



Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Derleme Makale

Virüslerin Kodladığı Uzun ve Kısa Kodlamayan RNA'lar

 Mehmet Kara^{a,*}

^a Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Bursa, TÜRKİYE

* Sorumlu yazarın e-posta adresi: mehmetkara@uludag.edu.tr

DOI:10.29130/dubited.1212643

ÖZ

Yeni geliştirilen RNA dizileme teknolojileri ile yaklaşık son on yıldır, memeli genomlarının önceden çöp, 'junk' DNA olarak görülen kısımlarının aslında aktif olarak RNA'ya dönüştükleri gözlemlenmektedir. Yapılan biyoinformatik analizler ve proteomik çalışmalar, bu RNA ürünlerinin çok büyük bir kısmının proteine dönüşmediğini göstermektedir. Uzun kodlamayan RNA olarak adlandırılan bu sınıftaki genlerin, günümüzde, bilinen genlerden sayıca daha fazla olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu RNA moleküllerinin nasıl üretildikleri ve ne yaptıklarını incelemek, hem genomun nasıl çalıştığını temel bilim düzeyinde anlamak hem de hastalıklara karşı tedavi geliştirmek ve erken teşhiste biyosensör olarak kullanmak için elzemdir. Virüsler, konak canlıının mekanizmalarını kullanan organizmalar olarak, bu tür RNA'ları kendi genomlarında barındırır ve proteinler gibi immün sistem gözetimi altında kalmadan görev yapan RNA moleküllerini, hücrenin yolaklarını kendi lehlerine manipüle etmede kullanırlar. Viral hastalıkları moleküler düzeyde anlamının yanı sıra, virüslerin aşı geliştirmede ve gen terapide vektör olarak kullanılmalarından dolayı viral kökenli RNA'ların fonksiyonlarını araştırmak giderek önem kazanmaktadır. Bu derlemede viral mikroRNA'lar ve halkasal circRNA'lar hariç tutularak, başlıca virüslerin ürettiği kodlamayan RNA'lardan ve hücredeki etki mekanizmalarından bahsedilmiştir. Ayrıca bu tür RNA'ların keşfi, yapısının belirlenmesi, karakterizasyonu ve fonksiyonunun anlaşılması için kullanılan yöntemlere değinilmiştir. Virüslerin konak hücreyi enfekte ederken kullandıkları bu küçük moleküllerin görevlerini ve etkilerini anlamak, bize RNA moleküllerinin düzenleyici ajanlar olarak ne kadar yaygın biçimde kullanıldığını göstermesi açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Virüs, Herpesvirüs, Uzun kodlamayan RNA, RNA protein etkileşimi, RNA omik teknikleri

Virally-Encoded Long and Short Non-Coding RNAs

ABSTRACT

Recent advances in RNA sequencing methods have elucidated that over the last decade, regions in the mammalian genome, which was previously described as 'junk DNA', is actively converted to RNA. Through bioinformatic and proteomic analyses, it was shown that the majority of these transcripts do not code for protein. Identified as long non-coding RNAs, these genes exceed the number of known protein-coding genes. It is required to investigate how these RNA molecules are generated and how they function, in order to understand how the genome works at a fundamental level and to design therapies against diseases and biosensors for early prognosis. Viruses, as organisms to utilize their hosts' mechanisms, encode for these RNA molecules which do not induce immune system-like proteins, and exploit ncRNAs to manipulate cellular pathways for their life cycles. In addition to understanding viral pathogenesis at a molecular level, it has become increasingly important to study virally encoded ncRNA function since viruses are used as vectors for gene therapy and vaccines. In this work, certain viral non-coding RNAs excluding the miRNAs and circular RNAs have been reviewed. Additionally, the methods and techniques for identification, characterization, and functional analyses for the lncRNA studies have been summarized. Understanding the key roles of these small molecules, which viruses utilize for infecting the host, is important for us to realize how commonly RNA is utilized for regulatory purposes.

Keywords: Virus, herpesvirus, long non-coding RNA, RNA-protein interactions, RNA omics technologies

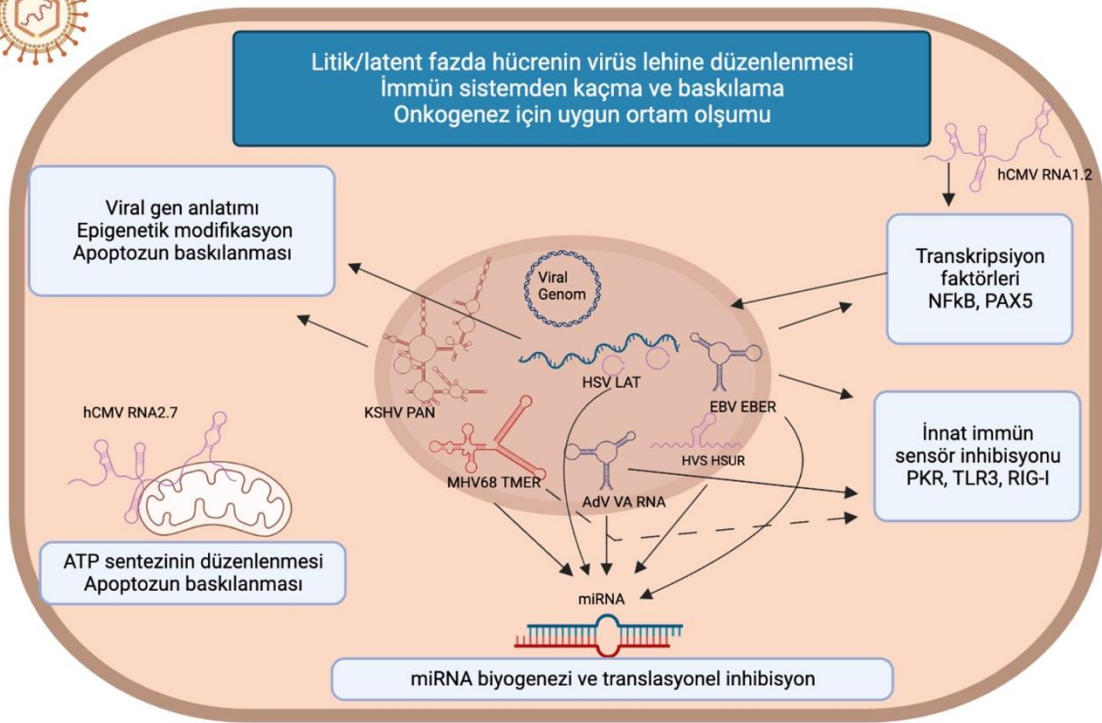
I. GİRİŞ

Uzun yıllar boyunca gen tanımı ve fonksiyon çalışmaları için memeli genomunun yaklaşık yalnızca %1-2'lik protein kodlayan kısmı odak noktasını oluşturmaktaydı. Fakat günümüzde daha ucuz ve uygulanabilir hale gelen mikroarray ve özellikle de RNA dizileme teknolojileri sayesinde bu anlayışın değişmeye başladığı belirgin hale gelmiştir[1]–[3]. Yeni geliştirilen teknikler ve uygulamalarla birlikte, bir çok farklı canlının genomunda önceden fonksiyonu belirlenmemiş ve neredeyse göz ardı edilmiş bölgelerinin yüksek miktarda ve çeşitlilikte transkripsiyona uğradığı artık bilinmektedir[4]. Virüsler konakları ile birlikte evrimleşen organizmalar olarak, bu transkripsiyonel mekanizmaları kullanırlar ve kendi hayat döngüleri için genomlarından uzun kodlamayan RNA'lar (**long non-coding RNA, lncRNA**) üretirler[5].

Virüsler memeli genomlarına nazaran oldukça küçük olan genomlarını en verimli potansiyelde kullanmak durumundadırlar. Yapılan araştırmalarda, virüslerin intergenik transkripsiyon, alternatif 'splicing', çift yönlü transkripsiyon, alternatif promotör kullanımı, 'read through' durmaksızın transkripsiyon, ve yaygın transkripsiyon adı verilen mekanizmaları kullanarak çeşitli miktarlarda lncRNA'lar ürettikleri gösterilmiştir[6], [7]. Virüsler açısından, proteinler gibi Büyük Doku Uyuşum Kompleksi (**Major Histocompatibility Complex, MHC**) üzerinde sergilenmeyen ve kazanılmış bağışıklık sistemi uyarmayan bu RNA'lar hücrenin fonksiyonlarını virüs lehine düzenlemek ve kullanmak adına oldukça avantajlı bir araç-gereç fonksiyonu göstermektedir.

