

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Klaarika Kikas

Vereplasmas ringlevate mikroRNAde ekspressiooni varieeruvus

Eesti populatsioonis

Magistritöö

Juhendaja Tarmo Annilo, PhD

Tartu 2015

Sisukord

Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus	5
Kirjanduse ülevaade	6
MikroRNA-d raku sees ja väljas	6
Tsirkuleerivate mikroRNA-de stabiilsus.....	6
MikroRNA-d rakkude vahelises kommunikatsioonis	8
MiRNA-de ülekanne vereringesse	8
Eksosoomid, mikrovesiikulid ja apoptootilised kehad miRNA-de transportijatena	9
MiRNA-de seotus valk-kompleksidega	10
MiRNA-de transport kõrge tihedusega lipoproteiinide vahendusel.....	11
MiRNA-de ülekanne sihtmärk-rakku	11
Näited miRNA-de ülekandest	12
Tsirkuleerivate miRNA-de kasutamine biomarkerina: eelised ja puudused	14
Näiteid tsirkuleerivate miRNA-de seostest haigustega.....	17
Tsirkuleerivad miRNA-d tervetes inimestes	22
Eksperimentaalosa.....	24
Valimi kirjeldus.....	24
Töös kasutatud materjalid ja meetodid.....	26
DNA eraldamine verest	26
cDNA süntees.....	27
Preamplifikatsioon	28
MiRNA profileerimine reaalaaja PCR meetodiga	29
Statistiline analüüs.....	30
Tulemused ja arutelu	31
Kokkuvõte	41
Summary	42

Tänuavaldused.....	43
Kasutatud kirjandus.....	44
Kasutatud veebiaadressid	58
Lisad	59

Kasutatud lühendid

Ago2 – *Argonaut 2* – Argonaut 2 valk

AMI – *acute myocardial infarction* – äge müokardi infarkt

NGS – *next generation sequencing* – uue põlvkonna sekveneerimine

NPM1 – *nucleophosmin 1* – nukleofosmiin 1

qRT-PCR – *quantitative real-time PCR* – kvantitatiivne reaalaaja PCR

RNU 6-2 – *U6 small nuclear 2* – väike tuuma RNA U6

snoRNA – *small nucleolar RNA* – väike tuumakese RNA

snRNA – *small nuclear RNA* – väike tuuma RNA

Sissejuhatus

Veri kannab üle kogu keha laiali paljusid erinevaid aineid. Teiste seas liiguvad vereringes ka väikesed mittekodeerivad RNA-d ehk mikroRNA-d (miRNA). MiRNA-d on umbes 20 nukleotiidi pikkused üheaahelised regulaatormolekulid, mis reguleerivad geeniekspressiooni mõjutamise kaudu mitmeid olulisi protsesse. Kuna miRNA-d on endogeense päritoluga, mõjutavad nad eeskätt just seda rakku, milles nad sünteesitakse. Osa miRNA-sid transporditakse tsirkulatsiooni, mille kaudu võivad miRNA-d jõuda eemalpaiknevate kudedeni. Seega on miRNA-del organismile nii lokaalne kui süsteemne mõju.

MiRNA-d on seotud näiteks rakkude jagunemise ja diferentseerumisega, kuid nad on olulised ka metabolismis, apoptoosis ja üldiselt kogu organismi arengus. MiRNA-d osalevad ka mitmete haiguste kujunemisel ja on leitud, et kõrvalekalded miRNA-de ekspressioonis võivad olla biomarkeriteks mitmete patoloogiliste protsesside korral. MiRNA-de leidumine veres teeb haiguse kohta käivate andmete kogumise võrreldes biopsia võtmisega otse haiguskoldest väheinvasiivseks ja mugavamaks.

Suurel hulgal leidub uurimistöid, mis keskenduvad miRNA-de ja haigustevaheliste seoste uurimisele, kuid seni on vähe andmeid miRNA-de profiili normaalse varieeruvuse kohta tervetel indiviididel. See on aga oluline alusteadmine miRNA-de biomarkeriks sobivuse hindamisel.

Käesoleva töö eesmärgiks on kirjeldada vereplasmas leiduvate miRNA-de ekspressiooni ja varieeruvust 84 erineva miRNA baasil.

Kirjanduse ülevaade

MikroRNA-d

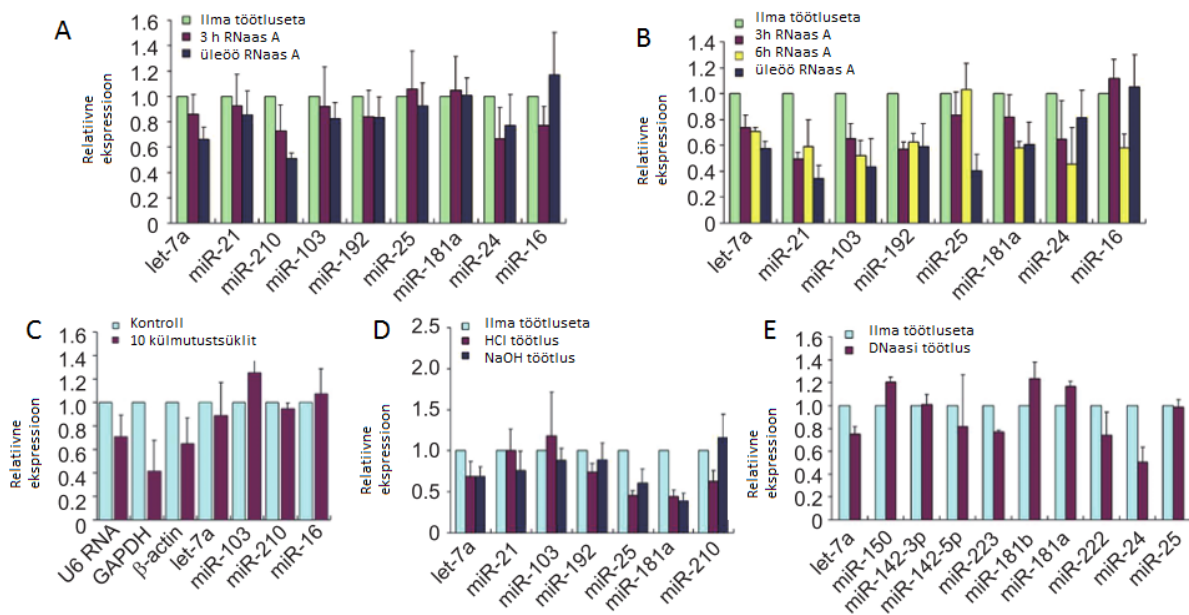
MikroRNA-d (miRNA-d) on lühikesed mittekodeerivad RNA-d, mis osalevad post-transkriptsioonilises regulatsioonis ja geenide ekspressiooni kontrollis (Bartel et al., 2004). Loomsed miRNA-d paarduvad enamasti osalise komplementaarsuse alusel mRNA-ga ja see võib viia mRNA translatsiooni takistamiseni ja/või selle lagundamiseni (Chu & Rana, 2006). Suur osa annoteeritud geene on miRNA-de ennustatud sihtmärkideks (Friedman et al., 2009) ning intratsellulaarsed miRNA-d on olulisteks geeniekspressiooni modulaatoriteks stressi, haiguste ja keskkonnast lähtuvatele stiimulite korral (Mendell and Olson, 2012). Ekstratsellulaarseid miRNA-sid leidub stabiilsel kujul enamikes kehavedelikes, sealhulgas veres, süljes, rinnapiimas, seemnevedelikus, spinaalvedelikus ja uriinis (Boon and Vickers, 2013). Ekstratsellulaarseid miRNA-sid peetakse rakkudevahelise kommunikatsiooni vahendajateks, sest neid saab transportida selektiivselt ja nad on funktsionaalsed retsipient-rakus (Vickers et al., 2011; Valadi et al., 2007).

Tsirkuleerivate mikroRNA-de stabiilsus

Plasmas olevad miRNA-d on üllatavalt stabiilsed ja vastupidavad erinevatele tingimustele. 2008. aastal ilmunud Cheni ja tema kolleegide poolt avaldatud artiklis uuriti miRNA-de vastupidavust erinevatele keskkonnatingimustele. Seerumi proove keedeti, sulatati ja külmutati korduvalt, muudeti proovi pH-d ning uuriti miRNA-de taset ka pärast pikaajalist seerumi säilitamist. Pärast seerumi proovide karmi töötlemist ei täheldatud olulisi erinevusi kvantitatiivse reaalka PCR-i (qRT-PCR) analüüsi tulemustes võrreldes töötlemata seerumi tulemustega (Chen et al., 2008).

Välise patogeeni kaitseks on veres RNAasne aktiivsus, mis tähendab, et verre sattunud üheaheelalised RNA-d lagundatakse ja seega ei tohiks miRNA-sid plasmas ja seerumis leida. Katsed on seevastu tõestanud vastupidist; sealhulgas on leitud, et erinevalt sünteetilistest oligotest on miRNA-d RNAasi lagundavale toimele väga vastupidavad (Chen et al., 2008). Need tulemused lubavad arvata, et veres ringlevad miRNA-d on kaitstud degradatsiooni eest. Lähemal uurimisel on jõutud järeldusele, et seerumis võivad miRNA-d olla pakitud erinevatesse mikropartiklitesse (eksosoomid, apoptootilised kehakesed, mikrovesiikulid)

(Zernecke et al., 2009; Valadi et al., 2007), olla seotud lipoproteiinsete kompleksidega (Vickers et al., 2011) või RNA-d siduvate valkudega (nt. Argonaut 2) (Arroyo et al., 2011).



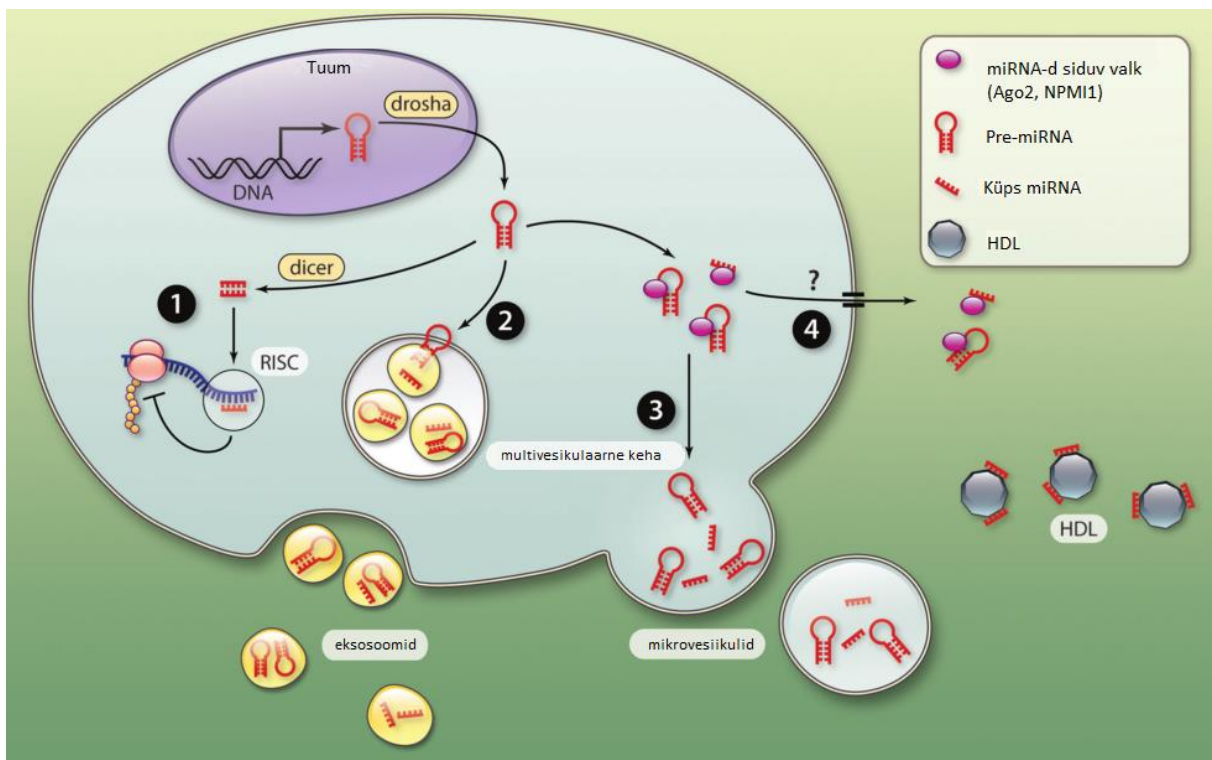
Joonis 1 MiRNA-de stabiilsus. MiRNA-d on vastupidavad erinevatele tötlustele. Graafikul A on kujutatud seerumist eraldatud miRNA-de vastupidavust RNAas A-le. Graafik B näitab RNAasi mõju seerumi miRNA-dele (RNAasi töötlus viidi läbi enne RNA eraldamist seerumist). Vastupidavust külmutamisele testiti 10 külmutustsükli rakendamisel (graafik C). MiRNA-de stabiilsust madala (pH=1) ja kõrge pH (pH=13) korral uuriti töötlemisel vastavalt HCl-ga ja NaOH-ga (graafik D). Seerumit inkubeeriti ka DNase I juuresolekul (graafik E). MiRNA-de tase määrati pärast iga töötlust qRT-PCR meetodil 40 sünteesitsükli läbiviimisel. Suuri miRNA-de vähenemisi pärast töötlust ei esinenud. Joonis põhineb Cheni ja tema kollegide töö (Chen et al., 2008).

MikroRNA-d rakkudevahelises kommunikatsioonis

MiRNA-de ülekanne vereringesse

Üldiselt võib jagada miRNA-de verre sattumise võimalused kolmeks:

- 1) Passiivne lekkimine vigastuste, krooniliste põletike või nekroosi tulemusena (Mitchell et al., 2008; Chen et al., 2008).
- 2) Aktiivne sekretsioon membraani vesiikulite, nagu näiteks eksosoomide, mikrovesiikulite ja apoptootiliste kehakeste vahendusel (Zernecke et al., 2009).
- 3) Aktiivne sekretsioon, kus miRNA-d moodustavad kompleksi lipoproteiinidega (Vickers et al., 2011) või RNA-d siduvate valkudega ja nukleofosmiin 1-ga (NPM1) (Wang et al., 2010c).



Joonis 2 miRNA-de vabanemine rakust ja transpordimehhanismid. 1. Pärast miRNA sünteesi ja töötlemist seondub üks miRNA ahel RNA-indutseeritud vaigistuskompleksiga (RISC) ja komplementaarne miRNA ahel võidakse lagundada või transportida rakust välja. 2. MiRNA-d ja pre-miRNA-d võidakse pakkida multivesikulaarsesse kehakesse, mille ühinemisel plasmamembraaniga vabanevad eksosoomid. 3. Tsütoplasmaatilised miRNA-d võivad rakust vabaneda ka mikrovesiikulites, mis punguvad raku plasmamembraanist. 4. MiRNA-d võivad vabaneda ka seotuna ainult valkudega, aga need vabanemise mehhanismid ja ulatus pole päris täpselt teada (Creemer et al., 2012; modifitseeritud joonis).

MikroRNA-d, mis on seotud vaid Argonaut (Ago) perekonna valkudega, vabanevad sageli mittespetsiifiliselt pärast raku surma. See on ka põhjus, miks pärast toksilist efekti mingile rakutüübile on veres suurenenud just vastava koe spetsiifiliste miRNA-de hulk (Corsten et al., 2010; Laterza et al., 2009).

Eksosoomid, mikrovesiikulid ja apoptootilised kehad miRNA-de transportijatena

El-Hefnawy pakkus koos kolleegidega ühena esimestest välja, et plasma miRNA-d on kaitstud lagundamise eest tänu sellele, et nad on seotud valguliste või lipiidsete vesiikulitega (El-Hefnawy et al., 2004). Vastavalt sellele, kui suur on vesiikul ja milline on selle vabanemise mehhanism, jagatakse need erinevatesse rühmadesse. Eksosoomid on endosoomist pärinevad vesiikulid, mille suurus jääb vahemikku 50 – 100 nm. Eksosoomid vabanevad rakust siis, kui multivesikulaarne keha liigub plasmamembraani lähedusse ja nende membraanid fuseeruvad. Selle tulemusel vabanevad luumenisisesed vesiikulid rakuvälisesse keskkonda (Kosaka et al., 2010). Mikrovesiikulid on membraaniga kaetud vesiikulid, mis on suuremad kui eksosoomid (0,1–1 µm). Mikrovesiikulid punguvad raku plasmamembraanist. Sarnase suurusega eksosoomid ja mikrovesiikulid on teineteisest füüsikaliste meetoditega raskesti eristatavad. Ultratsentrifuugimisel saadud proovis on segu mikrovesiikulitest ja eksosoomidest, kuid mitmetes töodes on selliselt eraldatud miRNA-sid nimetatud sageli eksosomaalseteks miRNA-deks, mis pole täiesti korrektne (Turchinovich et al., 2013). Apoptootilised kehad on läbimõõduga 0,5–2 µm ja tekivad raku programmeeritud rakusurma ehk apoptoosi käigus (Kosaka et al., 2010).

