

Mikro-RNA:n potentiaali syöpien diagnosoinnissa ja hoidossa

LuK-tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Biokemian tutkinto-ohjelma

02/2024

Pinja Ylikangas

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

YLIKANGAS PINJA: Mikro-RNA:n potentiaali syöpien diagnosoinnissa ja hoidossa

LuK-tutkielma, 19 s.

Biokemia

02/2024

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Syöpäsairaudet ovat yksi maailman yleisimmistä kuolinsyistä, mikä luo tarpeen löytää tehokkaita diagnosointi- ja hoitomenetelmiä. Mikro-RNA:iden eli miRNA:iden ilmentyminen syöpäsoluissa on osoitettu olevan normaalista poikkeavaa. miRNA:t osallistuvat solussa geenien säätelyyn ja niiden säätelyhäiriö voi johtaa muutokseen sellaisissa geeneissä, jotka mutatoituneena aiheuttavat syöpää. Syöpähoito voitaisiin kohdentaa näihin soluihin palauttamalla niiden miRNA:iden pitoisuus normaalille tasolle. Syöpäsoluista eristettyjä miRNA:ita voidaan käyttää perusteena diagnosoille.

miRNA:t ovat osoittaneet hyvän soveltuvuuden syöpädiagnosien tekemiseen, mutta nykyiset miRNA:n havaitsemismenetelmät, kuten uuden sukupolven sekvensointi, ovat kohtuuttoman hintaisia laajaan käyttöön. Tutkimus keskittyy löytämään uusia, kustannustehokkaita menetelmiä, kuten vieritestit. Rutiininomaiseen diagnostiikkaan soveltuvien menetelmien kehityksen haasteena on miRNA:n lyhyt sekvenssi ja homologisuus. Tällä hetkellä syövän hoitoon ei ole tarjolla miRNA-pohjaisia lääkkeitä. Suurimmiksi ongelmiksi ovat osoittautuneet RNA:n labiilius ja vaikeus kulkeutua kohdesoluun, joita tutkimus pyrkii ratkaisemaan.

Avainsanat: Mikro-RNA, diagnostiikka, syöpä

Sisällys

1	Johdanto	2
2	miRNA:n biogeneesi	4
3	miRNA geenien säätelijänä.....	5
4	miRNA:n merkitys syövässä	7
4.1	Säätelyhäiriöt.....	7
4.2	miRNA:t syövän aiheuttajina	7
4.3	Biomerkkiaineet.....	8
5	miRNA:n havaitsemismenetelmiä.....	9
5.1	Geenisirutekniikka.....	9
5.2	RT-qPCR.....	10
5.3	<i>In situ</i> -hybridisaatio.....	11
5.4	Northern-blottaus	12
5.5	Uuden sukupolven sekvensointi	13
5.6	Lateraalivirtaustesti.....	14
6	miRNA-pohjaiset hoitomuodot.....	16
6.1	miRNA:n jäljittelijät ja antagonistit.....	16
6.2	Nykytilanne	16
6.3	Mahdollisuudet syövän hoidossa.....	17
7	Yhteenveto	19
	Lähteet	20

1 Johdanto

miRNA:t eli mikro-RNA:t ovat keskimäärin 22 nukleotidia pitkiä RNA-molekyylejä, joiden geenit sijaitsevat DNA:ssa proteiineja koodaamattomilla alueilla. miRNA:iden tärkein tehtävä on säädellä geenejä. Eläinsoluissa miRNA:t häiritsevät lähetti-RNA:n toimintaa, jolloin solu ei voi tuottaa proteiineja translaatiossa. Ihmisestä on löydetty yli 1000 erilaista miRNA-molekyyliä ja ne säätelevät yli kolmasosaa ihmisen geeneistä. (Matulić ja muut 2022.) Muita miRNA-molekyylien biologisia toimintoja ovat esimerkiksi osallistuminen verisolujen erilaistumiseen nisäkkäillä (Li ja Ruan 2009).

miRNA:iden epätyypillinen ilmentyminen on yhdistetty moniin eri sairauksiin, kuten syöpiin ja infektiosairauksiin. Kyseisissä sairauksissa miRNA:ita on alettu käyttää hyväksi diagnoosin tekemisessä ja sairauden etenemisen arvioinnissa. miRNA:t soveltuvat hyvin biomarkkereiksi niiden ominaisuuksien puolesta. Verenkiertoon päätyneitä miRNA:ta voidaan eristää myös muista kehon nesteistä, kuten syljestä tai virtsasta. Lisäksi ne ovat stabiileja yhdisteitä, sillä ne ovat resistenttejä RNAaseille. (Khandan-Nasab ja muut 2021.) Koska miRNA:ita on monissa kehon nesteissä, niitä hyödyntämällä voitaisiin toteuttaa mahdollisimman vähän potilaaseen kajoavaa syöpädiagnostiikkaa (Koturbash ja muut 2011).

Noin joka kolmas suomalainen sairastuu syöpään jossain vaiheessa elämäänsä. Väestön ikääntyminen aiheuttaa syöpätapausten määrien kasvua. Vuonna 2021 Suomessa todettiin yli 36 000 uutta syöpätapausta ja syöpään kuoli yli 13 000 henkeä. (Suomen Syöpärekisteri, 2021.) miRNA:t ovat osoittaneet potentiaalia syöpäsairauksien diagnosoimiseksi jo taudin aikaisessa vaiheessa (Matulić ja muut 2022). Varhainen diagnoosi parantaa ennustetta sairaudesta toipumiseen ja vähentää kuolleisuutta.

Lääkekehityksen trendinä on kehittää lääkkeitä, jotka kohdistuvat geenitason tapahtumiin. Tämän takia miRNA:t ovat suosittu tutkimuksen kohde, sillä ne hiljentävät geenejä vuorovaikuttamalla lähetti-RNA:n kanssa. Näin miRNA:t vähentävät proteiinien tuotantoa solussa, mitkä voivat esimerkiksi olla anti-apoptoottisia proteiineja pahanlaatuisissa kasvaimissa. (Pozniak ja muut 2022).

Tämän tutkielman tavoitteena on pohtia miRNA:n potentiaalia syöpädiagnoosien tekemisessä ja syövän hoitomuotona. Tutkielmassa esitellään miRNA:n biologisia

funktioita, miten miRNA:t voivat aiheuttaa syöpää ja mitä miRNA-molekyylejä tiedetään esiintyvän eri syövässä. Lisäksi vertaillaan nykyisiä miRNA:n havaitsemismenetelmiä, joita voidaan käyttää osana syöpädiagnooseja tehdessä. Lopuksi esitellään mahdollisuuksia miRNA-pohjaisista syövän hoitomuodoista ja tarkastellaan syitä, miksi kyseisiä lääkkeitä ei vielä löydy markkinoilta.

