

Derleme

MikroRNA'ların Terapötik Kullanımı

Therapeutic Usage of MicroRNAs

Ayşegül GÖRÜR¹, Lülüfer TAMER¹

¹Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

Özet

MikroRNA'lar son dönemlerde keşfedilen evrimsel süreçte korunmuş, endojen, kodlanmayan ve yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda kısa RNA molekülüdürler. MikroRNA'lar farklılaşma, neoplastik transformasyon, hücre replikasyonu ve rejenerasyonu gibi birçok hücresel süreçte düzenleyici olarak görev alırlar. Bu düzenleyici görevlerinden dolayı birçok hastalıkta anormal mikroRNA ekspresyon düzeylerinin saptanması şaşırtıcı olmamıştır. Yapılan son çalışmalarda dolaşımdaki mikroRNA'ların klinik biyobelirteç olarak kullanılabilmesi rapor edilmiştir. Tümör baskılayıcı ve onkogenik özellik gösteren mikroRNA'lar hedeflenmiş kanser tedavi stratejilerine mükemmel bir olanak sağlamıştır. Onkogenik özellik gösteren mikroRNA'lar anti-miRNA oligonükleotid'ler, mikroRNA süngerleri ve mikroRNA maskeleri gibi birçok RNA interferans-tip stratejiler ile deaktive edilirler veya susturulurlar. Benign hastalık durumlarında ekspresyonu azalan tümör baskılayıcı mikroRNA'ların işlevleri ise mikroRNA mimikleri veya viral vektör kodlanmış mikroRNA replasman tedavisi ile sağlanır. Bu nedenle bu derlemede mikroRNA tabanlı tedavi stratejilerinin avantajlarının vurgulanması amaçlandı.

Anahtar Sözcükler: miRNA terapötikleri; anti-miRNA oligonükleotid; miRNA mimik; miRNA süngeri

Abstract

MicroRNAs are recently discovered family of endogenous, noncoding and evolutionarily conserved RNA molecules with approximately 22 nucleotide in length. MicroRNAs play important regulatory roles in many cellular processes, including differentiation, neoplastic transformation, cell replication and regeneration. Because of these regulatory roles, it has not been surprising that aberrant microRNA expression has been implicated in several diseases. Recent studies have reported that circulating microRNAs could serve as useful clinical biomarkers. MicroRNAs putative role as oncogenes or tumour suppressor genes presents a great opportunity to provide targeted cancer treatment strategies. MicroRNAs with oncogenic capacity can be deactivated or silenced by several RNA interference-type strategies by anti-miRNA oligonucleotides, microRNA sponges and microRNA masking. In case of benign disease state, the functions of the tumor suppressing microRNAs with declining expression can be achieved through microRNA mimicry or viral vector encoded microRNA replacement therapy. Thus, in this review, it was aimed to emphasize the advantages of microRNA based therapeutic strategies.

Keywords: miRNA therapeutics; anti-miRNA oligonucleotide; miRNA masking; miRNA sponge

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2011;4(2):1-7

Geliş Tarihi : 21.02.2012

Kabul Tarihi : 29.04.2012

Yazışma Adresi: Bil. Uzm. Ayşegül GÖRÜR, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 33100, Mersin

Tel : 0324 3374300/1530

Faks : 0324 3374305

E-posta : aysegulgorur82@gmail.com

Giriş

Protein kodlamayan mikroRNA (miRNA)'lar yaklaşık 20-23 nükleotit uzunluğunda tek iplikli RNA molekülüdürler. miRNA ailesinin ilk keşfedilen üyeleri, bir toprak solucanı olan *Caenorhabditis elegans*'ın gelişimi sırasında gözlenen ve spesifik ekspresyon modelleri sebebiyle küçük geçici RNA'lar olarak tarif edilen lineage-4 (*lin-4*) ve lethal-7 (*let-7*)'dir (1).

miRNA'lar ilk kez Lee ve ark. (2) tarafından 1993 yılında Victor Ambros laboratuvarında keşfedilmiş olup, miRNA terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Lee ve ark. (3) 1993 yılında *C. elegans*'i gen içeriği bakımından taramışlar ve larva gelişiminin zamanlamasını kontrol ettiği bilinen *lin-4* olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotit uzunluğunda bir çift küçük RNA transkribe ettiğini rapor etmişlerdir. miRNA *lin-4*'ün, *lin-14* mRNA'sının translasyonu yapılmamış 3' bölgesiyle (UTR) baz eşleşmesi yaptığını ve *lin-14* mRNA'sının translasyonunu baskıladığını göstermişlerdir.

