

Sirkulaarinen RNA ja sen rooli rintasyövässä

LuK-tutkielma
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Biokemia

Laatija:
Olivia Järvinen

3.4.2024
Turku

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

OLIVIA JÄRVINEN: Sirkulaarinen RNA ja sen rooli rintasyövässä

Tutkielma, 23s.

Biokemia

Helmikuu 2024

Ohjaaja: Pekka Rappu

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

Tutkielman aiheena on sirkulaarinen RNA ja sen rooli rintasyövässä. Tutkielmassa käsitellään sirkulaarisen RNA:n (circRNA) rakennetta sekä toimintaa rintasyövässä. circRNA on rakenteeltaan yksijuosteista RNA:ta, joka on muodoltaan rengasrakenteinen. circRNA:n rakenne johtuu molekyylille ominaisesta back-splicing-silmukoinnista, missä rengasrakenne syntyy kovalenttisella sidoksella. Tärkeimmät biologiset tehtävät circRNA:lla ovat microRNA-molekyyleihin tarttuminen, RNA:ta sitovien proteiinien konjugaattina toimiminen, transkription säätelyminen ja translaatioon osallistuminen.

Tutkielmassa tuodaan esiin tämänhetkiset rintasyövän toteamisen ja hoidon keinot. circRNA on lupaava rintasyövän diagnostiikan biomarkkeri, mikä perustuu circRNA:n ilmenemisen muuttumiseen syöpäkasvaimessa. circRNA on spesifinen rintasyövän alatyypille, minkä avulla potilaalle voidaan antaa oikeaa hoitoa. Rintasyöpätyyppejä ovat luminaaliset rintasyövät, HER2- rintasyöpä ja kolmoisnegatiivinen rintasyöpä. Tämänhetkisissä rintasyövähoidoissa on heikkoutena syövän vastustuskyky syöpälääkkeille, jonka syntyy circRNA:t osallistuvat. Tulevaisuuden tutkimuksissa keskitytään löytämään circRNA:han pohjautuvia hoitoja, jotka estäisivät vastustuskyvyn syntymisen. circRNA:n tutkimuksissa etsitään myös täsmälääkkeitä, jotka vaikuttaisivat circRNA:n ilmenemiseen kiihdyttävästi tai heikentävästi, millä syövän etenemistä ja etäpesäkkeiden syntyä estetään.

Asiasanat: circRNA: sirkulaarinen RNA, rintasyöpä, miRNA: microRNA, biomarkkeri, rintasyövän hoito

Sisällysluettelo

1	Johdanto	4
2	Sirkulaarinen RNA	6
2.1	Rakenne	6
2.2	Toiminta	8
3	Rintasyöpä	11
3.1	Rintasyöpätyypit	12
3.2	Sirkulaarinen RNA rintasyövässä	13
4	Sirkulaarisen RNA:n kliininen merkitys	16
4.1	Diagnostiikka	16
4.2	Lääkeresistenssi	17
4.3	Biologinen täsmälääke	18
5	Tulevaisuuden tutkimukset	20
6	Yhteenveto	21
	Lähteet	22

1 Johdanto

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpä, jonka suurin sairastumisriski on vanha ikä. Rintasyöpä todetaan mammografiakuvauksella, rintojen tunnustelulla tai kaikututkimuksella. (Vehmanen 2020b.) Rintasyövän tavanomaisin hoitomuoto on rinnan säästävä leikkaus, mutta välillä ainoana ratkaisuna on koko rinnan poisto. Rintasyövän uusiutumisen riskiä vähennetään sädehoidolla, mikä aiheuttaa potilaalle haitallisia sivuvaikutuksia. Elimistöön jääneitä syöpäsoluja hävitetään liittäen lääkehoidoilla kuten solunsalpaajilla, vasta-ainehoidoilla ja hormonihoitoilla. Lääkehoidon valintaan vaikuttaa rintasyövän alatyypin tietäminen, joita ovat luminaalinen, HER2-positiivinen ja kolmoisnegatiivinen rintasyöpä. (Vehmanen 2020a.) Maailmanlaajuisesti on edistytty paljon rintasyövän hoidoissa, mutta syöpään sairastuvuus ja kuolleisuus on yhä korkea (Wang ja Fang 2018).

Sirkulaarinen RNA (circRNA) on yksijuosteista rengasmaista RNA:ta. circRNA:ta muodostuu back-splicing-silmukoinnilla, joka poikkeaa RNA:n normaalista lineaarisesta silmukoinnista. Rintasyövän diagnostiikassa circRNA on saavuttanut huomiota sen merkityksestä rintasyövän tunnistuksessa ja toimimisesta syövän ennusteen indikaattorina. (Wang ja muut 2023.) circRNA-molekyylit sopivat hyvin rintasyövässä biomarkkeriksi niiden ominaisuuksien ansiosta: niillä on pitkä puoliintumiskäikä sekä niiden ilmeneminen syöpäkasvaimessa on spesifistä. circRNA-molekyylien spesifisyyden ja normaalista poikkeavan käyttäytymisen ansiosta ne toimivat biomarkkerina rintasyöpätyypin identifioinnissa. (Li ja muut 2019b.)

circRNA osallistuu syöpään liittyvien prosessien säätelyyn biomarkkerina toimimisen lisäksi. circRNA:n biologisia toimintoja ovat miRNA-molekyyliihin tarttuminen, RNA:ta sitovien proteiinien konjugaattina toimiminen, transkription säätely ja proteiinien sekä peptidien koodaaminen. (Wang ja muut 2023.) circRNA:n toimintaan pohjautuvissa lääkehoidoissa pyritään vaikuttamaan syövän syntyyn ja etenemiseen vaikuttamalla circRNA:n syöpään liittyvien prosessien säätelyyn (Tran ja muut 2020).

Kandidatutkielmassa käsittelen circRNA:n ominaisuuksia, kuten rakennetta ja circRNA:n toimintaa soluissa. Tutkielmassa käsittelen tulevaisuuden mahdollisuuksia käyttää circRNA:ta rintasyövän diagnoosissa kuten biomarkkerina rintasyövän alatyypin

identifioinnissa ja syövän ennusteen määrittämisessä. Lisäksi tutkielmassa tuon esiin tietoa tämänhetkisestä rintasyövän hoidosta, minkä pohjalta pohdin circRNA:n merkitystä rintasyövän hoidossa.