Günümüzde en iyi tanımlanmış viral lncRNA'lar herpesvirüs ailesine ait virüsler tarafından üretilmektedir[8]. Herpesvirüsler çift zincirli DNA genomuna sahip, zarflı, türüne göre 80-200 protein kodlama kapasitesine sahip virüslerdir. Herpesvirüsler bir konağa ilk kez bulaştıklarında litik faz denilen, dokulardan ve bazı durumlarda kandan enfeksiyöz virüs partiküllerinin elde edildiği bir akut enfeksiyona neden olurlar. İmmün sistemin devreye girmesi ve virüs konak arasında denge kurulması ile latent faz adı verilen oldukça sınırlı sayıda genin anlatımının yapıldığı, konakta ömür boyu süren, kronik bir enfeksiyon durumuna geçerler[9]. İmmün yetmezlik, stres ve değişen çevresel koşullar vb. durumlarda buldukları latent fazdan tekrardan aktif hale geldikleri birçok viral genin anlatımının yapıldığı ve enfeksiyöz partiküllerin üretildiği reaktivasyon olarak adlandırılan duruma neden olarak, yeni hücreleri enfekte eder ve konak virüs dengesini yeniden kurarlar[10]. Bu virüslerin konağı ömür boyu enfekte ettikleri latent enfeksiyon boyunca saklandıkları hücre içerisinde immün sistem gözetiminden kaçtıkları düşünüldüğünde, viral uzun kodlamayan RNA'ların, virüslerin yaşam döngüleri açısından önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. Viral lncRNA'ların fonksiyonlarının belirlenmesinin, hem hücrenin çoğalma, apoptoz, doğal immünite aktivasyonu/inhibisyonu ve onkogenez gibi yollarının nasıl düzenlendiğini anlama, hem de virüse karşı daha yenilikçi ve başarılı terapilerin geliştirilmesi adına ne kadar elzem olduğu ortaya çıkmaktadır.

Bu derlemenin amacı virüsler tarafından kodlanan uzun ve kısa kodlamayan RNA'ların üretim mekanizmalarına göre sınıflandırılması ve fonksiyonel açıdan hücredeki etki mekanizmalarını güncel literatürde bulunan çalışmalar ışığında değerlendirmektir. Şekil 1'de virüslerin hücrenin çeşitli yollarını virüs lehine düzenlerken kullandıkları bazı kodlamayan RNA'lar ve etkileşimleri gösterilmektedir. Burada gösterilen çeşitli örnekler metnin devamında detaylandırılmıştır. Derleme kapsamında bu örneklerin yanında kodlamayan RNA'ların keşfinde ve nasıl çalıştıklarını belirlemede kullanılan farklı dizileme ve antisense temelli purifikasyon metotları incelenmiştir.



Şekil 1. Viral kodlamayan RNA'ların virüs yaşam döngüsüne etki mekanizmaları. Enfeksiyon sonrasında çeşitli mekanizmalarla üretilen viral ncRNA'lar hücrenin proliferasyon, transkripsiyonun düzenlenmesi, epigenetik modifikasyonlar, miRNA biyogenezi ve hedef gene yöneltilmesi, immün sistemin baskılanması ve apoptozun inhibisyonu gibi mekanizmalarını etkiler ve hücre içi ortamı virüs lehine optimize ederler. Bu süreçler sonucunda onkogenik potansiyele sahip virüslerin enfeksiyonlarında viral ncRNA'lar tümör oluşumunu ve gelişimini tetikleyici etki gösterirler. HSV: Herpes Simpleks Virüs, LAT: Latens İlişkili Transkript, AdV: Adenovirüs, VA RNA: Virüs İlişkili RNA, EBV: Epstein-Barr Virüsü, EBER: Epstein-Barr Virüsü İlişkili RNA, HVS: Herpesvirüs Samiri, HSUR: HVS U zengin RNA, MHV68: Murine Gammaherpesvirüs 68, TMER: tRNA-miRNA kodlayan RNA, KSHV: Kaposi Sarkomu İlişkili Herpesvirüs, PAN: Poliadenillenmiş Nüklear RNA, hCMV: İnsan Sitomegalovirüs, PKR: Protein Kinaz R, TLR: Toll benzeri reseptör, RIG-I: Retioik asit indüklenen gen 1, NFKB: Nüklear Faktör Kappa B, PAX5: Paired Box 5. Şekil Biorender'da (<https://biorender.com/>) oluşturulmuştur.

II. ÜRETİM MEKANİZMALARINA GÖRE VİRAL KODLAMAYAN RNA'LAR

Genellikle lncRNA'lar için boyut açısından görece bir eşik olarak 200 nükleotidlik bir alt limit belirlenmiş durumdadır. Ancak virüsler tarafından üretilen Adenovirüs (AdV) kökenli VA (Viral-Associated) RNA'ları[11], Epstein-Barr Virüsü (EBV) kökenli EBER (Epstein-Barr virus Encoded small RNA)'ler[12] ve Murid Gammaherpesvirüs 68 (MHV68) kökenli TMER (tRNA-linked miRNA encoding RNA) elementleri[13], yaklaşık 160-220 nükleotid boyutlarındadır ve bu derleme kapsamında viral kodlamayan RNA'lar içerisinde bahsedilecektir. Küçük kodlamayan RNA'lar denildiğinde ilk akla gelen tür olan mikroRNA'lar bu derlemeye lncRNA'lar ile olan etkileşimleri haricinde dahil edilmemiştir. Viral miRNA'ların fonksiyonları ve üretim mekanizmaları çeşitli derlemelerde incelenmiştir[14]–[18].

Bu bağlamda viral lncRNA'lar sentezlendikleri mekanizma açısından RNA polimeraz II (pol II) ve RNA polimeraz III (pol III) ürünleri olarak genel itibarıyla uzun ve kısa kodlamayan RNA'lar şeklinde iki sınıfa ayrılabilirler. Fakat bu tanımın istisnası olarak Herpesvirüs samiri'nin kodladığı, 80-140 nükleotid uzunluğunda HSUR (Herpesvirus Samiri U-rich RNA) elementleri[19]–[21] RNA pol II tarafından sentezlenir ancak kısa kodlamayan RNA'lar olarak tanımlanabilirler.

A. RNA POL III TARAFINDAN SENTEZLENEN VİRAL KODLAMAYAN RNA'LAR

Hücre tarafından tRNA'ların sentezi için kullanılan RNA pol III promotörleri çevresel sinyallere çok daha az duyarlıdır ve sürekli olarak yüksek miktarlarda RNA üretebilme kapasitesine sahiptir[22]. Bu özellikleri dolayısı ile çeşitli virüslerin bu transkripsiyonel mekanizmayı kullanarak hücreyi kendi lehine manipüle etmek için RNA üretmesi hem ilginç hem de virüs açısından oldukça verimli bir yöntem teşkil etmektedir. Konak tarafından üretilen Pol III ürünü ncRNA'ların 7SL ve U6 gibi en bilinen örnekleri (tRNA'lar ve 5srRNA haricinde) ribonükleoproteinlerin katlanmasında, farklı subunitlerin bir araya gelmesinde iskele görevi görmesinde ve 'splicingin' gerçekleşmesinde rol oynamaktadırlar. Viral kökenli pol III ncRNA'ları benzer fonksiyonları virüs lehine yönetmenin yanında 'decoy' olarak tanımlanan yanıltıcı ve inhibe edici moleküller olarak görev yaparlar[23]. Küçük gen yapıları dolayısıyla viral genomda sınırlı yer kapladıklarından virüsler için avantaj sağlarlar.

Adenovirüsler (AdV) doğada farklı serotiplerde oldukça yaygın olarak bulunan ve solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan virüslerdir. Ayrıca günümüzde hem gen terapi hem de aşılmalarda (Covid19 aşılardan Sputnik V ve Oxford AstraZeneca gibi) vektör olarak kullanılan bu virüslerin viral uzun kodlamayan RNA'larının fonksiyonlarını anlamak önemlidir. AdV tarafından üretilen ve yaklaşık 160 nükleotid uzunluğunda olan VA I ve II RNA'ları enfekte hücrede 10^7 gibi oldukça yüksek bir kopya sayısına ulaşmaktadır. Bu RNA'ların delesyonları virüsün *in vitro* büyüme kinetiğine etki etmemektedir ve ayrıca VA mutant AdV'nin *in vivo*'daki fonksiyonu bilinmemektedir [24]. Hücre içi doğal immün sistemin önemli sensörlerinden biri olan çift zincirli RNA sensörü Protein Kinase R (PKR) inaktivasyonuna neden olmanın[25] yanında VA RNA parçalanarak miRNA dizileri ortaya çıkarmaktadır[26]. Hücre içinde yüksek miktarda Ago proteinine yerleşmiş halde VA I'den oluşan miRNA ve kök dizisinin hedeflediği mRNA'lar bulunmaktadır[27].

Epstein-Barr Virüsü (EBV) neredeyse bütün dünya popülasyonunu enfekte eden ve Burkitt lenfoma, Hodgkin lenfoma ve nazofarenks kanseri gibi çeşitli kanser türlerinin gelişimi ile ilişkili bir virüstür. Hiç bir viral protein anlatımının yapılmadığı durum da dahil olmak üzere, birden fazla latent formu (Latency 0, I, II, III) bulunmaktadır ve EBER I ve II adı verilen yaklaşık 170 nükleotid büyüklüğündeki ncRNA'lar EBV'nin bütün latent formlarında yüksek miktarda bulunurlar[28]. Nüklear RNA'lar olarak tanımlanmalarına rağmen sitoplazmada ve ekzozomlarda yaygın olarak buldukları gösterilmiştir[29]. PKR ve RIG-I gibi önemli doğal immün sistem sensörlerine bağlanarak hücrede onkogenезin gelişmesinde rol oynarlar[30], [31]. EBER 2 RNA'sı EBV genomundaki 'terminal repeat' adı verilen uç tekrar dizilerinden üretilen yeni transkriptlerle eşleşerek, B hücreleri gelişimi için önemli olan transkripsiyon faktörlerinden PAX5 proteinini EBV genomuna getirir ve viral gen anlatımının düzenlenmesini sağlar. EBER2'nin yok edildiği durumlarda ise viral gen ekspresyonu ve dolayısıyla hücreden virüs üretimi önemli düzeyde düşmektedir[32]. Genel paradigma, EBV'nin naif B hücrelerini enfekte ederek, bu enfekte hücreyi daha uzun süreli kalabilecek olduğu hafıza B hücrelerine dönüştürdüğü yönündedir. Bu süreçleri yönetirken kullanmış olduğu ncRNA fonksiyonlarının belirlenmesi hem EBV kaynaklı kanserlerin tedavilerine katkı sağlamada hem de B hücrelerinin immün yanıtındaki gelişim evrelerinin anlaşılmasında büyük önem taşımaktadır.

