012; Paul i Paul 2014). Kada govorimo o mutacijama, egzoni 11 – 13 također su od velike važnosti za tumor-supresorsku funkciju BRCA1 i sadrže visoki postotak klinički relevantnih mutacija (Al-Mulla i sur. 2009). Razlog tomu može biti interakcija s nekoliko proteina uključenih u široki raspon staničnih putova.

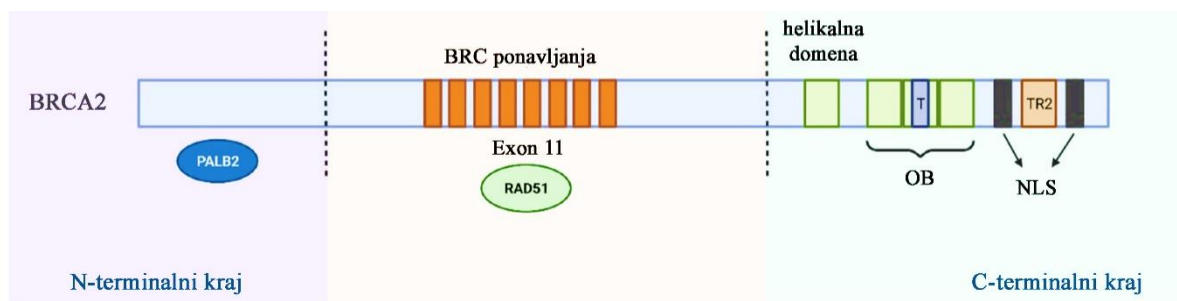


**Slika 2. Shematski prikaz funkcionalnih domena proteina BRCA1.** N-terminalna regija BRCA1 sadrži prstenastu domenu RING koja se povezuje s proteinom BARD1. Središnja regija proteina sadrži dva nuklearna lokalizacijska signala (NLS), a C-terminalna regija BRCA1 sadrži zavojnicu koja se povezuje s PALB2 i dvije domene BRCT koje posreduju u interakciji s različitim proteinima (slika je preuzeta i prilagođena iz Gonçalves i sur. (2022)).

BRCA1 se eksprimira u većini vrsta stanica i tkiva te je uključen u niz staničnih regulacijskih puteva (Hawsawi i sur. 2019). Njegove uloge su različite u različitim staničnim odjeljcima. Tako npr. tijekom S-faze staničnog ciklusa, fosforilirani BRCA1 se translocira u jezgru gdje sudjeluje u procesima popravka oštećene DNA, replikacije DNA, transaktivacije gena, ali i inaktivaciji kromosoma X. S druge strane, u citoplazmi, BRCA1 regulira mitotičku staničnu diobu, preuređenje citoskeleta, apoptozu i popravak mitohondrijskog genoma (Paul i Paul 2014). Na razini stanične regulacije, BRCA1 se pojavljuje kao inhibitor ciklin-ovisne kinaze p21, koja potiskuje rast stanice u G1/S kontrolnoj točki (Hawsawi i sur. 2019). Na osnovu toga, predloženo je i da BRCA1 ima regulacijsku ulogu u prijelazu G1/S (Petrovic i sur. 2017).

### 1.2.2. FUNKCIONALNE DOMENE I ULOGE PROTEINA BRCA2

Wooster i sur. (1994) identificirali su gen *BRCA2* 1994. godine na kromosomu 13q12-13. Ovaj gen kodira za protein koji se sastoji od 3418 aminokiselina, što ga čini gotovo dvostruko dužim od proteina *BRCA1* (Jasin 2002; Yoshida i Miki 2004). Osim toga, sastavljen je od 27 egzona među kojima je najveći egzon 11 koji sadrži osam ponavljajućih sekvenci BRC (Andreassen i sur. 2021). N-kraj *BRCA2* na aminokiselinama 21 – 39 veže *PALB2* (engl. *partner-and-localizer-of BRCA2*) koji djeluje kao skela za formiranje proteinskog kompleksa, ali i olakšava proces HR (Roy i sur. 2012). Struktura C-terminalne domene *BRCA2* ima svojstvo vezanja i jednolančane i dvolančane DNA (**Slika 3**) (Roy i sur. 2012; Andreassen i sur. 2021). Upravo u toj domeni uočen je velik broj tumorskih mutacija (Paul i Paul 2014).



**Slika 3. Shematski prikaz funkcionalnih domena proteina *BRCA2*.** Na N-terminalni kraj veže se *PALB2* na aminokiselinama 21 – 39, a u središnjoj regiji sadrži 8 ponavljanja BRC odgovornih za njegovu povezanost s proteinom *RAD51*. U C-terminalnoj regiji nalazi se DNA-vezujuća domena koja sadrži helikalnu domenu, tri regije za vezanje oligonukleotida (OB) i domenu „tower“ (T), što može olakšati vezanje *BRCA2* i na jednolančanu i na dvolančanu DNA. Osim toga, karboksilni kraj sadrži i domene NLS te domenu TR2 (slika je preuzeta i prilagođena iz Gonçalves i sur. (2022)).

*BRCA2* se također pojavljuje u većini vrsta stanica i tkiva u cijelom tijelu (Hawsawi i sur. 2019). Iako postoji određena sličnost između egzonskih struktura *BRCA1* i *BRCA2*, ovi geni nemaju puno očitih poveznica, izuzev tumor-supresorske uloge zajedničkom putu zaštite genoma. Poput *BRCA1*, *BRCA2* ima važnu koregulacijsku ulogu u transkripciji (Paul i Paul 2014). Osim toga, poznato je da oba proteina svojstveno sudjeluju u homolognoj rekombinaciji (HR), glavnom procesu popravka DNA. HR koristi neoštećenu sestrinsku kromatidu za popravak dvolančanih lomova DNA (engl. *double-strand breaks*, DSB) pretežno povezanih s replikacijom (Roy i sur. 2012). U tom pogledu, *BRCA2* može djelovati dvojako: aktivirajući ili inhibirajući taj proces. Samo jedan nepopravljeni DSB može rezultirati staničnom smrću. Stoga ne iznenađuje da se upravo DSB smatraju najcitotoksičnijim lezijama DNA (Fradet-Turcotte i sur. 2016). Gubitak funkcije *BRCA2* koja dovodi do izostanka popravka na kromosomskim

DSB, posljedično dovodi do nastanka različitih vrsta raka, poput raka jajnika i dojke (Petrovic i sur. 2017). Upravo zbog jedinstvene funkcije u zaštiti cjelovitosti DNA, odnosno telomera, od specifičnih sekundarnih struktura, ovaj gen naziva se i čuvarom genomske stabilnosti osobito nakon replikacijskog stresa (Fradet-Turcotte i sur. 2016).

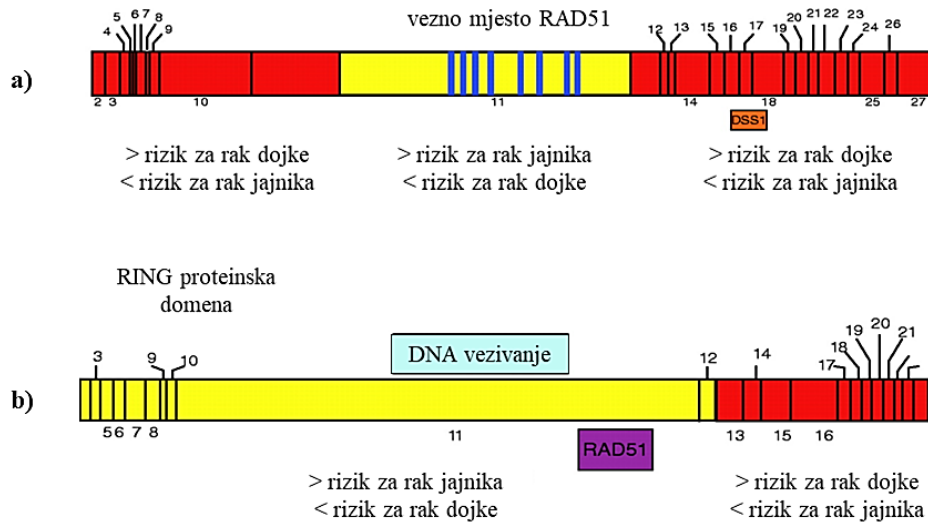
Iako proteini BRCA1 i BRCA2 djeluju u posve različitim fazama u odgovoru na oštećenje DNA (engl. *DNA damage response*, DDR) kao i u popravku DNA, čini se da je kritična komponenta na tom putu popravka DSB-a upravo BRCA2. Homologna i nehomologna rekombinacija (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ) u proliferirajućim stanicama glavni su mehanizmi za zaštitu cjelovitosti genoma. Drugi putevi popravka DSB-a skloni su pogreškama i stvaraju delecije i translokacije kromosoma (Rigakos i Razis 2012; Roy i sur. 2012; Fradet-Turcotte i sur. 2016). U kontekstu HR, za popravak u proteinskim domenama BRCA1/2 zadužen je protein RAD51 s kojim ove molekule stupaju u interakciju (Futaki i Liu 2001; Tutt i sur. 2003). Važno je naglasiti kako približno 70 % kodiranog proteina BRCA2 još uvijek nije ispitano zbog čega nema ni definiranu funkciju u odgovoru na oštećenje stanične DNA. Čak ni specifična/e uloga/e mnogih poznatih domena u BRCA2 nisu dobro karakterizirane, uglavnom zato što je stabilna ekspresija proteina BRCA2 u stanicama u eksperimentalne svrhe izazovna (Andreassen i sur. 2021).

### **1.2.3. NEFUNKCIONALNI GENI *BRCA1* I *BRCA2* I RIZIK OD RAKA**

Mutacije u genima *BRCA1* i *BRCA2* stvaraju povećani rizik za razvoj raka dojke i jajnika, na osobit način nasljednog oblika, ali i mnogih drugih vrsta raka (Lakhani i sur. 2004). Osim nasljednog oblika, veliki postotak sporadičnih zloćudnih bolesti pa tako i sporadični rak jajnika, povezani su s poremećenom ekspresijom gena *BRCA1/2*, što ukazuje na njihovu uključenost u razvoju tumorigeneze kod sporadičnog raka jajnika (Chan i sur. 2002). Posljedično, u stanicama u kojima su geni *BRCA1* ili *BRCA2* nefunkcionalni, što je često potaknuto mutacijama koje ometaju popravak DNA normalnog gena ili kontrolu HR, dolazi do akumuliranja kromosomskih abnormalnosti poput kromosomskih lomova, aneuploidije i pojačanja centrosoma. Takva kromosomska nestabilnost često je patogena osnova za nastanak zloćudne bolesti (Welsh i King 2001; Jelovac i Armstrong 2011). Kao i kod većine drugih tumorskih supresora, kako bi se stvorio fenotip malignosti oba alela ovih gena moraju biti prekinuta ili izgubljena (Kohn i Ivy 2017).

Kod osoba koje nose mutaciju gena *BRCA1* rizik od raka jajnika veći je od 40 %, dok je kod nositeljica mutacije u *BRCA2* znatno niži (**Slika 4**) (Welsh i King 2001; Lakhani i sur.

2004). Osim toga, prosječna dob početka razvoja raka jajnika znatno je ranija kod osoba koje imaju *BRCA1* mutaciju u genu (Jelovac i Armstrong 2011). Gotovo 80 % nositeljica nasljedne mutacije *BRCA1* ima dijagnosticiranu bolest prije menopauze, u odnosu na nositeljice mutacije *BRCA2* kao i osobe sa sporadičnim oblikom kod kojih se bolest uglavnom dijagnosticira nakon šezdesete godine (Paul i Paul 2014).



**Slika 4. Mjesta mutacija u genima *BRCA2* (a) ili *BRCA1* (b) koji utječu na razvoj raka dojke ili jajnika.** Crvenom bojom prikazano je područje čije mutacije nose povećani rizik od raka dojke, dok je žutom bojom prikazano područje čije mutacije nose povećani rizik od razvoja raka jajnika (slika je preuzeta i prilagođena iz Sowter i Ashworth (2005)).

Kada govorimo o sporadičnom raku jajnika, alel *BRCA1* izgubilo je 50 – 70 %, a alel *BRCA2* 30 – 50 % pacijentica. Premda su somatske točkaste mutacije u genima *BRCA1/2* gotovo potpuno odsutne, ovakvo opažanje upućuje na to kako bi sporadična tumorigeneza jajnika i dojke mogla biti povezana sa somatskim gubitkom gena *BRCA1/2* (Welch i King 2001). Osim toga, gubitak glavnih funkcija proteinskih produkata *BRCA1* i *BRCA2* potvrđen je u većini sporadičnih tumora jajnika i dojke (Al Bakir i Gabra 2014). Inaktivacija oba alela u stanici koja je sposobna izbjeći kontrolne točke staničnog ciklusa podloga je za tumorigenezu (Jelovac i Armstrong 2011). Prije takve inaktivacije može se dogoditi i inaktivacija ključnih gena u kontrolnim točkama staničnog ciklusa (Welch i King 2001). Takav jedan defekt u popravku dvolančanih lomova homolognom rekombinacijom, ali u odsutnosti nasljednih mutacija u genima *BRCA1/2*, poznat je kao fenotip *BRCAness* (Rigakos i Razis 2012; Lord i Ashworth 2016). Broj istraživanja koji potvrđuje da u sporadičnim tumorima, unatoč odsutnosti nasljednih mutacija u genima *BRCA1/2*, postoje slična patološka i klinička obilježja kao i kod nasljednih oblika, sve je veći.

### 1.3. NEKODIRAJUĆE MOLEKULE RNA

Nekodirajuće RNA (engl. *non-coding RNA*, ncRNA) kao područje znanstvenog interesa aktualne su već oko 60 godina (Palazzo i Lee 2015). To je veliki segment transkriptoma koji ne kodira za proteine. Iako im to naziv ne govori, ncRNA sadrže genetsku informaciju i posjeduju različite biološke uloge, pa tako sudjeluju i u patogenezi bolesti (Sun i Chen 2020). Premda se dugo vremena mislilo kako su proteini prijenosnici većine genetskih informacija, sve veći broj studija pokazuje kako je veliki dio genoma kod sisavaca i drugih složenijih organizama prepisan upravo u ncRNA. Mnoge od njih se naknadno alternativno prekrajaju ili prerađuju u manje produkte (Mattick i Makunin 2006). Kada govorimo o konformaciji i duljini, ncRNA su heterogena skupina molekula (Sun i Chen 2020) koja se može podijeliti u tri temeljne kategorije (Esteller 2011): (1) male ncRNA koje uglavnom sadrže između 19 i 30 nukleotida, (2) srednje velike ncRNA koje sadrže manje od 200 nukleotida te (3) dugi ncRNA transkripti s više od 200 nukleotida.

Sve ove molekule RNA (uključujući i one kodirane u intronima) vjerojatno posjeduju skriveni sloj unutarnjih signala čija je uloga kontroliranje različitih razina genske ekspresije u razvojnem i fiziološkom pogledu. Te uloge uključuju npr. transkripciju i prekrajanje RNA, modifikaciju histona, translaciju RNA i brojne druge (Mattick i Makunin 2006). Stoga, disregulacija molekula ncRNA, a na osobit način molekula mikroRNA, može biti podloga za tumorigenezu, ali i za neurološke, kardiovaskularne, autoimune i brojne druge poremećaje i različite razvojne bolesti (Esteller 2011).

#### 1.3.1. MOLEKULE mikroRNA

MikroRNA (engl. *microRNA*, miRNA) su kratke, endogene, nekodirajuće i jednolančane molekule RNA veličine 19-25 nukleotida. Ove molekule reguliraju posttranskripcijsko utišavanje ciljnih gena (Bentwich i sur. 2005; Lu i Rothenberg 2018) vezivanjem na njihovu 3'-netranslatiranu regiju (engl. *untranslated region*, UTR) čime se olakšava degradacija mRNA tih gena ili blokira njihova translacija (He i Hannon 2004; Fang i Rajewsky 2011). Suprotno tomu, noviji dokazi pokazuju kako miRNA ne reguliraju ekspresiju samo na način da ju snižavaju, nego omogućuju i njenu stimulaciju kao odgovor na specifične stanične uvjete (Vasudevan 2012). Osim toga, iako se vezivanje na 3'-UTR događa najčešće, dokazana su i miRNA-vezna mjesta na drugim regijama mRNA, poput kodirajućih regija i 5'-UTR, ali i na promotorskim regijama DNA (Xu i sur. 2014).

Prva miRNA otkrivena je u obliku *Caenorhabditis elegans* prije više od 30 godina kada je identificirana kao razvojni regulator lin-4 (Horvitz i Sulston 1980), za kojeg se naknadno pokazalo da ne kodira za protein nego za regulatornu RNA od 22 nukleotida (Lee i sur. 1993; Wightman i sur. 1993). Ovo otkriće stvorilo je novu eru u molekularnoj biologiji, zahvaljujući kojoj je do danas otkriveno preko 2000 miRNA kod ljudi (Hammond 2015). Preciznije, studija koju su proveli Kozomara i sur. (2019), a koja je uključivala 1493 skupa podataka dubokog sekvenciranja malih RNA, procijenila je da oko 1917 sekvenci prekursora miRNA transkribira ljudski genom, tvoreći 2654 zrele sekvence miRNA.

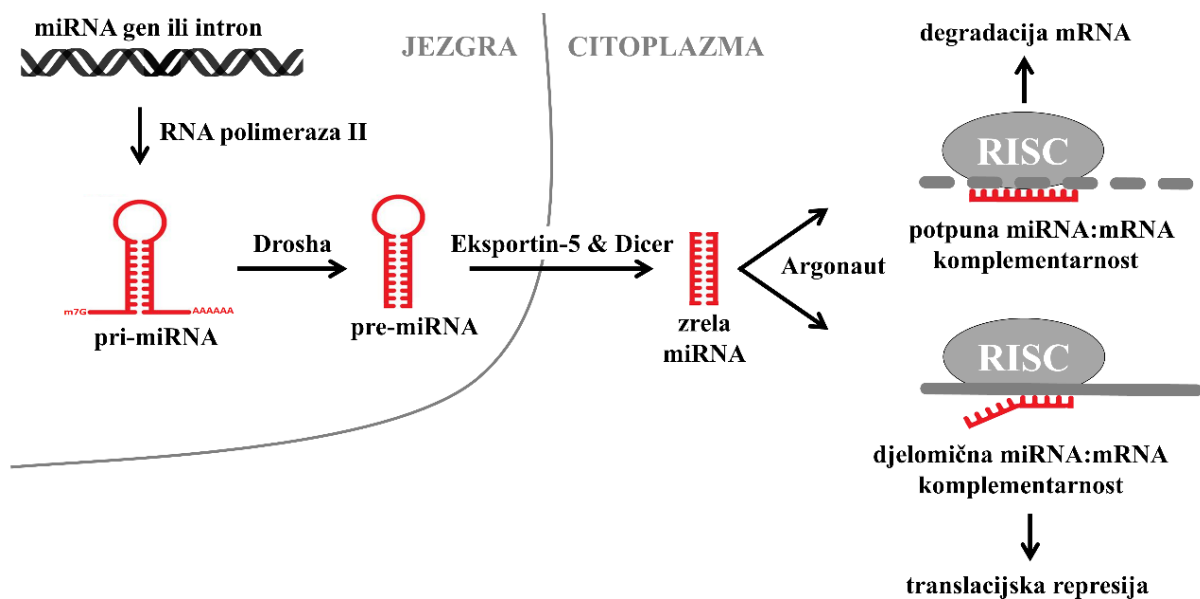
S obzirom na to da jedna miRNA može ciljati na stotine glasničkih RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA), kao i utjecati na ekspresiju mnogih gena često uključenih u jedan funkcionalni interakcijski put (Lu i Rothenberg 2018), vjeruje se kako miRNA molekule zajedno reguliraju više od dvije trećine gena u ljudskom genomu (Hammond 2015). Geni za miRNA smješteni su po cijelom genomu (Rodriguez i sur. 2004) i raspršeni su na svim ljudskim kromosomima izuzev kromosoma Y (Orang i sur. 2014), a mnogima je jedini transkripcijski proizvod molekula miRNA. Osim toga, ponekad je miRNA smještena i unutar UTR ili introna gena koji kodira za protein (Hammond 2015).

Interakcija miRNA i njenih ciljnih gena je dinamična te ovisi o mnogim čimbenicima poput substaničnog položaja miRNA, količine miRNA i njenih ciljnih mRNA, ali i o afinitetu interakcije miRNA-mRNA. Važno je spomenuti kako se molekule miRNA mogu izlučiti i u izvanstaničnu tekućinu gdje djeluju kao signalne molekule u međustaničnoj komunikaciji. U novije vrijeme dokazano je i da su to potencijalni biljezi za razne bolesti, te da se mogu transportirati u ciljne stanice putem vezikula (npr. egzosomima) ili vezivanjem na proteine, uključujući Argonaute (O'Brien i sur. 2018).

Sve molekule miRNA moraju prijeći biogenetski put kojim se miRNA prepisuje se iz sekvenci DNA u primarne miRNA (pri-miRNA), zatim prevodi u prekursor miRNA (pre-miRNA), te na kraju sazrijeva u zrelu, aktivnu miRNA koja se sastoji od približno 22 nukleotida. Ovakav biogenetski put naziva se kanonski i predstavlja dominantni put odgovoran za sazrijevanje većine obitelji miRNA (**Slika 5**) (Hammond 2015; Jiang i Yan 2016).

Transkripcija miRNA iz gena ili iz introna odvija se uz pomoć enzima RNA-polimeraze II pri čemu nastaje primarni miRNA transkript (pri-miRNA). Pri-miRNA je dalje podvrgnuta dvjema endonukleaznim obradama. Prva obrada odvija se u jezgri za vrijeme ili neposredno nakon transkripcije pri-miRNA pomoću enzima Drosha, iz obitelji RNA polimeraza III, koja

cijepa pri-miRNA, što rezultira stvaranjem prekursorske miRNA (pre-miRNA) koja ima strukturu ukosnice i dužinu oko 60 nukleotida. Pre-miRNA se pomoću Eksportina-5 oslobađa iz jezgre u citoplazmu gdje se odvija drugi korak obrade. U citoplazmi, endonukleaza Dicer se prvenstveno veže na dva nukleotida koji strše iz 3'-kraja pre-miRNA i cijepa područje terminalne petlje pre-miRNA oslobađajući zreli dupleks miRNA koji se sastoji od približno 21 nukleotida. Dalje se dupleks zrele miRNA spaja s proteinima Argonaut (AGO) formirajući tako tzv. RNA-inducirani kompleks za utišavanje (eng. *RNA-induced silencing complex*, RISC), nakon čega se odmotava dvolančana molekula miRNA te nastaje zreli lanac miRNA i njegov komplementarni lanac miRNA\*. U većini slučajeva, komplementarni lanac degradira u citoplazmi, međutim, neki lanci miRNA\* nastavljaju obavljati svoje funkcionalne uloge u stanicama. Što se tiče zrelog lanca miRNA, on se veže na 3'-netranslatiranu regiju (3'-UTR) ciljane mRNA, kako bi se degradirala odgovarajuća ciljna mRNA (potpuno uparivanje) ili inhibirala normalna translacija u odgovarajući protein (djelomično uparivanje), a sve u svrhu postizanja negativne regulacije ciljnog gena (Hammond 2015; Jiang i Yan 2016; O'Brien i sur. 2018; Chen i sur. 2019).



