

## Onkogen ve Tümör Supressör Gen Olan miRNA'ların Özellikleri ve Kullanım Alanları

*Doktora Öğrencisi G.Şeyda SEYDEL  
Prof.Dr. Kıymet AKSOY*

### 1. Kodlanmayan RNA'lar

Kodlanmayan RNA'lar, RNA olarak aktif olan bunun yanında proteine dönüşmeyen RNA'lardır. Herbir sınıfı küçük bir grup gen tarafından kodlanmaktadır. Ağırlıklarına ve işlevlerine göre 3 sınıfa ayrılırlar. Kodlanmayan RNA'ların ekspresyon düzeyleri kanser ve nörolojik hastalıkların tanısında ve hastalığın tiplendirilmesinde kullanım alanı bulmuştur. Çok sayıda farklı işlevleri olan kodlanmayan RNA bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; snRNA (small nuclear RNA)lar RNA transkriptlerin işlenmesinde ve intronların uzaklaştırılmasında, snoRNA (small nucleolar RNA)lar rRNA'nın olgunlaşmasında, siRNA (small interfering RNA)lar ve miRNA (microRNA)lar ise gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, piRNA (piwi interacting RNA)lar gametogenesisde ve tmRNA(transfer mRNA)lar ribozomların kırık mRNA'lardan arındırılmasında görev alırlar<sup>1</sup>.

### 2. miRNA'ların Genel Özelliği

mikroRNA'lar (miRNA's) yaklaşık 20-25 nükleotid uzunluğunda, endojen olan küçük RNA'ların (small RNA) bir sınıfını oluşturmaktadır. Bitki ve hayvan genomlarının protein kodu oluşturmayan bölgelerinden kodlanırlar<sup>2</sup>.

miRNA'lar hedef mRNA'daki komplementine göre ya hedef mRNA'ların 3'UTR bölgelerine bağlanarak translasyonel baskılama yaparlar ya da hedef mRNA'yı keserek gen ekspresyonunu azaltarak düzenleme işlevi görürler<sup>2</sup>.

miRNA'ların, insan genlerinin %30'undan fazlasını düzenlediği tahmin

---

\*Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, ADANA

edilmektedir<sup>3</sup>. Farede, insanda, Drosophilada, C.elegans ve Arabidopsis'de çok sayıda miRNA tarif edilmiş olup insanda tarif edilmiş miRNA genlerinin sayısı 500'den fazladır. Çoğu miRNA'lar organizmanın her yerinde eksprese edilirken, bazıları embriyonik gelişim sürecinde dokuya spesifik ekspresyon özelliği gösterirler. miRNA'ların yaklaşık % 60'ı bağımsız eksprese edilirken, %15'i kümeler halinde ve % 25'ide intronlarda eksprese edilirler<sup>2,3,4,5</sup>.

### 3. miRNA'ların Tarihçesi

miRNA'lar ilk olarak 1990'lı yılların başlarında, nematod türü bir solucan olan *Caenorhabditis Elegans*'ların gelişimi üzerine yapılan genetik taramalar sırasında Ambros ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır<sup>3</sup>. İlk keşfedilen miRNA, lin-4'tür. Lin-4'ün hedefe spesifik translasyonel inhibisyona neden olması gelişme süresinde gen düzenlenmesindeki yeni bir mekanizma olabileceğini düşündürmüştür. Lin-4'ün tanımlanmasından 7 yıl sonrada diğer bir miRNA olan let-7'ün, *C.elegans*'ın gelişmesindeki düzenleyici işlevi olduğu gösterilmiştir<sup>3</sup>.

### 4.miRNA'nın Biyogenezi

Hayvanlarda olgun miRNA'nın oluşumu 2 basamakta gerçekleşmektedir.

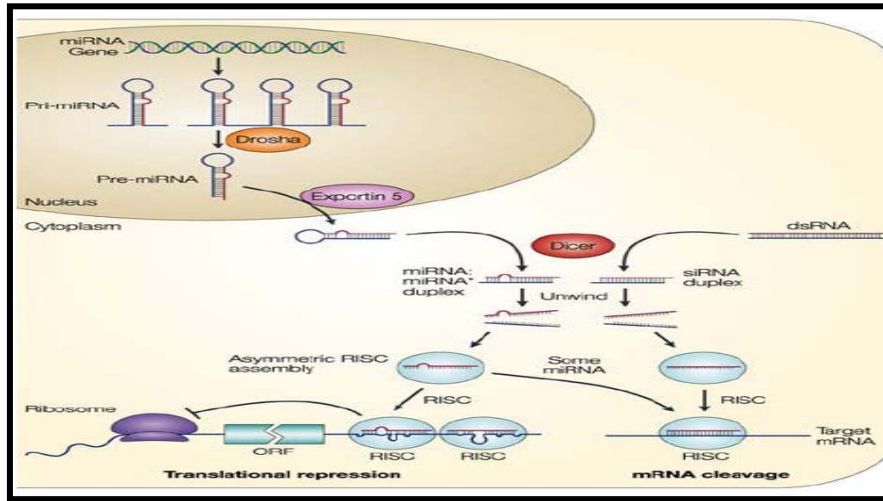
1. miRNA transkriptinin (pri-miRNA), 70 nükleotid uzunluğundaki prekürsöre (pre-miRNA) dönüşmesiyle
2. Pre-miRNA prekürsörünün 21-25 nükleotid uzunluğundaki olgun miRNA'yı oluşturması için kesilmesiyle oluşur<sup>3</sup>.