Valadi koos kolleegidega uuris rakkudest eraldunud eksosoomide sisaldust ja leidis, et nende uuritud rakud sisaldasid umbes 120 erinevat miRNA-d (Valadi et al., 2007). Avastuse tegi huvitavamaks asjaolu, et mõnede miRNA-de tase eksosoomis oli märkimisväärselt kõrgem kui doonorrakkudes. See viitab omakorda aktiivsele transpordile miRNA-de vesiikulisse viimisel. Pegati koos kolleegidega on näidanud, et miRNA-de aktiivset transporti vesiikulitesse esineb, kuid see ei kehti kõigi miRNA-de puhul. Nimelt peegeldasid 66% uuritavatest rakuvälistest miRNA-dest nende intratsellulaarset taset. Sealjuures olid 21% miRNA-dest vabanenud aktiivse mehhanismi tõttu ja 13% miRNA-de korral täheldati väljaspool rakku miRNA-sid vähem, kui oleks pidanud olema piiranguteta passiivse transpordi korral (Pigati et al., 2010). 2010. aastal näidati, et mesenhümaalsed rakud sekreteerivad eksosoomi, milles leidub nii küpseid miRNA-sid kui ka prekursor ehk lõplikult küpsemata miRNA-sid (Chen et al., 2010).

Siiani pole selged täpsed mehhanismid, millega on määratud, millised miRNA-d transporditakse rakust välja ning milliste kontsentratsiooni hoitakse kõrgemana raku sees.

MiRNA-de seotus valk-kompleksidega

Suur osa tsirkuleerivatest miRNA-dest on seotud valk-kompleksidega. Seerumis ja plasmas erinevaid miRNA-de komplekse uurides täheldas Arroyo koos kolleegidega kahte erinevat tüüpi miRNA-sid: vesiikulitega seotud ja vesiikulitega mitte seotud miRNA-d, kusjuures ligi 90% kõigist miRNA-dest moodustasid vesiikulitega mitte seotud miRNA-d. Mažoorse grupi uurimisel selgus, et miRNA-d destabiliseerusid RNAasi rikkas plasmas kui segusse lisati valke lõhkiva toimega proteinaas K. Kaitseks RNAasi lagundava toime eest on tsirkuleerivad miRNA-d seotud valkudega, millest levinum on Ago2 (Arroyo et al., 2011). Uurimusest selgus ka, et osasid miRNA-sid oli võimalik leida seotuna ainult valguga (nt. miR-122), samas kui teisi miRNA-sid leidis seotuna vaid vesiikulitega (nt. let-7a). See avastus pani aluse hüpoteesile, et miRNA-de transpordi ja seotuse viis võib olla määratud neid sekreteeriva rakutüübi poolt. Ainult valkudega seotud miR-122 on maksaspetsiifiline miRNA ja teised peamiselt vesiikulitega seotud miRNA-d võivad olla sekreteeritud rakkude poolt, millel toimub teadaolevalt vesiikulite eraldumine (nt. retikulotsüüdid) (Arroyo et al., 2011). Märkimisväärne on ka asjaolu, et valk-kompleksist vabasid miRNA-sid ega ka küpsete miRNA-de moodustumist ilma Ago perekonna valkudeta pole *in vivo* täheldatud. Seetõttu pole välistatud variant, et miRNA-d on valk-kompleksis ka vesiikulite ja HDL partikite sees (Turchinovich et al., 2013).

HepG2 rakke uurides leidis Wang koos kolleegidega, et vesiikulite ja valkudega seotud miRNA-de profiil on väga erinev (Wang et al., 2010). Avastuse seletamiseks pakkus ta välja hüpoteesi, et need kaks gruppi on seotud täiesti erinevate eksportmehhanismidega. Erinevate keemiliste inhibiitoritega katsetades jõuti järeldusele, et miRNA-de eksport on enamjaolt energiast sõltuv protsess, mis ei ole seotud Golgi kompleksi poolt vahendatud intrasellulaarse transpordiga ja eksosoomide moodustumisega (Wang et al., 2010). Lisaks Ago2 valgule leiti veel mitmeid valke, millega väikesed RNA-d olid seotud. Leitud valkude seas oli ka nukleofosmiin 1 (NPM1), millel on varasemates uuringutes täheldatud seost ribosoomi ekspordiga tuumast (Maggi et al., 2008). See oli huvitav leid, sest varasemalt oli NPM1 leitud peamiselt tuumast, mitte rakuvälisest keskkonnast. Uuringust selgus, et miRNA-d, mis olid seotud NPM1-ga, on vastupidavad RNAasile; ja kuna on leitud, et NPM1 osaleb ribosoomi

transpordis, siis on ka võimalik, et NPM1 on seotud nii miRNA transpordi kui stabiilsusega (Wang et al., 2010c).

MiRNA-de transport kõrge tihedusega lipoproteiinide vahendusel

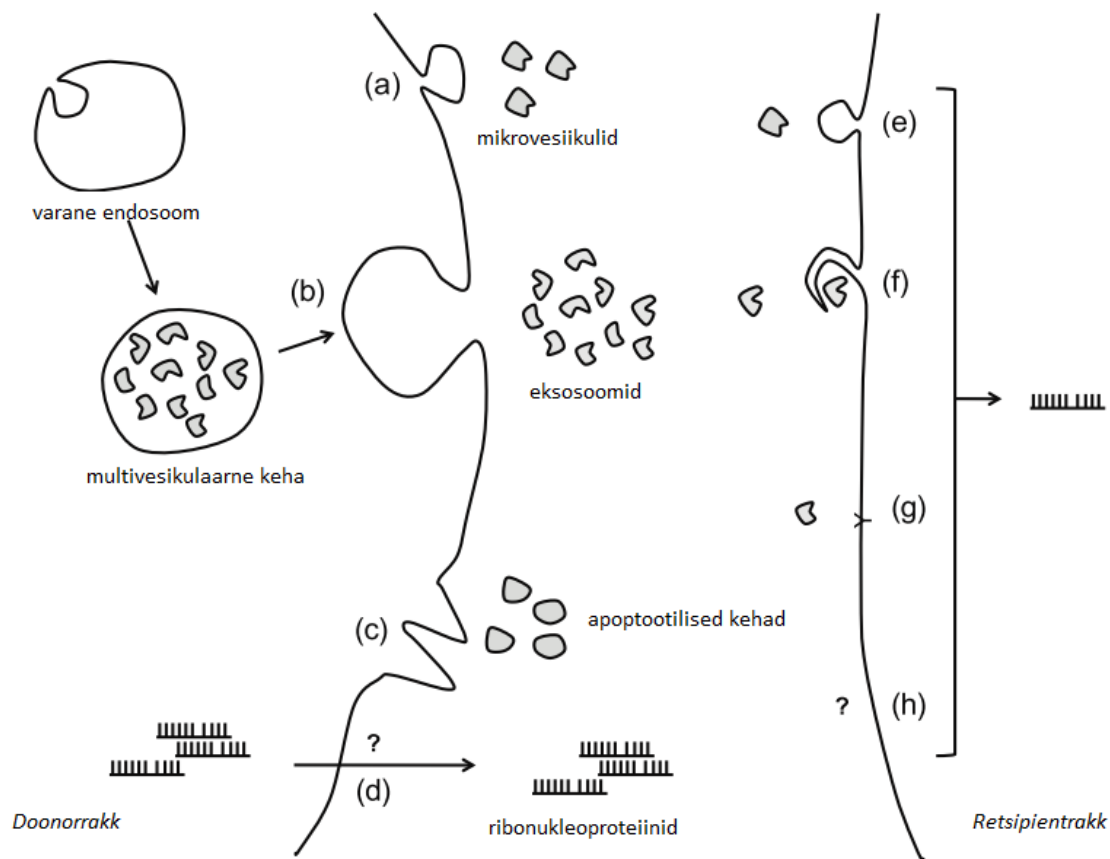
Katsed on näidanud, et endogeenseid miRNA-sid võivad transportida ka kõrge tihedusega lipoproteiinid (HDL) (Vickers et al., 2011). HDL osakesed on keskmiselt 8 kuni 12 nm diameetriga ja nende koostises on lipiidid, mis on võimelised moodustama nukleiinhapetega stabiilseid komplekse (Janas et al., 2006). Vickers uuris koos kolleegidega erinevusi eksosoomidega, HDL-ga ja madala tihedusega lipoproteiinidega (LDL) seotud miRNA-de profiilide vahel ja avastas mitu erinevat aspekti. Esiteks, HDL-miRNA profiil oli erinev eksosoomi profiilist. Teiseks, LDL-miRNA profiil sarnanes rohkem eksosoomi profiilile kui HDL profiilile. Kolmandaks, perekondlikku hüperkolesteroleemiat põdevate indiviidide HDL oli kõrgema miRNA kontsentratsiooniga ja sisaldas suuremal hulgal erinevaid miRNA-sid, kui tervete katsealuste HDL. Neljandaks, kasutades mass-spektrofotomeetriat ja Western blot analüüsi, ei leitud HDL fraktsioonidest varem identifitseeritud RNA-d siduvaid valke Ago2 ja NPM1. Viiendaks, kahe arteroskleroosi hiire mudeli uurimisel selgus, et HDL-miRNA profiilid erinesid oluliselt tervete kontrollloomade profiilidest ja märkimisväärne profiilide kattuvus oli hoopis perekondliku hüperkolesteroleemia patsientidega (Vickers et al., 2011). Kokkuvõtteks võib öelda, et HDL on varem seerumis kirjeldatud miRNA-d siduvatest süsteemidest iseseisev ja HDL-miRNA profiilid haigetel ja tervetel erinevad.

MiRNA-de ülekanne sihtmärk-rakku

Praegu ei ole veel täpselt teada, kuidas miRNA-d teistesse rakkudesse jõuavad, samuti on teadmata ka mehhanismid, mis määravad nende spetsiifilisuse. MiRNA-d võivad retsipient-rakku jõuda erinevate mehhanismide vahendusel ning selleks on välja pakutud erinevad võimalused (G. Cheng, 2015; Cortez et al., 2011):

1. Vesiikulitesse pakitud miRNA-d haaratakse sisse endotsütoosi, fagotsütoosi või ka lihtsalt plasmamembraanide fuseerumise tulemusel.
2. Spetsiifiliste valkudega seotud miRNA-d jõuavad rakku spetsiifiliste pinnaretseptorite vahendusel.
3. Mikrovesiikulite pinnal on spetsiaalsed rakku ära tundvad molekulid või on retsipient raku pinnal retseptorid, tänu millele saab toimuda spetsiifiline miRNA-de vastvõtt.

4. Rakkudevahelised aukliidused võimaldavad miRNA-de vaba ülekannet (Lim et al., 2011).



Joonis 3 MiRNA-de ülekanne. Eksotsütoosil (a), eksosoomide vabanemisel (b), apoptootiliste kehade moodustumisel (c) või mõnel muul viisil doonorrakust väljunud miRNA-d võivad retsipient-rakku jõuda mitmel erineval viisil. Nende hulka kuulub otsene fusioon (e), internalisatsioon (f), retseptor-vahendatud ülekanne ja muud vähem kirjeldatud mehhanismid (h) (Reid et al., 2010; modifitseeritud joonis).

Üheks meetodiks rakkudevahelises suhtlemises peetakse eksosomaalsete vesiikulite ülekannet, mis on oma olemuselt vesiikuli ühinemine sihtmärk-raku membraaniga, millele järgneb vesiikuli sisu ülekanne. Hüpoteesi kohaselt kinnitub vesiikul raku pinnale, mis võib olla vahendatud ligand – retseptor interaktsiooni poolt, ja seejärel toimub membraanide ühinemine (Loyer et al., 2014). Ühinemisprotsess on omakorda sõltuv vesiikuli lipiidsest koostisest ja on näidatud, et fosfatidülseriin vesiikuli membraanis soodustab fuseerumist (Rautou et al., 2011).

Näited miRNA-de ülekandest

In vivo uurimustest on selgunud, et enamik rakutüüpe, sealhulgas neuronid, lihaskud ja kasvajakud, sekreteerivad eksosoomide või mikrovesiikuleid (Lachenal et al., 2011; Valadi et

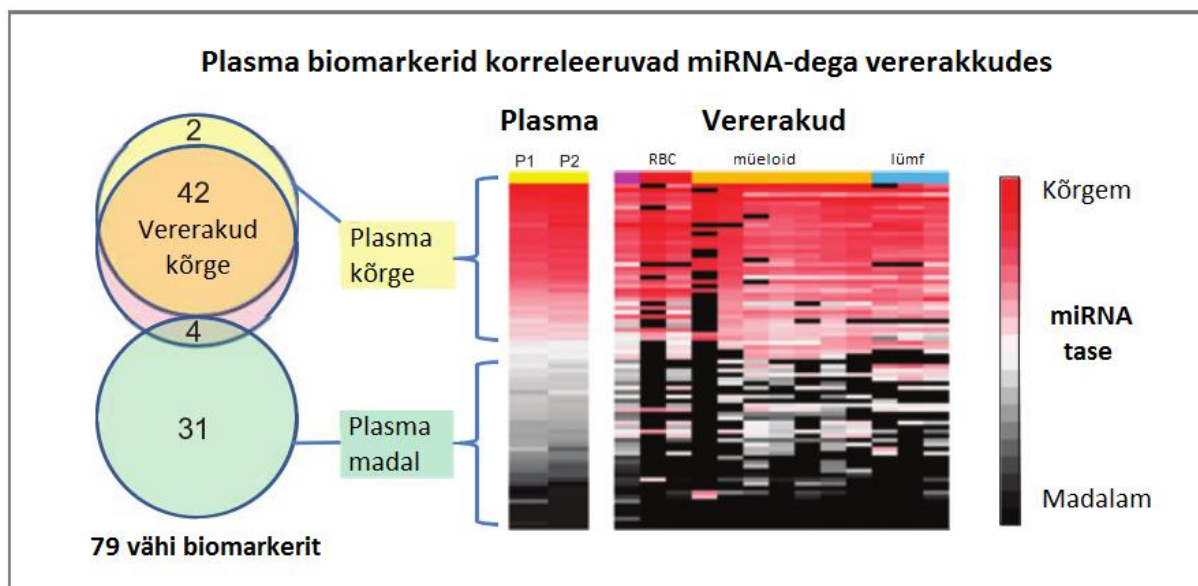
al., 2007; Rosell, Wei, & Taron, 2009; Skog et al., 2008; Kuwabara et al., 2011). Suur osa mikrovesiikulitest ja eksosoomidest on tõenäoliselt sekreteeritud trombotsüütide poolt (Heijnen et al., 1999). Funktsionaalsete miRNA-de endogeenset ülekannet kirjeldati esimest korda 2009. aastal, kui leiti, et apoptootilised kehad kannavad miR-126 retsipient-rakkudesse (Zernecke et al., 2009). Varasemalt oli märgatud, et apoptootilise kehade vabanemine tsirkulatsiooni inhibeerib arteroskleroosi progressiooni. Zernecke leidis efekti põhjuseks olevat apoptootilised kehad, mis kannavad kemokiini CXCL12 produktsiooni indutseerivat ja seeläbi kaitsvat funktsiooni omavat miR-126 (Zernecke et al., 2009). Eksosoomide ülekannet täheldati esmakordselt 2010. aastal, kui leiti, et Epstein-Barri viirusega nakatunud rakud sekreteerisid viraalseid miRNA-sid kandvaid eksosoomi. Samas eksperimendis täheldati ka miRNA-de mõju retsipient dendriitrakkudele (Pegtel et al., 2010).

Tsirkuleerivate miRNA-de kasutamine biomarkerina: eelised ja puudused

Ideaalne biomarker peab vastama mitmetele erinevatele kriteeriumitele, milleks on näiteks: vähene invasiivsus, kõrge spetsiifilisus ja tundlikkus, võime eristada patoloogiaid, haiguse varajases staadiumis määramise võimalikkus, tundlikkus haiguse kulu suhtes, proovi füüsiline stabiilsus, kiire, odava ning täpse detekteerimismeetodi olemasolu (Etheridge et al., 2011). Enamik praegu kasutusel olevatest verest määratavatest biomarkeritest põhinevad valkude erinevate tasemete määramisel, kuid need meetodid on liialt töömahukad (Duffy, 2007). Uute valgupõhiste biomarkerite väljatöötamisel ja arendamisel tuleb arvesse võtta mitmekesiseid posttranskriptsioonilisi modifikatsioone, järjestuse variatsioone eri liigist katseloomade kasutamisel ja muid aspekte, mis teevad protsessi kalliks ja aeganõudvaks (Etheridge et al., 2011).

Tsirkuleerivatel miRNA-del on mitmeid omadusi, mille tõttu neid peetakse perspektiivseteks biomarkeriteks. MiRNA-d on erinevates tingimustes stabiilsed (Chen et al., 2008), nad on tugevalt konserveerunud järjestustega kogu looma- ja taimeriigis (Cortez et al., 2011), mõnede miRNA-de ekspressioon on koe- või seisundispetsiifiline ja neid on kerge määrata näiteks qPCR analüüsiga (Kroh et al., 2010). Lisaks on leitud mitmeid erinevaid seoseid haiguste ja tsirkuleerivate miRNA-de vahel.