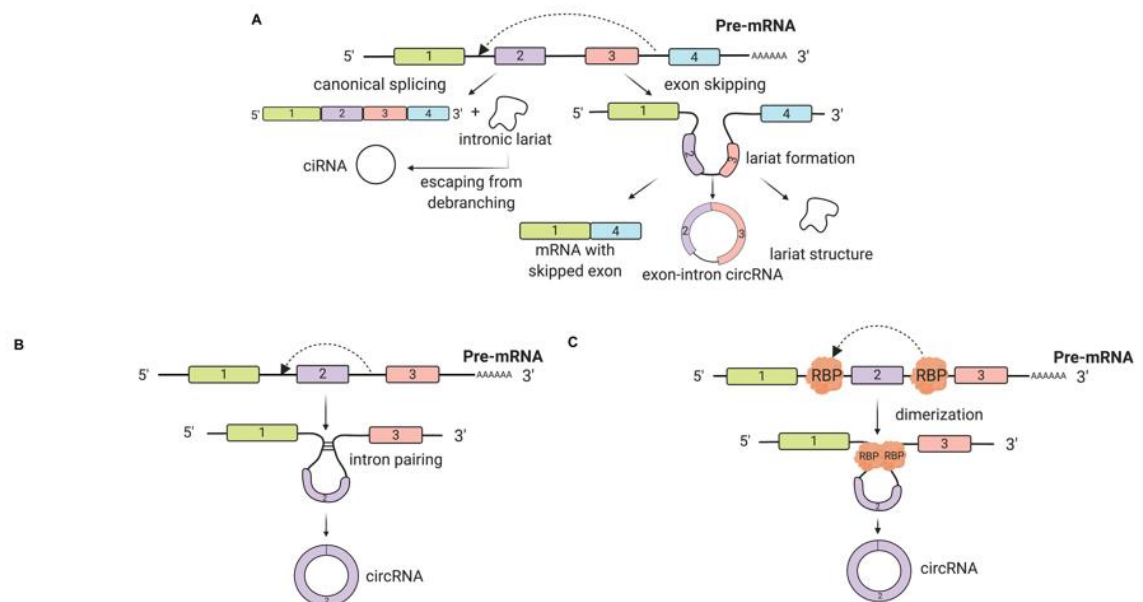
2 Sirkulaarinen RNA

circRNA:ta havaittiin RNA-viruksissa ensimmäisen kerran elektronimikroskoopilla 1976, milloin circRNA:ta pidettiin virus analogeina (Sanger ja muut 1976). Myöhemmin vuonna 1979 tehdyssä tutkimuksessa circRNA:ta havaittiin ensimmäisen kerran eukaryoottisoluiissa elektronimikroskoopilla (Hsu ja Coca-Prados 1979). circRNA-molekyylejä pidettiin alkuun pieleen menneen silmukoinnin viallisina RNA-molekyyleinä, mikä johti taukoon circRNA tutkimuksien kehityksessä. Toinen syy, tutkimuksien puutteelle on, että referenssigenomina käytettiin lineaarista RNA-sekvenssiä, joka ei tunnista circRNA:n rengasrakennetta. Sekvenssin datasta ovat poistuneet tiedot circRNA:sta. Nykyään bioinformatiikan analyysit ja sekvensointimenetelmät ovat kehittyneet huomattavasti, minkä avulla circRNA:n toimintaa biologisissa prosesseissa on selvitetty. (Wang ja muut 2023.) circRNA-molekyylejä on olemassa useissa eri lajeissa, mikä tukee niiden tärkeyttä evoluutiossa ja innostaa uusille tutkimuksille (Li ja muut 2019b).

2.1 Rakenne

circRNA muodostuu yksijuosteisesta RNA:sta. circRNA:n rakenne on kovalenttisesti suljettu silmukka, jonka muodostamista avustaa RNA-polymeraasi II (Tran ja muut 2020). Normaalisti RNA silmukoidaan lineaarisesti, mutta circRNA:lla on vaihtoehtoista back-splicing-silmukointia (Wang ja muut 2023). Lineaarisisessa silmukoinnissa liitetään eksonit yhteen ja poistetaan intronit. Transkription jälkeisessä muokkauksessa lineaariseen lähetti RNA:han lisätään 5'-häntään CAP-rakenne ja 3'-häntään poly-A-häntä. Lineaarisisessa silmukoinnissa silmukoidaan 5'-pään silmukoinnin luovuttaja (engl. *splice donor*) 3'-pään silmukoinnin vastaanottajaan (engl. *splice acceptor*), mutta back-splicing – silmukoinnissa luovuttaja ja vastaanottaja menee vastakkaisesti, koska 3'-pään silmukoinnin luovuttaja liittyy 5'-pään silmukoinnin vastaanottajaan kovalenttisesti. (Chen ja Yang 2015.) circRNA:n silmukointi tapahtuu eksoneita, introneita tai niitä molempia silmukoiden. Tämän seurauksena circRNA:ta on olemassa kolmea tyyppiä: eksoni-circRNA:ta, sirkulaarista introni-circRNA:ta sekä eksonia ja intronia sisältävää RNA:ta. (Li ja muut 2019a.) Suurin osa circRNA:sta on silmukoitu eksoneista ja nykyään termillä circRNA viitataan pääasiassa eksoneista silmukoituun sirkulaariseen RNA:han (Wang ja Fang 2018).

Kolmella erilaisella circRNA-tyypillä on myös erilaiset tavat muodostaa silmukkarakenne. Ensimmäinen silmukoimismetodi on eksonien väliin jättäminen, missä syntyy eksoneita ja introneita sisältävää circRNA:ta (kuva 1A). Eksonien väliin jättämisessä circRNA:n rengasrakenne muodostuu, kun eksonien välille muodostuu kovalenttinen sidos. (Wang ja Fang 2018.) Eksonien väliin jättämisessä syntyy circRNA:n lisäksi lineaarista lähetti-RNA:ta, josta ovat poistuneet circRNA:n sisältämät väliin jätetyt eksonit, ja introneja sisältävä lassorakenne. Lassarakenteesta voi syntyä pelkästään introneita sisältävää circRNA:ta, jos se pääsee pois RNA:n lassorakennetta pilkkovan entsyymin luota (engl. *DBR1 debranching RNA lariats* 1). (Tran ja muut 2020.)



Kuva 1: circRNA:n back-splicing silmukoimintimetodit. A) circRNA:n silmukoimintimetodi ensimmäisellä back-splicing menetelmällä, joka on eksonien väliin jättäminen. (engl. exon skipping). Eksonien väliin jättämisessä syntyy introneista lassorakenne, eksoni-introni-circRNA ja lähetti-RNA:ta. B) Toinen silmukoimintimetodi on intronien pariutuminen (engl. intron pairing), jossa syntyy eksoni-circRNA tai eksoni-introni-circRNA. C) Kolmas silmukoimintimetodi on intronien yhdistäminen RNA:ta sitovilla proteiineilla, RBP (engl. RNA binding protein). Silmukkarakenteen syntyminen edellyttää RNA:ta sitovien proteiinien dimerisoitumisen. (Tran ja muut 2020.)

Toinen silmukoimintimetodi on intronien pariutuminen, missä syntyy pelkästään eksoneita sisältävää circRNA:ta tai myös intronia sisältävää circRNA:ta. (Wang ja Fang 2018) Intronien pariutumisessa silmukkaan kuuluvien eksonien molemmille puolille jäävät vastakkain intronit, jotka pystyvät rakenteeltaan liittymään yhteen (kuva 1B). Intronien pariutumisessa vastakkaisen emäsparien välille muodostuu sidoksia, mikä mahdollistaa circRNA:n sulkeutuneen rengasrakenteen. (Tran ja muut 2020.) Eksonien

välillä olevilla introni-alueilla on toistuvia elementtejä, kuten ALU-toistojaksoja. Intronien pariutuminen tapahtuu usein näiden toistuvien ALU-jaksojen välillä eli circRNA:n muodostumiselle on etuna, että esilähettti-RNA:lla on pitkät intronit. (Wang ja Fang 2018.)