**Slika 5. Kanonski biogenetski put molekule miRNA kod sisavaca.** U jezgri se odvija prepisivanje i procesiranje primarnog transkripta mikroRNA (pri-miRNA) u prekursorsku miRNA (pre-miRNA), koja se transportira u citoplazmu gdje sazrijeva u zreli dupleks miRNA, a koji se zatim ugrađuje u RNA-inducirani kompleks za utišavanje (RISC). Kompleks RISC dalje posreduje u utišavanju ekspresije gena cijepanjem i degradacijom mRNA ili potiskivanjem translacije što ovisi o komplementarnosti između miRNA i ciljanog transkripta mRNA. Rezultat toga je ili translacijska represija ili degradacija ciljane mRNA, što ovisi o komplementarnosti miRNA i ciljane sekvence mRNA koja može biti djelomična ili potpuna (slika je preuzeta i prilagođena iz Levanat i sur. (2016)).

Dakle, genska ekspresija na posttranskripcijskoj razini koju negativno reguliraju molekule miRNA odvija se sparivanjem baza na djelomično komplementarnim mjestima, najčešće u 3'-UTR mRNA gena (Gu i sur. 2009). Takvo vezivanje obično dovodi do translacijske represije ili egz nukleolitičke degradacije mRNA, premda se endonukleolitički mogu odcijepiti visoko komplementarni krajevi.

Eksperimentalno je dokazano da jedna miRNA može potisnuti stotine mRNA. S obzirom na tako širok utjecaj miRNA na ekspresiju gena, jasno je i kako ove male molekule imaju jedinstvenu ulogu u različitim fenotipovima bolesti poput raka (Di Leva i sur. 2014). Stoga se može zaključiti kako je identifikacija ciljnih mjesta miRNA (engl. *targets*) ključna je za razumijevanje njihove funkcije, budući da svoju funkciju ostvaruju reguliranjem ciljnih mRNA.

### 1.3.1.1. Uloga molekula miRNA u raku jajnika

Kao što je već spomenuto, procjenjuje se da miRNA molekule reguliraju više od dvije trećine gena u ljudskom genomu, te da su uključene u regulaciju gotovo svih staničnih procesa. Potvrđeno je kako disregulacija ovih malih, nekodirajućih molekula igra važnu ulogu u razvoju različitih ljudskih bolesti (Esteller 2011), uključujući i rak jajnika (Alshamrani 2020). Brojne miRNA u uznapredovanim stadijima i u HGSOE su izrazito smanjene, što sugerira da su miRNA uključene u malignu transformaciju i progresiju tumora (Kinose i sur. 2014), osobito jer su abnormalnosti u broju kopija DNA pronađene i u lokusima s nekodirajućim miRNA (Bast i sur. 2009). Uloge miRNA u biološkim procesima povezanih s rakom uključuju tumorigenezu, staničnu proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu, angiogenezu, invaziju i metastaze, otpornost tumora, epitelno-mezenhimalni prijelaz, kao i samu prognozu raka (Zhao i sur. 2022). Svakako, važno je naglasiti kako sve ove uloge ne obavlja ista molekula i da različite miRNA imaju različite uloge u raku jajnika, a nedavno je identificirana i izmijenjena ekspresija miRNA u tumorigenezi jajnika koja dovodi do ovoga raka (Deb i sur. 2018). Prema navedenom, miRNA uključene u tumorigenezu mogu se ponašati kao tumorski supresori<sup>1</sup> ili onkogeni<sup>2</sup>, ovisno o

---

<sup>1</sup> *Tumorski supresori* su geni koji inhibiraju tumorigenezu, ali njihov potpuni gubitak, mutacija ili gubitak određene funkcije omogućuje aktiviranom onkogenu da uzrokuje rak. Njegov produkt igra negativnu regulatornu ulogu jer može npr. poboljšati diferencijaciju stanica, inhibirati proliferaciju stanica i/ili inhibirati migraciju stanica. Razine ekspresije određenih miRNA u tumorskim tkivima značajno su smanjene, čime pokazuju karakteristike tumorskih supresora (Chen i sur. 2019).

<sup>2</sup> *Protoonkogeni* su geni neophodni za održavanje normalnih životnih aktivnosti jer su uključeni u proliferaciju stanica. Produkt njihove ekspresije ima regulatornu ulogu u reprodukciji, razvoju, normalnom rastu i diferencijaciji stanica. Nespecifične strukture ili nekontrolirana ekspresija protoonkogeni mogu dovesti do abnormalnog ponašanja stanica i nastanka tumora. Razine ekspresije pojedinih miRNA u tumorskim tkivima značajno su povećane, čime pokazuju karakteristike protoonkogeni (Chen i sur. 2019).



njihovoj funkciji i ekspresiji (Calin i Croce 2006; Esquela-Kerscher i Slack 2006). Na primjer, u raku jajnika, kod nekih molekula miRNA ekspresija je inhibirana te se smatraju tumorskim supresorima koji negativno reguliraju onkogene, dok je kod drugih miRNA ekspresija pretjerano izražena te se smatraju molekulama koje promiču nastanak raka jer potiskuju tumorske supresore (Chen i sur. 2019; Alshamrani 2020). Također, važno je istaknuti kako mnoge komponente u procesu biogeneze miRNA u tumorima mogu biti ili pogrešno eksprimirane ili mutirane, što pridonosi disregulaciji ekspresije miRNA (Di Leva i sur. 2014). Tako je npr. poremećena ekspresija enzima Dicer i Drosha izrazito povezana s uznapredovanim stadijem raka jajnika te predstavlja i faktor otpornosti na kemoterapiju što naposljetku dovodi do loših kliničkih ishoda (Kinose i sur. 2014).

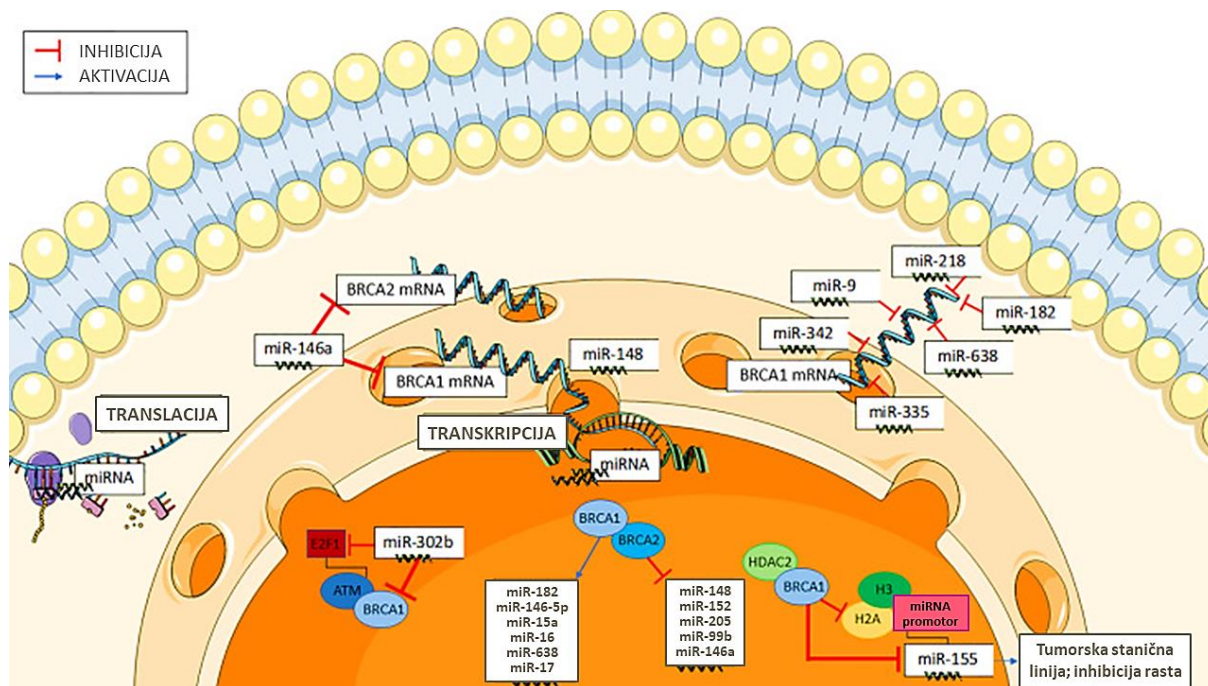
Calin i sur. (2002) su 2002. godine prvi put opisali disregulaciju miRNA na primjeru kronične limfocitne leukemije. Identificirali su dvije molekule miRNA, miR-15 i miR-16, smještene na kromosomu 13q14, čija je regija često izbrisana ili smanjeno eksprimirana u većini slučajeva ovoga raka (Calin i Croce 2006). Posljedično tomu, povećava se ekspresija gena *BCL2* odgovornog za regulaciju apoptoze. Smanjena ekspresija ovih molekula miRNA u raku u odnosu na normalna tkiva kasnije je opisana i u drugim vrstama raka, poput raka prostate, gastrointestinalnom stromalnom tumoru, malignom limfomu, multiplom mijelomu i raku jajnika (Di Leva i sur. 2014; Santulli 2015). Međutim, ekspresija miRNA prisutna u tumorigenezi nije uvijek jednaka nego varira u ovisnosti o stupnju bolesti, odnosno njenoj progresiji, ali i o histološkom tipu raka (Langhe 2015).

Kada govorimo o raku jajnika, obitelj molekula miRNA miR-200 koju sačinjava pet miRNA je najproučavanija i pokazuje izrazito izraženu prekomjernu ekspresiju (Kinose i sur. 2014; Alshamrani 2020). Tako su npr. miR-200a i miR-200b prekomjerno eksprimirane u seroznom raku jajnika u odnosu na zdrava tkiva, dok su u mucinoznom podtipu smanjene (Koutsaki i sur. 2017; Kumar i sur. 2020).

### 1.3.1.2. Povezanost molekule miRNA i gena *BRCA1/2*

U Poglavlju 1.3.1.1 opisano je postojanje karakterističnih promjena u ekspresiji miRNA, osobito kod seroznog raka jajnika visokog stupnja malignosti. Kada se veže na 3'-UTR ciljnih gena, miRNA može inhibirati translaciju transkripta mRNA ili ga degradirati (Strumidlo i sur. 2017). Ovaj mehanizam od izrazite je važnosti u temeljnim procesima rasta i diferencijacije, međutim, takve promjene nastale u miRNA i njihovim ciljnim mRNA mogu biti okidač za proces tumorigeneze (Lee i sur. 2009).

Iako je teško utvrditi uzročno-posljedične veze miRNA s drugim čimbenicima, nekoliko studija pokazalo je kako miRNA mogu imati veliku ulogu u mijenjanju ekspresije brojnih gena kod raka jajnika, među kojima se posebno ističu geni *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CA125*, *HE4*, ali i *ARHI* (Zhang i sur. 2015). Kada govorimo o genima *BRCA1/2*, miRNA na njihovu ekspresiju mogu utjecati u fenomenu sličnom *BRCAness*-u preko delecija i mutacija (Dhawan i sur. 2018). Tako na primjer, molekula miR-302b negativno regulira regulator prijelaza G1/S E2F1, čime se smanjuje i glavni stanični senzor oštećenja DNA ATM kojeg aktivira i fosforilizira gen *BRCA1*. Posljedično tomu, neizravno se oštećuje i funkcija gena *BRCA1*. Molekule miR-9, miR-342, miR-218, miR-182, miR-335 i miR-638 djeluju slično te smanjuju ekspresiju *BRCA1* na način da se vežu na 3'-UTR njegove mRNA čime se povećava osjetljivost stanica raka na oštećenje DNA. Molekula miR-146a također inhibira ekspresiju mRNA *BRCA1/2* vezivanjem na njihovu 3'-UTR. Ponekad se događa i obrnuta situacija: izmijenjena razina ekspresije mRNA može utjecati na ekspresiju gena koji kodira za miRNA. Recimo, geni *BRCA1/2* neke molekule miRNA reguliraju pozitivno (miR-146a, miR-146-5p, miR-182, miR-15a, miR-16, miR-17 i miR-638), a neke negativno (miR-155, miR-152, miR-148, miR-205, miR-146a i miR-99b) (Tommasi i sur. 2021). Osim toga, gen *BRCA1* je uključen i u epigenetsku kontrolu proupalne i onkogene miRNA, miR-155, koja cilja na promotor miR-155, te tako potiskuje njegovu ekspresiju putem histon deacetilaze 2 (HDAC2) koji deacetilira histone H2A i H3 na promotoru miR-155 (**Slika 6**) (Chang i sur. 2011).



**Slika 6. Uvidi u različite interakcije između određenih miRNA i gena BRCA1/2 (slika je preuzeta i prilagođena iz Tommasi i sur. 2021).**

Chang i Sharan (2012) opisali su zanimljiv genetički događaj. Kada se u specifičnu regiju sjemena zrele miRNA uvede izmijenjena sekvenca preko polimorfizma jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) ili određene genetičke varijacije u UTR gena, miRNA posljedično prepoznaje nove 3'-UTR nove ciljne mRNA, koje bez ovog događaja ne bi bile meta miRNA. Preciznije, bioinformatičkom analizom UTR gena *BRCA1*, autori su identificirali nekoliko SNP-ova koji potencijalno generiraju vezna mjesta miRNA, što posljedično može povećati rizik od nastanka raka.

Predviđa se da će gotovo 100 miRNA ciljati na mRNA transkribiranu s genima *BRCA1/2* (Petrovic i sur. 2017). S obzirom na tu činjenicu, promjena u ekspresijama tih miRNA mogla bi utjecati na razinu višestrukih ciljnih proteina ili obratno. Posljedično, dolazi do poremećene signalizacije različitih signalnih puteva u koje su uključene miRNA i proteinski produkti esencijalnih gena, a samim time i ometanja mnogih staničnih procesa. Razumijevanje interakcije signalnih puteva miRNA-mRNA uvelike će doprinijeti u prognostici, dijagnostici, a time i terapijskom pristupu u liječenju karcinoma povezanih s genima *BRCA1/2* (Chang i Sharan 2012).

### 1.3.1.3. Korištenje miRNA u dijagnostici

Jedan od glavnih razloga zbog kojih je stopa smrtnosti od raka jajnika i dalje visoka je nepostojanje učinkovite i osjetljive metode kojom bi se ovaj rak mogao otkriti u ranim fazama (Buys i sur. 2011). Potraga za pouzdanijim i karakterističnijim dijagnostičkim biljezima za rak jajnika, predmet je s kojim se znanstvena zajednica bavi već godinama (Hayes i sur. 2014).

Trenutačni dijagnostički pristupi koji uključuju pregled zdjelice, transvaginalni ultrazvučni pregled, kao i neke novije tehnike snimanja poput kompjutorizirane tomografije (CT) i magnetne rezonancije (engl. *magnetic resonance imaging*, MRI), kao i korištenje jedinog potvrđenog dijagnostičkog serumskog biljega CA125 (engl. *cancer antigen 125*), do sada se nisu pokazali dovoljno uspješnima u otkrivanju ove bolesti u ranim fazama (Stewart i sur. 2019).

Nedavno su se miRNA pojavile kao potencijalni novi biljezi u kliničkoj dijagnozi, prognozi i terapiji raka jajnika, osobito HGSOE-a (Deb i sur. 2018; Kumar i sur. 2020). Godine 2008. znanstvenici su otkrili cirkulirajuće miRNA u plazmi i serumu, gdje su miRNA u plazmi izuzetno stabilne i zaštićene od aktivnosti endogene RNaze (Mitchell i sur. 2008). Nedugo nakon toga dokazano je i kako se, pored tkiva i stanica u kojima su smještene u najvećem broju, miRNA mogu izolirati i iz drugih tjelesnih tekućina poput krvi, sline, urina, majčinog mlijeka, itd. (Weber i sur. 2010; Cortez i sur. 2011). Osim toga, miRNA u tjelesnim tekućinama pokazale su se stabilnima i neovisnima o unutarnjim i vanjskim čimbenicima, a različiti obrasci njihove ekspresije prisutni su u različitim patofiziološkim uvjetima (Etheridge i sur. 2011). Stoga je opravdano vjerovanje kako će miRNA uskoro biti potvrđeno dijagnostičko, terapijsko i prognostičko oružje protiv raka jajnika, ali i drugih vrsta raka, kao i da će pristupi u tom pogledu uskoro biti specifičniji prema pojedincu (Kinose i sur. 2014) budući da je specifična ekspresija miRNA povezana i s određenim histološkim tipom raka jajnika (Kumar i sur. 2020).

## 2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

---

U Laboratoriju za nasljedni rak (LNR) na Institutu Ruđer Bošković pomoću metode mikročipova provedeno je profiliranje molekula mikroRNA na malom broju uzoraka seroznog raka jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i zdravih jajovoda, koji predstavljaju jedan od glavnih ishodišnih organa za HGSOC. Dobiveni rezultati pokazali su kako je ekspresija molekula mikroRNA hsa-miR-16-5p i hsa-miR-107 statistički značajno pojačana u uzorcima HGSOC u odnosu na zdrave jajovode. Osim toga, analizom baze podataka TarBase.v8 eksperimentalno potvrđenih interakcija miRNA:mRNA (<http://www.microrna.gr/tarbase>; Karagkouni i sur. 2018) utvrđeno je da su geni *BRCA1* i *BRCA2* ciljni geni obje miRNA.

**Hipoteza** ovog rada je da bi, s obzirom na to da su obje istraživane miRNA pojačano ekspimirane u uzorcima HGSOC, ekspresija njihovih ciljnih gena *BRCA1* i *BRCA2* mogla biti regulirana pomoću te dvije miRNA u ovom tipu raka. Kako bi se provjerila ova hipoteza, potrebno je najprije potvrditi rezultate koje su istraživači LNR dobili profiliranjem pomoću mikročipova koristeći veći broj uzoraka i metodu qRT-PCR.

**Glavni cilj** ovog istraživanja je na proširenom setu uzoraka tkiva HGSOC i zdravih jajovoda odrediti ekspresiju miR-16-5p i miR-107 te njihovih ciljnih gena *BRCA1* i *BRCA2*.

**Dodatni cilj** je na staničnoj liniji karcinoma jajnika OVCAR-8, koja predstavlja jedan od staničnih modela za HGSOC, istražiti utjecaj tretmana inhibitorima i mimicima miR-16-5p i miR-107 na ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2*, te morfologiju stanica OVCAR-8 prije i nakon tretmana.

Ovo istraživanje moglo bi razjasniti epigenetsku regulaciju ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* pomoću malih nekodirajućih molekula RNA (mikroRNA) u seroznom raku jajnika visokog stupnja malignosti.

## 3. MATERIJALI I METODE

---

### 3.1. MATERIJALI

Za izradu ovog diplomskog rada korišteni su svježi uzorci tkiva seroznog raka jajnika visokog stupnja malignosti te uzorci zdravih jajovoda prikupljeni u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb u sklopu projekta HRZZ-a IP-2016-06-1268 (dozvola Etičkog povjerenstava KBC Zagreb Klasa: 8.1-17/24-2, Broj: 02/21 AG). Istraživanje je provedeno na 70 uzoraka HGSOE i 23 uzorka zdravih jajovoda.

Drugi dio istraživanja proveden je na komercijalno dostupnoj staničnoj liniji karcinoma jajnika čovjeka OVCAR-8 (RRID: CVCL\_1629), koja predstavlja stanični model seroznog raka jajnika visokog stupnja malignosti (dobivena od prof. dr. sc. Ljiljane Šerman s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu).

Ova stanična linija uzgaja se u Petrijevim zdjelicama kao adherentna kultura uz dodatak medija RPMI 1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*) s dodatkom 10 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS), 1 % natrijevog piruvata, 1 % L-glutamina, 1 % neesencijalne aminokiseline te 1 % penicilina streptomycina.

Stanična linija uzgajana je u kontroliranim uvjetima na temperaturi 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> u inkubatoru.

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. IZOLACIJA MOLEKULA RNA

##### 3.2.1.1. Izolacija molekula RNA iz tkiva

U zamrzivaču, na temperaturi od -80 °C, bili su pohranjeni uzorci tumorskog tkiva i zdravih jajovoda uzeti prilikom operativnog zahvata. Uzorci su se nalazili u jednokratnim krioeprevetama s dodatkom otopine za stabilizaciju molekula RNA, RNAlater (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, SAD). Krioeprevete s uzorcima sam izvadila iz zamrzivača i stavila na led. Neposredno prije samog postupka izolacije, etanolom sam dezinficirala podlogu i pribor koji ću koristiti. Izolaciju ukupne RNA izvodila sam pomoću univerzalnog reagensa za izolaciju ukupne RNA NukleoZOL (Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren, Njemačka).

Najprije sam pomoću sterilnih škarica odrezala približno 50 mg tkiva te ga stavila u Petrijevu zdjelicu koja se nalazila na ledu. Zatim sam dodala 500 µL reagensa NucleoZOL, a potom pomoću škarica tkivo usitnila na što sitnije komadiće. Dobivenu smjesu sam prebacila u plastičnu mikroeprevetetu, a zatim dodala i 200 µL vode očišćene od RNaza (engl. *water-free RNase*) te smjesu dobro protresla otprilike 15 sekundi.

Tako pripremljenu smjesu ostavila sam na inkubaciju 15 minuta na sobnoj temperaturi, a potom 15 minuta centrifugirala na temperaturi od 8 °C pri 12000 RCF (engl. *relative centrifugal force*, relativna centrifugalna sila) u mikrocentrifugi 5415 R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Po završetku centrifugiranja, u mikroeprevetama je vidljiva gornja vodena faza – supernatant u kojemu se nalazi RNA, te donja faza – talog, u kojemu se nalaze proteini i DNA. U čiste, prethodno označene mikroeprevete, prebacila sam 525 µL supernatanta, pazeći pri tomu da ne povučem talog. Zatim sam dodala 525 µL izopropanola te uzorke dobro promiješala, a potom ostavila na inkubaciju u trajanju od 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, uzorke sam centrifugirala 10 minuta pri 12000 RCF i temperaturi od 8 °C. U sljedećem koraku, iz mikroeprevete sam uklonila supernatant te na preostali talog dodala 500 µL 75 % etanola, a zatim ponovno centrifugirala 3 minute pri temperaturi od 8 °C i 8000 RCF. Supernatant sam uklonila te ponovila korak ispiranja u 500 µL 75 % etanola i centrifugiranja pri istim uvjetima. Nakon toga, uklonila sam supernatant te višak etanola tako što sam okrenula mikroeprevete na papir. Preostale kapljice sam izvukla pipetom. Potom sam talog otopila u 50 µL vode očišćene od RNaza i 3 minute vorteksirala sve uzorke pripremljene na opisani način.

Izoliranoj ukupnoj RNA sam izmjerila koncentraciju na spektrofotometru NanoPhotometer® N50/N60 (Implen, München, Njemačka). Neposredno prije mjerenja, uređaj sam kalibrirala tako što sam stavila 1 µL vode pročišćene RNaza, a zatim i po 1 µL svakog pripremljenog uzorka pri tomu očitavajući čistoću i koncentraciju RNA. Između nanošenja uzoraka očistila sam mjesto na kojega sam nanosila uzorak. Kada sam očitala i zabilježila sve potrebne podatke, mikroeprevete s izoliranom RNA sam pospremila natrag u zamrzivač na -80 °C.

