Derleme

Hastalıkların tanı ve tedavi stratejilerinde miRNA ve diğer non-protein-coding RNA'lar

Zehra Öksüz Karaarslan[1], Mehmet Sami Serin[1]

[1]Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin

Özet

Son yıllarda yapılan tüm genom/fonksiyonel analiz çalışmaları insan genomunun yaygın olarak binlerce düzenleyici non-protein-coding RNA'lar (protein kodlamayan RNA) transkribe ettiğini ortaya koymuştur. Bunlar içerisinde mikro RNA'lar, small interfering RNA'lar, P-element-induced Wimply Testis (PIWI) interacting RNAs'lar ve çeşitli uzun non-protein-coding RNA'lar vardır. Bunlar içerisinde özellikle miRNA'lar son 20 yıldır biyomedikal disiplinlerde tanı ve tedavi stratejisi geliştirilmesinde oldukça geniş bir ilgi odağı haline gelmiştir. MikroRNA'lar kısa non-protein-coding RNA moleküllerinin bir sınıfıdır. Yüksek kapasiteli genomik ve biyoinformatik tekniklerin geleneksel moleküler biyoloji teknikleri ve deney hayvanı çalışmaları ile bütünleşmesi ile mikroRNA araştırmaları, günümüzde elde edilen ön bulguların laboratuvardan kliniğe ve halk sağlığına aktarılmasında önemli bir yer tutmaktadır. mikroRNA'lar küçük olmalarına rağmen çeşitli hücresel süreçlerle ilişkili olan post-transkripsiyonel gen ekspresyonunun önemli düzenleyicileridir. Bu nedenle mikroRNA'larda meydana gelen alterasyonlar tanımlanan bir dizi hastalığın patolojisi ile ilişkilendirilmiştir. Günümüze kadar, insanda 5000'den fazla miRNA keşfedilmiş ve bunların çoğu kanser, viral hastalıklar, immünite ile ilişkili hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok yaygın insan hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. miRNA'ların yeni nesil biyomarker ve terapötik olma yolunda önemli potansiyelleri vardır.

Anahtar kelimeler: miRNA, non-protein-coding RNA, tanı, tedavi, biyomarkır

miRNAs and other non-proteın-coding RNAs in the strategy of diagnosis and treatment of the diseases

Abstract

Recent genome-wide/functional analyses have shown that the human genome is pervasively transcribed and produces several thousands of regulatory non-protein-coding RNAs, including microRNAs, small interfering RNAs, PIWI-interacting RNAs and various classes of long ncRNAs. MicroRNAs are a class of short non-coding RNA molecules. They have attracted significant attention from biomedical research communities over the past two decades.

Yazının geliş tarihi:31.05.2016 **Yazının kabul tarihi:**22.07.2016

Sorumlu Yazar: Arş. Gör. Zehra Öksüz Karaarslan

İletişim: Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasöttik Mikrobiyoloji AD, Mersin

Tel: 0324 361 00 01/1959**, E-posta:** zehraoksz@gmail.com

Facilitated by high-throughput genomics and bioinformatics in conjunction with traditional molecular biology techniques and animal models, miRNA research is now positioned to make the transition from laboratories to the clinics, delivering profound benefits to public health. MicroRNAs are small, however important regulators of post-transcriptional gene expression that have been linked to various cellular processes. Alterations of miRNAs are associated with the underlying pathology of several diseases. With over 5000 miRNAs discovered in human to date, many of them have already been implicated in common human disorders including cancer, viral and immune-related as well as neurodegenerative diseases. miRNAs have vital potential in becoming the next generation of diagnostics and therapeutics.

Keywords: miRNAs, Non-coding RNAs, diagnosis, therapy, biomarker

Giriş

Biyolojide gen düzenlenmesi konvansiyonel olarak çoğunlukla DNA/mRNA/proteinin merkezi dogma yoluyla protein kodlayan genler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte, tam genom sekanslama çalışmalarında, toplam RNA molekülünün yaklaşık olarak %1.5'luk kısmını protein kodlamadan sorumlu genomun oluşturduğu, çok büyük bir kısmını ise non-protein-coding RNA (npcRNA;protein kodlamayan RNA) olarak adlandırılan kodlanmayan düzenleyici elemanların oluşturduğu gösterilmiştir.[1] npcRNA'lar nükleotid (nt) uzunluklarına göre, içerisinde microRNA (miRNA), küçük engelleyici RNA (siRNA) ve PIWI etkileşim RNA (piRNA)'lar gibi npcRNA'ların bulunduğu ve 19-31 nt uzunluğa sahip "Kısa npcRNA'lar (Short ncRNA)", içerisinde küçük nucleolar RNA (smoRNA), sentromer tekrarlanan ilişkili siRNA'lar (crasiRNA) gibi npcRNA'ların bulunduğu ve ≤200 nt uzunluğa sahip "Orta büyüklükteki npcRNA'lar" ve içerisinde Intergenic RNA (lincRNA), uzun intronik RNA (linRNA) gibi npcRNA'ların bulunduğu ≥200 nt uzunluğa sahip "Uzun npcRNA'lar (lncRNA)" olarak ayrılabilirler (Tablo 1).[2] Pek çok npcRNA'nın fonksiyonu hala büyük ölçüde tanımlanmamış olmasına rağmen, son zamanlarda yapılan çalışmalarda, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser de dâhil olmak üzere, çeşitli patolojik durumlarda ve önemli biyolojik fonksiyonları da kapsayan mekanizmalarında ncRNA'ların rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda ncRNA'ların fonksiyonları aydınlatılmaya çalışılarak kanser gibi hastalıkların tanısı ve tedavileri için yeni yararlı potansiyel hedefler olabilmeleri üzerinde durulmaktadır.[3]

miRNA'lar post transkripsiyonel düzenlenmelerde yer alan ~22 nt uzunluğundaki npcRNA'lardır. miRNA'lar, özellikle gen ekspresyonunun negatif düzenlenmesi yoluyla, mesajcı RNA'ları (mRNA) düzenler. mRNA'nın bölgelerine bağlanarak translasyonu bloke ederler ya da tamamen degrade ederler. miRNA'nın otoregülatör geribildirim döngüleri ve fonksiyonları ilk keşfedilen miRNA'lardan biri olan let-7 ile gösterilmiştir. miRNA'ların çoğunluğu gibi, let-7 prekürsör saç tokası ya da pre-miRNA formu, nükleer RNaz Drosha tarafından uzun bir RNA polimeraz II transkripte işlenir sonra sitoplazmaya gönderilir ve Dicer tarafından ~22 nt'lik olgun miRNA'ya işlenir. miRNA'lar, hücresel farklılaşma, geliştirme, çoğalma ve apoptozisin de dâhil olduğu birçok olayda önemli rol oynamaktadırlar.[4] (Şekil 1).