Kuigi miRNA-d vastavad mitmele ideaalse biomarkeri kriteeriumile, esineb ka mitmeid aspekte, mida tuleks kaaluda ja arvesse võtta. Esimeseks aspektiks võiks olla asjaolu, et seerumi miRNA-d on väga tugevas seoses vererakkudes esinevate miRNA-dega ja enamik seerumis esindatud miRNA-dest on olemas ka vererakkudes (Chen et al., 2008; Pritchard et al., 2012). Kõrvalekalded keskmisest vererakkude hulgast veres ja hemolüüsi intensiivsus mõjutavad miRNA-de taset seerumis kuni 50 korda (Pritchard et al., 2012).



Joonis 4 Plasmas ja vererakkudes leiduvate miRNA-de omavaheline suhe. Vasakul on kujutatud 79 varem avaldatud potentsiaalset miRNA biomarkerit Venni diagrammil. Kollane ring kujutab miRNA-sid, mille ekspressioon on mediaanist kõrgem. Sinine ring kujutab mediaanist madalama ekspressiooniga miRNA-sid. Roosa ring kujutab miRNA-sid, mille ekspressioon on vererakkudes kõrge (ülemine viiekümnes protsentil). Parempoolsel joonisel on kujutatud kõrvuti plasma ja vererakkude miRNA-de profiil. Varem plasmas kirjeldatud potentsiaalsed biomarkerid korreleeruvad tugevalt vererakkudest leitud miRNA-dega (Pritchard et al., 2012; modifitseeritud joonis).

Teiseks oluliseks aspektiks on asjaolu, et miRNA-de uurimisel ei ole välja kujunenud kindlaid standardeid ja uurimustes kasutatakse erinevaid meetodeid, mille tulemusi sageli omavahel võrrelda ei saa (Schöler et al., 2010). Varieeruvuse vähendamiseks oleks vaja standardiseerida vere kogumise protsess, sealhulgas tuleks paika panna aeg, mille jooksul verest plasma või seerum eraldatakse, sest see muudab vererakkude mõju miRNA osakaalule (Pritchard et al., 2012). RNA eraldamine peaks põhinema sama põhimõttega meetoditel ja valik tuleks langetada ka selles osas kas eraldada totaalne RNA või ainult lühikeste RNA fragmentidega rikastatud fraktsioon (Cheng, 2015).

Viimaks tuleks ära määrata, millise meetodiga miRNA-sid mõõta, sest näiteks uue põlvkonna sekveneerimise (NGS) ja PCR tehnoloogiatel põhinevate analüüside tulemuste otsene võrdlemine on komplitseeritud (Linsen et al., 2009). Kolmeks peamiseks praegu kasutatavaks meetodiks on: kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR), mikrokiibid ja uue ehk teise põlvkonna sekveneerimine (NGS). qRT-PCR on odav ja kiire meetod, kuid võrreldes mikrokiipidega on ühe korraga võimalik analüüsida vaid väike kogus proove. Mikrokiibid ja NGS omakorda vajavad kõrgemat miRNA algkontsentratsiooni ja sageli tuleb kasutada preamplifikatsiooni

etappi, mis suurendab proovide vahelist varieeruvust. NGS-i suureks plussiks on võimalus avastada uusi miRNA-sid (Cheng, 2015).

Paljude miRNA-de kasutamine biomarkeritena on keerukas ka seetõttu, et ühe miRNA-ga on sageli seostatud mitmeid erinevaid fenotüüpe. Üheks selliseks näiteks on miR-141, mille ekspressioonitase tõuseb raseduse ajal ja kõrge mir-141 tasemega naistel on kõrgem risk preeklampsia tekkeks (Chim et al., 2008; H. Li et al., 2013). Madalama miR-141 ekspressiooniga patsiendid põevad seevastu suurema tõenäosusega süsteemset erütematoosluupust (Wang et al., 2011). Kõrge miR-141 kotsentratsiooniga kolorektaalvähi patsientidel on täheldatud pikemat elulemust (Diaz et al., 2014). Samas on leitud, et miR-141 kõrge tase soodustab vähi metastaseerumist (Bryant et al., 2012) ning on seotud eesnäärme vähi ja hepatotsellulaarse kartsinoomi halva prognoosiga (Gonzales et al., 2011; Yeh et al., 2014). Tuginedes nendele teadmistele saab öelda, et miRNA-de kasutamine biomarkerina vajab lisaks ulatuslikke teadmisi patsiendi eelneva haigusloo kohta.

Näiteid tsirkuleerivate miRNA-de seostest haigustega

Tsirkuleerivaid miRNAsid on seostatud paljude erinevate haigustega. Alljärgnev tabel 1 kirjeldab vaid väikest osa võimalikest tsirkuleerivatest miRNA-dest ja nendega seotud haigustest.

Praeguseks on juba üle kümne uurimisgrupi leidnud, et teatud miRNA-de taset võiks kasutada erinevate kardiovaskulaarhaiguste diagnoosimiseks või prognoosimiseks. Mitmed neist uuringutest vajavad veel valideerimist ka teistes populatsioonides, kuid juba on selge, et mõned miRNA-d on spetsiifiliselt seotud südamehaigustega (Creemers et al., 2012).

Mitmed uurimisgrupid on uurinud hüpoteesi, et akuutse müokardiinfarkti (AMI) korral lekivad vereringesse spetsiifilised miRNA-d ja seega on miRNA-sid jälgides võimalik hinnata ja detekteerida südame vigastusi (Creemers et al., 2012). AMI patsientide seas on täheldatud näiteks miR-1 (Cheng et al., 2010), miR-133b (Peng et al., 2014), miR-134 (He et al., 2014) ja mitmete teiste küpsete miRNA-de ekspressiooni muutust.

Palju on kirjeldatud ka miRNA-de seost erinevate vähkkasvajatega. Uurimustest on selgunud asjaolu, et vähi rakkude poolt sekreteeritavad miRNA-d mõjutavad vähi kulgu ja osalevad ka selle metastaasis. Näiteks võivad hepatotsellulaarsest vähist pärit miRNA-d soodustada retsipientrakkude kasvu (Kogure et al., 2011), monotsüütide poolt sekreteeritud miR-150 võib soodustada endoteeli rakkude angiogeneesi (Li et al., 2013b) ja migratsiooni (Zhang et al., 2010). Angiogeneesi ja migratsiooni võib esile kutsuda ka miR-9 (Zhuang et al., 2012); ja miR-223 ekspressioonitasemel on täheldatud seost rinnavähi invasiivsusega (Yang et al., 2011)

Tabel 1 Näiteid tsirkuleerivatest miRNA-dest ja nendega seotud haigustest. Tabelis kajastuvad miRNA-d on firma QIAGEN plasma ja seerumi uurimise paneelil, mida järgnevas eksperimentaalses töös kasutati. Tabelis on välja toodud tööd, kus haigetes on võrreldes tervetega konkreetne miRNA üles või alla reguleeritud.

miRNA	Suund	Haigus	Allikas
let-7a-5p	Alla	Alzheimeri tõbi	(Satoh et al., 2015)
miR-1-3p	Üles	Ebastabiilne stenokardia	(D'Alessandra et al., 2013)
	Üles	Äge müokardiinfarkt	(Cheng et al., 2010)
miR-100-5p	Üles	Osteoporoos	(Huang and Chen, 2014)
	Üles	Südamepuudulikkus	(Sucharov et al., 2008)

miR-106b-5p	Üles	Maovähk	(Tsujiura et al., 2010)
	Üles	Südame isheemia	(Ren et al., 2013)
miR-10b-5p	Üles	Rinnavähk	(W. Chen et al., 2013)
miR-122-5p	Üles	Krooniline hepatiit C	(Su et al., 2013)
miR-124-3p	Üles	Teist tüüpi diabeet	(Kong et al., 2011)
miR-125b-5p	Üles	Mitte-väikerakuline kopsukartsinoom	(Chen et al., 2008)
miR-126-3p	Üles	Stenokardia	(D'Alessandra et al., 2013)
miR-133a-3p	Üles	Südame isheemia	(Kuwabara et al., 2011)
miR-133b	Üles	Äge müokardiinfarkt	(Peng et al., 2014)
miR-134-5p	Üles	Äge müokardiinfarkt	(He et al., 2014)
miR-141-3p	Üles	Eesnäärme vähk	(Lodes et al., 2009)
miR-143-3p	Alla	Arterioskleroos	(Cordes et al., 2010)
miR-146a-5p	Üles	Mitte-väikerakuline kopsukartsinoom	(Chen et al., 2008)
miR-150-5p	Üles	Mitte-väikerakuline kopsukartsinoom	(Chen et al., 2008)
miR-155-5p	Üles	Difuusne suurerakuline lümfoom	(Lawrie et al., 2008)
miR-17-5p	Üles	Maovähk	(Tsujiura et al., 2010)
miR-17-3p	Alla	Alzheimeri haigus	(Satoh et al., 2015)
miR-18a-5p	Üles	Söögitoru lamerakk kartsinoom	(Hirajima et al., 2013)
miR-192-5p	Üles	Hepatotsellulaarne kartsinoom	(Zhou et al., 2011)
miR-195-5p	Üles	Rinnavähk	(Heneghan et al., 2010)
miR-196a-5p	Üles	Pankrease vähk	(Wang et al., 2009)
miR-19a-3p	Alla	Südame isheemia	(Weber et al., 2011)
miR-19b-3p	Alla	Maovähk	(Zhang et al., 2015)
miR-200a-3p	Üles	Munasarja vähk	(Kan et al., 2012)
miR-200b-3p	Üles	Munasarja vähk	(Kan et al., 2012)
miR-200c-3p	Üles	Maovähk	(Valladares-Ayerbes et al., 2012)

miR-203a-3p	Alla	Süsteemne erütematoosluupus	(Wang et al., 2011)
miR-205-5p	Üles	Mitte-väikerakuline kopsukartsinoom	(Chen et al., 2008)
miR-208a-3p	Üles	Südame isheemia	(Fichtlscherer et al., 2010)
miR-20a-5p	Üles	Kaelavähk	(Zhao et al., 2013)
miR-21-5p	Üles	Neeru fibroos	(Glowacki et al., 2013)
miR-210-3p	Üles	Difuusne suurerakuline lümfoom	(Lawrie et al., 2008)
miR-214-3p	Alla	Südame isheemia	(Lu et al., 2013)
miR-215-5p	Üles	Krooniline hepatiit	(Zhang et al., 2014)
miR-221-3p	Üles	Kolorektaalvähk	(Pu et al., 2010)
miR-222-3p	Üles	Mitte-väikerakuline kopsukartsinoom	(Chen et al., 2008)
miR-223-3p	Alla	Sepsis	(Wang et al., 2010b)
miR-224-5p	Üles	Hepatotsellulaarne kartsinoom	(Wang et al., 2008)
miR-23a-3p	Üles	Mitte-väikerakuline kopsukartsinoom	(Chen et al., 2008)
miR-25-3p	Üles	Söögitoru lamerakk-kartsinoom	(Komatsu et al., 2014)
miR-27a-3p	Üles	Mitte-väikerakuline kopsukartsinoom	(Chen et al., 2008)
miR-296-5p	Üles	Maovähk	(Li et al., 2014)
miR-29a-3p	Üles	Kolorektaalvähk	(Huang et al., 2010)
miR-30d-5p	Alla	Eesnäärme vähk	(Xuan et al., 2015)
miR-34a-5p	Alla	Kolorektaalvähk	(Nugent et al., 2012)
miR-375	Üles	Diabeet	(Erener et al., 2013)
miR-423-5p	Üles	Südamepuudulikkus	(Tijsen et al., 2010)
miR-499a-5p	Üles	Äge müokardiinfarkt	(Adachi et al., 2010)
miR-574-3p	Üles	Eesnäärme vähk	(Lodes et al., 2009)
miR-885-5p	Üles	Eesnäärme vähk	(Lodes et al., 2009)
miR-9-5p	Alla	Rinnavähk	(Lehmann et al., 2008)

miR-92a-3p	Alla	Akuutne leukeemia	(Tanaka et al., 2009)
miR-93-5p	Üles	Munasarja vähk	(Resnick et al., 2009)
let-7c-5p	Alla	Rinnavähk	(Li et al., 2015)
miR-107	Üles	Eesnäärme vähk	(Lodes et al., 2009)
miR-10a-5p	Üles	Urogenitaalsete teede kartsinoom	(Veerla et al., 2009)
miR-128-3p	Üles	Mitte-väikerakuline kopsukartsinoom	(Chen et al., 2008)
miR-130b-3p	Üles	Hepatotsellulaarne kartsinoom	(Liu et al., 2012)
miR-145-5p	Alla	Südame isheemia	(Fichtlscherer et al., 2010)
miR-148a-3p	Üles	Luukasvaja	(Ma et al., 2014)
miR-15a-5p	Üles	Kriitiline jäseme isheemia	(Spinetti et al., 2013)
miR-184	Üles	Keelevähk	(Wong et al., 2008)
miR-193a-5p	Üles	Kolorektaalvähk	(Yong et al., 2013)
miR-204-5p	Üles	Krooniline neerusiiriku kahjustus	(Scian et al., 2011)
miR-206	Üles	Rabtomüosarkoom	(Miyachi et al., 2010)
miR-211-5p	Üles	Melanoom	(Bell et al., 2014)
miR-26b-5p	Üles	Esmane maksatsirroos	(Tan et al., 2014)
miR-30e-5p	Alla	Mitte-väikerakuline kopsukartsinoom	(Silva et al., 2011)
miR-372-3p	Üles	Munandikasvaja	(Syring et al., 2015)
miR-373-3p	Üles	Munandikasvaja	(Syring et al., 2015)
miR-374a-5p	Üles	Kodade virvendus	(Lu et al., 2015)
miR-376c-3p	Üles	Rinnavähk	(Cuk et al., 2013)
miR-7-5p	Üles	Kolorektaalvähk	(Wang et al., 2015)
miR-96-5p	Üles	Ülemiste kuseteede vähk	(Kriebel et al., 2015)
miR-103a-3p	Üles	Pahaloomuline mesoteliom	(Weber et al., 2014)
miR-15b-5p	Üles	Hepatotsellulaarne	(Liu et al., 2012)

kartsinoom			
miR-16-5p	Üles	Eesnäärme vähk	(Lodes et al., 2009)
miR-191-5p	Alla	Äge müokardiinfarkt	(Hsu et al., 2014)
miR-22-3p	Üles	Mitte-väikerakuline kopsukartsinoom	(Franchina et al., 2014)
miR-24-3p	Üles	Mitte-väikerakuline kopsukartsinoom	(Chen et al., 2008)
miR-26a-5p	Üles	Hepatotsellulaarne vähk	(Zhou et al., 2011)
miR-31-5p	Üles	Suuvähk	(Liu et al., 2010)

Tsirkuleerivad miRNA-d tervetes inimestes

Tervete indiviidide seerumis on leitud ligikaudu 100–200 erinevat miRNA-d, mida on detekteerimiseks piisavalt suurel hulgal (Reid et al., 2011). MirRNA-sid, mida on proovis vähem kui kümme koopiat, on keeruline detekteerida. Meeste ja naiste seerumis on miRNA-de ekspressioon väga sarnane, mis viitab sellele, et enamjaolt on miRNA-d sattunud vereringesse sooneutraalsetest rakkudest. Chen koos kolleegidega leidis, et suurest hulgast miRNA-dest võivad meessoos spetsiifilised olla miR-100, miR-184 ja miR-923 ning miR-222 võiks olla naissoos spetsiifiline (Chen et al., 2008). Erinevate uuringute vahel leitud tervete miRNA-de profiilides on leitud vähe kattuvusi, mis võib olla ka tingitud erinevate uurimismeetodite kasutamisest (Reid et al., 2011). Chen koos kolleegidega uuris 21 terve inimese lühikesi RNA-sid ja sekveneerimise tulemusel leiti 190 juba teadaolevat miRNA-d (Chen et al., 2008). Mitchell määras koos kolleegidega TaqMan madala tihedusega RT-qPCR kiipi kasutades terve indiviidi seerumist 130 erinevat miRNA-d (Mitchell et al., 2008). Sama meetodiga määrati aasta hiljem 148 miRNA-d (detekteeritud 7 terves kontrollis) (Tanaka et al., 2009) ning Wang koos kolleegidega detekteeris neljal indiviidil 170 erinevat miRNA-d. TaqMani kiibi abil määras ka Hunter koos kolleegidega veidi üle saja (105) miRNA RNA-st, mis oli eraldatud perifeerse vere mikrovesiikulitest (Hunter et al., 2008). Kõigi katsete tulemusena määrati tervetes indiviidides üle 270 erineva miRNA, kuid sellegipoolest ei olnud nende katsete põhjal võimalik tervet paneeli kokku panna, sest leitud miRNA-de kattuvus ei olnud piisavalt suur. Tabelis 2 on välja toodud 20 miRNA-d, mida detekteeriti vähemalt neljas uurimuses viiest.

