

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Uloga mikroRNA u malignim bolestima
(The role of microRNA in malignant diseases)

SEMINARSKI RAD

Magdalena Valenta

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Petra Korać

Zagreb, 2016.

Sadržaj

1. Uvod.....	3
2. Otkriće, biogeneza i mehanizam djelovanja mikroRNA	3
2.1. Otkriće mikroRNA.....	3
2.2. Biogeneza mikroRNA.....	3
2.3. Metode detektiranja mikroRNA.....	6
3. Uloge mikroRNA u malignim bolestima.....	7
3.1. Tumor-supresorske i onkogene mikroRNA.....	7
3.2. Glavna obilježja malignih bolesti mogu biti uzrokovana s mikroRNA	8
4. Mijenjanje ekspresije mikroRNA	9
4.1. Genetske mutacije uzrokuju promjene u ekspresiji mikroRNA.....	9
4.2. Transkripcijska regulacija.....	10
4.3. Promjene transkripcijskog sustava.....	12
4.4. Epigenetička regulacija mikroRNA	12
4.4.1. Metilacija DNA.....	13
4.4.2. Kovalentne histonske modifikacije	14
4.4.3. MikroRNA mogu regulirati epigenetičke efekte	14
4.4.4. Okolišni čimbenici mogu utjecati na ekspresiju mikroRNA putem epigenetičke regulacije	17
5. Korištenje znanja o mikroRNA u detekciji i liječenju malignih bolesti	17
5.1. MikroRNA kao tumorski markeri.....	17
5.2. MikroRNA kao mete antitumorskih lijekova.....	19
5.2.1. Ciljanje onokomiRNA i oponašanje tumor-supresorskih mikroRNA	20
5.2.2. MikroRNA spužve	21
5.2.3. Uspostavljanje početne razine ekspresije mikroRNA lijekovima.....	21
6. Zaključak.....	22
7. Literatura.....	23
8. Sažetak	25

1. Uvod

MikroRNA (miRNA, engl. *microRNA*) male su, 22 do 25 nukleotida duge, vrlo konzervirane molekule RNA koje kontroliraju ekspresiju gena na post-transkripcijskoj razini [1]. Iako ne kodiraju za proteine, geni za mikroRNA su uključeni u regulaciju ekspresije gena uključenih u velik broj procesa kod različitih vrsta, uključujući i sisavce [2]. MikroRNA obično imaju višestruke mete te su stoga njihovi učinci na ekspresiju raznoliki. Osim što reguliraju razvojne procese te diferencijaciju stanica u odraslom organizmu, zabilježena je njihova važna uloga u procesima koji dovode do nastanka i napredovanja malignih bolesti pa su tako postale čest predmet istraživanja [1, 3].

2. Otkriće, biogeneza i mehanizam djelovanja mikroRNA

2.1. Otkriće mikroRNA

1993. je otkrivena prva mala RNA kodirana lokusom *lin-4* koja je povezana s razvojem oblića *Caenorhabditis elegans* [3]. Nađena RNA je negativno regulirala ekspresiju proteina *lin-14*. Smanjena ekspresija gena *lin-14* je ključna za nastavak razvoja po završetku ranog ličinačkog stadija. No, prije nego što je pokazan mehanizam djelovanja te RNA, 2000. je pronađena *let-7*, još jedna mala RNA za koju se također vjerovalo da ima ulogu u razvojnim procesima vrste *C. elegans* [3]. *Let-7* se pokazala konzerviranom u mnogim životinjskim vrstama među kojima su bili predstavnici kralježnjaka što je bio dokaz da su geni za mikroRNA esencijalni dio genoma [2]. Vjeruje se da su dijelovi genoma biljaka i životinja koji kodiraju za mikroRNA ostatci obrambenog sustava domaćina protiv RNA virusa i transpozona [2].

2.2. Biogeneza mikroRNA

MikroRNA djeluju na jednu ili više pripadajućih mRNA te njihovom degradacijom ili inhibicijom translacije negativno reguliraju ekspresiju gena [1].

Geni za mikroRNA se nalaze u genomu pojedinačno ili u skupinama. Smješteni su u regijama genoma koje ne kodiraju za proteine i kao takvi su dio RNA gena ili se nalaze u

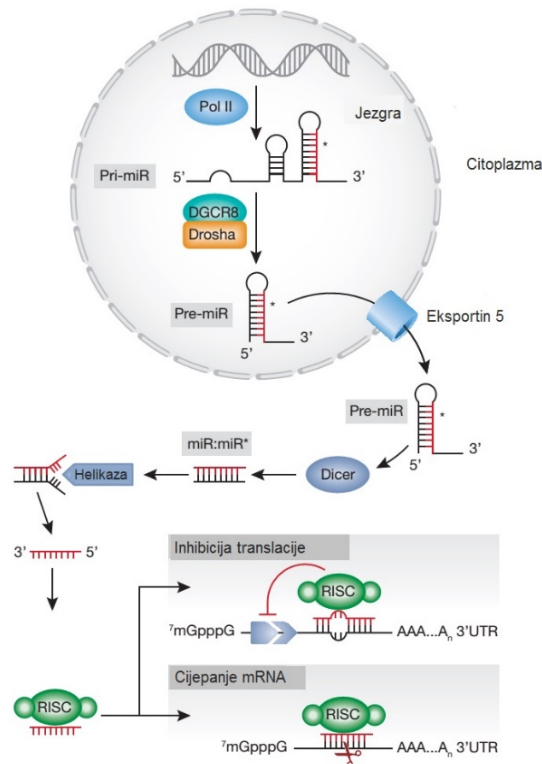
intronima gena koji kodiraju proteine pa je stoga ekspresija mikroRNA regulirana njihovim vlastitim promotorima ili promotorima gena u čijim intronima se nalaze [4].

Gene za mikroRNA prepisuje RNA polimeraza II, katkad RNA polimeraza III, u primarne transkripte (pri-miRNA) dugačke više od 1 kb koji na 3' kraju sadrže 7-metilgvanozinsku kapu, a na 5' kraju poli-A rep. Ključni dio pri-miRNA su kratke ukosnice koje nisu savršeno komplementarno spojene. Nakon obrade pri-miRNA enzimom Drosha u jezgri, preostaju dvolančane pre-miRNA koje su činile kratke ukosnice u pri-miRNA. Pre-miRNA su duge 70 do 100 nukleotida sa stršećim krajevima od 2 nukleotida na 3' kraju. Drosha je visoko konzervirani enzim mase 160 kDa i sadrži dvije domene s funkcijom RNaze III te domenu koja veže dvolančane molekule RNA i prepoznaje ukosnice u pri-miRNA. Drosha s kofaktorom DGCR8 (od engl. *Di George syndrome critical region 8*) čini mikroprocesor čovjeka, a s enzimom Pasha u *D.melanogaster* i *C.elegans*. Ti kompleksi su veliki 650 kDa tj. 550 kDa [2].

Alternativni put biogeneze, nazvan put miRtona, otkriven je u raznim organizmima uključujući vinsku mušicu, obliče i sisavce. MiRtoni su također regulatorne RNA koje nastaju procesiranjem pre-miRNA, ali ne koriste Droshu pri procesiranju [2].

3' stršeće krajeve pre-miRNA prepoznaje transmembranski protein eksportin 5 te uz kofaktor Ran-GTPazu prenosi pre-mikroRNA u citoplazmu gdje je obrađuje oko 200 kDa velik enzim Dicer. Dicer sadrži dvije katalitičke domene RNaze III, domenu koja prepoznaje dvolančanu RNA, domenu PAZ koja veže 3' kraj malih RNA te domene s ATPaznom i RNA-helikaznom aktivnošću [2]. Kod sisavaca, Dicer, uz pomoć proteina koji pripadaju porodici Argonaut, otklanja terminalnu omču ukosnice u kompleksu s TRBP-om (od engl. *transactivating response RNA-binding protein*) čime nastaje dvolančana RNA miRNA/miRNA* duga oko 22 nukleotida u kojoj miRNA označava zrelu miRNA, a miRNA* njoj komplementarni lanac [2].

Nastalu dvolančanu RNA kod sisavaca veže protein Argonaut 2 (Ago 2) kod koji stabilizira kompleks miRNA i Dicera te uz Ago 1 i druge članove porodice Argonaut postaje dio ribonukleoproteinskog kompleksa zvanog RISC (od engl. *RNA-induced silencing complex*). Kompleks RISC pri tome otklanja miRNA* za koju se smatralo da zatim prolazi degradaciju, ali čini se da ipak ima neke biološke uloge [2].