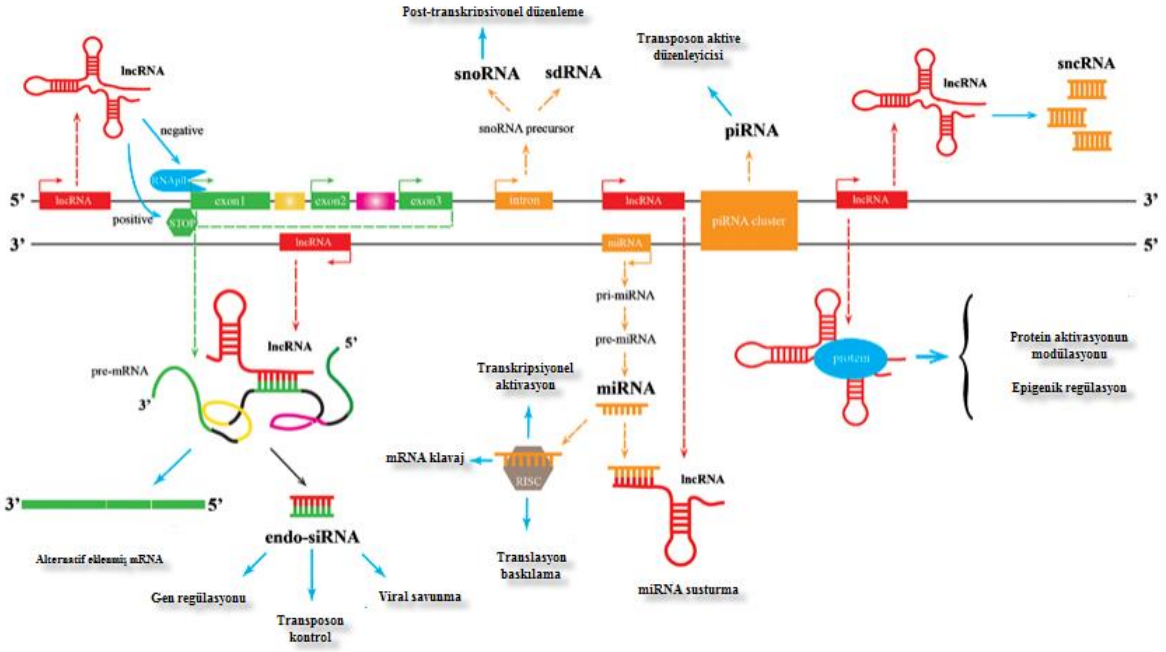
siRNA'lar genellikle 19-23 nt uzunluğunda, site-spesifik klevaj aracılığı ile RNA indüklü susturma kompleksini yöneterek hedef mRNA'nın susturulası ve yok edilmesi gibi fonksiyonları olduğu bilinmektedir.[7] Ekzojen siRNA'lar 10 yıl önce keşfedilmiş olmakla beraber endojen siRNA'lar meyve sineklerinde ve memelilerde son yıllarda tanımlanmışlardır. Endojen siRNA'lar anti-viral savunma, transpozon susturma, kromozom yeniden modellenme ve post-transkripsiyonel gen düzenlenmesinde (Argonaute aracılı hedef transkript klevajı) rol oynamaktadır[8] (Şekil 1).

Tablo-1: Non-coding RNA'ların temel fonksiyonları ve tiplari (Kaynak 2'den düzenlenmiştir).

Tip	Uzunluk (nt)	Fonksiyonları
Kısa ncRNA'lar		
	19-31	
miRNA		Çoğalma, farklılaşma ve apoptoz düzenlemesinde rol oynar.
siRNA		Posttranskripsiyonel gen susturma; patojenik nükleik asitlere karşı savunmada rol oynar.
tiRNA		Epigenetik susturucu kompleksleri hedefleyerek transkripsiyonun düzenler.
piRNA		Transpozon baskılanması, DNA metilasyonu, germ hücre gelişimi, kök hücre yenilenmesinde görev alır.
tel-sRNA		Epigenetik düzenleme
Orta büyük ncRNA'lar	≤ 200	
snoRNA		rRNA modifikasyonları
PASR		Protein kodlayan genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynar.
TSSa-RNA		Transkripsiyonun sürdürülmesinde rol oynar.
PROMPT		Transkripsiyon aktivasyonunda rol oynar
crasiRNA		Heterokromatinin ve / veya sentromer proteinlerin temini
Uzun ncRNA'lar	≥ 200	
IincRNA		Kompensasyon gibi biyolojik süreçlere katılır.
Intronik IncRNA		Posttranskripsiyonel gen susturma ile olası bağlantı
T-UCR		miRNA'ların düzenlenmesi ve protein kodlayan genler ve diğer ncRNAs için antisens inhibitörü
TERRA		Telomerazın engellenmesi yoluyla telomer uzunluğunun ve aktivitesinin negatif düzenlenmesi
Pseudogene RNA		miRNA tuzakları gibi hareket ederek tümör baskılayıcılar ve onkogenlerin düzenlenmesi

piRNA'lar 23-29 nt uzunluğunda ncRNA'lardır ve birçok hayvan türlerinin germ hattında piRNA kaynaklı susturma kompleksi oluştururlar. piRNA özellikle, Argonaute protein (AGO protein) ailesinin germ hattı spesifik üyelerinden PIWI proteinleri ile ilişkilidir. piRNA'nın ana fonksiyonu germ hücrelerde transposable elementlere karşı savunmadır. Transposable elementler konağın genomik bütünlüğünü tehdit eder. piRNA'lar ve onların karşılıklı etkileşen proteinleri hücresel süreçlerde önemli bir role sahiptir ve kanser hücresi gelişiminin potansiyel düzenleyicileridir.[8] (Şekil 1).lncRNA'lar fonksiyonel açık okuma çerçevesi (ORF) eksik, 200 nt'den uzun transkript sınıflarıdır. Genel olarak lncRNA'lar, poliadenile ya da değillerdir, nükleer ya da sitoplazmiklerdir. Şimdiye kadar, binlerce lncRNA'nın hastalıklarda önemli rol oynağı bulunmuş ancak hala çoğunluğunun fonksiyonel özellikleri belirlenememiştir.[1-9] lncRNA promoterleri, epigenetik olarak spesifik histon modifikasyonları ile işaretlenmiş ve Oct3/4, Nanog, CREB, Sp1, c-myc, Sox2, NF-κB ve p53'ünde dahil olduğu transkripsiyonel faktörler tarafından bağlanır ve düzenlenirler.[9] Son zamanlardaki bazı araştırmalar lncRNA'ların ekspresyon düzensizlikleri ile tümör patogenezleri arasında ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Bu lncRNA'lar hücresel çoğalma, apoptoz veya metastaz üzerinde etki ederek gerekli düzenleyici fonksiyonları gerçekleştirebilmektedirler.[1-9] (Şekil 1).

Bu derlemenin amacı, yukarda bahsedilen hayati süreçlerde farklı şekillerde görev alan npcRNA'ların; hastalıkların oluşumunda, erken teşhisinde ve tedavisindeki rollerinin anlaşılmasına katkı sağlamak amacıyla son dönemde yapılmış olan makale ve derlemeleri bir araya getirerek bu konu hakkındaki son bilgileri toparlamaktır.