2000 yılında Reinhart ve ark. (4) *C. elegans*'da 22 nükleotit uzunluğunda, *let-7* olarak adlandırılan, canlılığın gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir miRNA keşfetmişler ve bu molekülün *C. elegans*'da *lin-41*, *lin-28*, *lin-42* ve *daf12* mRNA'larının fonksiyonlarını baskıladığını bildirmişlerdir.

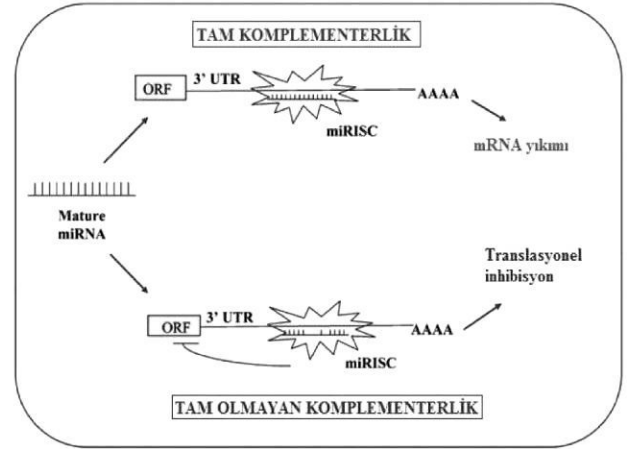
2002 yılında ise miRNA'ların kanser ile ilişkisi belirlenmiş ve miR-15 ve miR-16'nın kronik lenfositik lösemide (CLL) ekspresyonunun azaldığı ya da hiç sentezlenmediği belirlenmiştir. 2003 yılında *let-7*'nin insanları da içine alan türler arasında korunmuş olduğu keşfedilmiş olup, bu durum *let-7*'nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir. Daha sonraki yıllarda *lin-4* ve *let-7*'ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü, hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilmiş ve miRNA'lar olarak isimlendirilmiştir (5).

2006 yılında ise Andrew Fire ve Craig Mello isimli bilim adamları küçük engelleyici RNA'lar (siRNA) ve miRNA adı verilen RNA parçacıklarının aracılığıyla gerçekleşen ve gen ifadesinin susturulmasını sağlayan bir mekanizma olan RNA interferans (RNAi) konusunda yaptıkları çalışmalar ile nobel ödülü almışlardır (6).

MikroRNA'ların Fonksiyonu

miRNA'lar hücre döngüsünün hemen hemen her bölümünde yer almaktadırlar. miRNA'lar fonksiyonlarını post transkripsiyonel basamakta gen ekspresyonunun dizi spesifik modülasyonunda gösterirler. miRNA'ların protein kodlayan genlerin %30'unu bu yolla yönettiği düşünülmektedir. Etki mekanizmalarının anlaşılması terapötik düzenlemelerin uygulanabilmesi için oldukça önemlidir (7).

DNA'dan transkripsiyonu yapılan ancak proteine çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanan miRNA'lar, hedef genin mesajcı RNA (mRNA)'lara düşük özgüllükte bağlanmasına, mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden olabileceği için gen ifadesinin kontrolünde önemli rollere sahiptirler (8). miRNA'ların hedef mRNA ile komplementerliği tam ise mRNA'nın parçalanmasıyla, komplementerlik daha az ise translasyonun baskılanmasıyla sonuçlanır (Şekil 1) (9).



Şekil 1. miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanması (9 nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir)

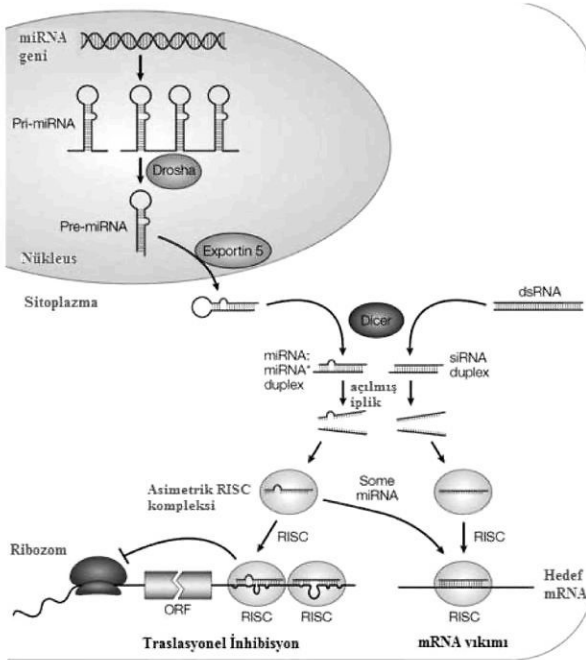
Bazı miRNA'ların onkogen, bazılarının ise tümör baskılayıcı gen olarak işlev görmesi, tümör progresyonu, metastazı ve invazyonunda miRNA'ların düzenleyici olduğunu göstermektedir. miRNA'lar gelişme, farklılaşma, sağkalım, apoptozis, yaşlanma ve metabolizma gibi çeşitli biyolojik olayların kontrolünde görev alırlar (4,10).

