

Kanserde MikroRNA'ların Rolü

The Role of Micro-RNAs in Cancer: Review

Nagehan ERSOY TUNALI,^a
N. Ozan TIRYAKIOĞLU^a

^aMoleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
Haliç Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi, İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 01.12.2009
Kabul Tarihi/Accepted: 05.07.2010

Yazışma Adresi/Correspondence:
Nagehan ERSOY TUNALI
Haliç Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
İstanbul,
TÜRKİYE/TURKEY
nagehanersoy@halic.edu.tr

ÖZET MikroRNA'lar (miRNA'lar) küçük, protein kodlamayan RNA molekülleridir. Bir ya da birden fazla hedef geni baskılayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü gibi süreçlerde rol oynarlar. miRNA'lar protein kodlayan genlerin eksonik ve intronik bölgelerinde ve genler arası bölgelerde bulunabilirler. miRNA genlerinin %50'sinden fazlası kanser ile ilişkilendirilmiş genom üzerindeki bölgelerde veya kırılğan bölgelerde bulunur; bu durum da miRNA'ların neoplazi patojenezinde önemli rolleri olduğuna işaret eder. Birçok deneysel çalışma miRNA'ların yeni bir onkogen veya tümör baskılayıcı gen sınıfı oluşturabileceğini göstermiştir. Normal ve patolojik dokular arasında farklı seviyede ifade edilen miRNA'lar tespit edilerek, insan kanserlerinde etkili olan miRNA'lar belirlenebilir. Bazı miRNA'lar epigenetik mekanizmalarla kontrol edilirken, bazıları da doğrudan veya dolaylı olarak epigenetik mekanizmada rol oynayan faktörleri hedef alırlar. miRNA'ların hedeflerinin belirlenmesinde en sık kullanılan programlar PicTar, Target-ScanS ve miRanda'dır. miRNA'ların işlevsel önemlerinin tam olarak anlaşılabilmesi ve tanı veya tedavi amaçlı kullanımlarının gerçekleştirilmesi için hedeflerine nasıl bağlandıklarının ve gen ifadesini farklı seviyelerde nasıl düzenlediklerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Tümörler, antineoplastik protokoller, genetik süreçler, epigenesis, mikroRNA'lar

ABSTRACT Micro RNAs (miRNA) are small, non-protein-coding RNA molecules. They have roles in growth, differentiation, proliferation and cell death by suppressing one or more target genes. miRNAs may be located in the introns and exons of protein-coding genes or in intergenic regions. More than 50% of miRNAs are found in cancer-associated regions of the genome or in fragile sites; this suggests that miRNAs have important roles in the pathogenesis of neoplasias. Many experimental studies have shown that miRNAs may constitute a new class of oncogenes or tumor suppressor genes. miRNAs that may have roles in human cancers can be determined by detecting miRNAs that have different levels of expression in normal and pathologic tissues. Some miRNAs may undergo epigenetic regulation while others may target factors which directly or indirectly have a role in epigenetic mechanisms. The softwares used for the identification of miRNA targets are PicTar, Target-ScanS and miRanda. How the miRNAs bind to their targets and regulate gene expression at different stages should be determined to understand the functional importance of miRNAs and to establish their utility in diagnosis and treatment of diseases.

Key Words: Neoplasms, antineoplastic protocols, genetic processes, epigenesis, microRNAs

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010;30(5):1690-700

MikroRNA'lar (miRNA'lar) küçük, protein kodlamayan RNA molekülleridir. Hedef genleri baskılayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü gibi süreçlerde rol oynarlar. İlk olarak bazı miRNA'ların bu süreçleri tek bir hedef geni baskılayarak düzenledikleri be-

lirlenmiş olsa da zamanla birçok miRNA'nın tek başına birden fazla hedef geni baskılayabildiği anlaşılmıştır.^{1,2}

miRNA ailesinin ilk keşfedilen üyeleri, *C.elegans*'ın gelişimi sırasında gözlenen ve spesifik ifade modelleri sebebiyle küçük geçici RNA'lar olarak tarif edilen lin-4 ve let-7'dir. miRNA'ların temel işlevleri *D. melanogaster* ve insanda let-7 keşfedilene kadar belirlenememiştir.³⁻⁶ let-7 miRNA'sının zamana bağlı ifade modeli insanlarda evrimsel olarak korunmuştur. Bu durum miRNA'ların önceden belirlenmiş uzay-zamansal modeller ile ifade edilebileceğine işaret eder.⁷ Diğer bir deyişle, çeşitli miRNA'ların farklı dokularda ve belli zaman aralıklarındaki gen ifadeleri karşılaştırılarak miRNA genlerinin ifade modelleri belirlenebilir. Örneğin fare ve insanda yapılan miRNA profillemeye çalışmaları, her iki canlıda da %50'ye yakın miRNA'nın doku-spesifik gen ifadesini göstermiştir.^{8,9} Bu gözlemleri doğrular şekilde, doku-spesifik miRNA gen ifadesi artırıldığı taktirde (örneğin nöronlarda mir-124 ve farklılaşmış hücrelerde let-7) öncül hücrelere özgün mRNA'ların baskılandığı ve hücrenin farklılaşma kararlılığının arttığı gözlemlenmiştir.^{10,11}

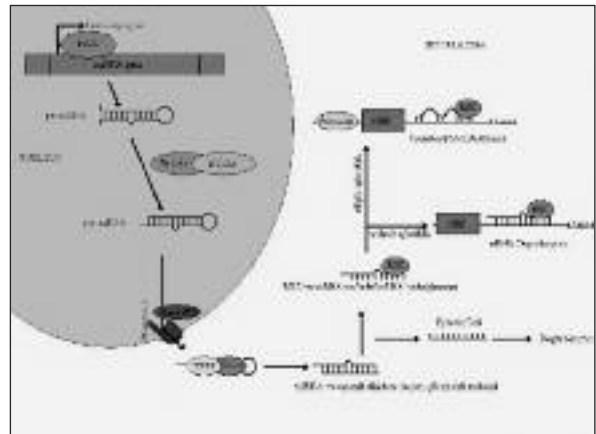
miRNA'ların büyük çoğunluğu (%61) protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde bulunmaktadır, ancak genler arası bölgelerde veya eksonlarda da bulunabilirler. miRNA genlerinin %50'sinden fazlası kanser ile ilişkilendirilmiş gen bölgelerinde veya kırılğan bölgelerde bulunur. Bu durum miRNA'ların neoplazi patojenezinde önemli rolleri olduğuna işaret eder.¹²

miRNA'ların işlevsel önemlerinin tam olarak anlaşılabilmesi ve tanı veya tedavi amaçlı kullanımlarının gerçekleştirilmesi için hedeflerine nasıl bağlandıklarının ve gen ifadelerini farklı seviyelerde nasıl düzenlediklerinin belirlenmesi gerekmektedir.