Şekil 1. ncRNA'ların biyogenez yolakları ve fonksiyonları [5]

Hastalık Oluşumlarında Kısa ncRNA'lar

Küçük RNA'lar kök hücre ve germline sürekliliği, gelişmesi ve farklılaşması, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen susturulması ve subsellüler lokalizasyon gibi hemen hemen tüm gelişim süreçlerinde rol oynamaktadırlar. Bu nedenlerden dolayı süreçlerindeki bir bozukluğun insan hastalıkları ile ilişkili olması sürpriz değildir.[4-7] Bazı memeli miRNA'larının her zaman ekspresse edildiği gözlenmektedir

ancak northern blots, PCR, microarray çip ve sensor transgenler gibi yöntemler kullanılarak beyin, akciğer, karaciğer, dalak, kalp ve iskelet kasının dahil olduğu hücre ve dokuların çeşitli şekillerde gelişimsel olarak düzenlenen miRNA ekspresyonları gösterdikleri bulunmuştur. Model organizmalarla yapılan çalışmalar miRNA'ların, özellikle embriyonik kök hücre farklılaşması ve embriyojeneze ek olarak beyin gelişimi, nöronal farklılaşma, hematopoetik soy farklılaşması, apoptozun kontrolünde rol oynağını göstermiştir.[10] Yapılan bu gen ekspresyon çalışmaları, kontrolsüz hücre bölünmesinin gerçekleştiği kanser hücrelerinde değişikliğe uğramış miRNA ekspresyonlarını gözler önüne sermiştir. Kanserin başlamasında ve ilerlemesinde, miRNA'lar hedefledikleri genin karakterine göre tümör süpresörler veya onkogenler gibi fonksiyon göstermektedirler.[11]

Caenorhabditis elegans'dan ilk keşfedilen miRNA'lardan olan lin-4, lin-28 ve let-7'nin, diğer birçok miRNA gibi memeliler dâhil olmak üzere diğer türlerle de yakın homologlara sahip oldukları gösterilmiştir. lin-4 ve let-7, lin-28'in hedefleri memelilerde muhafaza edilir. miRNA ve hedef mRNA arasındaki olası fiziksel etkileşim, insan hücrelerindeki poliribozomlarda lin-28 mRNA ile birlikte ilişkilendirilen let-7b miRNA ile gösterilmiştir. Let-7'nin azalan ekspresyonunda akciğer kanserleri hastalarda postoperatif hayatta kalmanın azaldığı gözlemlemiştir ve bir akciğer adenokarsinoma hücre hattında let-7'nin aşırı ekspresyonunda in vitro akciğer kanseri hücre büyümesinin baskılandığı da bilinmektedir.[12]

miRNA lokus ve biyogenez sentezlenme yolunun bileşenleri, kanseri geniş bir aralıkta ya amplifiye eder ya da azaltır. Küçük RNA düzensizliği, onların biyogenezi ve hedefleri ile ilgili süreçlerde birçok nedenden meydana gelmektedir. Yumurtalık kanseri hastalarında, miRNA yapımına dâhil olan RNases, Dicer ve Drosha'nın ekspresyonun azalma göstermesinin, kötü prognoz, yetersiz cerrahi sitoredüksiyon ve ileri tümör evreleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Benzer bir şekilde, Dicer1'in erken sona erdirilmesi ile sonuçlanan bir mutasyonda nadir bir pediatrik akciğer tümörünün geliştiği gösterilmiştir. Bu bulgulara paralel olarak, farelerde yapılan çalışmalar, memeli sistemlerinin Dicer aktivitesine son derece hassas olduğunu göstermiştir. Dicer'in tam kaybında erken embriyonik letalite ve gelişim programlarının bozulduğu bilinmektedir.[10-13]

Olgun ve prekürsör miRNA'larda tek nükleotid polimorfizmler (SNP), güçlü bir şekilde şizofreni ve otizm ile ilişkilendirilmiştir ve miR- 96'nın sekansındaki patojenik bir SNP, ilerleyen işitme kaybından sorumlu bulunmuştur. miRNA'nın hedef bölgelerindeki alel-spesifik polimorfizmlerde, yüzlerce genin doku spesifik miRNA düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiş ve böyle genetik polimorfizimlerin bireysel fenotipik değişikliklerin yaygın altta yatan nedeni olabileceği ileri sürülmüştür.[14]

Hastalık Oluşumlarında Uzun ncRNA'lar

lncRNA'ların da küçük npcRNA'lar gibi transkripsiyon ve post-transkripsiyonda, onkogenez ve normal gelişim merkezi de dâhil olmak üzere protein kodlayan genlerin bazal düzenlenmesinde rollerinin olduğu bilinmektedir. Bu yüzden lncRNA'ların düzensiz ekspresyonları ile lösemi, kolon, prostat, meme kanserlerinin, hepatoselüler karsinoma, sedef hastalığı, iskemik kalp hastalığı, alzheimer ve spinoserebellar ataksi tip 8 gibi birçok kompleks insan hastalığının ilişkilendirilmesi şaşırtıcı değildir.[4-6]

lncRNA'lar çeşitli tümörlerin gen ekspresyon profil analizinin yapıldığı çalışmalarda karsinogenezin genel mekanizmalarından sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca, genetik çalışmalar, primer sekanslarda mutasyonun varlığını ortaya koymuştur. Bu mutasyonların çoğunun kodlayan genler dışında bulunduğu bilinmektedir bu nedenle lncRNA'ların bu mutasyonlardan etkilendiği

düşünülmektedir. lncRNA'lar onkogen ve onko-supresör olarak metastaz ve tümör gelişimini de içeren sinyal yolaklarını düzenler. Gebeliğe bağlı non-protein-coding RNA (PINC) ve prostat kanseri geni sentezleme markır 1 (PCGEM1) meme ve prostat karsinomlarında aşırı ekspresse olduğu bulunan ilk onkojenik lncRNA'lardır. O zamandan bu yana, pek çok diğer lncRNA'nın onkojenik (KRASP, karaciğer kanserinde yüksek artış- HULC, HOX antisense intergenic RNA-HOTAIR, Metastaz ilişkili akciğer adenokarsinomu transkript 1-MALAT1, distal ucunda HOXA transkript-HOTTIP, INK4 Lokusunda antisesn non coding RNA-ANRIL ve RICTOR) ya da onko-supresör (maternal eksprese gen 3-MEG3, büyümenin durdurulması spesifik 5- GAS5, lncRNA'ların transkripsiyonel aktivitesini veya yolakları düzenleyen-LincRNA-p21, PTENP1, telomerik tekrar içeren lncRNA-TERRA, CCND1/CyclinD1 ve taurin artış gen 1- TUG1) özellikleri tanımlanmıştır. İlginç bir şekilde, birçok lncRNA'nın onkojenik ve onko-supresör her iki aktivitesi de hücresel içeriğe bağlılık göstermektedir. X kromozom inaktivasyonunu başlatan XIST, noncoding transkript, dişi tümörlerde düşük ekspresyon gösterirken erkek tümörlerde aşırı ekspresyon göstermektedir.[2-15]

