

Upotreba miRNA u genskoj terapiji

Jankaš, Lara

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:941167>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lara Jankaš

Upotreba miRNA u genskoj terapiji

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Lara Jankaš

Use of miRNA in gene therapy

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Preddiplomski sveučilišni studij Molekularna biologija na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Petre Korać.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Upotreba miRNA u genskoj terapiji

Lara Jankaš

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

miRNA su nekodirajuće molekule RNA duljine oko 22 nukleotida koje reguliraju ekspresiju gena na posttranskripcijskoj razini vežući se na molekulu mRNA. Saznanje o promjeni ekspresije određenih molekula miRNA u raznim bolestima dovelo je do ideje njihove upotrebe u genskoj terapiji. U slučajevima kada je bolest uzrokovana smanjenom ekspresijom miRNA potrebno je ponovno uspostaviti njenu funkciju. U ovu svrhu mogu se koristiti oponašatelji miRNA, miRNA-agomiri, prekursori miRNA te plazmidi s genom za miRNA. S druge strane miRNA-inhibitori su razvijeni s ciljem inhibicije prekomjerne ekspresije miRNA. Većina inhibitora, poput antimir-a i miRNA-spužvi, dizajnirana je s ciljem vezanja na prekomjerno eksprimiranu miRNA. miRNA-maskiranje je strategija kojom se umjesto direktne inhibicije dizajnira miRNA-masko koja se veže na molekulu mRNA i sprečava vezanje ciljane miRNA na nju. Nekolicina terapeutika temeljenih na funkciji molekula miRNA trenutno prolazi kroz klinička istraživanja. No, iako je postignut veliki napredak u području upotrebe miRNA u genskoj terapiji ova se tehnologija još suočava s brojnim izazovima, poput dopreme terapeutika na ciljano mjesto, poboljšanja stabilnosti terapeutika i njegove otpornosti na nukleaze te smanjenja toksičnog utjecaja na organizam.

Ključne riječi: mikroRNA, terapeutici, oponašanje, inhibicija
(25 stranica, 5 slika, 0 tablica, 81 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Use of miRNA in gene therapy

Lara Jankaš

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

miRNAs are approximately 22 nucleotides long non-coding RNA molecules that regulate gene expression at the posttranscriptional level by binding to the mRNA molecule. The knowledge about the change in the expression of specific miRNA molecules in several diseases led to the idea of their use in gene therapy. In cases where the disease is caused by reduced miRNA expression, it is necessary to restore its function. miRNA mimics, miRNA agomirs, miRNA precursors and miRNA-expressing plasmids can be used for this purpose. On the other hand, miRNA inhibitors have been developed with the aim of inhibiting the overexpression of miRNA molecules. Most inhibitors, such as antimiRs and miRNA-sponges, are designed to bind to overexpressed miRNA. miRNA-masking is a strategy by which, instead of direct inhibition, a miRNA-mask binds to the mRNA molecule and prevents the target miRNA from binding to it. Several therapeutics based on knowledge about miRNA function are currently undergoing clinical trials. But, although great progress has been made in the field of miRNA use in gene therapy, this technology still faces numerous challenges. Some of the most important challenges include delivering therapeutics to the target site, improving the stability of therapeutics and its resistance to nucleases and reducing the toxic impact on the organism.

Keywords: microRNA, therapeutics, mimic, inhibition
(25 pages, 5 figures, 0 tables, 81 references, original in: croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.
Mentor: izv. prof. dr. sc. Petra Korać

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. miRNA.....	1
2.1. Otkriće miRNA.....	1
2.2. Biogeneza miRNA.....	2
2.3. Mehanizam djelovanja miRNA	4
3. Genska terapija	4
4. Upotreba miRNA u genskoj terapiji	5
4.1. miRNA kao alat u genskoj terapiji	5
4.1.1. Ponovno uspostavljanje funkcije miRNA.....	5
4.1.2. Upotreba miRNA za moduliranje ekspresije egzogeno primijenjene terapijske molekule.....	7
4.2. miRNA kao cilj u genskoj terapiji	9
4.2.1. antimiR	9
4.2.2. miRNA-spužve.....	11
4.2.3. miRNA-maskiranje	13
5. Izazovi upotrebe miRNA u genskoj terapiji	13
5.1. Doprema miRNA na ciljano mjesto	14
5.2. Stabilnost i zaštita od nukleaza.....	15
5.3. Toksičnost i utjecaj na imunski sustav	17
6. Zaključak	18
7. Literatura	18
8. Životopis.....	25

1. Uvod

mikroRNA (miRNA) su endogene male jednolančane nekodirajuće molekule RNA duge oko 22 nukleotida koje reguliraju ekspresiju gena na posttranskripcijskoj razini (Bartel 2004). Na ovaj način je regulirano čak 60% gena koji kodiraju proteine kod ljudi (Friedman i sur. 2009). Mnoge molekule miRNA očuvane su između vrsta i esencijalne su za razvoj. Uključene su u nekoliko procesa razvoja uključujući diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu (Geisler i Fechner 2016). Zbog velike važnosti u staničnim procesima, bilo kakva promjena u biogenezi miRNA i regulaciji ekspresije ciljanih gena može potaknuti razvoj bolesti u organizmu (Rupaimoole i sur. 2011). Premala ili prevelika ekspresija molekula miRNA dokazana je kod raznih bolesti poput tumora, hepatitisa C te srčanih i metaboličkih bolesti (Christopher i sur. 2016). Saznanja o tkivnim specifičnostima pojedinih miRNA i njihovim karakteristikama omogućuju korištenje miRNA kao dijagnostičkog alata, ali i alata genske terapije (Iorio i Croce 2012). U genskoj terapiji se mogu koristiti na dva načina: kao alat i kao cilj.

2. miRNA

2.1. Otkriće miRNA

Prva molekula miRNA otkrivena je 1993. godine u istraživanju životnog ciklusa vrste *Caenorhabditis elegans* (Lee i sur. 1993; Wightman i sur. 1993). Istraživan je gen *lin-4* esencijalan za normalnu vremensku kontrolu postembrijskog razvoja čija mutacija dovodi do preuranjenog ili usporenog razvoja (Chalfie 1981). Ustanovljeno je da gen *lin-4* ne kodira protein već molekulu RNA koja negativno regulira ekspresiju gena *lin-14* vežući se na 3'-netranslatiranu regiju mRNA (3'-UTR, od engl. *untranslated region*) za *lin-14* (Lee i sur. 1993; Wightman i sur. 1993). Sedam godina kasnije, Reinhart i sur. (2000) otkrili su *let-7*, još jednu miRNA važnu za razvoj vrste *C. elegans*. Važno otkriće je bilo da je ova miRNA očuvana kod mnogih drugih životinjskih skupina uključujući kralježnjake, mješćinice, polusvitkovce, mekušce, kolutićavce i člankonošce (Pasquinelli i sur. 2000). Prema bazi podataka o miRNA (miRBase, verzija 22.1) do danas je otkriveno više od 38 000 miRNA, od toga oko 2 000 kod ljudi.

2.2. Biogeneza miRNA

Geni za miRNA raspršeni su po čitavom genomu te se nalaze ili u klasterima ili pojedinačno. Mogu se nalaziti u intronima gena koji kodiraju proteine, u intragenjskim regijama ili u eksonima (Kim i Nam 2006).