Tabel 2 Sagedasti detekteeritud tsirkuleerivad miRNA-d. Tabel on koostatud Reidi ja tema kolleegide töö põhjal (Reid et al., 2010)

	(Chen et al., 2008)	(Mitchell et al., 2008)	(Hunter et al., 2008)	(Wang et al., 2010)	(Tanaka et al., 2009)
Hsa-let-7b	X	X	X	X	X
Hsa-miR-16	X	X	X	X	X
Hsa-miR-21	X	X	X	X	X
Hsa-miR-223	X	X	X	X	X
Hsa-miR-24	X	X	X	X	X
Hsa-miR-25	X	X	X	X	X
Hsa-miR-30d	X	X	X	X	X
Hsa-miR-320	X	X	X	X	X

Hsa-miR-106b	X	X	X	X	
Hsa-miR-142	X	X	X		X
Hsa-miR-15a	X	X	X	X	
Hsa-miR-183	X	X	X		X
Hsa-miR-186	X	X	X		X
Hsa-miR-19b	X	X	X	X	
Hsa-miR-20a	X	X	X	X	
Hsa-miR-22	X	X		X	X
Hsa-miR-26a	X	X	X	X	
Hsa-miR-451	X	X		X	X
Hsa-miR-484	X	X	X		X
Hsa-miR-92a	X	X	X	X	X

Ekspérimentaalosa

Käesoleva töö eesmärkideks olid:

- 1) Määrata tervete inimeste vereplasmas ringlevate miRNA-de profiil, kasutades Eesti Geenivaramu doonorite poolt loovutatud vereplasmat.
- 2) Hinnata ringlevate miRNA-de ekspressiooni varieeruvust ja iseloomustada selle seoseid uuritavate soo ja vanusega.

Valimi kirjeldus

Katsetes kasutatavaks algmaterjaliks olid tervete indiviidide plasmaproovid, mis valiti tuhande detailset fenotüübiandmestikku omava geenidoonori hulgast, kes liitusid EGVga 2009. aastal. Veri koguti EDTA Vacutainer'isse ja fuugiti Eppendorf 5810R fuugiga 2000 rpm juures 15 min. Plasma tõsteti 2 ml krüotuubidesse ja seda säilitati -80C° juures. Uuringuks on olemas TÜ eetikakomitee luba (228/T-13) ning kõik uuritavad allkirjastasid informeeritud nõusoleku vormi. Töö viidi läbi FP7 projekti "BestAgeing - Biomarker Research Alliance for Diagnosing Heart Disease in the Ageing European Population" raames. Doonorite kohta kogutud andmete põhjal sorteeriti välja terved indiviidid, kes vere loovutamise hetkel vastasid järgnevatele tingimustele:

1. Kehamassi indeks jääb vahemikku 18–30
2. Vererõhk on madalam kui 140/90 mmHg
3. Indiviidil ei tohi olla diagnoositud järgnevaid haigusi (ICD-10 koodide põhjal):
 - a. varasemad südamehaigused (I00-I99);
 - b. varasem perkutaanne transluminaalne koronaarangioplastika (Z95.5);
 - c. neerupuudulikkus (N17-N19);
 - d. pahaloomuline kasvaja (C00-C99);
 - e. alumiste hingamisteede kroonilised haigused (J40-J44, J47);
 - f. vere- ja vereloomeelundite haigused ning teatavad immuunmehhanismidega seotud haigusseisundid (D46, D50-D64, E70.1, P61.4);
 - g. diabeet (E10-E14);
 - h. põletikulised haigused (M05-M06, M10, E32, G00-G09, G30-G32, G35-G37, H65.2, H65.3, H65.4, H66.1, H66.2, H66.3, H70.1, I05-I09, I30.0, I30.1, I41, I70, I73.0, I73.1, I77.6, I80, I84, I88, J31, J32, J35, J37, J40, J41, J42, J44, K02,

K04.5, K05.1, K05.3, K10.2, K10.3, K11.2, K12, K14.0, K55.1, K20, K25.4, K25.5, K25.6, K25.7, K26.4, K26.5, K26.6, K26.7, K29.3, K29.4, K29.5, K36, K50, K51.0, K51.1, K51.2, K51.3, K73, K81.1, K86.0, K86.1, L00, L01, L03, L40, M07.1, M07.2, M07.3, M07.4, M13, M15-M19, M30-M36, M46, M60, M65, M86.3, M86.4, M86.5, M86.6, M92, M93, N03, N11, N12, N30, N34.1, N34.2, N41.1, N45, N61, N70-N77)

4. Indiviid ei tohi regulaarselt tarvitada ravimeid (välja arvatud G03, G02B)
5. Hemoglobiini tase peab olema kõrgem kui 10 g/dl
6. Glomerulaarse filtratsiooni tase peab olema üle 60 ml/min

Vastavalt eelnevalt loetletud tingimustele koosnes moodustatud valim 268 indiviidi proovidest, millest 114 proovi pärines naistelt ja 150 meestelt. Noorimad uuringus osalejad olid proovi võtmise hetkel 18-aastased ja vanim osaleja oli 75-aastane. Uuringus osalejate keskmine vanus oli 32 aastat ja nende täpsem vanuseline jaotus on näidatud tabelis 1.

Tabel 3 Valimi vanuseline jaotus

Vanus	Hulk	Protsent
18-19	23	8,6%
20-24	69	25,8%
25-29	46	17,2%
30-34	34	12,7%
35-39	31	11,6%
40-44	25	9,4%
45-49	15	5,6%
50-54	10	3,7%
55-59	7	2,6%
60-64	5	1,9%
65-75	2	0,7%

Töös kasutatud materjalid ja meetodid

RNA eraldamine vereplasmast

RNA eraldamiseks plasmaproovidest kasutati ettevõtte QIAGEN kitti miRNeasy Serum/Plasma Kit. Kitis on kombineeritud proovide fenooli/guanidiini põhine lüüs silikamembraani põhise totaalse RNA puhastusega. Kitis sisaldub QIAzol lüüsireagent on ühefaasiline lahus fenoolist ja guanidiin tiotsüanaadist, mis denatureerib valkkompleksid ja RNAasid. RNA eraldamise tehnilise varieeruvuse tuvastamiseks kasutati sünteetilist nematoodi *C. elegans* miRNA-d cel-miR-39-3p (lahjendatud kontsentratsioonini $1,6 \times 10^8$ koopiat mikrolitri kohta).

RNA eraldamise protokoll oli järgmine:

1. 200 µl plasma proovile lisada 1000 µl QIAzol lüüsireagenti. Segada hoolikalt.
2. Proovi hoida toatemperatuuril 5 minutit.
3. Lisada 3,5 µl miRNeasy Serum/Plasma Spike-In kontrolli (cel-miR-39-3p) ja segada.
4. Lisada 200 µl kloroformi ja segada intensiivselt.
5. Lasta proovil seista toatemperatuuril 2–3 minutit.
6. Tsentrifugeerida 15 minutit 4°C juures raskusjõuga 12000 g.
7. Veefaas tõsta kogumistuubi ja lisada 1,5 korda proovi mahust suurem kogus 100% etanooli. (näiteks kui kätte saadi 600 µl veefaasi, siis lisada 900 µl puhast etanooli) ning suspendeerida.
8. Pipeteerida kuni 700 µl kolonnile, mis on asetatud 2 ml mahuga kogumistuubi.
9. Tsentrifugeerida toatemperatuuril 8000 g juures 15 sekundit ning seejärel valada ära läbi kolonni jooksnud vedelik.
10. Korrata punkte 8 ja 9 kuni kogu eraldatud veefaas on ümber tõstetud.
11. Lisada kolonnile 700 µl RWT puhvrit.
12. Tsentrifugeerida toatemperatuuril 8000 g juures 15 sekundit ning seejärel valada ära läbi kolonni jooksnud vedelik.
13. Pipeteerida kolonni 500 µl RPE puhvrit.
14. Tsentrifugeerida toatemperatuuril 8000 g juures 15 sekundit ning seejärel valada ära läbi kolonni jooksnud vedelik.
15. Kolonniga kogumistuubi lisada 500 µl 80% etanooli.
16. Tsentrifugeerida toatemperatuuril 8000 g juures 2 minutit ning seejärel valada ära läbi kolonni jooksnud vedelik.

17. Kolonn asetada uude kogumistuubi ja tsentrifuugida 5 minutit avatud kolonni täisvõimsusel, et membraan kuivaks. Vedelik ja kogumistuub visata ära.
18. Kolonn asetad uude 1,5 ml mahuga kogumistuubi ja lisada 14 µl RNAas'i vaba vett.
19. Tsentrifuugida tuubi 1 minut täisvõimsusel.
20. Kolonni jääb kinni ligikaudu 2 µl vedelikku ja RNA vesilahust edasisteks katseteks saab 12 µl.

cDNA süntees

Eraldatud RNA-d kasutati cDNA sünteesiks, ettevõtte QIAGEN miScript II RT Kit'i abil. Kitt võimaldab valida kahe erineva analüüsipuhvri vahel: HiSpec ja HiFlex puhver. Selles uurimuses kasutati HiSpec puhvrit, sest see võimaldab uurida vaid küpseid miRNA-sid erinevalt HiFlex puhvrist, mida kasutatakse lisaks küpsetele miRNA-dele ka prekursor miRNA-de, teiste mittekodeerivate RNA-de ja ka mRNA uurimiseks. Selektiivselt küpsetelt miRNA-delt ja kontrollina kasutatavate väikestelt tuumakese ja tuuma RNA-delt (snoRNA ja snRNA) sünteesitakse HiSpec puhvrit kasutades cDNA. Pikkade RNA-de nagu mRNA pöördtranskriptsioon on maha surutud.

Erinevalt mRNA-st ei ole miRNA-d polüadenüleeritud ja reaktsiooni esimeses etapis lisatakse miRNA järjestusele polüA saba. Seejärel sünteesitakse cDNA oligo-dT praimeril abil, millel on 3' ankur ja universaalne märgisjärjestus 5' osas, mis on vajalik miRNA amplifikatsiooniks reaalse PCR-i läbi viimisel. Märgisjärjestuse ja polüA kombinatsioon tagab, et edaspidises analüüsis ei detekteerita genoomset DNA-d.

Reaktsioonisegu ühe proovi kohta segati jääl kokku vastavalt järgnevale tabelile:

Komponent	Maht
5 x miScript HiSpec puhver	2 µl
10 x miScript nukleotiidide segu	1 µl
RNAasi vaba vesi	4,5 µl
miScript pöördtranskriptaasi segu	1 µl
Eraldatud RNA	1,5 µl
Kokku	10 µl

Proove inkubeeriti 60 minutit 37°C juures ja seejärel 5 minutit 95°C juures, et inaktiveerida pöördtranskriptaas.

Preamplifikatsioon

Kuna kehavedelikes on miRNA-de kogus madal, tuleb enne reaalaaja PCR analüüsi uuritava cDNA hulka suurendada. Selleks kasutati QIAGEN-i miScript PreAMP PCR kitti ja spetsiaalselt uuritavate miRNA-de järgi kohandatud miScript PreAMP Pathway Primer Mix praimerite segu. Enne preamplifikatsiooni reaktsiooni kokku segamist lahjendati sünteesitud 10 µl cDNA-d, lisades 40 µl vett.

Protokoll, mille järgi reaktsioonisegu kokku segati oli järgnev:

Komponent	Maht
5 x miScript PreAMP puhver	5 µl
HotStartTaq DNA polümeraas	2 µl
miScript PreAMP Pathway Primer Mix	5 µl
RNAasi vaba vesi	7 µl
miScript PreAMP universaalne praimer	1 µl
cDNA	5 µl
Kokku	25 µl

Pärast proovide kokku segamist asetati proovid termotsüklerisse ja pandi käima järgnev programm:

Aste	Aeg	Temperatuur
Aktivatsioon	15 min	95°C
Kolme temperatuuri tasemega tsükkel		
Denaturatsioon	30 s	94°C
Seondumine	60 s	55°C
Süntees	60 s	70°C
Tsüklite arv	2 tsükli	
Kahe temperatuuri astmega tsükkel		
Denaturatsioon	30 s	94°C
Seondumine	3 min	60°C
Tsüklite arv	10 tsükli	

MiRNA profileerimine reaalaaja PCR meetodiga

Analüüs viidi läbi QIAGEN-i Human & Plasma miScript miRNA PCR Array 384 (MIHS-106ZE) plaatidel, mis võimaldas uurida 84 erineva miRNA ekspressiooni. Plaadil kajastuvad miRNA-d on valitud hoolikalt varem avaldatud artiklite põhjal, mis on uurinud tsirkuleerivaid miRNA-sid ning ka nende seoseid erinevate haigustega. Plaadi abil tuvastatavad miRNA-d ja näited nendega seotud haigustest on toodud Tabelis 1. Lisaks on plaadil erinevad kontrollid: *C. elegans*-i miR-39, mis võimaldab hinnata RNA eraldamise ja sünteesi edukust; kuus väikest mittekodeerivat RNA-d (snoRNA/snRNA) SNORD61, SNORD68, SNORD72, SNORD95, SNORD95A, RNU6-2, mida saab kasutada andmete normaliseerimiseks $\Delta\Delta C_T$ meetodi rakendamise korral. Lisaks on plaadil ka miRNA pöördtranskriptsiooni kontroll, hindamaks pöördtranskriptsiooni tulemuslikkust ja positiivne PCR-i kontroll. Täpsem plaadiskeem on välja toodud lisa 1. Signaali detekteerimisel kasutati valgussignaali tekitamist SYBR Green tehnoloogia abil. SYBR Green I värv seondub kaheahelalise DNA-ga ja selle protsessi käigus suureneb fluorestsentsi intensiivsus ligikaudu 100 korda (Zipper et al., 2004).

Enne reaktsioonisegu kokku segamist lahjendati preamplifitseeritud cDNA-d 20 korda ehk 25 μ l cDNA-le lisati 475 μ l milli-Q vett. Reaktsioonisegu segati kokku ettevõtte QIAGEN miScript SYBR Green PCR kitiga vastavalt tootja protokollile, mis on järgnev:

Komponent	Kogus
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	550 μ l
10x miScript universaalne praimer	110 μ l
RNAasi vaba vesi	340 μ l
cDNA	100 μ l
Kokku	1100 μl

Plaadile pipeteeritud proovid analüüsiti Applied Biosystems aparaadiga ABI Prism 7900HT vastavalt järgnevale protokollile:

Aste	Aeg	Temperatuur
Aktivatsioon	15 min	95°C
Kolmeastmeline tsükkel		
Denaturatsioon	15 s	94°C
Seondumine	30 s	55°C

Ekstensioon	30 s	70°
Tsükli arv	40 tsükli	

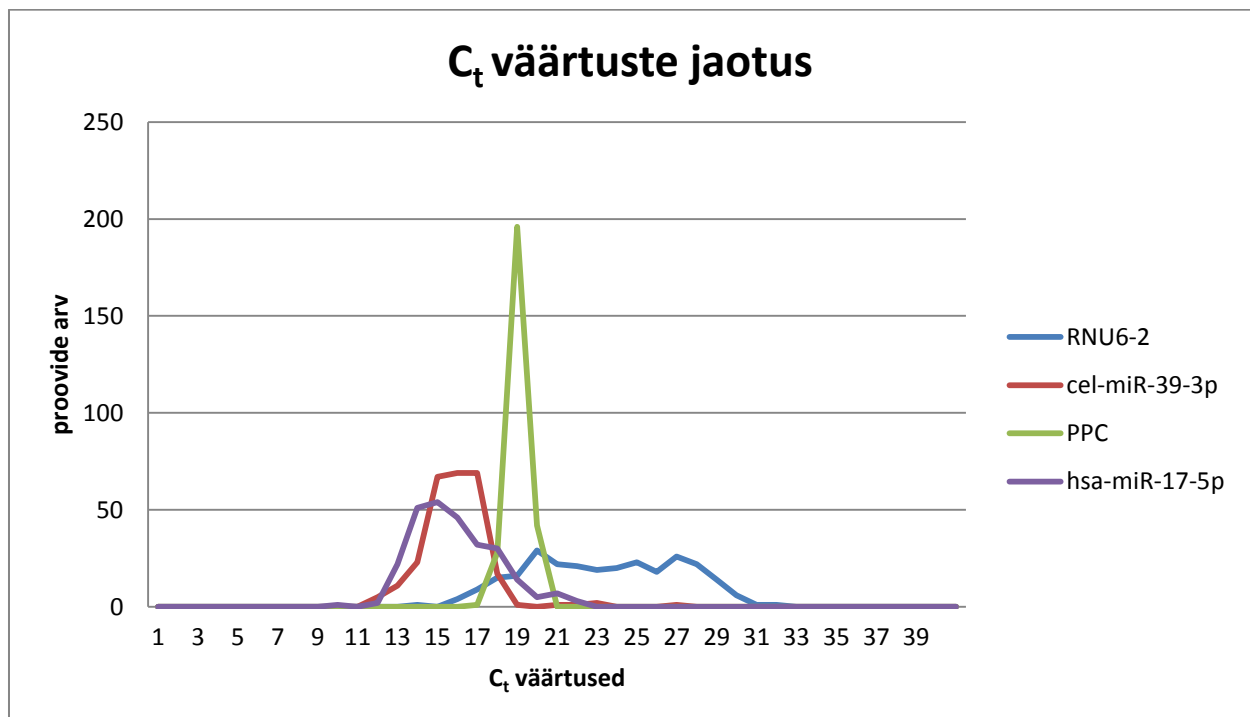
Statistiline analüüs

Esmalt analüüsiti qRT-PCR andmeid SDS RQ Manager 1.2.1 programmi abil võrdleva lävitsükli (C_t *cycle threshold*) meetodit kasutades. Lävitsükkel on PCRi tsükkel, kus sondi signaal ületab lävitaset (*threshold*). Proovide signaalitugevuse varieeruvuse tõttu kasutati automaatset lävitaseme määramise sätet. SDS RQ Managerist eksporditud andmed annoteeriti veebipõhise QIAGEN Analysis Center (www.qiagen.com) analüüsi tööriista abil. Edasi viidi läbi proovide C_t väärtuste normaliseerimine sünteetilise *C. elegansi* miRNA cel-miR-39-3p suhtes. *Spike-in* (cel-miR-39-3p) lisati miRNA-de plasmast puhastamise algfaasis; *spike-in* võimaldab hinnata tehnilist varieeruvust, mis on tekkinud näiteks RNA puhastamise ja DNA sünteesi efektiivsuste erinevusest. Teise normaliseerimismeetodina kasutati globaalse mediaani meetodit, kus proovide mediaanid viidi samale tasemele. Normaliseerimine viidi läbi programmi Microsoft Office Excel 2010 abil. Andmetabeleid korrastati programmi Microsoft Office Excel 2010 abil ja üldine valimit iseloomustav analüüs viidi läbi programmiga R (versioon 3.2.0) ning Microsoft Office Excel 2010-ga. Karpdiagrammide joonistamisel kasutati programmil R (versioonil 3.2) põhinevat veebitööriista (<http://boxplot.tyerslab.com/>).