Kısa ncRNA'ların Tanı Stratejileri Geliştirilmesindeki Yeri

Yapılan çalışmalar ncRNA'ların hayvanlarda primer genetik düzenleyiciler olabileceklerini göstermiş ve bu bulgular onların ideal diagnostik markırlar olabileceğini düşündürmüştür. Örneğin, bazı durumlarda miRNA ve lncRNA'ların ekspresyon profilleri, protein kodlayan mRNA'ların aksine, tümör ve karsinom kaynağını doğru şekilde tespit edebilmektedir. Yapılan araştırmalarda yaklaşık 200 kadar miRNA'nın kanser ile ilişkili olduğunu, kolon ve diğer gizli kanserlerle ilgili erken teşhiste karşılaşılan bazı zorlukların, hastaların serum, plazma, tükürük ve dokularından elde edilen miRNA profilleri ile aşılabileceği bulunmuştur.[16] İnsan kanserlerinde en yaygın artışı olan miRNA, miR-21'dir (Tablo 2). Bu miRNA'nın aşırı ekspresyonu meme, akciğer, prostat ve diğer kanserlerde hücre proliferasyonu ve invasyonunu arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Kanser türlerinde artışı olan diğer bir miRNA, mir-155'nin aşırı ekspresyonu lenfoma tümör oluşumu ile ilişkili bulunmuştur. 102 plazma örneğinde miR-141 ekspresyon profilinin araştırıldığı bir çalışmada, IV. evre kolon kanseri ile mir-141 arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır.[9-17] Bizim yaptığımız bir çalışmada da miR-30c-5p, miR-223-3p, miR-302c-3p ve miR-17-5p'nin Hepatit C Virusuna (HCV) bağlı hepatosellüler karsinomanın (HCC) erken teşhisinde markır olabileceği gösterilmiştir.[18] Aynı zamanda benzer bir çalışmada miR-125b-5p ve miR223-3p'nin Hepatit B Virusuna (HBV) bağlı HCC'nin erken teşhisinde markır olabileceği gösterilmiştir.[19]

Kanser dışında nörodejeneratif hastalıklar gibi diğer hastalıklarla kısa ncRNA ekspresyon seviyeleri arasında ilişkiler bulunduğunu gösteren bazı çalışmalar vardır. Örneğin; belirlenen miRNA'nın yaklaşık %70'i beyinde eksprese olmaktadır. Bu nedenle miRNA'lar nörodejeneratif süreçlerin izlenmesinde görev alabilirler. Yapılan bir çalışmada da miR-342-3p'nin alzheimer hastalığında potansiyel markır olabileceği gösterilmiştir[20.]

Kardiyovasküler hastalıkların gelişimiyle miRNA'ların ekspresyon profilleri arasındaki ilişki de araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda miR-1'in aktive T (NFAT) hücrelerinde kalmodulini ve kalmodulin bağımlı nükleer faktör ekspresyonunu negatif şekilde düzenleyerek kardiyomiyosit büyümesini etkilediği bulunmuştur. Başka bir çalışmada miR-208a, miR-208b ve miR-499'nın embriyonik ve yetişkin kalbinde farklı şekillerde ekspresse edildiği bulunmuştur. Kardiyak spesifik miR-208a'nın aşırı ekspresyonunun farelerde hipertrofik büyüme ve aritmi için yeterli olduğu tespit edilmiştir.[21]

Uzun ncRNA'ların Tanı Stratejileri Geliştirilmesindeki Yeri

lncRNA'lar insan genomunun ayrılmaz fonksiyonel bileşenleri olarak ortaya çıkmıştır ve şu anda kanserin moleküler biyolojisinde kritik düzenleyiciler olarak kabul edilmektedirler. Son veriler göstermiştir ki, lncRNA'lar kanserin başlaması, tümörün ilerlemesi ve metastatik yayılma ile ilişkilidir. Nekrotik tümör hücreleri tarafından salınan lncRNA'lar kan, plazma ve idrarda tespit edilebilir.[2]

miRNA'lar gibi bazı lncRNA'larında HCC'de değişik ekspresyonlar gösterdikleri tespit edilmiştir. Örneğin, HULC, HCC'de kanda son derece spesifik artış gösteren ilk lncRNA'dır. Aynı zamanda MALAT-1 ve HOTAIR'da HCC hastalarında aşırı ekspresse edilmektedir. Özellikle HOTAIR, karaciğer naklinden sonra nüks için bir prognostik biyomarkırdır. HCC'de nüks ile ilişkili ve aşırı ekspresse olan diğer bir lncRNA'da HEIH (HCC'de yüksek ekspresyon)'dir. HOTTIP ve HOXA13'de HCC hastalarında artışı olan diğer lncRNA'lardır (Tablo 3) [22].

Tablo-2: Kanserde doku ve kan örneklerinde potansiyel miRNA markırları[9]

Kanser	Doku Örnekleri (Ekspresyon durumu ↑,↓)	Kan Örnekleri (Ekspresyon durumu ↑,↓)
Meme Kanseri	miR-21↑ , miR-155 ↑, miR-191 ↑, miR-196a ↑, miR-125b ↓, miR-221 ↓, let-7a ↓, miR-145 ↓, miR-205 ↓	Serum: miR-10b ↑, miR-34a ↑, miR-155 ↑, miR-21 ↑, miR-106a ↑, miR-155 ↑, miR-126 ↓, miR-199a ↓, miR-335 ↓ Tam kan: miR-195 ↑
Akciğer kanseri	miR-21, miR-205	Serum: miR-10b ↑, miR-155 ↑
Mide kanseri	miR-106a ↑, miR-31 ↓	Serum: miR-10a ↑, miR-22 ↑, miR-100 ↑, miR-148b ↑, miR-223 ↑, miR-133a ↑, miR-127-3p ↑, miR-1 ↑, miR-20a ↑, miR-27a ↑, miR-34 ↑, miR-423-5p ↑
Pankreas kanseri	miR-452 ↑, miR-105 ↑, miR-127 ↑, miR-518a-2 ↑, miR-187 ↑, miR-30a-3p ↑, miR-21 ↑, miR-155 ↑, miR-221 ↑, miR-222 ↑, let-7a ↑	Serum: miR-21 ↑, miR-155 ↑, miR-196a ↑ Plazma: miR-21 ↑, miR-155 ↑, miR-196a ↑, miR-210 ↑
Prostat kanseri	miR-125b ↑, miR-15a ↓, miR-16 ↓, miR-184 ↑, miR-146a ↓, miR-203 ↓, miR-34c ↓, miR-141 ↑	Serum: miR-141 ↑, miR-21 ↑, miR-141 ↑, miR-221 ↑, miR-375 ↑

MALAT 1'in akciğer adenokarsinomlarında metastatik yayılım için önemli bir prognostik biyomarkır olduğu gösterilmiştir. TUG1, nonsmall hücre akciğer kanserinde (NSCLC) genellikle azalmaktadır. NSCLC'de BANCR (BRAF aktive non-protein-coding RNA)'nin ekspresyonu normal dokulara kıyasla önemli derecede arttığı gösterilmiştir. Son zamanlarda BANCR'in aşırı ekspresyonunun epitelyal-mezenkimal translasyonda anahtar rol oynadığı bulunmuştur [23] (Tablo 3).