Slika 1. Biogeneza mikroRNA u sisavaca. RNA polimeraza II prepisuje gene za mikroRNA čime nastaje pri-mikroRNA. Enzim Drosha s kofaktorom DGCR8 procesira pri-mikroRNA čime ostaju samo dvolančane ukosnice sa stršećim krajevima – pre-miRNA. Obrada pre-miRNA se nastavlja u citoplazmi u koju je prebacuje transmembranski protein eksportin 5. Enzim Dicer uklanja terminalnu omču, a helikazna aktivnost Argonauta cijepa dvolančanu miRNA/miRNA*. Nastala mikroRNA nalazi se u kompleksu s RISC-om čime je postala aktivna i ovisno o stupnju komplementarnosti s mRNA, određuje hoće li kompleks cijepati mRNA ili inhibirati njenu translaciju [2].

Iako se mikroRNA u pravilu sparuje s komplementarnom regijom na netranslatiranoj regiji 3' kraja mRNA (3'-UTR, od engl. *3'-untranslated region*), u nekim slučajevima mikroRNA se može vezati na 5'-netranslatirani kraj mRNA (5'-UTR, od engl. *5'-untranslated region*) ili za otvoreni okvir čitanja mRNA (ORF, od engl. *open reading frame*) [2].

Uz prethodno opisani, kompleksni put djelovanja, otkriveno je da mikroRNA mogu djelovati neovisno o kompleksu RISC te da mogu regulirati ekspresiju gena i na transkripcijskoj razini tako što se vežu direktno za DNA [2].

Kao dio RISC kompleksa, zrela mikroRNA može regulirati ekspresiju gena pri čemu prepoznaje pripadajuću mRNA. Smatralo se da je ključno za prepoznavanje prvih sedam do osam nukleotida na 5' kraju (od engl. *seed sequence*), ali je otkriveno da se mikroRNA mogu svrstati u tri razreda i to s obzirom na to da li je njihov 5' kraj ključan za prepoznavanje, je li takvo prepoznavanje tek jedna od opcija ili pak prepoznaju mRNA preko komplementarnog sparivanja s 3' krajem. Nakon prepoznavanja, a uslijed endonukleazne aktivnosti proteina porodice Argonaut, ovisno o stupnju komplementarnosti dolazi do degradacije mRNA ili pak do inhibicije njene translacije. Točnije, kompleks miRNA-RISC cijepa mRNA u slučaju potpune komplementarnosti između mRNA i mikroRNA, dok do degradacije mRNA i inhibicije translacije dolazi uslijed nepotpune komplementarnosti između mRNA i mikroRNA (Slika 1.) Kod sisavaca do degradacije mRNA i inhibicije translacije dolazi puno češće uslijed nepotpune komplementarnosti. Kod biljaka je pak pokazano kako usprkos gotovo potpunoj komplementarnosti mikroRNA i njene mete mRNA, dolazi do inhibicije translacije [2]. Postoji dokaz da mikroRNA može pozitivno regulirati translaciju proteina stanica koje nisu u diobi. Primjerice, miR-369-3 i *let-7* negativno reguliraju translaciju u stanicama koje proliferiraju, ali uzrokuju povećanu razinu translacije u kontrolnim točkama staničnog ciklusa [4].

2.3. Metode detektiranja mikroRNA

Metoda prenošenja RNA na membranu (engl. *Northern blotting*) je prva metoda detekcije korištena u kvantifikaciji mikroRNA, no ova metoda zahtjeva relativno velike količine mikroRNA pa su je zamijenile metode poput kvantitativne lančane reakcije polimerazom (q-R-PCR), metoda „*Invader assay*“ ili metoda detekcije fluorescencije inducirane konfokalnim laserom koje zahtijevaju tek nekoliko nanograma RNA i mogu razlikovati zrele mikroRNA od njihovih prekursora, ali i međusobno mikroRNA iz iste porodice među kojima postoji velika homologija. Niti jedna od ovih metoda nije optimalna kada je prisutan velik broj mikroRNA u uzorku te se u tom slučaju koriste oligonukleotidne probe tj. metoda mikročipa iako ona nema toliko veliku osjetljivost kod razlikovanja homolognih mikroRNA [3].

Nedavno su opisane metode kojima se mikroRNA može detektirati u tkivima koja su fiksirana u formalinu i uklopljena u parafin. Hibridizacijom *in situ* se na takvim uzorcima može utvrditi prisutnost ekspresije mikroRNA na razini detekcije od čak jedne stanice u heterogenoj populaciji stanica [3]. Ova metoda je pogodna za kliničku praksu jer se uzorci s

biopsije uklopljeni u parafin koji se već podvrgavaju imunohistokemijskim analizama mogu testirati na mikroRNA.

3. Uloge mikroRNA u malignim bolestima

Kao što su prva istraživanja dala pretpostaviti, mnoge mikroRNA pokazuju vremensku i tkivno-specifičnu ekspresiju u razvoju mnogih organizama pa tako i sisavaca. Ključne su za samoobnovu matičnih stanica te granulopoezu [3]. Osim raznih uloga mikroRNA u imunološkom sustavu i diferencijaciji hematopoetskih stanica, mnoga istraživanja pokazuju da promjene u ekspresiji mikroRNA sudjeluju u procesima koji dovode do pojave malignih bolesti. Dva su osnovna obrasca promjene ekspresije mikroRNA u tumorima: globalna razina ekspresije mikroRNA je povećana ili češće, smanjena [4].

3.1. Tumor-supresorske i onkogene mikroRNA

MikroRNA mogu imati onkogenu ili tumor-supresorsku ulogu. Dok onkogene mikroRNA inhibiraju ekspresiju tumor-supresorskih gena, tumor-supresorske mikroRNA negativno reguliraju onkoproteine inhibirajući njihovu translaciju [4]. Onkogene i tumor-supresorske mikroRNA jednim se imenom nazivaju onkomiR zbog njihove uloge u razvoju i progresiji malignih bolesti [1].

Mnoge su se mikroRNA pokazale vezane uz ključne puteve kancerogeneze tako što djeluju na ekspresiju poznatih onkoproteina. Primjerice, onkogen *BCL2*, tzv. antiapoptički faktor, reguliraju tumor-supresorske miR-15a i miR-16-1 [2]. Povišena razina *let-7* može blokirati formiranje tumora, njegovo napredovanje i pojavu metastaza te istovremeno poticati apoptozu tumorskih stanica. Svi učinci su posljedica degradiranja mRNA onkogeni koji su meta *let-7*: *RAS*, *HMGA2* (od engl. *high mobility group AT-hook 2*), *CDK4/6* (od engl. *cell division protein kinase 6*) i *MYC* [2, 5]. *Let-7*, također, ima ulogu u diferencijaciji i u postizanju polarnosti stanica središnjeg živčanog sustava [5].

Primjer onkogene mikroRNA je miR-21 koja blokira aktivnost kaspaza i apoptozu tako što djeluje na gene *PTEN* i *PDCD4* [2]. U onkogene mikroRNA spadaju još miR-155 te skupina miR-17 koja se sastoji od miR-17-5-p, -18, -19a, -19-b, -20 i -92 [1, 6]. Ova skupina se nalazi na kromosomskoj poziciji 13q31 koja je često amplificirana u nekoliko tipova limfoma [6]. Osim što mogu kontrolirati onkogene i tumor-supresorske gene, same mikroRNA mogu biti mete onkogeni i tumor-supresorskih gena.

3.2. Glavna obilježja malignih bolesti mogu biti uzrokovana s mikroRNA

Brojne su studije pokazale da je za svaki tip malignog tumora obrazac ekspresije mikroRNA različit u odnosu na zdravo tkivo čijom transformacijom je tumor nastao [4]. Uz to, obrazac ekspresije se razlikuje ovisno o tipu malignog tumora. Stoga je analiza ekspresije 217 mikroRNA iz raznih ljudskih malignih tvorbi pokazala kako je moguće odrediti podrijetlo tumora ovisno o obrascu ekspresije mikroRNA, a dodatne analize koje su uključile 540 uzoraka su pokazale koje su mikroRNA najčešće deregulirane [1, 4]. To su miR-21, -17-5-p, -191, -29b-2, -223, -128b, -199a-1, -24-1, 24-2, -146, -155, -181b-1, -20a, -107, -32, -92-2, -214, -30c, -25, -221 I -106a [4]. Ovisno o metodama izolacije i profiliranja mikroRNA, različite istraživačke grupe došle su do različitih rezultata. Različiti etiološki faktori i razlike u točnim molekularnim mehanizmima koji su uključeni u nastanak bolesti mogu biti uzrok zbog kojeg tumori slične ili iste morfologije imaju različite profile ekspresije mikroRNA. Rezultati koje podupire više istraživanja su u Tablici 1 [3, 4].