MikroRNA BİYOGENEZİ

İnsanlarda miRNA'lar pri-miRNA adı verilen 1 kb'dan daha büyük diziler hâlinde transkribe olurlar ve 5' cap ve 3' poliA kuyrukları vardır.^{13,14} pri-miRNA transkriptleri iki adımlı bir süreçten geçerek olgun ve işlevsel miRNA hâline gelirler

(Şekil 1). İlk adım nükleusta meydana gelir ve bir RNAz III olan Drosha ve çift zincirli RNA bağlama proteini olan DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8 (DGCR8-*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) tarafından gerçekleştirilir.^{15,16} Drosha pri-miRNA'nın her iki ipliğini de keserek pre-miRNA adı verilen yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda sap-ilmik formunda öncül molekülü oluşturur.¹⁶⁻¹⁸ Bu pre-miRNA'lar nükleer transport reseptörü ekspotin ve nükleer protein Ran-GTP aracılığıyla nükleustan sitoplazmaya taşınır.^{19,20} Son adımda bir RNAz III enzimi olan Dicer ve bir çift zincirli RNA bağlama proteini olan HIV-1 transaktive edici cevap oluşturan RNA bağlama proteini (TRBP-*transactivating response RNA binding protein*) tarafından pre-miRNA'nın sap-ilmik formunun bittiği bölgelerden kesilir.^{21,22} Sonuçta yaklaşık 22 nükleotid boyunda çift iplikli yapıda bir molekül oluşur. Bu molekülün bir ipliği miRNA, diğer ipliği ise pre-miRNA'nın diğer eşlenik kolundan türeyen dizidir. Çift iplikli RNA molekülü daha sonra RNA-indüklü susturma kompleksi (RISC-*RNA induced silencing complex*) adı verilen protein kompleksine



ŞEKİL 1: miRNA biyogenezi. miRNA'ları kodlayan genlerin transkripsiyonu RNA polimeraz II (RNA Pol II) tarafından nükleusta gerçekleştirilir. Oluşan transkriptte pri-miRNA adı verilir. Pri-miRNA'nın Drosha ve DGCR8 tarafından kesilmesi ile öncül molekül pre-miRNA oluşur. Pre-miRNA, eksportin-5 ve Ran-GTP aracılığı ile nükleustan sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada pre-miRNA, TRBP ve Dicer tarafından kesilir ve sonuçta bir zinciri miRNA, diğer zinciri ise miRNA'ya eşlenik diziyi barındıran çift zincirli molekül oluşur. Bu çift zincirli molekül RISC'e yüklenir ve çift zincirli molekülün açılmasıyla miRNA'ya eşlenik olan dizi kompleksten ayrılarak degrade olur. Çift zincirin açılmasıyla aktif hale gelen RISC, miRNA ve hedef arasındaki eşleniklik seviyesine bağlı olarak ya doğrudan hedef DNA dizisinin yıkımını gerçekleştirir ya da hedef mRNA'nın translasyonunu baskılar.

yüklenir.¹⁷ RISC, çift ipliğin açılmasıyla aktive olur. miRNA molekülü, kompleksi hedef mRNA'lara yönlendirirken, açılmış çift iplikli yapının diğer ipliği degrade olur.^{23,24} miRNA'lar hedef mRNA'ları ile farklı canlı türlerine ait aynı miRNA ailesinde yüksek oranda korunmuş ve tohum adı verilen 6-8 nükleotidlik bir bölge aracılığı ile etkileşirler.²⁵ Hedef ile miRNA'nın tohum dizisi (miRNA'nın 5' ucunun 2.-8. nükleotitleri) arasında eşleniklik olması hedefin belirlenmesi açısından çok önemlidir.²⁶ miRNA'lar hedef mRNA'ya kısmi veya tam eşleniklik göstererek bağlanabilirler. Hedef mRNA'nın translasyona uğramayan 3' bölgesi (3'UTR (-3'*untranslated region*) bölgesi ile miRNA tohum dizisi arasındaki eşlenikliğin seviyesi miRNA'nın hedefini hangi seviyede ve nasıl baskılayacağını belirler.²⁷ miRNA'ların hedef mRNA üzerinde bağlanma bölgeleri genellikle 3'UTR'dedir, ama 5'UTR'yi veya açık okuma çerçevesini (ORF-*open reading frame*) hedef aldıkları durumlarda da gen ifadesi baskılanır.²⁸ Eğer eşleniklik çok yüksek seviyede ise RISC hedef mRNA'ları degrade eder. Ayrıca bu durumda hedef mRNA'nın bozulumu da gerçekleşebilir. RISC'e yüklenmiş miRNA'lar aracılığı ile mRNA'ların poliA kuyruklarının ve 5'-cap yapılarının yok edilip mRNA bozulmasının tetiklendiği belirlenmiştir.²⁹ PoliA kuyruklarının ve 5' cap yapılarının yok olması sonucunda kararlılıkları azalan mRNA'lar hücrel enzimler tarafından parçalanır. Eğer genellikle memelilerde görüldüğü gibi eşleniklik daha az ise, hedef mRNA'dan protein oluşumu baskılanır.³⁰⁻³² Bu olayın mekanizması tam olarak belirlenmemiş olsa da hedef genin mRNA seviyesi artarken, protein seviyesinin değişmediği, dolayısıyla da baskılamanın translasyonel seviyede gerçekleştiği gösterilmiştir.^{33,34} Birçok çalışmada translasyonel seviyede düzenlemenin, translasyonun başlangıcında gerçekleştiği belirlenmiştir.^{31,32,35} miRNA-RISC kompleksinin çeşitli transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek protein translasyonunun başlangıç ve uzama aşamalarını engelliyor olması muhtemel gözükmektedir.³⁶

