

Circular RNA: features, functions and their correlation with diseases especially cancer

Mohammad Reza Noori-Dalooi¹, Sima Emadi Allahyari²

¹Professor, PhD of Medical Molecular Genetics, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²MSC student of Human Genetics, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

In early 2012, the world of science saw a fascinating discovery called circular RNA as a transcription product of thousands of genes in mice and humans. These circular RNAs have recently been grouped as the encoding RNA in an independent group that their remarkable difference with other RNAs is that these RNAs are not linear, in which two ends connect with a covalent connection creating a loop-shaped structure. These molecules play a role in regulating the expression of genes in mammals, and also, unlike other RNAs, they are very stable. These RNAs are created quite differently by means of a mechanism called back splicing. In this mechanism, in a molecule of RNA, axons or lariat-shaped introns are bonded at two ends of '3 and '5 with a covalent bond, creating circular structures that, unlike other common RNAs in the cytoplasm, are very stable. The circular RNAs act as mRNA sponge and form a set of RNA and protein that engage in transcription regulation by binding to RNA-related proteins. This suggests that these RNAs regulate gene expression at the transcriptional level and then they react by miRNAs. In fact, those circular RNAs that play a role in regulating the function of miRNAs also play a role in the onset and progression of the cancer. In tumor tissues, circular RNAs are reduced in comparison with normal tissues, and this may be for reasons like error occurs in the back splicing mechanism, degradation by unregulated miRNAs or increased cell proliferation. Recently circular RNAs have been identified in exosomic studies and in the movement of chromosomes in cancers, and there is found that the incorrect and abnormal attachment of these types of RNAs is related to drug resistance. Although it is thought that circular RNAs are non-coding, some of them are translated into functional proteins. So far, there are many unknowns about circular RNAs and the mechanism for regulating the expression of genes by them, but there is a lot of evidence to convince us that they will soon be used as biomarkers to diagnose diseases and therapeutic targets for cancers.

Keywords: *ncRNA, circRNA, Cancer, Diagnosis, Prognosis.*

Cited as: Noori-Dalooi MR, Emadi Allahyari S. Circular RNA: features, functions and their correlation with diseases especially cancer. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2019; 29(3): 191-202.

Correspondence to: Mohammad Reza Noori-Dalooi

Tel: +9821 88953005

E-mail: nooridalooi@sina.tums.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-9044-9842

Received: 16 Apr 2019; **Accepted:** 5 May 2019

RNAهای حلقوی: ویژگی‌ها، کارکردها و ارتباط آنها با بیماری‌ها به ویژه سرطان

محمد رضا نوری دلویی^۱، سیما عمادی اله یاری^۲

^۱استاد، دکتری ژنتیک مولکولی پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
^۲دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

در اوایل سال ۲۰۱۲ دنیای علم شاهد یک کشف جذاب به نام RNAهای حلقوی (circular RNA) به عنوان یک محصول رونویسی شده از هزاران ژن در موش و انسان بود. این RNAهای حلقوی اخیراً به عنوان گروهی از RNAهای کد کننده در گروه مستقلی قرار گرفته‌اند که تفاوت چشمگیر آنها با دیگر RNAهای خطی نبودن آنهاست که در آن، دو انتهای با اتصال کوالانسی به هم متصل شده و ساختاری حلقه ای شکل را ایجاد می‌کنند. این مولکول‌ها در تنظیم بیان ژن‌ها در پستانداران ایفای نقش می‌کنند و هم چنین بر خلاف سایر RNAها بسیار پایدارند. این دسته از RNAها به صورت کاملاً متفاوتی به وسیله سازوکاری به نام پیرایش برگشتی (Back splicing) ایجاد می‌شوند. در این سازوکار در یک مولکول RNA اگزون-ها و یا اینترون‌های کمندی شکل در دو انتهای ۳' و ۵' با پیوند کوالانسی به هم متصل می‌شوند و ساختارهای حلقوی ایجاد می‌کنند که برخلاف دیگر RNAهای معمول در سیتوپلاسم بسیار پایدارند. RNAهای حلقوی به عنوان mRNA sponge عمل کرده و با اتصال به پروتئین‌های مرتبط با RNA مجموعه ای متشکل از RNA و پروتئین را شکل می‌دهند که در تنظیم رونویسی شرکت می‌کنند. این موضوع پیشنهاد کننده این مطلب است که این دسته از RNAها تنظیم بیان ژن را در سطح رونویسی و پس از آن به وسیله واکنش با miRNAها انجام می‌دهند. در واقع آن دسته از RNAهای حلقوی که در تنظیم کارکرد miRNA نقش دارند در آغاز و پیشرفت سرطان نیز واجد کارکرد هستند. در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های طبیعی، RNAهای حلقوی دچار کاهش بیان می‌شود و این امر ممکن است به دلایل رخداد خطا در سازوکار پیرایش برگشتی، تخریب آنها به وسیله miRNAهای تنظیم نشده و یا افزایش تکثیر سلولی باشد. RNAهای حلقوی اخیراً در مطالعات اگزوزوم و در جابجایی کروموزوم‌ها در سرطان‌ها نیز شناسایی شده‌اند و مشخص شده است که الحاق نادرست و ناهنجار این دسته از RNAها با مقاومت دارویی ارتباط دارد. با وجود اینکه تصور بر این است که RNAهای حلقوی غیر کد کننده‌اند، اما شماری از آنها به پروتئین‌های کارکردی ترجمه می‌شوند. تاکنون ناشناخته‌های فراوانی در زمینه RNAهای حلقوی و سازوکار تنظیم بیان ژن‌ها توسط آنها وجود دارد، اما شواهد فزاینده‌ای ما را متقاعد می‌کند که به زودی از آنها به عنوان بیومارکرهایی جهت تشخیص بیماری‌ها و اهداف درمانی در سرطان‌ها استفاده خواهد شد.

واژگان کلیدی: circRNA، ncRNA، سرطان، تشخیص، پیش آگهی.

مقدمه

RNAهای غیر کد کننده به طور عمده شامل RNAهای کوچک (micro RNA)، RNAهای غیر کدکننده بلند (Long non-coding RNA) و RNAهای حلقوی هستند (۱).

RNAهای حلقوی حاصل پیرایش برگشتی اگزون‌ها، اینترون‌ها یا هر دوی آنها هستند (۲). چنان چه که در شکل ۱ نشان داده شده است، پیرایش برگشتی فرایندی است که در آن RNAهای حلقوی به وسیله پیرایش متناوب pre-mRNAها شکل می‌گیرند و در آن دهنده پیرایش بالادست به پذیرنده پیرایش پایین دست ملحق می‌شود (۳). هنگامی که RNA به صورت حلقوی در می‌آید از

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده ی پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی،

محمد رضا نوری دلویی (email: nooridalooi@sina.tums.ac.ir)