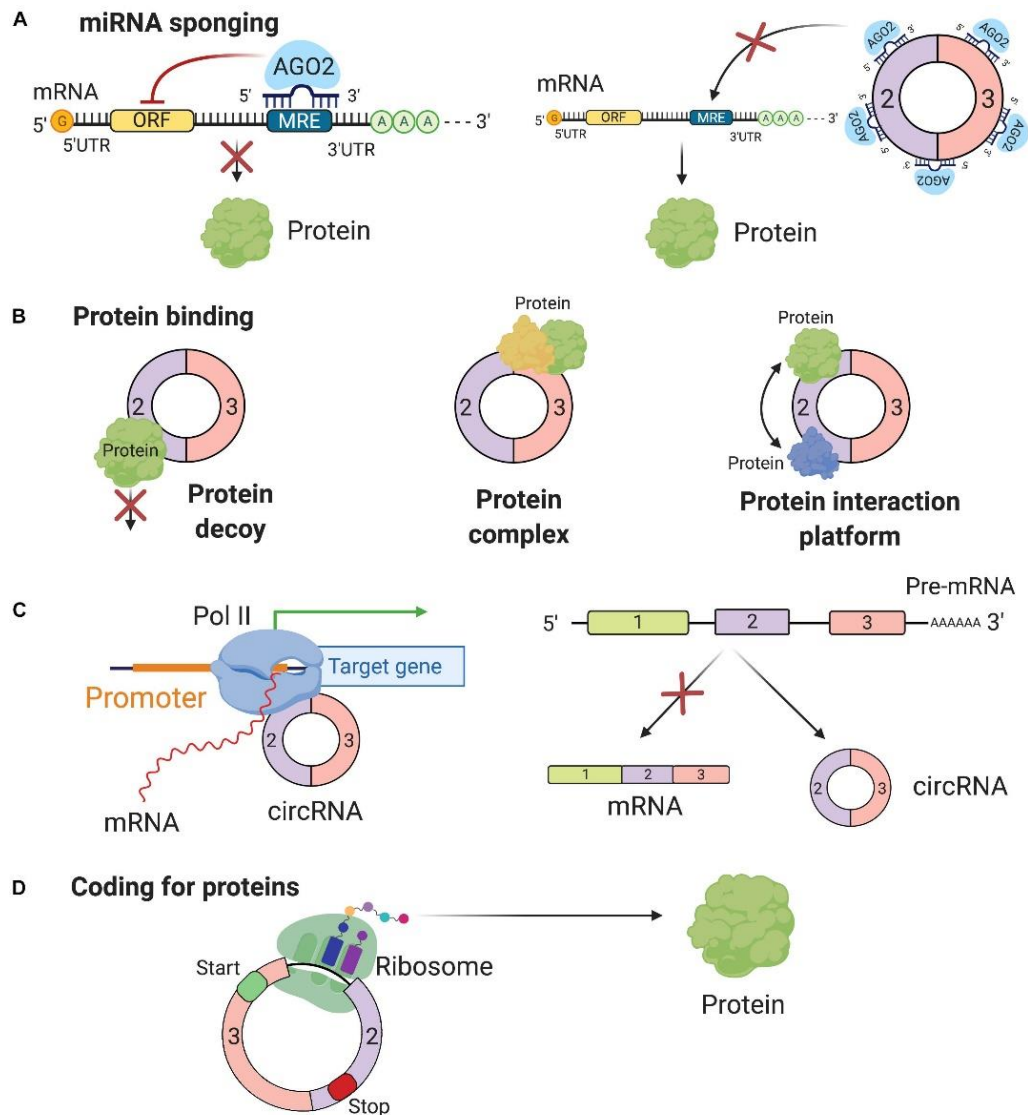
Kolmas circRNA:n silmukoimistapa on intronien yhdistäminen RNA:ta sitovilla proteiineilla (engl. *RNA-binding protein, RBP*), milloin syntyy vain eksonia sisältävää circRNA:ta (kuva 1C). circRNA:n rengasrakenteen syntyminen vaatii silmukoitavien eksonien molemmilta puolilta RBP:t, jotka sulkevat silmukan. Silmukan sulkeutuminen ja proteiinien aktivoituminen vaativat RBP:n dimerisaation. (Tran ja muut 2020.) Dimerisaatiossa proteiinit liittyvät muodostaen toimivan yksikön, joka on joko homodimeeri tai heterodimeeri (Dang 2022).

circRNA:t ovat kestäviä rakenteeltaan, mikä perustuu circRNA:n silmukkarakenteeseen, josta puuttuu 5'-päästä CAP-rakenne ja 3'-päästä poly-A-häntä. Tämä estää RNA-eksonukleaasia tai RNAasi R:ää hajottamasta circRNA:ta. Näistä edellä mainituista syistä circRNA on kestävämpi rakenteeltaan kuin lineaarinen RNA ja sillä on pidempi puoliintumisaika. Nämä piirteet tekevät circRNA:sta ideaalisen biomarkkerin diagnostiikassa. (Li ja muut 2019a; Wang ja Fang 2018.) circRNA-molekyylit ovat levinneet laajasti elimistöön, sillä ne voivat kulkea solunulkoisessa nesteessä. circRNA:ta voidaan havaita veren plasmasta sekä eksosomeista, mikä tukee myös circRNA:n käyttöä rintasyövän diagnostiikassa. (Li ja muut 2019b.)

2.2 Toiminta

circRNA:t vaikuttavat microRNA-molekyylien toimintaan. mikroRNA eli miRNA on koodaamatonta RNA:ta, jonka pituus on 19–24 nukleotidia. miRNA on tärkeä solujen biologisissa prosesseissa, kuten jakaantumisessa, kehitymisessä, apoptoosissa sekä metaboliassa. (Misir ja muut 2020.) miRNA:t osallistuvat muun muassa syöpäsolujen geenien säätelyyn (Z. Wang ja muut 2023). circRNA:t sisältävät vaihtelevia määriä miRNA:ssa olevia MRE-alueita (engl. *miRNA response element*), jotka sitovat miRNA:ta circRNA:han. circRNA:t pystyvät myös varastoimaan tai kuljettamaan miRNA:ta, minkä takia circRNA:ta kutsutaan miRNA-pesusieneksi (engl. *miRNA sponge*). (Misir ja muut

2020.) circRNA:han voi tarttua useita kymmeniä miRNA-molekyylejä, jotka sitoutuisivat muuten lähetti-RNA:han. circRNA:t voivat tämän seurauksena inhiboida miRNA:ta estämällä lähetti-RNA:n ja miRNA:n kohtaamisen tai kiihdyttää miRNA:n kohdegeenien ilmenemistä. (Kuva 2A) (Wang ja muut 2023.)



Kuva 2: circRNA:n toiminta. A) miRNA:n tarttuminen circRNA:han MRE-alueisiin (engl. miRNA sponging), mikä inhiboi miRNA:ta tai kiihdyttää miRNA:n kohdegeenien ilmenemistä. B) RNA:ta sitovien proteiinien (RBP) konjugaattina toimiminen (engl. protein binding). circRNA muodostaa kompleksin RBP:n kanssa ja vaikuttaa sen aktiivisuuteen ja proteiinien sijaintiin solussa. C) circRNA:t säätelevät transkriptiota sitoutumalla RNA polymeerasi II:n promoottoriin (Pol II). Pol II:seen sitoutuminen kiihdyttää circRNA:n ilmenemistä. D) circRNA:t pystyvät koodata mikropeptidejä ja proteiineja translaatiolla (engl. coding for proteins), koska circRNA:ssa on yli 100 aminohapon avoin lukukehys, ORF. Joistain circRNA-molekyyleistä löytyy myös AUG aloituskodoni ja kyky sitoutua ribosomiin. (Tran ja muut 2020.)

circRNA:t voivat toimia myös RNA:ta sitovan proteiinin konjugaattina. RBP:t sitoutuvat RNA:han sekä osallistuvat RNA:n transkriptioon, silmukointiin ja hajoamiseen. RBP:t ovat mukana lisäämässä poly-A-hännän esiaste-RNA:han. (Wang ja muut 2023.) circRNA

sitoutuu RBP:hen muodostaen kompleksin, joka säätelee proteiinien sijaintia solun sisällä sekä prosessiin osallistuvien proteiinien aktiivisuutta (Kuva 2B) (Zeng ja muut 2022). Tutkimuksissa on löydetty RBP nimeltä HuR (engl. *human antigen R*), joka pystyy vakauttamaan lähetti-RNA:ta ja säätelemään niiden translaatiota. Tutkimuksessa huomattiin circ-1073-molekyylin sitoutuvan HuR-proteiinin, milloin proteiinikompleksi estää kasvaimen kasvua rintasyövässä. (Wang ja muut 2023.)