### **3.2.1.2. Izolacija molekula RNA iz stanica**

Po završetku inkubacije tretmana mimicima i inhibitorima miR-16-5p i miR-107 opisanima u Poglavlju 3.2.4.4., stanice sam pripremila za izolaciju RNA molekule. Najprije sam uklonila stari medij te svaki od bunarčića sa stanicama isprala s 1 mL PBS-a. Nakon toga, stanice sam tripsinizirala s 200 µL tripsina te ih ostavila kraće vrijeme kako bi se odvojile od

podloge. Zatim sam dodala 1 mL svježeg medija te uvlačenjem i izvlačenjem sadržaja iz pipete „razbila“ nakupine stanica. U međuvremenu sam pripremila i označila 6 mikroepreveta u koje sam, prema odgovarajućoj oznaci, prebacila stanice iz bunarčića, a potom ih centrifugirala 5 minuta pri 1200 RPM (engl. *revolutions per minute*, okretaji po minuti), na sobnoj temperaturi. Po završetku centrifuge uklonila sam supernatant, a u svrhu što boljeg pročišćavanja stanica ponovila sam ispiranje stanica PBS-om i centrifugiranje, te na kraju ponovno uklonila supernatant.

Na preostali talog stanica dodala sam 500  $\mu$ L reagensa NucleoZOL i 200  $\mu$ L vode očišćene od RNaza te smjesu dobro protresla 15 sekundi. Pripremljenu smjesu ostavila sam na inkubaciju na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta, a zatim 15 minuta centrifugirala na sobnoj temperaturi i 13000 RPM. Nakon centrifugiranja prebacila sam ~ 700  $\mu$ L supernatanta u čiste, prethodno označene mikroeprevete. Potom sam dodala 700  $\mu$ L izopropanola te uzorke dobro promiješala i ostavila 5 minuta na inkubaciju pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, uzorke sam centrifugirala 10 minuta pri 13000 RPM na sobnoj temperaturi i po završetku centrifugiranja iz mikroepreveta uklonila supernatant, a na preostali talog dodala 500  $\mu$ L 75 % etanola. Uzorke sam 3 minute centrifugirala na sobnoj temperaturi, pri 8000 RPM, a nakon toga ponovno uklonila supernatant i ponovila korak ispiranja u 500  $\mu$ L 75 % etanola i centrifugiranja. Supernatant, kao i zaostali višak etanola sam uklonila, a talog otopila u 20  $\mu$ L vode očišćene od RNaza. Sve uzorke sam 3 minute vorteksirala. Izoliranoj ukupnoj RNA sam izmjerila koncentraciju na spektrofotometru na isti način opisan u poglavlju izolacije RNA u tkivima.

Kada sam očitala i zabilježila sve potrebne podatke, mikroeprevete s izoliranom RNA sam pospremila u zamrzivač na -80 °C.

### **3.2.2. REVERZNA TRANSKRIPCIJA**

#### **3.2.2.1. Reakcija reverzne transkripcije za određivanje ekspresije mRNA**

Reverzna transkripcija (engl. *reverse transcription*, RT) je postupak kojim se izolirana molekula RNA prevodi u komplementarnu molekulu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) s RNA-ovisnom DNA polimerazom poznatijom kao reverzna transkriptaza.

Ovaj postupak izvodila sam pomoću komercijalnog seta za reverznu transkripciju High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) koji sadrži pufer RT, deksinukleotide (dNTP), enzim reverznu transkriptazu te nasumične heksanukleotidne početnice. Prije početka rada, radnu površinu i potrebni pribor



očistila sam etanolom, a sve sastavnice, izuzev enzima reverzne transkriptaze, otopila sam te kratko vorteksirala i centrifugirala (engl. *short spin*). Osim toga, pripremila sam i označila mikroeprove od 0,2 mL za uzorke, te od 0,5 mL za reakcijsku smjesu (tzv. *MasterMix*).

Kako bih mogla provesti postupak reverzne transkripcije, prema formuli  $\gamma = \frac{m(RNA)}{V(RNA)}$ , gdje  $\gamma$  predstavlja koncentraciju izolirane RNA, izračunala sam volumen RNA koji mi je potreban kako bi ukupna masa RNA bila 1000 ng. Nakon toga, izračunala sam i potrebni volumen vode oslobođene od RNaza prema ukupnom volumenu koji iznosi 33  $\mu$ L. Volumene sam, prema izračunu, dodala u odgovarajuću mikroeprovu.

Zatim sam pripremila i reakcijsku smjesu koji sadržava sve komponente komercijalnog seta prema podacima iz **Tablice 1**, te ju nakon toga raspipetirala u mikroeprove sa prethodno dodanom RNA i vodom. U svaku mikroeprovu dodala sam po 17  $\mu$ L volumena *MasterMix*-a, prema ukupnom volumenu od 50  $\mu$ L koji se trebao nalaziti u mikroeprovi.

**Tablica 1.** Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

KOMPONENTA	POČETNA KONCENTRACIJA	KONAČNA KONCENTRACIJA	VOLUMEN ( $\mu$ L) (za reakciju od 50 $\mu$ L)
RT pufer	10x	1x	5
dNTP	100 mM	5 mM	2
nasumične početnice	10x	1x	5
reverzna transkriptaza	50 U/ $\mu$ L	2,5 U/ $\mu$ L	2,5
+	voda pročišćena od RNaza		2,5

Uzorke sam kratko vorteksirala i centrifugirala, a zatim postavila u uređaj za PCR ABI 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD). Reakcija se odvijala prema programu navedenom u **Tablici 2**.

**Tablica 2.** Uvjeti u uređaju za reakciju reverzne transkripcije.

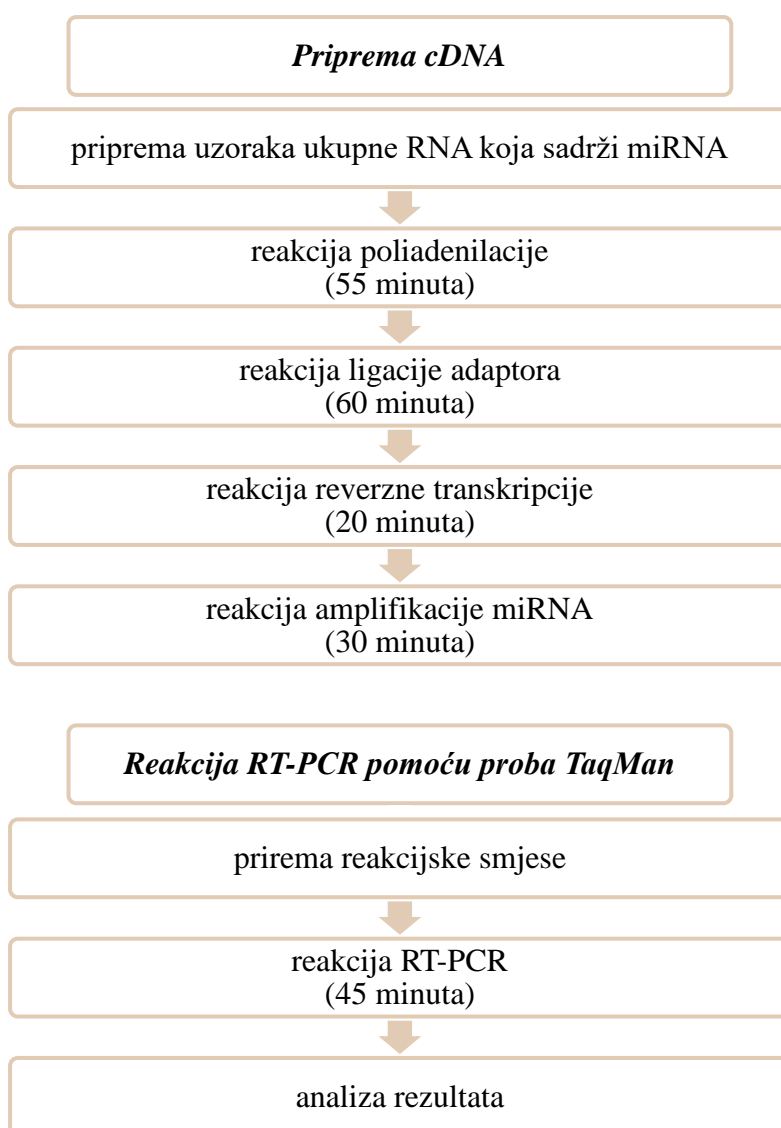
<b>Temperatura (°C)</b>	25	37	85	4
<b>Vrijeme (min)</b>	10	120	5	$\infty$

Dobivenu cDNA po završetku programa pospremila sam na -20 °C do daljnjeg korištenja.

### 3.2.2.2. Reakcija reverzne transkripcije za određivanje ekspresije miRNA

Reakciju reverzne transkripcije za određivanje ekspresije zrelih molekula miRNA iz ukupne RNA iz tkiva provela sam pomoću komercijalno dostupnog seta TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD), a ekspresiju zrelih molekula miRNA pomoću proba TaqMan.

Shema koju prikazuje **Slika 7** donosi osnovni pregled glavnih koraka u ovoj reakciji: pripreme cDNA predložaka kao prvog koraka, te izvođenje RT-PCR-a pomoću proba TaqMan kao drugog koraka.



**Slika 7. Shema glavnih koraka reakcije reverzne transkripcije i određivanja ekspresije pomoću proba TaqMan.**

Prije samog izvođenja reakcije reverzne transkripcije na ledu sam otopila uzorke izoliranih RNA te pripremila razrjeđenja tako da koncentracija radne otopine bude 5 ng/ $\mu$ L. Sve potrebne sastavnice za izvođenje reakcije također sam otopila, a zatim vorteksirala i kratko centrifugirala kako bi se uklonili mjehurići zraka.

Prvi korak u izvođenju reakcije je priprema kalupa cDNA, a sastoji se od nekoliko dijelova. Prvi je reakcija poliadenilacije. U mikroepruveti od 1,5 mL pripremila sam reakcijsku smjesu prema podacima iz **Tablice 3**.

**Tablica 3.** Sastav reakcijske smjese za reakciju poliadenilacije.

KOMPONENTA	VOLUMEN ( $\mu$ L) ZA 1 REAKCIJU
10x pufer Poly(A)	0,5
ATP	0,5
enzim Poly(A)	0,3
voda pročišćena od RNaza	1,7
<b>ukupni volumen: 3 <math>\mu</math>L</b>	

Pripremljenu reakcijsku smjesu kratko sam vorteksirala i centrifugirala, te po 3  $\mu$ L dodala u mikroepruvete od 0,2 mL, a zatim i po 2  $\mu$ L prethodno pripremljenog razrjeđenja radne otopine izoliranih RNA, nakon čega je ukupni volumen u mikroepruveti iznosio 5  $\mu$ L. Uzorke sam kratko vorteksirala i centrifugirala, a zatim inkubirala u uređaju za PCR ABI 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) prema uputama prikazanim u **Tablici 4**.

**Tablica 4.** Uvjeti za inkubaciju za reakciju poliadenilacije.

KORAK	TEMPERATURA ( $^{\circ}$ C)	VRIJEME (min)
poliadenilacija	37	45
zaustavljanje reakcije	65	10
zadržavanje	4	$\infty$

Uslijedila je reakcija ligacije adaptor. Najprije sam pripremila reakcijsku smjesu potrebnu za izvođenje ove reakcije. Smjesa je sadržavala sve komponente prikazane u **Tablici 5**. Nakon što sam pripremljenu smjesu vorteksirala i centrifugirala, po 10  $\mu$ L sam dodala u

mikroeprovete s reakcijskim produktima poliadenilacije. Ukupni volumen time je iznosio 15  $\mu\text{L}$ .

**Tablica 5.** *Sastav reakcijske smjese za reakciju ligacije adaptora.*

KOMPONENTA	VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ ) ZA 1 REAKCIJU
5x pufer za DNA ligazu	3
50 % PEG 8000	4,5
25x adaptor za ligaciju	0,6
RNA-ligaza	1,5
voda pročišćena od RNaza	0,4
<b>ukupni volumen: 10 <math>\mu\text{L}</math></b>	

Uzorke sam kratko vorteksirala i centrifugirala, a zatim inkubirala u uređaju za PCR ABI 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) prema uputama prikazanima u **Tablici 6**.

**Tablica 6.** *Uvjeti za inkubaciju za reakciju ligacije adaptora.*

KORAK	TEMPERATURA ( $^{\circ}\text{C}$ )	VRIJEME (min)
ligacija	16	60
zadržavanje	4	$\infty$

Nakon reakcije ligacije adaptora, uslijedila je reakcija reverzne transkripcije za koju sam također najprije pripremila reakcijsku smjesu u mikroeproveti od 1,5 mL (**Tablica 7**). Pripremljenu smjesu sam vorteksirala i kratko centrifugirala, te po 15  $\mu\text{L}$  raspipetirala u mikroeprovetu sa prethodno dobivenim reakcijskim produktima. Ukupni volumen koji se nalazio u epruveti je 30  $\mu\text{L}$ .

**Tablica 7.** *Sastav reakcijske smjese za reakciju reverzne transkripcije.*

KOMPONENTA	VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ ) ZA 1 REAKCIJU
5x pufer za reverznu transkripciju	6
dNTP mix (25 mM svaki)	1,2
20x univerzalna početnica za reverznu transkripciju	1,5
10x mix enzima za reverznu transkripciju	3
voda pročišćena od RNaza	3,3
<b>ukupni volumen: 15 <math>\mu\text{L}</math></b>	

Pripremljene mikroeprovete sam kratko vorteksirala i centrifugirala te postavila u uređaj za PCR ABI 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) prema uputama navedenim u **Tablici 8**.

**Tablica 8.** *Uvjeti za inkubaciju za reakciju reverzne transkripcije*

KORAK	TEMPERATURA ( $^{\circ}\text{C}$ )	VRIJEME (min)
reverzna transkripcija	42	15
zaustavljanje reakcije	85	5
zadržavanje	4	$\infty$

Posljednji korak naziva se amplifikacija miRNA (miR-Amp). Kao i u prethodnim koracima, najprije sam u mikroeproveti pripremila reakcijsku smjesu prema podacima iz **Tablice 9**, koju sam nakon pripreme kratko vorteksirala i centrifugirala kako bi se uklonili mjehurići.

**Tablica 9.** *Sastav reakcijske smjese za reakciju miR-Amp.*

KOMPONENTA	VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ ) ZA 1 REAKCIJU
2x miR-Amp Master Mix	25
20x miR-Amp Primer Mix	2,5
voda pročišćena od RNaza	17,5
<b>ukupni volumen: 45 <math>\mu\text{L}</math></b>	

Zatim sam pripremila i označila nove mikroeprovete od 0,2 mL te u njih dodala po 45  $\mu$ L pripremljene reakcijske smjese, a potom i po 5  $\mu$ L produkata prethodne reakcije reverzne transkripcije prema odgovarajućim oznakama. Pripremljene uzorke stavila sam u uređaj za PCR ABI 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) prema uputama navedenim u **Tablici 10**.

**Tablica 10.** *Uvjeti za inkubaciju za reakciju miR-Amp.*

KORAK	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME	BROJ CIKLUSA
aktivacija enzima	95	5 min	1
denaturacija	95	3 s	14
vezanje početnica	60	30 s	
zaustavljanje reakcije	99	10 min	1
zadržavanje	44	$\infty$	1

Nakon završetka inkubacije za reakciju miR-Amp, uslijedilo je izvođenje kvalitativne reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) na način opisan u Poglavlju 3.2.3.2.

### 3.2.3. KVANTITATIVNA LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU (QRT-PCR)

Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) je visokoprecizna i osjetljiva metoda za otkrivanje, karakterizaciju i kvantificiranje nukleinskih kiselina, odnosno kako bi se odredila relativna ili apsolutna količina početne cDNA na osnovu čega se dalje određuje ekspresiranost pojedinog gena od interesa. Da bi se odredila ekspresija, koristi se jedan od dva različita pristupa za detekciju nosintetiziranih molekula dsDNA iz cDNA: boja SYBR Green ili probe TaqMan.

#### 3.2.3.1. Reakcija qRT-PCR za određivanje relativne ekspresije mRNA

qRT-PCR-om analizirala sam ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2* u svim uzorcima zdravih jajovoda i tkiva HGSOE. Kao referentni gen koristila sam gen *RPLP0* (engl. *ribosomal protein lateral stalk subunit P0*) čija je ekspresija u stanici stalno prisutna. Relativnu ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2* u odnosu na referentni gen *RPLP0* sam izračunala pomoću formule

$2^{-\Delta C_t}$ , gdje  $\Delta C_t$  predstavlja razliku u ekspresiji gena od interesa i referentnog gena, odnosno razlika u  $C_t$ -vrijednostima gena *BRCA1* i *BRCA2* i gena *RPLP0*.

qRT-PCR izvodila sam u pločicama s 96 bunarčića ili u PCR-stripovima. Najprije sam pripremila reakcijsku smjesu za svaki gen od interesa, a po jednoj reakciji smjesa je sadržavala iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD) 2x (50 % v/v), početnice F (0,3 mM), početnice R (0,3 mM) te vodu pročišćenu od RNaza do ukupnog volumena od 9  $\mu$ L prema podacima iz **Tablice 11**.

**Tablica 11.** Sastav reakcijske smjese za qRT-PCR reakciju.

KOMPONENTA	VOLUMEN
iQ SYBR Green Supermix	5 $\mu$ L
početnica F	0,3 $\mu$ L
početnica R	0,3 $\mu$ L
voda	3,4 $\mu$ L
<b>ukupno: 9 <math>\mu</math>L</b>	

U svaki bunarčić dodala sam po 9  $\mu$ L pripremljene reakcijske smjese, a zatim i po 1  $\mu$ L cDNA dobivene prema opisu u Poglavlju **3.2.3.1**. Sve uzorke sam pripremala u duplikatu, a za svaki gen sam imala i tzv. negativnu kontrolu (engl. *no-template control*, NTC/NK), odnosno uzorak u koji nije dodana cDNA, a koji je bio pokazatelj da nije došlo do kontaminacije reakcijske smjese. Nukleotidni sljedovi korištenih početnica, kao i njihove reference prikazane su u **Tablici 12**.

**Tablica 12.** Sljedovi početnica korišteni za kvantitativni PCR. Oznaka *F* označava „forward“ odnosno 5'→3' smjer sekvence gena, dok *R* označava „reverse“, odnosno 3'→5' smjer.

GEN	SMJER	NUKLEOTIDNI SLIJED (5'-3')	VELIČINA APLIKONA (bp)	REFERENCA
<i>BRCA1</i>	F	GATTTGACGGAAACATCTTAC	236	(Williamson i sur. 2002)
	R	CCAGCAGTATCAGTAGTATGA		
<i>BRCA2</i>	F	GCAGTGAAGAATGCAGCAGA	205	(Wu i sur. 2000)
	R	CAATACGCAACTTCCACACG		
<i>RPLP0</i>	F	GGCACCATTGAAATCCTGAGT GATGTG	215	(Eichberger i sur. 2006)
	R	TTGCGGACACCCTCCAGGAA GC		

Neposredno prije stavljanja u uređaj za PCR, pločicu s uzorcima sam zatvorila zaštitnom folijom ili odgovarajućim poklopcima, a nakon toga sam uzorke centrifugirala otprilike 1 minutu pri 1200 RPM. Po završetku centrifuge, pločicu sam stavila u uređaj za qRT-PCR CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD) te namjestila odgovarajuće uvjete reakcije sastavljene od nekoliko temeljnih koraka: početne denaturacije u trajanju od 30 sekundi pri temperaturi 95 °C, zatim 40 ciklusa na temperaturi od 95 °C po 10 sekundi i potom na temperaturi od 61 °C po 30 sekundi, i na samom kraju krivulje mekšanja zagrijavanjem sa 60 °C na 95 °C. Posljednji korak ove reakcije ima za funkciju provjeru specifičnosti produkta s obzirom na to da svaki set početnica umnaža poznati ampikon čiji je oblik krivulje mekšanja poznat.

### 3.2.3.2. Reakcija qRT-PCR za određivanje relativne ekspresije miRNA

Ekspresiju zrelih molekula miRNA odredila sam reakcijom qRT-PCR pomoću komercijalno dostupnih proba TaqMan koje sadrže fluorescentnu boju na 5'-kraju reportera i nefluorescentni utišavač na 3'-kraju. Ove probe su specifične za cilj i vežu se samo na sekvencu DNA od interesa nizvodno od jedne od početnica tijekom koraka vezivanja, a temelje se ne 5'-nukleaznoj sondi kako bi se mogao detektirati specifični produkt PCR-a koji se nakuplja u reakciji.



Za svaki uzorak tkiva HGSOC i zdravih jajovoda pomoću komercijalno dostupnih proba TaqMan Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) odredila sam ekspresiju molekula miRNA miR-16-5p i miR-107. Kao referentnu miRNA koristila sam miR-361-5p.

Prije početka izvođenja ove reakcije, pripremila sam nove, čiste mikroeprove te ih označila prema odgovarajućim oznakama. Koristila sam uzorke koje sam dobila u reakciji miR-Amp, na način opisan u Poglavlju 3.2.2.2, te sam ih sve temeljito vorteksirala, a zatim kratko centrifugirala kako bi se spustio sadržaj u mikroeproveta te uklonili mjehurići zraka.

Najprije sam za dobivene uzorke cDNA napravila razrjeđenja 1:10. Razrjeđenja sam pripremila tako što sam dodala 11  $\mu\text{L}$  produkata iz reakcije miR-Amp te 99  $\mu\text{L}$  vode pročišćene od RNaza, kako bi ukupni volumen koji se nalazio u mikroeproveta bio 110  $\mu\text{L}$ .

Zatim sam za obje istraživane miRNA, kao i kontrolnu miRNA, u mikroeproveta od 1,5 mL pripremila PCR-reakcijsku smjesu prema podacima iz **Tablice 13**.

**Tablica 13.** Sastav reakcijske smjese za PCR reakciju za određivanje relativne ekspresije miRNA.

KOMPONENTA	VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ ) ZA 1 REAKCIJU
TaqMan Fast Advanced Master Mix (2x)	5
TaqMan Advanced miRNA Assay (20x)	0,5
voda bez RNaze	2
<b>ukupni volumen: 7,5 <math>\mu\text{L}</math></b>	

Pripremljenu reakcijsku smjesu sam vorteksirala i kratko spustila u centrifugi, a potom dodala po 7,5  $\mu\text{L}$  PCR-reakcijske smjese u svaki bunarčić PCR-reakcijske pločice. Nakon toga, dodala sam i po 2,5  $\mu\text{L}$  razrijeđene cDNA tako da je ukupni volumen po bunarčiću iznosio 10  $\mu\text{L}$ .

Svaku reakciju pripremila sam u duplikatu, a osim toga za svaku miRNA napravila sam i po jednu negativnu kontrolu bez dodatka cDNA. Reakcijsku ploču sam zatvorila, a zatim i kratko centrifugirala kako bi se sadržaji temeljito promiješali.

Metodu qRT-PCR za određivanje ekspresije miRNA izvodila sam na uređaju StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD), a korišteni uvjeti prikazani su u **Tablici 14**.

**Tablica 14.** Uvjeti reakcije qRT-PCR-a za određivanje relativne ekspresije miRNA.

KORAK	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME (s)	BROJ CIKLUSA
aktivacija enzima	95	20	1
denaturacija	95	1	40
vezanje početnica	60	20	

Razine ekspresije miRNA izračunala sam pomoću formule  $2^{-\Delta Ct}$ , koristeći ekspresiju referentne miRNA miR-361-5p.