TÜMÖR BASKILAYICI VE ONKOGEN OLARAK miRNA'LAR

Birçok deneysel çalışma mikroRNA'ların yeni bir onkogen veya tümör baskılayıcı gen sınıfı oluştura-

bileceğini göstermiştir.³⁷ Tümörlerde gen ifadeleri artan miRNA'lar onkogenler olarak sınıflandırılabilir. Bu onkogen miRNA'lar onkomirler olarak bilinir ve tümör baskılayıcı genleri, hücre farklılaşmasını ve apoptozu kontrol eden genleri engelleyerek tümör oluşumunu tetiklerler. Diğer yandan, bazı miRNA'ların ifadesi kanserli hücrelerde azalmıştır. Bu miRNA'ların genel olarak tümör baskılayıcı işlevi gösterdiği düşünülebilir. Tümör baskılayıcı miRNA'lar tümör oluşumunu onkogenleri engelleyerek ve farklılaşmayı sağlayan genlerin aktivitesini artırarak engellerler. İlk keşfedilen miRNA olan let-7, aynı zamanda tümör baskılayıcı işlevi gösterdiği belirlenen ilk miRNA'lardandır. let-7'nin kanserlerde genellikle delesyona uğrayan bir kromozomal bölgede bulunması ve gen ifadesinin azalmasının onkojenik farklılaşma kaybına yol açtığı belirlenmesi let-7'nin tümör baskılayıcı etki gösteren bir miRNA olarak kabul edilmesine sebep olmuştur. Tümör baskılayıcı olarak işlev gösteren diğer miRNA'lardan miR-15a/16-1 grubunun,³⁸ kronik lenfotik lösemide anti-apoptotik gen bcl-2'yi hedef aldığı belirlenmiştir.³⁹

Let-7 gibi bazı miRNA'lar genel olarak tümör baskılayıcı işlevi gösterirken, bazıları da tümör dokularında normal dokulara göre daha fazla ifade edilir ve tümör baskılayıcı genleri hedef alarak onkojenik işlev gösterirler. Onkogen olarak işlev gösterdiği belirlenmiş miRNA'lardan işlev mekanizması diğerlerine nazaran iyi belirlenmiş olan miR-17-92 grubuna dâhil olan miRNA'lar, c-myc onkogeni aracılığı ile transaktive olurlar ve kemirgen modelleriyle gerçekleştirilen çalışmalarda lenfojenezi hızlandırdıkları belirlenmiştir.^{40,41} miR-155 grubuna dâhil olan miRNA'ların ise enflamasyonun düzenlenmesi ve immün cevap oluşumunda önemli rolleri vardır ve transgenik kemirgen modellerinde lösemiye tetikledikleri belirlenmiştir.⁴²⁻⁴⁴ miR-21'in ise çeşitli neoplazmlarda pTEN⁴⁶ ve PDCD4 gibi önemli tümör baskılayıcı genleri hedef aldığı belirlenmiştir.⁴⁶⁻⁴⁸

miRNom VE KANSER

miRNA'lar ve kanser arasındaki ilk bağlantı bazı miRNA'ların hücre büyümesini ve apoptozu düzenlediğinin belirlenmesi⁴⁹ ve bu miRNA'ların ba-

zılarının kanserle ilişkilendirilmiş gen bölgelerinde bulunduğu anlaşılmaması ile ortaya çıkmıştır. miRNA'ların karsinogenezde etkili olabileceklerinin anlaşılmasından sonra, birçok çalışmada farklı kanser türlerinde spesifik bir hücre tipinde ifade edilen miRNA'ların (miRNom) ifade seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. İlk olarak miRNom'un normal ve patolojik dokular arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir.⁵⁰ Bu farklılıkların incelenmesi ile gen ifadeleri üzerindeki kontrolün kalktığı miRNA'lar tespit edilerek, insan kanserlerinde etkili olan miRNA'lar ve patolojik rolleri belirlenebilir.^{51,52}

Takamizawa ve ark. akciğer kanseri üzerine yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarında, azalmış let-7 ifadesi gözlemlenmiştir. Azalmış let-7 seviyesi ameliyat sonrası kısalmış sağ kalım süresi ile ilişkilendirilirken, hastalığın evresi ile bağlantılı bulunmamıştır.⁶

Meme kanseri ile ilişkili olarak ise İorio ve ark. miRNA ifade modellerinin normal ve neoplastik meme dokusu arasında büyük farklılık gösterdiğini, özellikle miR-125b, miR145, miR-21 ve miR-155 mikroRNA'larının ifadelerinin meme kanseri dokusunda oldukça azalmış olduğunu gözlemlemişlerdir.⁵¹ Ayrıca normal ve kanserli meme dokusu arasında görülen miRNA ifade düzeyi farklılıklarının tümör seviyesi, çoğalma indeksi, östrojen ve progesteron reseptörü ifadesi ve vasküler invazyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Michael ve ark. kolonik adenokarsinoma ve normal mukozada miRNA ifade profillerini karşılaştırarak gen ifadesi seviyelerinde farklılık olan 28 miRNA belirlemiş ve miR-143 ve miR-145 ifadelerinin kolorektal neoplazinin adenomatöz ve kanser aşamalarında azalmış olduğunu belirlemişlerdir.⁵³

miRNA'ların ifade profillerinin belirlenmesi yalnızca karsinogenezde rol oynayan miRNA'ların belirlenmesi açısından değil, kanserlerin sınıflandırılması açısından da faydalıdır. Farklı dokulardan kökenlenen bir çok tümör, yalnızca miRNA ifade profillerine göre sınıflandırılabilir. Bu konuda yapılan ilk pilot çalışmada 129 miRNA'nın insan kanserlerini sınıflandırabileceği gösterilmiştir.⁵⁴ Bu

miRNA'ların kanser dokularında, normal dokulara nazaran özellikle az miktarda olduğu belirlenmiştir. Bu durum karsinogenezde miRNA ifadesinin baskılandığına işaret eder. Ayrıca miRNA profilleri tümörlerin gelişimsel kökenlerini ve farklılaşma derecelerini göstermesi açısından da bilgilendiricidir. Bu sebeple geniş anlamda miRNA'ların hücreleri daha farklılaşmış bir aşamaya götürdükleri ve bu miRNA'ların tümörlerde görülen ifade profillerinin normal dokularla karşılaştırılmasının bu hücrelerde farklılaşmanın derecesini gösterdiği düşünülebilir.