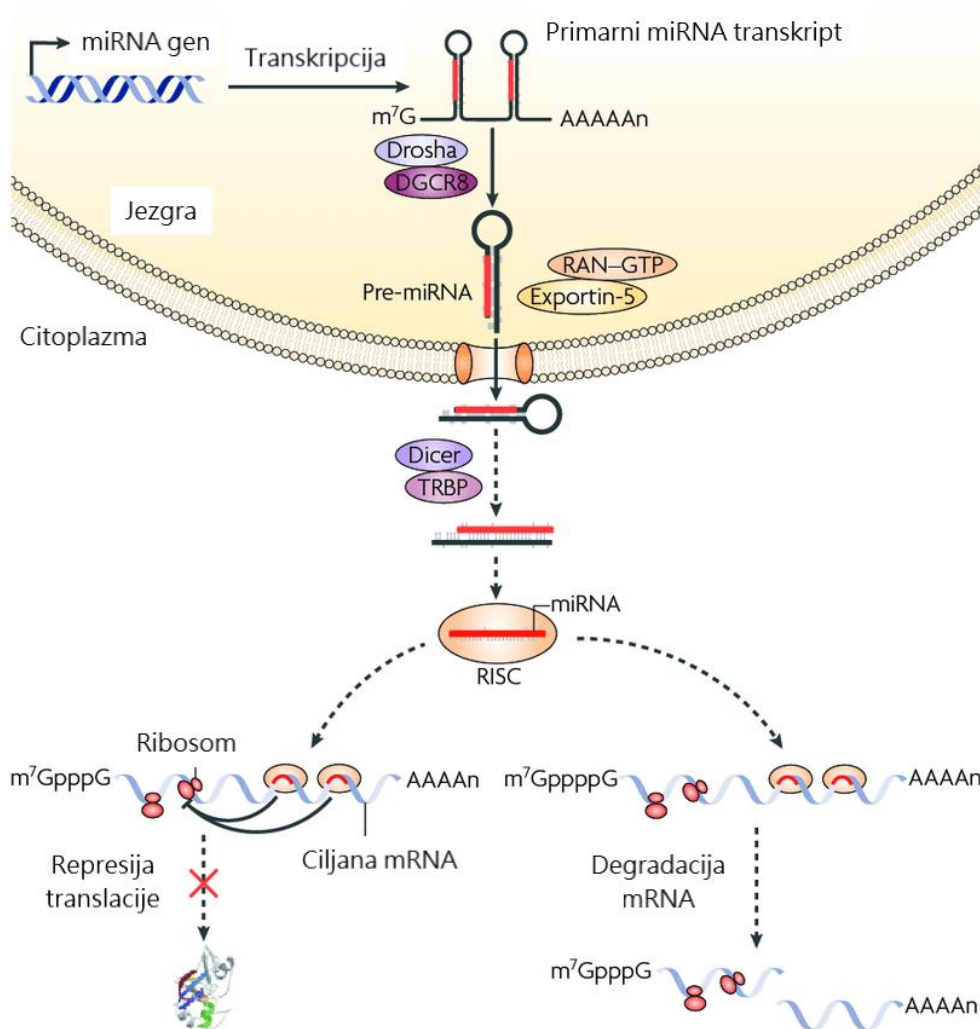
Biogeneza većine molekula miRNA započinje prepisivanjem gena za miRNA RNA-polimerazom II pri čemu nastaje primarna molekula miRNA (pri-miRNA) duga nekoliko kilobaza koju karakteriziraju ukosnice s nesavršeno sparenim parovima baza (Slika 1). U nekim slučajevima moguće je i prepisivanje RNA-polimerazom III (Bartel 2004). Proces se zatim može nastaviti kanonskim ili nekanonskim putem. Većina miRNA nastaje kanonskim putem, no važno je spomenuti da to nije jedini mogući način biogeneze (Miyoshi i sur. 2010).

Sljedeći korak kanonskog puta jest procesiranje pri-miRNA enzimom Drosha. Drosha je RNaza III koja cijepa pri-miRNA s obje strane ukosnice pri njenoj bazi ostavljajući fosfat na 5'-kraju i stršeci kraj od 2 nukleotida na 3'-kraju. Cijepanjem nastaje molekula pre-miRNA duga 60-70 nukleotida (Lee i sur. 2003). Enzimu Drosha potreban je kofaktor DGCR8 (od engl. *DiGeorge syndrome critical region gene 8*) kod ljudi, tj. Pasha kod vrsta *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans*. Drosha s kofaktorom čini kompleks mikroprocesora (Denli i sur. 2004).

pre-miRNA se aktivno prenosi iz jezgre u citoplazmu pomoću jezgrinog transportnog receptora eksportin-5 (Exp-5) i Ran-GTP (Bohnsack i sur. 2004; Lund i sur. 2004; Yi i sur. 2003). U citoplazmi enzim Dicer, također RNaza III, prepoznaje 3'-stršeci kraj pre-miRNA i cijepa omču ukosnice tako da nastaje dvolančana molekula RNA duljine oko 22 nukleotida koja se još naziva i miRNA/miRNA* dupleks (Chendrimada i sur. 2005; Ketting i sur. 2001). Dicer je visoko očuvani enzim kod većine eukariotskih organizama koji kao kofaktore koristi proteine koji se vežu za dvolančane molekule RNA (Kim i Nam 2006).

miRNA/miRNA* dupleks veže protein Argonaut (AGO) te s njim čini kompleks RISC (od engl. *RNA-induced silencing complex*). Jedan lanac dvolančane RNA ostaje u kompleksu RISC i naziva se zrela miRNA dok se njoj komplementarni lanac (označen s miRNA*) degradira (Kim i sur. 2009). Pokazano je da odabir lanca koji će ući u RISC ovisi o njihovoj termodinamičkoj stabilnosti, onaj s nestabilnijim parovima baza na 5'-kraju postaje zreli lanac miRNA (Khvorova i sur. 2003).

Ekspresija molekula miRNA uglavnom se regulira na razini transkripcije transkripcijskim faktorima, ali bitna je i posttranskripcijska regulacija (Alberti i sur. 2018; Kim i Nam 2006).



Slika 1. Biogeneza miRNA započinje prepisivanjem RNA-polimerazom II pri čemu nastaje primarna molekula miRNA (pri-miRNA). U jezgri se pri-RNA procesira enzimom Drosha i nastaje pre-miRNA koja se aktivno prenosi u citoplazmu pomoću proteina Exp-5. Obradu u citoplazmi nastavlja enzim Dicer cijepanjem omče pre-miRNA pri čemu nastaje dvolančana miRNA. Zreli lanac miRNA s proteinom Argonaut čini RISC. Ovisno o stupnju komplementarnosti s ciljanom molekulom mRNA dolazi ili do zaustavljanja translacije ili do degradacije mRNA. Prilagođeno prema Lodish i sur. 2008.

2.3. Mehanizam djelovanja miRNA

miRNA navodi kompleks RISC do ciljane molekule mRNA (Bartel 2004). Specifičnost prepoznavanja osigurava se komplementarnim sparivanjem nukleotida 2 do 7 s 5'-kraja molekule miRNA (od engl. *seed sequence*) i dijela molekule mRNA nazvanim MRE (od engl. *miRNA response element*) (Bartel 2009). Specifična sekvenca MRE uglavnom se nalazi na 3'-UTR kraju molekule mRNA, ali može se nalaziti i na 5'-UTR kraju, u promotorima ili otvorenim okvirima čitanja (ORF, od engl. *open reading frame*) (Broughton i sur. 2016; Xu i sur. 2014).

Ako se miRNA na ciljanu molekulu mRNA veže potpunom komplementarnošću protein Argonaut će pocijepati mRNA te će se ona degradirati. Ako miRNA i mRNA nisu potpuno komplementarne već postoji nekoliko pogrešno sparenih parova baza, endonukleazna aktivnost Argonauta se blokira. U tom se slučaju mRNA neće degradirati ali je zato blokirana translacija te mRNA (Jo i sur. 2015). Osim spomenutih metoda inhibicije ekspresije gena, u nekim okolnostima miRNA, s pripadajućim proteinskim kompleksima, mogu posttranskripcijski stimulirati gensku ekspresiju (Vasudevan 2012).

Zbog mogućnosti inhibicije ekspresije gena nepotpuno komplementarnim sparivanjem miRNA i mRNA jedna molekula miRNA može djelovati na više različitih ciljeva, tj. moguća je regulacija više gena jednom molekulom miRNA (Pasquinelli 2012). Molekule miRNA koje imaju istu očuvanu osnovnu sekvencu (od engl. *seed sequence*) svrstavaju se u istu porodicu miRNA i mogu regulirati ekspresiju istih gena (Brennecke i sur. 2005).

3. Genska terapija

Ideja genske terapije kao metode modifikacije gena odgovornih za genetičke poremećaje javila se tijekom 1960-ih i 1970-ih godina (Friedmann 1992; Gonçalves i Paiva 2017). Prva primjena genske terapije bila je za liječenje nedostatka adenozijske deaminaze 1990. godine u SAD-u (Anderson 1990).

U genskoj terapiji se nastoje eksprimirati geni povoljni za organizam bilo da se oni već nalaze u organizmu ili se unose vektorom. Unošenjem gena u organizam omogućava se stalna endogena proizvodnja proteina što je velika prednost u odnosu na terapiju proteinima kod koje je potrebna višestruka primjena terapije, tj. unosa potrebnih proteina (Dunbar i sur. 2018).

No, metoda genske terapije zbog svoje kompleksnosti još nije usavršena te su za njenu uspješnu primjenu potrebna opsežna istraživanja. Bolest koju se želi izliječiti mora biti dobro proučena, gen koji se unosi mora biti lako dostupan i netoksičan za organizam, ciljane stanice moraju biti dostupne te mora postojati prikladan način za unos gena (Misra 2013).