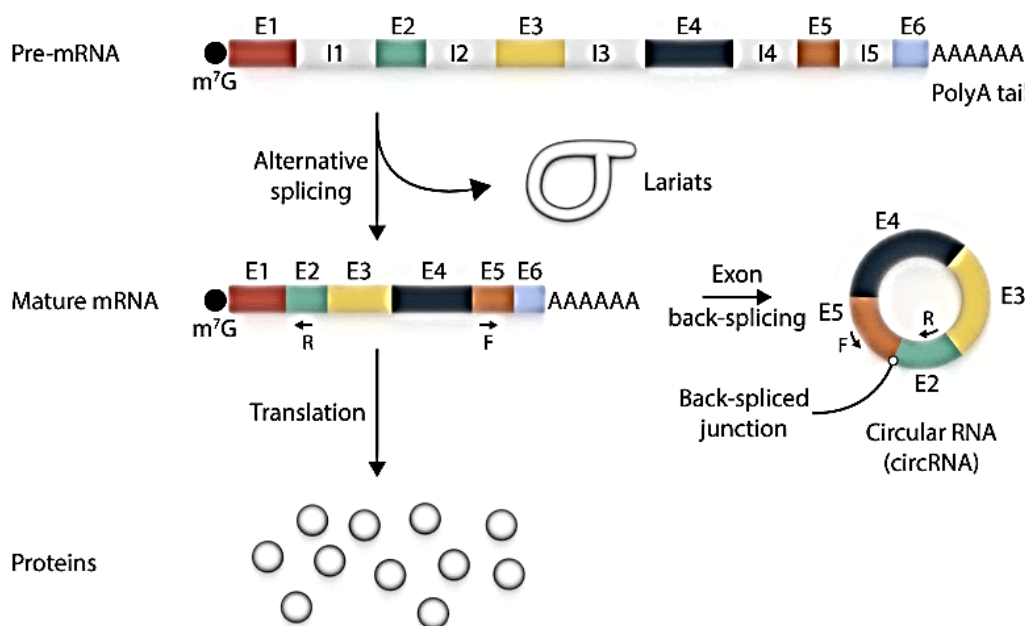
ORCID ID: 0000-0002-9044-9842

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۱/۲۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۸/۳/۹

می‌توانند موجب سرکوب فعالیت miRNA از طریق sequestration شوند؛ بنابراین افزایش یا کاهش بیان ژن هدف miRNA را به دنبال خواهد داشت (۱۱). RNAهای حلقوی و RNAهای پیک با جایگاه هدف miRNA برای اتصال به miRNA رقابت می‌کنند و یک تعامل پیچیده و شبکه تنظیمی را شکل می‌دهند که به طور رایج به عنوان شبکه RNAهای داخلی رقابت کننده شناخته می‌شوند. تشخیص اهداف miRNA به مقدار زیادی به توالی مکمل بین ناحیه‌ای موسوم به seed موجود در miRNA (نوکلئوتیدهای ۲ تا ۷ در توالی miRNA های بالغ) و جایگاه هدف بر روی شبکه RNAهای داخلی رقابت کننده وابسته است. جهش‌ها در miRNA (به ویژه ناحیه seed) و جایگاه‌های هدفشان ممکن است تعامل miRNA-ceRNA و ceRNA را تغییر دهند. اختلال در تنظیم بین شبکه‌های RNAهای داخلی رقابت کننده نقش مهمی را در بیماری‌زایی سرطان داشته و پیشنهاد شده که شبکه RNAهای داخلی رقابت کننده ممکن است در تومورهای بدخیم وابسته به miRNA درگیر باشند (۱۲). برای نمونه برخی از RNAهای حلقوی در سلول شواهدی پیشنهاد می‌کنند که این RNAها ممکن است رونویسی شده و مسیرها را به وسیله دست‌کاری miRNAها تنظیم کنند (۱۳). با این حال برخی مطالعات نشان داده‌اند که کارکرد کلی یک RNA حلقوی لزوماً به عنوان miRNA sponge نیست و تنها تعداد کمی از RNAهای حلقوی واجد این نقش هستند (۱۴).

تخریب توسط اگزونوکلازها مصنوعی مانده و موجب ثبات و فراوانی آنها در سیتوپلاسم می‌شود (۲، ۴، ۵). در حدود ۳۰ سال گذشته اولین مورد از RNAهای حلقوی مورد توجه قرار گرفت. در سال ۲۰۱۲ این موضوع توسط Salzman و همکاران مورد بررسی بیشتر قرار گرفت و RNAهای حلقوی در رده سلول‌های سرطانی و غیر سرطانی و هم چنین در مبتلایان به لوکمی لنفوبلاستیک حاد مشخص شد (۶). در واقع اولین مورد از RNAهای حلقوی پیرایش شده به دنبال آنالیز ژن حذف شده در سرطان کولورکتال (Deleted in Colorectal Cancer or DCC) انسانی و در یک آزمایش بر پایه RT-PCR و توالی یابی کشف شد (۷). مطالعه دیگری بر روی RNAهای حلقوی به دست آمده از ژن SRY (Sex-determining Region Y) موش بود (۸). این یکی از اصلی‌ترین RNAهای حلقوی شناخته شده است که به وسیله ناحیه تعیین جنسیت بر روی کروموزوم Y کد شده و در تعیین جنسیت مذکر در پستانداران نقش دارد. SRY به عنوان یک RNA حلقوی در سیتوپلاسم جایگزین می‌شود و به صورت miR-138 sponge عمل می‌کند و در شرایط آزمایشگاهی واجد ۱۶ جایگاه احتمالی برای miRNA است (۸). بر اساس یک فرضیه، کارکرد RNAها به عنوان miRNA sponge از طریق شبکه RNAهای داخلی رقابت کننده یا به اختصار ceRNA (competing endogenous RNA) است (۱۰). این فرضیه پیشنهاد می‌کند که RNAهای اختصاصی



شکل ۱. نمایش شماتیک از فرایند پیرایش برگشتی که منجر به ایجاد RNAهای حلقوی می‌شود.

ساختارهای انتهایی معمول (کلاهیگ ۵' و دم پلی A) بوده و انتهای آنها به صورت کووالانسی بسته است (۲۸, ۲۹). اسپلیسوزوم‌های کانونی با استفاده از یک مهارکننده پیرایش، سطوح RNAهای حلقوی و هم‌چنین سطوح رونوشت خطی پیرایش شده را کاهش می‌دهند. به بیان دیگر اسپلیسوزوم‌ها واجد نقش مهمی در بیوژنز این دسته از RNAها هستند (۳۰). لازم به تاکید است که بیان RNAهای حلقوی همیشه با سطوح بیان رونوشت خطی مشتق از آنها مرتبط نیست. این امر نشان می‌دهد که بیان RNAهای حلقوی بسیار تنظیم شده بوده و اسپلیسوزوم‌ها قادرند میان پیرایش به شکل رو به جلو و پیرایش برگشتی تمایز قائل شوند (۳۱).

RNAهای حلقوی ممکن است از اگزون‌ها و یا اینترون‌ها ایجاد شوند که در این صورت به تولید سه نوع متفاوت از آنها می‌انجامد که عبارتند از: RNAهای حلقوی اگزونی، RNAهای حلقوی اینترونی و RNAهای حلقوی اگزونی-اینترونی (۲).

شناسایی و ردیابی RNAهای حلقوی

از زمان کشف اولین RNAهای حلقوی تاکنون ابزارهای بیوشیمیایی متفاوتی در جهت آزمون حلقوی بودن، اعتبار سنجی و شناسایی بیان نابجای RNAهای حلقوی ایجاد شده است. هم‌چنین رویکردهای بیوانفورماتیکی و آماری برای کمی‌سازی بیان و شناسایی این نوع جدید از RNAها گسترش پیدا کرده‌اند (۳۲).