Weinberg je opisao šest glavnih obilježja malignih bolesti: autokrini čimbenici rasta, neosjetljivost na signale koji blokiraju rast, izostanak apoptoze, neograničeni potencijal za diobe te pojava angiogeneze, invazije tkiva i metastaza. MikroRNA mogu utjecati na svaku od tih pojava [7].

Jedna od glavnih karakteristika malignog tumora je nekontrolirana dioba stanica. Tijek staničnog ciklusa je pod kontrolom različitih ciklina, kinaza ovisnih o ciklinima (Cdk, od engl. *Cyclin-dependent kinases*) te njihovih inhibitora koji u kontrolnim točkama ciklusa određuju sudbinu stanice odnosno hoće li ciklus dalje napredovati ili ne. MikroRNA mogu uzrokovati atipično ponašanje stanice kao čimbenik koji sudjeluje u odluci stanice hoće li krenuti u programiranu staničnu smrt ili će nastaviti stanični ciklus. One negativno reguliraju inhibitor kinaza ovisnih o ciklinima – Dacapo. Dacapo je član porodice inhibitora p21/p27, a njegovom represijom dolazi do napredovanja stanice kroz ciklus nakon prelaska kontrolne točke G1/S. Dakle, ekspresija miRNA može uzrokovati neopravdani prelazak kontrolnih točki te time i nekontroliranu proliferaciju stanica. Osim toga, mikroRNA mogu utjecati na signalizaciju receptora faktora rasta čime također dolazi do proliferacije i migracije stanica [7].

U nastanak metastaza uključena je miR-9 koja smanjuje ekspresiju E-kadherina čime se aktivira β -katenin te dalje ekspresija različitih onkogeni, kao i miR-122 čija je meta *MnSOD* čiji produkt je potreban za smanjenu ekspresiju epitelnih markera, a povišenu ekspresiju mezenhimskih [7].

Angiogeneza nastaju nove krvne žile ili se granaju postojeće čime se postiže dovoljni dotok hranjivih tvari i kisika do metabolički aktivnih tumorskih stanica. MikroRNA kojima su mete vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF, od engl. *vascular endothelial growth factor*) te faktor induciran hipoksijom (HIF) mogu utjecati na angiogenezu. Takva je miR-210 koja, između ostalog, povećava ekspresiju receptora za VEGF te miR-424 čije krajnje mete su HIF α i VEGF [7].

Tablica 1. MikroRNA povezane s malignim bolestima te zabilježena promjena u njihovoj ekspresiji [3, 5].

Maligni tumor	MikroRNA	Ekspresija
Karcinom dojke	miR-21	↑
	miR-125b, miR-145	↓
Kolektalni karcinom	miR-143, miR-145	↓
	miR-135b, miR-96, miR-183	↑
Hepatocelularni karcinom	miR-18, miR-224	↑
	miR-199a, miR-195, miR-125a	↓
Limfom/leukemija (CLL)	miR-15a, miR-16-1	↓

* CLL, kronična limfocitna leukemija (od engl. *Chronic lymphocytic leukemia*).

4. Mijenjanje ekspresije mikroRNA

Uzroci promjene ekspresije mikroRNA su razni, a među njih spadaju mutacije, promjene u broju kopija DNA, promjene u regulaciji transkripcije mikroRNA, promjene na enzimima koji sudjeluju u biogenezi mikroRNA te epigenetičke promjene. MikroRNA mogu i međusobno djelovati jedne na druge čime se postiže recipročna regulacija i aktivacija te se povećava razina kompleksnosti regulacije [8]. Zbog toga je teško razlučiti kada prestaje regulacija jednim, a započinje regulacija drugim mehanizmom te je vjerojatno da se njihovi utjecaji međusobno isprepleću u svim stanicama koje su zahvaćene malignom bolešću.

4.1. Genetske mutacije uzrokuju promjene u ekspresiji mikroRNA

Calin i suradnici su 2004. godine pokazali da je 50% poznatih mikroRNA kodirano na regijama čija je kromosomska nestabilnost povezana s malignim tumorima, a Zang i suradnici su 2006. ustvrdili da je velik broj mikroRNA lokusa pokazuje varijacije u broju kopija DNA [1]. U jednoj od studija koja je obuhvatila 186 identificiranih mikroRNA gena, oko 50% njih je povezano s malignim bolestima i to kroz pojave gubitka heterozigotnosti (LOH, od engl. *loss of heterozygosity*), amplifikacije gena te kromosomske lomove, a svaka je promjena karakteristična za pojedini tip neoplazme [3, 4]. Navedene genomske aberacije dovode do promjene ekspresije mikroRNA, a time i ekspresije gena koji su im mete [3]. Budući da mikroRNA negativno reguliraju gensku ekspresiju, amplifikacijama gena za mikroRNA dolazi do veće ekspresije mikroRNA te do utišavanja tumor-supresorskih gena. Nasuprot tome, delecije gena za mikroRNA kojima su mete onkogeni uzrokuju njihovu prekomjernu ekspresiju [2]. Delecija kromosomske regije 13q14 dovodi do gubitka gena koji kodiraju za miR-15a i miR-16-1 čija uloga je tumor-supresorska. Smatra se da je ova mutacija povezana s oboljenjem od kronične limfocitne leukemije kod homozigota i heterozigota s tom mutacijom, ali i kada je gen utišan [2, 3].

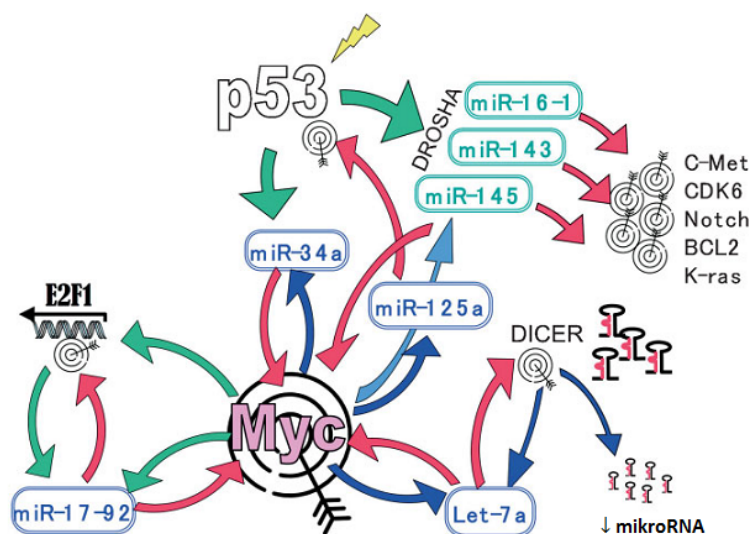
Osim što maligne bolesti prate genetske mutacije na genetski nestabilnim dijelovima kromosoma, manje promjene mogu predstavljati potencijal za razvoj određenog tipa bolesti koji je uzrokovan promjenom ekspresije mikroRNA. Određeni polimorfizmi jednog nukleotida (SNP, od engl. *single nucleotide polymorphism*) koji u genomu postoje svakih nekoliko tisuća parova baza, čine pojedince sklonijima na maligne bolesti [2]. 7 od 41 polimorfizma u genima za 26 mikroRNA pokazali su značajnu povezanost s rizikom oboljenja od malignih tumora jednjaka [4]. Specifična pozicija u genu za miR-146a, promjena iz G u C, u zametnim stanicama povezana je s predispozicijom za oboljenje od malignih tumora dojke i jajnika [4, 5]. Polimorfizmi su općenito česti u intronskim i netranslatiranim dijelovima genoma koji su povezani s ekspresijom mikroRNA te s ekspresijom enzima uključenih u biogenezu mikroRNA [2, 4].