4. Upotreba miRNA u genskoj terapiji

Otkriće uloga miRNA kod razvoja različitih bolesti dovelo je do ideje upotrebe miRNA u genskoj terapiji s ciljem modifikacije i poništavanja patoloških promjena u ekspresiji miRNA. miRNA su znatno manje veličine od proteina i molekula koje kodiraju proteine što omogućuje njihovu lakšu dopremu na ciljano mjesto (Bader i sur. 2010). Očuvanost među vrstama čini ih i pogodnima za korištenje zbog mogućnosti upotrebe iste molekule miRNA u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima (Rooij i Kauppinen 2014). Sposobnost regulacije više gena istom miRNA čini ovu vrstu genske terapije primamljivom i efikasnom, no istovremeno problematičnom zbog mogućih neželjenih djelovanja (Diener i sur. 2022). Pojedine molekule miRNA su u stanju bolesti ili prekomjerno ili nedostavno eksprimirane pa je iz tih razloga svrha genske terapije smanjiti ili pojačati ekspresiju specifične miRNA (Bajan i Hutvagner 2020).

4.1. miRNA kao alat u genskoj terapiji

4.1.1. Ponovno uspostavljanje funkcije miRNA

Mogući uzroci nekih bolesti jesu takve promjene u biogenezi miRNA koje dovode do njihove smanjene ekspresije. U takvim slučajevima potrebno je ponovno uspostaviti funkciju specifične miRNA unosom zamjenske terapijske molekule. Terapijska molekula će preuzeti ulogu određene endogene molekule miRNA i sudjelovati u regulaciji ekspresije odgovarajućih gena (Bajan i Hutvagner 2020). Neke od terapijskih strategija su unos oponašatelja miRNA (od engl. *miRNA mimics*), miRNA-agomira, prekursora miRNA (pre-miRNA) ili plazmida s genom za miRNA (Fu i sur. 2019).

Oponašatelji miRNA su sintetičke dvolančane molekule RNA koje nalikuju endogenim miRNA (Fu i sur. 2019). Sintetičke dvolančane RNA molekule se u stanici procesiraju istim mehanizmom kao i endogene (Bajan i Hutvagner 2020). Radi poboljšanja aktivnosti i stabilnosti mogu se kemijski modificirati, te se tada takve molekule zovu miRNA-

agomiri. Kao terapijske molekule mogu se koristiti i već spomenute molekule pre-miRNA koje se kemijski modificiraju, procesiraju u stanici te zatim oponašaju zrele molekule miRNA. Korištenjem plazmida s reporterskim genom ispred gena za miRNA se osim samog unosa miRNA istovremeno može i lokalizirati te vizualizirati njeno djelovanje (Fu i sur. 2019).

Budući da sve spomenute terapijske molekule imaju sekvence identične molekulama miRNA koje zamjenjuju, očekuje se da će regulirati isti set molekula mRNA kao i one. Nespecifična vezanja terapijskih miRNA s nepripadajućim mRNA malo su vjerojatna zbog duge evolucije interakcija miRNA-mRNA (Bader i sur. 2010).

U brojnim studijama na kulturama mišjih stanica i korištenjem miševa kao modelnih organizama identificirane su molekule miRNA za koje se smatra da posjeduju tumor-supresorske funkcije zbog njihove smanjene ekspresije u tumorskom u odnosu na zdrava tkiva (Bader i sur. 2010; Bajan i Hutvagner 2020). Ovo saznanje pobuđuje interes za razvoj protutumorskih terapeutika baziranih na molekulama miRNA (Bajan i Hutvagner 2020). Neke od tumor-supresorskih miRNA su miR-15a, miR-16, porodica miR-34 i porodica let-7 (Bader i sur. 2010).

Prva miRNA kod koje je dokazana tumor-supresorska aktivnost je let-7. Ona negativno regulira ekspresiju gena *RAS* i kod ljudi i kod *C. elegans* vežući se na 3'-UTR mRNA za protein *RAS* (Johnson i sur. 2005). Osim onkogeno *RAS*, suprimira i onkogene *HMGA2*, *c-Myc*, ciklin D, *CDK6*, *CDC25A* te djeluje kao imunski regulator (Bader i sur. 2010). Primjer tumora kod ljudi kod kojeg je smanjena ekspresija let-7 jest karcinom pluća nemalih stanica (NSCLC, od. engl. *non-small-cell lung carcinoma*) (Gilles i Slack 2018). Ponovno uspostavljanje funkcije let-7, tj. unos oponašatelja let-7 zaustavlja daljnju proliferaciju stanica tumora i smanjuje rast postojećih tumora u nekoliko studija na životinjama (Bader i sur. 2010; Ma i sur. 2021). Unatoč brojnim uspjesima studija, ljudska terapija temeljena na oponašanju let-7 još nije uspostavljena (Chirshev i sur. 2019).

U fazu kliničkog testiranja ušlo je samo nekoliko lijekova temeljenih na oponašanju molekula miRNA. To su MRX34 za oponašanje miRNA-34a, Remlarsen (MRG-201) za oponašanje miRNA-29 i MesomiR 1 za oponašanje miRNA-16 (Diener i sur. 2022).

Prvi miRNA lijek koji je ušao u fazu kliničkog testiranja je MRX34 (Faza 1 kliničkog testiranja) (Gilles i Slack 2018; Rupaimoole i Slack 2017). Oponašatelj miRNA-34a

inkapsuliran je lipidnim nanočesticama i zatim se unosi u organizam intravenozno (Beg i sur. 2017; Rupaimoole i Slack 2017).

Porodica miRNA-34 sastoji se od tri miRNA (34a, 34b i 34c) i geni porodice miR-34 transkripcijske su mete onkosupresora p53 (Hermeking 2010; Misso i sur. 2014). miRNA-34 doprinose učinku p53 na zaustavljanje proliferacije i indukcije apoptoze ciljajući c-MYC, CDK6 i c-MET (Hermeking 2010). Pokazano je da primjena MRX34 značajno doprinosi smanjenju tumora (tumor jetre, prostate i pluća) i smanjenju ekspresije proteina reguliranih s miRNA-34. Stavljanjem let-7 i miRNA-34 u istu lipidnu nanočesticu također je postignuto smanjenje tumora (Rupaimoole i Slack 2017), noprva faza kliničkog testiranja lijeka MRX34 zaustavljena je zbog nepovoljnih posljedica na imunosti sustav (Gilles i Slack 2018).

Kod pacijenata s agresivnim tumorom, malignim pleuralnim mezoteliomom (MPM), identificiran je manjak ekspresije miRNA-16 u usporedbi sa zdravim tkivom (Reid i sur. 2013). Mesomir 1 (Faza 1 kliničkog testiranja) uspješno imitira miRNA-16 i ponovno uspostavlja njenu funkciju u ciljanim tkivima te inhibira rast stanica tumora (Reid i sur. 2016).

Remlarsen (MRG-201) (Faza 2 kliničkog testiranja) imitira molekule porodice miRNA-29. Molekule ove porodice ključne su kod regulacije puta signalizacije transformirajućeg faktora rasta (TGF) i sinteze izvanstaničnog matriksa (ECM, od engl. *extracellular matrix*). Oba ova procesa doprinose razvoju fibroze (Cushing i sur. 2011). Kod nedostatka miRNA-29 povećava se razina TGF i ECM, a budući da i sami TGF i ECM smanjuju razinu ekspresije miRNA-29, dolazi do nekontrolirane proizvodnje ovih molekula što dovodi do razvoja fibroze. Remlarsenom se nastoje kontrolirati neki tipovi fibroze poput plućne i kožne fibroze (Gallant-Behm i sur. 2019).

4.1.2. Upotreba miRNA za moduliranje ekspresije egzogeno primijenjene terapijske molekule

Za sigurnu primjenu liječenja genskom terapijom vrlo je bitno izbjeći ekspresiju terapijskog gena u neželjenim tkivima. Budući da i neki promotori specifični za određena tkiva mogu biti nepouzdana, za ovu svrhu mogu poslužiti miRNA (Broderick i Zamore 2011). Promotori specifični za pojedina tkiva pozitivno reguliraju ekspresiju, tj. terapijska molekula će se eksprimirati samo u tkivima za koje je taj promotor specifičan. Suprotno tome, miRNA specifične za određena tkiva negativno reguliraju ekspresiju što znači da će se terapijska

molekula eksprimirati samo u tkivima u kojima određena miRNA nije eksprimirana (Broderick i Zamore 2011; Geisler i Fechner 2016). Sekvence na terapijskim molekulama koje prepoznaje specifična molekula miRNA nazivaju se i miR-TS (od engl. *artificial microRNA target sites*) (Geisler i Fechner 2016). miR-TS se mogu inkorporirati u 3'-UTR terapijske mRNA zbog manjka sekundarnih struktura na tom dijelu mRNA, ali ih je moguće i smjestiti u 5'-UTR ili otvoreni okvir čitanja (Broderick i Zamore 2011; Geisler i Fechner 2016).