Murine gammaherpesvirüs 68 (MHV68) doğal olarak tarla ve orman faresi gibi kemirgenleri enfekte eden ve laboratuvar farelerinde de gammaherpesvirüs enfeksiyonlarını ve patogenezi incelemek için model olarak kullanılan bir virüstür. Farelerde tıpkı insan gammaherpesvirüslerindeki gibi benzer hastalığa ve lenfomalara neden olmaktadır[33]. MHV68 genomunun ilk 6 kb'lik kısmında 8 adet tRNA geni tanımlanmıştır ve bu tRNA'lar yapılan ilk analizlere göre buldukları antikodona ait amino asit ile yüklenmemektedirler[34]. miRNA'ların keşfi sonrasında yapılan analizlerde, bu tRNA'ların hemen sonrasında bir ya da iki adet 'stem-loop' adı verilen pre-miRNA yapısına sahip diziler barındırdıkları gözlemlenmiştir[35], [36]. Genel kabul gören miRNA biyogenezi sırasında,

RNA pol II ile üretilen öncül pri-miRNA dizileri önce nükleusta Drosha kompleksi ile sonrasında Dicer ile sitoplazmada kesilerek olgun miRNA'ları oluştururlar ve RISC (RNA-Induced Silencing Complex) içerisine yerleşirler. RISC makinası içerisinde yer alan miRNA'lar genellikle kök dizisi aracılığı ile hedef genleri tanıyarak, transkripsiyonel baskılamasını sağlarlar [37]. Normal yoldan farklı olarak, MHV68'de her bir tRNA promotör görevi görerek bu tRNA-miRNA hibrid dizilerini üretir ve RNaz Z ve Dicer aracılığıyla kesilmeleri sonucu (Drosha'dan bağımsız bir biçimde) toplamda 28 adet olgun miRNA ortaya çıkar [38]. Dolayısı ile hem tRNA hem de miRNA dizileri içeren yaklaşık 200 nükleotid uzunluğundaki bu RNA moleküllerine 'tRNA miRNA Encoding RNA' kısaltması olarak TMER adı verilmiştir. Bu dizilerden TMER4 barındırdığı miRNA dizilerinden bağımsız olarak virüsün latent enfeksiyon oluşturma kabiliyetini etkilemektedir. miRNA dizileri mutasyona uğratılmış fakat ikincil yapısı korunmuş olan TMER4 mutant virüs yabancı tip virüsten bir farklılık göstermezken, TMER4 ikincil yapısını bozan mutasyonlar virüsün ilk girdiği lenfoid dokudan dalağa geçişini yüksek oranda durdurmuştur[39]. Viral ncRNA'lar miRNA biyogenezini ve değişik sinyal yollarının aktivasyonu/ inhibisyonu gibi hücrede birden fazla mekanizma içerisinde yer alabilirler. Şaşırtıcı bir biçimde TMER4 mutasyonunun viral yayılmayı inhibe edici bu fenotipi, EBV EBER-1'in TMER4 yerine konulması ile ortadan kalmaktadır[40]. Bu iki farklı virüsün dizi açısından birbirine benzerlik göstermeyen ancak ikincil yapılarında kısmi oranda benzerlik gösteren RNA'larının birbirlerinin fonksiyonel homologları gibi davranmaları, bize ncRNA'ların virüs biyolojisinde ne kadar temel bir görev üstlendiğini ve dizi benzerliğinin bu tür olguları anlamada ne kadar yetersiz kaldığını göstermesi açısından çok önemlidir.

B. RNA POL II ÜRÜNÜ KISA KODLAMAYAN RNA'LAR

Yine gammaherpesvirüs ailesine ait olan, yeni dünya maymunlarını enfekte eden ve T hücresi lenfomalarına neden olan Herpesvirus Samiri (HVS), latent enfeksiyon sırasında HSUR adı verilen küçük nükleer RNA'lar üretmektedir[19]. Yukarıda kısaca değinildiği gibi HSUR'lar RNA pol II tarafından üretilirler ve biyogenez ve yapıları itibarı ile 'spliceosome' da görev alan snRNA'lara (U1, U2 snRNA gibi) benzerler ve polyA kuyrukları yoktur. Nükleusta üretilip sitoplazmaya transfer olurlar, 5' trimetil guanin şapka yapısını kazanarak tekrardan nükleusa geri dönerler[41]. HSUR1, miRNA 27 ailesi üyelerinin kök dizileri ve 3' uçlarına güçlü biçimde bağlanır ve parçalanmasını sağlar. T hücrelerinde kullanılabilir halde olan miR 27'nin azalması T hücresi aktivasyonunun uzun süreli olmasına neden olur ve dolayısıyla virüs kaynaklı onkogenin oluşumuna katkı sağlar[42]. HSUR2 ise G1-S hücre döngüsü geçişi ve hematopoietik kök hücre gelişimi için önemli genleri hedefleyen miR142-3p ve miR16'ya bağlanarak bu miRNA'larla yüklü olan RISC kompleksini virüsün latent fazda kalmasına katkısı olan hedef mRNA'lara yönlendirmektedir[43].

C. RNA POL II TARAFINDAN SENTEZLENEN VİRAL UZUN KODLAMAYAN RNA'LAR

Üstte verilen örneklerdeki gibi RNA pol III tarafından sentezlenen ncRNA'ların dışında, virüsler RNA pol II tarafından üretilen 5' şapka ve polyA kuyruğuna sahip lncRNA'lar da üretmektedirler. İnsan sitomegalovirüs (cytomegalovirus, hCMV) ile enfekte hücrelerde viral kökenli RNA transkripsiyonun yaklaşık üçte ikisini 4 adet kodlamayan RNA (RNA2.7, RNA1.2, RNA4.9 ve RNA5.0) teşkil etmektedir[44]. Bu RNA'lardan RNA2.7 mitokondriyal solunum zinciri kompleksi 1 proteinine bağlanarak enfekte hücrede ATP sentezinin stabil kalmasını sağlar ve apoptozu baskılar. RNA1.2 NF- κ B aktivasyonunu bloke ederek, proinflamatuar sitokin salınımını önler[45], [46].

Herpes Simpleks Virüs 1 (HSV) tarafından üretilen Latens İlişkili Transkript (Latency-Associated Transcript, LAT) viral kodlamayan RNA'ların en bilinen örnekleri arasındadır. Yaklaşık 8.3 kb büyüklüğündeki primer LAT RNA'sı 'splicing' sonrası 2.0 ve 1.5 kb büyüklüğünde 3' kuyruğa sahip kısmi olarak halkasal, 'kement' (lariat) adı verilen stabil intronik RNA'lar oluştururlar ve enfekte hücrelerde yüksek miktarda birikmiş halde bulunurlar[47]. LAT transkripti virüsün reaktivasyonu için gereklidir. HSV-1 ve HSV-2 LAT RNA'larının birbiriyle değiştirilmesi sonucu enfekte tavşan gözlerinden genital HSV-2'ye benzer bir reaktivasyon sıklığı gözlemlenmiştir. LAT+ virüsle enfekte

nöronlarda apoptoz baskılanırken, LAT- virüs enfeksiyonunda yüksek miktarda apoptoz gerçekleştiği gösterilmiştir[48]. LAT transkripti ayrıca Drosha ile işlenmesi sonrası viral miRNA'ları oluşturmaktadır. Bu miRNALAR aktivatör fonksiyona sahip viral proteinlerin anlatımını baskılayarak virüsün latent fazda kalmasını sağlamaktadır[49]. LAT ve viral miRNA haricinde herhangi bir viral gen anlatımının gözlemlenmediği HSV-1 enfeksiyonlarında bu kodlamayan RNA'ların fonksiyonları virüsün reaktivasyonu ve latent fazda kalması açısından önemi oldukça büyüktür. Halen HSV-1 genomunun LAT bölgesinden çeşitli RNA'ların varlığı RNA dizileme yöntemleri ile gösterilmekte ve fonksiyonel çalışmalar yapılmaktadır[50].