Gubitak 3'-UTR dijela sekvence također može biti uzrok aktivacije onkogeni. Primjer je gen *HMGA2*. 3'-UTR transkripta toga gena je meta *let-7* [5].

4.2. Transkripcijska regulacija

Ekspresija mikroRNA može biti kontrolirana raznim transkripcijskim faktorima, stoga promjena u ekspresiji određene mikroRNA može biti uzrokovana manjom ili većom količinom transkripcijskog faktora koji je ključan za regulaciju njene ekspresije [7].

Ekspresija porodice miR-34a smanjena je kao posljedica inaktivacije tumor-supresorskog gena *p53* [8]. Nekoliko transkripcijskih faktora može u isto vrijeme regulirati ekspresiju mnogih mikroRNA, pa *p53* u slučajevima oštećenja DNA aktivira ekspresiju miR-143, miR-145 i miR-16-1 [4]. Uz *p53*, ekspresiju miR-23a reguliraju transkripcijski faktori Myc koji utišavaju transkripciju miR-23a u mnogim stanicama malignih tumora [9]. Onkogen *c-Myc* i transkripcijski faktor HIF su amplificirani i prekomjerno eksprimirani u nekoliko tipova malignih tumora što može promijeniti ekspresiju miR-17-92 i miR-210 [4, 8]. Poput *p53*, *c-Myc* regulira ekspresiju barem 20 mikroRNA, a u isto je vrijeme ekspresija *c-Myc* pod negativnom regulacijom dvije od njih mikroRNA – miR-17-5b i miR-20a čime se postiže autoregulacija. *C-Myc* također može regulirati vlastitu ekspresiju tako što smanjuje ekspresiju miR-34a i *let-7* koje su njegovi negativni regulatori. No, pri tome se smanjuje ekspresija miR-125b koja regulira *p53* čime se povećava ekspresija inhibitornih miR-34a i miR-145 (Slika 2.) [4].



Slika 2. Regulacija mikroRNA uključenih u kancerogenezu. Prikazan je jedan od puteva koji uključuju onkogene i tumor-supresorske gene. Transkripcijski faktor *c-Myc* aktivira ekspresiju skupine miR-17-92 preko transkripcijskog faktora E2F1 (indirektni put) ili direktno. MikroRNA iz skupine miR-17-92 inhibiraju ekspresiju transkripcijskih faktora *c-Myc* i E2F1. *C-Myc* inhibira ekspresiju još nekih mikroRNA: miR-34a, miR-125a i *let-7a* koje su povezane s ekspresijom *p53*, no u isto vrijeme je *c-Myc* pod negativno regulacijom dvije od njih: miR-34a i *let-7a*. Kao odgovor na oštećenje DNA te u suradnji s enzimom Drosha, transkripcijski faktor *p53* aktivira ekspresiju miR-16-1, miR-143 i miR-145 kojima se reguliraju brojni onkoproteini i tumor-

supresori (C-Met, CDK6, Notch, BCL2 i K-ras). Jednu od njih (miR-145) inhibira c-Myc čime se stvara još jedna negativna sprega. Uz to, enzim Dicer je pod negativnom kontrolom *let-7* zbog koje dolazi do smanjenja ekspresije mikroRNA (uključujući *let-7*) na globalnoj razini [4].

4.3. Promjene transkripcijskog sustava

Kao što je već opisano, transkripcijski sustav je reguliran s nekoliko proteina i enzima kao što su Drosha, Dicer i DGCR8 te proteinska porodica Argonaut i eksportin 5. Stoga mutacije ili promijenjena ekspresija svake od komponenti može dovesti do promjene u ekspresiji mikroRNA. Nedavna istraživanja pokazuju da su obje endonukleaze, Drosha i Dicer, deregulirane u malignim bolestima. Uz to, u genima *DGCR8* i *Drosha* postoje supstitucije ili delecije jednog nukleotida u 15% oboljelih od Wilmsova tumora što dovodi do smanjene ekspresije *let-7a* i miR-200. Smanjena ekspresija enzima Dicer povezana je s lošijom prognozom kod pacijenata s malignim tumorom na jajnicima ili većim metastatskim potencijalom kolorektalnog malignog tumora [7]. Ipak, mutacije u genima za enzime potrebne u transkripciji mikroRNA nađene su u svega 5% slučajeva [4]. U nekoliko tipova malignog tumora pluća, razine Dicera su smanjene dok su kod adenokarcinoma i malignog tumora prostate povećane. Dicer je pod negativnom kontrolom mikroRNA *let-7* što u većini slučajeva objašnjava snižene razine ekspresije Dicera [4]. Porodica proteina Argonaut također može biti deregulirana. Primjerice, gen *EIF2C1/hAgo1* je često deletiran kod Wilmsovog tumora bubrega. Ekspresija ljudskih proteina Argonaut ovisi o tipu stanice, tako da ovisno o njemu, razina proteina Ago2 može biti smanjena ili povećana. Dereguliran može biti i eksportin 5 (XPO5), protein koji omogućava prijenos pre-miRNA iz jezgre u citoplazmu. Mutacije s pomakom okvira čitanja koje uzrokuju stvaranje kraće verzije proteina odgovorne su za gubitak funkcije XPO5 uočen u stanicama kolorektalnog tumora [7].

4.4. Epigenetička regulacija mikroRNA

Geni za mikroRNA su i epigenetički regulirani, kao i geni koji kodiraju za proteine. MikroRNA, iako su i same epigenetička oznaka, mogu biti meta, ali i uzročnik epigenetičkih

promjena i to tako da utječu na regulaciju samih sebe ili pak tako što moduliraju enzime ili količinu enzima koji uvode druge epigenetičke promjene [10]. Takve mikroRNA, koje reguliraju enzime koji epigenetički modificiraju DNA, nazivamo epi-miRNA [5, 9]. Smatra se da je oko 50% mikroRNA gena metilirano. Promjena DNA metilacije CpG otoka u promotoru gena za miR-127 prva je otkrivena epigenetička regulacija neke mikroRNA [11]. Njome je utišana ekspresija tumor-supresorske mikroRNA, a time i supresija protoonkogene *BCL6* što je česta pojava u tumorima prostate i mjehura [12]. Broj mikroRNA koje su zahvaćene epigenetičkim regulatornim mehanizmima u različitim oblicima tumora pluća iznosi 27, a pripadaju u 18 porodica mikroRNA [10].

4.4.1. Metilacija DNA

Uz miR-127, detektirane su i brojne druge mikroRNA, poput miR-9, miR-148, miR-137, miR-34 i miR-152 miR-124 u čijim je promotorima hipermetilacija CpG otoka dovela do utišavanja ekspresije u nekoliko tipova malignih tumora [9]. Porodica miR-9 ima tri člana: miR-9-1, miR-9-2 i miR-9-3, a nalaze se na kromosomima 1, 5 i 15. Epigenetička represija miR-9-1 preko metilacije promotora prisutna je u malignom tumoru dojke i gušterače dok je epigenetičko utišavanje metilacijom DNA sve tri miR-9 povezano s pojavom metastaza kod različitih tumora. No, prekomjernom ekspresijom miR-9 u malignom tumoru dojke dolazi do invazivnog fenotipa što ukazuje na dualnu ulogu porodice miR-9 [8]. Hipermetilacijom CpG otoka miR-148-a dolazi do razvoja metastatskih staničnih linija čiju pojavu je moguće spriječiti ponovnom uspostavom aktivnosti miR-148-a, a hiperemetilacija promotora miR-148 je dokazana u malignim tumorima lokaliziranim u dojkama, plućima i debelom crijevu te kod melanoma [8].

Porodica miR-34, koja je meta transkripcijskog faktora p53, epigenetički je inaktivirana u mnogim tipovima malignih tumora, a reekspresija miR-34 može dovesti do zaustavljanja stanica u G1 fazi ciklusa i posljedično do apoptoze. Utišavanje ekspresije miR-137 je povezano s malignim tumorom želuca, debelog crijeva i pluća dok je miR-152 utišana u malignom tumoru vrata maternice [8].