İlk basamakta miRNA geni RNA polimeraz II enzimi tarafından pri-miRNA'ya dönüştürülür. Pri-miRNA'ların transkripsiyonel düzenleme üzerindeki etkileri hakkında bilgiler yeterli olmayıp birkaç kilobaz uzunluğundadırlar ve genellikle 5'ucunda şapka, 3' ucunda poli-A ucuna sahiptirler ve protein kodlayan mRNA'lara benzerlik gösterirler. Bu RNA'lar ORF (open reading frame) içersin ya da içermesinler kesilirler vede poliadenil kuyruğu takılırken lop özelliği gösterirler<sup>2,6,7</sup>.

Pri-miRNA'lar, nükleusta RNAaz III endonükleaz enzimi olan Drosha ve

gerekli bir kofaktör olan DGCR8/ PASHA tarafından kesilerek 60-70 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA'ya dönüştürülür. Drosha enzimi başlıca nükleusta yer alır, kesim bölgesinin 3' ucunda 2 nükleotid uzunluğunda çıkıntıya sahiptir. dsRNA bağlayıcı domain ve amino terminal domain olmak üzere iki domain içerir. Drosha enzimi tarafından kesim olduktan sonra pre-miRNA'lar nükleustan sitoplazmaya Exportin 5 (Exp-5-Ran transport reseptor ailesinin bir üyesi) ile taşınırlar<sup>2,6,7</sup>.

Sitoplazmaya geçen pre-miRNA'lar, ikinci bir RNAaz III endonükleaz enzimi olan Dicer tarafından ds-miRNA'lara dönüştürülür. Dicer enziminde helikaz domaini, DUF 283 domain, PAZ (Piwi, Argonaute- Zwillie) domaini ve RNAaz III domaini olmak üzere üç domain içerir. miRNA dubleksleri, helikaz enzimi tarafından olgun miRNA'ya dönüştürülür. Olgun miRNA'da, RISC (RNA induced silencing complex) olarak adlandırılan geniş bir protein kompleksiyle etkileşime girerek mRNA kesimini ve translasyonunu inhibe ederek mRNA'ların baskılanmasını yönetirler<sup>2,6,7</sup> (Şekil 1).



Şekil 1. miRNA'nın biyogenezi

### 5. miRNA'ların İşlevleri

Hayvanlarda ve bitkilerde önemli düzenleyici işlevleri vardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, miRNA'ların translasyonu baskılayarak yada mRNA'yı keserek genlerin ekspresyonunu sağladıkları gösterilmiştir. Bunun yanı sıra bazı mRNA'ların hücre proliferasyonunda, gelişmesinde, farklılaşmasında, kök hücrenin yenilenmesinde, hücre stres yanıtlarında ve apoptozis gibi çok önemli olaylarda düzenleyici olarak işlev gördükleri gözlenmiştir. Ayrıca bazı miRNA'ların onkogen ya da tumor baskılayıcı olarak da işlev gördükleri saptanmıştır<sup>2,3,4</sup>.

### 6. miRNA'nın Kansere İlişkisi

Çeşitli deneyler ve klinik analizler miRNA'ların, onkogenlerin ve tümör supresör genlerin yeni bir sınıfı olarak işlev gördüklerini kanıtlamıştır. miRNA'ların %50'den fazlasının kansere ilişkili genomik alanlarda ya da kolay kırılabilen bölgelerde yer aldıkları gösterilmiştir<sup>2,8,9</sup>. C.Elegans (lin-4) ve Drosophila canlılarında (bantam, miR-14, miR14-2,6,11,13,308) tanımlanan ilk miRNA'ların bazılarının kansere ilişkili yollarda işlev gördükleri gösterilmiştir<sup>9</sup>. miRNA'ların kanserde rol oynadığını gösteren ilk kanıtlar Croce ve arkadaşları tarafından kronik lenfositik lösemi (CLL)'nin moleküler patogenezi çalışılırken gösterilmiştir. miRNA'ların tümör supresörü gibi davranarak onkogenleri inhibe ettikleri veya tam tersi olarak onkogen gibi hareket ederek tümör supresörleri inhibe ettikleri gösterilmiştir<sup>2,9</sup>.