### 3.2.4. METODE PROVEDENE NA STANIČNOJ KULTURI OVCAR-8

Sve postupke vezane uz staničnu kulturu radila sam u laboratoriju za rad u sterilnim uvjetima u kabinetu s laminarnim protokom zraka. Prije početka rada i neposredno nakon, sav korišteni pribor, posuđe, reagense i medij, prije unošenja u kabinet s laminarnim protokom zraka, te radnu površinu unutar njega očistila sam etanolom, a po završetku rada sterilizirala ultraljubičastim svjetlom.

#### 3.2.4.1. Odmrzavanje stanica

Stanična linija karcinoma jajnika OVCAR-8 nalazila se u zamrzivaču na temperaturi od -80 °C, u krioeprevetama u kojima se nalazio medij za zamrzavanje (50 % serum, 40 % medij DMEM, 10 % DMSO (dimetil sulfoksid)). Dimetil sulfoksid djeluje kao krioprotektant tako što pomaže u sprječavanju stvaranja kristala vode povećanjem koncentracije unutarstanične otopljene tvari (Whaley i sur. 2021). S obzirom na to da ima i citotoksični učinak jer može stupiti u interakciju s plazma membranom dopuštajući stvaranje pora, koje doprinose smanjenju selektivnosti membrane i povećavaju propusnost stanica (De Abreu Costa i sur. 2017) postupak odmrzavanja potrebno je obaviti u što kraće vrijeme.

Dok su se stanice odmrzavale, u staklenu epruvetu pripremila sam 5 mL medija za rast stanica RPMI 1640 (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka) s dodatkom 10 % FBS-a (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Kada su se stanice odvojile od stijenke krioeprevete, prebacila sam ih u pripremljeni medij te centrifugirala 5 minuta pri 1200 RCF i temperaturi od 4 °C. Završetkom centrifuge uklonila sam supernatant, a preostali talog resuspendirala u 10 mL medija RPMI 1640.

Tako pripremljeni sadržaj prenijela sam u Petrijevu zdjelicu promjera 10 cm (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka) i lagano je protresla kako bi se stanice što ravnomjernije rasporedile po cijeloj površini. Petrijeve zdjelice sam potom pospremila u inkubator (Kambič, Semič, Slovenija) s kontroliranim uvjetima (37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>) kako bi se uspostavila adherentna stanična kultura.

#### **3.2.4.2. Održavanje stanica u staničnoj kulturi**

Kako bi stanice mogle neometano rasti, pripremila sam željeni medij dodavanjem 10 % FBS-a, 1 % natrijevog piruvata, 1 % L-glutamina, 1 % neesencijalne aminokiseline MEM (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka) te 1 % penicilina streptomicina te medija RPMI 1640 do željenog volumena.

Medij sam mijenjala svakih nekoliko dana najprije uklonivši stari medij pomoću sterilne pipete te bih drugom, čistom sterilnom pipetom dodala 10 mL svježeg medija.

#### **3.2.4.3. Presađivanje i razrjeđivanje stanica u staničnoj kulturi**

Stanice sam presađivala kada bi prekrile gotovo cijelu površinu Petrijeve zdjelice. Sterilnom pipetom uklonila sam stari medij, a zatim sam drugom sterilnom pipetom dodala 5 mL pufera PBS (engl. *Phosphate-Buffered Saline*; 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, pH 7,2) lagano ga ispuštajući uz stijenku Petrijeve zdjelice. Pufer PBS ima ulogu ispiranja zaostalog medija koji bi mogao deaktivirati djelovanje tripsina koji se dodaje u sljedećem koraku. Osim toga, na ovaj način se iz medija uklanjaju zaostale mrtve stanice. Pufer sam rasporedila preko cijele površine, a nakon toga ga uklonila.

Zatim sam dodala 1 mL tripsina s dodatkom 1 mM EDTA te ga ostavila da djeluje uz povremeno lagano protresanje Petrijeve zdjelice kako bi se stanice što učinkovitije odvojile od podloge. Nakon tripsinizacije, stanicama sam dodala 10 mL svježeg medija koji u svom sastavu ne sadrži antibiotik penicilin streptomicin, te ih nekoliko puta resuspendirala uvlačenjem sadržaja u pipetu i njegovim naglim ispuštanjem po cijeloj podlozi Petrijeve zdjelice kako bi se što bolje „razbile“ nakupine stanica.

Kada bih stanice razrjeđivala, u novu Petrijevu zdjelicu prenijela bih 1 mL pripremljene stanične suspenzije uz dodatak 10 mL svježeg medija.

#### 3.2.4.4. Pobrojavanje stanica i tretman stanica mimicima i inhibitorima miRNA miR-16-5p i miR-107

Nakon uspostavljanja adherentne stanične linije te promjene medija, stanice nasadene na Petrijevu zdjelicu prebacila sam u sterilnu epruvetu od 50 mL (*Falcon sterile centrifuge Tube*; Corning, New York, SAD), a zatim ih centrifugirala 5 minuta na sobnoj temperaturi pri 1200 RPM. Gornju vodenu fazu (tzv. supernatant) sam uklonila, a talog resuspendirala u 5 mL novog medija. Iz tako pripremljene stanične suspenzije, za potrebe pobrojavanja stanica uzela sam 20  $\mu$ L te ih resuspendirala u 80  $\mu$ L tripanskog modrila (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD).

Neubauerovu komoricu za brojanje stanica sam očistila, a zatim nanijela  $\sim 20 \mu$ L prethodno pripremljene suspenzije stanica i tripanskog modrila te ju postavila na inverzni svjetlosni mikroskop BIB-10 (Boeco, Hamburg, Njemačka). Neubauerova komorica se sastoji od 4 velika kvadrata od kojih se svaki sastoji od 16 manjih kvadratića. Stanice sam brojala u sva 4 velika kvadratna polja, a broj stanica izračunala sam pomoću formule (*broj stanica/0,4*)  $\times 5 \times 10^3$ . Zatim sam izračunala i potreban broj stanica po 1 mL suspenzije koristeći formulu *traženi br. stanica/dobiveni br. stanica*, gdje je *traženi broj stanica* iznosio  $0,8 \times 10^6$  po bunarčiću, dok *dobiveni broj* predstavlja vrijednost dobivenu u prethodnom izračunu. Također, kako bi dobila ukupni volumen od 2 mL po bunarčiću, ostatak sam nadomjestila dodavanjem svježeg medija. Stanice sam potom nasadila u pločice za kulturu stanica sa 6 pripadajućih bunarčića (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka).

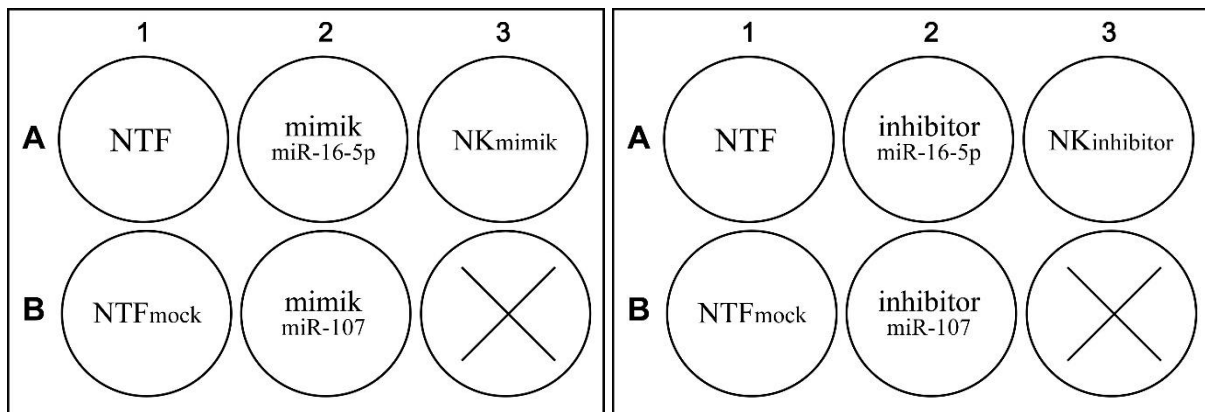
Zatim sam pripremila potreban broj mikroepruveta te iz hladnjaka uzela stock-otopine mimika (15 nM), inhibitora (15 nM) za mikroRNA miR-16-5p i miR-107, te njihove negativne kontrole (NK) (15 nM), pohranjene na 4 °C.

U pripremljene mikroepruvete ispipetirala sam po 1,5  $\mu$ L stock-otopine za svaku miRNA te dodala još po 100  $\mu$ L suplementa opti-MEM® I (Reduced Serum Medium opti-MEM (1x) + HEPES + 2.4 g/L natrijev bikarbonat + L-glutamin) (Gibco, Waltham, Massachusetts, SAD). Osim toga, pripremila sam i potrebni volumen transfekcijskog reagensa Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, SAD) po uzorku na način da sam u 6  $\mu$ L reagensa RNAiMAX dodala 100  $\mu$ L suplementa opti-MEM.

Pripremljene reakcijske smjese ostavila sam 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim sam po 100  $\mu$ L reakcijske smjese RNAiMAX dodala u mikroepruvete koje su sadržavale reakcijske

smjese mimika, inhibitora i odgovarajućih negativnih kontrola. Važno je istaknuti kako u reakcijsku smjesu netransfeciranih stanica (NTF) nisam dodala transfekcijski reagens, te je ona sadržavala isključivo suspenziju stanica i suplement opti-MEM, dok je u reakcijsku smjesu NTFmock osim suspenzije stanica dodan i transfekcijski reagens RNAiMAX.

Ovako pripremljene suspenzije su ostavljene na inkubaciju na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta. Nakon inkubacije, u bunarčiče s prethodno dodanih 2 mL stanica dodala sam i odgovarajuću reakcijsku smjesu na način prikazan na **Slici 8**.



**Slika 8. Raspored bunarčića za tretman stanične linije karcinoma jajnika OVCAR-8 mimicima i inhibitorima mikroRNA miR-16-5p i miR-107.** NTF (netretirane stanice) = suspenzija stanica + opti-MEM; NTF<sub>mock</sub> = suspenzija stanica + optiMEM + RNAiMAX; NK (negativna kontrola) = suspenzija stanica + optiMEM + RNAiMAX + NKmimik/inhibitor; mimik/inhibitor miR-16-5p/miR-107 = suspenzija stanica + optiMEM + RNAiMAX + mimik/inhibitor miR-16-5p/miR-107.

Tretirane uzorke pospremila sam u inkubator na inkubaciju u trajanju 48 sati.

### 3.2.5. BIOINFORMATIČKA ANALIZA TRANSKRIPTOMSKIH PODATAKA IZ JAVNIH BAZA PODATAKA

Kao kontrolu vlastitih rezultata koristila sam set transkriptomskih podataka (RNA-seq) dobivenih od velikog broja uzoraka karcinoma jajnika TCGA-OVCA (The Cancer Genome Atlas Research Network 2011), pohranjenih u Atlasu genoma ljudskog raka (engl. *The Cancer Genome Atlas*, TCGA) te set zdravih kontrolnih uzoraka s portala Genotype-Tissue Expression (GTEx) (GTEx Consortium 2015). Podatke o ekspresiji gena *BRCA1* i *BRCA2* te njihovoj međusobnoj korelaciji analizirala sam korištenjem web programa GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) (Tang i sur. 2019).

### 3.2.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli (vrijednosti genskih ekspresija) testirana je pomoću D'Agostino-Pearsonovog testa.

Za analizu varijabli koje su slijedile normalnu distribuciju nakon logaritamske transformacije koristila sam parametrijski nezavisni t-test za ispitivanje razlika između dvije grupe te parametrijsku jednosmjernu analizu varijance (ANOVA) s Tukey-Kramerovim *post hoc* testom za razliku između više od dvije grupe.

Za analizu varijabli koje nisu slijedile normalnu distribuciju nakon logaritamske transformacije koristila sam neparametrijske testove: Mann-Whitneyev test za ispitivanje razlika između dvije grupe te Kruskal-Wallisov test za razliku između više od dvije grupe.

Korelacija (povezanost) između ekspresija istraživanih mikroRNA i gena *BRCA1* i *BRCA2* određena je računanjem neparametrijskog Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova ( $\rho$ ), zajedno za tumorsko i zdravo kontrolno tkivo. Za tumačenje jačine korelacije prema iznosu statistički značajnog koeficijenta korelacije  $\rho$  korištena je skala prema Schober i sur. (2018):

0,00 – 0,10	nezatna korelacija
0,10 – 0,39	slaba korelacija
0,40 – 0,69	umjerena korelacija
0,70 – 0,89	jaka korelacija
0,90 – 1,00	vrlo jaka korelacija

Dijagnostičku vrijednost razina ekspresija istraživanih RNA, odnosno njihovu potencijalnu korisnost u dijagnostici seroznog raka jajnika visokog stupnja malignosti, odredila sam analizom krivulje ROC (engl. *receiver operating characteristic*) (Fawcett 2006) koja omogućava pronalazak vrijednosti razine ekspresije pri kojoj se najbolje razlikuje tumorsko od zdravog tkiva. Glavna mjera dijagnostičke vrijednosti dobivena ROC-analizom je površina ispod krivulje (engl. *area under curve*, AUC) gdje viša AUC predstavlja biljeg veće dijagnostičke vrijednosti.

Dijagnostički značaj, odnosno snaga da se prema relativnoj ekspresiji istraživanih RNA može razlikovati (diskriminirati) tumorsko od zdravog tkiva, tumačen je prema iznosu dobivenih AUC-vrijednosti kako je opisano u Mandrekar (2010):

< 0,5	bez snage diskriminacije
0,5 – 0,7	slaba snaga diskriminacije
0,7 – 0,8	prihvatljiva snaga diskriminacije
0,8 – 0,9	izvrsna snaga diskriminacije
> 0,9	izvanredna snaga diskriminacije

Obradu rezultata radila sam u programu Microsoft Excel for Microsoft 365 (Microsoft, Redmond, Washington, SAD), a statističku analizu u programu MedCalc v20.2 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija).

Sve dvosmjerne *P*-vrijednosti manje od 0,05 smatrala sam statistički značajnima.

## 4. REZULTATI

### 4.1. TKIVA

#### 4.1.1. EKSPRESIJA miRNA miR-16-5p I miR-107 U SEROZNOM RAKU JAJNIKA VISOKOG STUPNJA MALIGNOSTI I ZDRAVIM JAJOVODIMA

Metodom qRT-PCR određena je relativna razina ekspresije molekula miRNA, miR-16-5p i miR-107, u 70 uzoraka tkiva seroznog raka jajnika visokog stupnja malignosti (dalje u tekstu *karcinomi*) i 23 uzorka tkiva zdravih jajovoda (dalje u tekstu *kontrole*). Za usporedbu razina ekspresije molekula korištene su vrijednosti  $\Delta Ct$ , odnosno Ct-vrijednosti za svaku miRNA normalizirane prema Ct-vrijednosti referentne miRNA miR-361-5p. Relativna razina ekspresije izražena je pomoću formule  $2^{-\Delta Ct}$ .

Molekule miRNA miR-16-5p i miR-107 bile su eksprimirane u 100 % uzoraka kontrola i 100 % uzoraka karcinoma. Usporedba apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija pokazala je da je i u kontrolama i u karcinomima jače eksprimirana miR-16-5p, što pokazuju **Tablica 15** i **Slika 9**.

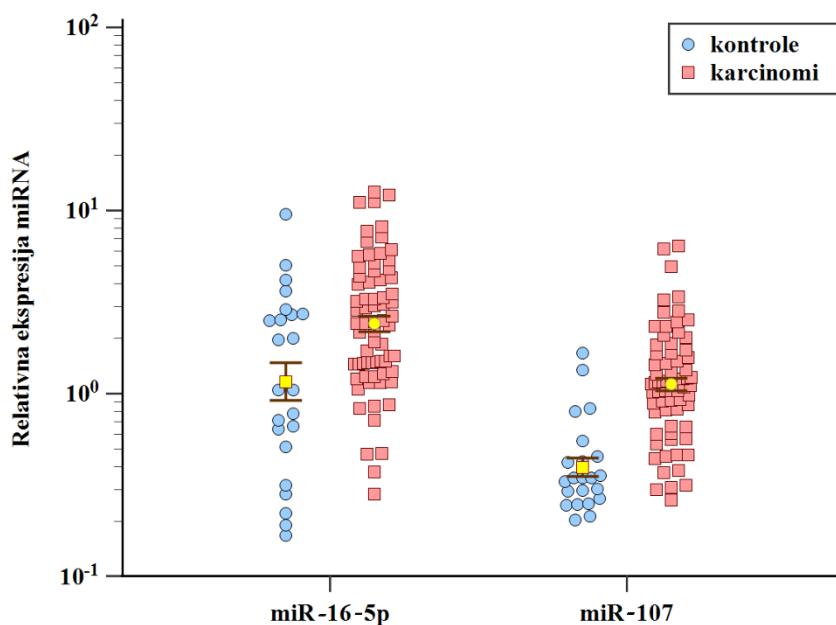
**Tablica 15.** Relativna razina ekspresije miR-16-5p i miR-107 u kontrolnom tkivu i tkivu karcinoma.

miRNA	KONTROLE		KARCINOMI		P-vrijednost**
	srednja vrijednost	S.E.M.*	srednja vrijednost	S.E.M.*	
<b>miR-16-5p</b>	2,011	0,4480	3,327	0,3362	0,001
<b>miR-107</b>	0,475	0,0763	1,437	0,1416	< 0,0001

\* S.E.M. - standardna pogreška srednje vrijednosti;

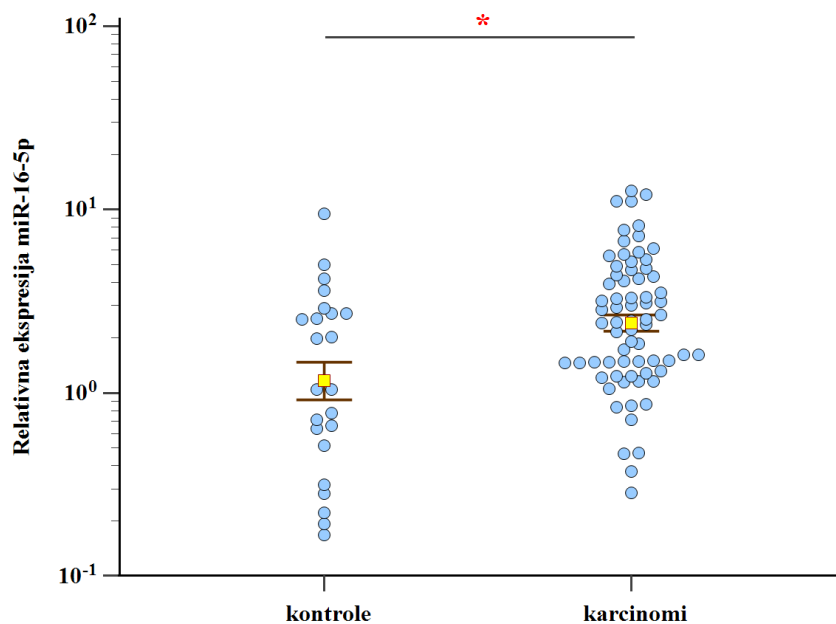
\*\* - nezavisni t-test na logaritamski transformiranim vrijednostima





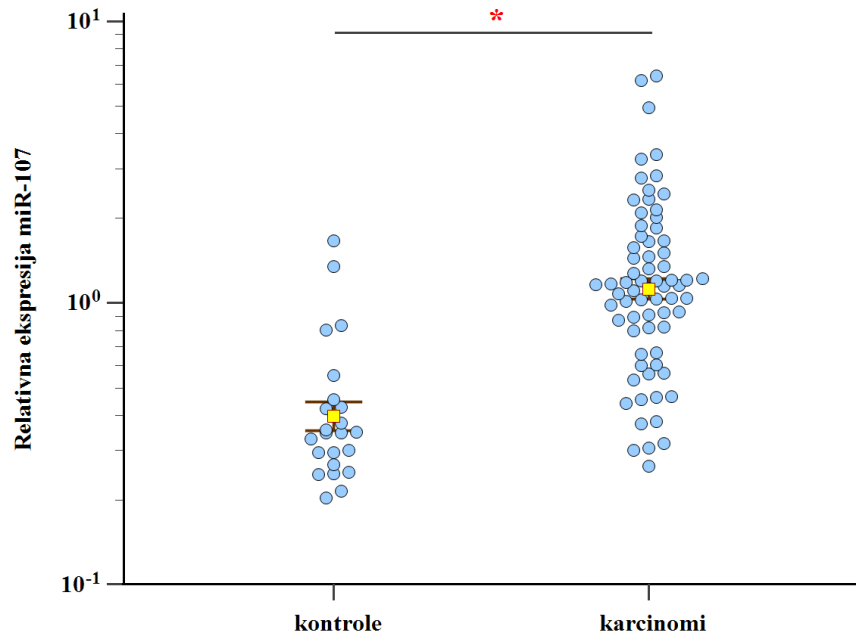
**Slika 9.** Usporedba apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija molekula *miR-16-5p* i *miR-107* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinoma *HGSOC*. Na grafu su označene srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti.

Usporedba razina ekspresije u kontrolama i karcinomima pokazala je da je miRNA *miR-16-5p* statistički značajno pojačano eksprimirana u karcinomima ( $P = 0,001$ ) (**Slika 10**).



**Slika 10.** Usporedba relativne ekspresije *miR-16-5p* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinomima *HGSOC*. MikroRNA *miR-16-5p* značajno je jače eksprimirana u uzorcima karcinoma jajnika ( $P = 0,001$ ). Na grafu su označene srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Zvezdica (\*) označava  $P < 0,05$ . Genska ekspresija za svaki uzorak određena je u tehničkom triplikatu.

Također, usporedba razina ekspresije u kontrolama i karcinomima pokazala je da je miRNA miR-107 statistički značajno pojačano eksprimirana u karcinomima ( $P < 0,0001$ ) (Slika 11).



**Slika 11. Usporedba relativne ekspresije miR-107 u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinomima HGSOc.** MikroRNA miR-107 značajno je jače eksprimirana u uzorcima karcinoma jajnika ( $P < 0,0001$ ). Na grafu su označene srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Zvezdica (\*) označava  $P < 0,05$ . Genska ekspresija za svaki uzorak određena je u tehničkom triplikatu.

#### 4.1.2. EKSPRESIJA GENA *BRCA1* I *BRCA2* U SEROZNOM RAKU JAJNIKA VISOKOG STUPNJA MALIGNOSTI I ZDRAVIM JAJOVODIMA

Metodom qRT-PCR određena je relativna razina ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* u 70 uzoraka tkiva HGSOE (dalje u tekstu *karcinomi*) i 23 uzorka tkiva zdravih jajovoda (dalje u tekstu *kontrole*). Vrijednosti relativne ekspresije gena *BRCA1/2* za dio uzoraka preuzete su iz diplomskog rada Tine Miloš (Miloš 2021).

Za usporedbu razina ekspresije gena korištene su vrijednosti  $\Delta Ct$ , odnosno Ct-vrijednosti za svaki gen normalizirane prema Ct-vrijednosti referentnog gena *RPLP0*. Relativna razina ekspresije izražena je pomoću formule  $2^{-\Delta Ct}$ .

