

Kanserde miRNA'ların Epigenetik Değişiklikleri ve Terapötik Uygulamaları

İlknur ÇINAR^{1*} Sümeyra ÇETİNKAYA¹ H.Gül DURSUN¹

¹Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Konya

*Sorumlu Yazar:

E-posta:ilknurcinar@msn.com

Geliş Tarihi: 10 Şubat 2016

Kabul Tarihi: 18 Mart 2016

Özet

Epigenetik, DNA dizisinde bir değişiklik olmaksızın gen ifadesindeki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. DNA metilasyonu gen ifadesinin hücre kontrolünde yer alırken, histon modifikasyonları da hücredeki transkripsiyonel aktivite ve kromatin yapıya ulaşılabilirlik kontrolünde fonksiyon göstermektedir. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmaların ayrıca miRNA'ların ifade sinidedüzenlediği belirlenmiştir. miRNA'lar hedef genlerinin ifadesini negatif yönde kontrol edebilenyaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda küçük RNA molekülleridir. miRNA ya da epigenetik mekanizmalarda ki tümör-ilişkili anomaliler insan kanserlerinde yaygın olarak saptanmaktadır. Bu derlemede kanserde disregüle olan miRNA ve epigenetik mekanizmaların ilişkisi ve kanser terapisine yönelik miRNA'lar tanımlanmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, kanser terapi, epigenetik, miRNA

Epigenetic Changes and Therapeutic Applications of miRNAs in Cancer

Abstract

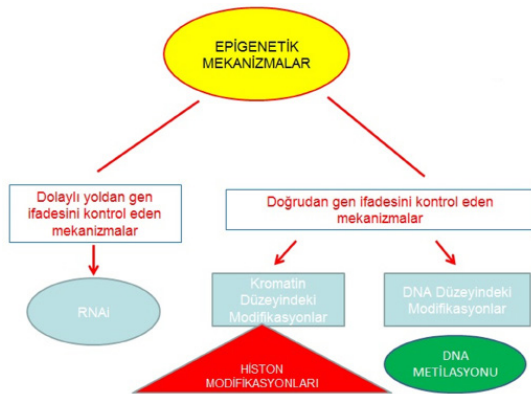
Epigenetics is identify as heritable changes in gene expression that do not appear a change in the DNA sequence. While DNA methylation involve in the control of cellular gene expression, histone modification function transcriptional activity in the cell and control the accessibility of chromatin structure. Epigenetic mechanisms such as DNA metylation and histone modifications also were determined that regulate the expressions of miRNAs. miRNAs are small RNA moleculesapproximately 22 nucleotide long that can negatively control their target genes expression.tumor-associated aberrations in the miRNA or epigenetic machineries are widely determined in human cancer. In this reviewhave been tried to define disregulated miRNA and epigenetic machineries relation between in cancer and miRNAs to cancer therapy.

Keywords: Cancer, cancer therapy, epigenetic, miRNA

GİRİŞ

Epigenetik nedir?

DNA dizisinden bağımsız olarak gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikler epigenetik olarak adlandırılır [1]. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gen regülasyonu, gelişim ve karsinogenezde önemli role sahip iki önemli epigenetik mekanizmadır [2]. Her iki düzenlemede DNA metil transferazlar ve MBDs (Methyl-CpG-binding domain) proteinlerle ilişkili olan histon deasetilazlarla sıkı işbirliği halindedir. Birçok durumda her iki epigenetik mekanizma birlikte çalışır [3] [Şekil 1].



Şekil 1. Epigenetik mekanizmalar

Doğrudan Gen İfadesini Kontrol Eden Epigenetik Mekanizmalar

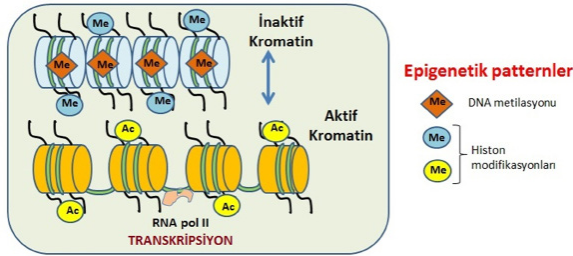
DNA Metilasyonu

Memeli hücrelerinde DNA metilasyonu imprint genler, X-kromozomu inaktivasyonu ve dokuya özgü genlerin ekspresyon patterni 'nin korunmasında rol oynayan normal bir süreçtir [4]. DNA metilasyonu CpG dinükleotidlerindeki sitozinin DNMT (DNA metil transferaz) enzimi aracılığıyla gerçekleşir. CpG yönünden yoğun olmayan bölgeler genom üzerinde dağınık yerleşim gösterirken, zengin bölgeler CpG adacıkları olarak tanımlanır. Metillenmiş sitozinin mutajeniteye daha açık olmasından kaynaklı genomun büyük bir kısmı CpG dinükleotidlerinin azlığını tercih eder [1].