آزمون‌های بیوشیمیایی ابزار مهمی جهت اعتبارسنجی و شناسایی RNAهای حلقوی هستند. در این میان RT-PCR برای اعتبارسنجی ابزار بسیار قدرتمندی است. در این رویکرد، یک RNA حلقوی توسط یک ترانس کریپتاز معکوس به یک cDNA تبدیل می‌شود و از آن جا که منشا cDNA یک RNA حلقوی است، توالی شامل توالی اتصالی اگزون-اگزون است که در mRNA پیرایش شده کانونی وجود ندارد و پرایمرها می‌توانند برای تکثیر اختصاصی و شناسایی این اتصالات تشخیصی طراحی شوند. پرایمرها در این جا به عنوان outward-facing شناخته می‌شوند، زیرا هنگامی که ژنوم aligned می‌شود، انتهای 3' به دور از همدیگر قرار می‌گیرند. برخلاف PCR استاندارد این موضوع از تکثیر گونه‌هایی که حاوی اتصالات تشخیصی نیستند (مانند mRNA یا DNA ی ژنومی) جلوگیری می‌کند. qRT-PCR می‌تواند برای ارزیابی سریع فراوانی نسبی RNA حلقوی در سراسر یک پنل نمونه مورد استفاده قرار گیرد (۳۳).

در چند سال گذشته فنون توالی‌یابی RNA (RNA-sequencing) در پستانداران به شناسایی هزاران RNA حلقوی منفرد درون زاد منجر شد که در شرایط موجود در بدن جانداران در مقایسه با هم‌تای خطی‌شان فراوان و با ثبات هستند (۱۵). از ژن‌های تولیدکننده RNA حلقوی می‌توان به ژن ETS1 (۱۶)، ژن‌های سیتوکروم P450 در رت و انسان (۱۷)، ژن تولیدکننده پروتئین متصل‌شونده به آندروژن یا shbg (۱۷)، ژن دیستروفین انسانی (۱۸)، ژن NCXI در میمون‌ها (۱۹) و ژن mbl در دروزوفیل (۲۰) اشاره کرد. هم‌چنین یک RNA غیرکدکننده انسانی به نام ANRIL نیز یافت شده است که تعداد کمی از رونوشت‌های آن توانایی حلقوی شدن را دارند (۲۱) و مشخص شده رونوشت آنتی‌سنس برای جایگاه CDR1 موجب تولید ایزوفرم حلقوی فراوانی می‌شود (۲۲). از انواع دیگر می‌توان به HIPK3 (۲۳)، circ ITCH و RNAهای حلقوی اگزوزومال اشاره کرد (۴, ۵, ۲۴).

ویژگی RNAهای حلقوی

۱) تعداد آنها بسیار زیاد است و در هزاران ژن بیان می‌شوند و در برخی موارد بیان بالاتری را نسبت به ایزوفرم خطی شناخته شده خود دارند (۲).
 ۲) بیان ویژه تیپ سلولی را نشان می‌دهند (۲۵).
 ۳) بین موش و انسان محافظت شده‌اند (۲).
 ۴) در سیتوپلاسم مستقرند (۶).
 ۵) بسیار با ثبات و پایدارند و نیمه عمری معادل با ۴۸ ساعت دارند (۲).
 ۶) به نظر نمی‌رسد که RNAهای حلقوی طبیعی ترجمه شوند، اگرچه پژوهش‌ها ثابت کرده است که این RNAهای حلقوی تولید شده که توسط جایگاه ورودی ریبوزوم طراحی می‌شوند، هم در vivo و هم در vitro قابلیت ترجمه را دارند (۲۶).
 ۷) معمولاً از اگزون‌ها و اینترون‌های بلندتر از حد متوسط شکل می‌گیرند (۲).
 ۸) در خلال تکامل زیستی بیان پویایی دارند (۲۷).
 شایان ذکر است که ویژگی‌های بالا، شامل کلیات RNAهای است و همه آنها در همه انواع RNAهای حلقوی یافت نمی‌شوند.

تولید RNAهای حلقوی

RNAهای حلقوی در خلال پیرایش برگشتی تولید می‌شوند. این RNAها از هم‌تاهای خطی خود متمایزند، زیرا فاقد

مرتبط با چرخه سلولی در سرطان پستان شناسایی شد. این اولین آنالیز اطلاعات جامع است که به بررسی اثرات کلی ارتباط بالقوه بین RNA های حلقوی و سرطان پرداخت (۳۴).

کارکردهای RNA های حلقوی در سرطانها

بسیاری از RNA های حلقوی ویژه بافت هستند و الگوهای بیان خاصی در مراحل تکاملی دارند و نقش‌های حیاتی در فرایندهای زیست‌شناختی مرتبط با سرطان بازی می‌کنند. چندین RNA حلقوی برای دست‌یابی و حفظ فنوتیپ‌های سرطانی و گستره وسیعی از سرطان‌های خارج از تنظیم ضروری هستند. پژوهش‌های اخیر به این نتیجه رسیده‌اند که فراوانی کلی RNA های حلقوی در سرطان کولورکتال نسبت به بافت طبیعی کمتر است (۳۶). اغلب پژوهشگران بر روی کارکرد RNA های حلقوی به عنوان miRNA sponge که از طریق ceRNA عمل می‌کنند متمرکز هستند (۳۷). RNA های حلقوی بیان ژنی را در سطح رونویسی و یا پس از ترجمه توسط miRNA ها تنظیم می‌کنند (۳۸). یکی از بیشترین مطالعات در زمینه miRNA و شبکه ceRNA با مطالعه بر روی miR-7 انجام گرفته است. شواهدی نوظهور حاکی از آن است که ciRs-7 سبب تنظیم بیان miR-7 می‌شود. miR-7 به طور مستقیم می‌تواند موجب کاهش بیان انکوژن‌هایی مانند گیرنده عامل رشد اپیدرمی (Epidermal Growth Factor Receptor)، کیناز-۱ فعال‌کننده p21 (Pak1)، سوسترای-۱ گیرنده انسولین (IRS-1)، زیر واحد کاتالیک دلتای کیناز فسفوانیزوتید-۳ (PIK3CD) و گیرنده راپامایسین پستانداران (mTOR) شود (۳۹). هم‌چنین نشان داده شد که در برخی شرایط پروتئین متصل‌شونده به ریبوزوم ممکن است به عنوان فعال‌کننده یا مهارکننده تنظیمی در شکل‌گیری RNA های حلقوی عمل کنند (۲۴). پروتئین‌های متصل‌شونده به ریبوزوم بر روی بازیابی و

به منظور سازمان‌دهی فعال RNA های حلقوی پایگاه‌های آنلاین ایجاد شده است. این پایگاه‌های اطلاعاتی RNA های حلقوی را از Gene bank یا مقالات منتشر شده جمع‌آوری می‌کنند. این پایگاه‌ها RNA های غیرکدکننده را که به طور تجربی تایید شده‌اند، RNA هایی که صرفاً پیش‌بینی محاسباتی شده‌اند و آنهایی که بر اساس اندازه پیشنهاد شده‌اند، فهرست کرده است. برای نمونه v2.0 StarBase و circBASE به کاربران اجازه می‌دهند که رده‌های کاربردی یا فرایندها را جستجو کنند. circ2Traits و nc2 cancer به کاربر اجازه می‌دهد براساس بیماری (مانند سرطان) جستجو انجام گیرد. اگرچه باید توجه داشت که همواره به ترکیبی از پایگاه‌های اطلاعاتی پیش‌بینی‌کننده بیان RNA های حلقوی و پایگاه‌های اطلاعاتی دیگر که بر مبنای بیماری هستند (مانند Circ2 Traits db؛ <http://gvaxet-beta.com/circ>) نیاز است (۳۴، ۳۵). در جدول ۱ سیاهه شماری از پایگاه‌های اطلاعاتی مرتبط با RNA های حلقوی آورده شده است.