Useimmat circRNA:t osallistuvat lähetti-RNA:n säätelyyn toimimalla miRNA-sienenä, mutta osa säätelee geenien cis- ja trans-transkriptiota. (Wang ja Fang 2018) circRNA:t voivat kiihdyttää muiden geenien ilmenemistä tai suosia circRNA:n ilmenemistä, mikä inhiboi mRNA:n syntymistä. Eksoni-introni-circRNA:t kiihdyttävät lähetti-RNA-molekyylien transkription aloitusta sitoutumalla DNA:n promoottorialueelle, mikä kiihdyttää circRNA:n syntyä (Kuva 2C). (Tran ja muut 2020.) Eksoni-introni-circRNA:t muodostavat esikompleksin U1snRNA:n (engl. *U1 spliceosomal RNA*) kanssa, millä sitoutuu RNA-polymeraasi II:n promoottoriin. U1snRNA stimuloi RNA-polymeraasi II:sta muodostamaan ensimmäisen fosfodiesterisidoksen. Transkription pidennysvaiheelle oleellinen vaihe on RNA-polymeraasi II:en fosforyloituminen. Vain intronia sisältävät circRNA:t osallistuvat transkription säätelyyn sitoutumalla fosforyloituneeseen RNA-polymeraasi II:een. (Bose ja Ain 2018; Wang ja muut 2023.) Intronisit circRNA:t kiinnittyvät RNA-polymeraasi II:een ja kiihdyttävät oman lähetti-RNA:n tuottamista (Tran ja muut 2020).

circRNA-molekyylejä on pidetty koodaamattomana RNA:na, koska niiltä puuttuu 3'-ja 5'-päätt sekä ribosomin sitoutumispaikat. Viimevuosina on huomattu, että circRNA:t voivat kumminkin sitoutua ribosomiin ja jotkut sisältävät aloituskodonin AUG. Tämä mahdollistaa, että circRNA pystyy koodaamaan mikropeptidejä ja pieniä proteiineja translaatiolla (Kuva 2D). (Wang ja muut 2023.) circRNA:n kyky toimia translaation templaattina liittyy siihen, että osalla circRNA-molekyyleistä on yli 100 aminohapon pituinen avoin lukukehys ORF (engl. *open reading frame*) (Tran ja muut 2020; Zeng ja muut 2022).

3 Rintasyöpä

Rintasyöpä on yksi kolmesta maailman yleisimmistä syövästä ja naisilla yleisin pahanlaatuinen syöpä (Harbeck ja Gnant 2017). Suomessa sairastuu vuosittain noin 5000 naista rintasyöpään, mutta elämänsä aikana sairastuneiden osuus on yksi seitsemästä naisesta. Rintasyöpää todetaan Suomessa eniten vaihdevuosisia lähestyvillä naisilla. Keski-ikä rintasyövän toteamiselle on 60 vuotta. Rintasyövän riskitekijöitä on monia, mutta suurin riski on ikä. Muita riskitekijöitä ovat muun muassa ylipainoisuus, runsas alkoholin juominen ja muuten epäterveelliset syömistottumukset. 30 % rintasyöpätapauksista on huonojen elintapojen seurausta. 5–10 % todetuista rintasyöivistä johtuu geneettisesti periytyvästä sairastumisriskistä BRCA-geeneissä. (Vehmanen 2020b.) Mutaatiot BRCA 1- ja 2-geeneissä lisäävät rintasyöpään sairastumisriskiä, koska geenit eivät pysty toimimaan normaalisti syövän ehkäisyssä (Winters ja muut 2017).

Rintasyövässä syöpäsolut alkavat kasvaa ja jakaantua hallitsemattomasti ilman apoptoosia, mikä johtaa kasvaimen syntyyn (Klefström 2012). Rintasyöpä löydetään yleensä kyhmynä rinnassa, joka todetaan käsin tunnustelemalla. Kyhmyn lisäksi löydettäviä oireita rintasyövässä ovat ihon tai nännin vetäytyminen sisäänpäin, epätavallinen nännierite, sinnikäs ihottuma sekä punoitus ja turvotus rinnassa. Syövälle olennainen ominaispiirre on metastaasien eli etäpesäkkeiden syntyminen. Rintasyöpä välillä huomataan vasta etäpesäkkeen sijainnin oireista. Suomessa 50–69-vuotiaille naisille tehdään mammografiakuvaukset kahden vuoden välein, missä seulotaan rintasyöpää rintojen röntgentutkimuksessa. Mikäli löytyy rintasyöpään viittaavia merkkejä, rinnasta otetaan biopsia eli paksuneulanäyte, josta voidaan todeta syöpä laboratoriossa. (Vehmanen 2020b.)

Rintasyövän hoitona yleisin ratkaisu on leikkaushoito, jossa koko rinta poistetaan tai päädytään yksilöllisesti parempaan leikkaustyyppiin. Säästävässä leikkauksessa yhdistetään rintasyövän hoitoon sädehoitoa vähentämään syövän uusiutumisen riskiä. Sädehoidon merkitys syövän hoidossa on vähentää paikallisen uusiutumisen riskiä ja parantaa syövän ennustetta. Sädehoidon negatiivisia puolia ovat ihon ärsytysoireet ja hoidetun rinnan muuttuminen aiempaa tiiviimmäksi. Sädehoito saattaa jättää rintaan pistelevän tai kutittavan tuntemuksen pitkäksi aikaa. (Vehmanen 2020a.)

Rintasyövän hoitoon liitetään usein lääkehoito, jolla ehkäistään syövän uusiutumista hävittämällä elimistöön jääneet syöpäsolut. Lääkehoitoa suunnitellaan hoitotavaksi, jos imusolmukkeissa on etäpesäkkeitä, syöpä on suuri kooltaan tai rintasyövän alatyypin on aggressiivinen. Solunsalpaajat ovat yksi rintasyöpään käytettävistä lääkehoidoista. Solunsalpaajien toiminta perustuu syöpäsolujen tuhoamiseen niiden jakautumisvaiheessa. Tämä takia ne ovat tehokkaimpia aggressiivisten syöpien hoidossa, joissa solujen jakautuminen on nopeinta. Solunsalpaajien käytössä haittapuoli on lisääntynyt tulehdusriski, mutta sen lisäksi esiintyy esimerkiksi pahoinvointia, hiustenlähtöä, uupumusta, heikentyneitä hedelmällisyyttä ja painonnousua. Solunsalpaajahoitojen haittavaikutukset rajoittavat niiden käyttöä iäkkäimmillä ihmisillä. Toinen rintasyövässä käytetty lääkehoito on vasta-ainehoito, jota käytetään HER2-positiivisessa rintasyövässä solunsalpaajien lisäksi. Vasta-ainehoito voi aiheuttaa sydänhaittoja, mutta harvoin hoitoihin liittyy muita haittavaikutuksia. Luminaalisiin syöpiin käytetään hormonihoitoa, joka estää estrogeenin tai progesteronin toimintaa. Hormonihoitoa käytetään viidestä vuodesta kymmeneen vuoteen riippuen rintasyövän uusiutumiseriskistä. Hormonihoidon suurimmat haitat ovat vaihdevuosisoireet, ja yleisimpänä käytetty tamoksifeeni-lääke lisää laskimoveritulpan ja kohtusyövän riskiä. (Vehmanen 2020a.)