Budući da mikroRNA mogu biti kodirane u intronskim regijama gena, njihove regulacije ekspresije su u tom slučaju povezane. MikroRNA mogu biti eksprimirane skupa s genom domaćinom te su pod utjecajem genetičkih promjena gena domaćina. Tako je miR-342 kodirana u intronu gena *EVL* (od engl. *Ena/Vasp-Like*). Metilacija promotora gena *EVL*

dovodi do utišavanja ekspresije miR-342 u kolorektalnom tumoru. Postoje i drugi primjeri: miR-126 je kodirana intronom gena *EGFL7* utišanog u staničnim linijama tumora prostate i mjehura, a miR-152 se nalazi u intronu 1 gena *COPZ2* (od engl. *coatomer protein complex*, podjedinica zeta 2) koji je inaktiviran u malignom tumoru endometrija [8]. MiR-181c je utišana u staničnim linijama glioblastoma u usporedbi sa zdravim tkivom mozga. Smatra se da je ta promjena povezana s DNA metilacijom promotora miR-181c uz otpuštanje jezgrinog faktora CTCF koji regulira ekspresiju miR-181-c [13].

Postoje i suprotni primjeri: CpG otok promotora *let-7a-3* gena je hipometiliran kod malignih bolesti pluća što dovodi do prekomjerne ekspresije *let-7a-3*. Slično se ponašaju miR-21, miR-205 i miR-203 kod malignog tumora epitelnih stanica jajnika te miR-200a i miR-200b kod nekoliko malignih tumora gušterače [8].

4.4.2. Kovalentne histonske modifikacije

Osim metilacije DNA i druge epigenetičke promjene mogu utjecati na ekspresiju mikroRNA. 2006. godine Scott i suradnici su otkrili da se ekspresija miRNA mijenja u staničnim linijama raka dojke tretiranim s inhibitorom histonski deacetilaza. Ekspresija miR-512-5p je, osim s DNA demetilacijom, povezana i s acetilacijom histona H3 i di-metilacijom histona H3 na lizinu. Uz njih, zabilježene su promjene metilacije pozicija histona H3K9 i H3K27. Metilacije H3K4, H3K9 i H3K27 dovode do utišavanja ekspresije, a suprotan učinak ima acetilacija H3. Zajedno acetilacija H3 i metilacija H3K4 dovode do aktivacije transkripcije mikroRNA, dok metilacija H3K27 uz metilaciju H3K9 dovodi do utišavanja gena [8].

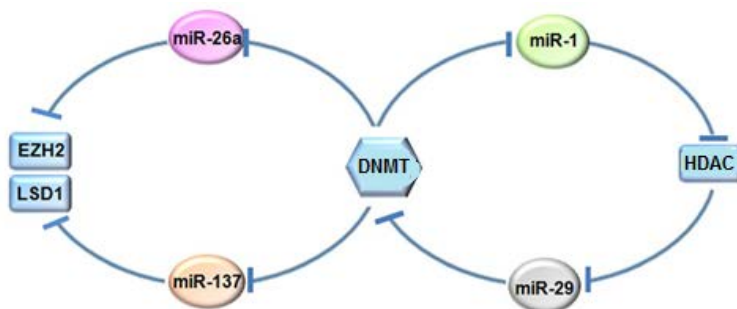
Prva otkrivena epi-miRNA, porodica miR-29, također je najistraživanija mikroRNA koja je regulirana histonskim modifikacijama. Histonske modifikacije često dolaze uz metilaciju DNA te djeluju zajedno što otežava analizu detekcije promjene ekspresije temeljenu na djelovanju pojedinih epigenetičkih oznaka [9].

4.4.3. MikroRNA mogu regulirati epigenetičke efekte

Epi-miRNA mogu regulirati ekspresiju enzima i drugih molekula koje epigenetički mijenjaju DNA, poput DNA metiltransferaze (DNMT), histonske acetiltransferaze (HAT), histonske metiltransferaze (HMT) i histonske deacetilaze (HDAC), proteina RBL2 (od engl. *Retinoblastoma-Like 2*), histonske-lizin N-metiltransferaze te EZH2 proteina (od engl.

Enhancer of zeste homolog 2) i PRC-a (od engl. *Polycomb Repressive Complex*) [4, 8]. Smatra se da epi-miRNA imaju važnu ulogu u razvoju tumora kroz proces proliferacije stanica, apoptozu, migraciju stanica i nastanak metastaza. Epi-miRNA su prvo otkrivene kod malignih tumora pluća kod kojih miR-29 direktno utječe na ekspresiju DNMT3a i DNMT3b i to preko komplementarnosti na 3' UTR-u DNMT3. MiR-29 mogu preko DNA metilacije *de novo* mijenjati metilaciju CpG otoka u promotorima tumor-supresorskih gena kao što su *WHOX*, *FHIT* i *p15INK4B*. MiR-148a regulira ekspresiju DNMT3b tako što veže kodirajuću regiju mRNA DNA metiltransferaze 3b. Supresivni učinak na proliferaciju nekoliko staničnih linija kolorektalnog tumora ima miR-143 koja smanjuje razinu ekspresije DNMT3a dok miR-342 inhibira ekspresiju DNMT1 tako što reaktivira tumor-supresorske gene *ADAM23* i *RASSF1A*. Uz to, miR-152 može direktno utišati DNMT1 tako što se veže za 3'UTR vlastitog transkripta što pokazuje složenost interakcije između miR-152 i DNMT3 kroz dvostruku negativnu spregu [8].

Iako svi segmenti složenih interakcija između različitih epigenetičkih modifikacija još nisu poznati, praćenje promjena ekspresije pojedinih mikroRNA može dati uvid u njihove međusobne odnose. MiR-26a može biti utišana s DNA metiltransferazama u malignom tumoru prostate, što dovodi do nakupljanja EZH2, čiji gen je meta te mikroRNA. EZH2 mijenja metilaciju DNA globalno što je jedan od primjera kako je preko mikroRNA spregnuto djelovanje više epigenetičkih regulatora. Još jedan medijator je miR-137 čija ekspresija je utišana hipermetilacijom CpG otoka u promotoru, a čija je meta lizin-specifična demetilaza 1 (LSD1) u kolorektalnom adenomu. Budući da LSD1 može stabilizirati DNMT1, postoji pozitivna regulacija među njima. Osim međudjelovanja između metilacije DNA i metilacije histona, u regulaciju je često uključena i deacetilacija histona. MiR-1, čija meta je HDAC4, utišana je u stanicama hepatocelularnog karcinoma hipermetilacijom CpG otoka DNMT1, čime se promovira ekspresija HDAC4. Histonske deacetilaze potiču utišavanje miR-29 u akutnoj mijeloičnoj leukemiji što ima za posljedicu ekspresiju gena koji kodira za DNMT3. Ovi primjeri opisuju kako se epigenetička modifikacija preko mikroRNA može prenositi na drugi epigenetički obrazac te kako mikroRNA kao dio epigenetičkih oznaka, sudjeluju u složenim odnosima međusobne regulacije (Slika 3.) [9].



Slika 3. Uloga mikroRNA u komunikaciji epigenetičkih regulatora transkripcije.

DNMT1 uzrokuje utišavanje miR-1 čime dolazi do akumulacije HDAC4 koji je meta te mikroRNA. HDAC4 uzrokuje smanjenu ekspresiju miR-29 čija je meta DNMT3. Hipermetilacijom CpG otoka u promotorima gena za miR-26a i miR-137 dolazi do utišavanja ekspresije čime se povećava djelovanje LSD1 i EZH2 (ovakva je mreža odnosa ovisna o tipu bolesti) [9].

Epi-miRNA imaju i značajnu ulogu u regulaciji brojnih proteina HDAC koje su preko njih povezane s proliferacijom tumorskih stanica te inhibicijom apoptoze. MiR-34a može regulirati sirtuin 1 (SIRT 1) te p53. SIRT1 spada u histonske deacetilaze trećeg razreda čija aktivnost ovisi o NAD^+ te inaktivira apoptozu u stanicama malignih tumora tako što deacetilira transkripcijski faktor p53. MiR-34a direktno inhibira SIRT1 čime se povećavaju količine acetiliranog p53 što dovodi do apoptoze stanica. Čini se da miR-449 također regulira SIRT1 te se posljedično ponaša kao tumor-supresorska molekula pa je moguće da uslijed njene smanjene ekspresije u tkivu prostate i želuca dolazi do pojave malignih tumora. Konačna meta regulacije putem miR-449 je put p53 koji osigurava regulaciju staničnog ciklusa te apoptozu. Između SIRT1 i miR-200 također postoji odnos međusobne regulacije. Pojačana ekspresija SIRT1 je povezana sa smanjenom ekspresijom miR-200a u stanicama adenokarcinoma dojke, a u suprotnim slučajevima dolazi do inhibicije transformacije epitelnih stanica dojke. Geni za miR-1 i miR-400 su također modificirani histonskim deacetilazama, a imaju tumor-supresorski učinak [8].