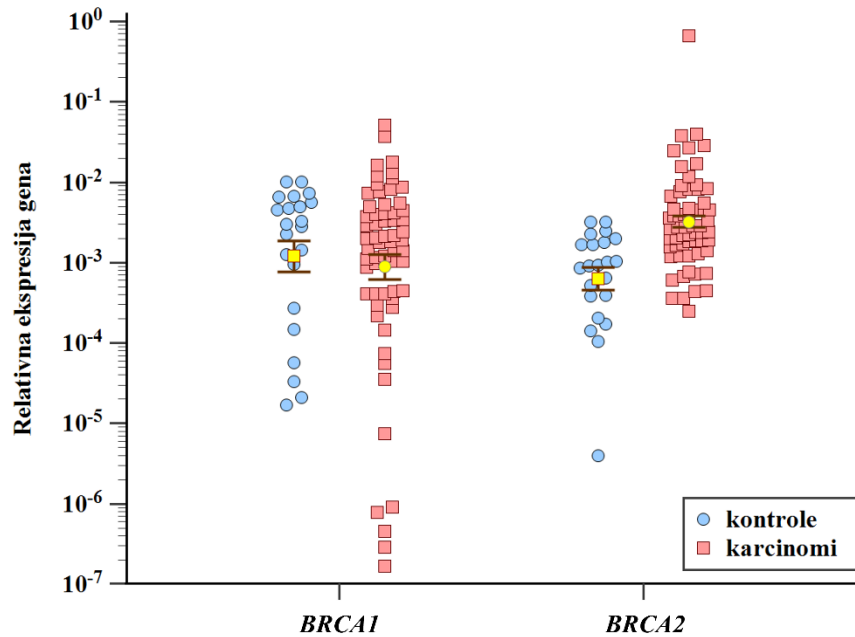
Gen *BRCA1* je bio eksprimiran u 95,65 % (22/23) uzoraka kontrola i 90 % (63/70) uzoraka karcinoma, a gen *BRCA2* također u 95,65 % (22/23) uzoraka kontrola 90 % (63/70) uzoraka karcinoma. Zanimljivo je da je u istim uzorcima izostala ekspresija oba gena.

Usporedba apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija pokazala je da je u kontrolama gen *BRCA1* jače eksprimiran u odnosu na gen *BRCA2*, dok je njihova ekspresija u karcinomima približno jednaka, što pokazuju **Tablica 16** i **Slika 12**.

**Tablica 16.** Relativna razina ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* u kontrolnom tkivu i tkivu karcinoma.

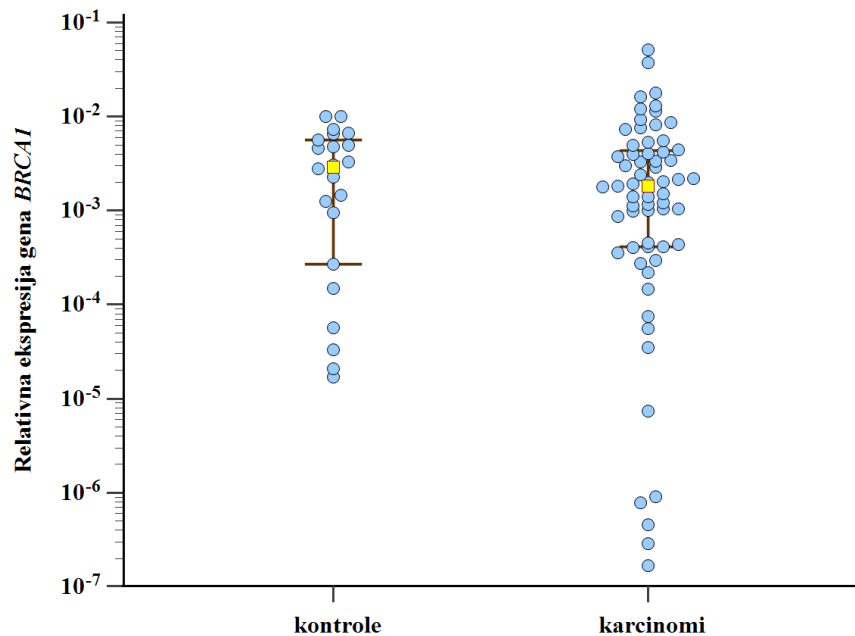
GEN	KONTROLE		KARCINOMI		P-vrijednost*
	medijan	interkvartilni raspon	medijan	interkvartilni raspon	
<i>BRCA1</i>	0,00292	0,0000169 – 0,0101	0,00183	0,000000168 – 0,0512	$P = 0,644$
<i>BRCA2</i>	0,000923	0,00000399 – 0,00323	0,00276	0,000248 – 0,668	$P < 0,0001$

\* - Mann-Whitneyev test



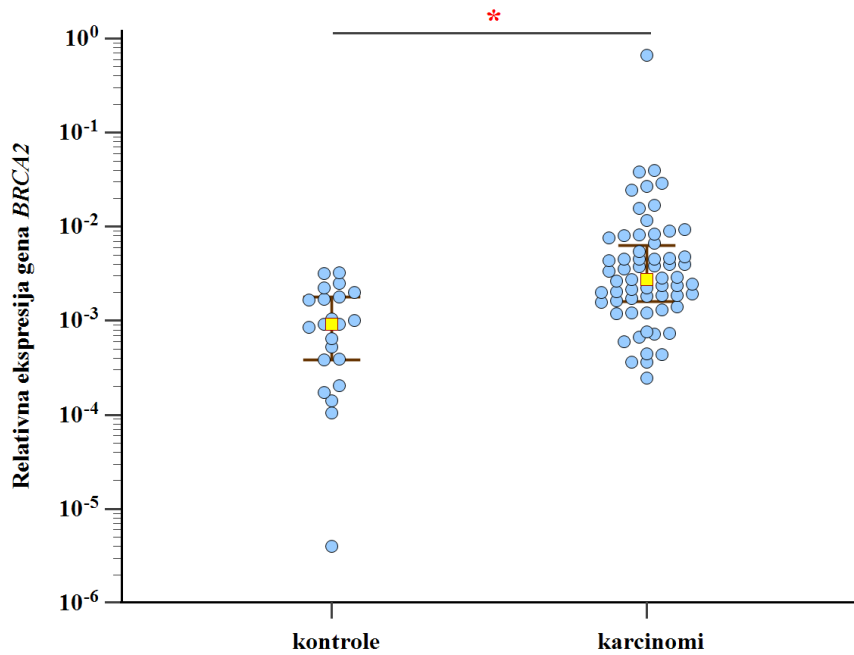
**Slika 12.** Usporedba apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija gena *BRCA1* i *BRCA2* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda i karcinoma HGSOC. Na grafu su označeni medijani i interkvartilni rasponi.

Usporedba razina ekspresije u kontrolama i karcinomima pokazala je da nema statistički značajne razlike u ekspresiji gena *BRCA1* ( $P = 0,644$ ) (**Slika 13**).



**Slika 13.** Usporedba relativne ekspresije gena *BRCA1* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda ( $n = 22$ ) i karcinoma HGSOC ( $n = 63$ ). Između skupina nije utvrđena statistički značajna razlika ( $P = 0,644$ ). Na grafu su označeni medijani i interkvartilni rasponi. Genska ekspresija za svaki uzorak određena je u tehničkom duplikatu.

Usporedba razina ekspresije u kontrolama i karcinomima pokazala je da je gen *BRCA2* statistički značajno jače eksprimiran u karcinomima ( $P < 0,0001$ ) (Slika 14).



**Slika 14.** Usporedba relativne ekspresije gena *BRCA2* u kontrolnim uzorcima zdravih jajovoda ( $n = 22$ ) i karcinoma HGSOV ( $n = 63$ ). Gen *BRCA2* značajno je jače eksprimiran u uzorcima karcinoma jajnika ( $P < 0,0001$ ). Na grafu su označeni medijani i interkvartilni rasponi. Zvezdica (\*) označava statistički značajnu razliku  $P < 0,05$ . Genska ekspresija za svaki uzorak određena je u tehničkom duplikatu.

#### 4.1.3. KORELACIJA IZMEĐU EKSPRESIJA ISTRAŽIVANIH miRNA I NJIHOVIH CILJNIH GENA

Korelacija (povezanost) između ekspresija istraživanih mikroRNA i njihovih ciljnih gena *BRCA1* i *BRCA2* određena je računanjem neparametrijskog Spearmanovog koeficijenta korelacije rangova ( $\rho$ ), zajedno za tumorsko i zdravo kontrolno tkivo.

U **Tablici 17** prikazani su koeficijenti korelacije s pripadajućim *P*-vrijednostima. Prisutnost korelacije može ukazivati na povezanu regulaciju ekspresije, ali ne mora značiti i direktnu uzročno-posljedičnu (kauzalnu) vezu.

**Tablica 17.** Korelacija između ekspresija miRNA i njenih ciljnih gena *BRCA1* i *BRCA2* u uzorcima tkiva HGSOE i zdravih jajovoda. Masnim brojevima označeni su statistički značajni koeficijenti korelacije s pripadajućim *P*-vrijednostima.

<b>miR-107</b>	<b><i>BRCA1</i></b>	<b><i>BRCA2</i></b>		
<b>0,52</b>	0,08	0,15	$\rho$	<b>miR-16-5p</b>
<b>&lt; 0,0001</b>	0,479	0,159	<i>P</i>	
	0,06	<b>0,31</b>	$\rho$	<b>miR-107</b>
	0,595	<b>0,004</b>	<i>P</i>	
		<b>0,51</b>	$\rho$	<b><i>BRCA1</i></b>
		<b>&lt; 0,0001</b>	<i>P</i>	

$\rho$  - Spearmanov koeficijent korelacije rangova

Analiza rezultata pokazala je da postoji pozitivna statistički značajna korelacija ( $\rho > 0$ ) između ekspresija molekula miR-16-5p i miR-107 ( $\rho = 0,52$ ;  $P < 0,0001$ ) i prema vrijednosti koeficijenta korelacije riječ je o umjerenoj korelaciji.

Što se tiče povezanosti ekspresija molekule miR-107, za razliku od miR-16-5p, između molekule miR-107 i gena *BRCA2* prisutna je slaba pozitivna korelacija ( $\rho = 0,31$ ;  $P = 0,004$ ), premda je poznato da su geni *BRCA1* i *BRCA2* ciljni geni obiju istraživanih miRNA.

Također je zanimljivo kako pozitivna korelacija postoji i u ekspresijama između gena *BRCA1* i *BRCA2*, iako je po vrijednosti koeficijenta korelacije riječ samo o umjerenoj korelaciji ( $\rho = 0,51$ ;  $P < 0,0001$ ).

#### 4.1.4. DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST ISPITIVANIH EKSPRESIJA

Dijagnostička vrijednost razine ekspresije istraživanih RNA, odnosno njihova potencijalna korisnost u dijagnostici seroznog raka jajnika visokog stupnja malignosti određena je analizom krivulje ROC koja omogućava pronalazak vrijednosti ekspresije pri kojoj se najbolje razlikuje tumorsko od zdravog tkiva.

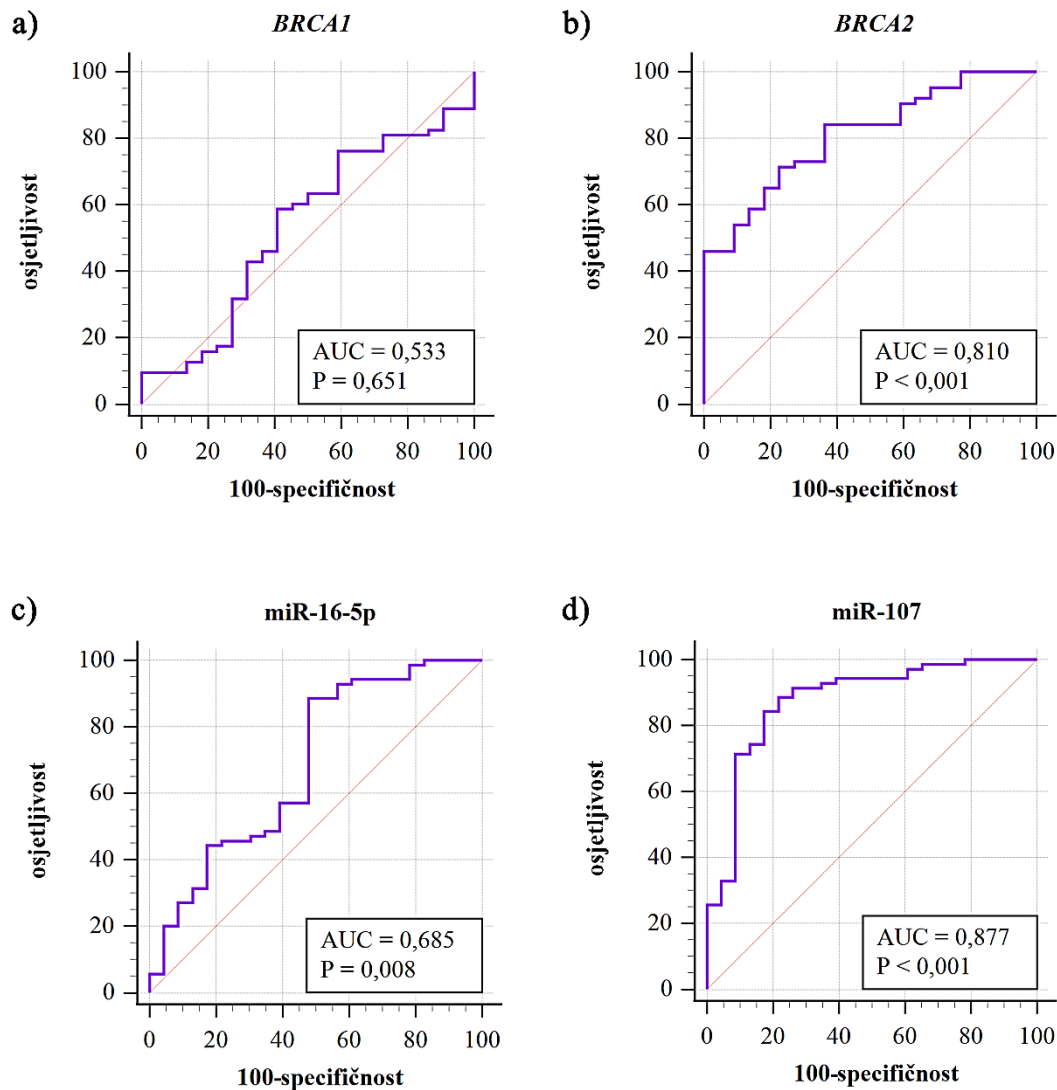
Glavna mjera dijagnostičke vrijednosti nekog biljega, kao što je npr. ekspresija nekog gena ili proteina u tkivu ili serumu, je površina ispod krivulje (AUC). Pri tomu, veća AUC predstavlja biljeg s većom dijagnostičkom vrijednosti.

Analizom krivulja ROC određena je dijagnostička vrijednost ekspresije mRNA gena *BRCA1* i *BRCA2* te miRNA miR-16-5p i miR-107. AUC vrijednost svakog ispitivanog potencijalnog dijagnostičkog biljega (ekspresije) te njegova vrijednost (razina ekspresije) pri kojem se najbolje razlikuje tumorsko od zdravog tkiva prikazana je u **Tablici 18**, dok su ROC krivulje prikazane na **Slici 15**.

*Tablica 18. Mjere dijagnostičkih vrijednosti ispitivanih biljega na razini ekspresije.*

<b>BILJEG</b>	<b>miR-16-5p</b>	<b>miR-107</b>	<b>BRCA1</b>	<b>BRCA2</b>
<b>AUC*</b>	0,685	0,877	0,533	0,810
<b>P-vrijednost</b>	0,008	< 0,001	0,651	< 0,001
<b>vrijednost ekspresije</b>	> 1,047704691	> 0,552661611	≤ 0,002187526	> 0,001790587
<b>osjetljivost (%)</b>	88,6	84,3	58,7	71,4
<b>specifičnost (%)</b>	52,2	82,6	59,1	77,3
<b>snaga diskriminacije</b>	slaba	izvrsna	slaba	izvrsna

\* - površina ispod krivulje



**Slika 15. Krivulje ROC i njima pridružene statistički značajne površine ispod krivulja (AUC).** Grafovi prikazuju dijagnostičku vrijednost dobivenih ekspresija za razlikovanje tumorskog od zdravog tkiva za (a) gen *BRCA1*, (b) gen *BRCA2*, (c) miR-16-5p i (d) miR-107.

Analizom krivulja ROC utvrđeno je kako ekspresije miR-16-5p, miR-107 i *BRCA2* imaju statistički značajnu vrijednost za razlikovanje tkiva seroznog raka jajnika visokog stupnja malignosti od tkiva zdravih jajovoda ( $P < 0,05$ ).

Vrijednosti površina ispod krivulja ROC (AUC) pokazale su kako relativne ekspresije mikroRNA miR-107 ( $> 0,552661611$ ) i gena *BRCA2* ( $> 0,001790587$ ) imaju izvrsnu snagu diskriminacije što ujedno znači i izvrsnu dijagnostičku vrijednost ( $AUC > 0,8$ ), dok miR-16-5p ( $> 1,047704691$ ) pokazuje slabu dijagnostičku vrijednost ( $AUC = 0,685$ ).



## 4.2. STANIČNA KULTURA OVCAR-8

### 4.2.1. UTJECAJ TRETMANA MIMIKA I INHIBIORA MIR-16-5P I MIR-107 NA EKSPRESIJU GENA *BRCA1* I *BRCA2*

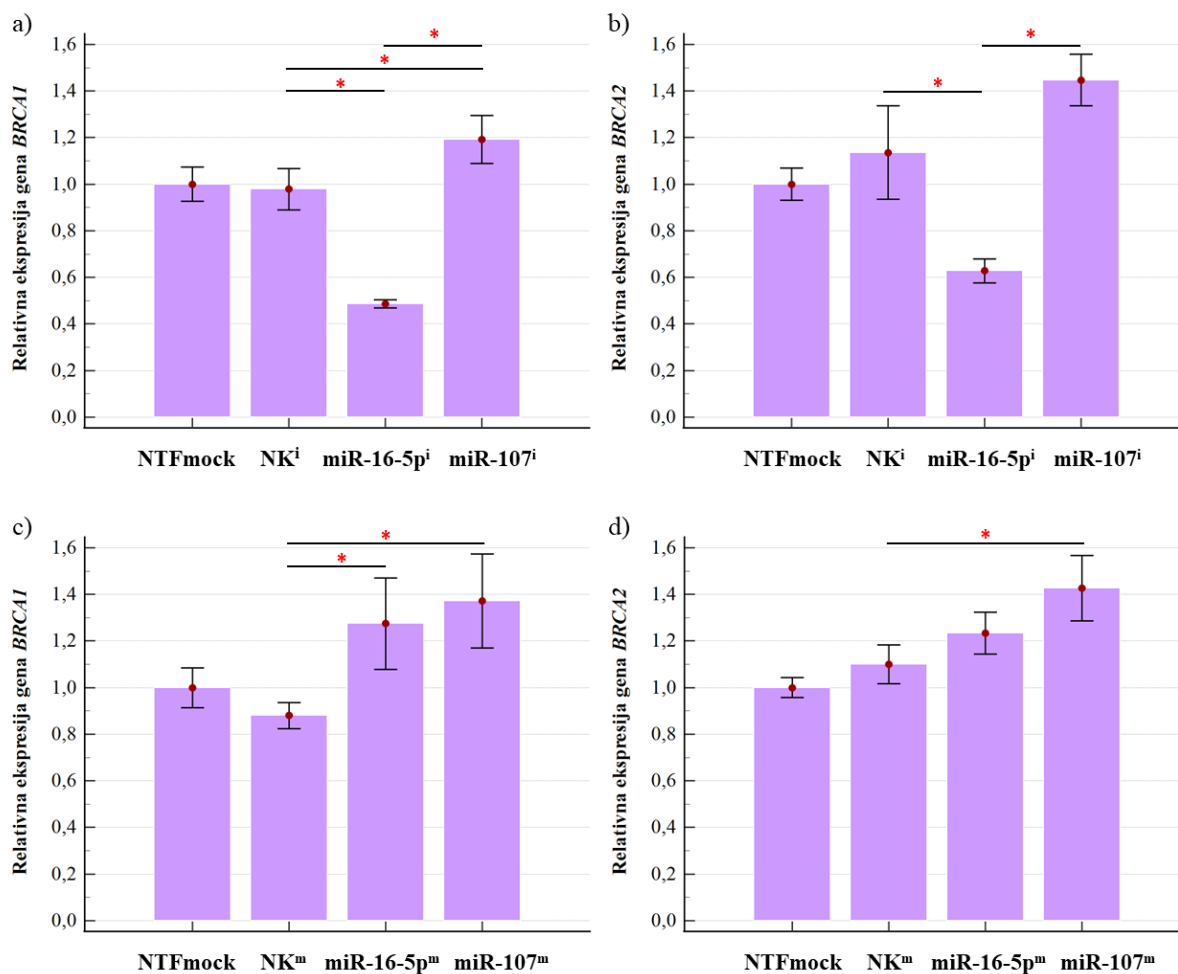
Usporedba tretmana NTFmock koji je sadržavao suspenziju stanica, suplement opti-MEM i transfekcijski reagens RNAiMAX, s tretmanom NK koji je osim navedenog sadržavao i stock-otopinu negativne kontrole mimika ili inhibitora pokazala je da transfekcijski reagens nema statistički značajan utjecaj na ekspresiju gena *BRCA1/2*.

Tretiranje stanične linije karcinoma čovjeka OVCAR-8 mimicima miR-16-5p i miR-107 pokazalo je statistički značajan utjecaj na ekspresiju gena *BRCA1* ( $P = 0,012$ ) i *BRCA2* ( $P = 0,003$ ). Također, tretiranje iste stanične linije inhibitorima miR-16-5p i miR-107 pokazalo je statistički značajan utjecaj na ekspresiju oba gena ( $P < 0,001$ ).

*Post hoc* analiza nakon tretmana inhibitorima molekule miR-16-5p pokazala je da je ekspresija oba gena statistički značajno smanjena u usporedbi s netretiranim stanicama. Navedeni tretman ima jači učinak na snižavanje ekspresije gena *BRCA1* (**Slika 16a, b**).

Suprotno tomu, nakon tretmana mimicima molekule miR-16-5p ekspresija oba gena bila je značajno pojačana u usporedbi s netretiranim stanicama. Međutim, u slučaju gena *BRCA2* nije statistički značajna (**Slika 16c, d**).

Što se tiče tretmana miR-107, zanimljivo je da nije bila prisutna značajna razlika između tretmana inhibitorima i mimicima pa tako oba tretmana pokazuju pojačanu ekspresiju gena *BRCA1/2* (**Slika 16**). Osim toga, tretman mimicima ove miRNA, pokazao je znatno jači utjecaj na pojačavanje ekspresije gena *BRCA1*.