3.1 Rintasyöpätyypit

Yleisin rintasyöpätyyppi on ER-positiivinen eli ER+, joka todetaan kolmasosalta rintasyöpään sairastuneista henkilöistä (Wang ja muut 2023). ER-positiivista syöpää kutsutaan luminaaliseksi syöväksi, jossa ilmenee estrogeenireseptoreja. Luminaalista syöpää esiintyy myös PR-positiivista (PR+), eli siinä ilmenee progesteronireseptoreita. (Barzaman ja muut 2020; Vehmanen 2020b.) Luminaalisesta syövästä on olemassa A- ja B-muotoa, joista B-muoto on aggressiivisempi, koska siinä solujen jakautuminen on nopeampaa (Vehmanen 2020b). Hoitona ER+-rintasyöpätyyppejä vastaan käytetään antihormonaalista hoitoa, joista yleisin lääke jo vuosikymmenten ajan on ollut tamoksifeeni (Wang ja muut 2023). Tamoksifeenin toimintaperiaate on estää estrogeenin sitoutuminen estrogeenireseptoriin (Barzaman ja muut 2020). Osalla potilaista syntyy kumminkin vastustuskyky tamoksifeeniä vastaan, jonka syntyyn liittyy koodaamattomat RNA:t, kuten circRNA. Resistenssi tamoksifeenille syntyy mm.

Hsa_circ_0025202-nimisellä circRNA:lla, joka tarttuu miR-182-5p-microRNA:han ja säätelee FOXO3-tekijän aktiivisuutta. (Wang ja muut 2023.)

Toinen rintasyöpätyyppi on HER2-positiivinen (HER2+) syöpä, joka perustuu HER2-reseptorin monistumiseen. HER2-reseptori on ihmisen epidermaalisen kasvutekijän reseptori. (Vehmanen 2020b.) HER2+-rintasyövän hoitoon käytetään monoklonaalisia vasta-aineita, kuten trastutsumabia ja pertutsumabia, jotka inhiboivat mikrotubuluksia (Barzaman ja muut 2020). Vasta-aineiden lisäksi HER2+-syövän hoidossa käytetään tyrosiinikinaasi-inhibiittoreita, kuten lapatinibi-lääkettä (Wang ja muut 2023). Aggressiivisissa rintasyövässä, kuten HER2-positiivisessa ja kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä, hoito aloitetaan lääkehoidolla, jota seuraa syöpäkasvaimen leikkaus (Vehmanen 2020a).

Kolmas rintasyövän biologinen alatyppi on kolmoisnegatiivinen rintasyöpä, jossa ei ole ollenkaan estrogeeni- tai progesteronireseptoreita eikä HER2-reseptoreita (Vehmanen 2020b). Kolmoisnegatiivista rintasyöpää kutsutaan TNBC-syöväksi (engl. *Triple Negative Breast Cancer*). TNBC-syöpä on näistä syövästä pahanlaatuisin ja sillä on suurin todennäköisyys rintasyöpätyypeistä tuottaa etäpesäkkeitä. TNBC reagoi huonosti perinteisiin kemoterapiahoitoihin eikä siihen ole hyvin tehoavaa tarkennettua terapiamuotoa. (Wang ja muut 2023.)

3.2 Sirkulaarinen RNA rintasyövässä

Uusissa tutkimuksissa on löydetty useampia circRNA-molekyylejä, jotka ovat osana rintasyövän etenemistä. Tutkimuksissa huomattiin circRNA-molekyylien käyttäytyvän epänormaalisti rintasyövässä verrattuna terveeseen rintakudokseen. (Zeng ja muut 2022) Vuonna 2018 tehdyssä tutkimuksessa geenisirutekniikalla rintasyövästä löydettiin 1155 circRNA-molekyyliä, jotka toimivat epänormaalisti kudoksessa. (Shi ja muut 2018; Wang ja Fang 2018). On huomioitavaa, että tutkimukset ovat uusia ja kaikkea tietoa ei olla vielä löydetty. Rintasyövässä circRNA:t muuttuvat aktiivisiksi ja osallistuvat syövän karsinogeenisyyteen sekä etäpesäkkeiden ja kemoresistenssin syntyyn (Li ja muut 2019a). Osalla circRNA:sta on todettu olevan rintasyövän syntyyn edistäviä ominaisuuksia, mutta osa circRNA molekyyleistä vaimentaa kasvainten kasvua (Wang ja muut 2023).

CircRNA:t osallistuvat rintasyövässä syöpäsolujen jakaantumiseen sekä syövän etenemiseen, kuten kasvaimen etäpesäkkeiden syntymiseen (Wang ja Fang 2018). Osallistuminen perustuu circRNA:n toimimiseen miRNA-sienenä. Esimerkiksi circHMCU-molekyylillä esiintyy rintasyövässä aktiivisempaa, mikä lisää syöpäsolujen jakaantumista, siirtymistä sekä laajenemista terveisiin kudoksiin vaikuttamalla solujen solusykliin. Tämän lisäksi circHMCU pystyy sitoutumaan miRNA let 7 - perheen jäseniin, mikä kiihdyttää let 7 – perheen kohdegeenien esiintymistä. (Zeng ja muut 2022.) Taulukossa 1 on vuosilta 2017–2022 tutkimuksia, joissa on todettu eri rintasyöpätyypeissä esiintyviä circRNA-molekyylejä sekä niiden vaikutuksia syövän etenemiseen ja syntyyn. Taulukossa olevat circRNA:t vaikuttavat syöpään toimimalla miRNA-sienenä, minkä takia taulukossa mainitaan osallistuva miRNA-molekyylillä. (Wang ja muut 2023.)