Kaposi Sarkomu ilişkili Herpesvirus (KSHV) insanlarda en son keşfedilen herpesvirüstür. AIDS gibi immün yetmezlik durumlarında Kaposi Sarkomuna neden olur. Bunun yanında birden fazla lenfoma çeşidinin gelişimi ile ilişkilidir. KSHV litik enfeksiyonda PAN adı verilen 1.1 kb boyutunda polyA kuyruğuna sahip nükleer (PAN) bir RNA sentezler. PAN RNA litik enfeksiyon sırasında hücrede bulunan viral RNALARIN %80'nini oluşturmaktadır ve nükleusta oldukça yüksek seviyelerde birikir[51], [52]. Viral transkripsiyon aktivatör proteinini ve hücrel transkripsiyon makinasını genomda PAN lokusuna getirerek viral genlerin anlatımının yapılmasını sağlar. PAN RNA interferon düzenleyici faktör 4 (IRF4) ile etkileşerek immün modulator genlerin anlatımını baskılar[53]. Latent fazdaki en önemli protein olan LANA ile etkileşerek reaktivasyon sırasında LANA'nın viral genomdan ayrışmasını tetikler[54]. KSHV PAN RNA'sının yanında henüz yeni tanımlanmış olan yaklaşık 10 kb büyüklüğünde viral genomda latent genlere ve miRNA'lara antisense olan ALT (Antisense Latency Transcript) adı verilen bir RNA kodlamaktadır[55]. HSV-1, EBV, MHV68 gibi diğer herpesvirüslerde de yaygın olarak bulunan bu RNA'ların anlatım düzeylerinin düşük olması, yalnızca latent dönemde gözlemlenmeleri, büyük boyutta olmaları ve buldukları lokusun kompleks olması gibi nedenler dolayısı ile henüz fonksiyonları tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak birbirinden farklı virüslerde bu tür RNA'ların bulunması antisense transkripsiyonun virüslerdeki önemini göstermektedir ve daha detaylı çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Alfaherpesvirüs ailesinden kanatlılarda Marek's hastalığı olarak bilinen T hücresi lenfomalarına neden olan Marek's Disease Virus (MDV) kendi telomer RNA (TR) şablonunu kodlaması açısından ilginçtir. Viral TR (vTR) yaklaşık 400 nükleotid uzunluğundadır ve tavuk TR genine yüksek oranda homoloji gösterir. vTR'ın ikincil yapısında bulunan varyasyonların telomeraz aktivitesini konağın TR dizisine nazaran 3 kat arttırdığı gözlemlenmiştir. Konak TR dizisinin vTR ile değiştirildiği mutant virüsler *in vitro* ortamda büyüme açısından bir farklılık göstermezken, enfekte konakta onkogenез ve transformasyon açısından %50 oranında düşüş gösterdiği saptanmıştır[56]. Telomeraz aktivitesinin kanser oluşumundaki önemi göz önünde bulundurulduğunda, MDV vTR'ın viral patogenezdaki rolü oldukça önemlidir.

Nazofarenks kanser örneklerinde ve hücre hatlarında EBV genomunun restriksiyon enzimi kesimi haritasına göre isimlendirilmiş olan 'BamH1 Rightwards' bölgesinden BART adı verilen yüksek sayıda alternatif 'splicing' izoformu gösteren ve genellikle nükleer fraksiyonda bulunan RNA'lar keşfedilmiştir[57], [58]. BART transkriptlerinden bazıları muhtemel ORF dizilerine sahip olmasına rağmen, bu RNA'lar genel olarak pri-miRNA olarak 44 adet EBV miRNA oluşumunda görevlidir[59], [60]. Ayrıca nükleer olan transkriptlerin cDNA olarak EBV negatif hücre hatlarında anlatımının yapılması, c-myc yolağının aktivasyonu ve XBP1'in azalması gibi kanser gelişiminde önemli transkripsiyonel değişikliklere neden olmaktadır[61]. İlginç olan detaylardan bir tanesi ise günümüzde yaygın olarak laboratuvarında kullanılan suş olan B95-8 EBV'nin, BART lokusunun önemli bir kısmını içermemesidir[62]. Ancak bu suş EBV'nin B hücrelerini *in vitro* ortamda transforme etmesi açısından yeterlidir. Dolayısı ile latent dönemde yüksek miktarda anlatımı yapılan miRNA ve lncRNA'ları içermeyen bir virüsün *in vitro* ortamda etkin biçimde transformasyona neden olurken, doğadaki izolatlarının korunmuş bir şekilde bu RNA'ları buldurması oldukça ilginçtir. Bu yüzden EBV kökenli kanserleşmelerde ncRNA etkileri moleküler yolları açıklamaları açısından detaylı araştırılması gereken konulardan biridir.

MHV68 bize transkripsiyonel çeşitliliği *in vivo*'da inceleme imkânı sunan bir model organizmadır. İlk genom analizinden bu yana, çeşitli araştırmalarda transkripsiyonel olarak bildiğimizden daha karmaşık

bir yapısı olduğu gösterilmiştir[7], [34], [36]. Yeni tanımlanmış transkriptlerden bir tanesinin hem miRNA kodlayan 3 adet TMER'e antisense olması hem de latent enfeksiyon açısından B hücresi sinyal yollarını düzenleyen M2 proteini ve kemokin bağlayan M3 proteini ile aynı lokusta bulunması açısından önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir[63]. M3 ve M2 genleri ile üst üste bulunan M3-04 adı verilen bu transkript polyA kuyruğuna sahip olması ve nükleer fraksiyonda yer alması dolayısı ile lncRNA gibi işlev gördüğü tahmin edilmektedir. Antisense miRNA'lardan iki tanesinin mutasyonu ile M3-04 seviyesinin arttığı ve *in vivo*'da bu mutant virüsün daha yüksek bir litik virüs titrasyonu gösterdiği gözlemlenmiştir[63]. Virüslerde yaygın olarak bulunan benzeri lncRNA'ların fonksiyonel olarak analizinin yapılması sonucu viral kökenli kodlamayan RNA'ların hücrede hangi yolları nasıl etkilediklerini ortaya çıkarmak mümkündür. Bu mekanizmaların açığa çıkarılması viral kaynaklı hastalıkların teşhis ve tedavilerinde kullanılacak ilaç, aşı, biyosensör gibi ürünlerin geliştirilmesine olanak sağlayabilirler.

D. RNA GENETİK MATERYALİNE SAHİP VİRÜSLERİN ÜRETTİĞİ KODLAMAYAN RNA'LAR

Konu üzerindeki genel anlayışlardan bir tanesi, RNA'yı genetik materyal olarak kullanan virüslerin miRNA ya da lncRNA gibi RNA temelli düzenleyici mekanizmaları kullanmadığı yönündedir. Kodlamayan RNA'nın işlenmesi ve kullanılması sürecinde Drosha gibi çeşitli nükleaz aktivitesi gösteren enzimlerin bulunması viral genomun bütünlüğünü ve miktarını tehlikeye atacağından, RNA genoma sahip olan ya da retrovirüsler gibi bir RNA aracıya ihtiyaç duyan virüslerin, bu mekanizmaları kullanmaktan kaçındıkları hipotezi yaygın olarak kabul görmektedir. Ancak RNA genoma sahip virüsler ve retrovirüsler subgenomik RNA molekülleri üreterek bu olguya istisnai durumlar ortaya koymaktadır. En bilinen örneklerden birisi olan Bovine Leukemia Virus (BLV), tRNA benzeri promotörler aracılığı ile küçük RNA'lar kodlar ve bu RNA'lardan miRNA'lar üreterek tümör oluşumunda rol alan mRNA'ları hedefler[64]. İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü (Human Immunodeficiency Virus, HIV) miRNA benzeri saç tokası yapısını andıran Transaktivasyon Yanıt (Trans-Activation Response, TAR) dizileri bulundurmaktadır. TAR dizisini içeren RNA molekülleri doğal bağışıklık sensörü Protein Kinaz R (PKR) yolağını inhibe ederek virüsün çoğalmasına katkı sağlar[65]. Pozitif anlamlı tek zincirli RNA virüslerinden flavivirüsler genomlarının 3' uçlarında yüksek derecede ikincil katlanmalar gösteren bir UTR kısmı içerirler. Bu 3' UTR'ler ekzonükleaz aktivitesine dirençli olduğundan XNR1 degradasyonundan etkilenmezler. Böylelikle hücrede yüksek miktarda, yaklaşık 300-500 nükleotid uzunluğunda subgenomik flavivirüs RNA'sı (sfRNA) birikir. Bu küçük parçalanmayan sfRNA'lar hücrede RNAi yollarını doyurur, doğal bağışıklık sensörlerinden interferon üretimini tetikleyen RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene I) aktivasyonunu bloke eder[66] ve flavivirus enfeksiyonu ve patogenezi için önemlidir[67].