Jedan od najbitnijih izazova ove metode je identifikacija prikladne molekule miRNA koja je eksprimirana samo u tipovima tkiva i stanica u kojima ne smije doći do ekspresije terapijske molekule (Geisler i Fechner 2016). Primjer ovakve molekule s kojom je u nekoliko studija postignuta uspješna supresija egzogeno primijenjene terapijske molekule je miRNA-122 specifična za hepatocite (Broderick i Zamore 2011). Ova molekula primjenjuje se u genskoj terapiji bolesti srca jer je u srcu ekspresija miRNA-122 značajno manja od ekspresije u jetri. U 3'-UTR terapijske molekule se inkorporira sekvenca miR122-TS koju prepoznaje miRNA-122 u jetri te tamo inhibira ekspresiju terapijske molekule. Istovremeno se u srcu zbog manjka specifične miRNA terapijska molekula normalno eksprimira (Geisler i Fechner 2016).

Drugi primjer tkivno specifične molekule je miRNA-142 koja je karakteristična za hematopoetske stanice. Dodavanje miR142-TS u terapijsku molekulu onemogućava njenu ekspresiju u stanicama koje prezentiraju antigen. Ovim putem se postiže imunosna tolerancija na terapijsku molekulu (Annoni i sur. 2009).

Osim što molekula miRNA koja se upotrebljava u regulaciji ekspresije egzogene molekule mora biti eksprimirana specifično, mora biti i eksprimirana na određenoj razini. Veća supresija uglavnom se postiže većom razinom ekspresije potrebne miRNA. Umetanjem 3-4 sekvenci miR-TS koje su potpuno komplementarne odgovarajućoj molekuli miRNA u terapijsku molekulu optimizira se efikasnost regulacije. Potpuna komplementarnost je poželjna jer dovodi do degradacije terapijske molekule čime se omogućuje brzo recikliranje molekule miRNA i izbjegava zasićenje molekula miRNA terapijskim molekulama. Bez ovog koraka endogene molekule miRNA ne bi bile sposobne istovremeno regulirati i prirodne mete (Geisler i Fechner 2016).

4.2. miRNA kao cilj u genskoj terapiji

Za liječenje stanja uzrokovanih prekomjernom ekspresijom određenih molekula miRNA potrebno je inhibirati djelovanje tih miRNA (Bajan i Hutvagner 2020). Inhibitor se za ciljanoj molekulu miRNA veže velikom afinitetom čime se postiže velika preciznost sprečavanja vezanja miRNA na pripadnu mRNA (Sempere i sur. 2021). Većina inhibitora dizajnirana je s namjerom vezanja na zrele molekule miRNA, no postoje i uspješni primjeri inhibicije prekursora zrelih molekula miRNA. Prekursori sadržavaju sekvence koje nisu prisutne u zrelih molekulama i koje nisu očuvane kod različitih molekula miRNA što smanjuje mogućnost vezanja inhibitora na zrele molekule miRNA sličnih sekvenci. No, prekursori su poprilično teške mete za inhibiciju jer se nalaze u jezgri i samo su prolazni oblik kod biogeneze miRNA (Beavers i sur. 2015).

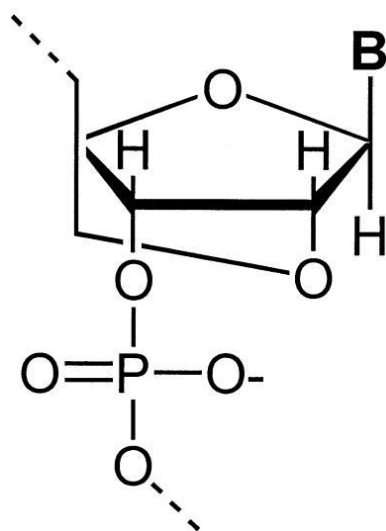
4.2.1. antimiR

Kod prvog pokušaja inhibicije funkcije miRNA *in vivo* upotrijebljeni su kemijski nemodificirani jednolančani DNA antimiR-oligonukleotidi (AMO, od engl. *anti-miRNA oligonucleotides*) koji su potpuno komplementarni endogenim molekulama miRNA. Zbog problema sa stabilnošću DNA rezultati studije bili su nezadovoljavajući te se sada umjesto DNA koristi RNA (Weiler i sur. 2006). AMO su ujedno i najkorišteniji alat za inhibiciju funkcija miRNA (Beavers i sur. 2015).

Za unaprjeđenje terapije potrebno je kemijski modificirati RNA-oligonukleotide i tako im povećati afinitet vezanja za miRNA, stabilnost i poboljšati farmakokinetička svojstva (Rooij i Kauppinen 2014). Kemijski se modificiraju šećeri, baze ili veze između nukleotida (Stenvang i sur. 2012).

Jedna od najranijih istraživanja inhibicije miRNA uključivala su modifikacije 2'-hidroksilne skupine riboze (Beavers i sur. 2015). Neke od uspješnih modifikacija su dodavanje metilne skupine, metoksietilne skupine ili fluora na 2'-OH (Zhang i Farwell 2007). Metilacijom se povećava afinitet vezanja za molekulu miRNA te se doprinosi otpornosti na nukleaze (Beavers i sur. 2015; Zhang i Farwell 2007) pa je metilacija oligonukleotida upotrebljena kod sinteze antimiR-122 koji specifično inhibira miRNA-122 što je pokazano smanjenjem razine ekspresije miRNA-122 i povećanjem razine ekspresije mRNA gena koje regulira miRNA-122 nakon primjene terapeutika (Krützfeldt i sur. 2005).

Jedne od najučinkovitijih molekula AMO su LNA (od engl. *locked nucleic acids*) (Slika 2) (Beavers i sur. 2015). Molekule LNA se od antimiR-a s modificiranom 2' OH skupinom strukturno razlikuju po tome što je kisik na položaju 2' povezan s 4' položajem riboze metilenskim mostom. Otpornije su na aktivnost nukleaza, manje toksične, stabilnije i vežu miRNA većim afinitetom (Zhang i Farwell 2007). Molekule LNA također su uspješno upotrebljene za inhibiciju miRNA-122. Ova miRNA pozitivno regulira replikaciju virusa hepatitisa C (HCV, od engl. *hepatitis C virus*) i zato se intenzivno proučava u pretkliničkim i kliničkim studijama (Jopling i sur. 2005). Pokazano je smanjenje ekspresije endogene miRNA-122 stvaranjem stabilnih interakcija između LNA i miRNA nakon injektiranja terapijske molekule LNA-antimiR-122 u primata (Elmén i sur. 2008). Dvije godine kasnije započelo je razvijanje lijeka Miravirsena (SPC3649). Miravirsena je 15 nukleotida duga molekula LNA komplementarna 5' kraju zrele miRNA-122 s kojom je završena faza 2 kliničkog ispitivanja (Janssen i sur. 2013; Lanford i sur. 2010).



Slika 2. Struktura monomera molekule LNA . Preuzeto iz Kurreck 2002.

Osim Miravirsena, još se nekoliko lijekova baziranih na molekulama LNA trenutno nalazi u različitim fazama kliničkog testiranja. Jedan od njih je Cobomarsen (MRG-106), LNA inhibitor miRNA-155 čija je povećana ekspresija povezana s progresijom najčešćeg podtipa kožnog T-staničnog limfoma (CTCL, od engl. *cutaneous T-cell lymphoma*), fungoidne mikoze (FM) (Seto i sur. 2018).

MRG-110 je LNA inhibitor miRNA-92a koji prolazi klinička ispitivanja i za koji su dokazani terapijski učinci. Inhibicijom miRNA-92a potiče se angiogeneza u mnogim

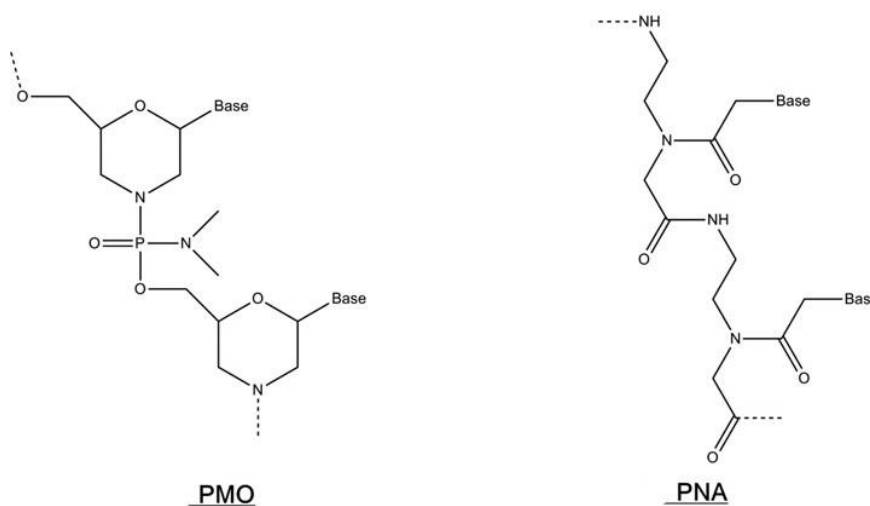
organskim sustavima što ima pozitivne posljedice na kardiovaskularne bolesti i zacjeljivanje rana (Abplanalp i sur. 2020; Gallant-Behm i sur. 2018).