اشاره می‌شود که موقعیت ژنومی چندین RNA حلقوی با پایگاه اطلاعاتی که همراهی SNP ها را با بیماری‌ها و یا بیماری‌های مرتبط با نواحی ژنتیکی خاص را اعلام می‌کنند، نشان داده شده است (circ2 Traits and nc2 cancer) (۳۴، ۳۵).

Ghosal و همکارانش احتمال همراهی بیماری با یک RNA حلقوی به دست آمده از محاسبات آماری حاصل از مطالعه تعامل بین RNA های حلقوی و microRNA مرتبط با بیماری را اندازه‌گیری کردند. آنها محتوای هسته را از لحاظ ژن‌های کدکننده پروتئین در بیماری‌هایی که بین miRNA و RNA حلقوی تعامل وجود دارد، بررسی کردند تا ژن‌های مرتبط با فرایندهای زیست‌شناختی ویژه را شناسایی کنند. فرایندهای زیست‌شناختی برای mRNA در ۵۰ بیمار شناسایی شد. در میان این mRNA ها ۲۲ ژن پاسخ به محرک نوری، ۴۳ ژن

جدول ۱. سیاهه مربوط به تعدادی از پایگاه‌های اطلاعاتی کاربردی مرتبط با RNA های حلقوی

Name of database	Functions
CircRNA	The sequence and expression information
circRNADB	Protein-encoding feature annotation
Circ2Traits	MiRNA-circRNA-mRNA-lncRNAs intraction network for diseases.
Deepbase	Comprehensive annotation of sRNAs.lncRNAs and circRNAs
circInteractome	Circular RNAs and their interactions with other binding factors (RBPs and miRNA)
circNET	Tissue-specific circRNA expression profile.circRNA/mRNA/gene regulatory networks
starBase	Systematically identify the RNA-RNA and protein-RNA interaction networks
CIRCexploret2	Annotate alternative back-splicing and alternative splicing in circRNAs

رونویسی mRNA ها اثر گذاشته و در تعدادی از بیماری‌ها مانند سرطان نیز کاربرد دارد (۴۰). جابجایی‌های کروموزومی با تولید fusion-circRNA های نابجا که به f-circRNA شهرت دارند، در سرطان‌ها نقش دارند (۴۱). در واقع با الحاق دو ژن مجزا، پروتئین‌های الحاقی انکوژنی شکل می‌گیرند که پروتئینی جهش یافته است و به آغاز و پیشرفت سرطان منجر می‌شود (۴۲). هنگامی که یک سری توالی اینترونی نامرتبط که دور از یکدیگر قرار دارند تجمع یافته و پیرامون هم جمع می‌شوند، به تشکیل f-circRNA منجر شده که در پی آن پیرایش‌های برگشتی جدیدی رخ می‌دهد (۳). f-circRNA ها واجد اثرات پروتئینوتیک و تکثیری بوده و در پیشبرد سرطان با تحریک فعالیت مسیرهای انتقال سیگنال PI3K و MAPK ایفای نقش می‌کنند (۴۱). f-circRNA ها در مقاومت به درمان نیز نقش دارند. برای نمونه، f-circRNA سبب مقاومت در برابر تری اکسید آرسنیک (ATO) در سلول‌های لوکمیک می‌شود (۴۱). بنابراین برای غلبه بر معضل مقاومت دارویی هدف گیری f-circRNA ها به جای RNAهای حلقوی ممکن است مزایای بیشتری داشته باشد. افزون بر این، مطالعه بر روی مسیرهای درگیر با سرطان‌زایی به پژوهشگران اجازه خواهد داد RNAهای حلقوی را شناسایی کنند که نقش بیومارکری دارند؛ برای نمونه برخی از انواع RNAهای حلقوی واجد نقش تنظیمی در مسیر Wnt/ β -catenin هستند (۴۳). سیگنال‌دهی Wnt به پیشرفت تومور در انسان منجر می‌شود (۴۴). در صورت تأیید تنظیم RNAهای حلقوی در این مسیر می‌توان با هدف گیری RNAهای حلقوی از رشد و گسترش تومورها جلوگیری کرد. به عنوان نمونه، ciR-7 در بافت‌های سرطانی موجب مهار miR-7 و در پی آن فعال شدن انکوژنهای EGFR و RAF1 می‌شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که RNAهای حلقوی واجد نقش کلیدی در آغاز و گسترش سرطان هستند (۴۵). دو مسیر PI3K/AKT و RAF/MEK/ERK ممکن است در آینده برای پژوهش در زمینه تنظیم بالقوه RNAهای حلقوی مورد مطالعه قرار گیرند (۴۶). پژوهش‌های اخیر هم چنین نشان داده است که عمده RNAهای حلقوی به وسیله EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) انسانی تنظیم شده‌اند و بیش از ۱/۳ از آن‌ها به صورت دینامیک توسط عامل پیرایش متناوب که به وسیله فرایند EMT تنظیم شده‌اند، تنظیم می‌شوند. شرکت EMT در تومورزایی نشانه‌های مهمی را برای پیشرفت سرطان فراهم می‌کند و ممکن است دانش زیادی در رابطه با نقش درمانی RNAهای حلقوی به وسیله هدف گذاری

miRNAهای درگیر در EMT فراهم کند (۳۶). علاوه بر اینها هدف گیری RNAهای حلقوی مرتبط با ژن‌های درگیر در سرطان‌ها ممکن است روش جدیدی برای غلبه مقاومت‌های مرتبط با درمان باشد (۴۷، ۴۸). برای نمونه RNA حلقوی HIAT1 (circ HIAT1) در نقش مهار کننده متاستاتیک برای گیرنده آندروژن عمل کرده و موجب مهاجرت و تهاجم سلول‌های کارسینومای کلیه می‌شود. در نتیجه، هدف گیری این گیرنده آندروژن با افزایش بیان RNA حلقوی HIAT1 می‌تواند موجب سرکوب پیشرفت سلولی شود (۴۹).

همراهی RNA های حلقوی با miRNA های مرتبط با سرطان

بسیار واضح است که miRNAها تقریباً در همه جوانب کارکردهای سلولی درگیر هستند و در آغاز و پیشرفت سرطان نقش حیاتی دارند (۵۰). در مارس ۲۰۱۳ دو مقاله، کارکرد RNAهای حلقوی به عنوان spongeهای miRNA که به طور طبیعی جدا از یکدیگر هستند و به طور رقابتی کارکرد miRNA را سرکوب می‌کنند گزارش کردند (۳۸، ۵۱، ۵۲).