miRNA profillerinin belirlenmesinin mRNA profillerine göre avantajı, miRNA'ların mRNA profillerinin ayırt edemediği az farklılaşmış kanser tiplerini sınıflandırabilmesidir. Rosenfeld ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada miRNA ifade profilleri ile kanserin kökenlendiği dokunun doğru olarak tanımlanabildiği belirlenmiştir.⁵⁵ Dolayısıyla miRNA profillerinin, kökenlendiği dokusu bilinmeyen kanserlerin tanımlanması açısından büyük klinik önemi vardır. Rosenfeld' in çalışmasında 253 örnek miRNA mikroarray analizi ile incelenmiş ve 22 kanser tipi 48 miRNA ile %90'dan fazla doğrulukla sınıflandırılmıştır.⁵⁵

miRNA İFADESİNİN DÜZENLENMESİ: c-myc ve p53

Kanserlerde anormal miRNA ifadesinin altında yatan mekanizmaları anlayabilmek amacıyla miRNA'ların düzenlenme mekanizmalarını inceleyen çalışmaların sayısı artmaktadır. Yüz yetmiş beş insan miRNA promotörünün nükleozom pozisyonlanması ve mikroarrayde kromatin immünoprecipitasyon (CHIP on Chip-*chromatin immunoprecipitation on microarray*) ile incelendiği bir çalışmada, miRNA promotörlerinin yapısal açıdan mRNA promotörlerinden farklılık göstermediği belirlenmiştir.^{56,57} miRNA'ların promotör yapılarını ve ifadelerinin düzenlenmelerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaların sonucu olarak, miRNA'ların protein kodlayan genlerle aynı şekilde düzenlendikleri gösterilmiştir.

miRNA transkripsiyonunun kritik düzenleyicilerinden biri c-Myc genidir. Bir proto-onkogen olan c-Myc, heliks-ilmik-heliks lösin fermuar for-

munda bir transkripsiyon faktörüdür.⁵⁸ İnsan genlerinin %10-15'ini düzenleyerek hücre büyümesini ve apoptozu kontrol eder.⁵⁹ c-Myc geni ifadesi üzerindeki kontrolün kalkması protein kodlayan genlerin hem aktivasyonu hem de baskılanması ile ilişkilidir ve birçok kanser türünde görülen bir durumdur.⁶⁰ c-Myc geni aynı zamanda miRNA genlerinin transkripsiyonunu da düzenler.^{61,62} c-Myc, miRNA promotorlarında bulunan E-kutularına bağlanır ve miR-17-92 grubunun transkripsiyonunu tetikler.⁶¹ miR-17-92 kümesinin hücre döngüsü düzenleyicisi E2F1'i baskıladığı bilinen ve miR-17-5p ile miR-20'nin de dâhil olduğu toplam altı üyesi vardır. Tümörlerde görülen artmış c-Myc aktivasyonu tutarlı olarak, miR-17-92 genellikle tümörlerde yüksek oranda ifade edilir. c-Myc, miR-17-92 kümesinden miRNA'ların ifadesini artırmasının yanı sıra tümör baskılayıcı özellik gösteren miR-15a-19-34 gibi birçok miRNA'nın ifadesini de azaltır.⁶² Lenfoma hücrelerinde c-Myc tarafından ifadesi baskılanan miRNA'ların dışsal olarak ifadesinin sağlanmasının hücre büyümesinin azalmasına sebep olduğu belirlenmiştir. Bu durum c-Myc aracılı tümör oluşumunda, c-myc'nin bazı miRNA'ları baskılamasının önemli rol oynadığına işaret eder.⁶² ChiP analizleri bu baskılamının en azından kısmi olarak c-Myc'nin doğrudan miRNA promotoruna bağlanmasıyla gerçekleştiğini göstermiştir.⁶²

miRNA ifadesini bir transkripsiyon faktörü gibi etkilemese de, miRNA miktarını değiştirdiği belirlenen diğer bir protein ise p53'tür. DNA hasarının olduğu şartlarda aralarına miR-143 ve miR-16'nın da dâhil olduğu birçok miRNA'nın miktarı artar. p53'ten yoksun HCT116 hücrelerinde DNA hasarı koşullarında bu miRNA'ların miktarlarının artmadığı ve dolayısıyla p53'ün DNA hasarına cevap olarak artan miRNA'ların işlenmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir.⁶³ Koimmunopresipitasyon çalışmaları p53'ün Drosha ile bir kompleks halinde bulunduğunu ve *in vitro* ortama p53 eklenmesinin Drosha işlevini arttırdığını göstermiştir.⁶³ Bu sonuçlar Drosha ile p53 etkileşiminin ekstraselüler uyarıma hızlı miRNA cevabı oluşturmak için gerekli olduğuna işaret eder.

EPIGENETİK DÜZENLEME VE EPI-miRNA'LAR

miRNA genlerinin çoğu protein kodlayan genlerle aynı RNA polimeraz aracılığı ile transkribe olduğu ve promotor yapıları protein kodlayan genlerin promotorlarının yapısından farksız olduğu için, protein kodlayan genleri düzenleyen epigenetik kontrol mekanizmalarının⁶⁴ miRNA'ları da düzenliyor olması oldukça muhtemeldir. Bunu destekler şekilde, birçok kanser tipinde anormal miRNA ifadesinden epigenetik mekanizmaların sorumlu olduğu belirlenmiştir. Kanserde oldukça sık görülen bir durum olan aşırı metile olmuş tümör baskılayıcı genlere benzer şekilde miR-9-1, -193a, -137, -342, -203 ve -34b/c gibi birçok miRNA lokusunun çeşitli kanser tiplerinde hipermetile olduğu belirlenmiştir.^{65,66} Bunun yanı sıra, miRNA promotorlarının gelişim ve patojenez sırasında histon modifikasyonları tarafından da düzenlendikleri gösterilmiştir.