2 miRNA:n biogeneesi

miRNA:n biogeneesi voi tapahtua kanonista ja ei-kanonista reittiä pitkin (engl. *canonical and non-canonical pathway*). Reittien suurin eroavaisuus on siinä, että vain kanonisessa käytetään mikroprosessorikompleksia (engl. *microprocessor complex*). Suurimman osan miRNA:sta tiedetään syntyvän kanonista reittiä pitkin, joten tutkielmassa käsitellään vain sitä. (Matulić ja muut 2022.)

Ihmisen miRNA:n biogeneesi tapahtuu kahden esiasteen kautta. RNA polymeraasi II tai III transkriptoi tietyn miRNA:n geenistä primaari-miRNA:n (engl. *pri-miRNA*). Primaari-miRNA on yli 1000 nukleotidia pitkä yksinauhainen RNA-molekyyli, johon muodostuu hiuspinniä muistuttava rakenne (engl. *stem-loop*). Kyseisen molekyylin 5'-päässä on 7-metyylliguanosidi ja 3'-päässä poly-A-häntä. (Matulić ja muut 2022.)

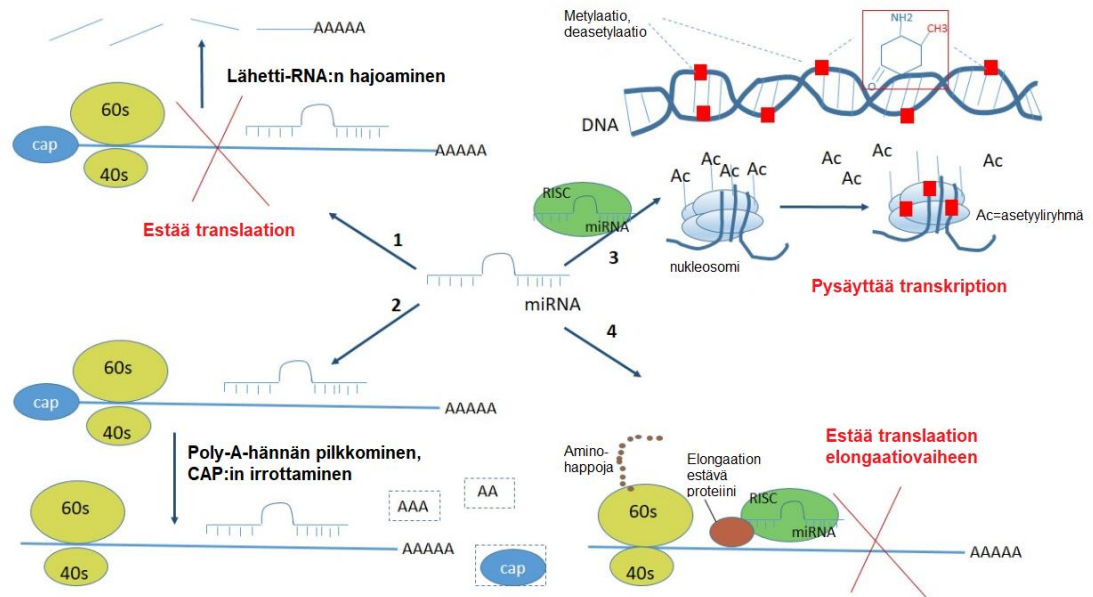
Drosha-niminen RNAasi III-entsyymi ja tuman proteiini Di-George Syndrome Critical Region 8 (DGSCR8) prosessoivat primaari-miRNA:sta pre-miRNA:n. Drosha ja DGSCR8 muodostavat mikroprosessorikompleksin, jossa primaari-miRNA halkaistaan. Syntynyt pre-miRNA on noin 65 nukleotidia pitkä ja molekyylin 3'-päässä on kahden nukleotidin pituinen pariutumaton osa. (Matulić ja muut 2022.)

Tumakalvolla oleva Exportin 5 -proteiini tunnistaa 3'-pään pariutumattoman osan. Kyseinen proteiini kuljettaa pre-miRNA:n tumasta sytoplasmaan yhdessä kofaktorinsa RanGTP:n (engl. *Ran guanosine triphosphate*) kanssa. Sytoplasmassa Dicer-entsyymi jatkaa pre-miRNA:n käsittelyä. Dicer ja sen kofaktori TRBP (engl. *TAR-RNA binding protein*) katkaisee pre-miRNA:n keskellä olevan pariutumattoman osan (engl. *terminal loop*) kohdalta, jolloin syntyvä tuote on kypsä, kaksinauhainen miRNA. (Matulić ja muut 2022.) Dicer-ribonukleaasikompleksi on osa RNA:n indusoimaa vaimentamiskompleksia (engl. *RNA-induced silencing complex, RISC*), joka purkaa miRNA-nauhaa. (Pozniak ja muut 2022.)

3 miRNA geenien säätelijänä

miRNA osallistuu geenien hiljentämiseen itsenäisesti sekä osana RISC:iä. miRNA sitoutuu vaimentamiskompleksiin ja näin ollen osallistuu RNA-interferenssiin. RNA-interferenssissä miRNA-molekyylillä on komplementaarinen hajotettavalle lähetti-RNA:lle. (Pozniak ja muut 2022.) miRNA:t sitoutuvat kohdelähetti-RNA:n proteiinia koodaamattomaan osaan (engl. *untranslated region*) ja aikaansaavat lähetti-RNA:n hajoamista ja rajoittavat translaatiota (Matulić ja muut 2022).

Kuvassa 1 on havainnollistettu miRNA:n tapoja rajoittaa geenien ilmentymistä (Pozniak ja muut 2022). miRNA voi estää translaation eli proteiinisynteesin sitoutumalla suoraan kohdelähetti-RNA:han, joka myös aiheuttaa lähetti-RNA:n hajoamisen palasiksi. Lisäksi miRNA voi deadenyloida lähetti-RNA:n eli saa aikaan polyA-hännän pilkkomisen 3'-päästä lyhyemmäksi. miRNA voi osallistua CAP-rakenteen irrottamiseen 5'-päästä. CAP-rakenne tarkoittaa lähetti-RNA:n 5'-päässä olevaa metyloitua guanosiinitrifosfaattia, joka on kiinnittynyt 5'-5'-sidoksella. Ilman kyseistä rakennetta lähetti-RNA ei ole sopivassa muodossa transloitavaksi. RISC:in yhteydessä miRNA voi vaikuttaa transkriptiotasolla DNA:n metylaatioon ja deasetylaatioon sekä histonien metylaatioon, mikä lopettaa transkription. Metylaatioissa molekyylisiin lisätään metyyliryhmä ja deasetylaatioissa poistetaan asetyyliiryhmä. Lisäksi RISC:issä toimiessaan miRNA voi vuorovaikuttaa repressoriproteiinien kanssa, mikä estää translaation elongaatiovaiheessa eli polypeptidiketjun pidentyessä. (Pozniak ja muut 2022.)