Idući primjer je CDR132L (LNA inhibitor miRNA-132), lijek koji pomaže pacijentima sa zastojem srca nakon infarkta miokarda (Batkai i sur. 2021; Täubel i sur. 2021).

Osim molekula LNA, učinkoviti inhibitori miRNA su i PNA (engl. *peptide nucleic acids*) i PMO (engl. *phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides*) (Beavers i sur. 2015) (Slika 3).

Peptidne nukleinske kiseline, kao i LNA, imaju visok afinitet vezanja za ciljane molekule miRNA. Razlika između njih je ta da su molekule PNA analozi oligonukleotida čija je šećerno-fosfatna okosnica zamijenjena s N-(2-aminoetil)-glicniskim ostacima. Molekule PNA također su i stabilne te netoksične (Christopher i sur. 2016; Egholm i sur. 1993).

U usporedbi s PNA i LNA, PMO su manjeg afiniteta prema ciljanim molekulama. PMO umjesto riboze sadrže morfolino prstenove i umjesto fosfodieterskih imaju fosfordiamidatne veze. Ovakva građa uvelike doprinosi njihovoj otpornosti na nukleaze (Beavers i sur. 2015).



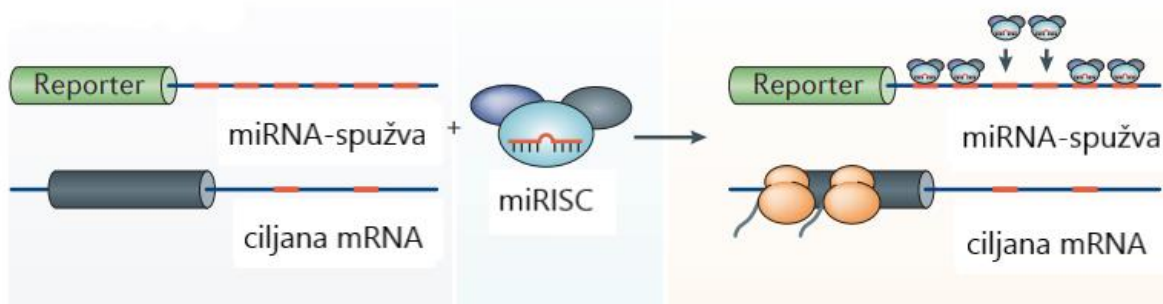
Slika 3. Struktura molekula PNA i PMO. Prilagođeno prema Beavers i sur. 2015.

4.2.2. miRNA-spužve

Inhibicija molekulama AMO i njihova održanost u stanici nije trajna. Kao alternativa mogu poslužiti miRNA-spužve, inhibitori miRNA kojima se postižu jednako dobri, ali dugoročniji rezultati. miRNA-spužve su dugi RNA-transkripti nastali ekspresijom transgena

sa snažnih promotora (Ebert i sur. 2007). Specifičnost ekspresije miRNA-spužve može se postići upotrebom tkivno-specifičnih promotora i korištenjem određenog tipa virusnog vektora za unos transgena (Ebert i Sharp 2010).

miRNA-spužve funkcioniraju kao lažne mete za miRNA i sadržavaju sekvencu komplementarnu „seed“ dijelu ciljane miRNA kako bi se mogle vezati (Slika 4). Zbog ovoga jedna miRNA-spužva može inhibirati cijelu porodicu miRNA koje sadrže odgovarajuću „seed“ sekvencu. To je jedna od prednosti u odnosu na inhibiciju molekulama AMO za koje se smatra da inhibiraju samo jednu određenu molekulu miRNA (Ebert i sur. 2007). Za inhibiciju cijele porodice miRNA bilo bi potrebno unijeti više različitih molekula AMO (Ebert i Sharp 2010).



Slika 4. Princip djelovanja miRNA-spužvi. miRNA-spužve služe kao lažne mete za ciljane molekule miRNA i tako omogućavaju translaciju pripadne mRNA. Prilagođeno prema Li i Rana 2014.

Za povećanje afiniteta vezanja spužve za miRNA u spužvu se dodaje nekoliko mjesta komplementarnosti (Ebert i sur. 2007). Jedna miRNA-spužva može sadržavati od 4 do 10 mjesta za vezanje između kojih postoji razmak od nekoliko nukleotida. Efikasnost inhibicije ovisi i o relativnom odnosu koncentracija miRNA-spužve i koncentracije miRNA. Unošenjem selekcijskog markera ili reporterskog gena u otvoreni okvir čitanja u vektor omogućuje se selekcija stanica u kojima je eksprimirana miRNA-spužva (Ebert i Sharp 2010).

Tehnologija miRNA-spužvi ima mnoge prednosti, ali zbog razvoja kemijski modificiranih oligonukleotida i poboljšanja metoda njihova unosa očekuje se veća primjena takve metode inhibicije (Ebert i Sharp 2010).

4.2.3. miRNA-maskiranje

Nešto drugačiji pristup inhibicije prekomjerne funkcije molekula miRNA ima tehnologija miRNA-maskiranja. Umjesto direktne inhibicije vezanjem na molekulu miRNA, dizajnira se molekula koja se potpuno komplementarno veže na molekulu mRNA i blokira vezanje ciljane miRNA (Wang 2011).

Molekule korištene kod miRNA-maskiranja su kemijski modificirani jednolančani oligoribonukleotidi dugi 22 nukleotida komplementarni 3' UTR kraju molekule mRNA koja sadrži sekvencu prepoznavanja ciljane molekule miRNA. miRNA-maskira na ovaj način ograničava pristup ciljane molekule miRNA mjestu za vezanje na molekuli mRNA. Djelovanje miRNA je zaustavljeno i ekspresija gena više nije potisnuta. miRNA-maskira ovako zapravo štiti gen od inhibicije molekulom miRNA. Na neki način miRNA-maskira štiti i molekule miRNA. Za razliku od metode inhibicije molekulama AMO kod koje se ciljane molekula miRNA nakon prepoznavanja degradira, u ovom pristupu miRNA-maskira ne inducira uništenje molekule miRNA i time omogućava normalnu funkciju utišavanja ostalih gena reguliranih tom istom miRNA (Wang 2011).

Dakle, strategija miRNA-maskiranja omogućuje regulaciju specifičnu za pojedini gen jer su molekule dizajnirane prema ciljanoj molekuli mRNA. Zato se za razliku od strategije inhibicije molekulama AMO ovdje očekuje poboljšanje ekspresije samo jednog ciljanog gena umjesto cijelog niza gena reguliranih tom određenom miRNA. Genska specifičnost miRNA-maskiranja je u mnogim situacijama poželjna te je zbog te karakteristike ova metoda prikladna za proučavanje posljedica regulacije jednog specifičnog gena molekulom miRNA (Wang 2011).

5. Izazovi upotrebe miRNA u genskoj terapiji

Unatoč velikom napretku u području upotrebe molekula miRNA u genskoj terapiji samo je nekoliko miRNA lijekova dospjelo u faze kliničkog istraživanja. To je posljedica mnogobrojnih izazova ove tehnologije. Jedan od najvećih izazova zasigurno je pronalazak molekule miRNA čija promjena ekspresije uzrokuje nastanak proučavane bolesti. Ostale bitne stavke na koje treba obratiti pažnju uključuju dizajniranje vektora za stabilan unos miRNA na

točno određeno mjesto istovremeno izbjegavajući nepoželjne nuspojave (Rupaimoole i Slack 2017).