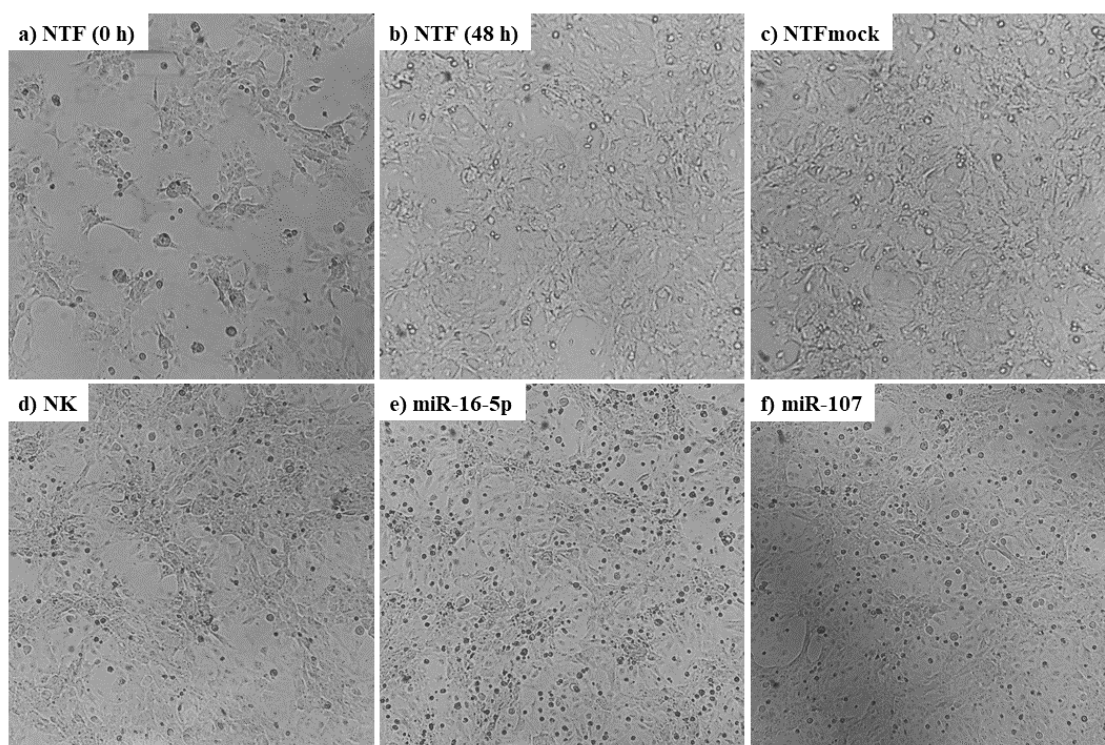


**Slika 16. Utjecaj tretmana mimika i inhibitora na ekspresiju gena BRCA1 i BRCA2.** Slike a) i b) prikazuju tretman inhibitorima (<sup>i</sup> = inhibitori), dok slike c) i d) prikazuju tretman mimicima (<sup>m</sup> = mimici). NTFmock = suspenzija stanica + optiMEM + RNAiMAX; NK (negativna kontrola) = suspenzija stanica + optiMEM + RNAiMAX + NKmimik/inhibitor; mimik/inhibitor miR-16-5p/miR-107 = suspenzija stanica + optiMEM + RNAiMAX + mimik/inhibitor miR-16-5p/miR-107. Tretirana je stanična linija karcinoma čovjeka OVCAR-8. Statistička analiza odrađena je nakon 48-satne inkubacije. Zvezdica (\*) označava statistički značajnu razliku  $P < 0,05$ . Genska ekspresija za svaki uzorak određena je u tehničkom triplikatu.

#### 4.2.2. MORFOLOGIJA STANIČNE LINIJE OVCAR-8 PRIJE I NAKON TRETMANA

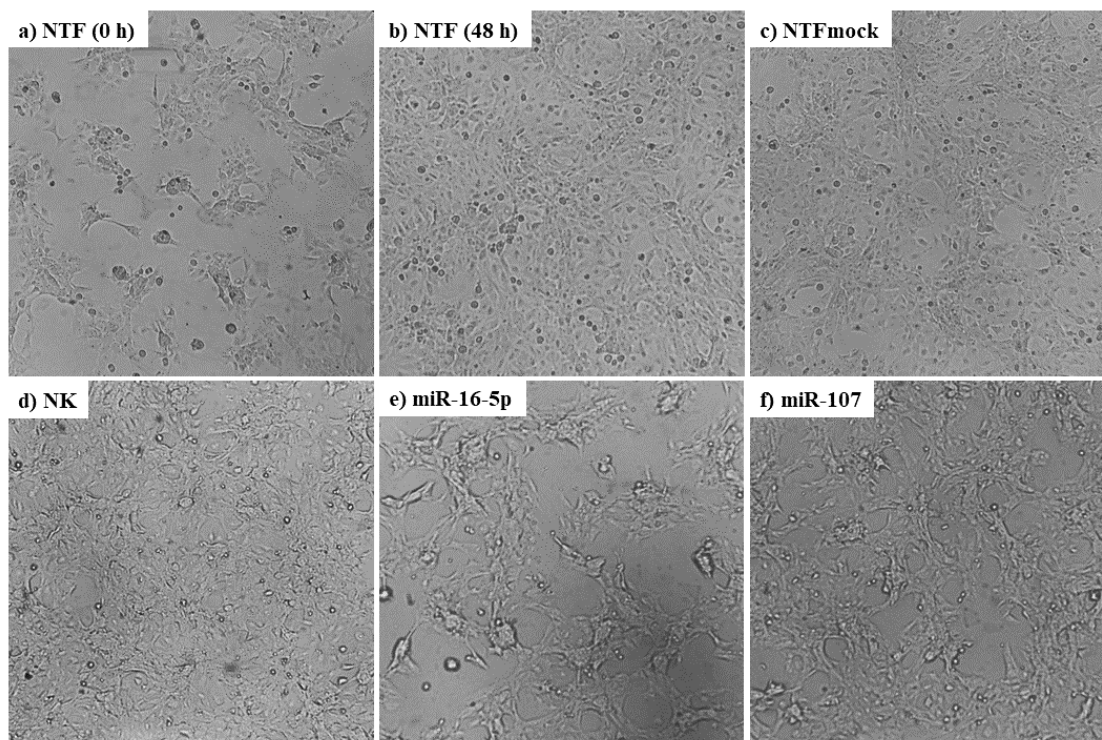
Promatranjem morfološkog izgleda stanica, vidljiv je određeni utjecaj tretmana mimika i inhibitora na staničnu liniju karcinoma jajnika OVCAR-8 nakon 48-satnog perioda inkubacije.

Općenito, nakon tretmana mimicima primijećeno je kako stanice pojačano umiru (na fotografijama vidljivo kao crne točkice (**Slika 17**)). Također, vidljivo je kako su stanice iz vretenastog oblika kakav imaju polazne netretirane stanice (**Slika 17a**), nakon tretmana mimicima poprimile okruglasti oblik. Međutim, stanična morfolologija stanica OVCAR-8 nakon 48-satnog perioda inkubacije značajno se ne razlikuje između (**b**) netretiranih stanica (NTF 48 h), (**c**) NTFmock-a tretiranog samo transfekcijskim reagensom, (**d**) negativne kontrole (NK) tretirane tranfekcijskim reagensom i stock-otopinom NK, kao ni tretmana (**e**) miR16-5p i (**f**) i miR-107 pojedinačno tretiranih transfekcijskim reagensom i stock-otopinama mimika ovih dviju miRNA (**Slika 17**).



**Slika 17. Morfološki prikaz stanične linije OVCAR-8 nakon 48-satnog tretmana mimicima.** NTF označava netretirane stanice (a) na početku i (b) nakon 48 h perioda inkubacije; (c) NTFmock = stanice tretirane transfekcijskim reagensom; (d) NK (negativna kontrola) = tranfekcijski reagens + mimik NK; (e) miR-16-5p = transfekcijski reagens + mimik miR-16-5p; (f) miR-107 = transfekcijski reagens + mimik miR-107. Fotografija je snimljena na inverznom svjetlosnom mikroskopu BIB-10 (Boeco, Hamburg, Njemačka), povećanje 10X.

S druge strane, nakon tretmana inhibitorima, primijetila sam kako je rast stanica usporen. Osim toga, nakon podvrgavanja ovom tretmanu stanice su manje adherentne te se gubi povezanost između stanica i površine, zbog čega plutaju u mediju kulture. Također je uočeno kako se stanice međusobno prerastaju (**Slika 18**).

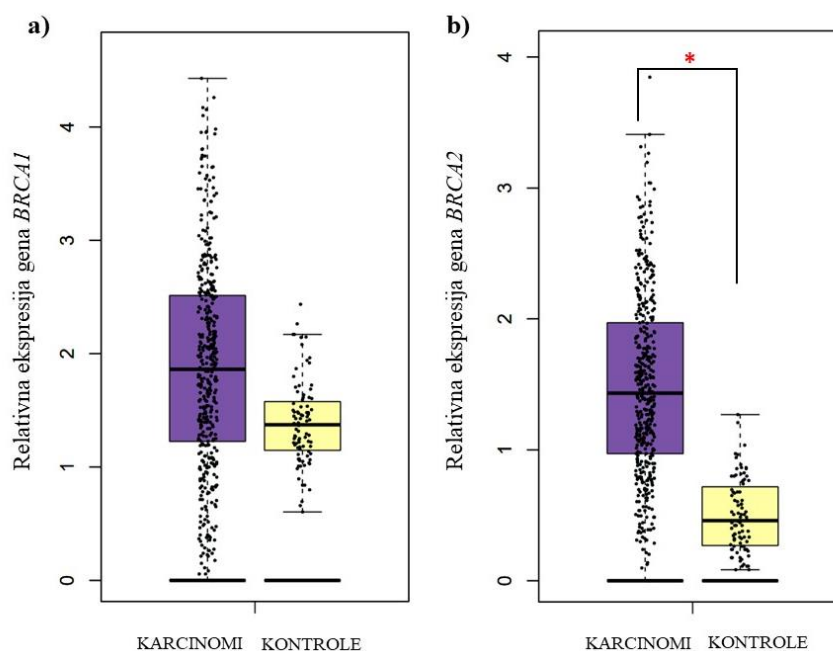


**Slika 18. Morfološki prikaz stanične linije OVCAR-8 nakon 48-satnog tretmana inhibitorima.** NTF označava netretirane stanice (a) na početku i (b) nakon 48 h perioda inkubacije; (c) NTFmock = stanice tretirane transfekcijskim reagensom; (d) NK (negativna kontrola) = transfekcijski reagens + inhibitor NK; (e) miR-16-5p = transfekcijski reagens + inhibitor miR-16-5p; (f) miR-107 = transfekcijski reagens + inhibitor miR-107. Fotografija je snimljena na inverznom svjetlosnom mikroskopu BIB-10 (Boeco, Hamburg, Njemačka), povećanje 10X.

Važno je naglasiti kako utjecaj miRNA na fenotip ne mora nužno biti povezan s utjecajem tih miRNA na ekspresiju istraživanih gena *BRCA1/2*.

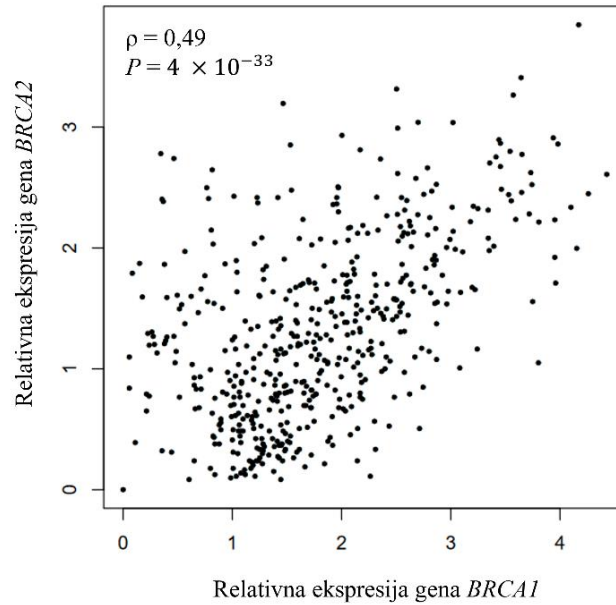
### 4.3. REZULTATI BIOINFORMATIČKE ANALIZE TRANSKRIPTOMSKIH PODATAKA

Bioinformatičkom analizom ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* u karcinomima jajnika i zdravim kontrolnim uzorcima, koja je dobivena analizom cjelokupnog transkriptoma (RNA-seq) na velikom broju uzoraka, potvrdila sam kako je, kao i u mojim rezultatima, samo gen *BRCA2* statistički značajno pojačano eksprimiran u karcinomima u odnosu na kontrole (**Slika 19**).



**Slika 19.** Ekspresija gena (a) *BRCA1* i (b) *BRCA2* u karcinomima jajnika i zdravim kontrolnim uzorcima dobivena analizom cjelokupnog transkriptoma (RNA-seq) velikog broja uzoraka. Statistička analiza provedena u web programu GEPIA2 pokazala je kako je samo gen *BRCA2* statistički značajno pojačano eksprimiran u karcinomima jajnika u odnosu na kontrolne uzorke. Zvezdica (\*) označava statistički značajnu razliku  $P < 0,05$ . (slike su preuzete i prilagođene s <http://gepia2.cancer-pku.cn/>)

Također, bioinformatičkom analizom transkriptomskih podataka, potvrdila sam da postoji pozitivna korelacija između ekspresija gena *BRCA1* i *BRCA2*, a prema vrijednosti koeficijenta korelacije riječ je o umjerenoj korelaciji ( $\rho = 0,49$ ;  $P = 4 \times 10^{-33}$ ) (**Slika 20**).



**Slika 20. Analiza cjelokupnog transkriptoma (RNA-seq) velikog broja uzoraka karcinoma jajnika i kontrolnog zdravog tkiva.** Vidljiva je pozitivna korelacija između ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2*. Analiza je provedena u web programu GEPIA2 (slika je preuzeta i prilagođena s <http://gepia2.cancer-pku.cn/>).

## 5. RASPRAVA

---

Nekoliko godina unatrag, Laboratorij za nasljedni rak (LNR) na Institutu Ruđer Bošković u kojemu je izrađen ovaj diplomski rad, proveo je profiliranje molekula mikroRNA pomoću metode mikročipova na manjem broju uzoraka seroznog raka jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i zdravih jajovoda, koji predstavljaju jedan od glavnih ishodišnih organa za HGSOC (Bergsten i sur. 2020). Rezultati su pokazali kako je ekspresija mikroRNA hsa-miR-16-5p i hsa-miR-107 bila statistički značajno pojačana u uzorcima HGSOC u odnosu na zdrave jajovode (neobjavljeni podaci). Analizom baze podataka eksperimentalno potvrđenih interakcija miRNA:mRNA TarBase.v8 (<http://www.microrna.gr/tarbase>; Karagkouni i sur. 2018) utvrđeno je da su geni *BRCA1* i *BRCA2* ciljni geni obje miRNA (Selbach i sur. 2008; Nelson i sur. 2011).

Prema hipotezi ovog rada ekspresija gena *BRCA1/2* mogla bi biti regulirana pomoću molekula miRNA miR-16-5p i miR-107, koje su dokazano pojačano eksprimirane u uzorcima HGSOC, budući da su geni *BRCA1/2* njihovi ciljni geni. Razlog tomu moglo bi biti vezivanje miRNA na 3'-UTR ciljnih gena čime se može prouzročiti transkripcijska represija ili potpuna degradacija molekula mRNA, što u konačnici ovisi o komplementarnosti miRNA:mRNA (He i Hannon 2004; Fang i Rajewsky 2011).

Poznato je kako proteinski produkti gena *BRCA1* i *BRCA2* igraju vrlo važne uloge u održavanju cjelovitosti genoma kroz proces preciznog popravka DNA procesom homologne rekombinacije (Gudmundsdottir i Ashworth, 2006). Narušavanje te cjelovitosti, odnosno funkcionalni gubitak gena *BRCA1/2*, dovodi do onkogene transformacije netumorigenih stanica u stanice koje potiču tumorigenezu ili u matične stanice raka (engl. *cancer stem cells*, CSC). Takva transformacija patogena je osnova za nastanak zloćudnih bolesti, osobito raka jajnika i dojke (Gorodetska i sur. 2019).

Prema svemu navedenom, glavni cilj mog istraživanja bio je pomoću metode qRT-PCR na proširenom setu uzoraka sačinjenom od 70 uzoraka tkiva seroznog raka jajnika visokog stupnja malignosti (*karcinomi*) i 23 uzorka zdravih jajovoda (*kontrole*) odrediti relativnu ekspresiju gena *BRCA1/2*, te molekula miRNA hsa-miR-16-5p i hsa-miR-107 kod kojih je dokazano da su geni *BRCA1/2* ciljni geni za obje ove molekule. Dobiveni rezultati potvrdili su rezultate koje je dobio LNR pomoću metode profiliranja mikročipovima, što je podudarno i s

literaturnim podacima koji potvrđuju veliku podudarnost u rezultatima koji su dobiveni ovim dvama tehnikama (Etienne i sur. 2004; Morey i sur. 2006; Camarillo i sur. 2011).

Usporedbom apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija, pokazala sam da je molekula miR-16-5p bila jače eksprimirana i u kontrolama i u karcinomima u odnosu na molekulu miR-107 (**Tablica 15, Slika 9**). Nadalje, molekula miR-16-5p pokazala je statistički značajnu pojačanu ekspresiju ( $P = 0,001$ ) u karcinomima u odnosu na kontrole (**Slika 10**) što potvrđuje i istraživanje koje su proveli Saral i sur. (2022), ali i brojna istraživanja promjene u ekspresiji ove miRNA provedena na drugim karcinomima uključujući rak dojke (Qu i sur. 2017), osteosarkom (Gu i sur. 2020), hepatoceklularni karcinom (Cheng i sur. 2019), gliom (Krell i sur. 2019), rak grlića maternice (Zhang i sur. 2020a) te neuroblastom (Zhang i sur. 2020b).

Usporedbom razine ekspresije u kontrolama i karcinomima, molekula miR-107 se također pokazala pojačano eksprimiranom u karcinomima u odnosu na kontrole (**Slika 11**), a vrijednost ekspresije bila je statistički značajna ( $P < 0,0001$ ). Pojačanu ekspresiju ove molekule u tkivima HGSOc u odnosu na zdrave jajovode potvrđuju i Wilczynski i sur. (2020), koji ju ujedno povezuju i s lošijim kliničkim ishodom. Također, prekomjerna ekspresija miR-107 potvrđena je i u drugim tipovima karcinoma poput raka mokraćnog mjehura gdje je pojačana ekspresija ove molekule pozitivno korelirala sa stadijem tumora (Wilczynski i sur. 2020), dok Li i sur. (2011) predlažu da prekomjerna ekspresija miR-107 kod raka želudca može čak biti povezana s metastazama.

Daljnji cilj istraživanja ovog diplomskog rada bio je utvrditi i eksprimiranost gena *BRCA1* i *BRCA2* u karcinomima u odnosu na kontrole. Oba gena bila su eksprimirana u 95,65 % uzoraka kontrola (22/23) i 90 % uzoraka karcinoma (63/70), a zanimljiv je izostanak ekspresije oba gena u istim uzorcima karcinoma. Usporedbom apsolutnih vrijednosti relativnih ekspresija, pokazala sam da je u kontrolama gen *BRCA1* jače eksprimiran u odnosu na gen *BRCA2*, dok je u karcinomima njihova ekspresija približno jednaka (**Tablica 16, Slika 12**). Međutim, samo je ekspresija gena *BRCA2* bila je statistički značajno jača u karcinomima u odnosu na kontrole ( $P < 0,0001$ ). Iako je znanstveno potvrđena pojačana eksprimiranost gena *BRCA1* kao i njegovo pojavljivanje kod bolesnika s uznapredovanim stadijem HGSOc (Lakhani i sur. 2004; Wang i sur. 2018; Manchana i sur. 2019), razlika u ekspresiji gena *BRCA1* između karcinoma i kontrola u mom istraživanju nije se pokazala statistički značajnom ( $P = 0,644$ ) (**Slika 13**). Olbromski i sur. (2022) u svojem istraživanju provedenom na 60 uzoraka karcinoma jajnika i 30 kontrolnih uzoraka zdravih jajnika također nisu primijetili statistički značajne promjene u ekspresiji gena



*BRCA1* u bolesnica s karcinomom jajnika u usporedbi s kontrolnom skupinom. Osim toga, i korištenjem web programa GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) za analizu podataka genoma i transkriptoma dobiju se rezultati identični mojima (**Slika 19**) (Tang i sur. 2019).

U ovom pogledu, značajni su i rezultati koje su objavili Wang i sur. (2018), koji nakon različitih bioinformatičkih analiza pokazuju kako, u slučaju raka jajnika, korelacija između razine ekspresije gena *BRCA1* i stope preživljenja bolesnika nije pronađena, za razliku od *BRCA2* čija je visoka razina ekspresije povezana sa niskom stopom preživljenja bolesnika s rakom jajnika. S obzirom na to da tumorske stanice pojačano proliferiraju te su genomske nestabilne, zbog čega je pojačana i potreba za popravljanjem molekule DNA, rezultat toga mogla bi biti i pojačana ekspresija gena *BRCA1/2* (Tsibulak i sur. 2018).

Nadalje, analizom rezultata o povezanosti (korelaciji) između ekspresija istraživanih mikroRNA i njihovih ciljnih gena *BRCA1* i *BRCA2*, utvrdila sam kako je ekspresija oba istraživana gena međusobno statistički značajno povezana, iako je po vrijednosti  $\rho$ -koeficijenta riječ o umjerenoj korelaciji ( $\rho = 0,51$ ;  $P < 0.0001$ ) (**Tablica 17**). Ovakvi rezultati također su dobiveni i analizom podataka putem spomenutog web programa GEPIA2 (**Slika 20**). Također, jednake rezultate potvrdili su i Rajan i sur. (1996), koji su primijetili kako je ekspresija mRNA ovih gena regulirana sličnim staničnim putevima koji su uključeni u kontrolu stanične proliferacije i diferencijacije u epitelnim stanicama dojke. Možda bi određivanje razine ekspresijskih profila gena *BRCA1* i *BRCA2* moglo poslužiti kao novi dijagnostički biljeg u otkrivanju i/ili liječenju raka jajnika, ali to još uvijek, unatoč pokušajima, nije eksperimentalno potvrđeno (Olbromski i sur. 2022)

Nadalje, utvrdila sam kako je i ekspresija obje istraživane molekule miRNA miR-16-5p i miR-107 također međusobno statistički značajno povezana ( $\rho = 0,52$ ;  $P < 0.0001$ ), a prema vrijednosti  $\rho$ -koeficijenta riječ je o umjerenoj pozitivnoj korelaciji (**Tablica 17**). To ukazuje na moguću povezanu regulaciju ekspresije ove dvije miRNA, a takva regulacija često je prisutna između različitih klastera za miRNA (engl. *miRNA clusters*, MC) sačinjenih od dva ili više gena miRNA zajedno transkribiranih i jednako orijentiranih (Kandettu i sur. 2022). Osim toga, poznato je kako obje ove miRNA pripadaju velikoj obitelji miR-15/107, što je definirano prema sekvenci AGCAGC koju sadrže u blizini 5' kraja zrele miRNA. Molekule iz ove obitelji međusobno se potpomažu u zajedničkoj ulozi regulacije ekspresije gena uključenih u staničnu diobu i metabolizam, odgovoru na stanični stres i angiogenezu, ali i uključenosti u ljudske karcinome, te kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Finnerty i sur. 2010).

S druge strane, u slučaju miR-107 bila je prisutna i slaba pozitivna korelacija između ekspresija ove molekule i gena *BRCA2* ( $\rho = 0,31$ ;  $P = 0,004$ ) (**Tablica 17**). Do sada nisu pronađeni literaturni izvori koji bi potvrdili ovakvu interakciju. Ipak, s druge strane, Quann i sur. (2015) pokazuju potencijal regulacije gena *BRCA1* nestandardnim interakcijama miRNA iz obitelji miR15/107 koje se pojavljuju unutar kodirajuće regije, gdje nakon 48-satne transfekcije prekursori miR15/107 uspješno potiskuju transkript *BRCA1* u ovisnosti o staničnom tipu. Također, miR-107 dokazano stupa u interakciju i s drugim važnim produktima koji, na kraju krajeva, stupaju u interakciju s genima *BRCA1/2* preko puteva popravka i održavanja cjelovitosti genoma. Tako je dokazano i kako miR-107 posttranskripcijski utišava ekspresiju *RAD51*, koji igra bitnu ulogu u homolognoj rekombinaciji i deregulaciji svojih medijatora poput *BRCA1/2* (Huang i sur. 2013). Ovi podaci pokazuju da prekomjerna ekspresija miR-107 također potiče genomsku nestabilnost.