HOTAIR, mide kanseri ile ilişkili transkript 1 (GCAT1), H19 ve küçük ubikitin benzeri tamamlayıcı SUMO 1 psödogen 3 (SUMO1P3) mide kanserlerinde aşırı eksprese olduğu rapor edilen lncRNA'lardır. Ayrıca HOTOIR, karaciğer kanseri ve mide kanseri dışında kolon, rektum, göğüs, over, oral kavite ve nazofarenks kanserlerinde de aşırı ekspresse olarak biyomarkır işlevi görmektedir. lncRNA'ların diğer kanser türleriyle ilişkisi tablo 3'de verilmiştir.[2]

Kısa ncRNA'larda olduğu gibi uzun ncRNA'ların da kanser dışında diğer bazı hastalıklarla ekspresyon seviyeleri arasında ilişki bulan çalışmalar vardır. miRNA'lar gibi lncRNA'ların da beyin dokusunda ekspresyon farklılıkları gösterdikleri bilinmektedir. 20 parkinson hastasının beyin örneklerinde lncRNA ekspresyonlarının araştırıldığı bir çalışmada 5 lncRNA'nın (H19 azalır, lincRNA-p21, Malat1, SNHG1, ve TncRNA artar) önemli ölçüde değişik ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. Yine aynı makalede bu 5 lncRNA'nın parkinson hastalığında biyomarkır olabileceği vurgulanmıştır.[24]

Tablo-3. Karsinogeneziste rol alan ve potansiyel kanser biyomarkerları olan lncRNA'lar [2]

Kanser Tipi	**lncRNA'lar**
Özefagus	ENST00000435885.1, XLOC 013014, ENST00000547963.1
Mide	GCAT1, H19, SUMO1P3
Kolon ve Rektum	HOTAIR
Karaciğer	HULC, HOTAIR, MALAT1, HOTTIP, HEIH
Akciğer	MALAT1, TUG1, BANCR, GAS5
Göğüs	HOTAIR, LincRNA-RoR, UCA1
Over	HOTAIR
Mesane	UCA1, H19, Linc-UBC1, MALAT1
Prostat	PCA3, PCAT1, PCGEM1
Glioma	H19
Melanom	BANCR
Oral kavite ve nazofarenks	HOTAIR, lnc-C22orf32-1, lnc-AL355149.1-1 lnc-ZNF674-1

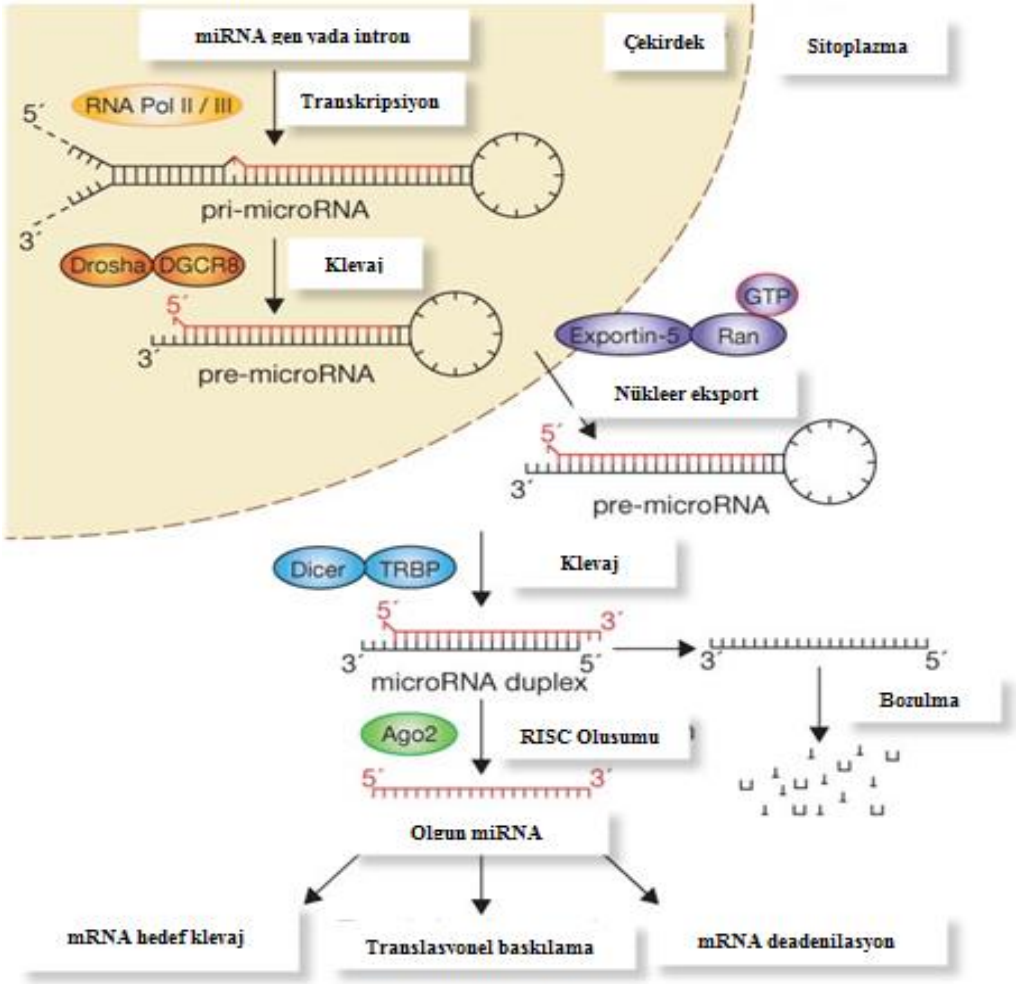
Kısa ncRNA'ların Tedavi Stratejileri Geliştirilmesindeki Yeri

Birçok ncRNA'nın önemli hastalıklarda düzensiz ekspresyon göstermelerinin kanıtlanmasından sonra şimdiki araştırmalar onların terapötik hedefler olarak kullanılması üzerinde yoğunlaşmıştır. ncRNA'lar dizi spesifik bir düzende mRNA transkripsiyonunun post transkripsiyonel olarak durdurulmasıyla sonuçlanan bir gen düzenlenmesini sağlamaktadırlar. Bu özelliklerinden dolayı dizi spesifik gen susturma hedefli ilaç tasarımlarında sıklıkla kullanılmaktadırlar. Potansiyel olarak herhangi bir hastalığa neden olan gen, hücre tipi ya da doku miRNA-RNAi ve siRNA-RNAi mekanizmaları ile hedeflenebilmektedir. Bu önemli

avantajdan dolayı günümüzde sadece kanser tedavisinde kullanılmak üzere 100 şirket 184 kanser araştırma projesi kapsamında 122 küçük ncRNA (miRNA, RNAi & siRNA) tabanlı ilaç geliştirme çalışması yapmaktadır**.** Onkolojik tedavi amaçlı bu ilaçlar hücre adezyon molekül aktivitesi, kofaktör bağlanması, sitokin aktivitesi, büyüme faktör aktivitesi, GTPase aktivitesi, kinase aktivitesi, ligand-bağımlı nuklear reseptör aktivitesi, metallopeptidase aktivitesi gibi temel hücresel fonksiyon içerisinde yer alan potansiyel moleküleri hedeflemektedir.[25]