5.1. Doprema miRNA na ciljano mjesto

Jedan od prvih izazova s kojima se suočava genska terapija bazirana na molekulama miRNA je pronalazak odgovarajućeg sustava dopreme koji će lijek zaštititi od uvjeta *in vivo* (Rupaimoole i sur. 2011). Odabir sustava dopreme ovisi o vrsti miRNA terapeutika, ekspresijskom obrascu određene miRNA ili gena (ovisno o metodi genske terapije) te o ciljanom mjestu dopreme miRNA lijeka (Momin i sur. 2021). Idealan sustav dostavlja lijek na specifično mjesto, biorazgradiv je i ne uzrokuje štetne imunodne reakcije (Rupaimoole i sur. 2011).

miRNA lijekovi se u organizam mogu isporučiti sistemski intravenskom injekcijom ili infuzijom. Funkcije nekih organa poput jetre, slezene i limfnih čvorova mogu se iskoristiti za pasivnu dopremu terapeutika gdje će se lijek i nosač nakupljati u tom organu. U središnji se živčani sustav terapeutici moraju unijeti intratekalno zbog prepreke koju predstavlja krvno-moždana barijera. Zbog manjka specifičnosti koja se javlja zbog sistemske primjene lijeka, u razvoju su neke metode direktnog unosa miRNA-terapeutika u ciljano područje poput intratumoralnog injektiranja (Bajan i Hutvagner 2020).

Virusni vektori već se dugo vremena upotrebljavaju za dopremu transgena u stanice ciljanog organizma. Iskorištene su infektivne karakteristike virusa koji kod infekcije animalnih i biljnih stanica u njih ubacuju svoj genom (Momin i sur. 2021). Virusni vektori mogu inficirati vrlo širok raspon tipova stanica te su uspješno modificirani za učinkovitu ekspresiju transgena, a i samoinaktivirajući su. Transgen će se u slučaju upotrebe vektora poput retrovirusa ili lentivirusa ugraditi u genom domaćina, a upotrebom vektora poput adenovirusa samo prolazno nalaziti u stanici domaćina (Bajan i Hutvagner 2020). Jedan od primjera upotrebe adenovirusa jest rekombinantni adenovirus koji kodira inhibitor miRNA-122 i uspješno dovodi do smanjenja razine miRNA-122 (Momin i sur. 2021). Rekombinantni adenovirusni vektori ne mogu se replicirati u stanicama domaćina što ih čini poželjnima za upotrebu jer nisu patogeni. Metode koje uključuju ugradnju transgena u genom domaćina sa sobom nose i probleme poput integracije transgena u dijelove genoma domaćina poput regulacijskih ili kodirajućih sekvenci što može dovesti do nepoželjnih efekata (Bajan i

Hutvagner 2020). Ovaj problem uz indukciju imunskog odgovora domaćina virusne vektore čini nesigurnima za upotrebu unatoč njihovom velikom potencijalu (Momin i sur. 2021).

Sljedeća strategija dopreme je inkapsulacija miRNA terapeutika lipidnom vezikulom koja olakšava prijenos preko stanične membrane (Bajan i Hutvagner 2020). Upotrebljavaju se liposomi, lipidne nanočestice i čvrste lipidne nanočestice. Sintetički kationski lipidi omogućavaju prijenos negativno nabijenih miRNA terapeutika preko negativno nabijene stanične membrane (Momin i sur. 2021). Zbog staničnog endosomnog puta koji često uzrokuje degradaciju unesenih vezikula lipidi su dizajnirani tako da otpuste transgen jednom kad uđu u stanicu (Bajan i Hutvagner 2020). Specifičnost i efikasnost dopreme se osigurava kemijskim modifikacijama lipida koje omogućavaju vezanje lipida na ciljano tkivo (Momin i sur. 2021).

Nanočestice se osim od lipida mogu sastojati i od polimera. Polimeri, slično lipidima, štite transgen od degradacije i osiguravaju specifičnost raznim kemijskim modifikacijama. Ova tehnologija također zahtijeva mehanizam otpuštanja transgena nakon ulaska u stanicu. Polimeri moraju biti biorazgradivi da bi se spriječilo njihovo nakupljanje u stanicama (Bajan i Hutvagner 2020).

5.2. Stabilnost i zaštita od nukleaza

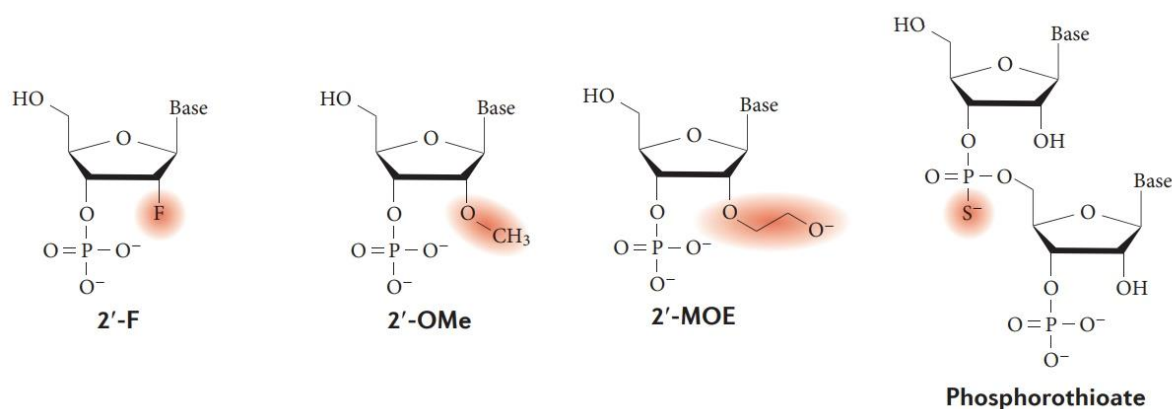
Nakon što je miRNA-terapeutik uspješno dopremljen u stanicu potrebno je spriječiti degradaciju nukleazama prije njegova djelovanja (Rupaimoole i sur. 2011). Degradaciji RNazama naročito su podložne molekule miRNA i miRNA-terapeutici s kemijski nemodificiranom 2'-OH skupinom riboze (Momin i sur. 2021). Za poboljšanje stabilnosti i zaštite od nukleaza moguće je uvesti razne kemijske modifikacije skupini 2'-OH. Dodaje joj se metilna skupina, metoksietilna skupina ili atom fluora. Osim ovih modifikacija ispitana je i zamjena fosfodieterske okosnice RNA-molekule fosforotioatom (Rupaimoole i sur. 2011) (Slika 5). Modifikacije se uvode na 5'-kraj kodirajućeg lanca miRNA jer nukleaze djeluju putem manje stabilnog kodirajućeg lanca. Ovo ukazuje na važnost asimetrije molekula miRNA (Momin i sur. 2021).

Oligonukleotidi sa fosforotioatnim vezama otporniji su na djelovanje nukleaza, no vežu se na ciljano molekulu manjim afinitetom. Za postizanje otpornosti na nukleaze i

povoljnog afiniteta prema ciljanoj molekuli potrebno je optimizirati omjer između fosfodieterskih i fosforotioatnih veza u molekuli terapeutika (Li i Rana 2014).

Otpornost na nukleaze i dobar afinitet vezanja ciljane molekule karakteristika je molekula sa metoksietilnom skupinom na 2'-OH položaju riboze (2'-MOE). U usporedbi sa oligonukleotidima s metiliranom 2' OH skupinom riboze, 2'-MOE modificirani oligonukleotidi su efikasniji (Li i Rana 2014).

Uvođenjem atoma fluora na 2'-OH poziciju riboze oligonukleotida unapređuje se afinitet za ciljanu molekulu, no otpornost na degradaciju nukleazama se smanjuje. Za postizanje stabilnosti i otpornosti na nukleaze kombinira se fosforotioatna okosnica i fluor na 2' OH skupini riboze. Ovakva molekula efikasnija je i od 2'-OH metiliranih oligonukleotida s fosforotioatnom okosnicom te 2'-MOE oligonukleotida s fosforotioatnom okosnicom (Li i Rana 2014).



Slika 5. Struktura kemijski modificiranih nukleotida upotrebljivanih za poboljšanje stabilnosti miRNA-terapeutika i njihove zaštite od nukleaza. Modifikacije pozicije 2'-OH riboze uključuju dodavanje atoma fluora (2'-F), metilne skupine (2'-OMe) i metoksietilne skupine (2'-MOE). Jedna od čestih modifikacija je i zamjena jednog kisika sumporom u fosfodieterskoj okosnici pri čemu nastaje fosforotioatna okosnica. Prilagođeno prema Li i Rana 2014.

5.3. Toksičnost i utjecaj na imunostni sustav

Kemijske modifikacije koje smanjuju osjetljivost na nukleaze mogu dovesti i do smanjenja ispravnog prepoznavanja mete, smanjenja aktivnosti terapeutika ili pak stvaranja toksičnih produkata razgradnjom modificiranih molekula (Rupaimoole i sur. 2011). U slučaju smanjenja ispravnog prepoznavanja mete miRNA-terapeutici će djelovati i nespecifično čime se proširuje područje njihova djelovanja i uzrokuju sistemske nuspojave. Neke od toksičnih posljedica upotrebe spomenutih kemijski modificiranih oligonukleotida su inhibicija zgrušavanja krvi, aktivacija komplementa i stanica imunostnog sustava te smanjen broj leukocita (Momin i sur. 2021).