miRNA'ların büyük çoğunluğu (%61) protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde bulunmaktadır, ancak genler arası bölgelerde veya ekzonlarda da bulunabilirler. İntergenik olan miRNA genlerinin ekspresyonu küme halinde bulunan diğer miRNA'lar ile kontrol edilir. İntonik bölgelerde bulunan protein kodlayan genler ise konak genlerinde olduğu gibi sıklıkla aynı zincirden ve korele düzeylerde eksprese olurlar (11). miRNA genleri genellikle kolay mutasyona uğrayan kırılgen bölgelerinde ve kanserle ilişkili genomik bölgelerde yerleşmişlerdir. Bu durum bu miRNA'ların kanserde hücre büyümesi, bölünmesi ve çoğalması gibi hücrel süreçlerde bozulma ile ilişkili olduğunu düşündürmekte ve miRNA'ların neoplazi patogenezinde önemli rolleri olduğuna işaret etmektedir. miRNA'ların işlevsel önemlerinin tam olarak anlaşılabilmesi ve tanı veya tedavi amaçlı kullanımlarının gerçekleştirilmesi için hedeflerine nasıl bağlandıklarının ve gen ifadelerini farklı seviyelerde nasıl düzenlendiklerlerinin belirlenmesi gerekmektedir (12,13).

MikroRNA Biyogenezi

MikroRNA'ların biyogenezi; primer transkript olan pri-miRNA'nın RNA polimeraz II (RNA pol II) tarafından transkripsiyonu, nükleusta prekürsör miRNA'nın kısmi olgunlaştırılması ve son olarak sitoplazmada fonksiyonel miRNA'nın oluşturulması olmak üzere üç önemli basamaktan oluşur (Şekil 2) (14). İnsanlarda miRNA'ları kodlayan genlerin transkripsiyonu RNA pol II tarafından nükleusta gerçekleştirilir. 1 kb'dan daha büyük diziler halinde transkribe olan molekül primer miRNA (pri-miRNA) olarak adlandırılır ve 5' cap (başlık) ve 3' poly A kuyruğuna sahiptir. Pri-miRNA'nın Drosha ve Pasha (DGCR8; insan DiGeorge sendromu kritik bölge 8 olarak bilinmekte) tarafından kesilmesi ile öncül molekül olan pre-miRNA oluşur. Pre-miRNA, eksportin-5 ve Ran-GTP aracılığı ile nükleustan sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada

pre-miRNA, transaktivasyondan sorumlu RNA bağlayıcı protein (TRBP) ve Dicer tarafından kesilir ve sonuçta bir zinciri kılavuz miRNA, diğer zinciri (yolcu zincir) ise kılavuz miRNA'ya eşlenik diziyi barındıran çift zincirli molekül oluşur. Bu çift zincirli molekülün kılavuz zinciri RNA ile uyarılan susturma kompleksi (RISC) ile birleşir ve hedef mRNA dizisinin inhibisyonuna neden olur veya translasyonunu engeller, yolcu zincir ise parçalanır. miRNA'lar hedef mRNA'ya kısmi veya tam komplementerlik göstererek bağlanabilirler. Hedef mRNA'nın translasyona uğramayan 3' bölgesi (3'UTR) ile miRNA çekirdek dizisi arasındaki komplementerliğin seviyesi miRNA'nın hedefini hangi seviyede ve nasıl baskılayacağını belirler (11).



Şekil 2. miRNA biyogenezini (14 nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir)

MikroRNA'ların Klinik Önemi ve Hastalıklarla İlişkisi

Dolaşımdaki miRNA'ların sadece kanda bol miktarda bulunması ile değil aynı zamanda oldukça kararlı bir yapı göstermesi nedeniyle klinikte hastalıkların tanısı ve prognozunda önemli bir biyobelirteç olarak kullanılabilceği gösterilmiştir. Yapılan son çalışmalarla miRNA'ların başta kan olmak üzere çeşitli vücut sıvılarında varlığı potansiyel klinik biyobelirteç olarak kullanımını mümkün kılmıştır. miRNA'lar plazmada bulunan RNAaz'lara oldukça dirençlidirler. Bunların yanı sıra miRNA'ların kaynatma, yüksek/düşük pH, uzun süreli depolama, dondurup çözme gibi zor koşullara dayanıklı olduğu da bildirilmiştir. Kısacası miRNA'ların kararlı olması, invazyona gerek kalmadan kolaylıkla elde edilebilmesi (doku, serum veya plazmadan), serum ve plazma örnekleri ile çalışmayı mümkün kılmaktadır. Ayrıca miRNA'ların formalin ile fikse edilmiş dokularda stabil kalması doku çalışmalarına da olanak vermiştir (15).