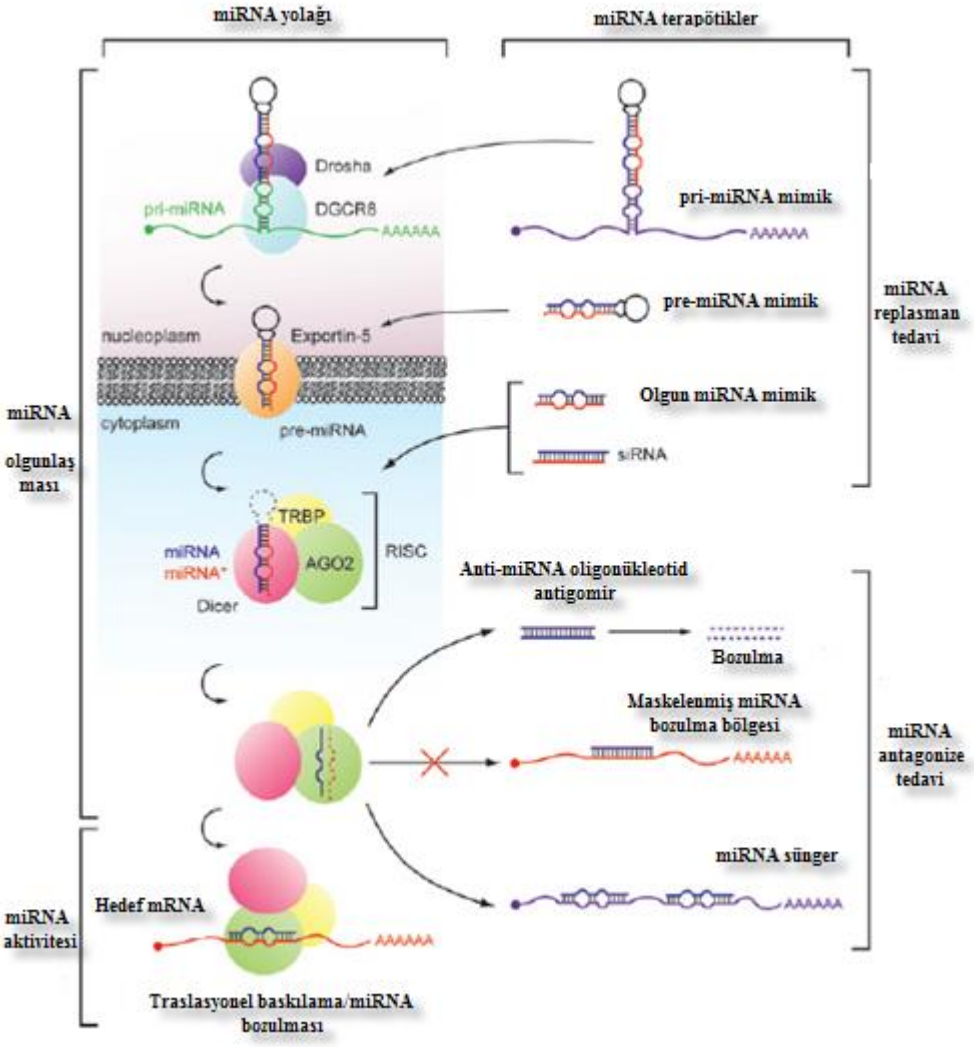
miRNA Tabanlı Tedavi Stratejileri

miRNA'lar küçük endojen RNA interferans RNAi efektörleridir. Genel olarak miRNA'lar RNA Pol II (RNA polymerase II) ile transkripte olan uzun pri-miRNA (primer-miRNA) transkriptinden türemektedir. Pri-miRNA transkripti aşamalı olarak önce enzim Drosha tarafından (çekirdekte) ve daha sonra Dicer tarafından (sitoplazmada) sırasıyla pre-miRNA (precursor-miRNA) saç tokası formu ve olgun miRNA türlerini meydana getirilir. Olgun miRNA'lar RNA-bağlı susturma kompleksine (RISC) bağlanarak ilişkili oldukları komplementer mRNA'yı klevaja uğratırlar. Her miRNA birden fazla mRNA hedeflerine bağlanabilir. Benzer şekilde, her mRNA'nın 3 'UTR bölgesi birden çok miRNA bağlanma bölgelerini içerir. Sonuç olarak miRNA'lar, ilgili fonksiyonları ile transkriptleri düzenleyerek gen ekspresyonunun ana düzenleyicileri olarak hareket edebilmektedirler ve bu özellikleri onları potansiyel farmakolojik hedefler haline getirmektedir [4-26] (Şekil 2).



Şekil 2. miRNA biyogenezi [27]

Hastalık oluşumunda etken faktör olan miRNA'nın faaliyeti durumunda antagonize miRNA aktivitesi tercih edilir. Bu iki geniş kategoriye ayrılır; küçük oligonükleotid miRNA inhibitörleri ve ekspresse miRNA süngerler. Bunun yerine, miRNA replasman tedavisi, endojen koruyucu yolağın düzenlenmesi ya da bir miRNA eksikliğinin giderilmesi için kullanılabilir [26] (Şekil 3).



Şekil 3. miRNA yolağı ve terapötik hedefler [28]

Antagonize miRNA Aktivitesi

miRNA aracılı gen düzenlenmesinin tümör oluşumu ve metastaz gibi süreçleri kapsadığı bilinmektedir bu yüzden son dönemde kanserin tedavisinde miRNA'nın engellenmesi umut verici bir uygulama olmaya başlamıştır. Anti-miRNA teknolojisi olarak en gelişmiş miRNA tabanlı tedavi yaklaşımı anti-miRNA oligonukleotidlerinin (ASO) kullanıldığı yaklaşımdır. ASO, hedef miRNA'yı ayıran ya da degrade ederek fonksiyon gösteren bir hedef miRNA'nın reverse tamamlayıcı dizisinden oluşan tek iplikli oligonükleotidlerdir. Alternatif olarak tamamlayıcı oligonükleotidler, hedef mRNA'ları özel bağlanma bölgelerinden miRNA'ya bağlanarak bloke ederler. Bu hedef maskeleme stratejisi, spesifik miRNA mRNA etkileşiminin engellenmesine izin verir.[26] Şu anda anti-miRNA tedavisi klinik deneme aşamasında olan ve HCV ve buna bağlı gelişen komplikasyonların tedavisinde kullanılması amaçlanan "miravirsen" ile uygulanmaktadır. miR-122 HCV'nin yaşam döngüsünde önemli bir role sahip karaciğer spesifik miRNA'dır. Miravirsen, olgun mir-122'de tamamlayıcı bir DNA fosforotioat

dizisi boyunca aralıklı locled nucleic acid (LNAs)'den oluşmaktadır. LNA modifikasyonları nükleaz bozulmalarında direnç ve onların hedefleri için yüksek afiniteye sahip ilaç sağlar. Miravirsen, olgun miRNA ve HCV RNA ile etkileşiminin yanı sıra pri ve pre miR-122'nin de bulunduğu hedef dizileri bloke ettiği düşünülmektedir. 2011–2012 yıllarında bir faz 2a çalışmasında, HCV genotip 1 ile infekte hastalara 5 hafta süre ile miravirsen enjekte edilmiş ve HCV RNA seviyesinde sürekli ve doza bağlı azalma gözlemlenmiştir.[28]