Taulukko 1: circRNA:n vaikutukset eri rintasyöpätyypeissä vuoden 2017-2022 tutkimuksissa. (Muokattu: Z. Wang ja muut 2023).

circRNA	Muuntunut ilmentyminen	Osallistuva miRNA	Kohdeproteiini	Vaikutus
ER+-rintasyöpä				
circRNA_0025202	heikentynyt	miR-182-5p	FOXO3a	tamoksifeeni herkkyys, lisääntyminen, etäpesäkkeiden synty ja leviäminen
circPGR	kiihtynyt	miR-301a-5p	CDK1/CDK6/ CHEK2	kasvu, solusyklin eteneminen, etäpesäkkeiden synty, leviäminen ja tunkeutuminen terveeseen kudokseen
HER2+-rintasyöpä				
circMMP11	kiihtynyt	miR-153-3p	ANLN	elinkelpoisuus, leviäminen ja tunkeutuminen terveeseen kudokseen
TNBC				
circSEPT9	kiihtynyt	miR-637	LIF	lisääntyminen, vaeltaminen ja tunkeutuminen terveeseen kudokseen
circFBXW7	heikentynyt	miR-197-3p	FBXW7	lisääntyminen, vaeltaminen ja kasvaimen kasvu
hsa_circ_0044234	heikentynyt	miR-135b	GATA3	eteneminen ja etäpesäkkeiden syntyminen
circHIF1A	kiihtynyt	miR-149-5p	AKT/STAT3	kasvu ja etäpesäkkeiden syntyminen
circUBE2D2	kiihtynyt	miR-512-3p	CDCA3	lisääntyminen, vaeltaminen, tunkeutuminen terveeseen kudokseen, doksorubiiniin vastustuskyky

Toinen tapa, miten circRNA osallistuu rintasyövän säätelyyn, on syöpään liittyvän signaloinnin kautta. Kasvavassa määrässä tuloksista on päädytty tulokseen, että circRNA pystyy säädellä rintasyöpää vaikuttamalla kohdegeeneihin tai miRNA:han, joka puolestaan on yhteydessä syöpään liittyviin signaalintireitteihin. (Wang ja Fang 2018.)

Eräs signaalintireitti on PI3K-AKT-FOXO, jossa kasvutekijät aktivoivat PI3K:n, joka saa puolestaan AKT:n aktivoitumaan, joka inaktivoi FOXO3:n fosforyloinnilla. Aktivoitunut signaalintireitti saa FOXO3:n siirtymään tumasta solulimaan eli pois kohde geenien luota. (Smit ja muut 2015; Yang ja muut 2016.) FOXO3 on syövän syntyä estävä geeni, jonka aktivoituminen johtaa solukuolemaan, solusyklin pysähtymiseen sekä useissa kudoksissa stressin vastustuskykyyn. PI3K-AKT-FOXO signaalintireitin aktivoitumisella ja FOXO3:n inhiboinnilla on rintasyöpää edistävä vaikutus. Rintasyövässä circ-FOXO3 tarttuu kiinni miRNA:han, johon FOXO3 mRNA muuten sitoutuisi. circ-FOXO3:n ansiosta FOXO3:n mRNA pysyy vapaana ja FOXO3-proteiinin translaatio voi tapahtua normaalisti. Tämä aiheuttaa syöpäsoluissa solukuoleman ja estää rintasyövän etenemistä. (Wang ja Fang 2018; Yang ja muut 2016.)

4 Sirkulaarisen RNA:n kliininen merkitys

4.1 Diagnostiikka

Tutkimuksissa on todettu circRNA:n nouseva merkitys rintasyövän diagnosoimisessa, mikä perustuu molekyylin kykyyn toimia biomarkkerina. circRNA:t osallistuvat rintasyövän aikaiseen diagnoosiin, jonka tunnistustapana toimii ei-invasiivinen nestemäinen biopsia. CircRNA-molekyyleillä on pitkä puoliintumiskä (yli 48h) ja leviävät elimistössä verenkierron mukana, mikä tekee molekyylistä ideaalisen rintasyövän biomarkkerin nestemäisissä näytteissä. (Wang ja muut 2023.) CircRNA molekyylejä voidaan havaita veren lisäksi plasmasta, seerumista sekä eksosomeista (Zeng ja muut 2022). Eksosomit ovat halkaisijaltaan 30–100 nm kokoisia vesikkeleitä, jotka sisältävät molekyylejä kuten proteiineja ja RNA:ta eli sisältäen myös circRNA:ta. circRNA:ta sisältävät eksosomit ovat loistava biomarkkeri syövässä, koska ne lisäävät diagnostiikan tarkkuutta ja herkkyyttä. (Wang ja muut 2023.)

Biopsioista voidaan selvittää tiettyjen circRNA-molekyylien ilmeneminen ja verrata sitä terveen kudoksen pitoisuuteen. Rintasyövän alatyypeille on ominaiset circRNA:t, joiden ilmeneminen on normaalista poikkeavaa, minkä takia biopsialla voidaan selvittää rintasyöpätyyppi. Rintasyövässä circRNA:n ilmeneminen on kiihtynyttä tai normaalista ilmenemisestä heikentynettä riippuen kyseisestä circRNA:sta. (Wang ja muut 2023.) CircRNA:n käyttämiseksi aikaisessa syövän diagnosoimisessa tarvitaan jatkuvia tutkimuksia uusien circRNA molekyylien löytämiseksi sekä niiden ilmenemisen selvittämiseksi normaalissa kudoksessa ja syöpäkudoksessa.

CircRNA:ta voidaan hyödyntää myös määrittämään syövän etenemistä. Syövän ennuste on tärkeää potilaalle, jotta tiedetään syövän käyttäytyminen tulevaisuudessa, ja potilaalle pystytään antaa parasta hoitoa sekä tarjota syövän tehokasta seuranta. Osa circRNA-molekyyleistä toimivat syövän etenemisessä epäsuotuisina biomarkkereina, joita ei toivota potilaan näytteessä olevan. Esimerkki epäsuotuisasta biomarkkerista on circZNF609, jonka korkea pitoisuus on yhteydessä syövän leviämiseen imusolmukkeisiin ja heikompaan syövästä selviytymisprosenttiin. Erityisesti kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä on tärkeää käyttää circRNA:ta biomarkkereina syövän etenemisen diagnosoimiseen. TNBC on aggressiivisin rintasyöpätyyppi, mutta tieto syövän

kehittämisestä antaa mahdollisuuden ennakoida syövän hoidossa ja aloittaa oikea hoitotapa mahdollisimman ajoissa. (Wang ja muut 2023.)

Kaikki circRNA:t eivät toimi epäsuotuisina rintasyövän biomarkkereina vaan osalla on positiivinen merkitys. Rintasyöpää sairastavilta potilailta on löytynyt tutkimuksessa circ_LARP4-biomarkkeri, joka on yhteydessä kasvaimen pienenemiseen ja parempaan syövän ennusteeseen. Toinen suotuisa circRNA-biomarkkeri on hsa_circ0001073, joka osoittaa syöpää sairastavalla olevan pienempi todennäköisyys sairastua rintasyöpään uudestaan (Wang ja muut 2023).

4.2 Lääkeresistenssi

Toimivien ja rintasyöpään tehoavien lääkehoitojen kehittämisessä on ongelmana vastustuskyvyn syntyminen syöpälääkkeille eli kemoresistenssi (Wang ja muut 2023). Kemoresistenssi on suuri ongelma syövän hoidossa, minkä takia circRNA:n toiminnan ymmärtäminen rintasyövässä on tärkeää. Tiedon avulla voitaisiin antaa parempaa hoitoa, kun osataan ennustaa syöpälääkkeen resistenssin mahdollinen syntyminen. Kemoresistenssin syntymisen ehkäisemisellä tämänhetkiset rintasyövän solunsalpaaja- ja hormonihoitot tehoaisivat paremmin. (Sarkar ja Diermeier 2021.)

Kemoterapiaan voi syntyä vastustuskyky usealla eri tavalla, mutta tutkimuksissa on huomattu circRNA:n osallistuvan resistenssin syntyyn. Kemoterapiaa vastaan vastustuskykyisessä syöpäkasvaimessa esiintyy circRNA-molekyylejä, joita ei muuten rinnassa esiintyisi, millä uskotaan olevan merkitystä resistenssin syntyyn. Tutkimus on vielä uutta ja pintapuolista, minkä takia ei pystytä vielä määrittämään circRNA:n osuutta lääkeresistenssin syntyyn. Tutkimuksissa on kumminkin huomattu circRNA-molekyylien normaalista poikkeavaa ilmentymistä lääkehoidolle vastustuskykyisissä kasvaimissa. (Wang ja muut 2023.).