Yaşlanma sırasında CpG adacıklarında genel bir metilasyon kaybına neden olan matilasyon patternindeki aşamalı geri dönüşüm özellikle karsinogenez sürecinde göze çarpan bir durumdur. Özellikle bazı tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına neden olan anormal DNA metilasyonu en fazla kanser vakalarında görülür [5]. Günümüzde bilinen 5 insan DNMT'si vardır. Bunlar; DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L'dir. DNA metilasyonunun gerçekleşmesinde üç büyük DNMT enzim ailesi yer alır. Ökaryotlarda DNA metiltransferazlar fonksiyonlarına göre farklı iki grupta toplanmıştır: DNMT3A ve 3B de nova, DNMT1 ise idame metil transferazlar olarak tanımlanır. Bunlar metillenmemiş DNA'yı substrat olarak kullanır. DNA metilasyonu, gen ifadesi sessizleştirilerek inaktif heterokromatin formunun ortaya çıkması sağlanır [2].

Histon Modifikasyonları

DNA'nın paketlenmesinde görevli olan histon proteinlerinin özellikle amino-terminal kuyrukları nükleozomdan çıkıntılar yapar. Post-transkripsiyonel değişikliklere uğrayarak gen ekspresyonunun kontrolünde yer alan bu epigenetik mekanizmalar histon modifikasyonları olarak tanımlanır. Bu modifikasyonlar arasında; HAT (histon asetil transferaz) ve HMT (histon metil transferaz)'ler yer almaktadır. HAT asetillenme, HMT metillenme mekanizmalarından sorumludur [6]. Histon asetilasyonu aktif gen transkripsiyonuyla ilişkiliyken, H3 lizin 9 metilasyonu gibi belli histon modifikasyonları inaktif ve yoğunlaşmış kromatinin göstergesidir [7]. DNA metiltransferazların kompleks bir ağ içerisinde histon deasetilazlar (HDAC), histon metil transferazlar ve metillenmiş-sitozine bağlanan protein'ler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [8](Şekil 2). Kanserinde yer aldığı çeşitli hastalıklar ile DNA hipermetilasyonu gibi anormal epigenetik değişiklikler arasındaki ilişki yapılan çalışmalarla daha açık hale gelmektedir [1].



Şekil 2. Aktif ve inaktif kromatin patternleri

Dolaylı Yoldan Gen İfadesini Kontrol Eden Mekanizmalar

RNAi (RNA interferansı):

Son yıllarda yapılan çalışmalarla kodlamayan RNA (non-coding RNA) olarak tanımlanan küçük RNA moleküllerinin epigenetik mekanizmalarda yer aldığı gösterilmiştir. RNA interferansı olarak bilinen, post-transkripsiyonel ve post-translasyonel susturmada fonksiyon gösteren RNA'lar arasında miRNA (micro RNA), siRNA (small-interfering RNA), X kromozomu inaktivasyonundan sorumlu olan XIST RNA sayılabilir [9]. Yapılan çalışmalarla DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmaların yalnızca protein kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenlemekle kalmayıp aynı zamanda miRNA'ların da ekspresyonunu etkilediğini ortaya koymuştur. miRNA'larda protein kodlayan genler gibi aynı epigenetik süreçlerden geçmeler [10].

Epigenetik Olarak Düzenlenen miRNA'lar

miRNA genlerinin yaklaşık yarısı CpG adacıklarıyla ilişkilidir ve bu nedenle ekspresyonları metilasyon mekanizması aracılığıyla düzenlenir [11]. Elde edilen bulgular ışığında 100'den fazla miRNA'nın epigenetik mekanizmalar aracılığıyla düzenlendiği ve yaklaşık yarısının 20'den fazla tümör tipinde kansere spesifik metile oldukları belirlenmiştir [12]. miRNA'lar HDAC ya da polycomb repressör kompleksleri (PRC1 ya da PRC2) gibi spesifik epigenetik düzenleyicilerin anormal ekspresyonunun bir sonucu olarak dereğüle olabilir. Polycomb grubu proteinler gelişim ve farklılaşma esnasında görülen soy seçimini düzenleyen transkripsiyonel baskılayıcılardır. PRC1 ve PRC2 olmak üzere iki polycomb baskılayıcı kompleksi (PRCs) mevcuttur. PRC1; Cbx, Mph, Ring, Bmi-1 ve Me118 birimleriyle

şekillendirilirken, PRC2; Ezh2, Suz12 ve Eed alt ünitelerinden oluşmaktadır [13](Şekil 3).



Şekil 3. PRC1 ve PRC2'nin alt üniteleri

Epigenetik Mekanizmalar Aracılığıyla Ekspresyonlarının Düzenlendiği Belirlenen Bazı miRNA'lar ve İlişkili Olduğu Kanseller

miR-9

miR-9, CpG adacıklarıyla ilişkili üç genomik bölgeden sentezlenir (miR-9-1, miR-9-2, miR-9-3). İn vitro çalışmalar ksenoöstrojen maruziyetinin miR-9 lokusunda anormal epigenetik patternleri uyarabileceğini göstermiştir [14]. miR-9 lokusunun epigenetik olarak susturulması meme kanserogenezinin erken bulgusu olarak belirlenmiştir. Olgun miR-9 farklı birçok kanser kanserde aşırı eksprese olan NF-kB (nüklear faktör kappa B)'yi hedefler [15]. miR-9 lokusunun hipermetilasyonu meme, kolon, baş-boyun, melanom ve akut lenfoblastik lösemisinin yer aldığı çeşitli malign dokularda gözlemlenmiştir [16].