ASO'nun etkileri, efektör moleküllerin varlığına bağlı olarak geçicidir. Bu yüzden eksprese miRNA süngerler uzun vadeli olarak miRNA'nın engellenmesi için geliştirilmiştir. Bu yöntemde hedef dizilerin multiple kopyaları klonlanır ve bir tümör hücresine transfeksiyonu ile onların doğal hedefleri azaltılır. Göğüs kanseri hücre hatlarında, bir miRNA süngerin, kanser metastazına bağlı azalan miR-9'u yakalayarak tümör hücrelerinin yayılmasını etkili şekilde azalttığı gösterilmiştir[9].

miRNA Replasman Tedavisi

miRNA mimikler, endojen miRNA'ların fonksiyonunu taklit eden sentetik ya da eksprese oligonükleotidlerdir. miRNA mimikler potansiyel anti-kanser terapötikleridir. Örneğin eksprese miR-26a Mimik'in adenovirüs-aracılı dağıtımında murin bir hepatoselüler karsinoma modelinde tümör progresyonunun önlendiği gösterilmiştir. Birçok kanser türüyle ilişkisi bulunmuş diğer bir miRNA, mir-34'dür. Mimik miR-34'ün transfeksiyon veya lentiviral aracılı teslim yoluyla, kanser hücrelerinde hücre döngüsünü durdurması ile apoptoz ve tümör boyutunda bir azalma gözlemlenmiştir.[9-26]

Avrupa'da ve ABD'de, miRNA bağlı patentlerde büyük bir artış gözlenmektedir. Birçok miRNA bazlı terapötikler preklinik ve klinik deneme aşamasındadır. Kanser tedavisinde, miR-34 (faz I) ve let-7 (preklinik) mimik teröpatikler olarak geliştirilen miRNA'lardır.[9]

siRNA Tabanlı Tedavi Stratejileri

RNAi çoğu ökaryotik hücrelerde transkripsiyon sonrası gen susmasına neden olan son derece etkili düzenleyici süreçlerdir. RNAi, siRNA tarafından tetiklenir. siRNA 19-21 nükleotid uzunluğunda bir sentetik çift iplikli RNA'dır. siRNA, RNA aracılı indüklenen susturma kompleksi (RISC)'ne bağlanır ve RISC'in klavuzluğunda hedef komplementer mRNA'ya dizi spesifik olarak bağlanır ve kompleks içerisinde yer alan endonükleazlar ile onu sonrasında küçük fragmentlere böler. Klevaja uğrayan mRNA daha sonra house-keeping endonükleazlarla sindirilerek hücreden temizlenir. Sonuçta ilgili protein sentezi post transkripsiyon aşamasında durdurulmuş (susturulmuş) olur.

Son zamanda araştırmacılar viral infeksiyonlar ve kanser gibi çeşitli hastalık hedeflerinin tedavisi için siRNA terapötiklerini geliştirmeyi amaçlamaktadır. Gen tedavisinde siRNA'nın başarılı bir şekilde kullanılabilmesi için birçok iletim/teslim vektörleri tasarlanmıştır. Adenovirüs ve Retrovirüs gibi viral vektörler kullanılarak özellikle kanser gen tedavisinde başarı elde edilmiş olmasına rağmen istenmeyen immünojenik cevapları uyarması, onkojenik etkisi, yüksek maliyet ve benzeri bir dizi dezavantaj getirerek büyük ölçüde terapötik uygulamaları sınırlandırmaktadır. Buna karşın her ne kadar viral olmayan vektörler önemli ölçüde daha az etkili olsa da onların azalmış immünojeniklikleri güvenlik sorunlarını azaltabilmelerinin yanı sıra iyi tanımlanmış fiziksel ve kimyasal bileşimleri onları hedef gen dağıtımı için gelecek vaat eden adaylar yapmaktadır.[29]

Bugüne kadar viral akciğer infeksiyonlarının tedavisinde, siRNA temelli tedaviler de dâhil olmak üzere klinik araştırmaların erken evrelerinde 30'un üzerinde aday RNAi bulunmaktadır. Bu klinik çalışmalar RNAi terapötiklerin genel olarak güvenli, iyi tolere edilen ve bazı umut verici terapötik etkinliklerinin olduğunu ortaya koymuştur. Örnek olarak AIN-RSV01, Respiratuvar Sinsitiyal Virüs (RSV) nükleokapsid proteinini hedefleyerek RSV

infeksiyonunun tedavisi için kullanılmış bir aday siRNA'dır.[30]

Uzun ncRNA'ların Tedavi Stratejileri Geliştirilmesindeki Yeri

Gen ekspresyonunu düzenlenmesindeki merkezi rollerinden dolayı, lncRNA'lar potansiyel terapötik hedefler olmuşlardır.[2] Birçok hedefleme stratejileri miRNA'lar için geliştirilmiş olsa da lncRNA'lar için bu stratejiler halen geliştirilmeye çalışılmaktadır. Yapısal ve fonksiyonel bir biçimde lncRNA'rı bozmak ya da ekspresyon seviyelerine düşürmek için hedef lncRNA molekülü tasarlamada prensip olarak miRNA ile aynı strateji kullanılabilir.[9]

RNAi tabanlı teknikler kanser hücrelerinde lncRNA'rı engellemede popüler yöntem olarak kabul edilmektedir.[2] lncRNA inaktivasyonu küçük molekül inhibitörleri ile aktif bölgenin engellenmesi yoluyla da mümkündür. Bunu yapabilmek için molekül fonksiyonlarını bilmemiz gerekir ancak birçok lncRNA için bu hala mümkün değildir. Kanserde bozulmuş lncRNA seviyelerini tersine çevirmek için replasman tedavisi de bir seçenektir. Dağıtımın bazı stratejileri araştırılmaktadır. Tümörlerde lncRNA H19 spesifik ekspresyonun kullanımı bir plazmid dağıtım yoluyla incelenmiştir. H19 promotörün düzenlenmesinde difteri toksinin A alt birimi için gen taşıyan plazmidin intratümöral taşınması difteri toksininin yüksek ekspresyonunu indükler bu da tümör boyutunun azalması ile sonuçlanır.[9]