Yapılan son çalışmalar ile miRNA'lardaki mutasyonlar ve ekspresyon düzeylilikleri ile birçok hastalık arasında direkt bir ilişki olduğu gösterilmiştir. miRNA'lar organizmada birçok biyolojik süreçte görev aldığı için, miRNA genlerinde meydana gelen çeşitli

mutasyonlar hastalıklara neden olabilmektedir. miRNA'ların başta kanser olmak üzere, kardiyovasküler bozukluklar, inflamatuvar hastalıklar, infeksiyonlar, gelişimsel bozukluklar, kaslar bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (16,17).

MikroRNA'ların Terapötik Kullanımı

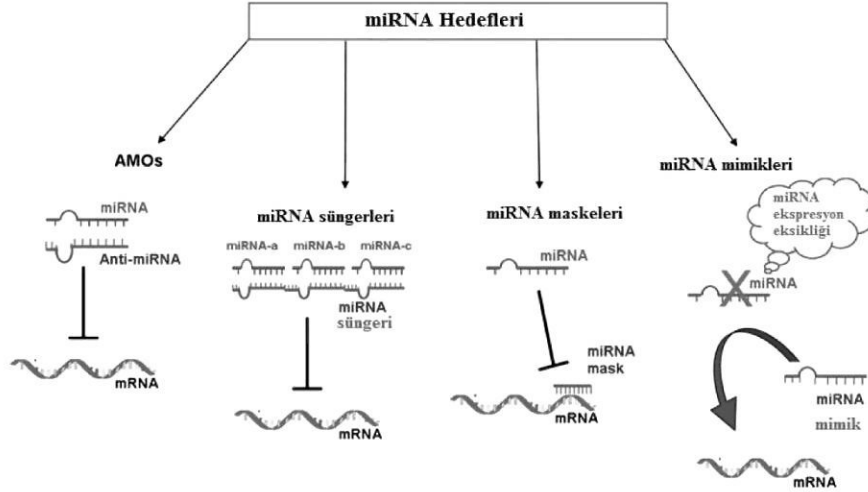
Gen ekspresyonunun susturulması olarak bilinen RNAi, dizi spesifik olarak mRNA'nın degradasyonuna veya translasyonun inhibisyonuna neden olarak ökaryotik gen ekspresyonunu düzenleyen hücrel bir mekanizmadır. RNAi mekanizması miRNA'lar ve siRNA'lar tarafından düzenlenir. siRNA'lar ya endojen olarak kodlanmış ya da transenfeksiyonla doğrudan hücre içine tanıtılmış veya çeşitli vektörler tarafından transkribe edilmiş uzun çift iplikli RNA'dan türetilmiş moleküllerdir. miRNA'lar ise konak genom içinde kodlanmış, ilmi yapıdaki pre-miRNA'dan meydana gelmektedir (18).

Organizmada birçok patolojinin, anormal bir endojenik gen veya mutant gen nedeniyle hücreler arasında sinyalin bozulma, apoptozis ve hücre proliferasyonu ile meydana geldiği bilinmektedir. Buna ek olarak viral enfeksiyon da yabancı gen ekspresyonu yaptırarak, hastalığa neden olmaktadır. RNAi mekanizması ile yabancı gen ürünlerinin sessizleştirilerek, tedavide kullanılması yönündeki görüşler giderek artmaktadır (7,19,20).

MikroRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı fonksiyon gösterebilirler (21). Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan miRNA'lar tümör baskılayıcı miRNA'lar veya "anti-oncomiR" olarak ifade edilmektedir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur. Bunun tersi durumda ise, "oncomiR" olarak ifade edilen bazı miRNA'ların kanserin gelişimini arttırdığı görülmektedir. Bu miRNA'lar bir tümör baskılayıcısının baskılanmasını sağlarlar (1). OncomiR'ler bazı tümörlerde, gen amplifikasyonu, epigenetik mekanizmalar veya transkripsiyonel bozukluklardan dolayı aşırı ekspresyon olurlar. Gelişmekte olan miRNA tabanlı tedaviler için iki yaklaşım vardır: onkogenik miRNA'ları hedef alan (anti-miR, miRNA süngerleri ve miRNA maskeleri) ve tümör baskılayıcı miRNA'ları hedef alan (miRNA mimikleri) tedavilerdir (7).