Jednolančane i dvolančane egzogene molekule RNA potiču imunostni odgovor stimulirajući razne unutarstanične i izvanstanične receptore PAMP (od engl. *pathogen-associated molecular pattern*) kao što su TLR (od engl. *Toll like receptors*). Signalizacija putem molekula TLR je najčešća kod imunostnog odgovora na miRNA-terapeutike (Winkle i sur. 2021). Stimulacijom receptora TLR pokreće se signalni put preko proteina MyD88 čime započinje proizvodnja i otpuštanje proupalnih citokina i interferona (Barton i Medzhitov 2003).

MRX je primjer oponašatelja miRNA-34a čije se kliničko testiranje privelo kraju zbog ozbiljnih imunostnih nuspojava. Osim u ciljano tkivo, terapeutik je unesen i u koštanu srž i slezenu, imunostne organe važne za nastajanje i sazrijevanje stanica imunostnog sustava (Diener i sur. 2022). Petero pacijenata je između ostalog imalo simptome hipoksije, sistemske upale, zatajenja jetre i zatajenja disanja (Hong i sur. 2020). Primjer sigurnog terapeutika s minimalnim imunostnim reakcijama je MesomiR 1 (van Zandwijk i sur. 2017).

U pretkliničkim istraživanjima toksičnih utjecaja miRNA terapeutika potrebno je uzeti u obzir činjenicu da se utjecaj jednog terapeutika u modelu i ljudskom organizmu može razlikovati te da ne potiču svi terapeutici imunostni sustav na isti način (Winkle i sur. 2021).

6. Zaključak

Od prve ideje upotrebe miRNA-terapeutika pa sve do danas ova je tehnologija izrazito napredovala. Mnogi miRNA terapeutici prolaze kroz pretklinička ili klinička istraživanja, ali usprkos njihovim brojnim uspjesima primjena miRNA-terapeutika još nije ostvarena. Na putu do uspješne primjene miRNA-terapeutika potrebno je savladati još neke izazove poput toksičnog utjecaja terapeutika na imunski sustav i cjelokupni organizam ili pronalazak efikasnog načina dopreme terapeutika na ciljano mjesto. Brojna se istraživanja bave spomenutim problemima i ostalim načinima poboljšanja trenutnog stanja ove metode. Budućnost zasigurno donosi nove ideje i velike napretke u ovom području kojima će se ostvariti potencijal koji pružaju molekule miRNA.

7. Literatura

1. Abplanalp, W. T., Fischer, A., John, D., Zeiher, A. M., Gosgnach, W., Darville, H., Montgomery, R., Pestano, L., Allée, G., Paty, I., Fougerousse, F., Dimmeler, S. (2020): Efficiency and Target Derepression of Anti-miR-92a: Results of a First in Human Study. **Nucleic Acid Therapeutics**, 30(6), 335–345.
2. Alberti, C., Manzenreither, R. A., Sowemimo, I., Burkard, T. R., Wang, J., Mahofsky, K., Ameres, S. L., Cochella, L. (2018): Cell-type specific sequencing of microRNAs from complex animal tissues. **Nature Methods**, 15(4), 283–289.
3. Anderson, W. F. (1990): September 14, 1990: the beginning. **Human Gene Therapy**, 1, 371-372.
4. Annoni, A., Brown, B. D., Cantore, A., Sergi, L. S., Naldini, L., Roncarolo, M.-G. (2009): In vivo delivery of a microRNA-regulated transgene induces antigen-specific regulatory T cells and promotes immunologic tolerance. **Blood**, 114(25), 5152–5161.
5. Bader, A. G., Brown, D., Winkler, M. (2010): The Promise of MicroRNA Replacement Therapy. **Cancer Research**, 70(18), 7027–7030.
6. Bajan, S., Hutvagner, G. (2020): RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. **Cells**, 9(1), 137.
7. Bartel, D. P. (2004): MicroRNAs. **Cell**, 116(2), 281–297.
8. Bartel, D. P. (2009): MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, 136(2), 215–233.

9. Barton, G. M., Medzhitov, R. (2003): Toll-Like Receptor Signaling Pathways. **Science**, 300(5625), 1524–1525.
10. Batkai, S., Genschel, C., Viereck, J., Rump, S., Bär, C., Borchert, T., Traxler, D., Riesenhuber, M., Spannauer, A., Lukovic, D., Zlabinger, K., Hašimbegović, E., Winkler, J., Garamvölgyi, R., Neitzel, S., Gyöngyösi, M., Thum, T. (2021): CDR132L improves systolic and diastolic function in a large animal model of chronic heart failure. **European Heart Journal**, 42(2), 192–201.
11. Beavers, K. R., Nelson, C. E., Duvall, C. L. (2015): MiRNA inhibition in tissue engineering and regenerative medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 88, 123–137.
12. Beg, M. S., Brenner, A. J., Sachdev, J., Borad, M., Kang, Y. K., Stoudemire, J., Smith, S., Bader, A. G., Kim, S., Hong, D. S. (2017): Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. **Investigational new drugs**, 35(2), 180–188
13. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., Görlich, D. (2004): Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. **RNA**, 10(2), 185–191.
14. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., Cohen, S. M. (2005): Principles of MicroRNA–Target Recognition. **PLoS Biology**, 3(3), e85.
15. Broderick, J. A., Zamore, P. D. (2011): MicroRNA therapeutics. **Gene Therapy**, 18(12), 1104–1110.
16. Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W., Pasquinelli, A. E. (2016): Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. **Molecular Cell**, 64(2), 320–333.
17. Chalfie, M. (1981): Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. **Cell**, 24(1), 59–69.
18. Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., Shiekhattar, R. (2005): TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**, 436(7051), 740–744.
19. Chirshev, E., Oberg, K. C., Ioffe, Y. J., Unternaehrer, J. J. (2019): *Let - 7* as biomarker, prognostic indicator, and therapy for precision medicine in cancer. **Clinical and Translational Medicine**, 8(1), 24.

20. Christopher, A., Kaur, R., Kaur, G., Kaur, A., Gupta, V., Bansal, P. (2016): MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. **Perspectives in Clinical Research**, 7(2), 68.
21. Cushing, L., Kuang, P. P., Qian, J., Shao, F., Wu, J., Little, F., Thannickal, V. J., Cardoso, W. v., Lü, J. (2011): miR-29 Is a Major Regulator of Genes Associated with Pulmonary Fibrosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 45(2), 287–294.
22. Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., Hannon, G. J. (2004): Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature**, 432(7014), 231–235.
23. Diener, C., Keller, A., Meese, E. (2022): Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. **Trends in Genetics**, 38(6), 613–626.
24. Dunbar, C. E., High, K. A., Joung, J. K., Kohn, D. B., Ozawa, K., Sadelain, M. (2018): Gene therapy comes of age. **Science**, 359(6372).
25. Ebert, M. S., Sharp, P. A. (2010): MicroRNA sponges: Progress and possibilities. **RNA**, 16(11), 2043–2050.
26. Ebert, M. S., Neilson, J. R., Sharp, P. A. (2007): MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. **Nature Methods**, 4(9), 721–726.
27. Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A., Berg, R. H., Kim, S. K., Norden, B., Nielsen, P. E. (1993): PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson–Crick hydrogen-bonding rules. **Nature**, 365(6446), 566–568.
28. Elmén, J., Lindow, M., Schütz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjärn, M., Hansen, H. F., Berger, U., Gullans, S., Kearney, P., Sarnow, P., Straarup, E. M., Kauppinen, S. (2008): LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. **Nature**, 452(7189), 896–899.
29. Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., Bartel, D. P. (2009): Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, 19(1), 92–105.
30. Friedmann, T. (1992): A brief history of gene therapy. **Nature Genetics**, 2(2), 93–98.
31. Fu, Y., Chen, J., Huang, Z. (2019): Recent progress in microRNA-based delivery systems for the treatment of human disease. **ExRNA**, 1(1), 24.
32. Gallant-Behm, C. L., Piper, J., Dickinson, B. A., Dalby, C. M., Pestano, L. A., Jackson, A. L. (2018): A synthetic microRNA-92a inhibitor (MRG-110) accelerates