Tulemused ja arutelu

Firma QIAGEN vereplasma-spetsiifilist miRNAde paneeli kasutades õnnestus tuvastada kõigi 84 uuritud miRNA ja 12 kontroll-reaktsiooni ekspressioon.

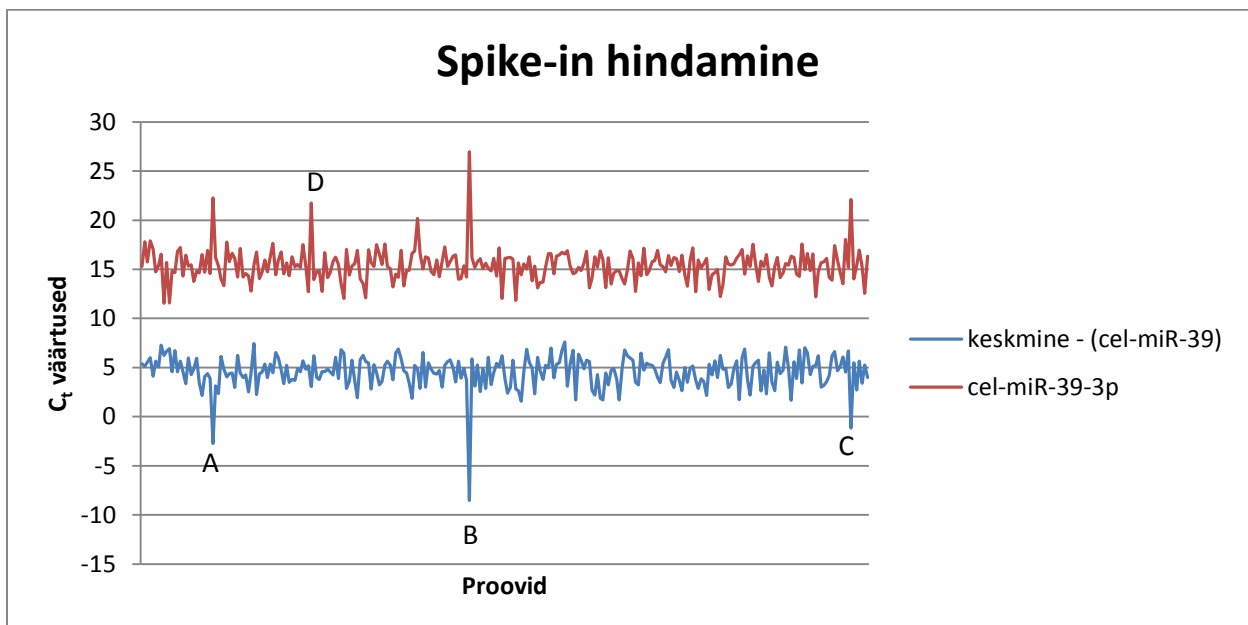
Enne edasist analüüsi hinnati proove üldiselt. Kõigi reaktsioonide positiivsed kontrollid olid väikese varieeruvusega, moodustades jaotusgraafikul (joonis 5 roheline) kitsa ja kõrge piigi. Lisaks miRNA-dele mõõdeti teiste väikeste RNA-de (snoRNA-d, snRNA-d ja RNU6-2) tasemeid, mida on varasemalt kõrgelt ekspresseerununa väga paljudes erinevates kudedes leitud. Nende kõrge ja suhteliselt stabiilse ekspressiooni tõttu nimetatakse neid „koduhooldaja“ (*housekeeping*) RNA-deks ja neid on kasutatud ka referentsina qPCR andmete normaliseerimisel. Samas toimub snoRNA-de ja snRNA-de biogenees teisiti kui miRNA-del ja enamasti on neid kasutatud koepõhiste proovide normaliseerimisel ning tsirkuleerivate miRNA-de uurimisel ei pruugi need olla parimaks valikuks (Benz et al., 2013). Käesolevast analüüsist selgus, et määratud väikeste RNA-de varieeruvus oli üpris suur ja seega ei saa nende tasemeid andmete normaliseerimisel aluseks võtta. Sageli kasutatakse andmete normaliseerimiseks sünteetilist RNA-d (Cheng, 2015). Kuna *spike-in*-i väärtused jaotusid normaaljaotusele lähedaselt ja andmete varieeruvus oli madal, võib antud töös aluseks võtta cel-miR-39-3p normaliseerimise.



Joonis 5 Jaotusgraafikud enne andmete normaliseerimist. Positiivsed kontrollid (PPC) on väikese hajuvusega (roheline). Sünteetiline *spike-in* cel-miR-39-3p on lähedane normaaljaotusele ja suhteliselt

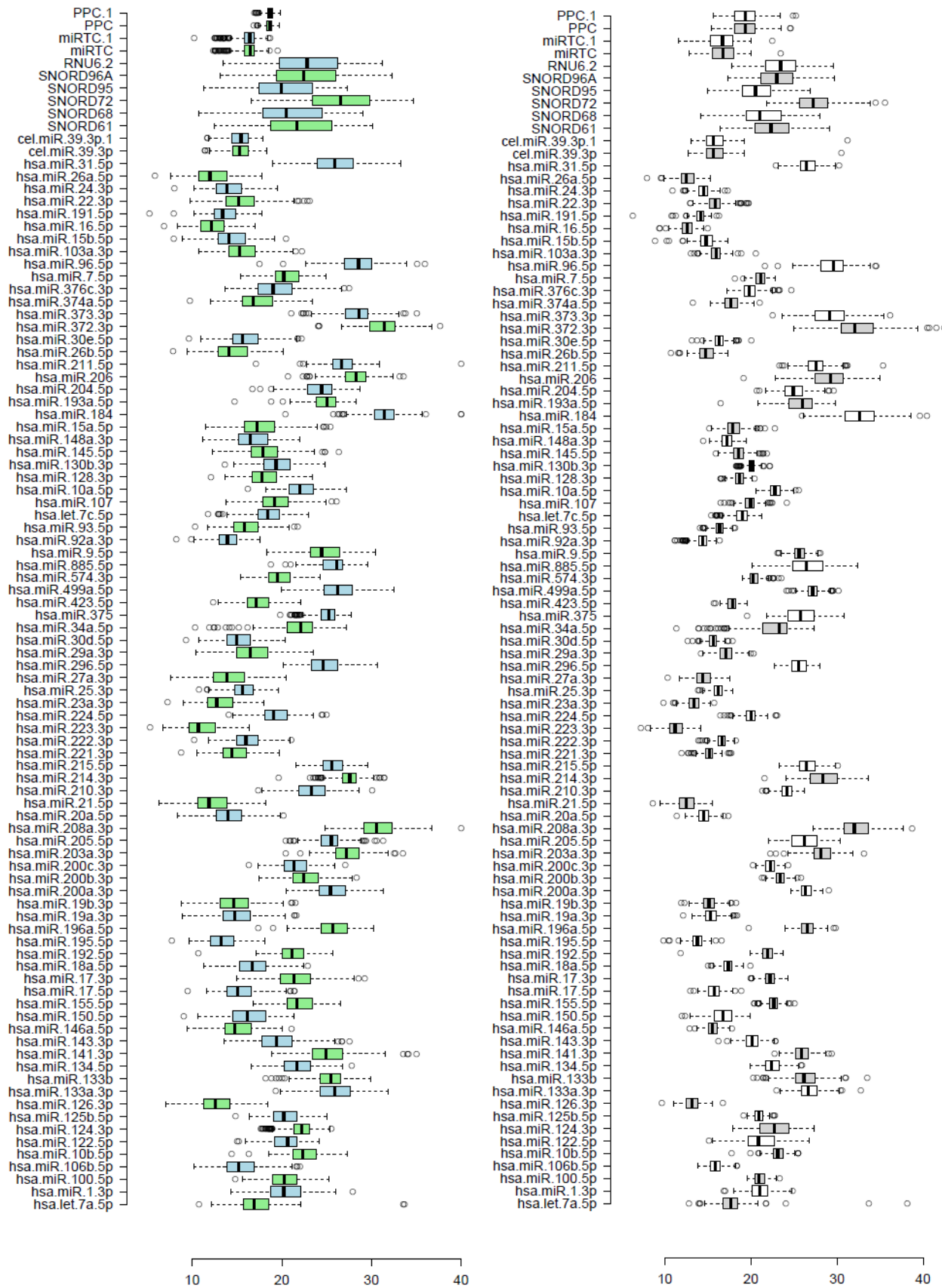
väikese hajuvusega (tumepunane). Väikese tuuma RNA U6 (RNU6-2) ekspressioon on suure hajuvusega ja ebahütlase jaotusega (sinine). Näitena on toodud ka normaliseerimata miR-17-5p (lilla) Ct väärtused.

Cel-miR-39-3p andmete kõrvutamisel proovide keskmiste väärtustega selgus, et osades proovides (joonisel 6 tähistatud A, B ja C) on cel-miR-39-3p Ct väärtus madalam kui kogu proovi keskmine. Lisaks joonistus ühe proovi puhul piik välja (joonisel 6 tähistatud D) ainult *spike-in* väärtustel. Edasisel analüüsil selgus, et antud proovi korral oli ka kõikide miRNAde signaal väga madal (erinevus kõikide proovide keskmisest 5,1 standardhälvet). Välja toodud nelja proovi puhul oli *spike in'i* väärtus rohkem kui 25 % kõrgem keskmisest cel-miR-39-3p väärtusest. Need ebanormaalse cel-miR-39-3p tasemega proovid eemaldati edasisest analüüsist. C_t väärtuste normaliseerimisel lahutati igast saadud tulemusest temale vastava proovi *spike-in'i* väärtus.

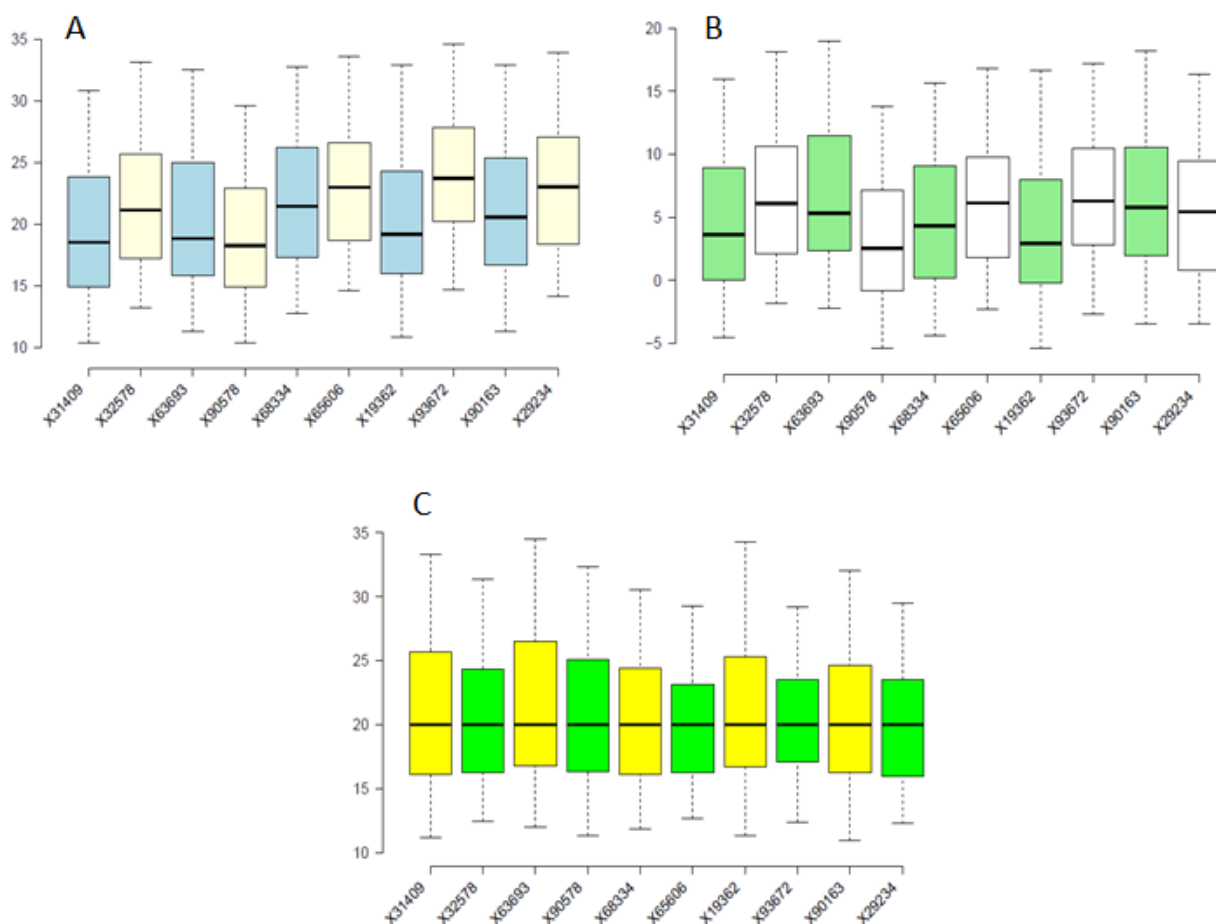


Joonis 6 Cel-miR-39-3p hindamine. Üldiselt on cel-miR-39-p (tumepunane) Ct väärtuste varieeruvus väike, kuid eristusid viis proovi, millel oli C_t väärtus keskmisest märgatavalt kõrgem (joonisel tähistatud A, B, C ja D) ja mis eemaldati edasisest analüüsist.

Teise normaliseerimise meetodina kasutati globaalse mediaani meetodit, kus proovide mediaan viiakse samale tasemele, jagades iga väärtust vastava proovi mediaaniga ja korrutades kõik väärtused seejärel läbi 20-ga (normaliseerimata C_t väärtuste keskmine oli umbes kakskümmend (19,91)). Normaliseerimisejärgsed tulemused on kajastatud joonisel 7 paremal pool. Karpdiagrammidel on kasti keskel märgitud mediaan, kasti suurus on määratud ülemise ja alumise kvartiiliga. „Vuntsid“ ulatuvad kuni punktini, kus väärtus jääb alla 1,5 korra ülemise ja alumise kvartiili vahest.



Joonis 7 Normaliseerimata ja globaalse mediaani meetodil normaliseeritud andmed. Vasakpoolsel graafikul on kujutatud normaliseerimata C_1 väärtuste jaotus ja hajuvus. Parempoolne graafik kujutab globaalse mediaani meetodil normaliseeritud andmeid.