Kuva 1. miRNA:n tapoja estää geenin ilmentyminen. 1. miRNA estää translaation, 2. miRNA deadenyloi lähetti-RNA:n ja poistaa CAP-rakenteen, 3. RISC pysäyttää transkription ja 4. RISC estää translaation elongaatiovaiheen. Muokattu lähteestä Pozniak ja muut 2022.

miRNA:iden ilmentymistä säätelevät omat promootterit, jotka sijaitsevat genomien proteiinia koodaamattomilla alueilla tai pois silmukoitavissa introneissa (Matulić ja muut 2022). miRNA:n esiintymiseen solussa vaikuttaa esimerkiksi p53- ja c-Myc-transkriptiofaktoreiden vähenemä tai histoniproteiinien translaation jälkeiset muokkaukset (Pozniak ja muut 2022).

4 miRNA:n merkitys syövässä

4.1 Säätelhäiriöt

miRNA:n geenien säätely voi olla geneettistä ja kromosomimutaatiot aiheuttavat muutoksia säätelyyn. Mahdollisia kromosomimutaatiota ovat häviämä, kahdentuma, siirtymä tai jopa pistemutaatio. (Pozniak ja muut 2022.) Tiettyjen miRNA-geenien tiedetään sijaitsevan genomien herkissä ja epävakaisissa kohdissa, joissa tapahtuu DNA:n järjestäytymistä syövän muodostuessa (Baumann ja Winkler 2014). Tiedetään, että noin 50 % miRNA-geeneistä sijaitsee alueilla, jotka ovat yhdistetty syöpään (Matulić ja muut 2022). Genomin mutaatioiden lisäksi säätely voi häiriintyä miRNA:n biogeneesiin osallistuvien proteiinien mutaatioista. Tällaiset mutaatiot voivat vaikuttaa esimerkiksi miRNA:n sitoutumiseen Drosha-proteiiniin, vuorovaikuttamiseen Dicer-entsyymiin kanssa tai kulkeutumiseen Exportin 5 -reseptorin läpi. (Pozniak ja muut 2022.)

4.2 miRNA:t syövän aiheuttajina

miRNA:t vaikuttavat syövän muodostumiseen usealla tavalla. P53-transkriptiofaktorin säätelyhäiriö suojaaa syöpäsoluja apoptoosilta, jonka voi aiheuttaa miR-192, miR-194 ja miR-215:n vajaatuotto useissa myeloomissa. miRNA:t voivat myös estää Fas-ligandin toimintaa apoptoosissa. miR-21-5p:n ylituotto on osoitettu vähentävän Fas-ligandin ilmenemistä maksasyövässä. miRNA:t voivat vaikuttaa solusyklin säätelyyn ja syöpäsolujen levinneisyyteen estämällä RASSF9-proteiinia (engl. *Ras association domain-containing protein 9*), kuten miR-1269 vatsasyövän muodostuessa ja edistyessä. Maksasyövässä miR-487a:n ylituotto lisää syöpäsolujen jakautumista vaikuttamalla PIK3R1-kinaasiin (engl. *phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1*) ja näin ollen AKT-signaalintireittiin. (He ja muut 2020.)

Syöpään yhdistetyt miRNA:t voidaan jakaa kahteen alapopulaatioon: onkogeneihin tai kasvua rajoittaviin (engl. *tumor suppressor*). Osalla miRNA:ista voi olla piirteitä kummastakin alapopulaatiosta ja kyseiset piirteet tulevat esiin eri syöpätyypeissä. (Baumann ja Winkler 2014). Onkogeeniset miRNA:t ilmenevät syöpäsoluissa liiallisissa määrin ja vaikuttavat usein solusykliä sääteleviin geeneihin sekä edistävät syöpäsolujen leviämistä (He ja muut 2020; Koturbash ja muut 2011.) Yleisin onkogeeninä toimiva miRNA on miR-21. Kyseinen molekyyli on ylituotettu 15 eri syöpätyypissä, kuten

lymfoomassa ja keuhkosyövässä. miR-21 vaikuttaa solusykliä sääteleviin geeneihin saadakseen aikaan anti-apoptoottisen aktiivisuuden. (Koturbash ja muut 2011.) Kasvua rajoittavat miRNA:t ovat vajaatuotettuja syöpäsolussa, kuten esimerkiksi miR-149 vajaatuotto vatsasyövässä aiheuttaa solusyklin progression ja vähentää apoptoosia. (Baumann ja Winkler 2014)

4.3 Biomerkkiaineet

miRNA:ta voidaan käyttää syöpien biomarkkereina sillä verrattaessa normaaliin kudokseen, eri syöpätyypit osoittavat eri pitoisuuksia miRNA:ita (Xiong ja muut 2021). Lisäksi miRNA:t liittyvät vahvasti syövän muodostumisen ja etenemisen mekanismeihin, jolloin niiden pitoisuudet muuttuvat jo taudin varhaisessa vaiheessa (Matulić ja muut 2022). Ominaisuuksiensa puolesta ne sopivat biomarkkereiksi, sillä verenkierrossa esiintyessään miRNA:t pysyvät stabiileina useissa kehon nesteissä (Khandan-Nasab ja muut 2021). Taulukossa 1 on valikoima miRNA:ita, joiden pitoisuuksien muutokset on yhdistetty eri syöpäsairauksiin. Jotta miRNA:ita voidaan käyttää biomarkkereina kliinisessä käyttötarkoituksessa, kyseisten molekyylien pitoisuudet täytyy olla mitattavissa jollakin havaitsemismenetelmällä.