Kao što je već spomenuto, visoka stopa smrtnosti od HGSOE najviše je uzrokovana nedostatkom specifičnih simptoma koji bi ovu bolest u ranoj fazi razlikovali od drugih mokraćnih ili gastrointestinalnih bolesti (Lisio i sur. 2019). Stoga bi novi dijagnostički pristup kao i otkriće boljih i preciznijih biljega uvelike doprinio liječenju ove agresivne bolesti. Za sada, jedini tumorski biljeg koji je u primjeni je CA125, a koristi se već više od četiri desetljeća. CA125 je glikoprotein smješten na površini stanica raka jajnika, koji se kvantificira u uzorcima seruma pacijenata. Međutim, korištenje ovog biljega nije uvelike doprinijelo u dijagnosticiranju bolesti u prvom i drugom stadiju, a samim time ni poboljšalo preživljenje pacijenata (Charkhchi i sur. 2020). Razlog leži u njegovoj nemogućnosti da se koristi za probir, te se njime ne mogu testirati asimptomatske osobe zbog čega često može rezultirati lažno pozitivnim rezultatima (Henderson i sur. 2018). Osim toga, povećane razine CA125 u serumu primijećene su i u drugim fiziološkim i patološkim stanjima (menstruacija, trudnoća, endometriozna, upalne bolesti peritoneuma) (Buamah 2000).

Analizom krivulje ROC određena je dijagnostička vrijednost ekspresija istraživanih molekula RNA. Po vrijednosti površine ispod krivulja ROC (AUC), ali i po obliku same krivulje, moguće je procijeniti učinkovitost testa. Također, dijagnostička točnost testa je veća što je krivulja bliža gornjem lijevom rubu grafa i što je njena površina veća. AUC može imati bilo koju vrijednost između 0 i 1, ali ukoliko je ta vrijednost manja ili jednaka 0,5, ispitivani dijagnostički biljezi nemaju dijagnostičku vrijednost, odnosno dovoljnu snagu diskriminacije za razlikovanje tumorskog od zdravog tkiva. Analizom površina ispod krivulja ROC (AUC) utvrdila sam kako je statistički značajna vrijednost izražena u slučaju ekspresija obje istraživane

mikroRNA, miR-107 i miR-16-5p, te gena *BRCA2* (**Tablica 18, Slika 15**). Pri tome, relativna ekspresija miR-107 ( $> 0,552661611$ ) i *BRCA2* ( $> 0,001790587$ ) pokazuje izvrsnu dijagnostičku vrijednost ( $AUC > 0,8$ ), dok relativna ekspresija miR-16-5p ( $> 1,047704691$ ) ima slabu dijagnostičku vrijednost ( $AUC = 0,685$ ). Prema navedenom, moguće je zaključiti kako su biljezi miR-107 i *BRCA2* djelomično usporedivi s postojećim tumorskim biljegom CA125, s obzirom na to da se njegova osjetljivost i specifičnost kreće između 75 - 90 % (Dochez i sur. 2019). Ipak, zbog niske prevalencije raka jajnika, idealan test probira trebao bi imati osjetljivost iznad 75 % i specifičnost od najmanje 99,6 % (Charkhchi i sur. 2020). Moguće je i kako bi kombinacija jednog od ovih biljega s CA125 mogla pridonijeti njegovoj točnosti.

Kako bi se proučila funkcija miRNA, ključno je proučiti i sposobnost mijenjanja njene količine. Osim toga ova metoda se koristi i za identifikaciju ciljnih mjesta miRNA u mRNA. U tom pogledu, primjenjuju se dvolančani egzogeni mimici koji oponašaju miRNA nakon transfekcije u stanicu i jednolančani komplementarni inhibitori RNA (engl. *antisense microRNAs*, antimiRs) koji nakon transfekcije inhibiraju njeno djelovanje (Qiagen 2015). Utjecaj ovih tretmana najčešće se procjenjuje pomoću metode qRT-PCR, ali je važno naglasiti kako ova metoda ne prikazuje točnu funkcionalnu razinu miRNA (Thomson i sur. 2013). Naposljetku je određen utjecaj tretmana spomenutih mimika i inhibitora na promjenu ekspresije gena *BRCA1/2* u staničnoj liniji karcinoma jajnika OVCAR-8. Moji rezultati su pokazali da tretman stanične linije OVCAR-8 mimicima i inhibitorima miR-16-5p i miR-107 ima statistički značajan utjecaj na ekspresiju gena *BRCA1* i *BRCA2* ( $P < 0,05$  za oba gena). Korištena je negativna kontrola koja služi kao potvrda da se opažana promjena ekspresije gena u stanici domaćinu ne može pripisati transfekcijskom reagensu umjesto tretmanima. Prema tome, pokazala sam kako usporedbom tretmana NTFmock koji je sadržavao suspenziju stanica, suplement opti-MEM i transfekcijski reagens RNAiMAX, s tretmanom NK koji je osim navedenog sadržavao i stock-otopinu negativne kontrole mimika ili inhibitora, transfekcijski reagens nema statistički značajan utjecaj na ekspresiju gena *BRCA1/2*, što je bilo u skladu s očekivanjima.

Suprotno očekivanjima, pokazali su se rezultati nakon tretmana inhibitorima i mimicima molekule miR-16-5p, gdje se ispostavilo kako je nakon tretmana inhibitorima ekspresija u slučaju oba gena značajno smanjena u usporedbi s netretiranim stanicama (**Slika 16a, b**). Ovaj tretman pokazao je jači učinak u smanjenju ekspresije gena *BRCA1*. Premda ovakvi rezultati još uvijek nisu pronađeni kod raka jajnika, postoje nalazi koji pokazuju slične rezultate u kojima inhibitori miRNA snižavaju ekspresiju ciljnih gena u drugim tipovima tumora. Na primjer,

Fletcher i sur. (2019) na staničnoj liniji raka prostate C42 i LNCaP pokazuju kako, u ovisnosti o dozi, inhibitori miR-346, miR-361-3p i miR-197 značajno smanjuju razine proteina AR, premda je u staničnim linijama raka vrata maternice, želuca i debelog crijeva pokazano suprotno, te u njima miR-346 povećava razine mRNA i proteinskog produkta gena *AGO2*.

S druge strane, nakon tretmana mimicima molekule miR-16-5p ekspresija oba gena bila je značajno pojačana u usporedbi s netretiranim stanicama, pri čemu je jedino pojačana ekspresija *BRCA1* bila statistički značajna (**Slika 16c, d**). Prema ovom fenomenu, molekula miRNA miR-16-5p ima pozitivan utjecaj na ekspresiju gena *BRCA1/2*, odnosno njena potencijalna uloga nije smanjenje, nego pojačavanje ekspresije ovih gena. Ovakve rezultate potvrđuje sve veći broj objavljenih istraživanja koji pokazuju kako određene miRNA i njima pridruženi proteinski kompleksi (mikroribonukleoproteini ili mikroRNP) mogu dodatno posttranskripcijski izravno i neizravno stimulirati ekspresiju gena (Vasudevan 2012). Slično situaciji u kojoj miRNA utišavaju ekspresiju gena, pojačana ekspresija ciljnog gena pomoću miRNA može biti različita te varirati od manjih do značajnih pojačanja ekspresije, što u konačnici ima i različit značaj za sami ciljni gen (Lee i Vasudevan 2013).

Što se tiče tretmana miR-107, rezultati su zbunjujući jer oba tretmana dovode do pojačane ekspresije gena *BRCA1/2* (**Slika 16**). Kod gena *BRCA2*, tretman inhibitorima miR-107 ipak nije imao statistički značajan utjecaj na ekspresiju.

Naposljetku, ako izuzmemo rezultat inhibitora miR-107, možemo pretpostaviti kako uistinu tretmani pokazuju obrnuti utjecaj te da je riječ o pozitivnoj regulaciji ekspresije ovih gena putem molekula miRNA. To dodatno potvrđuje rezultat na tkivima gdje je pokazana pozitivna korelacija između ekspresije miR-107 i gena *BRCA2* ( $\rho = 0,31$ ;  $P = 0,004$ ) (**Tablica 17**). Premda se dugo vremena smatralo kako miRNA djeluju isključivo negativno na ekspresiju ciljnih gena, noviji eksperimentalni dokazi pokazuju kako pod određenim uvjetima miRNA mogu aktivirati njihovu ekspresiju (Vasudevan i sur. 2007) i na taj način izvršiti svoje esencijalne uloge u različitim vrstama raka. Do sada je pronađeno više od 200 pozitivnih regulacija ekspresije gena putem miRNA (Xu i sur. 2020). Tan i sur. (2019) prvi su istražili takvu regulaciju analiziravši profile interakcije miRNA:mRNA u 8375 uzoraka pacijenata u 31 najučestalijem tipu raka kod ljudi koje su preuzeli iz baze podataka Atlasa genoma ljudskog raka (TCGA). Utvrdili su kako pozitivne korelacije između ekspresija miRNA i njihovih ciljnih gena također imaju važne uloge u biološkim procesima povezanim s brojnim obilježjima raka poput imunološkog odgovora, kontrole staničnog ciklusa i signalizacije stanične membrane.

Važno je naglasiti kako se ovakva interakcija uvelike razlikovala između uvjeta *in vitro* i *in vivo*.

Dodatno, moguće objašnjenje dobivenih rezultata nameće se i u pitanju trajanja tretmana mimicima i inhibitorima, koje je u našem slučaju uzeto na osnovu duljine tretmana koja se najčešće prikazuje u literaturi (48 h) (Thomson i sur. 2013; Zhang i sur. 2019b). Osim toga, koncentracija inhibitora i mimika, koja je u mom slučaju 15 nM, također može biti važan faktor (Jin i sur. 2015). Značajnu razliku između dobivenih rezultata može pokazivati i odabrana stanična linija raka jajnika, budući da različite stanične linije pokazuju različita svojstva u pogledu agresivnosti, metastatskom potencijalu, kemorezistenciji, kao i samom njihovom porijeklu (Wilczynski i sur. 2020). Naposljetku, rezultati mogu varirati i u korištenju različitih pragova za analizu statističkih rezultata. Thomson i sur. (2013) također navode i kako transfekcija inhibitorima može odstupati iz razloga što razine inhibitora iz staničnih vezikula nakon lize stanice mogu izravno interferirati s reakcijom PCR korištenom kako bi se izmjerila razina ekspresije korištenih miRNA.

Naposljetku, iako smo svjedoci kako je istraživanje regulatornih uloga miRNA tijekom posljednjeg desetljeća u porastu, samo mali broj istraživanja prikazuje točne promjene pod specifičnim staničnim uvjetima, a uz to, veliki broj postojanih tvrdnji međusobno si proturječi. Prema tome, nedvojbeno, potrebno je otkriti veliki broj postojećih enigmi kako bi se mogli definirati mehanički detalji u regulaciji ekspresije gena *BRCA1* i *BRCA2* posredovane miRNA.

## 6. ZAKLJUČAK

---

Istraživanje provedeno u ovom diplomskom radu dovelo je do nekoliko zaključaka:

1. Analizom genske ekspresije pomoću metode qRT-PCR na proširenom setu uzoraka svježeg tkiva HGSOE i kontrolnih uzoraka zdravih jajovoda potvrđeni su rezultati dobiveni profiliranjem ekspresije pomoću metode mikročipova na malom setu uzoraka.
2. Ekspresija molekula miRNA miR-16-5p i miR-107, čiji su geni *BRCA1/2* ciljni geni, kao i gena *BRCA2*, pokazala se statistički značajno pojačanom u uzorcima karcinoma u odnosu na kontrolne uzorke. Ekspresija miR-16-5p u ovom tipu karcinoma bila je jača u odnosu na miR-107.
3. Pokazana je međusobna pozitivna korelacija između ekspresija gena *BRCA1* i *BRCA2*, te između ekspresija istraživanih miRNA čime je ukazano na još jednu potencijalnu regulaciju ekspresije između dviju miRNA. Pozitivna, ali slaba korelacija potvrđena je i između ekspresija molekule miR-107 i gena *BRCA2*, što ukazuje i na pozitivnu povezanost u njihovim ekspresijama. Na osnovu ovih rezultata nije moguće utvrditi uzročno-posljedične veze.
4. Analizom krivulja ROC utvrđena je i statistički značajna vrijednost za razlikovanje tkiva HGSOE od tkiva zdravih jajovoda u ekspresijama miR-16-5p, miR-107 i *BRCA2*. Pri tome, miR-107 i *BRCA2* pokazuju izvrsnu snagu diskriminacije što ujedno znači i izvrsnu dijagnostičku vrijednost ( $AUC > 0,8$ ). Nažalost, osjetljivost i specifičnost kod ova dva potencijalna dijagnostička biljega ipak nije dovoljno visoka da bi se njihovom primjenom za dijagnosticiranje oboljelih od HGSOE dobili dovoljno precizni rezultati.
5. Tretiranje stanične linije karcinoma jajnika OVCAR-8 mimicima i inhibitorima istraživanih miRNA općenito ukazuje kako ove molekule miRNA potencijalno pozitivno reguliraju gensku ekspresiju *BRCA1/2*, što je podudarno s kliničkim rezultatima. Međutim, kod tretmana inhibitorom miR-107 rezultat je suprotan od očekivanog, te bi mogao biti objašnjen trajanjem tretmana ili korištenom koncentracijom stock-otopine ove miRNA.

## 7. LITERATURA

---

- Abreu Costa L. De, Ottoni M.H.F., Santos M.G. Dos, Meireles A.B., Almeida V.G. De, Fátima Pereira W. De, Avelar-Freitas B.A. De, Brito-Melo G.E.A. (2017): Dimethyl sulfoxide (DMSO) decreases cell proliferation and TNF- $\alpha$ , IFN-, and IL-2 cytokines production in cultures of peripheral blood lymphocytes. *Molecules* **22**: 1789.
- Al-Mulla F., Bland J.M., Serratt D., Miller J., Chu C., Taylor G.T. (2009): Age-dependent penetrance of different germline mutations in the BRCA1 gene. *J. Clin. Pathol.* **62**: 350 – 356.
- Alshamrani A.A. (2020): Roles of microRNAs in Ovarian Cancer Tumorigenesis: Two Decades Later, What Have We Learned? *Front. Oncol.* **10**: 1084 (1 – 19).
- Andreassen P.R., Seo J., Wiek C., Hanenberg H. (2021): Understanding BRCA2 function as a tumor suppressor based on domain-specific activities in DNA damage responses. *Genes (Basel)*. **12**: 1034.
- Babarović E., Krašević M., Eminović S. (2016): Recent concepts of ovarian cancer pathogenesis. *Med. Flum.* **52**: 362 – 369.
- Bakir M. Al, Gabra H. (2014): The molecular genetics of hereditary and sporadic ovarian cancer: Implications for the future. *Br. Med. Bull.* **112**: 57 – 69.
- Bast R.C., Hennessy B., Mills G.B. (2009): The biology of ovarian cancer: New opportunities for translation. *Nat. Rev. Cancer* **9**: 415 – 428.
- Bentwich I., Avniel A., Karov Y., Aharonov R., Gilad S., Barad O., Barzilai A., Einat P., Einav U., Meiri E., Sharon E., Spector Y., Bentwich Z. (2005): Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Genet.* **37**: 766 – 770.
- Bergsten T.M., Burdette J.E., Dean M. (2020): Fallopian tube initiation of high grade serous ovarian cancer and ovarian metastasis: Mechanisms and therapeutic implications. *Cancer Lett.* **476**: 152 – 160.
- Berns E.M.J.J., Bowtell D.D. (2012): The changing view of high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res.* **72**: 2701 – 2704.
- Bertwistle D., Ashworth A. (1998): Functions of the BRCA1 and BRCA2 genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 14 – 20.
- Buamah P. (2000): Benign conditions associated with raised serum CA-125 concentration. *J. Surg. Oncol.* **75**: 264 – 265.
- Burges A., Schmalfeldt B. (2011): Ovarialkarzinom: Diagnostik und therapie. *Dtsch. Arztebl.* **108**: 635 – 641.
- Buyss S.S., Partridge E., Black A., Johnson C.C., Lamerato L., Isaacs C., Reding D.J., Greenlee R.T., Yokochi L.A., Kessel B., Crawford E.D., Church T.R., Andriole G.L., Weissfeld J.L., Fouad M.N., Chia D., O'Brien B., Ragard L.R., Clapp J.D., Rathmell J.M., Riley T.L., Hartge P., Pinsky P.F., Zhu C.S., Izmirlian G., Kramer B.S., Miller A.B., Xu J.L.,

- Prorok P.C., Gohagan J.K., Berg C.D. (2011): Effect of screening on ovarian cancer mortality: The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) cancer screening randomized controlled trial. *JAMA* **305**: 2295 – 2302.
- Calin G.A., Croce C.M. (2006): MicroRNA-cancer connection: The beginning of a new tale. *Cancer Res.* **66**: 7390 – 7394.
- Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C.M. (2002): Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 15524 – 15529.
- Camarillo C., Swerdel M., Hart R.P. (2011): Comparison of microarray and quantitative real-time PCR methods for measuring MicroRNA levels in MSC cultures. *Methods Mol. Biol.* **698**: 419 – 429.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2011): Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**: 609–615.
- Chan K.Y.K., Ozçelik H., Cheung A.N.Y., Ngan H.Y.S., Khoo U.-S. (2002): Epigenetic factors controlling the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res.* **62**: 4151 – 4156.
- Chang S., Sharan S.K. (2012): BRCA1 and MicroRNAs: Emerging networks and potential therapeutic targets. *Mol. Cells* **34**: 425 – 432.
- Chang S., Wang R.H., Akagi K., Kim K.A., Martin B.K., Cavallone L., Haines D.C., Basik M., Mai P., Poggi E., Isaacs C., Looi L.M., Mun K.S., Greene M.H., Byers S.W., Teo S.H., Deng C.X., Sharan S.K. (2011): Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155. *Nat. Med.* **17**: 1275 – 1282.
- Charkhchi P., Cybulski C., Gronwald J., Wong F.O., Narod S.A., Akbari M.R. (2020): Ca125 and ovarian cancer: A comprehensive review. *Cancers (Basel)*. **12**: 1 – 29.
- Chen S.N., Chang R., Lin L. Te, Chern C.U., Tsai H.W., Wen Z.H., Li Y.H., Li C.J., Tsui K.H. (2019): MicroRNA in ovarian cancer: Biology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **16**: 1510.
- Chen V.W., Ruiz B., Killeen J.L., Coté T.R., Wu X.C., Correa C.N., Howe H.L. (2003): Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* **97**: 2631 – 2642.
- Cheng B., Ding F., Huang C.Y., Xiao H., Fei F.Y., Li J. (2019): Role of miR-16-5p in the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**: 137 – 145.
- Colvin E.K., Howell V.M. (2020): Why the dual origins of high grade serous ovarian cancer matter. *Nat. Commun.* **11**: 1200.
- Cortez M.A., Bueso-Ramos C., Ferdin J., Lopez-Berestein G., Sood A.K., Calin G.A. (2011): MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**: 467 – 477.
- Deb B., Uddin A., Chakraborty S. (2018): miRNAs and ovarian cancer: An overview. *J. Cell.*



- Physiol. **233**: 3846 – 3854.
- Dexheimer P.J., Cochella L. (2020): MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**: 433.
- Dhawan A., Scott J.G., Harris A.L., Buffa F.M. (2018): Pan-cancer characterisation of microRNA across cancer hallmarks reveals microRNA-mediated downregulation of tumour suppressors. *Nat. Commun.* **9**: 1 – 13.
- Dochez V., Caillon H., Vaucel E., Dimet J., Winer N., Ducarme G. (2019): Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA. *J. Ovarian Res.* **12**: 1 – 9.
- Ducie J., Dao F., Considine M., Olvera N., Shaw P.A., Kurman R.J., Shih I.M., Soslow R.A., Cope L., Levine D.A. (2017): Molecular analysis of high-grade serous ovarian carcinoma with and without associated serous tubal intra-epithelial carcinoma. *Nat. Commun.* **8**: 990.
- Esquela-Kerscher A., Slack F.J. (2006): Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**: 259 – 269.
- Esteller M. (2011): Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **12**: 861 – 874.
- Etheridge A., Lee I., Hood L., Galas D., Wang K. (2011): Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **717**: 85 – 90.
- Etienne W., Meyer M.H., Peppers J., Meyer R.A. (2004): Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray. *Biotechniques* **36**: 618 – 626.
- Fang Z., Rajewsky N. (2011): The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs. *PLoS One* **6**: e1806.
- Fathalla M.F. (1971): Incessant Ovulation-A Factor in Ovarian Neoplasia? *Lancet* 163.
- Fawcett T. (2006): An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognit. Lett.* **27**: 861 – 874.
- Finnerty J.R., Wang W.X., Hébert S.S., Wilfred B.R., Mao G., Nelson P.T. (2010): The miR-15/107 group of MicroRNA genes: Evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases. *J. Mol. Biol.* **402**: 491 – 509.
- Fletcher C.E., Sulpice E., Combe S., Shibakawa A., Leach D.A., Hamilton M.P., Chrysostomou S.L., Sharp A., Welti J., Yuan W., Dart D.A., Knight E., Ning J., Francis J.C., Kounatidou E.E., Gaughan L., Swain A., Lupold S.E., Bono J.S. de, McGuire S.E., Gidrol X., Bevan C.L. (2019): Androgen receptor-modulatory microRNAs provide insight into therapy resistance and therapeutic targets in advanced prostate cancer. *Oncogene* **38**: 5700 – 5724.
- Fradet-Turcotte A., Sitz J., Grapton D., Orthwein A. (2016): BRCA2 functions: From DNA repair to replication fork stabilization. *Endocr. Relat. Cancer* **23**: T1 – T17.
- Futaki M., Liu J.M. (2001): Chromosomal breakage syndromes and the BRCA1 genome surveillance complex. *Trends Mol. Med.* **7**: 560 – 565.
- Goff B.A., Mandel L., Muntz H.G., Melancon C.H. (2000): Ovarian carcinoma diagnosis: Results of a national ovarian cancer survey. *Cancer* **89**: 2068 – 2075.