EZH2 je katalitička podjedinica enzima PRC2 i posreduje formaciji heterokromatina tako što trimetilira poziciju H3K27 što je mehanizam utišavanja nekoliko tumor-supresorskih gena. Pojačana ekspresija EZH2 može dovesti do utišavanja miR-101 koja ima tumor-supresorsku ulogu. Razina ekspresije miR-101 je smanjena u nekoliko tipova malignih bolesti pri čemu je zabilježena povišena razina EZH2. Transfekcija maligno transformiranih stanica s miR-101 dovodi do utišavanja EZH2 što ima za posljedicu smanjene razine metilacije pozicije H3K27 te sprječava daljnje promjene koje vode razvoju bolesti [8].

4.4.4. Okolišni čimbenici mogu utjecati na ekspresiju mikroRNA putem epigenetičke regulacije

Infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* je povezana s malignim tumorom želuca, dijelom kroz promjenu ekspresije mikroRNA. Istraživanje na staničnoj liniji HTC 116 pokazalo je da se kao posljedica infekcije javlja povećana razina transkripcijskog faktora MYC koji utječe na ekspresiju mnogih mikroRNA pa tako i *let7a* i *let7c* i to na dva načina; povećane razine transkripcijskog faktora MYC uzrokuju povećanu razinu ekspresije EZH2 tako što smanjuju količine mikroRNA koje ga negativno reguliraju: miR-26a i miR-101. Interakcije između MYC te enzima DNMT3B i EZH2 uzrokuju epigenetičke promjene promotora *let-7* te zbog metilacije DNA i metilacije histona dolazi do utišavanja gena *let-7* što ima za posljedicu aktivaciju puta Ras koji je uključen u kancerogenezu. Zanimljivo, kod drugih malignih bolesti promotor *let-7* je hipometiliran što pokazuje važnost konteksta tipa stanica kod epigenetičke regulacije iste mikroRNA [9]. Moguća je povezanost ekspresije miR-204 s malignim tumorom želuca uzorkovanim *H. pylori*. Postoje indikacije da je razina miR-204 veća kada bolest nije uzrokovana tom bakterijom nego kada je bakterija uključena u put nastanka bolesti [14]. *H. pylori* uzrokuje metilaciju promotora porodice miR-124, a razine metilacije su veće u nezahvaćenom dijelu sluznice želuca pacijenata s malignim tumorom u odnosu na sluznicu zdrave kontrole. Uz to, infekcija bakterijom *H. pylori* uzrokuje DNA metilaciju promotora gena za miR-34b/c. Kod pacijenata s malignim oboljenjem, razina metilacija u dijelu sluznice koji nije zahvaćen bolešću ovisi o broju malignih tvorbi na zahvaćenom dijelu sluznice [8]. Slične korelacije koje postoje u tkivu na kojem se makroskopski ne vide promjene, temelj su ranog otkrivanja malignih bolesti uz pomoć mikroRNA kao markera.

MikroRNA herpes virusa povezanog s Kaposijevim sarkomom (KSHV) može smanjiti razine proteina RBL2 u stanicama čime indirektno dolazi do povećanja razine ekspresije DNA metiltransferaza, a time i globalnog epigenetičkog reprogramiranja [8].

5. Korištenje znanja o mikroRNA u detekciji i liječenju malignih bolesti

5.1. MikroRNA kao tumorski markeri

Promjena u profilu eksprimiranih mikroRNA može biti karakteristična za pojedine tipove malignih bolesti, ali analizom je moguće odrediti i podtip tumora, histološki gradus, podrijetlo tumora te njegov metastatski potencijal pa čak i vjerojatnost povratka bolesti nakon povlačenja ili liječenja, čime su mikroRNA pokazale potencijalni prognostički značaj [3, 4].

Različiti tipovi malignih tumora dojke i debelog crijeva su pokazali različite profile eksprimiranih mikroRNA pri čemu su određene mikroRNA povezane s različitim stadijima bolesti [4]. Kao potencijalni marker koji ukazuje na vjerojatnost preživljenja kod tumora dojke, istražuje se miR-10b. Istraživanje na 770 pacijenata s različitim oblicima ovog tumora pokazalo je da povišena ekspresija miR-10b može ukazivati na lošiju prognozu [15]. Za folikularni karcinom štitnjače je nađeno sedam prekomjerno eksprimiranih mikroRNA koje se razlikuju od onih karakterističnih za anaplastični karcinom štitnjače koji ima daleko lošiju prognozu. Visoki histološki gradus karcinoma mjehura također pokazuje specifične obrasce ekspresije mikroRNA [4]. Uporabom metoda profiliranja ekspresije mikroRNA uspješno je klasificirano 12 od 17 slabo diferenciranih različitih tipova karcinoma. Za usporedbu, samo je jedan uspješno klasificiran pomoću metoda koje koriste mRNA [3].

Brojna istraživanja sugeriraju da je promjena u fenotipu metatskog tumora u odnosu na primarni djelomično uzrokovana promjenom u ekspresiji mikroRNA. Smanjena ekspresija miR-148a, miR-34b/c i miR-9 je povezana s hipermetilacijom promotora mikroRNA u odnosu na razne tipove primarnih tumora što pokazuje kako se epigenetičke promjene događaju kroz napredovanje bolesti, a analiza 353 uzoraka koštane srži pacijenata oboljelih od akutne limfocitne leukemije, pokazala je 13 metiliranih mikroRNA gena u 65% uzoraka pacijenata koji su imali veću stopu povratka bolesti te veću stopu smrtnosti [4, 8].

Trenutno se istražuje i pokušava povezivati profil ekspresije mikroRNA određene bolesti s njihovom prisutnošću u tjelesnim tekućinama pacijenata. Prednost mikroRNA, u odnosu na proteine koji su najčešći biomarkeri, je veća stabilnost u krvi čak nakon nekoliko ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. Te su značajke pripisane činjenici da tumorske stanice luče egzosome (onkosomi) s proteinima, mRNA i mikroRNA u kojima su mikroRNA zaštićene od RNaza u krvi. Početna istraživanja su pokazala da su mikroRNA specifične za maligne bolesti, prisutne u krvi već od ranih stadija bolesti te da se njihova koncentracija povećava s rastom tumora. Neke od detektiranih mikroRNA čije su razine povišene zbog prisutnosti maligne bolesti su navedene u Tablici 2 [4].

Tablica 2. Cirkulirajuće mikroRNA koje su potencijalni biomarkeri malignih tumora [4].

Maligni tumor	mikroRNA u krvi
Kolorektalni karcinom	miR-29a, -92a, miR-135b, -92, -222, -17-3p
Karcinom pluća (karcinom ne-malih stanica)	miR-17-3p, -21, -106a, -146, -155, -191, -203, -205, -210, -212, -214
Karcinom jajnika	miR-21, -141, -200a/b/c, -203, -205, -214
Karcinom prostate	miR-141 miR-16, -92a, -103, -107, -197, -346, -328, -485-5p, -92b, -574-3p, -636, -640; 766, -885-5p
Karcinom gušterače (duktalni)	miR-21, -210, -155, -196a
Akutna limfoblastična leukemija	miR-92 (razina je smanjena)

Postoje naznake da je smanjena količina miR-204 u serumu oboljelih od različitih malignih tumora želuca, a priutnost miR-204 je povezana i s vjerojatnošću pojava metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, diferencijacijom tumora, stupnju prema klasifikaciji tumora TNM i prognozom [14]. Uz to, onkogene mikroRNA nestaju iz krvi nakon operacije u kojoj je uspješno otklonjen tumor pa tako imaju i potencijal za procjenu uspješnosti operativnih zahvata [4]. S druge strane, nakon kirurškog otklanjanja malignog tumora, razina tumor-supresorske miR-204 u serumu pacijenata s različitim malignim tumorima želuca poraste [14].

Najnovija istraživanja su pokazala da je iste one mikroRNA čija je ekspresija karakteristična za adenokarcinom prostate moguće detektirati u urinu. Iako sama razlika u količini detektirane miR-21 nije bila dovoljna da se razlikuje hiperplazija prostate od tumora, u kombinaciji s detekcijom miR-19a i miR-19b, nađena je statistički značajna korelacija između pojavnosti količine tri navedene mikroRNA i adenokarcinoma prostate s većom preciznošću od testa za detekciju PSA (antigen specifičan za prostatu) koji je u uporabi [16].