III. KODLAMAYAN RNA'LARIN KEŞFİNDE VE FONKSİYONUNUN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Viral genomlarda bulunan kodlamayan RNA'ları keşfetmek için Illumina temelli RNA dizileme yöntemleri sınırlı seviyede kalmaktadır. Illumina yaklaşık 150-300 baz aralığında bulunan kütüphaneleri yüksek doğrulukta dizileme yapabilir[68]. Anlatımı yapılan DNA'nın hangi zincirinden RNA üretildiğini bilmek ve 'splice' noktaları net biçimde bulmak için alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmakta ve geliştirilmektedir. Dolayısı ile, karmaşık transkriptomları çözümlenmek için son yıllarda Pac Bio SMRT (Single Molecule Real Time) ve Oxford Nanopore gibi uzun molekülleri dizileme (Long Read Sequencing; LRS) teknikleri kullanılmaktadır[69]. O'Grady ve ark. geliştirdiği TRIMD (Transcriptome Resolution through Integration of Multi-platform Data) adı verilen biyoinformatik panelde, (i)Illumina, (ii)PacBio SMRT dizileme ve (iii)5' deepCAGE dizilime yöntemleri kullanılarak sırasıyla (i)genel RNA miktarı ve ekzon-intron birleşim noktaları, (ii) karmaşık uzun izoformlar ve

(iii)transkripsiyon başlangıç noktaları belirlenmiştir. Daha sonra bu çoklu veri kümeleri TRIMD ile birleştirilerek transkriptler tanımlanmıştır. EBV, MHV68, KSHV ve HSV-1 genomlarında yeni keşfedilen alternatif mRNA formlarının ve uzun kodlamayan RNAların analizi yapılmıştır[70]–[72]. Uzun molekülleri dizileme (LRS) analizleriyle herpesvirüs, retrovirüs, baculovirüs ve poxvirüs gibi ailelere ait başka virüslerin de transkriptomik analizleri yapılmıştır[69], [73], [74]. Bu analizlerin sonucunda ortaya çıkan temel bulgular, antisense transkripsiyonun, çok genli transkriptlerin, ‘read through’ adı verilen bilinen polyA sinyal dizilerinin üstünden geçen transkriptlerin ve üst üste binen (overlap) transkripsiyonun oldukça yaygın olarak virüsler tarafından kullanıldığını göstermektedir.

Gen anlatımının kantitatif olarak ölçümünün yapıldığı qRT-PCR analizlerine dayalı viral ncRNA çalışmaları, transkripsiyonel açıdan oldukça karmaşık olan bu virüsleri anlamada yeterli olmayacaktır. Dolayısı ile Northern blot yöntemini kullanarak üzerinde çalışılan RNA izoformuna yönelik mutasyon, siRNA dizaynı ya da dizi spesifik qRT-PCR primer dizaynı yapmak daha anlamlı sonuçlar almak açısından önemlidir[75]. Özellikle kompakt genomlu virüslerdeki lncRNA spesifik fonksiyon çalışmaları için ise yalnızca siRNA ve shRNA temelli ‘knockdown’ yöntemlerine dayalı kalmak yerine poliadenilasyon sinyal dizilerini kullanarak kısaltılmış transkriptler ya da promotör mutasyonları oluşturarak elde edilen verileri desteklemek gerekmektedir. Burada göz önüne alınması gereken noktalardan bir tanesi ncRNA fonksiyonlarının büyük çoğunluğunun nükleus içerisinde gerçekleştiği düşünülürse, sitoplazmik RNAi temelli siRNA ya da shRNA yöntemleri transkript seviyesini düşürmede yetersiz ya da etkisiz kalabilir. CRISPR temelli ‘knockout’ modelleri ya da hücrede doğal olarak var olan RNaz H yardımıyla, nükleotidleri modifiye edilmiş antisense oligonükleotidler (ASO) kullanarak lncRNA seviyeleri deneysel olarak azaltmak daha verimli bir yöntem sunabilir.

Fonksiyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi de RNA dizisine komplementer biotinlenmiş oligonükleotid problemler kullanılarak gerçekleştirilen biyokimyasal analizlerdir[76], [77]. ‘RNA Antisense Purification’ (RAP), ‘Chromatin Isolation by RNA Purification’ (Chirp), ‘Capture hybridization analysis of RNA Targets’ (CHART) gibi teknikler temel olarak RNA’ya bağlanan faktörleri, RNA spesifik problemler aracılığıyla saflaştırmaya dayalıdır. Fikse edilmiş hücrelerden izole edilen RNA’nın etkileşimde olduğu proteinler ve DNA segmentleri ayrıştırılır, proteinler için kütle spektrometresi, DNA için dizileme yöntemleri ile RNA’nın bağlandığı faktörler belirlenebilir. Bu tür analizler yapılırken dikkat edilmesi gereken önemli bir husus RNA’nın açıkta olan kısımlarının bulunmasıdır. Eğer üzerinde çalışılan RNA molekülü yüksek miktarda protein ile kapatılmış durumda ise çeşitli RNaz enzimleri kullanılarak prob dizayn edilmesi gereken bölgeler bulunmak zorundadır[78]. ncRNA biyolojisinde cevaplanması gereken sorular bahsedilen tekniklerin kombinasyonları kullanılarak araştırılmaya çalışılmaktadır.

IV. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kodlamayan RNA’lar memelilerde ve bu hücreleri enfekte edebilen virüslerde yaygın olarak gözlenmektedir. Bu derlemede bahsi geçen büyük çoğunluğunu herpesvirüslerin kodladığı viral kodlamayan RNA örnekleri büyüklükleri ve üretildikleri transkripsiyon mekanizmaları açısından değerlendirilmiştir. RNA moleküllerinin dizi spesifik etkileşimlerle DNA’ya bağlanabilme ve oluşturdukları ikincil ve üçüncül yapı aracılığıyla proteinlerle etkileşme özellikleri bulunmaktadır. Bu nedenle hem konak hem de virüs tarafından çeşitli yollarda RNA’ları düzenleyici faktörler olarak görmekteyiz. Genel olarak, viral kodlamayan RNA’lar viral latent enfeksiyonun devamlılığının sağlanması, apoptozun baskılanması, tümör gelişiminin tetiklenmesi, immün sistemden kaçış gibi virüse avantaj sağlayacak yollarda rol oynamaktadır. Çeşitli virüsler farklı dizilerde kodlamayan RNA’lar üreterek benzer hücresel mekanizmaları etkilemektedir.

Son yıllarda kullanılan ‘derin’ dizileme teknikleri RNA üretiminin ne kadar yaygın olduğunu göstermiştir. Ribozom profillemeye deneylerinde translasyona uğramadıkları gösterilmiş olan ya da biyoinformatik analizlerde anlamlı bir okuma çerçevesi (ORF) bulundurmayan RNA’ların hücredeki hangi mekanizmaları etkiledikleri henüz detaylı olarak bilinmemektedir. Virüslerin ürettiği

ncRNA'ların karakterizasyonunun yapılması ve fonksiyonlarının belirlenmesi bize yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde çeşitli fikirler ve öneriler sunabilir. Örneğin EBV kökenli EBER'ler ekzozomlarda bulduklarından viral kaynaklı tümörlerde serumdan taranabilirler ve bu kanserlerde biyosensör olarak kullanılabilirler. HSV-1 kökenli LAT transkripti latent nöron hücrelerinde virüsün ürettiği tek üründür. Antisense oligonükleotid ya da CRISPR gibi yöntemlerle LAT anlatımı engellendiğinde, virüsün reaktivasyonuna ve HSV-1 kaynaklı hastalıklara çözüm aranabilir. Bir diğer yandan viral ncRNA'lar gösterdikleri etkiler dolayısı ile başka hastalıkların tedavisinde kullanılabilir mi sorusu da önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Virüsler immün sistemi baskılama ya da immün sistemden kaçma özellikleri açısından oldukça başarılı stratejiler geliştirmişlerdir. Bu özellikleri barındıran viral ncRNA'ların potansiyelleri değerlendirilmelidir. Örneğin AdV kökenli VA RNA'larının ve EBV kökenli EBER RNA'larının PKR sensörü aracılığıyla immün sistemi inhibe edici etkisi bulunmaktadır. Bu tür viral ncRNA'lar otoimmün hastalıklar gibi durumların tedavisinde kullanılabilir. Bu yaklaşımların gerçeklik kazanabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Hem virüs hem konak açısından, lncRNA ya da üretilen RNA'lar kapsamında her zaman göz önünde tutulması gereken konulardan bir tanesi etki mekanizmasının ürün mü yoksa süreç mi kaynaklı olduğudur. Genomda çok yaygın olarak görülmesi ve bazı durumlarda düşük kopya sayılarına sahip olmaları gibi sebeplerden dolayı, oluşan RNA ürünlerinin fonksiyonel olmadığı durumlarda mevcuttur. Bu tür durumlarda lncRNA'lar antisense oligonükleotidler aracılığıyla yok edildiğinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemekte ancak lncRNA'nın promotörü mutasyonlarına uğratıldığında etki gözlenmektedir. lncRNA'nın kendisi değil fakat aktif biçimde transkripsiyona uğraması, yakınında bulunan genlere RNA pol II'nin getirilmesi, kromozomda ilmek yapıları oluşturarak transkripsiyon artırıcı 'enhancer' bölgelerinin yakınlaştırılması ve epigenetik modülatör enzimlerin bölgeye getirilmesi gibi süreçler için önemli olabilir. Örneğin insülin benzeri büyüme faktörü 2 reseptörü (Igf2r) geninin 'imprint' edilmesi Airn lncRNA'sının transkripsiyonuna bağlıdır. Airn lncRNA'sının promotörü mutasyona uğratıldığında 'imprinting' inhibe edilmiş fakat Airn geninin aşağı bir bölgesinde poliadenilasyon sinyali konulduğunda ve kısaltılmış bir transkript ürettirildiğinde normal 'imprinting' gözlemlenmiştir[79]. Dolayısı ile lncRNA'nın kendisi değil aktif olarak transkribe edilmesi bir etki mekanizması oluşturmaktadır. Bu olgu viral kodlamayan RNAların fonksiyonları incelenirken dikkat edilmesi gereken önemli hususlardan biridir.