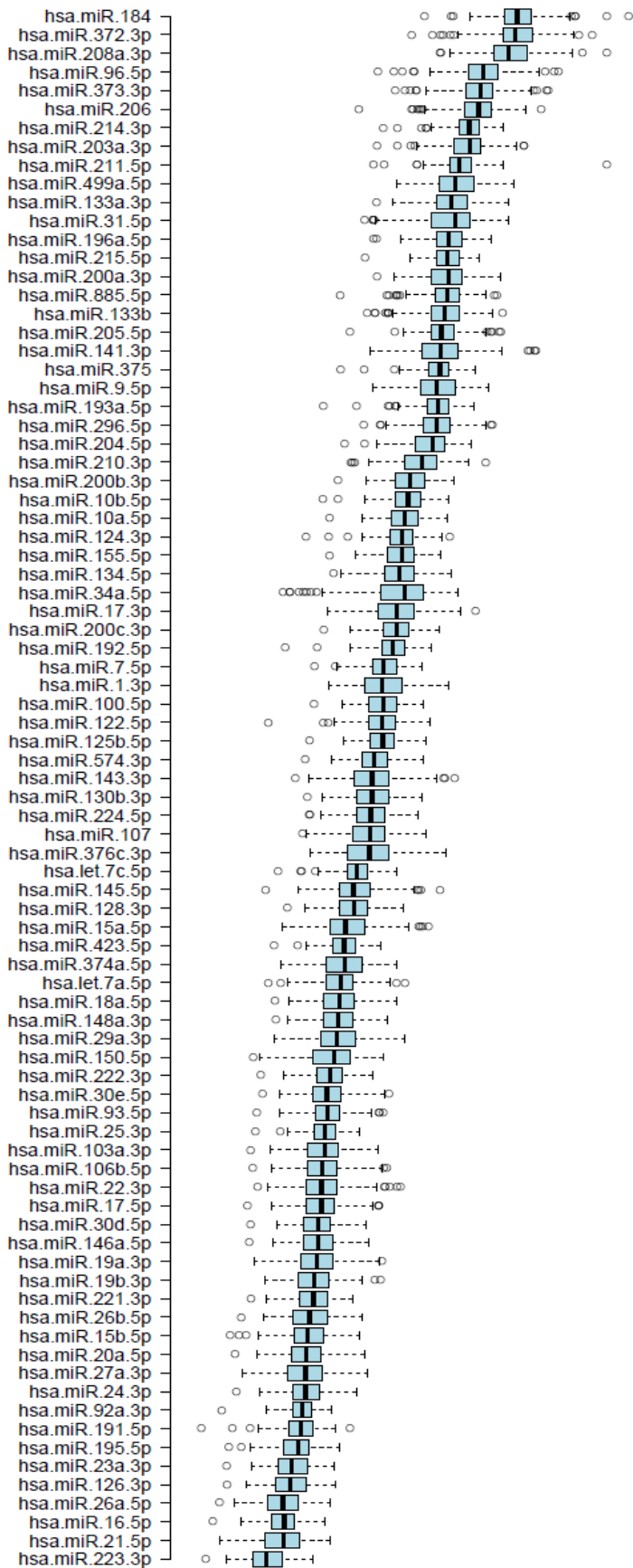


Joonis 8 Erinevate normaliseerimismeetodite rakendamine. Kõigil graafikutel on kujutatud 10 juhuslikult valitud proovi ja nende mediaan ning hajuvus. Graafikul A on normaliseerimata väärtused, graafikul B *spike-in*-i järgi ja graafikul C globaalse mediaani meetodil normaliseeritud proovid.

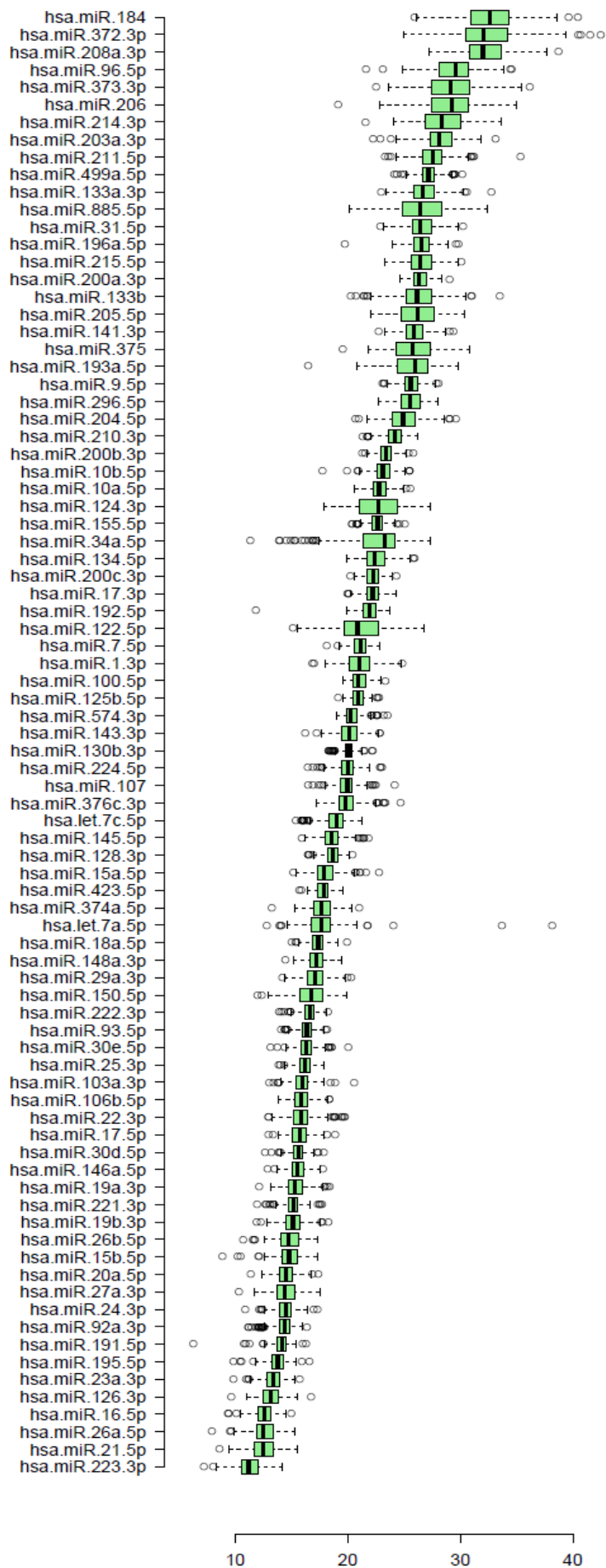
Kõige kõrgemalt oli ekspresseerunud hsa-miR-223-3p ja kõige madalamalt oli ekspresseerunud hsa-miR-184. MiR-233 kõrge ekspressioon ei ole üllatav, sest seda on leitud kõrgelt ekspresseerununa ka vererakkudes (Pritchard et al., 2012). Kõikide normaliseeritud miRNA-de ekspressiooni on kujutatud joonistel 9 ja 10 ning tabelis 4 on välja toodud 10 kõige kõrgema ekspressioonitasemega miRNA-d. Mitmeid neist on varasemates uurimustes leitud tervete indiviidide ja kontrollgruppide vereplasmas (varasemad uuringud tabelis 2, lk 22). Mõlema normaliseerimismeetodi puhul oli miRNA-de järjestus ekspressiooni taseme järgi sarnane. Erinevused ilmsid varieeruvuse näitajates: globaalse mediaani meetodil normaliseeritud andmetel esines väiksem varieeruvus ning varieeruvus eri miRNA-del oli ebahütlasem (joonised 9 ja 10). Kõikide miRNA-de *spike-in*-i järgi normaliseeritud C_t väärtuste keskmine variatsiooni amplituud on 9,43 ja standardhälve on 1,66; globaalse mediaani järgi normaliseerimisel on vastavad näitajad 8,22 ja 1,30.

Tabel 4 Kümme kõrgeima ekspresiooniga miRNA-d. Enne kaldkriipsu on näidatud tulemused *spike-in*-i järgi normaliseerimisel ja pärast kaldkriipsu globaalse mediaani meetodil normaliseerimisel.

	Keskmine normaliseeritud C_t väärtus	Variatsiooni amplituud	Dispersioon	Standardhälve
hsa-miR-223-3p	-4.22/11.26	7.01/6.99	2.29/1.21	1.51/1.10
hsa-miR-21-5p	-2.98/12.54	7.80/6.90	3.13/1.28	1.77/1.13
hsa-miR-26a-5p	-2.98/12.54	7.79/7.37	2.82/1.16	1.68/1.08
hsa-miR-16-5p	-2.98/12.58	6.87/5.62	1.98/0.75	1.41/0.87
hsa-miR-126-3p	-2.38/13.17	7.16/7.12	2.83/0.94	1.68/0.97
hsa-miR-23a-3p	-2.19/13.39	6.80/5.87	2.17/0.73	1.47/0.86
hsa-miR-195-5p	-1.89/13.69	7.19/6.75	1.97/0.73	1.41/0.85
hsa-miR-191-5p	-1.58/14.04	12.11/10.02	2.03/0.72	1.43/0.85
hsa-miR-92a-3p	-1.39/14.27	5.27/5.22	1.16/0.78	1.08/0.88
hsa-miR-24-3p	-1.16/14.44	7.89/6.41	2.51/0.67	1.58/0.82



Joonis 9 *Spike-in-i järgi normaliseeritud miRNA-de ekspressiooni tase.* Näidatud on C_t väärtused ja nende hajuvus. MiRNA-d on järjestatud vastavalt ekspressiooni tasemele.



Joonis 10 Globaalse mediaani järgi normaliseeritud miRNA-de ekspressiooni tase. Näidatud on C_t väärtused ja nende hajuvus. MiRNA-d on järjestatud vastavalt ekspressiooni tasemele.

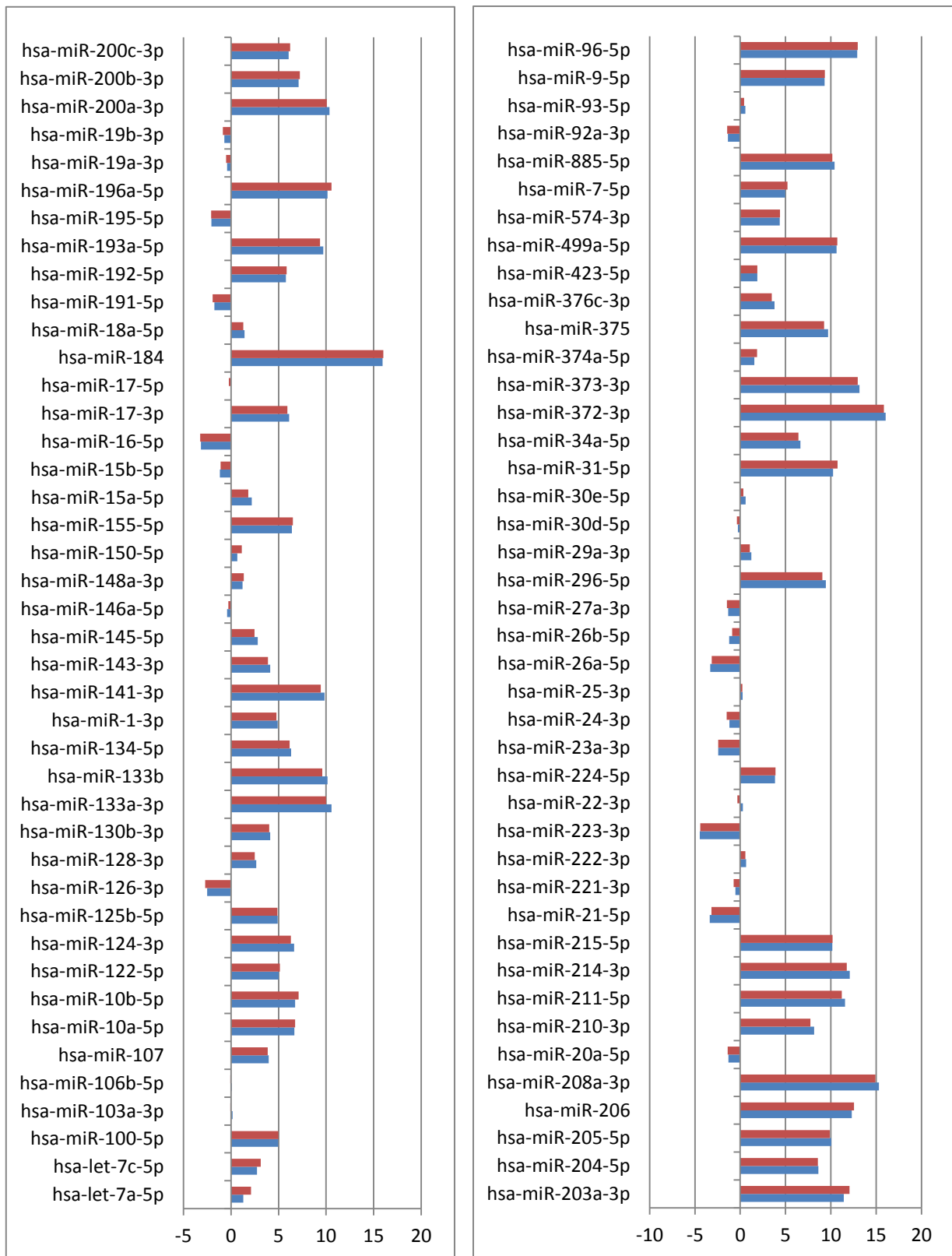
Väga suuri erinevusi miRNA-de tasemetes naiste ja meeste vahel ei esinenud, kuid pärast Studenti t-testi läbiviimist saab välja tuua 3 miRNA-d, millel oli meeste seas naistega võrreldes veidi kõrgem ekspressioon. Kuue miRNA puhul oli miRNA-de tase kõrgem naistel. Erinevalt ekspresseerunud miRNA-d on välja toodud tabelis 5. Statistiliselt olulisteks leidudeks liigitati need, mille p-väärtus oli väiksem kui 0,05. Pärast mitmese testimise korrektsiooni Bonferroni meetodil ei olnud ükski neist tulemustest enam statistiselt oluline. Nagu tabelist 5 on näha, ei ole analüüsitud miRNA-de tasemete erinevused suured ja kõigi miRNA-de soospetsiifilised erinevused jäävad alla kahe korra. See tulemus on kooskõlas varasemate uuringutega, kus meeste ja naiste vereplasmas tsirkuleerivate miRNA-de ekspressioonis pole täheldatud märkimisväärseid erinevusi. Varasemas uuringus leidis Chen koos kollegidega, et miR-184 ja miR-222 võivad olla soo-spetsiifiliselt ekspresseerunud (Chen et al., 2008), kuid käesolevas uuringus nende miRNA-de ekspressioon sellele ei viidanud.

Tabel 5 Soospetsiifilise ekspressiooniga miRNA-de Ct väärtused (*spike-in* normaliseerimine)

	Meeste keskmine	Naiste keskmine	T-testi p-väärtus	Erinevus kordades
Meestel oli ekspressioon kõrgem				
hsa-miR-122-5p	4.83	5.48	0.001	1.57
hsa-miR-885-5p	10.11	10.71	0.001	1.52
hsa-miR-92a-3p	-1.53	-1.22	0.022	1.24
Naistel oli ekspressioon kõrgem				
hsa-miR-143-3p	4.67	3.91	0.002	1.69
hsa-miR-145-5p	3.12	2.46	0.003	1.58
hsa-miR-31-5p	10.91	10.03	0.004	1.84
hsa-miR-133b	10.27	9.81	0.044	1.39
hsa-miR-150-5p	1.18	0.62	0.045	1.47
hsa-miR-107	4.28	3.84	0.047	1.36

Indiviidide puhul, kelle vanus proovi võtmise ajal oli alla 30 (kaasa arvatud), ei olnud miRNAde ekspressiooni tase oluliselt erinev nendest, kelle vanus oli üle 30. Alla 20 (kaasa arvatud) aasta vanuste võrdlemisel üle 50 (kaasa arvatud) aastastega, ei täheldatud samuti statistiliselt olulisi erinevusi (joonis 11). Seega ei õnnestunud käesolevas uuringus tuvastada tsirkuleerivate miRNA-de ekspressiooni sõltuvust eest. Varasemalt on leitud tsirkuleerivate miRNA-de ekspressioonis erinevusi vastavalt nende eale. Näiteks leidis Hooten koos kolleegidega, et miR-151a-5p, miR-181a-5p ja miR-1248 tasemed on vanemate indiviidide seerumis oluliselt vähenenud (Hooten et al., 2013). Neid miRNA-sid käesolev uuring ei käsitlenud. Samuti oli antud valimis vanade inimeste hulk väike ning seetõttu tuleks vanuse-seoselisi miRNA-sid otsida suuremast valimist.

Suitsetajate ja mittedsuitsetajate võrdlemisel ei täheldatud samuti suuri erinevusi. Vaid miR-885-5p puhul esines statistiline erinevus (p-väärtus oli 0,02), sealjuures on miR-885-5p vereplasmas madalalt ekspresseerunud. Pärast kohaldamist mitmesele testimisele ei olnud seos enam oluline. Madalalt ekspresseerunud miRNA-sid on raskem detekteerida ja saadud statistilist seost tuleks kindlasti valideerida suuremas valimis.



Joonis 11 MiRNA-de ekspressioonitase vanade ja noorte uuritavate vereplasmas. Punasega on tähistatud 50 kuni 75 aastaste ja sinisega 18 kuni 20 aastaste indiviidide miRNA ekspressioonitasemed. Kahe eagrupi vahel ei ole statistiliselt olulisi erinevusi. X-teljel on näidatud *spike-in*-i järgi normaliseeritud C_t väärtused..

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli kirjeldada vereplasmas leiduvate miRNA-de ekspressiooni ja varieeruvust 84 erineva miRNA baasil. Selleks määrati 264 indiviidi plasmas leiduvate miRNA-de tasemed. Terved individid valiti välja Eesti Geenivaramu 2009. aasta geenidonorite seast, rakendades erinevaid kitsendavaid kriteeriume individide haigusloo ja üldise füüsilise seisundi põhjal.