miR-34 (a and b/c)

miR-34'ün üç ayrı lokustaki genlerinin ekspresyonu miR-34 'ün toplam seviyesini yansıtmaktadır (miR-34a, miR-34b, miR-34c). miR-34a monosistronik olup, 34b/c polisistroniktir. Her iki lokusta p53 bağlanma bölgelerinde yer alır ve p53 sinyaliyle düzenlenir [17]. Olgun miR-34; hücre siklusu, onkogen ve kanser metastazıyla ilişkili MYC, CDK4 (Cyclin-dependent kinases-4), CDK6 (Cyclin-dependent kinases-6), E2F3, CREB (cAMP response element-binding protein) ve MET gibi çeşitli genleri hedefler. miR-34 türlerinin ektopik ekspresyonu bu hedef genleri susturarak hücre siklusunun durdurulmasını ve apoptozu uyarırken; hücre büyümesi ve metastazı baskılamaktadır [18].

miR-124

Birçok çalışmada yetişkin beyinde en fazla bulunan miRNA türünün miR-124 olduğu belirlenmiştir. Bu durum miR-124'ün nörogenezde kilit bir rol oynadığını göstermektedir [19]. miR-124 lokusunun (miR-124-1-2-3) epigenetik olarak sessizleşmesi sadece beyin tümörlerinde değil kolon (%75), meme(32-50%), akciğer (48%), lösemi (36%), lenfoma (42%) gibi birçok kanser türünde sıklıkla gözlenmektedir (18). Olgun miR-124'ün hedefi bir onkogen olan CDK6'dır. miR-124 lokusu prekanseröz lezyonlarda da hipermetile durumdadır [20].

miR-137

İntergenik bir miRNA olan miR-137 fizyolojik olarak miR-124'ün analogu olup CDK6'yı hedefleyerek nörogenezde yer alır [21]. CpG adacığı spesifik olarak kanser dokularında hipermetile durumdadır. Kanser hücrelerinde miR-137'nin aşırı ekspresyonu hücre siklusunu G1 noktasında durdurur ve apoptozu uyarır [22].

miR-148

Metastatik kanser hücre hatlarında kanser metaztaziyla ilişkili olduğu belirlenen üç miRNA'dan biri miR-148'dir [23]. miR-148 lokusunun metastazın görüldüğü kanser dokularında, metastaza uğramayanlara göre daha yüksek seviyede metillendiği belirlenmiştir. TGIF2 (TGF(Beta)-Induced Transcription Factor 2)'yi hedefleyen miR-148, malign over kanserlerinde aşırı eksprese edildiğinden dolayı miR-148'in epigenetik olarak susturulmasının TGIF2 aktivasyonunu arttırması öngörülmektedir [24].

Let-7a-3

Let-7 ailesi tümör suppressör miRNA'lar içerisinde tanımlanmasına rağmen, let-7a-3 onkogenik fonksiyon gösteren miRNA'lardandır [25]. Let-7a-3 bölgesi normal dokularda genellikle metile olup, kolon ve akciğer kanseri gibi bazı kanser tiplerinde hipometile durumdadır [26]. Ayrıca over kanserinde let-7a-3 metilasyon seviyesi olgun let-7a-3 seviyesiyle ilişkilidir. Let-7a-3'ün A549 akciğer adenokarsinom hücre hattına girerek hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneğini arttırdığı belirlenmiştir [27].

miRNA'ların Epigenetik Fonksiyonu

miRNA'lar spesifik epigenetik fonksiyonlara sahiptir. Bu fonksiyonlarına göre ilk olarak miRNA'ların bir alt kümesinin DNA metil transferazların, HDAC ve PRC grubu genlerin yer aldığı önemli epigenetik düzenleyicilerin ekspresyonunu kontrol ettiği belirlenmiştir. Epi-miRNA olarak bilinen bu miRNA'ların ekspresyonu birçok hücrel yolak ve sürecin epigenetik düzenlenmesinde önemli sonuçlara neden olur. İkinci olarak son zamanlardaki bulgularla genomik DNA'ya ve özellikle ilişkili olduğu genlerin ekspresyonunu kontrol eden bazı promotorlara spesifik protein komplekslerin toplanmasıyla miRNA'ların doğrudan epigenetik fonksiyonlara sahip olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle miRNA ve epigenetik yolaklar kompleks bir düzenleyici döngü içerisinde ortaya çıkmaktadır. Bu döngünün bozulumu kanserinde yer aldığı birçok hastalığın oluşumuna neden olur [10].

Epi-miRNA'lar

DNA metiltransferaz, HDAC ya da PRC'lerin bileşenleri gibi spesifik epigenetik regülatörleri hedefleyerek epigenetik mekanizmalarda yer alabilen miRNA'lar epi-miRNA olarak

tanımlanmaktadır. Akciğer kanseri hücre hatlarında DNMT3A ve DNMT3B gibi DNA metiltransferazları doğrudan hedef alan miR-29 ailesi tanımlanan ilk Epi-miRNA'lardır. Kanser hücrelerindeki miR-29'un yeniden eksprese olması DNA metiltransferaz aktivitesinin inhibisyonu, susturulmuş tümör baskılayıcıların yeniden aktive olması ve tümör büyümesinin inhibisyonu ile sonuçlandığı belirlenmiştir [28].