Meme kanseri hücre hattı SKBr3'ün histon de-asetilaz (HDAC) inhibitörü LAQ824 ile muamelesi sonucu 32 olgun miRNA ifadesinin önemli derecede azaldığı belirlenmiştir.⁶⁷ Mesane kanseri hücreleri hem DNA demetilasyon ajanı olan 5-aza-2'deoksisistidin hem de bir HDAC inhibitörü olan 4-fenilbütirik asit ile muamele edildiğinde tüm insan miRNA'larının %5'inin ifadesinin arttığı belirlenmiştir.⁶⁸ Bu çalışmada epigenetiği etkileyen kimyasallar yoluyla ifadesinin arttığı belirlenen miRNA'lar arasında bir CpG adacağı bölgesinde bulunan ve kanserlerde hem promotor metilasyonu hem de histon modifikasyonları ile susturulan miR-127'de vardır. Bu miRNA'nın dâhil olduğu gruba aynı zamanda miR-136, -431, -432, -433'de dâhildir. Ancak hücrelerin hem demetilasyon ajanı hem de HDAC inhibitörü ile muamele edilmesi durumunda yalnızca miR-127'nin ifadesinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca her iki ilacın da ayrı ayrı kullanılması durumunda miR-127 ifadesinde bir değişim görülmemiştir. Bu durum hem histon modifikasyonlarının hem de DNA metilasyonunun miR-127 ifadesini etkilediğini gösterir. Ayrıca miR-127'nin hedefinin onkogen bcl-6 olması ve bu miRNA'nın ifadesinin epigenetik olarak sustu-

rulmasının bcl-6 ifadesini tetiklemesi, miR-127'nin mesane karsinogenezine katkıda bulunduğuna işaret eder.

Kolorektal kanser hücre hattı HCT-116, *de novo* DNA metil transferazlar olan DNMT1 ve DNMT3b genleri çift nakavt (DKO-*double knock-out*) hâle getirilip, DKO ve yabancı tip hücrelerin miRNA ifade profilleri karşılaştırıldığında incelenen 320 miRNA'dan %6'sının ifadesinin DKO hücrelerde arttığı belirlenmiştir. Bu çalışma ile düzenlenme kontrollerinin kalktığı belirlenen miRNA'lardan yalnızca miR-124 kanser hatlarında metile, normal hücrelerde ise metile olmayan bir CpG adacağı bölgesinde bulunur. miR-127 doğrudan CDK6'yı hedef alır ve bu miRNA'nın ifadesinin tekrar sağlanması CDK6 miktarının düşmesine sebep olur. Ayrıca CDK6 aşağı efektörü olan proteinin fosforilasyonunu da etkiler.⁶⁹

Yine DNMT1 ve DNMT3 için çift nakavt hücrelerde normalde promotör hipermetilasyonu ile susturulmuş olan let-7-a3'ün ifadesinin arttığı gösterilmiştir.⁷⁰ Akciğer adenokarsinomu primer tümörlerinde ise let-7a-3 promotörünün normal doku promotörlerine göre hipometile olduğu ve bu durumun artmış onkojenik gen transkripsiyonuna sebep olduğu belirlenirken, epitel ovaryum kanserlerinde let-7a-3 promotörünün hipermetile olduğu belirlenmiştir.^{70,71}

Epigenetik mekanizmalarla kontrol edilen diğer bir miRNA, miR-1'dir. Hepatokarsinomlarda miR-1'in promotör hipermetilasyonu ile susturulduğu, fakat DNTM-null HCT-116 hücrelerinde miR-1'in hipometile olduğu ve tekrar ifade edildiği gösterilmiştir.⁷² DNTM3B-null hücrelerde ise hipometilasyon ve tekrar ifade belirlenmemiştir. Bu sonuçlar DNTM1'in bu miRNA'nın düzenlenmesinde önemli rol oynadığını gösterir.

Birçok çalışmada miRNA'ların metastaz ile ilişkili genleri etkileyerek metastatik süreci etkilediğinin gösterilmesi üzerine⁷³⁻⁷⁵ Lujambio ve ark., metastatik kanserlerde epigenetik faktörlerin miRNA ifadesini etkileyip etkilemediğini belirlemek üzere üç metastatik lenf nodu hücre hattını 5-aza-2'-deoksistidine maruz bırakarak mikroarray analizinin ardından CpG adası analizi ve bilsülfid

genom dizilemesi gerçekleştirerek üç miRNA'nın (miR-148a, miR-34b/c ve miR9) kanser spesifik hipermetilasyon gösterdiğini belirlemiştir.⁶⁶

Epigenetik inaktivasyon ile miR-148a ve miR-34b/c ifadesi tetiklendiğinde hücrelerin motilitesinin azalmasının yanı sıra, ksenograft modellerde hücrelerin metastatik potansiyellerinin inhibe olduğu ve c-Myc, E2F3, CDK6 ve TGIF2 gibi hedef onkojenik genlerin ifadelerinin azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca bu üç miRNA'nın promotör hipermetilasyonunun insan kanserlerinde metastaz ile ileri derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir.⁶⁶ miR-34b/c grubunun kolorektal kanserlerde normal kolon mukozasının kolorektal kanser tümörleri ile karşılaştırılması sonucu %90 oranında hipermetile oldukları belirlenmiştir.⁷⁶ miR-9 ve miR-148'in (miR-152, -124a ve -663 ile beraber) göğüs kanserinde epigenetik olarak susturulduğu ve 5-aza-2'-deoksistidin ile muamele edilen göğüs kanseri hücre hatlarında miR-9-1'in tekrar aktive olduğu belirlenmiştir.⁷⁷

Asetilasyon ve metilasyon gibi geçici düzenlemenin yanı sıra miRNA'lar ayrıca gen bölgelerinin damgalanması ile kalıcı epigenetik kontrole de maruz kalırlar. İki damgalanmış bölge H19 ve Dlk1-Gt2'nin miRNA kümeleri içerdiği belirlenmiştir.^{78,79} Farklı damgalama modellerinin normal gelişim için gerekli olduğu bilindiğinden, bu miRNA'ların gelişim sırasında henüz belirlenmemesi bir rolleri olması muhtemeldir.

Bazı miRNA'lar epigenetik mekanizmalarla kontrol edilirken, bazıları da doğrudan veya dolaylı olarak epigenetik mekanizmada rol oynayan faktörleri hedef alırlar. Bu miRNA'lara epi-miRNA adı verilmiştir. Ayrıca bazı epi-miRNA'ların ifadelerinin epigenetik olarak kontrol ediliyor olması bir geri besleme döngüsü oluşturarak epigenetik mekanizmalar ve miRNA'lar arasındaki düzenlenme ilişkisini daha da karmaşıklaştırır.