Onkogenik MikroRNA Tabanlı Tedavi Stratejileri

Onkogenik miRNA'lar (OncomiR'ler), tümör baskılayıcı genleri ve/veya apoptozis ve hücre farklılaşmasını kontrol eden genleri negatif olarak inhibe ederek tümör gelişimine neden olmaktadır. OncomiR'ler genlerin amplifikasyonları, transkripsiyonel düzeylilikler ve epigenetik mekanizmalardan dolayı birçok dokuda aşırı veya normalden düşük miktarda ekspresyon olurlar (22). Terapötik olarak kullanılan onkogenik özelliğe sahip miRNA'lar küçük tek zincirli anti-miR'ler, miRNA süngerleri ve miRNA maskeleri olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (Şekil 3) (7).



Şekil 3. Potansiyel miRNA terapötik stratejileri. Onkojenik miRNA'ların ekspresyonları, antimirRNA AMO'lar (anti-miRNA oligonucleotide), miRNA süngerleri ve miRNA maskeleri aracılığı ile azalır. AMO'lar komplementer miRNA'larına bağlanırlar ve miRNA'ların dupleks oluşumuna veya miRNA degradasyonuna neden olurlar. miRNA süngerleri aynı anda birden fazla miRNA'yı ayırmak için farklı bağlanma bölgesi içerirler. miRNA maskeleri hedef miRNA'nın 3'UTR bölgesi ile komplementer bölgeye sahiptir ve diğer hedefler ile yarışmalı inhibisyon sonucunda miRNA'nın etkisini azaltırlar. Tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonlarının azalması ise sentetik olarak üretilmiş olan miRNA mimikleri ile gerçekleştirilir (7).

Küçük Tek Zincirli Anti-miR'ler

AntagomiR, miRNA'ya direk bağlanan ve onun aktivitesini bloke eden antisense oligonükleotidler için kullanılan genel bir terimdir. AntagomiR'ler aynı zamanda miRNA prekürsörlerine bağlanarak olgun miRNA'ların biyogenezini inhibe ederler (Şekil 3) (7). miRNA'ların hedef bölgelerine bağlanmaları Watson-Crick baz eşleşme kuralına göre basit bir şekilde gerçekleşmektedir. AntagomiR'lerin miRNA'ların fonksiyonunu nasıl inhibe ettiği henüz tam olarak anlaşılamamasına rağmen, olgun miRNA'ların RISC kompleksine bağlanmasını önlediği bilinmektedir. AntagomiR'lerin terapide kullanımının avantajı, spesifik ve potansiyel olarak miRNA'ları inhibe etmesi ve bunun sonucunda yüzlerce geni etkilemesidir (23).

Tedavide kullanılan miRNA'ların hücresel alınımı ve stabilitesini geliştirmek için gerekli olan yaklaşımlar; nükleik asitin kimyasal modifikasyonları ve miRNA'ların koruyucu partiküller içine çeşitli yöntemler ile paketlenmesini içerir. Bu modifikasyonların en önemli ikisi 2' O-metil (2'-OMe), O-2' metiletil (2'-MOE)'dir. Locked nükleik asitler (LNA) olarak adlandırılan moleküllerde ise termal stabilitenin arttığı ve DNA/RNA hedeflerinin tanınmasının zenginleştiği görülmüştür. Bunlara ilave olarak kolesterol ve 3'-benzen-pridin gibi moleküllerin bağlanması ile miRNA'ların hücre içine alınmasının kolaylaştığı bildirilmiştir (24-26).

miRNA'ların hedef bölgeye *in vivo* olarak gönderilmesi sırasında nükleaz aracılı degradasyona dayanıklı olması gerekmektedir. Bunun için miRNA'lar bazı kimyasal modifikasyonlara maruz kalmaktadır. Bununla birlikte bu kimyasal modifikasyonlar düşük miRNA aktivitesine ve bu moleküllerin degradasyonu sonucu toksik metabolitlerin üretilmesine neden olmaktadır. miRNA modifikasyonlarındaki bu sınırlamalar sonucunda çıplak haldeki miRNA'nın *in vivo* koşullardan

ve nükleazlardan korunması için daha uygun iletim sistemi arayışlarına gidilmiştir. miRNA ve miRNA antagomiR'lerinin ideal sistemik iletimi için hedefe güçlü bağlanmayı sağlayan, biyolojik olarak parçalanabilen ve non-immunojenik bir taşıyıcı gerektirmiştir. Bu stratejilerden birisi doğal veya sentetik olarak lipid veya polimerlerden yapılan biyolojik olarak uyumlu, submikron boyutlarındaki nanotaşıyıcılardan oluşmaktadır. Nanotaşıyıcıların kullanılmasının avantajları da tümör spesifik reseptörler için yüksek affiniteli ligandlar ile kaplanabilmesi ve bu taşıyıcıların salıverilmesinin sürekli kontrol edilmesidir. miRNA'ların hücreye alınımı sırasında kullanılan bu nanotaşıyıcılardan en dikkat çekici olanı 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfatidilkolin (DOPC)'dir. Bir nötral nanolipozom olan DOPC molekülünün kullanılmasının avantajları, toksisitesinin olmaması, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir yapıda olmasıdır. Bir diğer nanopartikül ise pozitif yük taşıyan kitosandır. Kitosan molekülü miRNA ve siRNA'nın hücreye alınmasında oldukça güvenilir ve etkin bir yapıdadır. Bunlara ilave olarak miRNA'nın hücreye alınması sırasında kullanılan ve oldukça umut verici olan modifiye edilmiş yüksek yoğunluklu lipoprotein (rHDL) nanopartikülü ile ilgili ileri çalışmalar da devam etmektedir (19).