Bazı miRNA'ların ise doğrudan histon düzenleyicileri hedef aldığı belirlenmiştir. Bu durum gen transkripsiyonunun epigenetik düzenlemesi için daha fazla regülatör kompleksin varlığını göstermektedir [29].

miRNA'lar Aracılığıyla Doğrudan Epigenetik Düzenleme

Son zamanlardaki bulgularla sitoplazmadaki hedef mRNA'ların translasyonunun düzenlenmesi yanında kromatin remodelleme kompleksleri ve genom arasındaki kritik bir arayüz olarak fonksiyon gösteren endojen miRNA'ların transkripsiyonel seviyesinin nukleustaki gen ekspresyonunu doğrudan etkileyebileceği belirlenmiştir. Daha önceleri promotor bölgeye göre eşleniklik gösteren eksojen small interfering RNA'lar heterokromatin yapının oluşumunu ve transkripsiyonel gen susturulmasını (TGS) uyardırmada kullanılmaktaydı[30]. miRNA düzenlenmesindeki rolünden dolayı iyi bilinen TGS'ye Ago proteinleri aracılık etmektedir ve memeli gen promotorları miRNA hedef bölgeleri için spesifiklik göstermektedir buna dayanarak miRNA'nın doğrudan promotor aktivitesini düzenleyebileceği ileri sürülebilir [31].

miRNA'ların spesifik genlerin promotor bölgelerini hedefleyerek gen ekspresyonunu doğrudan düzenleyebileceği öncü çalışmalardan elde edilen ilk kanıtlar ile ortaya konmuştur [32]. miR-373'ün E-kaderin ve Csd2 promotorlarında spesifik bir diziyi tanıdığı ve bu genlerdeki RNA polimerazın bağlanmasını ve transkripsiyonel olarak aktif hale gelmesini uyardığı belirlenmiştir. Diğer bir yandan miR-320 antisens yöndeki Polr3d 'nin promotörü içinde kodlandığı ve olgun miRNA Ago 1 proteini ve polr3d promotorundaki PRC2 bileşeni Ezh2 toplanmasını yönlendirebildiği bu durumda H3K27 tri-metilasyonu ve transkripsiyonel susturmayla sonuçlandığı ortaya konmuştur[33].

Çizelge 1.Epigenetik mekanizmayı düzenleyen bazı efektör epi-miRNA'lar

miRNA	Hedefi	Kanser yada doku
miR-29a/b/c	DNMT3a, DNMT3b, DNMT1, YY1	Akciğer, AML
miR-101	Ezh2	Prostat, mesane
miR-128	Bmi1	Glioma, pankreatik ve kolorektal kanser
miR-148a/b	DNMT3b, DNMT1	Servikal
miR-152	DNMT1	Endometrial, karaciğer
miR-185	DNMT1	Glioama
miR-200a,b	Suz12, Sirt1, HDAC4	Karaciğer tümörleri
miR-203	Bmi1	Pankreatik ve kolorektal kanser hücreleri
miR-214	Ezh2	İskelet kası ve embriyonik kök hücreler
miR-449a	HDAC1	Prostatik

miRNA'lar Aracılığıyla Düzenlenen Epigenetik Yolak-İlişkili Genler

miRNA'ların kendisi epigenetik yolakları kontrol eden genleri hedefleyebilir. Çeşitli miRNA'lar polycomb grubuyla ilişkili genleri ve histon deasetilaz (HDAC) gibi histon modifiye edici molekülleri düzenleyerek kromatin yapısını kontrol edebileceği belirlenmiştir [18].

Bu nedenle bazı epigenetik mediatörler ve onları düzenleyen miRNA'lar daha detaylı olarak anlatılmaya çalışılacaktır.

EZH2 Geni

PRC2'nin korunmuş katalitik bir alt grubu olan EZH2'nin ekspresyon seviyesi normal dokulara göre kanserde artış göstermektedir. En yüksek EZH2 seviyesinin ilerlemiş hastalık evresi ve kötü prognozla ilişkili olduğu belirlenmiştir. EZH2'nin aşırı ekspresyonunun diğer bir mekanizması da miRNA'lar aracılığıyla post transkripsiyonel olarak düzenleniyor oluşudur. EZH2 ekspresyonu miR-26a, miR-101, miR-205 ve miR-214 ile kontrol edilir. Bu miRNA'ların kansere spesifik down-regülasyonunun EZH2'nin aşırı ekspresyonuyla sonuçlandığı gösterilmiştir [34].

Bmi-1

miR-203'ün Bmi-1'i hedeflediği ve miRNA'lar aracılığıyla epigenetik düzenleyicilerin EMT mekanizmalarında yer aldığı belirlenmiştir [29]. PRC1'in alt ünitesi olan Bmi-1 genin susturulmasında önemli bir rol oynar ve küçük hücreli olmayan akciğer ve kolorektal kanserin yer aldığı birçok kanser türünde aşırı ekspresyona uğradığı belirlenmiştir. Bmi-1'in aşırı ekspresyonu pankreas [35], meme [36], beyin [37] gibi bazı kanser kök hücre tiplerinin kendini yenilemesine yardım ettiği belirlenmiştir.

Yin Yang 1 (YY1)

YY1 embriyogenez, hücre siklusu, apoptoz, inflamasyon, karsinogenez gibi birçok biyolojik süreçte yer alan bir transkripsiyon faktörüdür. YY1 kromatin yeniden modellenmesini uyarmak için genomdaki spesifik bir bölgeye PRC2 ve HDAC'ları toplayan PRC'ye bağlanan bir proteindir (PRC-binding protein). NF-kB aracılı miR-29b/c baskılaması YY1 protein ekspresyonunu yeniden aktifleştirdiği gibi YY1'de miR-29b/c'i baskılayabileceği belirlenmiştir [38].