Epi-miRNA'ların varlığı ile ilgili ilk kanıt akciğer kanseri hücrelerinde bir miRNA ailesinin (miR-29a, -29b ve 29c) DNTM3a ve DNTM3b'yi hedef aldığı belirlenmesiyle elde edilmiştir.⁸⁰ miR-29'ların ifadesinin tetiklenmesinin *de novo* DNA metilasyonunu bozarak kanser hücrelerinde genel

DNA hipometilasyonuna sebep olduğu belirlenmiştir. Ayrıca akciğer kanserinde promotör hipermetilasyonu ile epigenetik olarak susturulan tümör baskılayıcı genlerin miR-29'lar ile muameleden sonra promotörlerinde gerçekleşen CpG adacığ demetilasyonunun sonucu olarak tekrar ifade edildikleri ve dolayısıyla kanserli hücrelerin apoptoza gittiği ve büyümelerinin inhibe olduğu belirlenmiştir.⁸⁰ Bu keşif daha önce bilinmeyen bir mekanizmayı ortaya çıkartmış, miRNA'ların epigenetik süreci doğrudan etkileyerek gen ifadesini dolaylı olarak düzenledikleri anlaşılmıştır. Muhafaza DNA metil transferazı olan DNTM1, *de novo* DNTM'lerin yokluğunu telafi edebileceği için miR-29'lar ile muamele edilmiş hücrelerde genel hipometilasyon gözlenmesi, bu miRNA ailesinin DNMT1 aktivitesini etkiliyor olabileceğine işaret eder. Bu sonuçlar ile tutarlı olarak akut myeloid lösemi hücrelerinde miR-29b'nin DNTM3a ve DNTM3b'nin yanı sıra DNTM1 geninin transaktivatörü olan SP1'i doğrudan etkileyerek DNTM1'i dolaylı olarak susturduğu belirlenmiştir.⁸¹ DNTM3b ifadesi aynı zamanda miR-148a ve miR-148b'nin kontrolü altındadır. miR-148 grubu, DNTM3b mRNA'sında kodlayıcı bölgeye bağlanarak bu *de novo* DNTM'i düzenler. Ayrıca DNTM3b'nin çeşitli kırılma varyantlarının dan sorumlu olması muhtemeldir.⁸²

Fare embriyonik kök hücrelerinde miR-290 grubunun doğrudan bir DNTM3 inhibitörü olan RBL2'yi hedef aldığı gösterilmiştir.^{83,84} miR-290 grubunun Dicer'dan yoksun embriyonik kök hücrelerde ifade edilmediği, RBL2'nin ise aşırı ifade edildiği ve bunun sonucu olarak *de novo* metilasyon yolunun bozulduğu belirlenmiştir. Bu durum artmış telomer rekombinasyonuna ve aşırı telomer uzamasına sebep olur. Bu etkiler miR-290 grubunun tekrar ifade ettirilmesi ile tersine dönmüştür.^{83,84} İlginç bir şekilde Dicer geni nakavtından sonra HEK293 hücrelerinde miR-290 grubunun *de novo* DNTM'ler üzerinde hiçbir etkisi gözlemlenmemiştir. Bu durum miR-290'ların DNTM3'ler üzerindeki etkilerinin hücreye veya türe spesifik olabileceğini gösterir.⁸⁴

Epi-miRNA'lar HDAC'ların ve polikomb represif kompleks genlerinin de ifadelerini kontrol ederler. HDAC4 hem miR-1'in hem de miR-140'ın

hedefidir,^{85,86} miR-449a ise HDAC1'in 3'UTR bölgesine bağlanır.⁸⁷ HDAC1'in bazı kanserlerde ifadesi artar ve miR-449'un prostat kanseri hücrelerinde tekrar ifade ettirilmesi HDAC1 miktarının azalmasını sağlayarak hücre döngüsünün durmasını ve apoptozu tetikler.⁸⁷ EZH2 polikomb represif kompleks 2'nin katalitik alt birimidir ve histon H3 lizin 27'yi trimetilleyerek heterokromatin oluşumundan ve dolayısıyla birçok tümör baskılayıcı genin susturulmasından sorumludur. Varambally ve ark. prostat kanseri hücre hatlarında ve primer tümörlerde miR-101 ifadesinin EZH2 seviyelerindeki artışla ilişkili bir şekilde azaldığını göstermişlerdir.⁸⁸ miR-101'in bir epi-miRNA olduğuna işaret eden bu bulgular miR-101'in hem prostat hem de mesane kanseri modellerinde EZH2'yi doğrudan hedef aldığı gösterilmesiyle kanıtlanmıştır.^{88,89} Ayrıca EZH2'nin miR-101 ile baskılanmasının kanser hücrelerinin çoğalmasını ve koloni oluşumunu engellediği belirlenmiştir.⁸⁹ miRNA'ların, protein kodlayan genlere benzer şekilde epigenetik düzenlemeye maruz kaldığının ve epi-miRNA'ların epigenetik mekanizmada rol alan etkenleri düzenlediklerinin belirlenmesiyle gen düzenlenmesi mekanizmaları daha da karmaşık bir hâle gelmiştir. İnsan genomunun nasıl düzenlendiğinin anlaşılabilmesi ve karsinogeneze katkıda bulunan gen ifadesi değişimlerinin belirlenmesi ve düzeltilebilmesi için bu mekanizmaların daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