MikroRNA Süngerleri

miRNA süngerleri translasyonel başlama kodonu bulunmayan tek zincirli miRNA'lardır. Endojen miRNA'lar için birden fazla bağlanma bölgesine sahip olan ve miRNA ile onun endojen hedefi arasındaki bağlanmayı engelleyen sentetik miRNA'lardır (Şekil 3) (7).

miRNA'lar hedef bölgeyi tanımak için büyük özgüllükte belirleyici özelliğe sahip olan ve sayısı 2-7 arasında değişen nükleotidleri taşırlar. miRNA süngerleri,

ilgili miRNA üzerinde birden fazla, ardışık (en fazla 7) komplementer bağlanma bölgesi taşırlar ve miRNA geninin çekirdek bölgesine bağlanarak, bu miRNA ile ilişkili tüm aileyi bloke ederler (27,28).

MikroRNA Maskeleri

Herhangi bir miRNA yüzlerce gen tarafından düzenlenebilir veya herhangi bir gen birden fazla miRNA ile düzenlenebilir. Endojen miRNA'lara benzer olarak AMO'ların aktivasyonu gen spesifik değil dizi spesifiktir. Bu nedenle AMO'lar hedef dışı bölgelerde istenmeyen toksisite ve yan etkiler gösterebilir. Xiao ve ark. (29) endojen miRNA'ların hedef gen üzerindeki bağlanma bölgesine mükemmel komplementerlik gösteren bir nükleotid dizisi dizayn etmişlerdir. miRNA maskeleri hedef mRNA'ya yüksek affinite ile bağlanarak duplex oluştururlar ve hedef mRNA'nın degradasyonuna neden olurlar (Şekil 3) (7). Böylece AMO'larda olduğu gibi yan etkiler ve toksisite gözlenmemektedir (29).

Tümör Baskılayıcı miRNA Tabanlı Tedavi Stratejileri

Tümör baskılayıcı olarak kullanılan miRNA tabanlı tedaviler, miRNA mimiklerini içerir.

MikroRNA Mimikleri

Çift iplikli yapılar olan miRNA mimikleri endojen miRNA'lar ile tam olarak eşleşebilen küçük, sentetik dizilerdir (Şekil 3) (7). miRNA mimikleri tek iplikçik oluşturmak yerine siRNA'ların yapısına benzer olarak tam olarak eşleşme gösteren çift iplikli bir yapı oluştururlar. Bu nedenle RISC kompleksi çift iplikli yapıya tek iplikli yapıya göre daha etkili bir şekilde bağlanır. miRNA mimikleri modifiye edilebildiğinden dolayı, doğal olarak oluşan formlarına göre kullanımı daha avantajlıdır. Örneğin miRNA glioma ilişkili antijen 1 (Gli-1) için dizayn edilen miRNA mimiği Gli-1 hedefine doğal olarak oluşan miRNA'dan daha yüksek affinite ile bağlanır. Bu miRNA mimiğinin doğal olan formuna göre pankreatik tümör hücre hatlarının Gli-1 aracılı çoğalmasını güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (23). Benzer olarak prelinik çalışması devam eden bir miRNA mimiği olan *let-7*'nin, özellikle akciğer kanseri olmak üzere birçok kanser tipinde onkojen olarak görev yapan KRAS üzerine etkili olduğu görülmüştür. Bu miRNA mimiğinin, KRAS-G12D transgenik fare modellerinde ve insanda küçük hücreli akciğer kanseri olmayan xenograflarda tümör gelişimini güçlü bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir (31).

miRNA antagonistleri hastalıklı dokularda fonksiyon gösteren endojen miRNA'ları etkisizleştirmek için üretilirken, miRNA mimikleri fonksiyon eksikliğini gidermek için kullanılırlar. miRNA replasman tedavisi olarak da bilinen miRNA mimikleri, sağlıklı hücrelerde normalde ifade edilen miRNA'ların hastalık halinde eksikliğini gidermeyi hedefler (30).