HDACs

Histonların asetilasyon ve deasetilasyon mekanizmaları hedef genlerin transkripsiyonel düzenlenmesinde görev almaktadır. İnsan hücrelerinde PRC2 fiziksel olarak HDACs 1 ve 2 ile ilişkilidir [39]. HDAC'ların sadece histon proteinleri değil aynı zamanda non-histon proteinlerini de (HDAC1: p53, ve Myo-D; HDAC2: Bcl-6, Stat3 ve YY1) hedeflediği belirlenmiştir. Histon ve non-histon proteinlerin düzenlenmesi hücre çoğalması, apoptoz ve kemoterapi direncinde rol oynamaktadır. HDAC1 ve 2'nin ekspresyonu çeşitli kanser türlerinde artış göstermektedir [40]. Prostat kanserinde HDAC-1 miR-449a'nın doğrudan hedefi olduğu ve miR-449'un downregülasyonunun HDAC-1'in aşırı ekspresyonuna neden olduğu belirlenmiştir [18].

DNMT 3A ve 3B

DNA metilasyonunda DNMT1, 3A ve 3B kilit rol oynayan enzimlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla insan hücrelerinde PRC2 ve DNMT'nin hem fiziksel hemde fonksiyonel olarak bağlantılı olduğu belirlenmiştir [41].

DNMT'lerin disregülasyonu, kanser ve konjenital düzensizlikler gibi çeşitli hastalık süreçleriyle bağlantılıdır. miR-29 ailesi üyelerinin doğrudan DNMT3A ve 3B'yi hedeflediği, eksojen miR-29 türlerinin küçük hücreli olmayan kanser hücrelerindeki normal DNA metilasyon patternlerini tamir ederek metilasyonla susturulmuş tümör baskılayıcı genleri yeniden aktif hale getirebildiği belirlenmiştir [28]. miRNA-epigenetik düzenleyici mekanizma birkez aksaklığa uğrarsa normal fizyolojik olaylar engellenir ve birçok hastalık süreci şekillenmeye başlar. miRNA-epigenetik düzenleyici döngünün disregülasyonu üzerinde yapılacak çalışmalar, hastalıkların moleküler mekanizmalarını anlayabilmemizde oldukça yararlı olacaktır [18].

Kanserde Terapötik Amaçlı miRNA Uygulamaları

Son yıllarda kanser ilaçları tedavisiyle hastaların sağkalım süresi artmış olup, kansere bağlı ölüm oranları azalmıştır. Buna rağmen daha hedefe özgü yeni ilaçların geliştirilmesi gereklidir [42]. Kanserde miRNA'ların tedaviye yönelik uygulamaları henüz yeni olup, malignitenin moleküler mekanizmasını engelleyebilmek adına heyecan verici bir yaklaşımdır. miRNA ile terapi iki farklı yol ile yapılabilir; Bunlar miRNA replasman terapisi ya da miRNA inhibisyonudur.

miRNA Replasmanı

İnsan kanserlerinde miRNA ekspresyonunun azalmasının primer nedenleri arasında miRNA gen lokusunun delesiyonu, miRNA genlerinin promotor bölgesindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonu ile gerçekleşen epigenetik susturma ya da miRNA biyogenezinin/işlenmesinin azalması sayılabilir. Küçük moleküller kullanılarak bu süreçlerin tersine döndürülmesi global miRNA ekspresyon seviyesinin normal değerlere ulaşmasına yardım edebilir. miRNA replasman terapisinde miRNA mimikleri kullanılmaktadır. miRNA mimikleri çift zincirli pre-miRNA'ya benzer yapıya sahip olup, hedef proteinin ifadesini azaltmak için RISC kompleksine yüklenen küçük RNA molekülleridir [43].

Tümör baskılayıcı miRNA'lardaki değişiklikler veya mutasyonlar kanser hücreleri üzerindeki inhibitör etkilerini ortadan kaldırır ve onkogenik aktiviteye katılır. Etkili bir çözüm olarak miRNA mimikleri olarak tanımlanan bu sentetik miRNA benzeri moleküller kullanılarak ortadan kalkan miRNA'ların yerine konulması yoluyla tümör baskılayıcı miRNA'ların normal fonksiyonları onarılır. miRNA mimikleri gastrik kanserde [44], beyin tümöründe [21], akciğer kanseri [45] hücre hatlarında tümörü baskılama veya tümörün tedaviye direncini ortadan kaldırmak için kullanılmıştır [46]. Bu küçük RNA'ların hücre içine verilmesi nanopartiküller, lipozomlar ve viral sistemler gibi etkili taşıyıcılar aracılığıyla gerçekleştirilebilir [43]. İlk miRNA replasman terapisi ileri hepatosellüler karsinomlu hastaların faz 1 klinik denemelerinde lipozom-temelli miR-34 mimiği olan MRX34'ün intravenöz enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir [47].