■ mikroRNA HEDEFLERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN KULLANILAN BİYİNFORMATİK ARAÇLAR

miRNA dizisi ile hedef mRNA dizisinin birbirlerine tam olarak eşlenik olmaması miRNA hedef genlerinin belirlenmesini oldukça zorlaştırır da son birkaç yılda miRNA hedeflerinin belirlenmesi amacıyla birçok biyoinformatik araç geliştirilmiştir. Bu programlar spesifik baz çifti oluşumu kurallarına ve muhtemel 3'UTR tanıma bölgelerinin belirlenmesi için korunum analizlerine dayanırlar. Yalnızca baz çifti oluşumu kurallarına dayalı programlar genellikle büyük oranlarda yanlış-pozitif sonuç verirler. Bu yanlış-pozitif sonuçların oranı sonuçların yalnızca diğer canlılarda korunmuş olan

dizilerle sınırlandırılmasıyla azaltılabilir.⁹⁰ Aşağıda sıralanan kriterler kullanılarak miRNA hedefleri ile ilgili olarak biyoinformatik programları ile elde edilen sonuçların geçerliliği artırılabilir: i) miRNA-lar hedefle ya 5' ucunda 2.-8. nükleotidler boyunca (kök dizi) yüksek oranda eşleniklik gösterirler ve hedefe olan benzerlik miRNA'nın 3' ucuna doğru geri kalan kısmında daha azdır; ya da 3'ucu hedefe büyük oranda eşlenikken 5' ucu ile çok daha az oranda eşleniklik gösterir.⁹¹ ii) G:U çiftleri enerjetik açıdan stabil olmalarına rağmen miRNAların hedefe bağlanmasını bozarlar.⁹²

miRNA'ların hedeflerinin belirlenmesinde kullanılan algortimaların üçü en sık kullanılan programlardır. Bunlar, PicTar,⁹³ Target-Scans²⁶ ve miRanda⁹⁴ dır. PicTar, 5' uçta birinci veya ikinci nükleotitten başlayarak 7 nükleotidin (kök dizinin) hedefe tam olarak eşlenik olması prensibine dayanır. Daha sonra tam olarak eşlenik olmayan kök diziler için miRNA:hedef bağlanmasının serbest enerjisi hesaplanır. Enerji eşik değerleri girilip serbest enerji açısından muhtemel olmayan sonuçlar elendikten sonra birkaç organizmada evrimsel korunuma bağlı olarak en muhtemel doğru sonuçlar belirlenir. TargetScanS miRNA'nın 5' ucunda 2. ve 8. nükleotitler arasındaki dizi ile hedef arasında tam eşlenikliğe göre kök dizi bağlanma bölgelerini beş organizmada (insan, şempanze, köpek, fare ve tavuk) korunmuş olan dizilere dayanarak belirler. MiRanda ise tam eşlenik kök dizi varlığına dayanmaktan ziyade modifiye edilmiş farklı bir yaklaşım dayalı olarak çalışır.

Biyoinformatik algoritmalar yüzlerce tahmini miRNA hedefi belirlese de bu şekilde belirlenmiş hedeflerin geçerliliğinin anlaşılması için deneysel bilgilere gerek vardır. Ama birçok miRNA gen ifadesini mRNA seviyesinde değil, yalnızca protein seviyesinde etkiler. Hedef proteinlere dair bilgiler miRNA dizileri ile beraber kullanılarak çok daha etkin miRNA hedef tahmini gerçekleştirilebilir. Yakın zamanda Huang ve ark. mikroRNA'lar ile beraber cDNA ifade profillerine dair verileri insan miRNA hedeflerinin belirlenmesi amacıyla Bayesian analiz algoritmasıyla bütünleştirmişler ve 104 insan mikroRNA'sı için 88 doku ve hücre tipinde

RNA ifade verileri ile desteklenen 1597 tahmini hedef belirlemişlerdir.⁹⁵ Tahmini miRNA hedeflerinin geçerliliğini belirlemek için en sık başvuru olan yöntem 3'-UTR bölgelerine mRNA üzerindeki tahmini miRNA bağlanma dizisinin lusiferaz rapörtörlerine klonlanması ve ifadelerinin ölçülmesidir. Ancak bu metod çok verimli değildir ve miRNA'nın muhtemel hedef dizisi esasen dâhil olduğu mRNA dizisinden çıkartılarak yalnızca kısa bir dizi hâlinde vektöre klonlandığı için gerçek fizyolojik durumu yansıtmayabilir.

SONUÇ

On beş yıl önceki keşiflerinden bu yana miRNA'ların biyosentezi ve işlev mekanizması hakkında oldukça fazla bilgi edinilmiştir. miRNA'ların düzenlenmesindeki bozukluklar birçok kanser tipiyle ilişkilendirilmiş, miRNA ifadesi profillerinin tanı ve tedavide faydalı kriterler sağlayacağı öngörülmüştür. Ayrıca kanserlerde bozuk düzenlenen birçok miRNA'nın apoptotik süreçlerde rol oynadığının belirlenmesiyle tümör oluşumunda ve sitotoksik muameleye hassasiyette miRNA'ların etkili olduğu belirlenmiştir. MikroRNA'lar hakkında elde edilen bunca bilgiye rağmen kanserde tanı ve tedavi amaçlı kullanımlarının pratikte uygulanabilmesi için mikroRNA üretiminde ve işlenmesinde rolü olan tüm enzim ve proteinler biliniyor mu, kök dizi eşlenikliği dışında miRNA'ların hedeflerini tanımasında etkili olan faktörler nelerdir, miRNA'ların transkripsiyonu tam olarak nasıl düzenleniyor gibi soruların cevaplanması gerekmektedir.

Yine de miRNA aracılı tedaviye yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Özellikle karsinogenezde değişmiş miRNA ifadesinin etkili olduğunun anlaşılmasından sonra miRNA ifadesini etkileyebilen küçük molekülleri belirlemek ve terapötik moleküller olarak kullanımlarını incelemek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda belirlenen moleküllerden biri RISC'in miRNA ve hedefe bağlanmasını arttıran Enoxacin'dir. Enoxacin, miRNA aracılı baskılamayı arttırıcı etki gösterir. Bu durum tümör baskılayıcı etki gösteren ve sitotoksik kanser tedavilerine hassasiyeti artırdığı belirlenen let-7

gibi miRNA'ların⁹⁶ ifadesini artırarak karsinogenezi olumsuz etkilese de bazı miRNA'ların özellikle de onkogen etki gösteren miRNA'ların baskılanması tedavi aşamasında faydalı olabilir. Tedavi amacıyla miRNA inaktivasyonunun gerçekleştirilebilmesi için en uygun yöntem kilitli nükleik asitlerin (LNA-*locked nucleic acid*) kullanımını gibi gözükmektedir. Bu moleküller kanser

tedavisinde kullanılan diğer moleküllerden hem daha stabil hem de daha az toksiktirler.