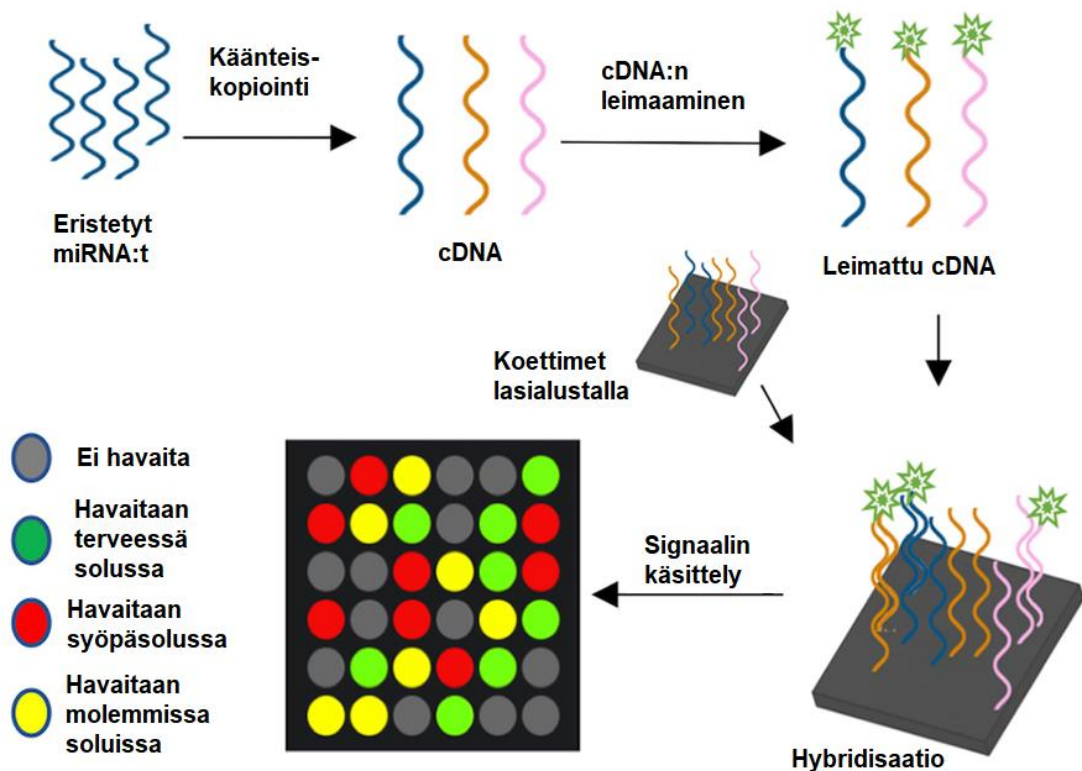
Taulukko 1. Valikoima miRNA:ita, joiden säätely on epätyypillistä ihmisen syöpäsairauksissa (Koturbash ja muut 2011).

miRNA	Ylituotettu	Vajaatuotettu
miR-1		Keuhko
miR-let7d	Haima	Rinta ja munasarja
miR-25	Aivo (glioblastooma)	
miR-26a		Munasarja ja kilpirauhanen
miR-29b	Rinta ja kilpirauhanen	Keuhko
miR-146a	Kohdunkaula	Eturauhanen
miR-181d	Rinta ja haima	
miR-199b		Munasarja
miR-203	Virtsarakko, rinta ja keuhko	Ruokatorvi

5 miRNA:n havaitsemismenetelmiä

5.1 Geenisirutekniikka

Geenisirutekniikka (engl. *microarray*) perustuu nukleiinihappojen hybridisaatioon. Kuvassa 2 on esitelty geenisirutekniikan perusperiaate. Tutkittavasta näytteestä eristetään miRNA:ta, jolle valmistetaan komplementaarinen DNA (cDNA) käänteiskopioijaentsyymillä. Syntynyt tuote leimataan esimerkiksi fluoresoivalla leimalla tai biotiinilla. Menetelmässä käytetään lasialustaa, johon on kiinnitetty satoja koettimia. Koettimissa on spesifiset sekvenssit eri miRNA:iden cDNA-molekyyleille ja niiden välinen hybridisaatio tuottaa signaalin. Lopuksi signaali täytyy käsitellä luettavaan muotoon, jossa intensiteetti on verrattavissa miRNA:n pitoisuuteen. (Siddika ja Heinemann 2021.)



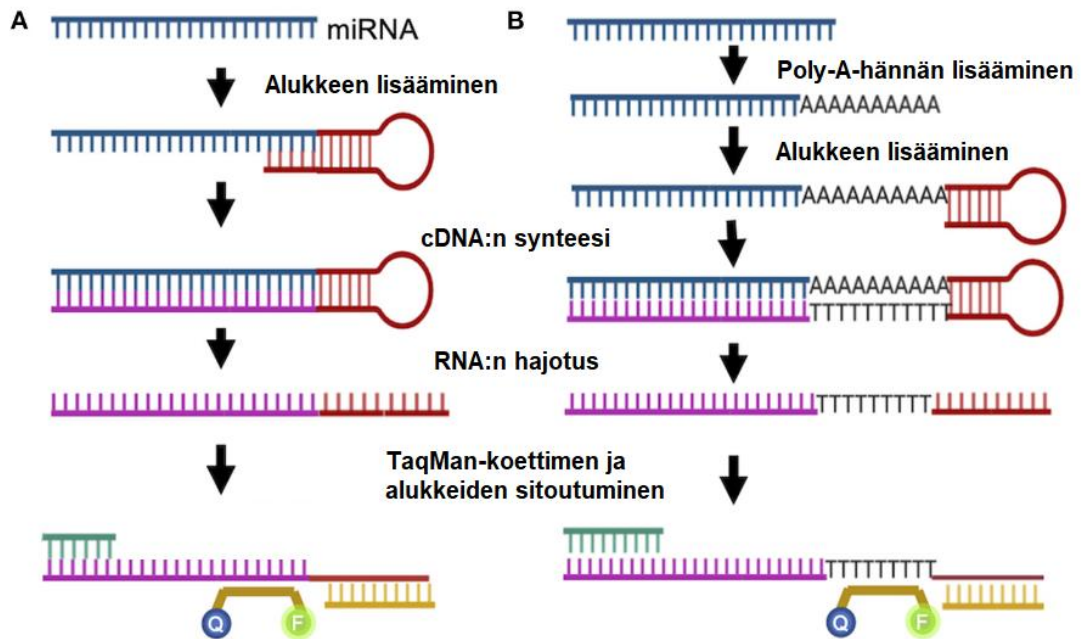
Kuva 2. Geenisirutekniikan perusperiaate. miRNA eristetään, valmistetaan leimattu cDNA ja annetaan hybridisoitua lasialustalla koettimien kanssa. Leiman tuottama signaali on verrattavissa miRNA:n pitoisuuteen. Muokattu lähteestä Siddika ja Heinemann 2021.

Geenisirutekniikka mahdollistaa useiden näytteiden samanaikaisen mittauksen, joka tekee siitä tehokkaan vaihtoehdon miRNA:n havaitsemiseksi. Toisaalta

geenisirutekniikkaa ei voida hyödyntää uusien miRNA-molekyylien todentamiseen, mutta sillä voidaan luoda miRNA-profiileja. Profiileja voidaan käyttää ilmentymistasojen vertailuun syövän etenemisen kartoittamisessa. Geenisirutekniikka ei kuitenkaan ole menetelmänä kovin herkkä tai spesifinen. (Khandan-Nasab ja muut 2021; Matulić ja muut 2022.) Geenisirutekniikkaa käyttäessä miRNA täytyy lähes poikkeuksetta rikastaa näytteessä, joka vaatii muiden tekniikoiden, kuten reaaliaikaisen käänteistranskriptaasipolymeraasiketjureaktion eli RT-qPCR:n (engl. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) käyttöä. Menetelmä on myös suhteellisen kallis. (Siddika ja Heinemann 2021.)