Doksorubisiini-lääkkeelle syntyvään resistenssiin osallistuu circKDM4C eli se voi toimia biomarkkerina lääkkeen resistenssin synnylle. Väitettä tukee circKDM4C ilmentymisen heikentyminen ja toimiminen miRNA-sienenä miR-548p-molekyylille, mikä estää kasvaimen kasvamista ja vähentää doksorubisiini-lääkkeen vastustuskykyä. (Sarkar ja Diermeier 2021.) Resistenssin syntyyn Paklitakseli-läkettä vastaan osallistuvat muun

muassa circ-RNF111, circ-ABCB10 ja hsa_circ_0006528, joiden ilmentyminen on kiihtynyttä vastustuskykyisessä kudoksessa verrattuna kudokseen, johon lääke tehoaa. hsa_circ_0006528 on myös kiihtyneesti ilmentynyt rintasyövässä, joka on doksorubisiinille vastustuskykyinen. HER2+-rintasyöpään tärkein lääkehoito on antihormonaalinen hoito, jonka haasteena on myös lääkeresistenssi. Yleisin antihormonaalinen lääke on trastutsumab, jota kohtaan voi syöpä voi tulla vastustuskykyiseksi. Tutkimuksissa on huomattu, että Hsa_circ_0001598 ja circ-BGN ilmentyminen on kiihtynyttä trastutsumab-resistensseissä kudoksissa (Wang ja muut 2023.)

4.3 Biologinen täsmälääke

Osa circRNA-molekyyleistä toimivat rintasyövässä liiallisesti ilmentyneenä ja karsinogeenisinä eli syöpää aiheuttavina. Biologisessa täsmälääkehoidossa keskitytään näiden circRNA-molekyylien inhiboimiseen. (Tran ja muut 2020.) circRNA:han kohdistuvassa hoidossa pyritään laskemaan karsinogeenisten circRNA-molekyylien ilmentyminen normaalille tasolle. Yleisin tapa on toimittaa lyhyttä, rakenteeltaan hiuspinniä muistuttavaa RNA:ta (*engl. short hairpin RNA, shRNA*) tai pientä häiritsevää RNA:ta (*engl. small interfering RNA, siRNA*) syöpäkasvaimen luo. Nämä RNA-molekyylit kohdistavat toimintansa circRNA:n rengasrakenteen kiinnittymiskohtaan, mikä inhiboi ilmenemistä. Rintasyövässä esimerkiksi circDnmt1-molekyylit ovat liiallisesti ilmentyneenä, mikä edistää p53 ja AUF1 proteiinien siirtymistä solun tumaan. Muutos aiheuttaa solussa autofagosytoosia, eli solun omien osien hajottamista lysosomissa, sekä edistää kasvaimen kasvua. (Li ja muut 2021; Rogers 2024.) Hiirellä tehdyssä tutkimuksessa siRNA liitettiin polyetyleeniglykolilla vakautettuihin kultananopartikkeleihin (PEG-AuNPs), joiden kohteena oli circDnmt1 (Li ja muut 2021; Wang ja muut 2020). siRNA esti circRNA:n normaalia toimintaa ja proteiinien siirtymistä tumaan, minkä takia solujen autofagosytoosia ei tapahtunut nostaa hiiren elinikää (Li ja muut 2021).

Toinen hoitotapa täsmälääkehoidossa on lisätä syövän kasvua ehkäisevät circRNA:t, joiden ilmeneminen on heikentynyt rintasyövässä (Li ja muut 2021). Kasvainten kasvua estävien circRNA-molekyylien etuna ovat circRNA-molekyylien pidemmät

puoliintumisajat verrattuna muihin RNA-hoitoihin. Pidemmän puoliintumisajan ansiosta annosteltu lääkemäärä voi olla pienempi ja harvemmin annosteltuna, koska circRNA:t eivät hajoa yhtä nopeasti. (Tran ja muut 2020.) Täsmälääkehoidoissa halutaan kiihdyttää syövän ehkäisevien circRNA-molekyylien ilmentymistä, mitä varten tuotetaan circRNA:n ilmenemistä avustavia rakenteita. Aiemmin tutkielmassa mainittu circFOXO3 on syövän kasvua ehkäisevä circRNA, jonka ilmeneminen on rintasyövässä heikentynyt. Hiirellä tehdyssä tutkimuksessa circFoxo3-molekyylin aktiivisuutta lisättiin liittämällä circRNA:ta ilmentävä plasmidi PEG-AuNP-partikkeliin, mikä lisäsi syöpäsolujen apoptoosia sekä esti kasvaimen kasvua. (Li ja muut 2021.)

5 Tulevaisuuden tutkimukset

Useat tutkimukset on tehty käyttäen julkisia RNA-sekvensointikirjastoja, kuten *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Sekvenssikirjasto on tehty poly-A-hännällä rikastettuna eli sekvensoinnissa tunnistetaan RNA:t, joissa on poly-A-häntä. Tämän seurauksena useat circRNA:t ovat saattaneet jäädä sekvensoimatta. Tulevaisuuden tutkimuksia varten pitää tehdä uudet sekvenssikirjastot, jotka sisältävät circRNA:t tunnistettuna. (Sarkar ja Diermeier 2021.)

circRNA-molekyyleillä on monta eri kohdekudosta sekä ne osallistuvat usean sairauden syntyyn. Esimerkiksi aiemmin tutkielmassa mainittu circFoxo3 on osallisena sydänlihaksen vanhenemiseen, eturauhassyövän kemoresistenssin synnyssä ja useissa muissa syövässä. circRNA:n ilmenemisen muuttamisessa on riski, että se vaikuttaa muihin elimistön kudoksiin. circRNA:han kohdistuvassa lääkehoidossa on tärkeää tietää circRNA:n potentiaaliset vaikutukset koko elimistöön ennen kuin lääkettä voidaan käyttää syövän hoidossa. circRNA:han pohjautuvissa hoidoissa pitää parantaa lääkkeiden spesifisyyttä ja vähentää muihin kudoksiin olevaa vaikutusta ennen kuin lääke on toimiva. Tutkimuksien avulla löydetään myös rintasyöväälle spesifisemmät biomarkerit. (Li ja muut 2021.)

circRNA:n toimintaan pohjautuvassa lääkehoidossa on kehitteillä synteettisiä circRNA-molekyylejä. Synteettiseen circRNA:han voidaan lisätä miRNA:ta sitovia alueita, milloin circRNA:n toimiminen miRNA-sienenä tehostuu. Synteettistä circRNA-molekyyliä voidaan myös muokata siten, että siitä puuttuu lopetuskodoni. Tämä mahdollistaa, että circRNA:sta tuotetaan jatkuvasti proteiinia translaatiolla. (Li ja muut 2021.) Haasteena tulevaisuuden tutkimuksissa on, että synteettisistä circRNA-molekyyleistä ei tiedetä vielä, minkälainen vaikutus niillä on immuunijärjestelmään. circRNA:t muistuttavat muodoltaan virusanalogeja, minkä takia niitä luultiin alkuun viruksiksi ja se saattaa vaikuttaa elimistössä syntyvään immuunireaktioon. (Sanger ja muut 1976; Tran ja muut 2020) RNA-terapian riskinä on, että elimistössä syntyy tulehdusreaktio-oireyhtymä (engl. *systemic inflammatory response syndrome*, SIRS), jossa elimistöön tulee liiallinen tulehdusvaste. Tulehdusreaktio-oireyhtymässä kiihtynyt kemokiinien, sytokiinien sekä leukosyyttien tuotanto aiheuttaa elinten lamaantumista. (Chakraborty ja Burns 2024; Tran ja muut 2020.)