miRNA ile yapılan tedavi stratejilerinin temel prensibi kanser ve viral enfeksiyonlar gibi bazı hastalıklarda protein sentezini azaltarak hastalığı durdurmaya çalışmaktır. miRNA yolu ile RNAi mekanizmasını

tedaviye taşıyan firmalardan birçoğu gerek direkt miRNA gerekse modifiye edilmiş miRNA'ları kullanarak "faz I" çalışmalarına başlamış bulunmaktadır. miRNA tedavi stratejileri için çalışması yapılan miRNA'lardan biri de miR-34'dür. Bu miRNA'nın p53 yolağının bir parçası olduğu ve antikanser aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Lipid tabanlı miR-34'ü taklit eden bir ajan geliştirilmiş ve bu ajanın akciğer ve prostat kanseri oluşturulmuş fare modellerinde tümör büyümesini ve metastazı inhibe ettiği gösterilmiştir (31). Benzer olarak, insan dışındaki primatlarda yapılan ve miRNA hedefli HCV tedavisinde faz I çalışması tamamlanan bir diğer deneme ise Danimarkalı bir firma olan Santaris firması tarafından geliştirilen bir bileşik olan SPC-3649'dir. Bu bileşik karaciğerde eksprese olan ve HCV'nin replikasyonunda önemli bir rolü olan miR-122'yi hedefleyen bir LNA-antimiR'dır. Bu miRNA inhibitörü, insanlarda miRNA antagonistini test etmek için ilk defa kullanılmıştır. Antaris firması ise bu bileşiğin hiperkolestrolemi ile ilişkili olan genleri de düzenlediğini belirlemişlerdir (32,33). MiRagen firması, miRNA'ların oligonükleotid temelli modülasyonu teknolojisiyle kardiyovasküler hastalıkların kontrolü için miRNA-208'i hedef alan modifiye edilmiş kısa nükleik asit dizilerini (antimiR-208) geliştirmişlerdir (34). Benzer şekilde kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkisi olduğu düşünülen miR-499 ve miR-195'in ise prelinik çalışmaları devam etmektedir. Bunlardan miR-499'un inhibisyonu, kalpteki hızlı hareket eden kas liflerinin ekspresyonunu artırırken, strese cevap olarak β -MHC ekspresyonunu baskılar. Patolojik kalp büyümesi ile direkt ilişkisi olan miR-195'in ise, kardiyak hipertrofi sırasında upregüle olduğu ve bunun sonucunda kalp yetmezliğine neden olabileceği bildirilmiştir (31).

Prostat kanseri hücrelerinde down regüle olan miR-16 ile yapılan bir çalışmada atelokollajen ile kaplanmış miR-16 kompleksinin kemik metastazı olmuş farenin kuyruk veninden sistemik olarak verilmesi sonucu prostat kanser hücrelerinin büyümesinin engellendiği görülmüş ve ileri prostat kanseri hastalarının miR-16 replasman tedavisi ile tedavi edilmesinin miRNA terapötik uygulamalarının bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (35).

Kullanılacak miRNA veya siRNA efektörünün özel hücre tiplerini hedef alması için, farklı ligand ve antikörlerin bu RNAi efektörlerinden biri ile konjuge olması gereklidir. Viral vektörler, RNAi efektörünün sistemik verilmesi için kullanılan taşıyıcılardan biridir. Viral vektörler klinik olarak hücreye iletilirken dokuya spesifik tropizm ve transdüksiyonu sağlasa da, her tip viral vektör, risk ve güvenlik sorunlarını beraberinde getirmektedir. Adeno-ilişkili virüs (AAV) gibi taşıyıcı sistemler kullanılarak miRNA'nın sistemik olarak uygulandığı klinik öncesi çalışmalar da mevcuttur (36-38). Hepatosellüler karsinomda (HCC) bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanan *miR-26a*'nın AAV kullanılarak HCC oluşturulmuş sıçanlara sistemik olarak uygulanması sonucu kanser hücrelerinin çoğalmalarının inhibe edildiği, tümör spesifik apoptozisin uyarıldığı ve hiçbir toksisite gözlenmeden hastalığın ilerlemesinin durduğu gözlenmiştir (20). Benzer şekilde, terapötik etkinliği olan miRNA mimikleri geliştirmek için katyonik lipozomlar veya polimer tabanlı nanoparçacık formülasyonları da geliştirilebilir (36-38).