Virus patogenezi ve biyolojisi çalışmalarında mutasyonlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüze kadar çok çeşitli virüs ailelerinde viral genlerin fonksiyonlarını anlamak için insersiyon ve delesyon mutasyonları oluşturulmuş ve bu mutant virüslerin fenotipik değişikliklerini açıklarken genellikle proteinlerin görevli olduğu düşüncesi ile hareket edilmiştir. Viral transkriptomların karmaşıklığını göz önünde bulunduracak olursak, viral proteinlere atfedilen fenotipik özelliklerin belki de bir kısmının ncRNA fonksiyonu kaynaklı olduğu ihtimali değerlendirilmelidir. Viral genomların genler açısından yoğunluğu da düşünüldüğünde, mutant virüs oluşturmada lokusların ncRNA üretme potansiyeli incelenmelidir. Lokustan üretilen proteinin mi yoksa ncRNA'nın mı etki gösterdiğini açıkça ortaya koyabilecek olan mutasyonlar ve deneyler tasarlanmalıdır.

lncRNA'ların dizi noktasında düşük miktarda homoloji göstermeleri, çeşitli virüslerde çok çeşitli dizilere sahip ncRNA'ların (Tablo 1) fonksiyonları açısından ortak paydaların bulunması adına zor bir problem teşkil etmektedir. Bu hususta viral kodlamayan RNA fonksiyon çalışmalarında samanlıktan iğne aramaktan çok ileri olmasak da yapılan araştırmalarda ortaya koyulan bulgular ümit vericidir.

Tablo 1. Başlıca viral kodlamayan RNA'lar.

Virüs	RNA	Uzunluk (baz)	RNA polimeraz	Etkisi	Kaynak
Adenovirüs	VA RNA I ve II	~160	pol III	PKR ve RIG-I inhibisyonu	[11], [25]
HSV-1	LAT	~2000	pol II	HSV-1 gen anlatımının baskılanması, reaktivasyon, apoptozun baskılanması, miRNA biyogenezi	[48], [49]
MDV	vTR	~400	pol II	Lenfomanın tetiklenmesi, telomer uzaması	[56]
hCMV	RNA 2.7, 1.2, 4.9, 5.0	~1200- 5000	pol II	Apoptoz baskılanması, NF-kB yolağını bloke etme	[44], [46]
mCMV	7.2 kb sis RNA	~7200	pol II	Litik fazdan latent faza geçiş	[80]
EBV	EBER I ve II	167-172	pol III	Apoptozun baskılanması, doğal immün sensörlerin inhibisyonu, viral gen anlatımının düzenlenmesi	[30], [32]
HSV	HSUR1-7	75-144	pol II	miRNA'lara bağlanarak translasyonun regülasyonu	[19]
KSHV	PAN	1060	pol II	Geç litik viral gen anlatımı ve virionların salınımı	[52]
MHV68	TMER1-8	140-220	pol III	Viral yayılımın sağlanması, latent fazın devamlılığı	[39], [40]
MHV68	M3-04	~4000	pol II	Viral miRNAlara bağlanma, latent genlerin anlatımının düzenlenmesi	[63]
HIV	TAR	Değişken	pol II	PKR inaktivasyonu, miRNA oluşumu?	[65]
Flavivirüs (WNV, Dengue)	sfRNA	300-500	viral polimeraz	İnterferonun baskılanması, RNA bozulma yollarının baskılanması	[81]

V. KAYNAKLAR

- [1] T. Derrien, R. Johnson, G. Bussotti, A. Tanzer, S. Djebali, H. Tilgner, G. Guernec, D. Martin, A. Merkel, D. G. Knowles, J. Lagarde, L. Veeravalli, X. Ruan, Y. Ruan, T. Lassmann, P. Carninci, J. B. Brown, L. Lipovich, J. M. Gonzalez, M. Thomas, C. A. Davis, R. Shiekhattar, T. R. Gingeras, T. J. Hubbard, C. Notredame, J. Harrow, and R. Guigó, "The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression," *Genome Res*, vol. 22, no. 9, pp. 1775–1789, Sep. 2012.
- [2] S. Djebali, C. A. Davis, A. Merkel, A. Dobin, T. Lassmann, A. Mortazavi, A. Tanzer, J. Lagarde, W. Lin, F. Schlesinger, C. Xue, G. K. Marinov, J. Khatun, B. A. Williams, C. Zaleski, J. Rozowsky, M. Röder, F. Kokocinski, R. F. Abdelhamid, T. Alioto, I. Antoshechkin, M. T. Baer, N. S. Bar, P. Batut, K. Bell, I. Bell, S. Chakraborty, X. Chen, J. Chrast, J. Curado, T. Derrien, J. Drenkow, E. Dumais, J. Dumais, R. Dutttagupta, E. Falconnet, M. Fastuca, K. Fejes-Toth, P. Ferreira, S. Foissac, M. J. Fullwood, H. Gao, D. Gonzalez, A. Gordon, H. Gunawardena, C. Howald, S. Jha, R. Johnson, P. Kapranov, B. King, C. Kingswood, O. J. Luo, E. Park, K. Persaud, J. B. Preall, P. Ribeca, B. Risk, D. Robyr, M. Sammeth, L. Schaffer, L.-H. See, A. Shahab, J. Skancke, A. M. Suzuki, H. Takahashi, H. Tilgner, D. Trout, N. Walters, H. Wang, J. Wrobel, Y. Yu, X. Ruan, Y. Hayashizaki, J. Harrow, M. Gerstein, T. Hubbard, A. Reymond, S. E. Antonarakis, G. Hannon, M. C. Giddings, Y. Ruan, B. Wold, P. Carninci, R. Guigó, and T. R. Gingeras, "Landscape of transcription in human cells," *Nature*, vol. 489, no. 7414, pp. 101–108, Sep. 2012.

- [3] A. M. Khalil, M. Guttman, M. Huarte, M. Garber, A. Raj, D. R. Morales, K. Thomas, A. Presser, B. E. Bernstein, A. van Oudenaarden, A. Regev, E. S. Lander, and J. L. Rinn, “Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression,” *PNAS*, vol. 106, no. 28, pp. 11667–11672, Jul. 2009.
- [4] J. M. Engreitz, J. E. Haines, E. M. Perez, G. Munson, J. Chen, M. Kane, P. E. McDonel, M. Guttman, and E. S. Lander, “Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing,” *Nature*, vol. 539, no. 7629, pp. 452–455, Nov. 2016.
- [5] K. T. Tycowski, Y. E. Guo, N. Lee, W. N. Moss, T. K. Vallery, M. Xie, and J. A. Steitz, “Viral noncoding RNAs: more surprises,” *Genes Dev.*, vol. 29, no. 6, pp. 567–584, Mar. 2015.
- [6] C. Arias, B. Weisburd, N. Stern-Ginossar, A. Mercier, A. S. Madrid, P. Bellare, M. Holdorf, J. S. Weissman, and D. Ganem, “KSHV 2.0: A Comprehensive Annotation of the Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Using Next-Generation Sequencing Reveals Novel Genomic and Functional Features,” *PLOS Pathog*, vol. 10, no. 1, p. e1003847, Jan. 2014.
- [7] B. Y. H. Cheng, J. Zhi, A. Santana, S. Khan, E. Salinas, J. C. Forrest, Y. Zheng, S. Jaggi, J. Leatherwood, and L. T. Krug, “Tiled microarray identification of novel viral transcript structures and distinct transcriptional profiles during two modes of productive murine gammaherpesvirus 68 infection,” *J. Virol.*, vol. 86, no. 8, pp. 4340–4357, Apr. 2012.
- [8] T. Tagawa, A. Serquiña, I. Kook, and J. Ziegelbauer, “Viral Non-coding RNAs: Stealth Strategies in the Tug-of-war between Humans and Herpesviruses,” *Semin Cell Dev Biol*, vol. 111, pp. 135–147, Mar. 2021.
- [9] A. A. Nash, B. M. Dutia, J. P. Stewart, and A. J. Davison, “Natural history of murine gamma-herpesvirus infection.,” *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 356, no. 1408, pp. 569–579, Apr. 2001.
- [10] J. P. Simas and S. Efstathiou, “Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis,” *Trends in Microbiology*, vol. 6, no. 7, pp. 276–282, Jul. 1998.
- [11] T. Minamitani, D. Iwakiri, and K. Takada, “Adenovirus virus-associated RNAs induce type I interferon expression through a RIG-I-mediated pathway,” *Journal of Virology*, vol. 85, no. 8, pp. 4035–4040, Apr. 2011.
- [12] J. G. Howe and M. D. Shu, “Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements,” *Cell*, vol. 57, no. 5, pp. 825–834, Jun. 1989.
- [13] K. W. Diebel, A. L. Smith, and L. F. van Dyk, “Mature and functional viral miRNAs transcribed from novel RNA polymerase III promoters,” *RNA*, vol. 16, no. 1, pp. 170–185, Jan. 2010.
- [14] I. W. Boss and R. Renne, “Viral miRNAs: tools for immune evasion,” *Curr Opin Microbiol*, vol. 13, no. 4, pp. 540–545, Aug. 2010.
- [15] I. Jurak, A. Griffiths, and D. M. Coen, “Mammalian Alphaherpesvirus miRNAs,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1809, no. 11–12, pp. 641–653, 2011.
- [16] R. Mishra, A. Kumar, H. Ingle, and H. Kumar, “The Interplay Between Viral-Derived miRNAs and Host Immunity During Infection,” *Front Immunol*, vol. 10, p. 3079, Jan. 2020.