Başka bir çalışmada da akciğer adenokarsinom hücre hattı olan A549 içerisine let-7 transkripti ederek hücre koloni oluşumunun azaltılabileceği rapor edilmiştir [27]. miR-143 ve miR-145'in KRAS genini hedeflediği bilinmektedir. KRAS mutasyonlu pankreatik kanser hücrelerinde miR-143 ve miR-145'in uyarılmasıyla tümör oluşumunun ciddi düzeyde engellenebileceği belirlenmiştir [48]. ERBB2/3 onkogeni tümör hücrelerinin gelişimi ve invazyonunu uyardığı bilinmektedir. Retroviral vektörler aracılığıyla insan meme kanseri SKBR3 hücreleri içine miR-125a/b'yi transkript edilmiş

olup ve bu yolla ERBB2/3'ün transkripsiyon ve translasyonu engellenebildiği gösterilmiştir [49].

miRNA İnhibisyonu

Terapiye yönelik diğer bir yolda miRNA inhibisyonunun sağlanmasıdır. Bu yöntem ile antagonistleri kullanılarak onkogenik miRNA'ların ifade edimesi engellenmeye çalışılmaktadır. OnkomiR'ler kanser hücrelerinde genellikle aşırı ifade edilir bu nedenle onkomiR inhibisyonu hedefledikleri tümör baskılayıcı genlerin normal fonksiyonlarını yeniden yerine getirebilmelerine katkı sağlayabilir. Tek zincirli, 21-23 nükleotid uzunluğundaki RNA molekülleri olan anti-miRs yada antagomir miRNA antagonistlerinin, hedef miRNA'larla tamamlayıcı eşleşme göstererek miRNA'ların fonksiyonlarını engelleyebileceği belirlenmiştir [50]. miRNA inhibitör ajanları olarak tanımlanan Antisens anti-miR (AMOs-antimiR) oligonükleotidleri, locked nükleik asit (LNA) anti-miRNA'ları, miRNA süngerleri, miRNA maskeleri ve miRNA'ların küçük-moleküllü inhibitörleri prelinik ve klinik araştırmalarla test edilmiştir [47].

Sentetik anti-miRNA oligonükleotidleri (AMOs) yarışmalı inhibitör olarak fonksiyon gösteren, hedef mRNA'yla ilişkili miRNA'yla tamamlayıcı eşleşme gösteren tek-zincirli RNA molekülleridir. Bu moleküller aracılığıyla spesifik miRNA inhibisyonu gerçekleştirilerek, hedef mRNA'nın upregülasyonu sağlanabilir. AMOs moleküllerine farklı 2'-riboz modifikasyonlarının uygulanması (2'-O-metil AMOs ve 2'-O-methoxyethyl) nükleazlara karşı direnç, gelişmiş bağlanma afinitesi ve stabilitesinin sağlanmasına yardımcı olur. 2' modifikasyonu ile birlikte phosohorothioate kısmının ilavesi endonükleazlara karşı direncini, serum stabilitesini ve molekülün hücre alımını arttırdığı belirlenmiştir [51].

Diğer bir modifikasyonda antagomirleri oluşturmak için nükleik asitlerin 3' pozisyonuna fonksiyonel bir kolesterol ilave edilmesidir. Kolesterol modifikasyonu AMOs'ların hücre içine alımını artırır. Farelerde miR-122'ye karşı intravenöz antagomir enjeksiyonu ile endojen miR-122'nin spesifik inhibisyonu ve buna bağlı olarak hedef mRNA'nın upregüle olması sağlanmıştır [52]. Bu etkilerin herhangi bir immün yanıt yada toksisite oluşturmayıp uzun ömürlü (23 günden fazla) olduğu belirlenmiştir. Olgun miR-122'nin hedeflenmiş baskılanması karaciğer, akciğer, böbrek, kalp, intestin, yağ, deri, kemik iliği, kas ve overlerde gözlemlenmiştir [47]. Bir diğer örnekte de metastatik meme kanseri fare modeline sistemik miR-10b antagomir muamelesinin ardından primer tümörde herhangi bir azalma görülmezken meme kanserinin akciğere metastazının efektif olarak baskılandığı belirlenmiştir. miR-10b antagomiri miR-10b seviyesini önemli derecede azaltırken, miR-10b'nin önemli bir hedefi olan Hoxd10'un seviyesini arttırdığı da rapor edilmiştir [53].

Modifiye edilen diğer bir AMOs örneğinde riboz halkasının 2'-O ve 4'-O atomları arasında ekstra bir metilen köprüsü kurularak oluşturulan LNA anti-miR'leridir. Modifiye edilmiş LNA oligonükleotidleri hedef mRNA'larına yüksek afiniteyle bağlanırlar. Bu nedenle daha yüksek termal stabilite ve hedef RNA moleküllerine daha üstün hibridizasyon sergilerler. Ayrıca sulu ortamda daha yüksek çözünürlük ve in vivo aktarımda artmış metabolik stabilite gösterdikleri belirlenmiştir. Afrika yeşil maymunu ve şempanzeleri gibi primat modellerinde miR-122'ye karşı LNA anti-miR'lerinin intravenöz enjeksiyonu kolesterol-konjuge antagomir'lerle karşılaştırıldığında belirgin bir üstünlük sağladığı belirlenmiştir. Bu yolla Karaciğerde

miR-122'nin tamamen ortadan kaldırılmasının hayvanlarda LNA-ilişkili toksisite yada histopatolojik herhangi bir değişikliğe neden olmadığı rapor edilmiştir [54]. Sistemik Ortotopik meme kanseri modelinde intravenöz LNA anti-miR aktarımının yüksek özgüllükle uzun-süreli miRNA susturumuna neden olduğu gösterilmiştir [55].

miRNA süngerleri (sponges) olarak adlandırılan miRNA antagonizmi için yeni bir formasyon rapor edilmiştir. Bunlar endojen bir miRNA için miRNA'ya bağlanan bölgelerin çoklu rastgele tekrarlarından oluşan RNA transkriptleridir. Bu süngerler miRNA'ya karşılık gelen alanı sünger gibi çeker (soak up) yada etkileşime girerek stabil hale gelir bu durum miRNA'nın hedef mRNA'yla etkileşimini önler. Meme kanserli ortotopik fare modelinde bir miRNA süngeri kullanılarak pulmoner mikrometastazın etkinlikle inhibe edildiği belirlenmiştir [56].