Keşfinden bu yana her geçen gün daha fazla ilgi odağı olan miRNA'lar, günümüzde hızla artan bir öneme sahip hedef spesifik ilaç tedavisi çalışmalarında da yerini almaktadır. mRNA'yı hedef alan terapötik strateji, miRNA'lar üzerinden gen spesifik tedavi yöntemlerini içeren çalışmalarını sürdürmektedir. Gelecekte RNA tabanlı bu uygulamaların geliştirilebilmesi için miRNA'ların nasıl düzenlendiklerinin, hedeflerini nasıl belirlediklerinin ve biyogenezlerinin çok daha iyi anlaşılması gerekmektedir. miRNA fonksiyonlarının araştırılmasındaki ilerlemeler ve teknolojik gelişmeler ilaç endüstrisi ve tıp dünyasında fikir değişmesine neden olacak ve birçok fizyolojik ve patolojik sürecin aydınlanması sağlanarak, hastalıkların tanısı, ayırıcı tanısı, prognoz ve tedavi sonrası izleminde yenilikler getirilmiş olacaktır.

Kaynaklar

- Saydam F, Değirmenci İ, Güneş H V. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi* 2011;38(1):113-20.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75(5):843-54.
- Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001;294(5543):862-4.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000;403(6772):901-6.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281-97.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-1.
- McDermott AM, Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. The therapeutic potential of microRNAs: disease modulators and drug targets. *Pharm Res* 2011;28(12):3016-29.
- Konaç E, Önen Hİ, Sözen S. Üroonkolojide MikroRNA (miRNA)'ların yeri ve önemi. *Üroonkoloji Bülteni* 2010;1:3-13.
- Paranjape T, Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut* 2009;58(11):1546-54.
- Tunalı NE, Tiryakioğlu NO. Kanserde MikroRNA'ların Rolü. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010;30(5):1690-700.
- Shomron N, Levy C. MicroRNA-biogenesis and Pre-mRNA splicing crosstalk. *J Biomed Biotechnol* 2009;2009:Article ID:594678. doi:10.1155/2009/594678.
- Budhu A, Ji J, Wang XW. The clinical potential of microRNAs. *J Hematol Oncol* 2010;3:37.
- Erson AE, Petty EM. MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet* 2008;74(4):296-306.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;5(7):522-31.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(30):10513-8.
- Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W, Cui Q. An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS ONE* 2008;3(10):e3420.
- The human microRNA disease database
Erişim: <http://202.38.126.151/hmdd/miRNA/md/>
Erişim tarihi: 09.04.2012.
- Chiba Y, Hijikata T. MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: preface. *J Pharmacol Sci* 2010;114(3):262-3.
- Rupaimoole R, Han HD, Lopez-Berestein G, Sood AK. MicroRNA therapeutics: principles, expectations, and challenges. *Chin J Cancer* 2011;30(6):368-70.
- Kota J, Chivukula RR, O'Donnell K.A, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 2009;137(6):1005-17.
- Bhardwaj A, Singh S, Singh AP. MicroRNA-based Cancer Therapeutics: Big Hope from Small RNAs. *Mol Cell Pharmacol* 2010;2(5):213-9.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007;302(1):1-12.
- Love TM, Moffett HF, Novina CD. Not miR-ly small RNAs: big potential for microRNAs in therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(2):309-19.
- Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjörn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 2008;452(7189):896-9.
- Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438(7068):685-9.
- Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006;3(2):87-98.
- Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* 2007;4(9):721-6.
- Ebert MS, Sharp PA. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA* 2010;16(11):2043-50.

29. Xiao J, Yang B, Lin H, Lu Y, Luo X, Wang Z. Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of micro-RNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4. *J Cell Physiol* 2007;212(2):285–92.
30. Bader AG, Lammers P. The therapeutic potential of microRNAs. discovery technology.
Erişim:<http://www.miRNArx.com/pdfs/The%20Therapeutic%20Potential%20of%20microRNAs.pdf>.
Erişim tarihi:15.04.2012.
31. Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, Patrawala L, Yan H, Jeter C, Honorio S, Wiggins JF, Bader AG, Fagin R, Brown D, Tang DG. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med* 2011;17(2):211-5.
32. Dimond PF. Chasing the Therapeutic Potential of miRNAs. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 2009;1-3.
Erişim:http://www.genengnews.com/news/bnitem_print.aspx?name=62345106.
Erişim tarihi: 10.04.2012.
33. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, Ørum H. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010;327(5962):198-201.
34. What are miRNAs?
Erişim: <http://www.miragentherapeutics.com/87/September%2030,202010/>.
Erişim tarihi: 12.04.2012.
35. Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi RU, Yamamoto Y, Kosaka N, Kawamata M, Kelnar K, Bader AG, Brown D, Ochiya T. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther* 2010;18(1):181-7.
36. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 2009;137(6):1005-17.
37. Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjörn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 2008;452(7189):896-9.
38. Therapy Analysis-microRNA.
Erişim: http://www.pharmaprojects.com/therapy_analysis/microR_A-0808.html.
Erişim tarihi:15.04.2012.