Tedaviye yönelik adımlar şimdiden atılmış olsa da, gelecekte bu uygulamaların geliştirilebilmesi için miRNA'ların nasıl düzenlendiklerinin, hedeflerini nasıl belirlediklerinin ve biyogenezlerinin çok daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008;455(7209):58-63.
- Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008;455(7209):64-71.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000;403(6772):901-6.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293(5531):834-8.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001;294(5543):858-62.
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004;64(11):3753-6.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martin-dale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000;408(6808):86-9.
- Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 2004;5(3):R13.
- Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA* 2008;14(1):35-42.
- Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* 2005;123(6):1133-46.
- Bussing I, Slack FJ, Grosshans H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol Med* 2008;14(9):400-9.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(9):2999-3004.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004;10(12):1957-66.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002;21(17):4663-70.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004;18(24):3016-27.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425(6956):415-9.
- Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:175-205.
- Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(5):376-85.
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004;10(2):185-91.
- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004;303(5654):95-8.
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005;436(7051):740-4.
- Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 2001;15(20):2654-9.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000;404(6775):293-6.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115(2):199-208.
- Karginov FV, Conaco C, Xuan Z, Schmidt BH, Parker JS, Mandel G, et al. Biochemical approach to identifying microRNA targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(49):19291-6.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003;115(7):787-98.
- Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002;297(5589):2056-60.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120(1):15-20.
- Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2006;103(11):4034-9.
- Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 2006;21(4):533-42.
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 2005;309(5740):1573-6.
- Wang B, Love TM, Call ME, Doench JG, Novina CD. Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol Cell* 2006;22(4):553-60.

33. Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 1999;216(2):671-80.
34. Wightman B, HA I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993;75(5):855-62.
35. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(47):16961-6.
36. Nissan T, Parker R. Computational analysis of miRNA-mediated repression of translation: implications for models of translation initiation inhibition. *RNA* 2008;14(8):1480-91.
37. Lotterman CD, Kent OA, Mendell JT. Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways. *Cell Cycle* 2008;7(16):2493-9.
38. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(13):5166-71.
39. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(39):13944-9.
40. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernandez-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005;435(7043):828-33.
41. Mendell JT. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 2008;133(2):217-22.
42. Costinean S, Zaneni N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(18):7024-9.
43. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* 2007;179(8):5082-9.
44. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 2007;316(5824):604-8.
45. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006;6(3):184-92.
46. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008;27(15):2128-36.
47. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH, et al. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2008;283(2):1026-33.
48. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133(2):647-58.
49. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 2005;33(4):1290-7.
50. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome* 2006;17(3):189-202.
51. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65(16):7065-70.
52. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med* 2005;353(17):1793-801.
53. Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003;1(12):882-91.
54. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834-8.
55. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol* 2008;26(4):462-9.
56. Oszolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* 2008;22(22):3172-83.
57. Corcoran DL, Pandit KV, Gordon B, Bhattacharjee A, Kaminski N, Benos PV. Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS ONE* 2009;4(4):e5279.
58. Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach. *Genes Dev* 2008;22(20):2755-66.
59. Çitak EÇ. [Apoptosis and cancer]. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2000;9(3):183-91.
60. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 2008;8(12):976-90.
61. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005;435(7043):839-43.
62. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 2008;40(1):43-50.
63. Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 2009;460(7254):529-33.
64. Sayin DB. [Methylation and cancer]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2008;28(4):513-24.
65. Lujambio A, Esteller M. How epigenetics can explain human metastasis: a new role for microRNAs. *Cell Cycle* 2009;8(3):377-82.
66. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, Blanco D, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(36):13556-61.
67. Scott GK, Mattie MD, Berger CE, Benz SC, Benz CC. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res* 2006;66(3):1277-81.
68. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006;9(6):435-43.
69. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007;67(4):1424-9.
70. Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, Mund C, Musch T, Sültmann H, et al. The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res* 2007;67(4):1419-23.
71. Lu L, Katsaros D, de la Longrais IA, Sochirca O, Yu H. Hypermethylation of let-7a-3 in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor-II expression and favorable prognosis. *Cancer Res* 2007;67(21):10117-22.
72. Datta J, Kutay H, Nasser MW, Nuovo GJ, Wang B, Majumder S, et al. Methylation mediated silencing of microRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 2008;68(13):5049-58.
73. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, et al. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nature Cell Biol* 2008;10(2):202-10.
74. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007;449(7163):682-8.

75. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008;451(7175):147-52.
76. Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008;68(11):4123-32.
77. Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Muller M, Romermann D, Laenger F, et al. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol* 2008;214(1):17-24.
78. Cai XZ, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* 2007;13(3):313-6.
79. Seitz H, Royo H, Bortolin ML, Lin SP, Ferguson-Smith AC, Cavaille J. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain. *Genome Res* 2004;14(9):1741-8.
80. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(40):15805-10.
81. Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CE, Callegari E, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene re-expression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood* 2009;113(25):6411-8.
82. Duursma AM, Kedde M, Schrier M, le Sage C, Agami R. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA* 2008;14(5):872-7.
83. Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, Munoz P, Gonzalez S, Schöftner S, et al. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15(3):268-79.
84. Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Berninger P, Gaidatzis D, Mohn F, Artus-Revel CG, et al. MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15(3):259-67.
85. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006;38(2):228-33.
86. Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, Waters J, Hajjhosseini MK, Clark I, et al. The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett* 2006;580(2):4214-7.
87. Noonan EJ, Place RF, Pookot D, Basak S, Whitson JM, Hirata H, et al. miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. *Oncogene* 2009;28(14):1714-24.
88. Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, et al. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 2008;322(5908):1695-9.
89. Friedman JM, Liang G, Liu CC, Wolff EM, Tsai YC, Ye W, et al. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Res* 2009;69(6):2623-9.
90. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2004;2(11):e363.
91. Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet*. 2006;38(Suppl):S8-13.
92. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005;3(3):e85.
93. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005;37(5):495-500.
94. Kiriakidou M, Nelson PT, Kouranov A, Fitziev P, Bouyioukos C, Mourelatos Z, et al. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* 2004;18(10):1165-78.
95. Huang JC, Babak T, Corson TW, Chua G, Khan S, Gallie BL, et al. Using expression profiling data to identify human microRNA targets. *Nat Methods* 2007;4(12):1045-9.
96. Weidhaas JB, Babar I, Nallur SM, Trang P, Roush S, Boehm M, et al. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res* 2007;67(23):11111-6.