ASO, kısa tek sarmallı RNA ya da hedef lncRNA'a spesifik bir sekansla tasarlanmış RNA'lardır. ASO'lar lncRNA'nın klavajı ile sonuçlanan endojen RNase H1 ve baz eşleşmesi aracılığıyla lncRNA transkripte direkt hibridize olur ve daha sonra oluşan hibritleri tanır. ASO'lar lncRNA transkriptlerinin azaltılması yoluyla lncRNA fonksiyonunu düzenler. ASO tarafından MALAT1'in engellenmesi ile servikal kanser hücrelerinde çeşitli malign fenotiplerinin azaldığı gösterilmiştir. Farelerde deri altı tümörlerine ASO injeksiyonu in vivo olarak MALAT1'i etkili şekilde baskılar ve akciğer kanseri hücrelerinde metastazı engeller.[2]

Bu yöntemler dışında siRNA'lar in vitro ve in vivo olarak antikanser etkileri indükler ve kanser hücrelerinde birçok onkojenik lncRNA'yı etkili şekilde yok eder. Örneğin HULC ve MALAT1 siRNA aracılı yok edilmesinde HCC hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü progresyonu baskılamaktadır. Dahası H19'un siRNA aracılı yok edilmesi apoptozu uyarır ve p53'ü inaktive eder.[31]

ncRNA'larla yapılan çalışmalar insan genomunun kodlayıcı olmayan kısmının önemini ortaya koymuştur. Tüm ncRNA'nın sadece küçük bir kısmı iyi karakterize edilmiştir. Araştırmalar onların kanser başlangıcı, ilerlemesi ve metastazda önemli rollerinin olduğunu gösterilmiştir. Kanser ve diğer hastalıklarda ekspersyon profillerinin ayrıntılı incelenmesi hastalıkların tanısını ve prognozunu artıracaktır. Ayrıca ncRNA'rının teröpatik potansiyelleri gelecekte yapılacak olan daha fonksiyonel ve yapısal çalışmalarla ayrıntılı olarak gösterilmesi şuan tedavisi bulunmayan ya da zor olan hastalıkların ortadan kaldırılmasını mümkün kılacaktır.

Kaynaklar

1. Gan L, X Midie, Z Yi, Z Xia, G Weijian. Focusing on long noncoding RNA dysregulation in gastric cancer. *Tumor Biol* 2015;36:129–141.
2. Meseure D, Alsibai KD, Nicolas A, Bieche I and Morillon A. Long noncoding RNAs as new architects in cancer epigenetics, prognostic biomarkers, and potential therapeutic targets. *BioMed Research International* 2015:14
3. J.M. Perkel. Visiting 'noncodarnia'. *BioTechniques* 2013;54(6):301–304.
4. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. "Non-coding RNAs: regulators of disease." *J Pathol* 2010;220(2):126-139.
5. Peng Qi, Xiang Du. The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine. *Modern Pathology* 2013;26:155–165.

6. Lares MR, Rossi JJ, Ouellet DL. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. *Trends Biotechnol* 2010;28(11):570-579.
7. Hrdlickova B, de Almeida RC, Borek Z, Withoff S. "Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease". *Biochim Biophys Acta* 2014;1842(10):1910-1922.
8. Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2011;12:246-258.
9. Hauptman N, Glavac D. MicroRNAs and long non-coding RNAs: prospects in diagnostics and therapy of cancer. *Radiol Oncol* 2013;47(4):311-318.
10. Mattick JS ve Makunin IV. Small regulatory RNAs in mammals. *Human Molecular Genetics* 2005;14(1):121-132.
11. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi* 2011;38(1):113-120.
12. Takamizawa, J, Konishi, H, Yanagisawa, K, Tomida, S, Osada, H, Endoh, H, Harano, T, Yatabe, Y, Nagino, M, Nimura, Y. et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004;64(11):3753-3756
13. Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med,* 2010;363(19):1877.
14. Kim J, Bartel D. Allelic imbalance sequencing reveals that single-nucleotide polymorphisms frequently alter microRNAdirected repression. *Nat Biotechnol* 2009;27(5):472-477.
15. Gloss BS, Dinger ME. The specificity of long noncoding RNA expression, BBA - gene regulatory mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859(1):16-22
16. Hydbring P, Badalian-Very G. "Clinical applications of microRNAs".Version 3. F1000Res. 2013;2:136.
17. Huang Z, Huang D, Ni SJA, Peng ZL, Sheng WQ, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010;127(1):118-126.
18. Oksuz Z, Serin MS, Kaplan E, Dogen A, Tezcan S, Aslan G, Emekdas G, Sezgin O, Altintas E, Tiftik EN. Serum microRNAs; miR-30c-5p, miR-223-3p, miR-302c-3p and miR-17-5p could be used as novel non-invasive biomarkers for HCV-positive cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2015;42(3):713-720.
19. Giray BG, Emekdas G, Tezcan S, Ulger M, Serin MS, Sezgin O, Altintas E, Tiftik EN. Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2014;41(7):4513-4519.
20. Hu YB, Li CB, Song N, Zou1 Y, Chen SD, Ren RJ and Wang G. Diagnostic value of microRNA for alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2016;8(13):1-9.
21. Wong, LL, Wang J, Liew OW, Richards AM and Chen YT. MicroRNA and Heart Failure. *Int. J Mol Sci* 2016;17(4):1-31.
22. Yuan SX, Yang F, Yang Y et al. Long noncoding RNA associated with microvascular invasion in hepatocellular carcinoma promotes angiogenesis and serves as a predictor for hepatocellular carcinoma patients' poor recurrence-free survival after hepatectomy. *Hepatology* 2012;56(6):2231–2241.
23. Yang J, Lin J, Liu T et al. Analysis of lncRNA expression profiles in non-small cell lung cancers (NSCLC) and their clinical subtypes. *Lung Cancer* 2014;85(2):110–115.
24. Kraus TF, Haider M, Spanner J, Steinmaurer M, Dietinger V, Kretzschmar HA. Altered long noncoding RNA expression precedes the course of parkinson's disease-a preliminary report. *Mol Neurobiol* 2016:1-9 [Epub ahead of print]
25. Research and markets. RNA (miRNA, RNAi & siRNA) therapy in oncology drug pipeline update 2014, Erişim: http://www.researchandmarkets.com/reports/2191815/. (Erişim tarihi: 10.05.2016).
26. Roberts TC and Wood MJA. Therapeutic targeting of non-coding RNAs. *Essays Biochem* 2013;(54):127–145.

27. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* 2009;11: 228–34.
28. van der Ree MH, van der Meer AJ, van Nuenen AC, de Bruijne J, Ottosen S, Janssen HL, Kootstra NA, Reesink HW. Miravirsen dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment Pharmacol Ther* 2016;43(1):102-113.
29. Zhi D, Zhao Y, Cui S, Chen H, Zhang S. Conjugates of small targeting molecules to non-viral vectors for the mediation of siRNA. *Acta Biomater* 2016;36:21-41.
30. Man DK, Chow MY, Casettari L, Gonzalez-Juarrero M, Lam JK. Potential and development of inhaled RNAi therapeutics for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2016 Apr 22 [Epub ahead of print]
31. T. Gutschner, M. H¨ammerle, and S. Diederichs, MALAT1—a paradigm for long noncoding RNA function in cancer. *Journal of Molecular Medicine* 2013;91(7):791–801.