- Gonçalves D., Pires A.S., Marques I.A., Gomes I., Sousa G., Botelho M.F., Abrantes A.M. (2022): An Overview on Radiation Sensitivity in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *Cancers (Basel)*. **14**: 3254.
- Gorodetska I., Kozeretska I., Dubrovska A. (2019): BRCA genes: The role in genome stability, cancer stemness and therapy resistance. *J. Cancer* **10**: 2109 – 2127.
- GTEX Consortium (2013): The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* **45**: 580–585.
- Gu S., Jin L., Zhang F., Sarnow P., Kay M.A. (2009): Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 144 – 150.
- Gu Z., Li Z., Xu R., Zhu X., Hu R., Xue Y., Xu W. (2020): miR-16-5p Suppresses Progression and Invasion of Osteosarcoma via Targeting at Smad3. *Front. Pharmacol.* **11**: 1324.
- Gudmundsdottir K., Ashworth A. (2006): The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* **25**: 5864 – 5874.
- Hammond S.M. (2015): An overview of microRNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **87**: 3 – 14.
- Hawsawi Y.M., Al-Numair N.S., Sobahy T.M., Al-Ajmi A.M., Al-Harbi R.M., Baghdadi M.A., Oyouni A.A., Alamer O.M. (2019): The role of BRCA1/2 in hereditary and familial breast and ovarian cancers. *Mol. Genet. Genomic Med.* **7**: e879.
- Hayes J., Peruzzi P.P., Lawler S. (2014): MicroRNAs in cancer: Biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol. Med.* **20**: 460 – 469.
- He L., Hannon G.J. (2004): MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5**: 522 – 531.
- Henderson J.T., Webber E.M., Sawaya G.F. (2018): Screening for ovarian cancer updated evidence report and systematic review for the US preventive services task force. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **319**: 595 – 606.
- Horvitz H.R., Sulston J.E. (1980): Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **96**: 435 – 454.
- Huang J.W., Wang Y., Dhillon K.K., Calses P., Villegas E., Mitchell P.S., Tewari M., Kemp C.J., Taniguchi T. (2013): Systematic screen identifies miRNAs that target RAD51 and RAD51D to enhance chemosensitivity. *Mol. Cancer Res.* **11**: 1564 – 1573.
- Jasin M. (2002): Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: The BRCA connection. *Oncogene* **21**: 8981 – 8993.
- Jayson G.C., Kohn E.C., Kitchener H.C., Ledermann J.A. (2014): Ovarian cancer. *Lancet* **384**: 1376 – 1388.
- Jazaeri A.A., Yee C.J., Sotiriou C., Brantley K.R., Boyd J., Liu E.T. (2002): Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**: 990 – 1000.
- Jelovac D., Armstrong D.K. (2011): Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian

- cancer. *CA. Cancer J. Clin.* **61**: 183 – 203.
- Jiang S., Yan W. (2016): Current View of microRNA Processing. *Sign. Transduct. Insights* **5**: 9 – 13.
- Jin H.Y., Gonzalez-Martin A., Miletic A. V., Lai M., Knight S., Sabouri-Ghomi M., Head S.R., Macauley M.S., Rickert R.C., Xiao C. (2015): Transfection of microRNA mimics should be used with caution. *Front. Genet.* **6**: 340.
- Kandettu A., Adiga D., Devi V., Suresh P.S., Chakrabarty S., Radhakrishnan R., Kabekkodu S.P. (2022): Deregulated miRNA clusters in ovarian cancer: Imperative implications in personalized medicine. *Genes Dis.* **9**: 1443 – 1465.
- Karagkouni D., Paraskevopoulou M.D., Chatzopoulos S., Vlachos I.S., Tastsoglou S., Kanellos I., Papadimitriou D., Kavakiotis I., Maniou S., Skoufos G., Vergoulis T., Dalamagas T., Hatzigeorgiou A.G. (2018): DIANA-TarBase v8: A decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Res.* **46**: 239 – 245 (<http://www.microrna.gr/tarbase> - pristupljeno dana 13.11.2022)
- Kinose Y., Sawada K., Nakamura K., Kimura T. (2014): The Role of MicroRNAs in Ovarian Cancer. *Biomed Res. Int.* **2014**: 1 – 11.
- Kohn E.C., Ivy S.P. (2017): Whence High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* **37**: 443 – 448.
- Konstantinopoulos P.A., Ceccaldi R., Shapiro G.I., D’Andrea A.D. (2015): Homologous recombination deficiency: Exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer. *Cancer Discov.* **5**: 1137 – 1154.
- Koutsaki M., Libra M., Spandidos D.A., Zaravinos A. (2017): The miR-200 family in ovarian cancer. *Oncotarget* **8**: 66629 – 66640.
- Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. (2019): MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* **47**: D155 – D162.
- Krell A., Wolter M., Stojcheva N., Hertler C., Liesenberg F., Zapatka M., Weller M., Malzkorn B., Reifemberger G. (2019): MiR-16-5p is frequently down-regulated in astrocytic gliomas and modulates glioma cell proliferation, apoptosis and response to cytotoxic therapy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **45**: 441 – 458.
- Kumar V., Gupta S., Varma K., Sachan M. (2020): microRNA as Biomarker in Ovarian Cancer Management: Advantages and Challenges. *DNA Cell Biol.* **39**: 2103 – 2124.
- Labidi-Galy S.I., Papp E., Hallberg D., Niknafs N., Adleff V., Noe M., Bhattacharya R., Novak M., Jones S., Phallen J., Hruban C.A., Hirsch M.S., Lin D.I., Schwartz L., Maire C.L., Tille J.C., Bowden M., Ayhan A., Wood L.D., Scharpf R.B., Kurman R., Wang T.L., Shih I.M., Karchin R., Drapkin R., Velculescu V.E. (2017): High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nat. Commun.* **8**: 1093.
- Lakhani S.R., Manek S., Penault-Llorca F., Flanagan A., Arnout L., Merrett S., McGuffog L., Steele D., Devilee P., Klijn J.G.M., Meijers-Heijboer H., Radice P., Pilotti S., Nevanlinna H., Butzow R., Sobol H., Jacquemier J., Lyonnet D.S., Neuhausen S.L., Weber B., Wagner

- T., Winqvist R., Bignon Y.J., Monti F., Schmitt F., Lenoir G., Seitz S., Hamman U., Pharoah P., Lane G., Ponder B., Bishop D.T., Easton D.F. (2004): Pathology of Ovarian Cancers in BRCA1 and BRCA2 Carriers. *Clin. Cancer Res.* **10**: 2473 – 2481.
- Langhe R. (2015): MicroRNA and Ovarian Cancer. U Santulli, G. (ur.): *MicroRNA Cancer. From Molecular Biology to Clinical Practice.* str 119 – 151.
- Lee C.H., Subramanian S., Beck A.H., Espinosa I., Senz J., Zhu S.X., Huntsman D., Rijn M. van de, Gilks C.B. (2009): MicroRNA profiling of BRCA1/2 mutation-carrying and non-mutation-carrying high-grade serous carcinomas of ovary. *PLoS One* **4**: e7314.
- 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.
- Lee S., Vasudevan S. (2013): Post-transcriptional Stimulation of Gene Expression by MicroRNAs. *Ten Years Prog. GW/P Body Res. Adv. Exp. Med. Biol.* **768**: 97 – 126.
- Lee Y., Miron A., Drapkin R., Nucci M.R., Medeiros F., Saleemuddin A., Garber J., Birch C., Mou H., Gordon R.W., Cramer D.W., McKeon F.D., Crum C.P. (2007): A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J. Pathol.* **211**: 26 – 35.
- Lengyel E. (2010): Ovarian cancer development and metastasis. *Am. J. Pathol.* **177**: 1053 – 1064.
- Leva G. Di, Garofalo M., Croce C.M. (2014): MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **9**: 287 – 314.
- Levanat S., Sabol M., Musani V., Ozretić P., Trnski D. (2016): Hedgehog Signaling Pathway as Genetic and Epigenetic Target in Ovarian Tumors. *Curr. Pharm. Des.* **23**: 73 – 94.
- Li X., Zhang Y., Shi Y., Dong G., Liang J., Han Y., Wang X., Zhao Q., Ding J., Wu K., Fan D. (2011): MicroRNA-107, an oncogene microRNA that regulates tumour invasion and metastasis by targeting DICER1 in gastric cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **15**: 1887 – 1895.
- Lisio M., Fu L., Goyeneche A., Gao Z., Telleria C. (2019): High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences , Clinical and Therapeutic Standpoints. *Int. J. Mol. Sci.* **20**: 952.
- Lord C.J., Ashworth A. (2016): BRCAness revisited. *Nat. Rev. Cancer* **16**: 110 – 120.
- Lu T.X., Rothenberg M.E. (2018): MicroRNA. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**: 1202 – 1207.
- Manchana T., Phoolcharoen N., Tantbiroj P. (2019): BRCA mutation in high grade epithelial ovarian cancers. *Gynecol. Oncol. Reports* **29**: 102 – 105.
- Mandrekar J.N. (2010): Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. *J. Thorac. Oncol.* **5**: 1315 – 1316.
- Mattick J.S., Makunin I. V. (2006): Non-coding RNA. *Hum. Mol. Genet.* **15**: R17 – R29.
- Meinhold-Heerlein I., Fotopoulou C., Harter P., Kurzeder C., Mustea A., Wimberger P., Hauptmann S., Sehouli J. (2015): Statement by the Kommission Ovar of the AGO: The New FIGO and WHO Classifications of Ovarian, Fallopian Tube and Primary Peritoneal Cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* **75**: 1021 – 1027.

- Meinhold-Heerlein I., Fotopoulou C., Harter P., Kurzeder C., Mustea A., Wimberger P., Hauptmann S., Sehouli J. (2016): The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch. Gynecol. Obstet.* **293**: 695 – 700.
- Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P.A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L.M., Ding W., Bell R., Rosenthal J., Hussey C., Tran T., McClure M., Frye C., Hattier T., Phelps R., Haugen-Strano A., Katcher H., Yakumo K., Gholami Z., Shaffer D., Stone S., Bayer S., Wray C., Bogden R., Dayananth P., Ward J., Tonin P., Narod S., Bristow P.K., Norris F.H., Helvering L., Morrison P., Rosteck P., Lai M., Barrett J.C., Lewis C., Neuhausen S., Cannon-Albright L., Goldgar D., Wiseman R., Kamb A., Skolnick M.H. (1994): A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* **266**: 66 – 71.
- Miloš T. (2021): Povezanost metilacije promotora s ekspresijom gena *BRCA1* i *BRCA2* u seroznom raku jajnika visokog stupnja malignosti. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
- 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. U. S. A.* **105**: 10513 – 10518.
- Morey J.S., Ryan J.C., Dolah F.M. Van (2006): Microarray validation: Factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol. Proced. Online* **8**: 175 – 193.
- Narod S. (2016): Can advanced-stage ovarian cancer be cured? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**: 255 – 261.
- Nelson P.T., Wang W.X., Mao G., Wilfred B.R., Xie K., Jennings M.H., Gao Z., Wang X. (2011): Specific sequence determinants of miR-15/107 microRNA gene group targets. *Nucleic Acids Res.* **39**: 8163 – 8172.
- Nguyen V.H.L., Yue C., Du K.Y., Salem M., O'Brien J., Peng C. (2020): The role of microRNAs in epithelial ovarian cancer metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**: 1 – 39.
- O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. (2018): Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **9**: 402.
- Olbromski P.J., Pawlik P., Bogacz A., Sajdak S. (2022): Identification of New Molecular Biomarkers in Ovarian Cancer Using the Gene Expression Profile. *J. Clin. Med.* **11**: 3888.
- Orang A.V., Safaralizadeh R., Kazemzadeh-Bavili M. (2014): Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. *Int. J. Genomics* **2014**: 970607.
- Palazzo A.F., Lee E.S. (2015): Non-coding RNA: What is functional and what is junk? *Front. Genet.* **6**: 1 – 11.
- Paul A., Paul S. (2014): The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian

- cancers. *Front. Biosci.* **19**: 605 – 618.
- Petrovic N., Davidovic R., Bajic V., Obradovic M., Isenovic R.E. (2017): MicroRNA in breast cancer: The association with BRCA1/2. *Cancer Biomarkers* **19**: 119 – 128.
- Prahn K.P., Karlsen M.A., Høgdall E., Scheller N.M., Lundvall L., Nedergaard L., Christensen I.J., Høgdall C. (2015): The prognostic value of dividing epithelial ovarian cancer into type I and type II tumors based on pathologic characteristics. *Gynecol. Oncol.* **136**: 205 – 211.
- Punzón-Jiménez P., Lago V., Domingo S., Simón C., Mas A. (2022): Molecular Management of High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **23**: 13777.
- Qiagen (2015). Guidelines for miRNA mimic and miRNA inhibitor experiments Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies. *MiRNA Res. Man.* at <www.qiagen.com.>.
- Qu Y., Liu H., Lv X., Liu Y., Wang X., Zhang M., Zhang X., Li Y., Lou Q., Li S., Li H. (2017): MicroRNA-16-5p overexpression suppresses proliferation and invasion as well as triggers apoptosis by targeting VEGFA expression in breast carcinoma. *Oncotarget* **8**: 72400 – 72410.
- Quann K., Jing Y., Rigoutsos I. (2015): Post-transcriptional regulation of BRCA1 through its coding sequence by the miR-15/107 group of miRNAs. *Front. Genet.* **6**: 242.
- Rajan J. V., Wang M., Marquis S.T., Chodosh L.A. (1996): Brca2 is coordinately regulated with Brcal during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 13078 – 13083.
- Reyes H.D., Devor E.J., Warriar A., Newtonson A.M., Mattson J., Wagner V., Duncan G.N., Leslie K.K., Gonzalez-Bosquet J. (2019): Differential DNA methylation in high-grade serous ovarian cancer (HGSOC) is associated with tumor behavior. *Sci. Reports*. **9**: 17996.
- Rigakos G., Razis E. (2012): BRCAness: Finding the Achilles Heel in Ovarian Cancer. *Oncologist* **17**: 956 – 962.
- Riman T., Nilsson S., Persson I.R. (2004): Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **83**: 783 – 795.
- Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J.L., Bradley A. (2004): Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* **14**: 1902 – 1910.
- Roy R., Chun J., Powell S.N. (2012): BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection. *Nat. Rev. Cancer* **12**: 68 – 78.
- Santulli, G. (ur.) (2015): *MicroRNA Cancer From Molecular Biology to Clinical Practice.* Springer Cham.
- Saral M.A., Tuncer S.B., Odemis D.A., Erdogan O.S., Erciyas S.K., Saip P., Ozel S., Yazici H. (2022): New biomarkers in peripheral blood of patients with ovarian cancer: high expression levels of miR-16-5p, miR-17-5p, and miR-638. *Arch. Gynecol. Obstet.* **305**:

193 – 201.

- Schober P., Schwarte L.A., Boer C. (2018): Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation. *Anesth. Analg.* **126**: 1763 – 1768.
- Scully R.E. (1995): Pathology of ovarian cancer precursors. *J. Cell. Biochem.* **59**: 208 – 218.
- Šekerija M. (2021): Incidencija raka u Hrvatskoj 2019. *Bilten* 44.
- Selbach M., Schwanhäusser B., Thierfelder N., Fang Z., Khanin R., Rajewsky N. (2008): Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**: 58 – 63.
- Sowter H.M., Ashworth A. (2005): BRCA1 and BRCA2 as ovarian cancer susceptibility genes. *Carcinogenesis* **26**: 1651 – 1656.
- Stewart C., Ralyea C., Lockwood S. (2019): Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin. Oncol. Nurs.* **35**: 151 – 156.
- Strumidło A., Skiba S., Scott R.J., Lubiński J. (2017): The potential role of miRNAs in therapy of breast and ovarian cancers associated with BRCA1 mutation. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **15**: 1 – 5.
- Sueblinvong T., Carney M.E. (2009): Current understanding of risk factors for ovarian cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* **10**: 67 – 81.
- Sun Y.M., Chen Y.Q. (2020): Principles and innovative technologies for decrypting noncoding RNAs: From discovery and functional prediction to clinical application. *J. Hematol. Oncol.* **13**: 1 – 27.
- Swisher E.M., Garcia R.L., Kilgore M.R., Norquist B.M. (2016): Culprit or bystander? The role of the fallopian tube in “ovarian” high-grade serous carcinoma. *Cancer Discov.* **6**: 1309 – 1311.
- Tan H., Huang S., Zhang Z., Qian X., Sun P., Zhou X. (2019): Pan-cancer analysis on microRNA-associated gene activation. *EBioMedicine* **43**: 82 – 97.
- Tang Z., Kang B., Li C., Chen T., Zhang Z. (2019): GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res.* **47**: W556 – W560.
- Thomson D.W., Bracken C.P., Szubert J.M., Goodall G.J. (2013): On Measuring miRNAs after Transient Transfection of Mimics or Antisense Inhibitors. *PLoS One* **8**: e55214.
- Tommasi C., Pellegrino B., Boggiani D., Sikokis A., Michiara M., Uliana V., Bortesi B., Bonatti F., Mozzoni P., Pinelli S., Squadrilli A., Viani M.V., Cassi D., Maglietta G., Meleti M., Musolino A. (2021): Biological Role and Clinical Implications of microRNAs in BRCA Mutation Carriers. *Front. Oncol.* **11**: 700853.
- Torre L.A., Trabert B., DeSantis C.E., Miller K.D., Samimi G., Runowicz C.D., Gaudet M.M., Jemal A., Siegel R.L. (2018): Ovarian cancer statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* **68**: 284 – 296.
- Toss A., Tomasello C., Razzaboni E., Contu G., Grandi G., Cagnacci A., Schilder R.J., Cortesi L. (2015): Hereditary ovarian cancer: Not only BRCA 1 and 2 Genes. *Biomed Res. Int.* **2015**: 341723.

- Tsibulak I., Wieser V., Degasper C., Shivalingaiah G., Wenzel S., Sprung S., Lax S.F., Marth C., Fiegl H., Zeimet A.G. (2018): BRCA1 and BRCA2 mRNA-expression prove to be of clinical impact in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **119**: 683 – 692.
- Tutt A., Connor F., Bertwistle D., Kerr P., Peacock J., Ross G., Ashworth A. (2003): Cell cycle and genetic background dependence of the effect of loss of BRCA2 on ionizing radiation sensitivity. *Oncogene* **22**: 2926 – 2931.
- Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A. (2007): Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. *Science*. **318**: 1931 – 1934.
- Vasudevan S. (2012): Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **3**: 311 – 330.
- Venkitaraman A.R. (2002): Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**: 171 – 182.
- Wang Z., Zhang J., Zhang Y., Deng Q., Liang H. (2018): Expression and mutations of BRCA in breast cancer and ovarian cancer: Evidence from bioinformatics analyses. *Int. J. Mol. Med.* **42**: 3542 – 3550.
- 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.
- Welsh P.L., King M.C. (2001): BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 705 – 713.
- Whaley D., Damyar K., Witek R.P., Mendoza A., Alexander M., Lakey J.R.T. (2021): Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant.* **30**: 1 – 12.
- Wightman B., Ha I., Ruvkun G. (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**: 855 – 862.
- Wilczynski M., Kielbik M., Senderowska D., Krawczyk T., Szymanska B., Klink M., Bieńkiewicz J., Romanowicz H., Frühauf F., Malinowski A. (2020): MiRNA-103/107 in primary high-grade serous ovarian cancer and its clinical significance. *Cancers (Basel)*. **12**: 1 – 15.
- Wooster R., Neuhausen S.L., Mangion J., Alves A.M., Carr F.J., Quirk Y., Ford D., Collins N., Nguyen K., Seal S., Tran T., Averill D., Fields P., Marshall G., Narod S., Lenoir G.M., Lynch H., Feunteun J., Devilee P., Cornelisse C.J., Menko F.H., Daly P.A., Ormiston W., Mcmanus R., Pye C., Lewis C.M., Cannon-albright L.A., Peto J., Ponder B.A.J., Skolnick M.H., Easton D.F., Goldgar D.E., Stratton M.R. (1994): Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*. **265**: 2088 – 2090.
- Xu W., Lucas A.S., Wang Z., Liu Y. (2014): Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics* **15**: S4.
- Xu P., Wu Q., Yu J., Rao Y., Kou Z., Fang G., Shi X., Liu W., Han H. (2020): A Systematic Way to Infer the Regulation Relations of miRNAs on Target Genes and Critical miRNAs in Cancers. *Front. Genet.* **11**: 278.



- Yang H., Jeffrey P.D., Miller J., Kinnucan E., Sun Y., Thomä N.H., Zheng N., Chen P.L., Lee W.H., Pavletich N.P. (2002): BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science*. **297**: 1837 – 1848.
- Yoshida K., Miki Y. (2004): Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*. **95**: 866 – 871.
- Yu Q.F., Liu P., Li Z.Y., Zhang C.F., Chen S.Q., Li Z.H., Zhang G.Y., Li J.C. (2018): MiR-103/107 induces tumorigenicity in bladder cancer cell by suppressing PTEN. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. **22**: 8616 – 8623.
- Zhang S., Dolgalev I., Zhang T., Ran H., Levine D.A., Neel B.G. (2019a): Both fallopian tube and ovarian surface epithelium are cells-of-origin for high-grade serous ovarian carcinoma. *Nat. Commun*. **10**: 5367.
- Zhang N., Hu G., Myers T.G., Williamson P.R. (2019b): Protocols for the Analysis of microRNA Expression, Biogenesis, and Function in Immune Cells. *Curr. Protoc. Immunol*. **126**: e78.
- Zhang S., Lu Z., Unruh A.K., Ivan C., Baggerly K.A., Calin G.A., Li Z., Bast R., Le X.F. (2015): Clinically relevant microRNAs in ovarian cancer. *Mol. Cancer Res*. **13**: 393 – 401.
- Zhang S., Wang W., Wu X., Liu W., Ding F. (2020a): miR-16-5p modulates the radiosensitivity of cervical cancer cells via regulating coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Pathol. Int*. **70**: 12 – 20.
- Zhang X., Zhang J., Liu Q., Zhao Y., Zhang W., Yang H. (2020b): Circ-CUX1 Accelerates the Progression of Neuroblastoma via miR-16-5p/DMRT2 Axis. *Neurochem. Res*. **45**: 2840 – 2855.
- Zhao L., Liang X., Wang L., Zhang X. (2022): The Role of miRNA in Ovarian Cancer: an Overview. *Reprod. Sci*. **29**: 2760 – 2767.

# ŽIVOTOPIS

---

Zovem se Petra Perić i rođena sam 6. prosinca 1998. u Splitu. Dolazim iz Tomislavgrada gdje sam ujedno pohađala osnovnu (Osnovna škola Ivana Mažuranića), a zatim i srednju Prehrambeno-biotehnološku školu u Srednjoj strukovnoj školi Tomislavgrad u kojoj sam bila proglašena učenikom generacije.

Godine 2017. upisala sam preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Fakultetu prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti (FPMOZ) Sveučilišta u Mostaru, gdje sam 2020. godine stekla zvanje sveučilišne prvostupnice biologije (univ. bacc. biol.) obranivši završni rad na temu *Biologija i ekologija grebenotvornih koralja* pod mentorstvom doc. dr. sc. Adriane Planinić.

Iste godine upisujem diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunologija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF) Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme diplomskog studija odradila sam semestralnu laboratorijsku stručnu praksu na Zavodu za animalnu fiziologiju pod voditeljstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić, koja se odvijala u sklopu dvaju projekata: *Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi* (<http://plantbiomolecules.com/>) i *Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma* (<http://plantbiopower.com/>). Osim toga, odradila sam i jednomjesečnu ljetnu praksu u Laboratoriju Doma zdravlja u Tomislavgradu. U sklopu diplomskog studija, položila sam i A kategoriju LabAnim - Tečaja za osposobljavanje osoba koje rade sa pokusnim životinjama.

Za završetak studija izrađujem i ovaj diplomski rad na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za nasljedni rak, pod mentorstvom nasl. doc. dr. sc. Petra Ozretića i komentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić, u svrhu sticanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp).

## **PUBLIKACIJE:**

[1] Odeh D, Oršolić N, Adrović E, Gaćina L, **Perić P**, Odeh S, Balta V, Lesar N, Kukulj M (2022). Effects of Volatile Anaesthetics and Iron Dextran on Chronic Inflammation and Antioxidant Defense System in Rats. *Antioxidants* 11: 708.