5.2 RT-qPCR

RT-qPCR-tekniikka perustuu polymeraasiketjureaktioon ja käänteiskopioijaentsyymiin. Tekniikassa yksijuosteisesta RNA:sta muodostetaan kaksijuosteista DNA:ta muutamalla välivaiheella (kuva 3). miRNA:lle syntetisoidaan cDNA käänteiskopioijaentsyymillä. cDNA:n syntetisoimiseen voidaan käyttää universaaleja tai spesifisiä alukkeita. DNA:n monistaminen tapahtuu lämpösykleissä, missä vaihtelevat lämpötilat saavat aikaan juosteiden eroamisen, alukkeiden kiinnittymisen kohdesekvenssiin ja uuden juosteen syntetisoimisen. miRNA:n pitoisuuden kvantifiointi tapahtuu vertaamalla näytteen kynnysykyä standardireaktioiden kynnysykyihin. Menetelmän haasteena on miRNA-molekyylien pituus, sillä ne ovat samanpituisia kuin käänteiskopiointiin tarvittavat alukkeet. (Matulić ja muut 2022.) Tämän vuoksi miRNA:han voidaan lisätä poly-A-häntä tai hiuspinnan muotoinen alue (engl. *stem-loop reverse transcription primer*), mikä pidentää kopioitavaa sekvenssiä. Kyseistä aluketta käytettäessä voidaan erottaa jopa vain yhden nukleotidin verran toisistaan poikkeavat miRNA:t. (Siddika ja Heinemann 2021.)



Kuva 3. miRNA:n havainnointi RT-qPCR:llä. Auke voi sitoutua miRNA:han A. suoraan tai B. poly-A-hännän lisäämisen jälkeen. Havaitsemiseksi voidaan käyttää A. spesifistä tai B. universaalia TaqMan-koetinta. Muokattu lähteestä Siddika ja Heinemann 2021.

Syntynyt cDNA-juostetta käytetään seuraavaksi PCR:n templaattina, jolloin tuotteeksi muodostuu kaksinauhaista DNA:ta. Koska kypsässä miRNA:ssa on sama sekvenssi kuin sen esiasteissa, RT-qPCR:ssä usein suositaan hydrolyysisiä koettimia (engl. *hydrolysis probes*), esim. TaqMan-koetin. (Matulić ja muut 2022.) TaqMan-koetin on komplementaarinen DNA-nauhalle ja sen fluorofori tuottaa signaalin, kun kyseinen DNA-nauha monistuu.

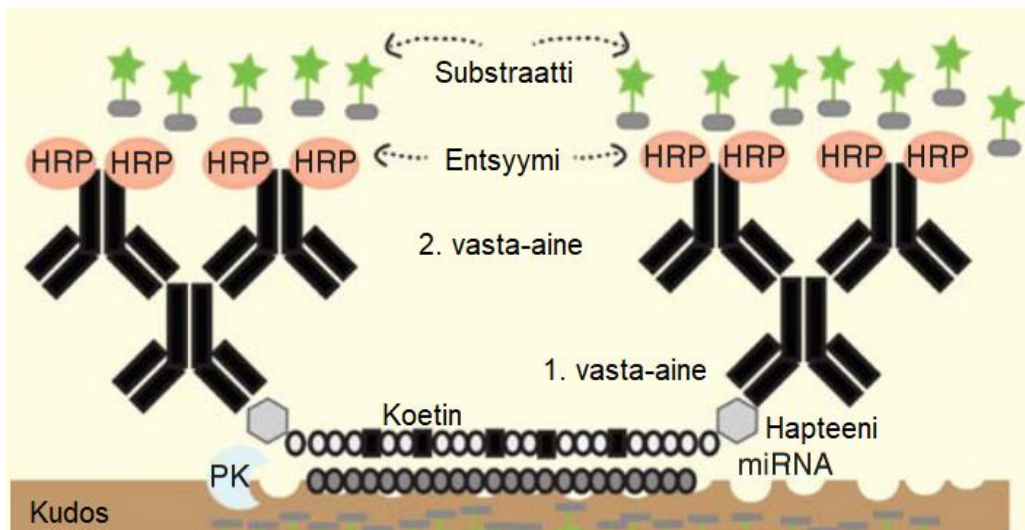
RT-qPCR:ää voidaan käyttää ainoastaan jo tunnettujen miRNA:iden pitoisuuksien selvittämiseen. Menetelmän etuina ovat sen spesifisyys ja herkkyys. (Matulić ja muut 2022.) Ongelmana on se, että menetelmän toteuttaminen vaatii kalliita laitteita ja ammattitaitoa ja vie lisäksi paljon aikaa. (Khandan-Nasab ja muut 2021).

5.3 *In situ* -hybridisaatio

In situ -hybridisaatio (ISH) on menetelmä, jolla voidaan havaita molekyylin esiintyminen ja sijainti kudoksessa tai solussa. Menetelmässä käytetään leimattuja komplementaarisia nukleiinihappokoettimia yksinauhaisen DNA:n tai RNA:n tunnistamiseksi. (Dave ja muut 2019.) ISH on ainut miRNA:n havainnointimenetelmä, jolla saadaan tietoa miRNA:n ilmentymisestä ja sijainnista kudoksessa. Tämä

mahdollistaa sen, että miRNA:n levinneisyyttä voidaan seurata solutasolla eikä sitä tarvitse erikseen eristää ja monistaa. (Khandan-Nasab ja muut 2021.)

Kuvassa 4 on esitetty tapa, jolla miRNA:ta voidaan havaita käyttämällä ISH:ta. Menetelmä aloitetaan käsittelemällä kudoksesta proteiini-kinasi K:lla. Tämä esikäsittely rikkoo proteiinien ja RNA-molekyylien välisiä sitoutumisia (engl. *crosslinking*), mikä helpottaa koettimen tunkeutumista miRNA:n luokse. Koetin hybridisoituu miRNA:n kanssa. Koettimessa on hapteeni, johon on kiinnitetty ensimmäinen vasta-aine. Ensimmäiseen vasta-aineeseen sitoutuu toinen vasta-aine. Toisessa vasta-aineessa on kiinnittyneenä piparjuuriperoksidaasi (engl. *horseradish peroxidase*, HRP). Kun reaktioon lisätään fluorokromiin konjugoitunutta substraattia, HRP tuottaa fluoresenssia sen mukaan, onko kudoksessa tutkittavaa miRNA:ta. (Sempere 2014.)