6 Yhteenveto

circRNA:n tutkimuksien tavoitteena on löytää rintasyövässä normaalista käyttäytymisestä poikkeavat circRNA:t. Tavoitteena on myös ymmärtää circRNA-molekyylien vaikutus syövän syntyyn ja etenemiseen sekä miten molekyyli vaikuttaa muualla elimistössä. Identifioimalla rintasyöpätyypille ominaiset circRNA-molekyylit ja niiden normaalista poikkeava toiminta, nopeutetaan oikean hoidon antamista ja estetään syövän etenemistä. circRNA:n etuna rintasyövän diagnosoimisessa on sen levittyminen koko elimistöön veren mukana, mikä mahdollistaa potilasystävällisemmän näytteenoton nestemäisellä ei-invasiivisellä biopsialla.

Tutkimuksissa on edistytty lupaavasti, kuten synteettisen circRNA:n kehittämisessä, mutta paljon on vielä selvittämättä. circRNA-molekyyliä on vielä monia, joita ei ole vielä tunnistettu ja monia, joiden toimintaa ei vielä täysin tunneta. circRNA on lupaava rintasyövän hoitomenetelmä, joka tarjoisi paremman vaihtoehdon perinteisille rintasyövän lääkehoidoille, jotka aiheuttavat useita negatiivisia sivuvaikutuksia. Tulevaisuuden tutkimuksissa voitaisiin keskittyä löytämään circRNA-molekyylit, jotka osallistuvat kemoresistenssin syntyyn. Kemoresistenssiin aiheuttavien circRNA-molekyylien paremmalla tuntemisella tutkimuksissa voitaisiin keskittyä estämään vastustuskyvyn syntymistä. Tämä parantaisi kemoterapian tehoamista syöpään, millä olisi positiivinen vaikutus rintasyövän paranemisprosenttiin.

Lähteet

- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., ... Farahmand, L. (2020) Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol* **84**:106535.
- Bose, R. & Ain, R. (2018) Regulation of Transcription by Circular RNAs. Teoksessa J. Xiao (Toim.), *Circular RNAs: Biogenesis and Functions* (ss. 81–94). Singapore: Springer.
- Chakraborty, R. K. & Burns, B. (2024) Systemic Inflammatory Response Syndrome. Teoksessa *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Noudettu osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547669/>
- Chen, L.-L. & Yang, L. (2015) Regulation of circRNA biogenesis. *RNA Biol* **12**:381–388.
- Dang, D. T. (2022) Molecular Approaches to Protein Dimerization: Opportunities for Supramolecular Chemistry. *Front Chem* **10**:829312.
- Harbeck, N. & Gnant, M. (2017) Breast cancer. *The Lancet* **389**:1134–1150.
- Hsu, M.-T. & Coca-Prados, M. (1979) Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. *Nature* **280**:339–340.
- Klefström, J. Miksi syöpä leviää, voiko sitä estää? *128(18)* **2012**:1830–1832.
- Li, F., Yang, Q., He, A. T. & Yang, B. B. (2021) Circular RNAs in cancer: Limitations in functional studies and diagnostic potential. *Semin Cancer Biol* **75**:49–61.
- Li, Zehuan, Chen, Z., Hu, G. & Jiang, Y. (2019) Roles of circular RNA in breast cancer: Present and future. *Am J Transl Res* **11**:3945–3954.
- Li, Zhe, Ruan, Y., Zhang, H., Shen, Y., Li, T. & Xiao, B. (2019) Tumor-suppressive circular RNAs: Mechanisms underlying their suppression of tumor occurrence and use as therapeutic targets. *Cancer Sci* **110**:3630–3638.
- Misir, S., Hepokur, C., Aliyazicioglu, Y. & Enguita, F. J. (2020) Circular RNAs serve as miRNA sponges in breast cancer. *Breast Cancer* **27**:1048–1057.
- Rogers, K. (2024, tammikuuta 16) Autophagy. <https://www.britannica.com/science/autophagocytosis> (Luettu 5.2.2024)
- Sanger, H. L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H. J. & Kleinschmidt, A. K. (1976) Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci* **73**:3852–3856.
- Sarkar, D. & Diermeier, S. D. (2021) Circular RNAs: Potential Applications as Therapeutic Targets and Biomarkers in Breast Cancer. *Non-Coding RNA* **7**:2.
- Shi, P., Sun, J., He, B., Song, H., Li, Z., Kong, W., ... Xue, H. (2018) Profiles of differentially expressed circRNAs in esophageal and breast cancer. *Cancer Manag Res* **10**:2207–2221.

- Smit, L., Berns, K., Spence, K., Ryder, W. D., Zeps, N., Madiredjo, M., ... Clarke, R. B. (2015) An integrated genomic approach identifies that the PI3K/AKT/FOXO pathway is involved in breast cancer tumor initiation. *Oncotarget* **7**:2596–2610.
- Tran, A. M., Chalbatani, G. M., Berland, L., Cruz De los Santos, M., Raj, P., Jalali, S. A., ... Calin, G. A. (2020) A New World of Biomarkers and Therapeutics for Female Reproductive System and Breast Cancers: Circular RNAs. *Front Cell Dev Biol* **8**. Noudettu osoitteesta <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.00050>
- Vehmanen, L. (2020a, syyskuuta 16) Rintasyövän hoito. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00468> (Luettu 9.1.2024)
- Vehmanen, L. (2020b, syyskuuta 16) Rintasyövän toteaminen, alatyypit ja ennuste [Terveyskirjasto]. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00618> (Luettu 20.12.2023)
- Wang, X. & Fang, L. (2018) Advances in circular RNAs and their roles in breast Cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **37**:206.
- Wang, Y., Quinsaati, J. E. Q., Ono, T., Maeki, M., Tokeshi, M., Isono, T., ... Yamamoto, T. (2020) Enhanced dispersion stability of gold nanoparticles by the physisorption of cyclic poly(ethylene glycol). *Nat Commun* **11**:6089.
- Wang, Z., Deng, H., Jin, Y., Luo, M., Huang, J., Wang, J., ... Zhou, J. (2023) Circular RNAs: Biology and clinical significance of breast cancer. *RNA Biol* **20**:859–874.
- Winters, S., Martin, C., Murphy, D. & Shokar, N. K. (2017) Chapter One—Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. Teoksessa R. Lakshmanaswamy (Toim.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vsk. 151, ss. 1–32). Academic Press.
- Yang, W., Du, W. W., Li, X., Yee, A. J. & Yang, B. B. (2016) Foxo3 activity promoted by non-coding effects of circular RNA and Foxo3 pseudogene in the inhibition of tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* **35**:3919–3931.
- Zeng, Y., Zou, Y., Gao, G., Zheng, S., Wu, S., Xie, X. & Tang, H. (2022) The biogenesis, function and clinical significance of circular RNAs in breast cancer. *Cancer Biol Med* **19**:14–29.