RNAهای حلقوی و mRNAها با جایگاه هدف miRNA معمولی برای اتصال به miRNA رقابت می‌کنند و یک تعامل پیچیده و شبکه تنظیمی را شکل می‌دهند که به طور رایج به عنوان شبکه ceRNA شناخته می‌شود. تشخیص هدف miRNA به میزان زیادی به توالی مکمل بین ناحیه seed موجود در miRNA (نوکلئوتید ۲ تا ۷ در توالی miRNA بالغ) و جایگاه هدف روی ceRNA وابسته است. جهش‌ها در miRNA (به ویژه در ناحیه ی seed) و جایگاه‌های هدفشان ممکن است تعامل miRNA-ceRNA و ceRNA را تغییر دهند (۱۲). اختلال عدم تنظیم بین ceRNAها در شبکه نقش مهمی را در بیماری‌زایی سرطان دارد. پیشنهاد شده است که RNAهای حلقوی می‌توانند در تومورهای بدخیم وابسته به miRNA درگیر باشند (۳۶، ۵۳).

با اندازه گیری احتمال پیوستگی یک RNA حلقوی با بیماری با توجه به اهمیت آماری تعامل با miRNAهای پیوسته با بیماری، پایگاه‌های اطلاعاتی circ2Traits فرایند زیست‌شناختی برای mRNA در ۹۰ بیماری را فهرست کرده است (۳۴). در میان این mRNAها، ۲۲ مورد ژن پاسخ به محرک نوری و ۴۳ ژن مرتبط با چرخه سلولی در سرطان پستان وجود داشت (۳۴). این اولین گزارش با دیدی کلی درباره پیوستگی بالقوه بین RNAهای حلقوی و سرطان بر پایه آنالیز جامع اطلاعات بود. با این حال یک RNA حلقوی مستقیم و miRNA همراه برای شواهد زیست‌شناختی بیشتر مورد نیاز

حلقوی در کارسینومای سلول‌های کبدی برخلاف بافت‌های طبیعی افزایش می‌یابد (۵۸).

سرطان کولورکتال

سرطان کولورکتال به عنوان سومین سرطان رایج و سومین علت رایج مرگ، هم در زنان و هم در مردان، شناخته می‌شود. به منظور تعیین نقش RNAهای حلقوی و اعتبارسنجی آن پنج نوع از آنها انتخاب و مشخص شد چهار مورد کاهش بیان را در مقایسه با بافت‌های موکوسی طبیعی نشان می‌دهند و تنها یک مورد (circ6229) به طور چشمگیری تغییر می‌کند. در مطالعه‌ای که بر روی این سرطان انجام گرفت مشخص شد جهش KRAS به ایجاد مقاومت دارویی به درمان‌هایی بر ضد گیرنده عامل رشد اپیدرمی (anti-EGFR) منجر می‌شود. Dou و همکارانش نشان دادند که بیان RNA حلقوی در رده‌های سلولی سرطان کولون که واجد جهش در KRAS هستند، در مقایسه با سویه‌های وحشی با احتمال زیادی کاهش می‌یابد (۵۹). این نوع RNAهای حلقوی به عنوان miRNA sponge عمل می‌کنند و موجب افزایش سطوح RNA حلقوی ITCH می‌شود. ژن ITCH مسیر Wnt/ β catenin درگیر است و موجب شروع و پیشرفت سرطان کولورکتال می‌شود (۶۰).

سرطان معده

سرطان معده در بسیاری از ملل توسعه یافته با وجود کاهش قابل توجه در بروز، اغلب به عنوان یکی از علل رایج مرگ‌های ناشی از سرطان در جهان است. Li و همکارانش has circ 002059 را به عنوان یک RNA حلقوی که به طور بالقوه با سرطان معده مرتبط است، شناسایی کردند (۶۱). hsa circ 002059 در بافت توموری معده در مقایسه با کنترل‌های نرمال به طور چشمگیری کاهش می‌یابد. هم چنین در نمونه‌های پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان معده در مقایسه با کنترل‌های سالم به طور چشمگیری کاهش می‌یابد و با ویژگی‌های بافت شناسی و بالینی مانند مرحله، سن، جنس و متاستاز به نقاط دور دست مرتبط است (۶۱). از سوی دیگر Chen و همکارانش، RNA حلقوی PVT را در بافت‌های توموری معده شناسایی کردند و مشخص شد که در این بافت‌ها افزایش یافته و موجب پیشبرد تکثیر سلولی توسط اعضای خانواده miR-125 می‌شود (۶۲).

سرطان مثانه

سرطان مثانه از پوشش اپیدرمی مجاری ادراری ناشی می‌شود و نهمین علت رایج سرطان در جهان است. RNAهای حلقوی در سرطان مثانه نیز با استفاده از میکروآرای با توان بالا شناسایی شدند (۶۳). با استفاده از این فن، Zhong و همکارانش دو مورد RNA حلقوی (circ FAM169A و circ

است. پایگاه اطلاعاتی somamiR2.0 حاوی جهش‌های سوماتیک در miRNAها و جایگاه‌های هدف روی Long non coding RNA، RNAهای حلقوی و miRNAها است (۵۴). شناسایی ceRNAها و RNAهای حلقوی به عنوان تنظیم کننده‌های مهم فعالیت miRNAها، مسئول افزایش پیچیدگی RNAهای غیر کد کننده میانجی شبکه‌های تنظیمی هستند. به ویژه RNAهای حلقوی که به عنوان ciRs-7 شناخته می‌شوند و به عنوان یک ceRNA یا sponge فوق العاده miR-7 عمل می‌کنند و به طور رقابتی miR-7 را مهار و بیان آنکوژن‌هایی مانند EGFR و XIAP را القا می‌کنند. در حالی که مهار ژن‌های سرکوب کننده تومور مانند KLF4 را موجب می‌شوند و بنابراین موجب القای آغاز و گسترش سرطان‌هایی همانند هیپاتوسلولار کارسینوما، سرطان پستان و گردن رحم می‌شوند (۱۳، ۵۵).

شناسایی تنظیم محور فعالیت miR-7/miR-67/ciR-7 احتمالاً موجب پیشرفت دانش سبب شناسی سرطان‌های متفاوت می‌شود (۵۵). SRY به عنوان یک miRNA حلقوی قابل توجه است که تاثیرات زیست شناختی miR-138 را به وسیله اتصال با ۱۶ جایگاه اتصال حفاظت شده کنترل می‌کند. این امر می‌تواند شبکه تنظیمی را تنظیم و بسیاری از فرایندهای زیست شناختی و بافت شناسی را به وسیله مدولاسیون miRNA چندگانه تحت تاثیر قرار دهد. به دلیل اینکه SRY و miRNA-7 اثرات حیاتی در وقوع و پیشرفت سرطان دارند، این گونه فرض شده است که RNAهای حلقوی هم باید در این فرایند دخیل باشند (۳۸).