Kuva 4. *In situ*-hybridisaatio miRNA:n havaitsemiseksi. Entsyymien ja substraatin välinen reaktio tuottaa fluoresenssisignaalin, mikäli kudoksessa on tutkittavaa miRNA:ta. PK: proteiini-kinasi K. HRP: piparjuuriperoksidaasi. Muokattu lähteestä Sempere 2014.

ISH:n ongelmana on matala suorituskyky. Kuitenkin fluoresoivilla leimoilla leimatut koettimet kykenevät havainnoimaan useita miRNA-molekyyliä samanaikaisesti yhdessä reaktiossa. (Dave ja muut 2019.) ISH saa kritiikkiä siitä, ettei menetelmä ole kovinkaan herkkä tai spesifinen. (Khandan-Nasab ja muut 2021.)

5.4 Northern-blottaus

Northern-blottaus on tällä hetkellä käytetyin menetelmä miRNA:n havaitsemiseksi tutkimuksissa. Menetelmän suosio perustuu siihen, että Northern-blottaus antaa tietoa

sekä miRNA-molekyylin pituudesta että nukleotidisekvenssistä. (Khandan-Nasab ja muut 2021.) Northern-blottauksessa eristetyt RNA:t erotetaan toisistaan koon perusteella geelielektroforeesissa. miRNA:n eristäminen vaatii kaksi erillistä geelijaioa, jotta se saadaan erotettua esiasteistaan. Geelillä ajettut miRNA:t siirretään nylonkalvolle, johon lisätään komplementaarisia oligonukleotideja ja annetaan hybridisoitua miRNA:n kanssa. miRNA:n havaitsemiseksi komplementaarisisissa oligonukleotideissa käytetään sekä radioaktiivisia että ei-radioaktiivisia leimoja. (Matulić ja muut 2022.)

Menetelmän ongelmana on ollut alttius RNA:n hajoamiselle, joten miRNA:n havaitsemisen tehostamiseksi on alettu käyttää lukittuja nukleiinihappoja (engl. *locked nucleic acid, LNA*) (Matulić ja muut 2022; Siddika ja Heinemann 2021). Lukitut nukleiinihapot ovat muokattuja RNA-nukleotideja, missä metyleeni yhdistää riboosin 2'-hapon ja 4'-hiilen. Tämä tekee RNA:sta resistentin nukleaaseille. miRNA:t voidaan havaita jopa 10-kertaa tehokkaammin lukituilla nukleiinihappoilla kuin perinteisillä DNA-koettimilla. (Siddika ja Heinemann 2021.) Northern-blottauksella saadaan spesifisiä tuloksia halpaan hintaan, mutta menetelmä on aikaa vievä eikä kovinkaan herkkä. Menetelmää varten tarvitaan suuret määrät näytteitä ja koettimia. (Khandan-Nasab ja muut 2021).

5.5 Uuden sukupolven sekvensointi

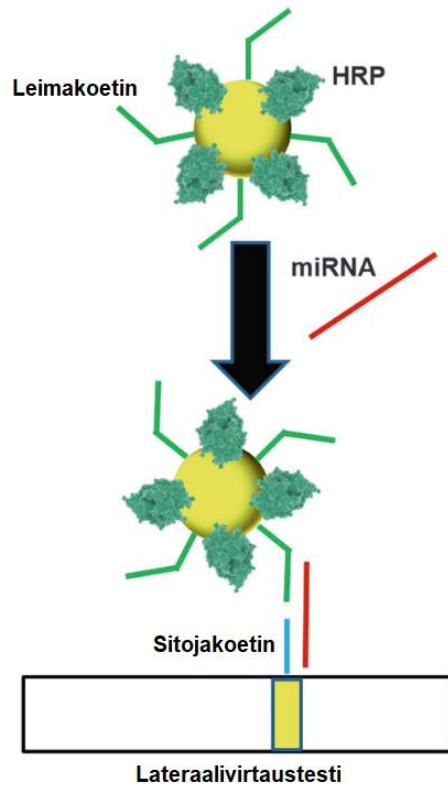
Uuden sukupolven sekvensointi (engl. *next generation sequencing, NGS*) on joukko menetelmiä, jolla voidaan havaita jo tunnistettuja miRNA:ita kuin myös löytää uusia. Lisäksi menetelmillä voidaan kvantifioida miRNA:n pitoisuus. miRNA eristetään ja kopioidaan cDNA:ksi. cDNA:ta monistetaan PCR:llä ja menetelmä luo samanaikaisesti dataa molekyylien sekvensseistä. NGS ei tarvitse spesifisiä alukkeita monistukseen tai tietoa miRNA:n sekvenssistä. (Dave ja muut 2019.)

NGS on nopea, herkkä ja spesifinen tapa havainnoida miRNA:ta. Menetelmä ei ole altis virheille ja se toimii tehokkaasti, sillä samanaikaisesti voidaan tutkia suuria määriä miRNA:ita. (Khandan-Nasab ja muut 2021). NGS on kuitenkin liian kallista rutiininomaiseen laboratoriotyöhön ja saatu data vaatii käsittelyä sekä tulkintaa. Koska menetelmä vaatii tietokoneen datan käsittelemiseksi, sitä ei voida hyödyntää vieritestauksissa. (Dave ja muut 2019.)

5.6 Lateraalivirtaustesti

Lateraalivirtaustestit kuuluvat vieritesteihin (engl. *point-of-care testing, POCT*). Niillä voidaan saada aikaan nopeita ja yksiselitteisiä tuloksia. miRNA:n havainnointiin käytettävät lateraalivirtaustestit perustuvat nukleiinihappojen käyttöön perinteisten vasta-aineiden sijaan. (Khandan-Nasab ja muut 2021.)