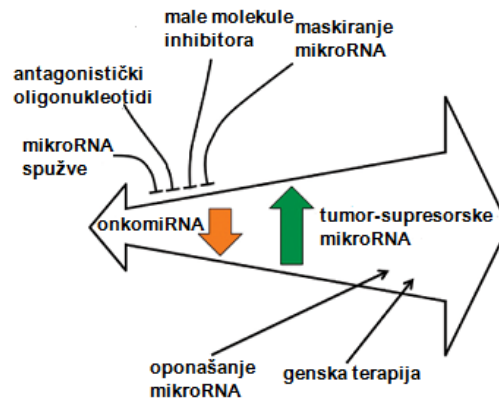
Za rano otkrivanje karcinoma ne-malih stanica pluća (NSCLC, od engl. *Non-small cell lung cancer*), u ispljuvku otkrivena su tri potencijalna biomarkera: miR-21, miR-31 i miR-210 s viskom točnošću od preko 80% [17].

Postojeća istraživanja trebaju za potvrdu studije provedene na većim populacijama.

5.2. MikroRNA kao mete antitumorskih lijekova

Jedna od glavnih osobina zbog kojih su mikroRNA privlačne mete lijekova je ta što one reguliraju više gena, često u međusobno složenim odnosima ili je pak jedan transkript podložan regulaciji od strane brojnih mikroRNA [2, 4]. Uz to, mikroRNA mogu biti uzrok

rezistencije na terapiju tako što reguliraju enzime koji metaboliziraju lijekove ili reguliraju ekspresiju transportera lijekova [4, 18]. Aktivnost mikroRNA je moguće suzbiti inhibitorima mikroRNA, DNA ili RNA oligomerima koji se vežu za mikroRNA (*antisense* terapija) te mikroRNA spužvama i maskiranjem aktivnosti mikroRNA [19] (Slika 4.).



Slika 4. Shematski prikaz terapijskih mogućnosti koje ciljaju mikroRNA. Dva su osnovna principa: neutraliziranje aktivnosti onkogenih mikroRNA (onkomiRNA) čime dolazi do smanjenja njihovog učinka (crvena strelica) ili uspostavljanje početne razine ekspresije tumor-supresorskih mikroRNA (zeleni strelica) [20].

5.2.1. Ciljanje onkomiRNA i oponašanje tumor-supresorskih mikroRNA

Mnogim metodama je cilj smanjiti ekspresiju onkogeno reguliranog s ciljanom mikroRNA. Prvo je razvijena metoda inhibicije miR-21 jednolančanim antagonističkim oligonukleotidima (anti-miR-21). U istraživanju je dokazana smanjena vijabilnost stanica hepatocelularnog karcinoma zbog pojačane aktivnosti kaspaza te je došlo do apoptoze i nekroze stanica HCC-a. Uz to, smanjena je mogućnost migracije malignih stanica i njihova klonalna ekspanzija [19]. Utišavanje miR-122 na ovaj način u stanicama jetre miša se pokazalo kao stabilno, učinkovito te je trajalo 23 dana nakon tretiranja oligonukleotidima [20].

Jedan od glavnih problema ovakvih terapija je unos mikroRNA u ciljano tkivo primaoca. Pri unosu u krv treba se osigurati uspješno izbjegavanje fagocitoze od strane monocitno-makrofagnog sustava te ekskreciju u bubrezima koji filtriraju sve molekule manje od 50 kDa. Stoga su razvijene nanočestice poput LPH (liposom-polikation-hijaluronska kiselina) koje su modificirane s dijelovima antitijela kako bi se osigurao transport miR-34 do

metastaza u plućima ili se pak koriste proteini kao što je atelokolagen u kompleksu s kojim se subkutano unosi miR-34a [2].

Ovakve mikroRNA još nisu podvrgnute kliničkim istraživanjima, iako su se u predkliničkim istraživanjima pokazale sigurnije od tretmana s interferirajućim RNA (RNAi) [18].

Oponašanje tumor-supresorskih mikroRNA može inducirati apoptozu tumorskih stanica te autofagiju. Početna funkcija tumor-supresorskih RNA se može uspostaviti uvođenjem sintetičkih oligonukleotida koji su identični odabranoj RNA te oponašaju njen učinak. Takve molekule su male, obično dvolančane te kemijski modificirane. Na primjer, apoptoza humanih staničnih linija malignog tumora prostate i stanica akutne mijeloične leukemije postignuta je unošenjem miR-15-a i miR-29. Još jedan od načina povećanja ekspresije tumor-supresorskih mikroRNA je pomoću vektora s adenovirusom. Takvi vektori se neće ugraditi u genom, a njihova transdukcija je prilično uspješna te su pokazali minimalnu toksičnost u početnim fazama kliničkih ispitivanja [20].

5.2.2. MikroRNA spužve

Uz *antisense* nukleotide, razvijene su druge tehnologije koje sprječavaju aktivnost mikroRNA. U tu svrhu je zabilježena uporaba malih inhibitora mikroRNA molekula poznatih i kao mikroRNA spužve. To su transkripti koji mogu na sebe vezati velike količine mikroRNA od interesa. Ti transkripti moraju imati visoku razinu ekspresije kako bi se miRNA vezale za njih, a ne za svoje mete, te trebaju imati pozicije koje inače cijepa Argonaut 2. Pomoću takvih konstrukata su uspješno utišane onkomiRNA *in vitro*, a razina uspješnosti je podjednaka onoj kod terapije oligonukleotidima [20].

5.2.3. Uspostavljanje početne razine ekspresije mikroRNA lijekovima

Budući da epigenetička inaktivacija tumor-supresorskih mikroRNA, odnosno aktivacija onkogenih mikroRNA vodi do pojave i razvoja malignih tumora, zaključeno je da se primjenom agensa koji mijenjaju epigenetičke oznake može uspostaviti inicijalna razina ekspresije mikroRNA. Na primjer, inhibitori DNA metiltransferaze mogu biti korišteni kako bi se smanjila razina metilacije gena. Među takve agense spadaju 5-aza-dC i 5-azacitidin kojima se u Sjedinjenim Američkim Državama tretiraju akutna mijeloična leukemija i mijeloplastični sindromi. Inhibitorima HDAC-a se pak liječe određeni tipovi limfoma, a

C646 inhibira histonsku acetiltransferazu EP300. Ovi lijekovi su nekim slučajevima imaju bolju efikasnost kada su primjenjeni zajedno zbog toga što mikroRNA gene regulira velik broj epigenetičkih efektoru te jedan od njih ne može sam promijeniti ekspresiju [10, 8]. Ipak, ovi lijekovi nisu selektivni te su poznate njihove nuspojave [11].

Stoga su istraživani i prirodni, netoksični agensi koji se ponašaju kao epigenetički regulatori. Izoflavoni iz soje, osobito genistein, inhibiraju ekspresiju miR-27a u stanicama melanoma, a uz to pokazuju sličan učinak kao 5-aza-2-deoksicitozin, odnosno demetiliraju promotore miR-29 i miR-1256 čija razina je smanjena kod nekoliko humanih staničnih linija malignog tumora prostate [21, 22]. Sličan učinak ima 3,3'-diindolimetan na promotor miR-34a kod istih staničnih linija. U niskoj koncentraciji kukurkumin neposredno regulira histonske deacetilaze, histonske acetiltransferaze i DNA metiltransferazu, a posredno, indukcijom ekspresije miR-29b, inhibira ekspresiju DNA metiltransferaze 3b čija meta je miR-29b. Tretman resveratrolom smanjuje ekspresiju DNMT 1 i 3b čime se uspostavlja inicijalna razina ekspresije miR-129, miR-204 i miR-489, a može se ponašati kao aktivator gena SIRT1, koji je poznat kao inhibitor HDAC-a [21, 22]. Uz navedene spojeve, sulforafan iz zelenog povrća te epigalokatehin-3-galat iz zelenog čaja pokazuju slična svojstva. Budući da se navedeni spojevi nalaze u navedenim namjernicama, smatra se da njihova konzumacija u svakodnevnoj prehrani može pridonijeti smanjenju rizika od malignih i drugih bolesti povezanih sa starenjem [23].