- [17] B. R. Cullen, "Viruses and microRNAs: RISCy interactions with serious consequences," *Genes Dev.*, vol. 25, no. 18, pp. 1881–1894, Sep. 2011.
- [18] R. P. Kincaid and C. S. Sullivan, "Virus-Encoded microRNAs: An Overview and a Look to the Future," *PLOS Pathog*, vol. 8, no. 12, p. e1003018, Dec. 2012.
- [19] H. L. Cook, H. E. Mischo, and J. A. Steitz, "The Herpesvirus saimiri Small Nuclear RNAs Recruit AU-Rich Element-Binding Proteins but Do Not Alter Host AU-Rich Element-Containing mRNA Levels in Virally Transformed T Cells," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 10, pp. 4522–4533, May 2004.
- [20] S. I. Lee and J. A. Steitz, "Herpesvirus saimiri U RNAs are expressed and assembled into ribonucleoprotein particles in the absence of other viral genes.," *J Virol*, vol. 64, no. 8, pp. 3905–3915, Aug. 1990.
- [21] G. Chavez-Calvillo, S. Martin, C. Hamm, and J. Sztuba-Solinska, "The Structure-To-Function Relationships of Gammaherpesvirus-Encoded Long Non-Coding RNAs and Their Contributions to Viral Pathogenesis," *Non-Coding RNA*, vol. 4, no. 4, p. 24, Dec. 2018.
- [22] H. Täuber, S. Hüttelmaier, and M. Köhn, "POLIII-derived non-coding RNAs acting as scaffolds and decoys," *Journal of Molecular Cell Biology*, vol. 11, no. 10, pp. 880–885, Oct. 2019.
- [23] R. J. White, "Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought," *Nat Rev Genet*, vol. 12, no. 7, pp. 459–463, Jul. 2011.
- [24] V. K. Vachon and G. L. Conn, "Adenovirus VA RNA: An essential pro-viral non-coding RNA," *Virus Res*, vol. 212, pp. 39–52, Jan. 2016.
- [25] G. D. Ghadge, S. Swaminathan, M. G. Katze, and B. Thimmapaya, "Binding of the adenovirus VAI RNA to the interferon-induced 68-kDa protein kinase correlates with function.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, no. 16, pp. 7140–7144, Aug. 1991.
- [26] N. Xu, B. Segerman, X. Zhou, and G. Akusjärvi, "Adenovirus virus-associated RNAII-derived small RNAs are efficiently incorporated into the rna-induced silencing complex and associate with polyribosomes," *J Virol*, vol. 81, no. 19, pp. 10540–10549, Oct. 2007.
- [27] E. Carnero, J. D. Sutherland, and P. Fortes, "Adenovirus and miRNAs," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1809, no. 11–12, pp. 660–667, Nov. 2011.
- [28] J. R. Arrand and L. Rymo, "Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells.," *J Virol*, vol. 41, no. 2, pp. 376–389, Feb. 1982.
- [29] W. Ahmed, S. Tariq, and G. Khan, "Tracking EBV-encoded RNAs (EBERs) from the nucleus to the excreted exosomes of B-lymphocytes," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 15438, Oct. 2018.
- [30] T. V. Sharp, M. Schwemmle, I. Jeffrey, K. Laing, H. Mellor, C. G. Proud, K. Hilse, and M. J. Clemens, "Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA," *Nucleic Acids Res*, vol. 21, no. 19, pp. 4483–4490, Sep. 1993.
- [31] M. Samanta, D. Iwakiri, T. Kanda, T. Imaizumi, and K. Takada, "EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN," *EMBO J*, vol. 25, no. 18, pp. 4207–4214, Sep. 2006.

- [32] N. Lee, W. N. Moss, T. A. Yario, and J. A. Steitz, “EBV Noncoding RNA Binds Nascent RNA to Drive Host PAX5 to Viral DNA,” *Cell*, vol. 160, no. 4, pp. 607–618, Feb. 2015.
- [33] E. J. Usherwood, J. P. Stewart, and A. A. Nash, “Characterization of tumor cell lines derived from murine gammaherpesvirus-68-infected mice.,” *J Virol*, vol. 70, no. 9, pp. 6516–6518, Sep. 1996.
- [34] H. W. Virgin, P. Latreille, P. Wamsley, K. Hallsworth, K. E. Weck, A. J. D. Canto, and S. H. Speck, “Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68.,” *J. Virol.*, vol. 71, no. 8, pp. 5894–5904, Aug. 1997.
- [35] J. Y. Zhu, M. Strehle, A. Frohn, E. Kremmer, K. P. Höfig, G. Meister, and H. Adler, “Identification and Analysis of Expression of Novel MicroRNAs of Murine Gammaherpesvirus 68,” *J. Virol.*, vol. 84, no. 19, pp. 10266–10275, Oct. 2010.
- [36] T. A. Reese, J. Xia, L. S. Johnson, X. Zhou, W. Zhang, and H. W. Virgin, “Identification of Novel MicroRNA-Like Molecules Generated from Herpesvirus and Host tRNA Transcripts,” *J. Virol.*, vol. 84, no. 19, pp. 10344–10353, Oct. 2010.
- [37] D. P. Bartel, “MicroRNAs: target recognition and regulatory functions,” *Cell*, vol. 136, no. 2, pp. 215–233, Jan. 2009.
- [38] H. P. Bogerd, H. W. Karnowski, X. Cai, J. Shin, M. Pohlers, and B. R. Cullen, “A mammalian herpesvirus uses non-canonical expression and processing mechanisms to generate viral microRNAs,” *Mol Cell*, vol. 37, no. 1, p. 135, Jan. 2010.
- [39] E. R. Feldman, M. Kara, L. M. Oko, K. R. Grau, B. J. Krueger, J. Zhang, P. Feng, L. F. van Dyk, R. Renne, and S. A. Tibbetts, “A Gammaherpesvirus Noncoding RNA Is Essential for Hematogenous Dissemination and Establishment of Peripheral Latency,” *mSphere*, vol. 1, no. 2, Apr. 2016.
- [40] B. A. Hoffman, Y. Wang, E. R. Feldman, and S. A. Tibbetts, “Epstein-Barr virus EBER1 and murine gammaherpesvirus TMER4 share conserved in vivo function to promote B cell egress and dissemination,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 116, no. 51, pp. 25392–25394, Dec. 2019.
- [41] M. Ve, L. Si, and S. Ja, “Viral small nuclear ribonucleoproteins bind a protein implicated in messenger RNA destabilization,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 4, Feb. 1992.
- [42] D. Cazalla, M. Xie, and J. A. Steitz, “A Primate Herpesvirus Uses the Integrator Complex to Generate Viral MicroRNAs,” *Mol Cell*, vol. 43, no. 6, pp. 982–992, Sep. 2011.
- [43] D. Cazalla, “Learning noncoding RNA biology from viruses,” *Mamm Genome*, vol. 33, no. 2, pp. 412–420, Jun. 2022.
- [44] D. Gatherer, S. Seirafian, C. Cunningham, M. Holton, D. J. Dargan, K. Baluchova, R. D. Hector, J. Galbraith, P. Herzyk, G. W. G. Wilkinson, and A. J. Davison, “High-resolution human cytomegalovirus transcriptome,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 108, no. 49, pp. 19755–19760, Dec. 2011.
- [45] M. B. Reeves, A. A. Davies, B. P. McSharry, G. W. Wilkinson, and J. H. Sinclair, “Complex I Binding by a Virally Encoded RNA Regulates Mitochondria-Induced Cell Death,” *Science*, vol. 316, no. 5829, pp. 1345–1348, Jun. 2007.