RNAهای حلقوی و نمونه‌هایی از سرطان‌های مرتبط با آن

Yu و همکارانش در سال ۲۰۱۶ بر روی ciR-7 که پیش‌تر در کارسینومای سلول‌های کبدی بررسی شده بود کار کردند و دریافتند که در بافت‌های توموری کارسینومای سلول‌های کبدی در مقایسه با بافت‌های غیر توموری اطراف افزایش می‌یابد. از آنجایی که ciR-7 به عنوان miR-7 sponge شناخته شده است، پژوهش‌های زیادی شامل ناوک داوون کردن ciR-7 و افزایش بیان miR-7 sponge انجام گرفت و مشخص شد ciR-7 به عنوان یک آنکوژن از طریق هدف گیری miR-7 در کارسینومای سلول‌های کبدی عمل می‌کند (۵۶). از طرفی Qin و همکارانش در همان سال نوعی RNA حلقوی به نام has-circ-0001649 را شناسایی کردند و مشخص شد این RNA حلقوی در بافت‌های توموری کبد در مقایسه با بافت‌های کبدی طبیعی پیرامون به طور چشمگیری کاهش می‌یابد (۵۷). اما برخلاف این یافته، Shang و همکارانش نیز در همان سال مشخص کردند که این RNA

دارد. پیش بینی شده است که اثرات پیرایش CANRIL به سرکوب INK4/ARF منجر شده و موجب افزایش خطر آترواسکلروزیس می‌شود (۲۱). هیپوکسی عامل خطر شناخته شده برای آترواسکلروزیس و یک محرک کلیدی برای آنژیوژنیزیس است که توسط RNAهای حلقوی تنظیم می‌شود (۶۵). CIZNF292 یک RNA حلقوی است که به وسیله هیپوکسی در سلول‌های اندوتلیال تنظیم می‌شود و آنژیوژنیزیس را کنترل می‌کند (۶۵). RNAهای حلقوی به میزان زیادی در بافت‌های قلبی انسانی بیان می‌شوند و با ژن‌های کلیدی قلب شامل Titin (TTN)، RNR2 و DMD ارتباط دارند (۶۶). شواهد بیشتری برای نقش RNAهای حلقوی در بیماری‌های قلبی-عروقی به وسیله Jakobi جمع‌آوری شده است. او توالی یابی RNA را روی قلب موش‌های بالغ انجام داد و بیش از ۵۷۵ مورد RNA حلقوی را که نامزد بیماری قلبی هستند شناسایی کرد (۶۷). برخی از این RNAهای حلقوی با لکوس ژن مرتبط با بیماری قلبی همراهی داشته و با هم بروز می‌کنند. برای نمونه has circ 0124644 در بیماری‌های قلبی در مقایسه با کنترل‌ها افزایش می‌یابد (۶۸).

دیابت

دیابت نوعی بیماری مزمن است که منجر به ایجاد ناهنجاری‌های بلند مدت می‌شود. امروزه روش‌های جدیدی جهت شناسایی، تشخیص و درمان بهتر مورد نیاز است. افزایش miR-7 در سلول‌های بتای موش ترانسژنیک نشان داده شده است و مشخص شد که ciR-7 کارکرد miR-7 را در سلول‌های بتا که موجب ترشح انسولین می‌شود را بهبود می‌بخشد (۶۹).

آلزایمر

مطالعات اولیه نشان داده‌اند که RNAهای حلقوی به میزان زیادی در مغز بیان می‌شوند (۲۳) و ممکن است در تنظیم کارکرد سیناپسی و شکل‌گیری عصبی (۷۰) شرکت کنند. مشخص شده است که کارکرد نابجای miR7-circRNA در ناحیه CA1 هیپوکامپ مغز در آلزایمر اسپورادیک ایجاد می‌شود (۷۱). افزایش miR-7 در مغز مبتلایان به آلزایمر به دلیل نقص در ciR-7، به کاهش mRNA مرتبط با آلزایمر و کاهش بیان آنها می‌انجامد که از آن میان می‌توان به UBE2A ubiquitin conjugase (UBE2A) اشاره کرد (۴۶). در چرخه یوبی کوئیتیناسیون به عنوان یک افکتور مرکزی عمل می‌کند که در پاک‌سازی پپتیدهای آمیلوئید به وسیله فاگوسیتوز درگیر است. در مغز مبتلایان به آلزایمر اسپورادیک UBE2A تخلیه شده و به آمیلوئیدوژنیزیس منجر می‌شود.

TRIM24 را که در سرطان مثانه به طور چشمگیری کاهش می‌یابد، شناسایی کردند (۶۳).

علاوه بر این دو، آنها موفق به شناسایی چهار RNA حلقوی دیگر شدند که در بافت‌های سرطان مثانه نسبت به بافت‌های غیر توموری پیرامون به طور چشمگیری افزایش می‌یابد (circ RNA circ BCO48201 و circ PTK2، circ ZFR، TCF25 حلقوی TCF25 به عنوان miRNA sponge عمل می‌کند و در بافت‌های سرطانی موجب کاهش miR-103a-3p و miR-107 و افزایش CDK6 و سرانجام گسترش سرطان می‌شود (۶۳).

کارسینومای سلول‌های کبدی

کارسینومای سلول‌های کبدی یک بدخیمی مربوط به کبد است و به طور غالب در مبتلایان به بیماری کبدی مزمن و سیروز کبدی رخ می‌دهد. در این بیماری RNAهای حلقوی در مقایسه با بافت‌های سالم از تنظیم خارج می‌شوند (۶۳).

Qin و همکارانش has-circ-0001649 را در این بیماری شناسایی کردند و متوجه شدند که در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های کبدی طبیعی پیرامون به طور چشمگیری کاهش می‌یابد (۵۷). Shang و همکارانش has-circ-0005075 را شناسایی کردند و متوجه شدند که در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های طبیعی به طور چشمگیری افزایش می‌یابد (۵۸).

Yu و همکاران ciRS-7 را که در گذشته شناسایی شده بود مورد آزمایش قرار دادند و متوجه شدند که در بافت‌های توموری کارسینومای سلول‌های کبدی در مقایسه با بافت‌های غیر توموری پیرامون، افزایش می‌یابد (۵۶). از آنجایی که ciRS-7 به عنوان miR-7 sponge عمل می‌کند، پژوهش‌های زیادی شامل ناوک داون کردن ciRS-7 و افزایش بیان miR-7 انجام گرفت و مشخص شد ciRS-7 به عنوان یک انکوژن از طریق هدف‌گیری miR-7 در کارسینومای سلول‌های کبدی عمل می‌کند (۴۶).

مطالعات دیگر کاهش بیان برخی از RNAهای حلقوی را در سرطان ریه و مری (۴۷، ۴۸)، سرطان پانکراس (۶۴)، کارسینومای سلولی کلیه و سرطان پروستات (۲۳) مشخص کردند.

نمونه‌هایی از دیگر بیماری‌های مرتبط با

RNAهای حلقوی

بیماری قلبی ایسکمیک

این بیماری علت پیش‌روی مرگ در کشورهای توسعه یافته است. CANRIL یکی از نخستین RNAهای حلقوی شناخته شده است که با چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی رایج همراهی

ارزیابی پاسخ به درمان مورد استفاده بسیاری از متخصصان بالینی قرار می‌گیرند. اغلب آنالیزهای بر پایه خون و بیوپسی مایعات بدن به دلیل ماهیت غیر تهاجمی یا کمتر تهاجمی مورد توجه هستند (۷۶). آنالیز بر پایه خون امکان مشاهده پاسخ به درمان، مقاومت به درمان یا شناسایی عود اولیه در زمان واقعی را برای پژوهشگر فراهم می‌کند (۷۷). اگر چه تعداد RNAهای حلقوی با کارکردهای شناخته شده در حال افزایش است، اما هزاران نوع از آنها با کارکردهای ناشناخته نیز وجود دارند. ممکن است که اکثریت RNAهای حلقوی یک کارکرد واحد شناخته شده داشته باشند و یا همراه با هم موجب ایجاد یک نقش واحد شوند. این امکان وجود دارد که کسر بزرگی از RNAهای حلقوی که بیان شده‌اند اما کارکردی نیستند، محصول فرعی پیرایش باشند. ناوک اوت کردن RNAهای حلقوی با ابزار خاص ویرایش ژنومی ممکن است به فهم کارکرد آنها منجر شود (۳۲). امید می‌رود که پیشرفت‌های بیوتکنولوژی مولکولی و بیوشیمیایی در کنار مطالعات مشخص کننده جزییات کارکردی، فیزیولوژیکی و بافت شناسی در آینده نزدیک موجب گسترش راهکارهای درمانی مبتنی بر RNAهای حلقوی شود و زمینه ایجاد کارکردهای بالینی موفق و ایمن را فراهم آورد (۳۶).