Yleisluonteinen lateraalivirtaustesti miRNA:n havaitsemiseksi rakennetaan niin, että tutkittavalle miRNA:lle valmistetaan komplementaariset leima- ja sitojakoettimet. miRNA:iden lyhyt sekvenssi on kuitenkin haaste koetinsuunnittelulle. Leimatekniikkana voidaan käyttää entsyymejä tai kultananopartikkeleita. Leimattu tai kultananopartikkeliin sidottu koetin sitoutuu miRNA:han ja niiden muodostama kokonaisuus sidotaan kalvolla olevalle testiviivalle. Testiviivalla on sitojakoetin ja testin positiivinen tulos syntyy, jos kaikki kolme ovat sitoutuneet yhteen. Testin visuaalinen tulos saadaan aikaan kultananopartikkelien kerääntymisellä testiviivalle tai kun entsyymi katalysoi reaktion, jossa substraatti muuttuu havaittavaksi tuotteeksi. Testi voidaan rakentaa myös niin, että sitojakoettimessa on komplementaariset alueet sekä miRNA:lle että leimakoettimelle. Näin ollen miRNA:n lyhyeen sekvenssiin ei tarvitse mahtua kahdelle koettimelle komplementaarisia alueita. Leimakoettimen täytyy sitoutua yhdessä miRNA:n kanssa sitojakoettimeen positiivisen tuloksen luomiseksi. Testiliuskaan voidaan lisätä yksinauhaista nukleiinihappoa hajottava nukleaasi, joka hajottaa sitoutumattomat koettimet, kun miRNA:ta ei ole läsnä näytteessä. Kuvassa 4 on esitetty eräs HRP-entsyymileimalla toteutettu lateraalivirtaustesti. (Dave ja muut 2019.)



Kuva 5. Lateraalivirtaustesti, jossa leimakoettiin on lisätty entsyymi. HRP: piparjuuriperoksidaasi. Kuva muokattu lähteestä Dave ja muut 2019.

Lateraalivirtaustestien etuna on niiden nopeus, yksinkertaisuus ja siirrettävyys. Kyseisten testien tekemiseen ei tarvita näytteiden esikäsittelyä, kalliita laitteita tai osaavaa henkilökuntaa. Testit ovat halpoja, käyttäjäystävällisiä sekä niillä on hyvä spesifisyys ja sensitiivisyys. (Dave ja muut 2019.) Vaikeuksina on kuitenkin miRNA:iden suuri määrä, sillä testin suorituskyky ei ole suuri. Yksi testiliuska voi testata vain yhtä miRNA:ta yhden kerran. Haasteena on myös miRNA-molekyylien koko, joka vaikeuttaa testin koetinsuunnittelua. Lisäksi testien kehittämistä hankaloittaa miRNA:iden samankaltaiset sekvenssit. (Wang ja muut 2022.)

6 miRNA-pohjaiset hoitomuodot

6.1 miRNA:n jäljittelijät ja antagonistit

miRNA:han perustuvassa hoidossa vajaatuotettu tai toimimaton miRNA voidaan korvata synteettisillä, miRNA:ta jäljittelevillä oligonukleotideilla (engl. *miRNA mimics*). Ylituotetun miRNA:n vaikutuksia inhiboidaan oligonukleotidiantagonisteilla. Sekä vajaan ylituotetun miRNA:n vasteisiin voidaan vaikuttaa myös muilla molekyyleillä. (Baumann ja Winkler 2014.)

miRNA:ta imitoidaan parhaiten kaksinauhaisella RNA-oligonukleotideilla, joissa on mahdollisimman vähän kemiallisia muokkauksia. miRNA:n jäljittelijän halutaan liittyvän osaksi solun RNA-interferenssiä, jolloin jäljittelijässä ei saa olla suuria kemiallisia muokkauksia, tai muuten RNA-interferenssikoneisto ei ota jäljiteltä miRNA:ta osakseen. Toisaalta muokkaamaton RNA hajoaa biologisissa nesteissä minuuteissa RNAasien vaikutuksesta, mikä vaikeuttaa RNA:n käyttöä lääkeaineena. Yksinauhaisia, miRNA:lle komplementaarisia oligonukleotideja voidaan käyttää antagonistina. Kun antagonistit sitoutuu komplementaarisesti miRNA:han, tämä ei pysty enää sitoutumaan hajotettavaan lähetti-RNA:han. (Baumann ja Winkler 2014.)

Syövän hoito voidaan kohdistaa miRNA:ihin myös ilman synteettisten oligonukleotidien käyttöä. Fluorokinolonit ovat laajakirjoinen ryhmä antibiootteja, joista enoksasiinin on osoitettu vähentävän solujen elinkelpoisuutta syöpäsolulinjoissa. Enoksasiini vahvistaa TRPB:n affiniteettiä miRNA:ihin. TRPB on Dicerin kofaktori ja osa RNA-interferenssin koneistoa. (Baumann ja Winkler 2014.) Ylituotetun miRNA:n vaikutuksia voidaan vähentää kohdentamalla lääkehoito miRNA:n biogeneesiin, kuten liittämällä antagonistiteja Drosha- ja Dicer-entsyymien sitoutumiskohtiin. Lisäksi voidaan valmistaa molekyylejä, joihin miRNA:t sitoutuvat voimakkaammin, kuin lähetti-RNA:han. Kun näiden molekyylipitoisuus solussa on suuri, miRNA suosii niitä lähetti-RNA:n sijasta, eikä vastetta synny. (Baumann ja Winkler 2014.)

6.2 Nykytilanne

Markkinoilla on vuonna 2021 ollut 13 eri oligonukleotidia lääkekäytössä, mutta ne eivät ole laadultaan miRNA-pohjaisia tai syövän hoitoon tarkoitettuja (Xiong ja muut 2021).

Ensimmäinen kliinisiin testeihin yltänyt miRNA-pohjainen hoitomuoto syöpään on ollut MRX34. MRX34 on synteettinen kaksinauhainen RNA-oligonukleotidi, joka on pakattu liposomiin. Kyseinen lääke korvaa maksasyöpäsolussa vajaatuotetun miR-34:n ja näin ollen palauttaa p53/wnt-signaalintireitin aktiivisuuden. (Baumann ja Winkler 2014.) MRX34 pääsi lääkekehityksessä vaiheeseen 2 asti, mutta lääkkeen tutkijat ilmoittivat jatkuvista ja vakavista haitallisista tapahtumista mikä johti tutkimuksen keskeyttämiseen. Tällä hetkellä tutkimuskohteena on esimerkiksi Cobomarsen, joka on päässyt lääkekehityksessä vaiheen 1 läpi. Antagonistina toimiva lääkeaine on lukittu nukleiinihappo, joka estää miR-155:n toiminnan lymfoomassa ja leukemiassa. (Xiong ja muut 2021.)

6.3 Mahdollisuudet syövän hoidossa

Oligonukleotidejä voidaan syntetisoida nopeammin ja halvemmin verrattuna kemoterapiassa käytettyihin sytostaatteihin. Lisäksi oligonukleotideillä on korkea affiniteetti ja suhteellisen yksinkertainen rakenne, joten ne ovat helposti tuotettavissa kemiallisesti. (Xiong ja muut 2021.) Syövän immunoterapiassa käytetään geneettisesti muokattuja kudosspesifisiä T-soluja, jotka pyritään kohdistamaan syöpäsoluja vastaan. T-solujen käyttö ei kuitenkaan ole saavuttanut hoitomuotona tarpeeksi pitkäjänteistä ja tehokasta vastetta. miRNA:ita voitaisiin hyödyntää yhdessä immunoterapian kanssa, missä miRNA:t stimuloisivat T-solujen jakautumista ja erilaistumista. (He ja muut 2020.)