- angiogenesis and wound healing in diabetic and nondiabetic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, 26(4), 311–323.
33. Gallant-Behm, C. L., Piper, J., Lynch, J. M., Seto, A. G., Hong, S. J., Mustoe, T. A., Maari, C., Pestano, L. A., Dalby, C. M., Jackson, A. L., Rubin, P., Marshall, W. S. (2019): A MicroRNA-29 Mimic (Remlarsen) Represses Extracellular Matrix Expression and Fibroplasia in the Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, 139(5), 1073–1081.
34. Geisler, A., Fechner, H. (2016): MicroRNA-regulated viral vectors for gene therapy. **World Journal of Experimental Medicine**, 6(2), 37.
35. Gilles, M.-E., Slack, F. J. (2018): *Let-7* microRNA as a potential therapeutic target with implications for immunotherapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, 22(11), 929–939.
36. Gonçalves, G. A. R., Paiva, R. de M. A. (2017): Gene therapy: advances, challenges and perspectives. **Einstein (São Paulo)**, 15(3), 369–375.
37. Hermeking, H. (2010): The miR-34 family in cancer and apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, 17(2), 193–199.
38. Hong, D. S., Kang, Y.-K., Borad, M., Sachdev, J., Ejadi, S., Lim, H. Y., Brenner, A. J., Park, K., Lee, J.-L., Kim, T.-Y., Shin, S., Becerra, C. R., Falchook, G., Stoudemire, J., Martin, D., Kelnar, K., Peltier, H., Bonato, V., Bader, A. G., Smith, S., Kim, S., O'Neill, V., Beg, M. S. (2020): Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. **British Journal of Cancer**, 122(11), 1630–1637.
39. Iorio, M. v., Croce, C. M. (2012): MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. **EMBO Molecular Medicine**, 4(3), 143–159.
40. Janssen, H. L. A., Reesink, H. W., Lawitz, E. J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A. J., Patick, A. K., Chen, A., Zhou, Y., Persson, R., King, B. D., Kauppinen, S., Levin, A. A., Hodges, M. R. (2013): Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. **New England Journal of Medicine**, 368(18), 1685–1694.
41. Jo, M. H., Shin, S., Jung, S.-R., Kim, E., Song, J.-J., Hohng, S. (2015): Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. **Molecular Cell**, 59(1), 117–124.

42. Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D., Slack, F. J. (2005): RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. **Cell**, 120(5), 635–647.
43. Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M., Sarnow, P. (2005): Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. **Science**, 309(5740), 1577–1581.
44. Ketting, R. F., Fischer, S. E. J., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., Plasterk, R. H. A. (2001): Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. **Genes & Development**, 15(20), 2654–2659.
45. Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S. D. (2003): Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. **Cell**, 115(2), 209–216.
46. Kim, V. N., Nam, J.-W. (2006): Genomics of microRNA. **Trends in Genetics**, 22(3), 165–173.
47. Kim, V. N., Han, J., Siomi, M. C. (2009): Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 10(2), 126–139.
48. Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., Stoffel, M. (2005): Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs.’ **Nature**, 438(7068), 685–689.
49. Kurreck, J. (2002): Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, 30(9), 1911–1918.
50. Lanford, R. E., Hildebrandt-Eriksen, E. S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M. E., Kauppinen, S., Ørum, H. (2010): Therapeutic Silencing of MicroRNA-122 in Primates with Chronic Hepatitis C Virus Infection. **Science**, 327(5962), 198–201.
51. 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(5), 843–854.
52. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, V. N. (2003): The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, 425(6956), 415–419.
53. Li, Z., Rana, T. M. (2014): Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**, 13(8), 622–638.
54. Lodish, H. F., Zhou, B., Liu, G., Chen, C.-Z. (2008): Micromanagement of the immune system by microRNAs. **Nature Reviews Immunology**, 8(2), 120–130.

55. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., Kutay, U. (2004): Nuclear Export of MicroRNA Precursors. **Science**, 303(5654), 95–98.
56. Ma, Y., Shen, N., Wicha, M. S., Luo, M. (2021): The Roles of the Let-7 Family of MicroRNAs in the Regulation of Cancer Stemness. **Cells**, 10(9), 2415.
57. Misra, S. (2013): Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. **The Journal of the Association of Physicians of India**, 61(2), 127–133.
58. Misso, G., di Martino, M. T., de Rosa, G., Farooqi, A. A., Lombardi, A., Campani, V., Zarone, M. R., Gullà, A., Tagliaferri, P., Tassone, P., Caraglia, M. (2014). Mir-34: A New Weapon Against Cancer? **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, 3(9), e195.
59. Miyoshi, K., Miyoshi, T., Siomi, H. (2010): Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. **Molecular Genetics and Genomics**, 284(2), 95–103.
60. Momin, M. Y., Gaddam, R. R., Kravitz, M., Gupta, A., Vikram, A. (2021): The Challenges and Opportunities in the Development of MicroRNA Therapeutics: A Multidisciplinary Viewpoint. **Cells**, 10(11), 3097.
61. Pasquinelli, A. E. (2012): MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. **Nature Reviews Genetics**, 13(4), 271–282.
62. Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., Ruvkun, G. (2000): Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, 408(6808), 86–89.
63. Reid, G., Kao, S. C., Pavlakis, N., Brahmhatt, H., MacDiarmid, J., Clarke, S., Boyer, M., van Zandwijk, N. (2016): Clinical development of TargomiRs, a miRNA mimic-based treatment for patients with recurrent thoracic cancer. **Epigenomics**, 8(8), 1079–1085.
64. Reid, G., Pel, M. E., Kirschner, M. B., Cheng, Y. Y., Mugridge, N., Weiss, J., Williams, M., Wright, C., Edelman, J. J. B., Vallely, M. P., McCaughan, B. C., Klebe, S., Brahmhatt, H., MacDiarmid, J. A., van Zandwijk, N. (2013): Restoring expression of miR-16: a novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. **Annals of Oncology**, 24(12), 3128–3135.
65. Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., Ruvkun, G. (2000): The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, 403(6772), 901–906.

66. Rooij, E., Kauppinen, S. (2014): Development of microRNA therapeutics is coming of age. **EMBO Molecular Medicine**, 6(7), 851–864.
67. Rupaimoole, R., Slack, F. J. (2017): MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, 16(3), 203–222.
68. Rupaimoole, R., Han, H.-D., Lopez-Berestein, G., Sood, A. K. (2011): MicroRNA therapeutics: principles, expectations, and challenges. **Chinese Journal of Cancer**, 30(6), 368–370.
69. Sempere, L. F., Azmi, A. S., Moore, A. (2021): microRNA-based diagnostic and therapeutic applications in cancer medicine. **WIREs RNA**, 12(6), e1662.
70. Seto, A. G., Beatty, X., Lynch, J. M., Hermreck, M., Tetzlaff, M., Duvic, M., Jackson, A. L. (2018): Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. **British Journal of Haematology**, 183(3), 428–444.
71. Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S., Kauppinen, S. (2012): Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. **Silence**, 3(1), 1.
72. Täubel, J., Hauke, W., Rump, S., Viereck, J., Batkai, S., Poetzsch, J., Rode, L., Weigt, H., Genschel, C., Lorch, U., Theek, C., Levin, A. A., Bauersachs, J., Solomon, S. D., Thum, T. (2021): Novel antisense therapy targeting microRNA-132 in patients with heart failure: results of a first-in-human Phase 1b randomized, double-blind, placebo-controlled study. **European Heart Journal**, 42(2), 178–188.
73. van Zandwijk, N., Pavlakis, N., Kao, S. C., Linton, A., Boyer, M. J., Clarke, S., Huynh, Y., Chrzanowska, A., Fulham, M. J., Bailey, D. L., Cooper, W. A., Kritharides, L., Ridley, L., Pattison, S. T., MacDiarmid, J., Brahmbhatt, H., Reid, G. (2017): Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: a first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study. **The Lancet Oncology**, 18(10), 1386–1396.
74. Vasudevan, S. (2012): Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, 3(3), 311–330.
75. Wang, Z. (2011): The Principles of MiRNA-Masking Antisense Oligonucleotides Technology. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 676, 43–49.
76. Weiler, J., Hunziker, J., Hall, J. (2006): Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? **Gene Therapy**, 13(6), 496–502.

77. 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(5), 855–862.
78. Winkle, M., El-Daly, S. M., Fabbri, M., Calin, G. A. (2021): Noncoding RNA therapeutics — challenges and potential solutions. **Nature Reviews Drug Discovery**, 20(8), 629–651.
79. Xu, W., San Lucas, A., Wang, Z., Liu, Y. (2014): Identifying microRNA targets in different gene regions. **BMC Bioinformatics**, 15(S7), S4.
80. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., Cullen, B. R. (2003): Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes & Development**, 17(24), 3011–3016.
81. Zhang, B., Farwell, M. A. (2007): Translational Medicine: microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 12(1), 3–21.

8. Životopis

Zovem se Lara Jankaš i rođena sam 19.02.2001. godine u Čakovcu. Pohađala sam Osnovnu školu Domašinec od 2007. do 2015. godine. Obrazovanje sam nastavila u Gimnaziji Josipa Slavenskog Čakovec od 2015. do 2019. godine. Nakon gimnazije upisujem preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.