- [46] B. Lau, K. Kerr, Q. Gu, K. Nightingale, R. Antrobus, N. M. Suárez, R. J. Stanton, E. C. Y. Wang, M. P. Weekes, and A. J. Davison, “Human Cytomegalovirus Long Non-coding RNA1.2 Suppresses Extracellular Release of the Pro-inflammatory Cytokine IL-6 by Blocking NF- κ B Activation,” *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 10, p. 361, Jul. 2020.
- [47] T. T. Wu, Y. H. Su, T. M. Block, and J. M. Taylor, “Evidence that two latency-associated transcripts of herpes simplex virus type 1 are nonlinear,” *J Virol*, vol. 70, no. 9, pp. 5962–5967, Sep. 1996.
- [48] G.-C. Perng, C. Jones, J. Ciacci-Zanella, M. Stone, G. Henderson, A. Yukht, S. M. Slanina, F. M. Hofman, H. Ghiasi, A. B. Nesburn, and S. L. Wechsler, “Virus-Induced Neuronal Apoptosis Blocked by the Herpes Simplex Virus Latency-Associated Transcript,” *Science*, vol. 287, no. 5457, pp. 1500–1503, Feb. 2000.
- [49] J. L. Umbach, M. F. Kramer, I. Jurak, H. W. Karnowski, D. M. Coen, and B. R. Cullen, “MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs,” *Nature*, vol. 454, no. 7205, pp. 780–783, Aug. 2008.
- [50] K. Tormanen, S. Wang, H. H. Matundan, J. Yu, U. Jaggi, and H. Ghiasi, “Herpes Simplex Virus 1 Small Noncoding RNAs 1 and 2 Activate the Herpesvirus Entry Mediator Promoter,” *J Virol*, vol. 96, no. 3, pp. e01985-21.
- [51] W. Zhong and D. Ganem, “Characterization of ribonucleoprotein complexes containing an abundant polyadenylated nuclear RNA encoded by Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8),” *Journal of Virology*, vol. 71, no. 2, pp. 1207–1212, Feb. 1997.
- [52] M. Campbell and Y. Izumiya, “PAN RNA: transcriptional exhaust from a viral engine,” *Journal of Biomedical Science*, vol. 27, no. 1, p. 41, Mar. 2020.
- [53] C. C. Rossetto and G. S. Pari, “Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Noncoding Polyadenylated Nuclear RNA Interacts with Virus- and Host Cell-Encoded Proteins and Suppresses Expression of Genes Involved in Immune Modulation ∇ ,” *J Virol*, vol. 85, no. 24, pp. 13290–13297, Dec. 2011.
- [54] M. Campbell, K. Y. Kim, P.-C. Chang, S. Huerta, B. Shevchenko, D.-H. Wang, C. Izumiya, H.-J. Kung, and Y. Izumiya, “A lytic viral long noncoding RNA modulates the function of a latent protein,” *J Virol*, vol. 88, no. 3, pp. 1843–1848, Feb. 2014.
- [55] J. M. Schifano, K. Corcoran, H. Kelkar, and D. P. Dittmer, “Expression of the Antisense-to-Latency Transcript Long Noncoding RNA in Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus,” *Journal of Virology*, vol. 91, no. 4, pp. e01698-16, Feb. 2017.
- [56] N. Chbab, A. Egerer, I. Veiga, K. W. Jarosinski, and N. Osterrieder, “Viral control of vTR expression is critical for efficient formation and dissemination of lymphoma induced by Marek’s disease virus (MDV),” *Vet Res*, vol. 41, no. 5, p. 56, Oct. 2010.
- [57] M. M. Hitt, M. J. Allday, T. Hara, L. Karran, M. D. Jones, P. Busson, T. Tursz, I. Ernberg, and B. E. Griffin, “EBV gene expression in an NPC-related tumour,” *EMBO J*, vol. 8, no. 9, pp. 2639–2651, Sep. 1989.
- [58] N. Raab-Traub, R. Hood, C. S. Yang, B. Henry, and J. S. Pagano, “Epstein-Barr virus transcription in nasopharyngeal carcinoma,” *J Virol*, vol. 48, no. 3, pp. 580–590, Dec. 1983.

- [59] R. H. Edwards, A. R. Marquitz, and N. Raab-Traub, “Epstein-Barr Virus BART MicroRNAs Are Produced from a Large Intron prior to Splicing,” *J Virol*, vol. 82, no. 18, pp. 9094–9106, Sep. 2008.
- [60] S. Pfeffer, M. Zavolan, F. A. Grässer, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, B. John, A. J. Enright, D. Marks, C. Sander, and T. Tuschl, “Identification of Virus-Encoded MicroRNAs,” *Science*, vol. 304, no. 5671, pp. 734–736, Apr. 2004.
- [61] A. R. Marquitz, A. Mathur, R. H. Edwards, and N. Raab-Traub, “Host Gene Expression Is Regulated by Two Types of Noncoding RNAs Transcribed from the Epstein-Barr Virus BamHI A Rightward Transcript Region,” *J Virol*, vol. 89, no. 22, pp. 11256–11268, Nov. 2015.
- [62] D. H. Dreyfus, “Genetics and Molecular Biology of Epstein-Barr Virus-Encoded BART MicroRNA: A Paradigm for Viral Modulation of Host Immune Response Genes and Genome Stability,” *J Immunol Res*, vol. 2017, p. 4758539, 2017.
- [63] M. Kara, T. O’Grady, E. R. Feldman, A. Feswick, Y. Wang, E. K. Flemington, and S. A. Tibbetts, “Gammaherpesvirus Readthrough Transcription Generates a Long Non-Coding RNA That Is Regulated by Antisense miRNAs and Correlates with Enhanced Lytic Replication In Vivo,” *Non-Coding RNA*, vol. 5, no. 1, p. 6, Mar. 2019.
- [64] R. P. Kincaid, J. M. Burke, and C. S. Sullivan, “RNA virus microRNA that mimics a B-cell oncomiR,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 109, no. 8, pp. 3077–3082, Feb. 2012.
- [65] V. R. Sanghvi and L. F. Steel, “The Cellular TAR RNA Binding Protein, TRBP, Promotes HIV-1 Replication Primarily by Inhibiting the Activation of Double-Stranded RNA-Dependent Kinase PKR ν ,” *J Virol*, vol. 85, no. 23, pp. 12614–12621, Dec. 2011.
- [66] G. Manokaran, E. Finol, C. Wang, J. Gunaratne, J. Bahl, E. Z. Ong, H. C. Tan, O. M. Sessions, A. M. Ward, D. J. Gubler, E. Harris, M. A. Garcia-Blanco, and E. E. Ooi, “Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness,” *Science*, vol. 350, no. 6257, pp. 217–221, Oct. 2015.
- [67] A. Slonchak and A. A. Khromykh, “Subgenomic flaviviral RNAs: What do we know after the first decade of research,” *Antiviral Res*, vol. 159, pp. 13–25, Nov. 2018.
- [68] B. E. Slatko, A. F. Gardner, and F. M. Ausubel, “Overview of Next Generation Sequencing Technologies,” *Curr Protoc Mol Biol*, vol. 122, no. 1, p. e59, Apr. 2018.
- [69] Z. Boldogkői, N. Moldován, Z. Balázs, M. Snyder, and D. Tombácz, “Long-Read Sequencing – A Powerful Tool in Viral Transcriptome Research,” *Trends in Microbiology*, vol. 27, no. 7, pp. 578–592, Jul. 2019.
- [70] T. O’Grady, S. Cao, M. J. Strong, M. Concha, X. Wang, S. S. BonDurant, M. Adams, M. Baddoo, S. K. Srivastav, Z. Lin, C. Fewell, Q. Yin, and E. K. Flemington, “Global Bidirectional Transcription of the Epstein-Barr Virus Genome during Reactivation,” *J. Virol.*, vol. 88, no. 3, pp. 1604–1616, Feb. 2014.
- [71] T. O’Grady, X. Wang, K. Höner Zu Bentrup, M. Baddoo, M. Concha, and E. K. Flemington, “Global transcript structure resolution of high gene density genomes through multi-platform data integration,” *Nucleic Acids Res.*, Jul. 2016.
- [72] T. O’Grady, A. Feswick, B. A. Hoffman, Y. Wang, E. M. Medina, M. Kara, L. F. van Dyk, E. K. Flemington, and S. A. Tibbetts, “Genome-wide Transcript Structure Resolution Reveals

Abundant Alternate Isoform Usage from Murine Gammaherpesvirus 68,” *Cell Rep*, vol. 27, no. 13, pp. 3988-4002.e5, Jun. 2019.

- [73] D. Tombácz, Z. Csabai, A. Szűcs, Z. Balázs, N. Moldován, D. Sharon, M. Snyder, and Z. Boldogkői, “Long-Read Isoform Sequencing Reveals a Hidden Complexity of the Transcriptional Landscape of Herpes Simplex Virus Type 1,” *Front Microbiol*, vol. 8, p. 1079, 2017.
- [74] D. Tombácz, Z. Balázs, Z. Csabai, M. Snyder, and Z. Boldogkői, “Long-Read Sequencing Revealed an Extensive Transcript Complexity in Herpesviruses,” *Frontiers in Genetics*, vol. 9, 2018.
- [75] M. Kara and S. A. Tibbetts, “Empirical Validation of Overlapping Virus lncRNAs and Coding Transcripts by Northern Blot,” in *Long Non-Coding RNAs in Cancer*, A. Navarro, Ed. New York, NY: Springer US, 2021, pp. 243–253.
- [76] C. Chu, J. Quinn, and H. Y. Chang, “Chromatin isolation by RNA purification (ChIRP),” *J Vis Exp*, no. 61, 2012.
- [77] J. Engreitz, E. S. Lander, and M. Guttman, “RNA antisense purification (RAP) for mapping RNA interactions with chromatin,” *Methods Mol Biol*, vol. 1262, pp. 183–197, 2015.
- [78] C. G. Simpson and J. W. Brown, “RNase A/T1 protection assay,” *Methods Mol Biol*, vol. 49, pp. 239–247, 1995.
- [79] P. A. Latos, F. M. Pauler, M. V. Koerner, H. B. Şenergin, Q. J. Hudson, R. R. Stocsits, W. Allhoff, S. H. Stricker, R. M. Klement, K. E. Warczok, K. Aumayr, P. Pasierbek, and D. P. Barlow, “Airm Transcriptional Overlap, But Not Its lncRNA Products, Induces Imprinted Igf2r Silencing,” *Science*, vol. 338, no. 6113, pp. 1469–1472, Dec. 2012.
- [80] S. Tm, V. La, A. Cg, and K. Ca, “Molecular investigation of the 7.2 kb RNA of murine cytomegalovirus,” *Virology journal*, vol. 10, Dec. 2013.
- [81] S. L. Moon, B. J. T. Dodd, D. E. Brackney, C. J. Wilusz, G. D. Ebel, and J. Wilusz, “Flavivirus sfRNA suppresses antiviral RNA interference in cultured cells and mosquitoes and directly interacts with the RNAi machinery,” *Virology*, vol. 485, pp. 322–329, Nov. 2015.