Ensimmäisissä kliinisissä kokeissa käytettiin muokkaamattomia tai vain vähän muokattuja oligonukleotidejä, kuten fosforotiaattista muokkausta (engl. *phosphorothioate*). Vaikeutena on ollut saada lääkeaine kuljetettua syöpäsoluun ihmiskehossa, sillä lääkeaineiden täytyy ylittää useita esteitä päästäkseen ehjänä kohdesolun sisään. Oligonukleotidien ongelmana on ollut myös liian nopea poistuminen kehosta, mikä on vähentänyt lääkkeen tehoa. (Xiong ja muut 2021) Jotta lääkkeenä käytetty miRNA pääsee vaikuttamaan syöpäsolun geeninsäätelyyn, miRNA-molekyylin täytyy päästä solukalvon läpi, välttää lysosomin RNAasit ja sitoutua RISC:iin. Pakatut miRNA:t saadaan solukalvon läpi reseptorivälitteisellä endosytoosilla. Endosomien sisältö kuljetetaan lysosomeihin, missä RNAasien tehtävänä on hajottaa vierasperäinen nukleiinihappo. Tässä on haaste lääkekehitykselle, jotta miRNA saataisiin vapautettua

endosomista jo solulimassa. Solulimassa miRNA pääsee sitoutumaan vaimentamiskompleksiin ja osallistumaan RNA-interferenssiin. (Pozniak ja muut 2022.)

7 Yhteenveto

Diagnostista käyttötarkoitusta varten miRNA:n pitoisuuden muutos täytyy pystyä mittaamaan jollakin sopivalla menetelmällä. Nykyisillä havaitsemismenetelmillä on teknisiä haasteita miRNA-molekyylien pienen koon ja sekvenssien homologisuuden takia. Lisäksi useimmat menetelmät ovat liian kalliita laajaa kliinistä käyttöä varten.

miRNA:illa on osoitettu olevan kiistaton merkitys tautien kehityksessä, mutta niiden laaja käyttö biomarkkereina tarvitsee lisää tutkimusta (Matulić ja muut 2022). Kliinistä käyttötarkoitusta varten havainnointimenetelmän tulisi soveltua parhaiten verenkierrossa olevalle miRNA:lle, jotta näytteenotto olisi mahdollisimman vähän kajoavaa. miRNA esiintyy verenkierrossa matalina pitoisuuksina ja miRNA-molekyylit ovat hyvin monimuotoisia solun ulkopuolella, joten niitä olisi helpoin havainnoida NGS:llä tämän korkean sensitiivisyyden ansiosta. Geenisirutekniikalla voitaisiin verrata satojen miRNA:iden pitoisuuksia keskenään ja saada kokonaisvaltaisempi kuva taudista. Molemmat edellä mainitut menetelmät kuitenkin vaativat miRNA:n monistamisen RT-qPCR:llä ja ovat liian kalliita laajaan käyttöön. (Siddika ja Heinemann 2021.) ISH on ainut havainnointimenetelmä, jolla voitaisiin saada tietoa syöpäsolujen levinneisyydestä, mutta se vaatii kajoavan näytteenoton (Khandan-Nasab ja muut 2021). Vieritesteillä voitaisiin saavuttaa nopea ja halpa diagnoosi, mutta suoritusteho ei ole toistaiseksi riittävä.

Yhtäkään miRNA-pohjaista hoitomuotoa syöpään ei ole vielä kliinisessä käytössä, mutta vuonna 2021 kliinisiin tutkimuksiin on yltänyt kuusi lääkeainetta (Xiong ja muut 2021). Suurimmat haasteet liittyvät RNA:n kemialliseen muokkaamiseen ja siihen, että saadaan synteettinen oligonukleotidi vapautettua solulimassa.

Lähteet

- Baumann, V. & Winkler, J. (2014) miRNA-based therapies: Strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents. *Future Medicinal Chemistry* **6**:1967–1984.
- Dave, V. P., Ngo, T. A., Pernestig, A.-K., Tilevik, D., Kant, K., Nguyen, T., ... Bang, D. D. (2019) MicroRNA amplification and detection technologies: Opportunities and challenges for point of care diagnostics. *Laboratory Investigation* **99**:452–469.
- He, B., Zhao, Z., Cai, Q., Zhang, Y., Zhang, P., Shi, S., ... Wang, X. (2020) miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *Int J Biol Sci* **16**:2628–2647.
- Khandan-Nasab, N., Askarian, S., Mohammadinejad, A., Aghaee-Bakhtiari, S. H., Mohajeri, T. & Kazemi Oskuee, R. (2021) Biosensors, microfluidics systems and lateral flow assays for circulating microRNA detection: A review. *Anal Biochem* **633**:114406.
- Koturbash, I., Zemp, F. J., Pogribny, I. & Kovalchuk, O. (2011) Small molecules with big effects: The role of the microRNAome in cancer and carcinogenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **722**:94–105.
- Li, W. & Ruan, K. (2009) MicroRNA detection by microarray. *Anal Bioanal Chem* **394**:1117–1124.
- Matulić, M., Gršković, P., Petrović, A., Begić, V., Harabajsa, S. & Korać, P. (2022) miRNA in Molecular Diagnostics. *Bioengineering* **9**:459.
- Pozniak, T., Shcharbin, D. & Bryszewska, M. (2022) Circulating microRNAs in Medicine. *IJMS* **23**:3996.

- Sempere, L. F. (2014) Tissue slide-based microRNA characterization of tumors: How detailed could diagnosis become for cancer medicine? *Expert Review of Molecular Diagnostics* **14**:853–869.
- Siddika, T. & Heinemann, I. U. (2021) Bringing MicroRNAs to Light: Methods for MicroRNA Quantification and Visualization in Live Cells. *Front Bioeng Biotechnol* **8**:619583.
- Wang, N., Zhang, J., Xiao, B., Sun, X., Xie, R. & Chen, A. (2022) Recent advances in the rapid detection of microRNA with lateral flow assays. *Biosens Bioelectron* **211**:114345.
- Xiong, H., Veedu, R. N. & Diermeier, S. D. (2021) Recent Advances in Oligonucleotide Therapeutics in Oncology. *IJMS* **22**:3295.
- Suomen syöpärekisteri (2021). Syöpä 2021- raportti. (Luettu 30.12.2023)
<https://syoparekisteri.fi/raportit-ja-katsaukset/syopa-raportti/>