Bir gene spesifik geliştirilen anti-miRNA terapilerinden biride miRNA maskeleridir. Bu miRNA maskeleri hedef mRNA'nın 3'UTR'sindeki miRNA bağlanma bölgelerine tamamen komplementer olan tek zincirli, 5' ve 3' uçları kapatılmış 2'-O-metil'den modifiye edilmiş antisens oligonükleotidlerden oluşmaktadır. Bu moleküller endojen miRNA'lardan gelen hedef mRNA'ları maskeleyerek mRNA'ların translasyonel olarak baskılanmasını önledikleri belirlenmiştir. Bir zebra balığı modelinde uygulanan bu molekül TGF- β yolağı üzerinde miR-430'un aktivitesini kaldırmada oldukça başarılı olmuştur [57].

miRNA inhibisyonuna yönelik tanımlanan son anti-miRNA grubu potansiyel miRNA-spesifik küçük-molekül inhibitörlerdir (SMIRs). Diazobenzen ve türevlerinin in vitro pri-miR-21 içindeki miR-21 geninin transkripsiyonunu azalttığı belirlenmiştir. Ancak diğer işleme süreçleri üzerindeki sitotoksik ve spesifik olmayan etkileri henüz test edilmemiştir. Bu bilgiler ışığında belirlenen miRNA'nın küçük-molekül inhibitörleri klasik kemoterapotik ajanlarla birlikte kullanılabilirliği öngörülebilmektedir [47].

KAYNAKLAR

- [1] Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*.429:457-463.
- [2] Baylin SB, Ohm JE. 2006. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*.6:107-116.
- [3] Su Z, Xia J, Zhao Z. 2006. Functional complementation between transcriptional methylation regulation and post-transcriptional microRNA regulation in the human genome. *BMC Genomics*.12 (Suppl 5):S15.
- [4] Csankovszki G, Nagy A, Jaenisch R. 2001. Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol*.153:773-784.
- [5] Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*.16:6-21.
- [6] Klose RJ, Bird AP. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*;31:89-97.
- [7] Heard E, Rougeulle C, Arnaud D, Avner P, Allis CD, Spector DL. 2001. Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell*.107:727-738.
- [8] Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. 2003. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol*

Chem.278:4035–4040.

[9] Jiang Y, Bressler J, Beaudet LA. 2004.Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genet.*5:479-510.

[10] Malumbres M. 2013.miRNAs and cancer: An epigenetics view. *Molecular Aspects of Medicine.*34:863–874. Med 6, 14.

[11] Esteller M. 2007.Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome.Hum. Mol. Genet16 (1):R50–R59.

[12] Kunej T, Godnic I, Ferdin J, HorvatS, Dovc P, Calin G.A. 2011.Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. *Mutat.Res.*717 (1–2):77–84.

[13] Richly H, Aloia L, Di Croce, L. 2011.Roles of the Polycomb group proteins in stem cells and cancer. *Cell Death Dis.*2: e204.

[14] Hsu PY, Deatherage DE, Rodriguez BA, Liyanarachchi S, Weng YI, Zuo T, Liu J, Cheng AS & Huang TH. 2009.Xenoestrogen-induced epigenetic repression of microRNA-9-3 in breast epithelial cells. *Cancer Res.*69:5936–5945.

[15] Guo LM, Pu Y, Han Z, Liu T, Li YX, Liu M, Li X & Tang H. 2009.MicroRNA-9 inhibits ovarian cancer cell growth through regulation of NF-kappaB1. *FEBS J.*276: 5537–5546.

[16] Bandres E, Agirre X, Bitarte N, Ramirez N, Zarate R, Roman-Gomez J, Prosper F & Garcia-Foncillas J. 2009. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. *Int J Cancer.*125:2737–2743.

[17] Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Korner H, Knyazev P, Diebold J & Hermeking H. 2008.Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle.*7: 2591–2600.

[18] Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. 2011. MicroRNAs and epigenetics.*FEBSJ.*May;278(10):1598-609.

[19] Cao X, Pfaff SL & Gage FH. 2007. A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes Dev.*21:531–536.

[20] Roman-Gomez J, Agirre X, Jimenez-Velasco A, Arqueros V, Vilas-Zornoza A, Rodriguez-Otero P, Martin-Subero I, Garate L, Cordeu L, San Jose-Eneriz E et al. 2009. Epigenetic regulation of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.*27, 1316–1322.

[21] Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Munnakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF et al. 2008.miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med.*24;6:14.

[22] Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K & Inazawa J. 2008.Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res.*68, 2094–2105.

[23] Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ et al.2008.A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA.*105, 13556–13561.