6. Zaključak

Promjene ekspresije mikroRNA prisutne su u širokom spektru malignih bolesti te su uzrokovane genetičkim, ali i epigenetičkim promjenama što objašnjava njihovu tkivnu specifičnost. Zbog složenosti regulatorne mreže, potrebno je uložiti daljnje napore kako bi se razlučile kritične promjene koje uzrokuju nastanak tumora od onih koje su njima posljedične. Razlikovanje primarnih od sekundarnih promjena omogućit će razvoj novih strategija u prevenciji i liječenju malignih bolesti.

MikroRNA su potencijalno dobri biomarkeri tumorskih bolesti zbog svoje prisutnosti u izvanstraničnim tekućinama te stabilnosti koje pokazuju. Za sada mnoge studije pokazuju različite rezultate, ali primjećuje se specifični profil ekspresije mikroRNA ovisno o tipu bolesti pa se mikroRNA čine obećavajućim za otkrivanje podrijetla tumora, njihovih

metastaza te procjenu učinka antitumorske terapije. Uz to, prirodni spojevi se također čine zanimljivom i netoksičnom alternativom nekim oblicima dosadašnjih terapijskih protokola.

Uporabom novih alata za uređivanje genoma kao što je CRISPR/Cas9 sustav, osim što je moguće mijenjati genetičku informaciju, moguće je ciljati ključna mjesta u biogenezi mikroRNA te uspostaviti trajnu promjenu ekspresije mikroRNA gena [23, 24]. Daljnja će istraživanja pomoći u spoznaji svih uloga mikroRNA i puteva regulacije u kojima sudjeluju čime će se osigurati veća mogućnost sprječavanja malignih bolesti te njihovo rano otkrivanje i uspješnije liječenje.

7. Literatura

1. Schickel R, Boyerinas B, Park S M, Peter M E, 2008. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* **27**, 5959–5974.
2. Iorio M V, Croce C M, 2012. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine* **4**(3), 143–159.
3. Zhang W, Dahlberg J E, Tam W, 2007. MicroRNAs in Tumorigenesis: A Primer. *The American Journal of Pathology* **171**(3), 728-738.
4. Krutovskikh V A, Herceg Z, 2010. Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers. *Bioessays* **32**, 894–904.
5. Sun X, Liu J, Xu C, Tang S C, Ren H, 2016. The insights of Let-7 miRNAs in oncogenesis and stem cell potency. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **20**(10), 1– 10.
6. Hwang H W, Mendell J T, 2006. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British Journal of Cancer* **94**(6), 776–780.
7. Peng Y, Croce C M, 2016. MicroRNA role in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **1**, 15004.
8. Xia J., Guo X., Deng K., 2014. Epigenetics, MicroRNAs and Human Cancer. U: *MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis*. Ed. S. Babashah, Springer International Publishing, Švicarska, pp. 30–57.

9. Liu X, Chen X, Yu X, Tao Y, Bode A M, Dong Z, Cao Y, 2013. Regulation of microRNAs by epigenetics and their interplay involved in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* **32**(1), 96.
10. Rusek A M, Abba M, Eljaszewicz A, Moniuszko M, Niklinski J, Allgayer H, 2015. MicroRNA modulators of epigenetic regulation, the tumor microenvironment and the immune system in lung cancer. *Molecular Cancer* **14**, 34.
11. Sharma S, Kelly T K, Jones P A, 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **31**(1), 27–36.
12. Saito Y, Jones P M, 2006. Epigenetic Activation of Tumor Suppressor MicroRNAs in Human Cancer Cells. *Cell Cycle* **5**(19), 2220– 2222.
13. Ayala-Ortega E, Arzate-Mejía R, Pérez-Molina R, González-Buendía E, Meier K, Guerrero G, Recillas-Targa F, 2016. Epigenetic silencing of miR-181c by DNA methylation in glioblastoma cell lines. *BMC Cancer* **16**, 226.
14. Chen X, Liu X S, Liu H Y, Lu Y Y, Li Y, 2016. Reduced expression of serum miR-204 predicts poor prognosis of gastric cancer. *Genetics and Molecular Research* **15** (2).
15. Wang N, Chen P, Huang L P, Wang T Z, 2016. Prognostic significance of microRNA-10b overexpression in breast cancer: a metaanalysis. *Genetics and Molecular Research* **15** (2).
16. Stuopelytė K, Daniūnaitė K, Jankevičius F, Jarmalaitė S, 2016. Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina* **52**, 116– 124.
17. Xing L, Su J, Guarnera M A, Zhang H, Cai L, Zhou R, Jiang F, 2015. Sputum microRNA biomarkers for identifying lung cancer in indeterminate solitary pulmonary nodules. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **21**(2), 484–489.
18. Riquelme I, Letelier P, Riffo-Campos A L, Brebi P, Roa J C, 2016. Emerging Role of miRNAs in the Drug Resistance of Gastric Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **17**(3), 424.
19. Gambari R, Brognara E, Spandidos D A, Fabbri E, 2016. Targeting oncomiRNAs and mimicking tumor suppressor miRNAs: New trends in the development of miRNA therapeutic strategies in oncology (Review). *International Journal of Oncology* **49**, 5–32.

20. Garzon R, Marcucci G, Croce C M, 2010. Targeting MicroRNAs in Cancer: Rationale, Strategies and Challenges. *Nature Reviews. Drug Discovery* **9**(10), 775–789.
21. Li Y, Sarkar F H, 2015. Targeting Epigenetically Deregulated miRNA by Nutraceuticals: Focusing on Cancer Prevention and Treatment. *Curr Pharmacol Rep* **1**, 1–10.
22. Daniel M, Tollefsbol T O, 2015. Epigenetic linkage of aging, cancer and nutrition. *The Journal of Experimental Biology* **218**(1), 59–70.
23. Sachdeva M, Pal M, Gupta N, Khan A, Majumdar M, Tiwari A, 2015. CRISPR/Cas9: molecular tool for gene therapy to target genome and epigenome in the treatment of lung cancer. *Cancer Gene Therapy* **22**, 509– 517.
24. Chang H, Yi B, Ma R, Zhang X, Zhao H, Xi Y, 2016. CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo. *Scientific Reports* **6**, 22312.

8. Sažetak

MikroRNA su male, nekodirajuće RNA koje reguliraju ekspresiju gena tako što degradiraju njihove transkripte ili sprječavaju njihovu translaciju. Otkrivene su 1993. pa se njihove uloge još uvijek istražuju. Istraživanje otežava činjenica da su mikroRNA često dio složenih sustava regulacije te utječu na ekspresiju velikog broja gena, ali i to da jedan gen može regulirati mnogo različitih mikroRNA. Važna je njihova uloga u razvoju malignih kod kojih se, usred promjene regulacije transkripcije, ponašaju kao onkogene ili tumor-supresorske te sudjeluju u pojavi svih šest glavnih obilježja malignih bolesti. Promjene u razini ekspresije mikroRNA mogu uzrokovati genetičke i epigenetičke promjene. MikroRNA nisu samo meta već imaju regulatornu ulogu tako što utječu na brojne epigenetičke modulatore. Tkivo-specifična ekspresija mnogih mikroRNA te njihova stabilnost u izvanstaničnim tekućinama čine ih obećavajućim biomarkerima, dok ih činjenica da utječu na brojne promjene uslijed malignih bolesti čini poželjnim metama lijekova. MikroRNA tako su jedna od mogućnosti za bolje razumijevanje malignih bolesti.

Summary

MicroRNAs are small non-coding RNA which control gene expression by degradation of protein-coding transcripts or through translational repression. They were discovered in 1993 so their roles are still matter of research. The fact that the miRNAs are often part of a complex regulation network and impact the expression of a large number of genes, makes research a bit difficult. As well as the fact that a single gene can regulate many different miRNA molecules. Therefore, miRNAs have important role in the development of malignancies where, depending on changes in their regulation, they can act as oncogenes or tumor-suppressor and participate in the development of all six major characteristics of malignant diseases. Both genetic and epigenetic mutations can cause changes in the level of expression of microRNAs because microRNAs are not only target, but also have a regulatory role of other genes by influencing the epigenetic effectors. The tissue-specific expression of many microRNAs and their stability in extracellular fluids makes them promising biomarkers, while the fact that the impact on the number of changes due to malignant disease makes them attractive targets of new drugs. Therefore, microRNAs are one of the possibilities for a better understanding of malignant diseases.