Analüüsi tulemusel määrati 84 erineva varem seerumis ja plasmas leitud miRNA ekspressiooni tasemed ja nende hajuvus. Andmete normaliseerimisel rakendati *spike-in* ja globaalse mediaani meetodeid. Mõlemad meetodit andsid sarnaseid tulemusi. Globaalse mediaani meetodi rakendamise tulemusel oli üldine hajuvus väiksem (standardhälve 1,66 versus 1,3 (*spike-in* meetod)). Kõige kõrgemalt olid ekspresseerunud miR-223-3p, miR-21-5p ja miR-26a-5p. Analüüsi tulemusel tuvastati 9 miRNA-d, mille ekspressioon oli eri soost individidel mõnevõrra erinev, kuigi mitmese testimise korrigeerimine statistiliselt olulist erinevust ei kinnitanud. Vanuse ja ekspressiooni vahel statistiliselt olulist seost ei tuvastatud.

Soolise sõltuvuse tuvastamiseks miRNA-de ekspressioonis tuleks uurida potentsiaalse 9 miRNA ekspressiooni suuremas valimis. Vanuseesosealiste miRNA-de tuvastamiseks tuleks panna kokku valim, kus oleks rohkem vanemaid indiviide ja kaasata valimisse ka vanemaid kui 75-aastaseid indiviide. Huvitav oleks täpsemalt võrrelda miRNA-de ekspressiooni teiste populatsioonide andmetega, et uurida kuivõrd on ühes regioonis saadud tulemused ülekantavad teise piirkonda. Käesoleva töö tulemusi saab rakendada edasistes uurimustes kontrollgrupina, et aidata leida sobivaid biomarkereid erinevatele haigustele. Huvitav oleks ka täpsemalt uurida keskmisest erineva miR-34a-5p tasemega individide terviseandmeid, kuna selle miRNA muutunud tase on seotud mitmete vähktõve liikidega.

Summary

Expression and variance of circulating microRNAs in Estonian population.

Klaarika Kikas

MicroRNAs (miRNAs) are short, non-coding RNA molecules that act as regulators of gene expression. Very stable circulating miRNAs are found in most body fluids. They were recently identified as biomarkers for various physiological and pathological conditions, but little is still known about the normal spectrum of circulating miRNAs.

Current Master's Thesis studied 84 circulating miRNAs and their natural variance. In order to do that 264 healthy Estonian gene donor plasma samples were analysed using qRT-PCR arrays. In this study there is also a comparison of two data normalization methods and their impact on data.

The comparison of global median and spike-in normalization methods gave similar results, but generally the variance was smaller with global median method. The standard deviation for this method was 1.30 compared to 1.66 with spike-in normalization results. The miRNAs with a highest expression were miR-223-3p, miR-21-5p ja miR-26a-5p. There were nine miRNAs that can be related to a sex of a person. Six of them (miR-143-3p, miR-145-5p, miR-31-5p, miR-133b, miR-150-5p and miR-107) were slightly up-regulated in women and miR-122-5p, miR-885-5p and miR-92a-3p levels were higher in men, but the result was not significant after Bonferroni correction was conducted. No differences between different age groups and miRNA expression were observed.

In conclusion circulating miRNAs are promising biomarkers because they are non-invasive, stable and their expression variance among different healthy individuals is relatively small. Plasma miRNAs from healthy individuals make up a good control group for further studies.

Tänuavaldused

Soovin tänada Martin Tootsi't, kes oli suureks abiks plasmaproovidest RNA eraldamisel ning Steven Smit'i, kes aitas automatiseerida suuremahulisi pipeteerimisi. Veel tänan toredaid ja abivalmis laborikaaslasi. Eriti soovin tänada oma juhendajat Tarmo Annilot suurepärase juhendamise eest.

Kasutatud kirjandus

Adachi, T., Nakanishi, M., Otsuka, Y., Nishimura, K., Hirokawa, G., Goto, Y., Nonogi, H., and Iwai, N. (2010). Plasma MicroRNA 499 as a Biomarker of Acute Myocardial Infarction. *Clin. Chem.* *56*, 1183–1185.

Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogossova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., et al. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 5003–5008.

Bartel, D.P., Lee, R., and Feinbaum, R. (2004). MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function Genomics : The miRNA Genes. *Cell* *116*, 281–297.

Bell, R.E., Khaled, M., Netanel, D., Schubert, S., Golan, T., Buxbaum, A., Janas, M.M., Postolsky, B., Goldberg, M.S., Shamir, R., et al. (2014). Transcription factor/microRNA axis blocks melanoma invasion program by miR-211 targeting NUA1. *J. Invest. Dermatol.* *134*, 441–451.

Benz, F., Roderburg, C., Vargas Cardenas, D., Vucur, M., Gautheron, J., Koch, A., Zimmermann, H., Janssen, J., Nieuwenhuijsen, L., Luedde, M., et al. (2013). U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Exp. Mol. Med.* *45*, e42.

Boon, R.A., and Vickers, K.C. (2013). Intercellular Transport of MicroRNAs. *Arter. Thromb Vasc Biol.* *33*, 186–192.

Bryant, R.J., Pawlowski, T., Catto, J.W.F., Marsden, G., Vessella, R.L., Rhee, B., Kuslich, C., Visakorpi, T., and Hamdy, F.C. (2012). Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br. J. Cancer* *106*, 768–774.

Chen, T.S., Lai, R.C., Lee, M.M., Choo, A.B.H., Lee, C.N., and Lim, S.K. (2010). Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res.* *38*, 215–224.

- Chen, W., Cai, F., Zhang, B., Barekati, Z., and Zhong, X.Y. (2013). The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers. *Tumour Biol.* *34*, 455–462.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., et al. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* *18*, 997–1006.
- Cheng, G. (2015). Circulating miRNAs: Roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *81C*, 75–93.
- Cheng, Y., Tan, N., Yang, J., Liu, X., Cao, X., He, P., Dong, X., Qin, S., and Zhang, C. (2010). A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin. Sci.* *119*, 87–95.
- Chim, S.S.C., Shing, T.K.F., Hung, E.C.W., Leung, T.-Y., Lau, T.-K., Chiu, R.W.K., and Lo, Y.M.D. (2008). Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin. Chem.* *54*, 482–490.
- Cordes, K.R., Sheehy, N.T., White, M., Berry, E., Sarah, U., Muth, A.N., Lee, T., Miano, J.M., and Ivey, K.N. (2010). miR-145 and miR-143 Regulate Smooth Muscle Cell Fate Decisions. *Nature* *460*, 705–710.
- Corsten, M.F., Dennert, R., Jochems, S., Kuznetsova, T., Devaux, Y., Hofstra, L., Wagner, D.R., Staessen, J. a, Heymans, S., and Schroen, B. (2010). Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* *3*, 499–506.
- Cortez, M.A., Bueso-Ramos, C., Ferdin, J., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K., and Calin, G. a (2011). MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *8*, 467–477.
- Creemers, E.E., Tijssen, A.J., and Pinto, Y.M. (2012). Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ. Res.* *110*, 483–495.

Cuk, K., Zucknick, M., Madhavan, D., Schott, S., Golatta, M., Heil, J., Marmé, F., Turchinovich, A., Sinn, P., Sohn, C., et al. (2013). Plasma microRNA panel for minimally invasive detection of breast cancer. *PLoS One* 8, e76729.

D'Alessandra, Y., Carena, M.C., Spazzafumo, L., Martinelli, F., Bassetti, B., Devanna, P., Rubino, M., Marenzi, G., Colombo, G.I., Achilli, F., et al. (2013). Diagnostic potential of plasmatic MicroRNA signatures in stable and unstable angina. *PLoS One* 8, e80345.

Diaz, T., Tejero, R., Moreno, I., Ferrer, G., Cordeiro, A., Artells, R., Navarro, A., Hernandez, R., Tapia, G., and Monzo, M. (2014). Role of miR-200 family members in survival of colorectal cancer patients treated with fluoropyrimidines. *J. Surg. Oncol.* 109, 676–683.

Duffy, M.J. (2007). Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. *Eur. J. Intern. Med.* 18, 175–184.

El-Hefnawy, T., Raja, S., Kelly, L., Bigbee, W.L., Kirkwood, J.M., Luketich, J.D., and Godfrey, T.E. (2004). Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin. Chem.* 50, 564–573.

Erener, S., Mojibian, M., Fox, J.K., Denroche, H.C., and Kieffer, T.J. (2013). Circulating miR-375 as a biomarker of β -cell death and diabetes in mice. *Endocrinology* 154, 603–608.

Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D., and Wang, K. (2011). Extracellular microRNA : A new source of biomarkers. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 717, 85–90.

Fichtlscherer, S., De Rosa, S., Fox, H., Schwietz, T., Fischer, A., Liebetrau, C., Weber, M., Hamm, C.W., Röxe, T., Müller-Ardogan, M., et al. (2010). Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ. Res.* 107, 677–684.

Franchina, T., Amodeo, V., Bronte, G., Savio, G., Ricciardi, G.R.R., Picciotto, M., Russo, A., Giordano, A., and Adamo, V. (2014). Circulating miR-22, miR-24 and miR-34a as novel predictive biomarkers to pemetrexed-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *J. Cell. Physiol.* 229, 97–99.

Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.

Glowacki, F., Savary, G., Gnemmi, V., Buob, D., Van der Hauwaert, C., Lo-Guidice, J.-M., Bouyé, S., Hazzan, M., Pottier, N., Perrais, M., et al. (2013). Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis. *PLoS One* 8, e58014.

Gonzales, J.C., Fink, L.M., Goodman, O.B., Symanowski, J.T., Vogelzang, N.J., and Ward, D.C. (2011). Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer. *Clin. Genitourin. Cancer* 9, 39–45.

He, F., Lv, P., Zhao, X., Wang, X., Ma, X., Meng, W., Meng, X., and Dong, S. (2014). Predictive value of circulating miR-328 and miR-134 for acute myocardial infarction. *Mol. Cell. Biochem.* 394, 137–144.

Heijnen, B.H.F.G., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., and Sixma, J.J. (1999). Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and alpha-Granules. *Blood* 94, 3791–3800.

Heneghan, H.M., Miller, N., Lowery, A.J., Sweeney, K.J., Newell, J., and Kerin, M.J. (2010). Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann. Surg.* 251, 499–505.

Hirajima, S., Komatsu, S., Ichikawa, D., Takeshita, H., Konishi, H., Shiozaki, a, Morimura, R., Tsujiura, M., Nagata, H., Kawaguchi, T., et al. (2013). Clinical impact of circulating miR-18a in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 108, 1822–1829.

Hooten, N.N., Fitzpatrick, M., Wood, W.H., De, S., Ejiogu, N., Zhang, Y., Mattison, J.A., Becker, K.G., Zonderman, A.B., and Michele, K. (2013). Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging (Albany. NY)*. 5, 725–740.

Hsu, A., Chen, S., Chang, Y., Chen, H., and Chu, P. (2014). Systemic Approach to Identify Serum microRNAs as Potential Biomarkers for Acute Myocardial Infarction. 2014.

Huang, J., and Chen, D. (2014). miRNAs in circulation: mirroring bone conditions? *J. Bone Miner. Res.* 29, 1715–1717.

Huang, Z., Huang, D., Ni, S., Peng, Z., Sheng, W., and Du, X. (2010). Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int. J. Cancer* *127*, 118–126.

Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.-L.T., Schmittgen, T.D., et al. (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* *3*, e3694.

Janas, T., Janas, T., and Yarus, M. (2006). Specific RNA binding to ordered phospholipid bilayers. *Nucleic Acids Res.* *34*, 2128–2136.

Kan, C.W.S., Hahn, M. a, Gard, G.B., Maidens, J., Huh, J.Y., Marsh, D.J., and Howell, V.M. (2012). Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* *12*, 627.

Kogure, T., Lin, W., Yan, I., Braconi, C., and Patel, T. (2011). Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology* *54*, 1237–1248.

Komatsu, S., Ichikawa, D., Hirajima, S., Kawaguchi, T., Miyamae, M., Okajima, W., Ohashi, T., Arita, T., Konishi, H., Shiozaki, a, et al. (2014). Plasma microRNA profiles: identification of miR-25 as a novel diagnostic and monitoring biomarker in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* *111*, 1614–1624.

Kong, L., Zhu, J., Han, W., Jiang, X., Xu, M., Zhao, Y., Dong, Q., Pang, Z., Guan, Q., Gao, L., et al. (2011). Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetol.* *48*, 61–69.

Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., and Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 17442–17452.

Kriebel, S., Schmidt, D., Holdenrieder, S., Goltz, D., Kristiansen, G., Moritz, R., Fisang, C., Müller, S.C., and Ellinger, J. (2015). Analysis of tissue and serum microRNA expression in patients with upper urinary tract urothelial cancer. *PLoS One* *10*, e0117284.

Kroh, E.M., Parkin, R.K., Mitchell, P.S., and Tewari, M. (2010). Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 50, 298–301.

Kuwabara, Y., Ono, K., Horie, T., Nishi, H., Nagao, K., Kinoshita, M., Watanabe, S., Baba, O., Kojima, Y., Shizuta, S., et al. (2011). Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 4, 446–454.

Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F.J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y., and Sadoul, R. (2011). Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 409–418.

Laterza, O.F., Lim, L., Garrett-Engele, P.W., Vlasakova, K., Muniappa, N., Tanaka, W.K., Johnson, J.M., Sina, J.F., Fare, T.L., Sistare, F.D., et al. (2009). Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin. Chem.* 55, 1977–1983.

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

Lehmann, U., Hasemeier, B., Christgen, M., Müller, M., Römermann, D., Länger, F., and Kreipe, H. (2008). Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J. Pathol. J* 214, 17–24.

Li, H., Ge, Q., Guo, L., and Lu, Z. (2013a). Maternal Plasma miRNAs Expression in Preeclamptic Pregnancies. *Biomed Res. Int.* 2013.

Li, J., Zhang, Y., Liu, Y., Dai, X., Li, W., Cai, X., Yin, Y., Wang, Q., Xue, Y., Wang, C., et al. (2013b). Microvesicle-mediated transfer of microRNA-150 from monocytes to endothelial cells promotes angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 288, 23586–23596.

Li, T., Lu, Y.Y., Zhao, X.D., Guo, H.Q., Liu, C.H., Li, H., Zhou, L., Han, Y.N., Wu, K.C., Nie, Y.Z., et al. (2014). MicroRNA-296-5p increases proliferation in gastric cancer through repression of Caudal-related homeobox 1. *Oncogene* 33, 783–793.

Li, X.-X., Gao, S.-Y., Wang, P.-Y., Zhou, X., Li, Y.-J., Yu, Y., Yan, Y.-F., Zhang, H.-H., Lv, C.-J., Zhou, H.-H., et al. (2015). Reduced expression levels of let-7c in human breast cancer patients. *Oncol. Lett.* *9*, 1207–1212.

Lim, P.K., Bliss, S. a, Patel, S. a, Taborga, M., Dave, M. a, Gregory, L. a, Greco, S.J., Bryan, M., Patel, P.S., and Rameshwar, P. (2011). Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res.* *71*, 1550–1560.

Linsen, S.E. V, de Wit, E., Janssens, G., Heater, S., Chapman, L., Parkin, R.K., Fritz, B., Wyman, S.K., de Bruijn, E., Voest, E.E., et al. (2009). Limitations and possibilities of small RNA digital gene expression profiling. *Nat. Methods* *6*, 474–476.

Liu, A.M., Yao, T.-J., Wang, W., Wong, K.-F., Lee, N.P., Fan, S.T., Poon, R.T.P., Gao, C., and Luk, J.M. (2012). Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. *BMJ Open* *2*, e000825.

Liu, C.-J., Kao, S.-Y., Tu, H.-F., Tsai, M.-M., Chang, K.-W., and Lin, S.-C. (2010). Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral Dis.* *16*, 360–364.

Lodes, M.J., Caraballo, M., Suci, D., Munro, S., Kumar, A., and Anderson, B. (2009). Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One* *4*, e6229.

Loyer, X., Vion, A.-C., Tedgui, A., and Boulanger, C.M. (2014). Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. *Circ. Res.* *114*, 345–353.

Lu, H.-Q., Liang, C., He, Z.-Q., Fan, M., and Wu, Z.-G. (2013). Circulating miR-214 is associated with the severity of coronary artery disease. *J. Geriatr. Cardiol.* *10*, 34–38.

Lu, Y., Hou, S., Huang, D., Luo, X., Zhang, J., Chen, J., and Xu, W. (2015). Expression profile analysis of circulating microRNAs and their effects on ion channels in Chinese atrial fibrillation patients. *8*, 845–853.

Ma, W., Zhang, X., Chai, J., Chen, P., Ren, P., and Gong, M. (2014). Circulating miR-148a is a significant diagnostic and prognostic biomarker for patients with osteosarcoma. *Tumour Biol.* 35, 12467–12472.

Maggi, L.B., Kuchenruether, M., Dadey, D.Y. a, Schwoppe, R.M., Grisendi, S., Townsend, R.R., Pandolfi, P.P., and Weber, J.D. (2008). Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Mol. Cell. Biol.* 28, 7050–7065.

Mendell, J.T., and Olson, E.N. (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 148, 1172–1187.

Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., Briant, K.C.O., Allen, A., et al. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection.

Miyachi, M., Tsuchiya, K., Yoshida, H., Yagyu, S., Kikuchi, K., Misawa, A., Iehara, T., and Hosoi, H. (2010). Circulating muscle-specific microRNA, miR-206, as a potential diagnostic marker for rhabdomyosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400, 89–93.

Nugent, M., Miller, N., and Kerin, M.J. (2012). Circulating miR-34a levels are reduced in colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* 106, 947–952.

Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. a, van Eijndhoven, M. a J., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Würdinger, T., and Middeldorp, J.M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6328–6333.

Peng, L., Chun-guang, Q., Bei-fang, L., Xue-zhi, D., Zi-hao, W., Yun-fu, L., Yan-ping, D., Yang-gui, L., Wei-guo, L., Tian-yong, H., et al. (2014). Clinical impact of circulating miR-133, miR-1291 and miR-663b in plasma of patients with acute myocardial infarction. *Diagn. Pathol.* 9, 89.

Pigati, L., Yaddanapudi, S.C.S., Iyengar, R., Kim, D.-J., Hearn, S. a, Danforth, D., Hastings, M.L., and Duelli, D.M. (2010). Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One* 5, e13515.

- Pritchard, C.C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J.D., Dougherty, K.J., Miyaji, M.M., Tait, J.F., and Tewari, M. (2012). Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. 5, 492–497.
- Pu, X., Huang, G., Guo, H., Guo, C., Li, H., Ye, S., Ling, S., Jiang, L., Tian, Y., and Lin, T. (2010). Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 1674–1680.
- Rautou, P.-E., Leroyer, A.S., Ramkhelawon, B., Devue, C., Duflaut, D., Vion, A.-C., Nalbone, G., Castier, Y., Leseche, G., Lehoux, S., et al. (2011). Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circ. Res.* 108, 335–343.
- Reid, G., Kirschner, M.B., and Zandwijk, N. Van (2011). Circulating microRNAs : Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit. Rev. Oncol. / Hematol.* 80, 193–208.
- Ren, J., Zhang, J., Xu, N., Han, G., Geng, Q., Song, J., Li, S., Zhao, J., and Chen, H. (2013). Signature of circulating microRNAs as potential biomarkers in vulnerable coronary artery disease. *PLoS One* 8, e80738.
- Resnick, K.E., Alder, H., Hagan, J.P., Richardson, D.L., Croce, C.M., and Cohn, D.E. (2009). The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol. Oncol.* 112, 55–59.
- Rosell, R., Wei, J., and Taron, M. (2009). Circulating MicroRNA Signatures of Tumor-Derived Exosomes for Early Diagnosis of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer* 10, 8–9.
- Satoh, J., Kino, Y., and Niida, S. (2015). MicroRNA-Seq Data Analysis Pipeline to Identify Blood Biomarkers for Alzheimer ' s Disease from Public Data. 21–31.
- Schöler, N., Langer, C., Döhner, H., Buske, C., and Kuchenbauer, F. (2010). Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature. *Exp. Hematol.* 38, 1126–1130.
- Scian, M.J., Maluf, D.G., David, K.G., Archer, K.J., Suh, J.L., Wolen, a R., Mba, M.U., Massey, H.D., King, a L., Gehr, T., et al. (2011). MicroRNA profiles in allograft tissues and

paired urines associate with chronic allograft dysfunction with IF/TA. *Am. J. Transplant* *11*, 2110–2122.

Silva, J., García, V., Zaballos, Á., Provencio, M., Lombardía, L., Almonacid, L., García, J.M., Domínguez, G., Peña, C., Diaz, R., et al. (2011). Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur. Respir. J.* *37*, 617–623.

Skog, J., Wurdinger, T., Rijn, S. Van, Meijer, D., Gainche, L., Sena-estevés, M., Jr, W.T.C., Carter, R.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1470–1476.

Spinetti, G., Fortunato, O., Caporali, A., Shantikumar, S., Marchetti, M., Meloni, M., Descamps, B., Floris, I., Sangalli, E., Vono, R., et al. (2013). MicroRNA-15a and microRNA-16 impair human circulating proangiogenic cell functions and are increased in the proangiogenic cells and serum of patients with critical limb ischemia. *Circ. Res.* *112*, 335–346.

Su, T.-H., Liu, C.-H., Liu, C.-J., Chen, C.-L., Ting, T.-T., Tseng, T.-C., Chen, P.-J., Kao, J.-H., and Chen, D.-S. (2013). Serum microRNA-122 level correlates with virologic responses to pegylated interferon therapy in chronic hepatitis C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 7844–7849.

Sucharov, C., Bristow, M.R., and Port, J.D. (2008). miRNA expression in the failing human heart: functional correlates. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *45*, 185–192.

Syring, I., Bartels, J., Holdenrieder, S., Kristiansen, G., Müller, S.C., and Ellinger, J. (2015). Circulating serum miRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p and miR-373-3p) as biomarkers in patients with testicular germ cell cancer. *J. Urol.* *193*, 331–337.

Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Köppel, T., Jahantigh, M.N., Lutgens, E., et al. (2009a). Delivery of MicroRNA-126 by Apoptotic Bodies Induces CXCL12-Dependent Vascular Protection. *Sci. Signal.* *2*, 1–12.

Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Köppel, T., Jahantigh, M.N., Lutgens, E., et al. (2009b). Delivery of MicroRNA-126 by Apoptotic Bodies Induces CXCL12-Dependent Vascular Protection. *Sci. Signal.* *2*, 1–12.

Zhang, J., Song, Y., Zhang, C., Zhi, X., Fu, H., Ma, Y., Chen, Y., Pan, F., Wang, K., Ni, J., et al. (2015). Circulating MiR-16-5p and MiR-19b-3p as Two Novel Potential Biomarkers to Indicate Progression of Gastric Cancer. *Theranostics* 5, 733–745.

Zhang, Z., Meng, H., Wang, N., Liang, L., Liu, L., Lu, S., and Luan, Y. (2014). Serum microRNA 143 and microRNA 215 as potential biomarkers for the diagnosis of chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Diagn. Pathol.* 9, 135.

Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., et al. (2010). Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol. Cell* 39, 133–144.

Zhao, S., Yao, D., Chen, J., and Ding, N. (2013). Circulating miRNA-20a and miRNA-203 for screening lymph node metastasis in early stage cervical cancer. *Genet Test Mol Biomarkers* 17, 631–636.

Zhou, J., Yu, L., Gao, X., Hu, J., Wang, J., Dai, Z., Wang, J.-F., Zhang, Z., Lu, S., Huang, X., et al. (2011). Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 29, 4781–4788.

Zhuang, G., Wu, X., Jiang, Z., Kasman, I., Yao, J., Guan, Y., Oeh, J., Modrusan, Z., Bais, C., Sampath, D., et al. (2012). Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J.* 31, 3513–3523.

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., and Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 32, e103.

Tan, Y., Pan, T., Ye, Y., Ge, G., Chen, L., Wen, D., and Zou, S. (2014). Serum microRNAs as potential biomarkers of primary biliary cirrhosis. *PLoS One* 9, e111424.

Tanaka, M., Oikawa, K., Takanashi, M., Kudo, M., Ohyashiki, J., Ohyashiki, K., and Kuroda, M. (2009). Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One* 4, e5532.

Tijssen, A.J., Creemers, E.E., Moerland, P.D., de Windt, L.J., van der Wal, A.C., Kok, W.E., and Pinto, Y.M. (2010). MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ. Res.* *106*, 1035–1039.

Tsujiura, M., Ichikawa, D., Komatsu, S., Shiozaki, a, Takeshita, H., Kosuga, T., Konishi, H., Morimura, R., Deguchi, K., Fujiwara, H., et al. (2010). Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br. J. Cancer* *102*, 1174–1179.

Turchinovich, a, Samatov, T.R., Tonevitsky, a G., and Burwinkel, B. (2013). Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front. Genet.* *4*, 119.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötval, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 654–659.

Valladares-Ayerbes, M., Reboredo, M., Medina-Villaamil, V., Iglesias-Díaz, P., Lorenzo-Patiño, M.J., Haz, M., Santamarina, I., Blanco, M., Fernández-Tajes, J., Quindós, M., et al. (2012). Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *J. Transl. Med.* *10*, 186.

Wang, G., Tam, L.S., Li, E.K.M., Kwan, B.C.H., Chow, K.M., Luk, C.C.W., Li, P.K.T., and Szeto, C.C. (2011). Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* *20*, 493–500.

Wang, G.-K., Zhu, J.-Q., Zhang, J.-T., Li, Q., Li, Y., He, J., Qin, Y.-W., and Jing, Q. (2010a). Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur. Heart J.* *31*, 659–666.

Wang, J., Chen, J., Chang, P., LeBlanc, a., Li, D., Abbruzzesse, J.L., Frazier, M.L., Killary, a. M., and Sen, S. (2009). MicroRNAs in Plasma of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients as Novel Blood-Based Biomarkers of Disease. *Cancer Prev. Res.* *2*, 807–813.

Wang, J., Yu, M., Yu, G., Bian, J., Deng, X., Wan, X., and Zhu, K. (2010b). Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *394*, 184–188.

- Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., and Galas, D.J. (2010c). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 38, 7248–7259.
- Wang, S., Xiang, J., Li, Z., Lu, S., Hu, J., Gao, X., Yu, L., Wang, L., Wang, J., Wu, Y., et al. (2015). A plasma microRNA panel for early detection of colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 136, 152–161.
- Wang, Y., Lee, A.T.C., Ma, J.Z.I., Wang, J., Ren, J., Yang, Y., Tantoso, E., Li, K.-B., Ooi, L.L.P.J., Tan, P., et al. (2008). Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target. *J. Biol. Chem.* 283, 13205–13215.
- Weber, D.G., Casjens, S., Johnen, G., Bryk, O., Raiko, I., Pesch, B., Kollmeier, J., Bauer, T.T., and Brüning, T. (2014). Combination of MiR-103a-3p and mesothelin improves the biomarker performance of malignant mesothelioma diagnosis. *PLoS One* 9, e114483.
- Weber, M., Baker, M.B., Patel, R.S., Quyyumi, A. a, Bao, G., and Searles, C.D. (2011). MicroRNA Expression Profile in CAD Patients and the Impact of ACEI/ARB. *Cardiol. Res. Pract.* 2011, 532915.
- Veerla, S., Lindgren, D., Kvist, A., Frigyesi, A., Staaf, J., Persson, H., Liedberg, F., Chebil, G., Gudjonsson, S., Borg, A., et al. (2009). MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31. *Int. J. Cancer* 124, 2236–2242.
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., and Remaley, A.T. (2011). MicroRNAs are Transported in Plasma and Delivered to Recipient Cells by High-Density Lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* 13, 423–433.
- Wong, T.-S., Liu, X.-B., Wong, B.Y.-H., Ng, R.W.-M., Yuen, A.P.-W., and Wei, W.I. (2008). Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin. Cancer Res.* 14, 2588–2592.
- Xuan, H., Xue, W., Pan, J., Sha, J., Dong, B., and Huang, Y. (2015). Contributes to Pathogenesis of Prostate Cancer by Targeting Bmi-1. *Biochemistry* 80, 276–283.

Yang, M., Chen, J., Su, F., Yu, B., Su, F., Lin, L., Liu, Y., Huang, J.-D., and Song, E. (2011). Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol. Cancer* *10*, 117.

Yeh, T.-S., Wang, F., Chen, T.-C., Yeh, C.-N., Yu, M.-C., Jan, Y.-Y., and Chen, M.-F. (2014). Expression profile of microRNA-200 family in hepatocellular carcinoma with bile duct tumor thrombus. *Ann. Surg.* *259*, 346–354.

Yong, F.L., Law, C.W., and Wang, C.W. (2013). Potentiality of a triple microRNA classifier: miR-193a-3p, miR-23a and miR-338-5p for early detection of colorectal cancer. *BMC Cancer* *13*, 280.

Kasutatud veebiaadressid

<https://www.qiagen.com/ee/products/genes%20and%20pathways/data-analysis-center-overview-page/?UID=5c8b1d08-ac49-4078-9cc2-0a08d4421eb8>

<http://boxplot.tyerslab.com/>

Lisad

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	01	01	02	02	03	03	04	04	05	05	06	06	07	07	08	08	09	09	10	10	11	11	12	12
B	01	01	02	02	03	03	04	04	05	05	06	06	07	07	08	08	09	09	10	10	11	11	12	12
C	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	24	24
D	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	24	24
E	25	25	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35	36	36
F	25	25	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35	36	36
G	37	37	38	38	39	39	40	40	41	41	42	42	43	43	44	44	45	45	46	46	47	47	48	48
H	37	37	38	38	39	39	40	40	41	41	42	42	43	43	44	44	45	45	46	46	47	47	48	48
I	49	49	50	50	51	51	52	52	53	53	54	54	55	55	56	56	57	57	58	58	59	59	60	60
J	49	49	50	50	51	51	52	52	53	53	54	54	55	55	56	56	57	57	58	58	59	59	60	60
K	61	61	62	62	63	63	64	64	65	65	66	66	67	67	68	68	69	69	70	70	71	71	72	72
L	61	61	62	62	63	63	64	64	65	65	66	66	67	67	68	68	69	69	70	70	71	71	72	72
M	73	73	74	74	75	75	76	76	77	77	78	78	79	79	80	80	81	81	82	82	83	83	84	84
N	73	73	74	74	75	75	76	76	77	77	78	78	79	79	80	80	81	81	82	82	83	83	84	84
O	Ce	Ce	Ce	Ce	SN1	SN1	SN2	SN2	SN3	SN3	SN4	SN4	SN5	SN5	SN6	SN6	miRTC	miRTC	miRTC	miRTC	PPC	PPC	PPC	PPC
P	Ce	Ce	Ce	Ce	SN1	SN1	SN2	SN2	SN3	SN3	SN4	SN4	SN5	SN5	SN6	SN6	miRTC	miRTC	miRTC	miRTC	PPC	PPC	PPC	PPC

Lisa 1 QIAGEN-i Human & Plasma miScript miRNA PCR Array 384 (MIHS- 106ZE) plaatide skeem. Allpool on välja toodud mis number plaadil tähistab millist miRNA-d

- | | | |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| 1. hsa-let-7a-5p | 16. hsa-miR-150-5p | 31. hsa-miR-208a-3p |
| 2. hsa-miR-1-3p | 17. hsa-miR-155-5p | 32. hsa-miR-20a-5p |
| 3. hsa-miR-100-5p | 18. hsa-miR-17-5p | 33. hsa-miR-21-5p |
| 4. hsa-miR-106b-5p | 19. hsa-miR-17-3p | 34. hsa-miR-210-3p |
| 5. hsa-miR-10b-5p | 20. hsa-miR-18a-5p | 35. hsa-miR-214-3p |
| 6. hsa-miR-122-5p | 21. hsa-miR-192-5p | 36. hsa-miR-215-5p |
| 7. hsa-miR-124-3p | 22. hsa-miR-195-5p | 37. hsa-miR-221-3p |
| 8. hsa-miR-125b-5p | 23. hsa-miR-196a-5p | 38. hsa-miR-222-3p |
| 9. hsa-miR-126-3p | 24. hsa-miR-19a-3p | 39. hsa-miR-223-3p |
| 10. hsa-miR-133a-3p | 25. hsa-miR-19b-3p | 40. hsa-miR-224-5p |
| 11. hsa-miR-133b | 26. hsa-miR-200a-3p | 41. hsa-miR-23a-3p |
| 12. hsa-miR-134-5p | 27. hsa-miR-200b-3p | 42. hsa-miR-25-3p |
| 13. hsa-miR-141-3p | 28. hsa-miR-200c-3p | 43. hsa-miR-27a-3p |
| 14. hsa-miR-143-3p | 29. hsa-miR-203a-3p | 44. hsa-miR-296-5p |
| 15. hsa-miR-146a-5p | 30. hsa-miR-205-5p | 45. hsa-miR-29a-3p |

- | | | |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| 46. hsa-miR-30d-5p | 59. hsa-miR-128-3p | 72. hsa-miR-373-3p |
| 47. hsa-miR-34a-5p | 60. hsa-miR-130b-3p | 73. hsa-miR-374a-5p |
| 48. hsa-miR-375 | 61. hsa-miR-145-5p | 74. hsa-miR-376c-3p |
| 49. hsa-miR-423-5p | 62. hsa-miR-148a-3p | 75. hsa-miR-7-5p |
| 50. hsa-miR-499a-5p | 63. hsa-miR-15a-5p | 76. hsa-miR-96-5p |
| 51. hsa-miR-574-3p | 64. hsa-miR-184 | 77. hsa-miR-103a-3p |
| 52. hsa-miR-885-5p | 65. hsa-miR-193a-5p | 78. hsa-miR-15b-5p |
| 53. hsa-miR-9-5p | 66. hsa-miR-204-5p | 79. hsa-miR-16-5p |
| 54. hsa-miR-92a-3p | 67. hsa-miR-206 | 80. hsa-miR-191-5p |
| 55. hsa-miR-93-5p | 68. hsa-miR-211-5p | 81. hsa-miR-22-3p |
| 56. hsa-let-7c-5p | 69. hsa-miR-26b-5p | 82. hsa-miR-24-3p |
| 57. hsa-miR-107 | 70. hsa-miR-30e-5p | 83. hsa-miR-26a-5p |
| 58. hsa-miR-10a-5p | 71. hsa-miR-372-3p | 84. hsa-miR-31-5p |

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Klaarika Kikas (sünnikuupäev: 29.11.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Vereplasmas ringlevate mikroRNAde ekspressiooni varieeruvus Eesti populatsioonis, mille juhendaja on Tarmo Annilo,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015