[24] Imoto I, Pimkhaokham A, Watanabe T, Saito-Ohara F, Soeda E & Inazawa J. 2000. Amplification and over-expression of TGIF2, a novel homeobox gene of the TALE superclass, in ovarian cancer cell lines. *BiochemBiophys Res Commun.*276, 264–270.

[25] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Ne-

grini M et al. 2000. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.*101, 2999–3004.

[26] Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, Mund C, Musch T, Meister M, Sultmann H & Lyko F. 2007.The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated. *Cancer Res.*15;67(4):1419-23.

[27] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh Hand Harano T, et al. 2004. Reduced expression of the let-7 microRNAs in humanlung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer-Research.*64:3753–3756.

[28] Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zaneni N, Callegari E, Liu S, et al. 2007.MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc. Natl. Acad. Sci.*104 (40), 15805–15810.

[29] Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, Waldvogel B, Vannier C, Darling D, zur Hausen A et al. 2009. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol* 11, 1487–1495.

[30] Kim D.H, Rossi J.J. 2007. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* 8 (3), 173–184.

[31] Younger S.T, Pertsemlidis A, Corey D.R. 2009. Predicting potential miRNA target sites within gene promoters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (14), 3791–3794.

[32] Place R.F, Li L.C, Pookot D, Noonan E.J, Dahiya R. 2008. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc. Natl.Acad. Sci.* 105 (5), 1608–1613.

[33] Kim D.H, Saetrom P, Snove Jr, O Rossi J.J. 2008. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (42), 16230–16235.

[34] Gandellini P, Folini M, Longoni N, Pennati M, Binda M, Colecchia M, Salvioni R, Supino R, Moretti R, Limonta P et al. 2009.miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon. *Cancer Res*69, 2287–2295.

[35] Lee CJ, Dosch J & Simeone DM.2008. Pancreatic cancer stem cells. *J Clin Oncol* 26, 2806–2812.

[36] Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, Suri P & Wicha MS. 2006. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 66, 6063–6071.

[37] Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S,Otsuki A, Nuovo G, Raychaudhury A, Newton HB,Chiocca EA & Lawler S 2008. Targeting of the Bmi-1 oncogene / stem cell renewal factor by microRNA-128inhibits glioma proliferation and self-renewal. *CancerRes*9125–9130.

[38] Wang H, Garzon R, Sun H, Ladner KJ, Singh R, Dahlman J, Cheng A, Hall BM, Qualman SJ, Chandler DS et al. 2008. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*14, 369–381.

[39] van der Vlag J & Otte AP.1999. Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat Genet*23, 474–478.

[40] Witt O, Deubzer HE, Milde T & Oehme I.2009. HDAC family: what are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* 277, 8 21.

[41] Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T & Peters AH. 2003. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9

methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol.*13, 1192–1200.

[42] Wang Z. 2011. The guideline of the design and validation of MiRNA mimics. *Methods Mol Biol* 676:211-23.

[43] Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. 2015. MicroRNA and cancer A brief overview. *Adv Biol Regul. Jan*;57:1-9.

[44] Ji Q, Hao X, Meng Y, Zhang M, Desano J, Fan D, Xu L. 2008. Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres. *BMC Cancer.* 21(8):266.

[45] Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Patrawala L, Brown D, Bader AG. 2010. Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Research.*70(14):5923-30.

[46] Hatakeyama H, Cheng H, Wirth P, Counsell A, Marcrom SR, Wood CB, Pohlmann PR, et al. 2010. Regulation of heparin-binding EGF-like growth factor by miR-212 and acquired cetuximab-resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *5(9):e12702.*

[47] Shah MY, Calin GA. 2014. MicroRNAs as therapeutic targets in human cancers. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* Jul-Aug;5(4):537-48.

[48] Kent OA, Chivukula RR, Mullendore M, Wentzel EA, Feldmann G, Lee KH and Liu S, et al. 2010. Repression of the miR-143/145 cluster by oncogenic Ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway. *Genes Development.* 24:2754–2759.

[49] Scott G.K, Mattie M.D, Berger C.E, Benz S.C, Benz C.C. 2006. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res.* 66(3), 1277–1281.

[50] Krutzfeldt J, Kuwajima S, Braich R, Rajeev KG, Pena J, Tuschl T, et al. 2007. Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. *Nucleic Acids Research.* 35:2885-92.

[51] Hutvagner G, Simard MJ, Mello CC, Zamore PD. 2004. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol.*2:E98.

[52] Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. 2005. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature.*438:685–689.

[53] Ma L, Reinhardt F, Pan E, Soutschek J, Bhat B, Marcussen EG, Teruya-Feldstein J, Bell GW, Weinberg RA. 2010. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol.*28:341–347-A.

[54] Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjärn M, Hansen HF, Berger U, et al. 2008. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature.*452:896–899

[55] Zhang Y, Roccaro AM, Rombaoa C, Flores L, Obad S, Fernandes SM, Sacco A, Liu Y, Ngo H, Quang P, et al. 2012. LNA-mediated anti-miR-155 silencing in low-grade B-cell lymphomas. *Blood.*120;1678–1686.

[56] Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, Teruya-Feldstein J, Reinhardt F, Onder TT, Valastyan S, et al. 2010. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol.*12:247–256-B.

[57] Choi WY, Giraldez AJ, Schier AF. 2007. Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430. *Science.*318:271–274.