شواهد بیشتر برای یک ارتباط با پیری از شناسایی RNAهای حلقوی همراه با پیری یا senescence وجود دارد (۷۲). پیری وضعیتی است که در پی مواجهه سلول‌ها با محرک‌های ایجاد کننده تنش سلولی، رشد سلولی متوقف می‌شود و با فرایندهایی مانند sarcopenia، آرتریت، دیابت، تخریب عصبی و سرطان مرتبط است (۷۳). CircPVT1 نیز به عنوان یک سرکوب کننده پیری در فیبروبلاست‌های تکثیر کننده عمل می‌کند (۷۴، ۷۵).

دورنما

پژوهش‌های وسیعی موجب تعمیق فهم ما از شبکه پیچیده RNAهای حلقوی در شرایط وجود یا عدم وجود سرطان می‌شوند و اطلاعات اولیه نقش آنها را در آغاز، پیشرفت و مقاومت درمانی نشان می‌دهد. این واقعیت که RNAهای حلقوی ویژه‌ای در برخی از بیماری‌های خاص وجود دارد ثابت شده است و کارکردهای تنظیمی آنها در آینده به عنوان بیومارکرهای پیش آگهی دهنده و تشخیصی و به منظور کاربرد در اهداف درمانی مورد توجه است. بیومارکرهایی با ویژگی و حساسیت بالا، در تشخیص بیماری، شناسایی جمعیت در معرض خطر بالا، گسترش درمان‌های هدفمند و

REFERENCES

1. Warner JR. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trend Biochem Sci* 1999;24:437-40.
2. Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA* 2013;19:141-57.
3. Barrett SP, Wang PL, Salzman J. Circular RNA biogenesis can proceed through an exon-containing lariat precursor. *Elife* 2015;4:e07540.
4. Noori-Daloi M. Medical molecular genetics in the third millennium. Tehran, Iran: Samer Publication; 2012. [In Persian]
5. Noori-Daloi M, ed. Emery's elements of medical genetics. 8th ed. Tehran, Iran: Jame-negar and Salemi Publication; 2017. [In Persian]
6. Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PloS One* 2012;7:e30733.
7. Nigro JM, Cho KR, Fearon ER, Kern SE, Ruppert JM, Oliner JD, et al. Scrambled exons. *Cell* 1991;64:607-13.
8. Capel B, Swain A, Nicolis S, Hacker A, Walter M, Koopman P, et al. Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell* 1993;73:1019-30.
9. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 1990;348:450.
10. Taulli R, Loretelli C, Pandolfi PP. From pseudo-ceRNAs to circ-ceRNAs: a tale of cross-talk and competition. *Nat Struct Mol Biol* 2013;20:541.
11. Thomson DW, Dinger ME. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy. *Nat Rev Genet* 2016;17:272.
12. Xiao-Jie L, Ai-Mei G, Li-Juan J, Jiang X. Pseudogene in cancer: real functions and promising signature. *J Med Genet* 2015;52:17-24.
13. Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK. Circular RNA and miR-7 in cancer. *Cancer Res* 2013;73:5609-12.

14. Salzman J. Circular RNA expression: its potential regulation and function. *Trends Genet* 2016;32:309-16.
15. Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat Biotech* 2014;32:453.
16. Cocquerelle C, Mascrez B, Hetuin D, Bailleul B. Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB J* 1993;7:155-60.
17. Zaphiropoulos PG. Exon skipping and circular RNA formation in transcripts of the human cytochrome P-450 2C18 gene in epidermis and of the rat androgen binding protein gene in testis. *Mol Cell Biol* 1997;17:2985-93.
18. Surono A, Takeshima Y, Wibawa T, Ikezawa M, Nonaka I, Matsuo M. Circular dystrophin RNAs consisting of exons that were skipped by alternative splicing. *Hum Mol Genet* 1999;8:493-500.
19. Li X-F, Lytton J. A circularized sodium-calcium exchanger exon 2 transcript. *J Biol Chem* 1999;274:8153-60.
20. Houseley JM, Garcia-Casado Z, Pascual M, Paricio N, O'dell KM, Monckton DG, et al. Noncanonical RNAs from transcripts of the *Drosophila muscleblind* gene. *J Hered* 2006;97:253-60.
21. Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS Genet* 2010;6:e1001233.
22. Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, Villadsen SB, Statham AL, Clark SJ, et al. miRNA silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO J* 2014;33:414-22. -dependent g
23. Zheng Q, Bao C, Guo W, Li S, Chen J, Chen B, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. *Nat Commun* 2016;7:11215.
24. Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, Conn VM, Salamanidis M, Phillips CA, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell* 2015;160:1125-34.
25. Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang PL, Brown PO. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet* 2013;9:e1003777.
26. Chen C-y, Sarnow P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science* 1995;268:415-7.
27. Szabo L, Morey R, Palpant NJ, Wang PL, Afari N, Jiang C, et al. Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development. *Genome Biol* 2015;16:126.
28. Vicens Q, Westhof E. Biogenesis of circular RNAs. *Cell* 2014;159:13-4.
29. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 2013;495:333.
30. Starke S, Jost I, Rossbach O, Schneider T, Schreiner S, Hung L-H, et al. Exon circularization requires canonical splice signals. *Cell Rep* 2015;10:103-11.
31. Chen L-L, Yang L. Regulation of circRNA biogenesis. *RNA Biol* 2015;12:381-8.
32. Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development* 2016;143:1838-47.
33. Cocquet J, Chong A, Zhang G, Veitia RA. Reverse transcriptase template switching and false alternative transcripts. *Genomics* 2006;88:127-31.
34. Ghosal S, Das S, Sen R, Basak P, Chakrabarti J. Circ2Traits: a comprehensive database for circular RNA potentially associated with disease and traits. *Front Genet* 2013;4:283.
35. Chen Z, Liu K, Yan Z, Xiang S, Sun Z. nc2Cancer: a database for cancer-associated human ncRNAs. *Chin J Bioinformatics* 2015;13:77-81.
36. Chen Y, Li C, Tan C, Liu X. Circular RNAs: a new frontier in the study of human diseases. *J Med Genet* 2016;53:359-65.
37. O.A.MJT. K. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 2006;25:96-188.
38. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* 2013;495:384.
39. Dong Y, He D, Peng Z, Peng W, Shi W, Wang J, et al. Circular RNAs in cancer: an emerging key player. *J Hematol Oncol* 2017;10:2.

40. Chénard CA, Richard S. New implications for the QUAKING RNA binding protein in human disease. *J Neurosci Res* 2008;86:233-42.
41. Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, Paffenholz SV, Berry K, Naldini MM, et al. Oncogenic role of fusion-circRNAs derived from cancer-associated chromosomal translocations. *Cell* 2016;165:289-302.
42. Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet* 2010;11:685.
43. Huang G, Zhu H, Shi Y, Wu W, Cai H, Chen X. cir-ITCH plays an inhibitory role in colorectal cancer by regulating the Wnt/ β -catenin pathway. *PloS One* 2015;10:e0131225.
44. Padala RR, Karnawat R, Viswanathan SB, Thakkar AV, Das AB. Cancerous perturbations within the ERK, PI3K/Akt, and Wnt/ β -catenin signaling network constitutively activate inter-pathway positive feedback loops. *Mol Biosyst* 2017;13:830-40.
45. Weng W, Wei Q, Toden S, Yoshida K, Nagasaka T, Fujiwara T, et al. Circular RNA ciRS-7—a promising prognostic biomarker and a potential therapeutic target in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2017; 23:3918-28.
46. Greene J, Baird A-M, Brady L, Lim M, Gray SG, McDermott R, et al. Circular RNAs: biogenesis, function and role in human diseases. *Front Mol Biosci* 2017;4:38.
47. Li F, Zhang L, Li W, Deng J, Zheng J, An M, et al. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/ β -catenin pathway. *Oncotarget* 2015;6:6001.
48. Wan L, Zhang L, Fan K, Cheng Z-X, Sun Q-C, Wang J-J. Circular RNA-ITCH suppresses lung cancer proliferation via inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway. *Biomed Res Int* 2016;2016.
49. Wang K, Sun Y, Tao W, Fei X, Chang C. Androgen receptor (AR) promotes clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) migration and invasion via altering the circHIAT1/miR-195-5p/29a-3p/29c-3p/CDC42 signals. *Cancer let* 2017;394:1-12.
50. Humphries B, Yang C. The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget* 2015;6:6472.
51. Noori-Dalooi M, Alvandi E. Micro RNA: little but mysterious, and its use: a review article. *The Journal of Faculty of Medicine, TUMS* 2006;64:5-19.[In Persian]
52. Noori-Dalooi MR, Nejatizadeh A. MicroRNA in disease and health: diagnostic and therapeutic potentials. *Gene Therapy Development and Future Perspectives*. Rijeka, Croatia: InTech; 2011. P.93-120.
53. Noori-Dalooi M, Vand Rajabpour F. Roles of miRNAs in gene expression regulation, apoptosis, diagnosis and treatment of cancer. *Medical Science Journal of Islamic Azad university-Tehran Medical Branch* 2011;21.3:151-61. [In Persian]
54. Bhattacharya A, Cui Y. SomamiR 2.0: a database of cancer somatic mutations altering microRNA–ceRNA interactions. *Nucleic Acids Res* 2015;44:D1005-10.
55. Peng L, Yuan XQ, Li GC. The emerging landscape of circular RNA ciRS-7 in cancer. *Oncol Rep* 2015;33:2669-74.
56. Yu L, Gong X, Sun L, Zhou Q, Lu B, Zhu L. The circular RNA Cdr1as act as an oncogene in hepatocellular carcinoma through targeting miR-7 expression. *PloS One* 2016;11:e0158347.
57. Qin M, Liu G, Huo X, Tao X, Sun X, Ge Z, et al. Hsa_circ_0001649: a circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark* 2016;16:161-9.
58. Shang X, Li G, Liu H, Li T, Liu J, Zhao Q, et al. Comprehensive circular RNA profiling reveals that hsa_circ_0005075, a new circular RNA biomarker, is involved in hepatocellular carcinoma development. *Medicine* 2016;95: e3811.
59. Dou Y, Cha DJ, Franklin JL, Higginbotham JN, Jeppesen DK, Weaver AM, et al. Circular RNAs are down-regulated in KRAS mutant colon cancer cells and can be transferred to exosomes. *Sci Rep* 2016;6:37982.
60. Ye Q, Yao G, Zhang M, Guo G, Hu Y, Jiang J, et al. A novel ent-kaurane diterpenoid executes antitumor function in colorectal cancer cells by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling. *Carcinogenesis* 2015;36:318-26.
61. Li P, Chen S, Chen H, Mo X, Li T, Shao Y, et al. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer. *Clin Chim Acta* 2015;444:132-6.
62. Chen J, Li Y, Zheng Q, Bao C, He J, Chen B, et al. Circular RNA profile identifies circPVT1 as a proliferative factor and prognostic marker in gastric cancer. *Cancer Lett* 2017;388:208-19.

63. Zhong Z, Lv M, Chen J. Screening differential circular RNA expression profiles reveals the regulatory role of circTCF25-miR-103a-3p/miR-107-CDK6 pathway in bladder carcinoma. *Sci Rep* 2016;6:30919.
64. Qu S, Song W, Yang X, Wang J, Zhang R, Zhang Z, et al. Microarray expression profile of circular RNAs in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genom Data* 2015;5:385-7.
65. Boeckel J-N, Jaé N, Heumüller AW, Chen W, Boon RA, Stellos K, et al. Identification and characterization of hypoxia-regulated endothelial circular RNA. *Circ Res* 2015; 117:884-90.
66. Tan WL, Lim BT, Anene-Nzeliu CG, Ackers-Johnson M, Dashi A, See K, et al. A landscape of circular RNA expression in the human heart. *Cardiovasc Res* 2016;113:298-309.
67. Jakobi T, Czaja-Hasse LF, Reinhardt R, Dieterich C. Profiling and validation of the circular RNA repertoire in adult murine hearts. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2016;14:216-23.
68. Zhao Z, Li X, Gao C, Jian D, Hao P, Rao L, et al. Peripheral blood circular RNA hsa_circ_0124644 can be used as a diagnostic biomarker of coronary artery disease. *Sci Rep* 2017;7:39918.
69. Xu H, Guo S, Li W, Yu P. The circular RNA Cdr1as, via miR-7 and its targets, regulates insulin transcription and secretion in islet cells. *Sci Rep* 2015;5:12453.
70. You X, Vlatkovic I, Babic A, Will T, Epstein I, Tushev G, et al. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. *Nat Neurosci* 2015;18:603.
71. Lukiw W. Circular RNA (circRNA) in Alzheimer's disease (AD). *Front Genet* 2013;4:307.
72. Panda AC, Abdelmohsen K, Gorospe M. RT-qPCR detection of senescence-associated circular RNAs. *Methods Mol Biol* 2017;1534:79-87.
73. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Ann Rev Physiol* 2013;75:685-705.
74. Lehmann SM, Krüger C, Park B, Derkow K, Rosenberger K, Baumgart J, et al. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2012;15:827.
75. Panda AC, Grammatikakis I, Kim KM, De S, Martindale JL, Munk R, et al. Identification of senescence-associated circular RNAs (SAC-RNAs) reveals senescence suppressor CircPVT1. *Nucleic Acids Res* 2016;45:4021-35.
76. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature* 2017;545:446.
77. Reid G, Pel M, Kirschner M, Cheng Y, Mugridge N, Weiss J, et al. Restoring expression of miR-16: a novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol* 2013;24:3128-35.