Kanserde herhangi bir genin tek başına incelenmesi yerine, gen ekspresyonunun genel analizi, tanı açısından önem kazanmıştır. DNA mikrodizinlerinin kullanımı, onbinlerce genin aynı anda incelenmesine olanak vermiştir. Farklı tümörlerin gen ekspresyon profillerini kıyaslamak suretiyle, moleküler bir sınıflama yöntemi geliştirilmiştir. Bu tür çalışmalar, gen ekspresyon profillerinin, başka bakımdan benzerlik gösteren tümörleri birbirinden ayırabildiğini ve hastalığın klinik seyri ya da tedaviye cevabı açısından bilgi verdiğini göstermektedir. Son zamanlarda kanser çalışmalarında miRNA'ların ekspresyon düzeyleri normal hücrenin miRNA'sı

ile mukayese edilerek yeni bir yaklaşım oluşturulmuştur<sup>2,9</sup>.

Kanserde miRNA'nın az eksprese olması tümör baskılayıcı olarak işlev görebildiğini onkogen veya hücre farklılaşmasını ya da apoptozisi kontrol eden genleri düzenleyerek kanseri engelleyebileceğini düşündürmüştür. Kanserde miRNA'nın aşırı eksprese olması, onkogen olarak işlev gösterdiğini ve apoptozisi kontrol eden genleri ya da tümör baskılayıcı genleri negatif olarak düzenleyerek kanser gelişmesinde rol oynadığı ve bu bilgilerin tedavide kullanılabileceğini göstermiştir<sup>9</sup>.

Kanser patolojisinde miRNA'nın işlevlerini çalışmak için up ya da down miRNA'nın ekspresyonunu düzenlemek önem kazanmıştır. Kanser patolojisinde miRNA'nın işlevi çalışılırken antisens inhibitörler, transgenikler, spesifik promotorlar, real time PCR ve miRNA mikroarray gibi çeşitli yöntemler kullanılmaya başlanmıştır<sup>2,10,11</sup>.

### **7. Onkogen Olarak İşlev Gösteren miRNA'lar**

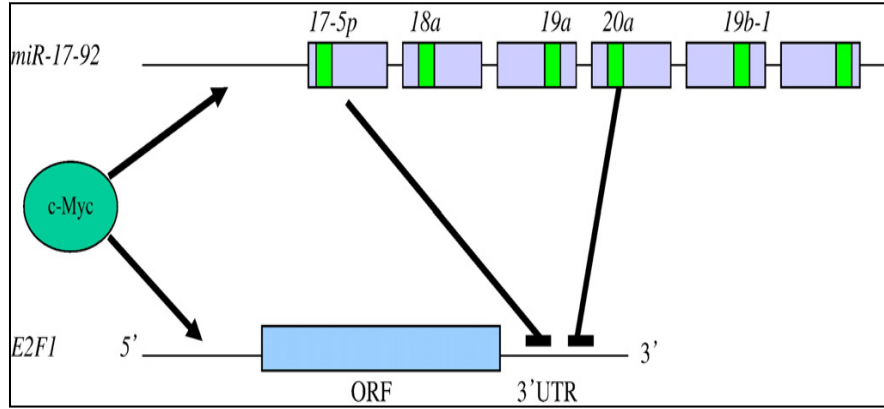
Kanserlerde, ekspresyonları artan miRNA'lar onkogen olarak adlandırılmaktadır. Bu onkogen miRNA'lar "onkomirs" olarak tanımlanmaktadır. Onkogenler, gen ekspresyonunu hızlandıran ya da kodladıkları proteinlerde kontrolsüz aktivite artışına neden olan genetik değişikliklerin sonucunda anormal hücre çoğalmasına neden olurlar. Bu genler nokta mutasyonu, kromozom yapısındaki translokasyon, duplikasyon ve delesyon gibi anomalik değişimler sonucunda oluşurlar (Tablo 1). Onkogen olarak işlev gösteren miRNA'lar tümör süpresör genleri yada hücre farklılaşmasını veya apoptozisi kontrol eden genleri negatif yönde etkileyerek tümörün gelişmesini teşvik ederler. Pekçok miRNA geni farklı kanserlerde aşırı derecede ekspresyona uğramaktadırlar. Ancak bugüne kadar bunlardan sadece birkaç tanesi çok iyi tanımlanabilmiştir<sup>2,12</sup>.

**Tablo.1. Onkogenlerin aktivasyon şekilleri**

Onkogen	Kanser türü	Aktivasyon şekli
Abl	Kronik miyeloid lösemi, Akut lenfositik lösemi	Translokasyon
Akt	Meme, over, pankreas karsinomu	Amplifikasyon
bcl-2	Foliküler B hücreli lenfoma	Translokasyon
erbB-2	Meme ve over karsinomu	Amplifikasyon
Gli	Glioblastom	Amplifikasyon
Gsp	Hipofiz ve tiroid tümörleri	Nokta mutasyonları
C-myc	Burkitt lenfoması	Translokasyon
C-myc	Meme ve akciğer karsinomu	Amplifikasyon
L-myc	Akciğer karsinomu	Amplifikasyon
N-myc	Nöroblastom, akciğer karsinomu	Amplifikasyon
Ras H	Tiroid karsinomu	Nokta mutasyonları
Ras K	Barsak, akciğer, pankreas ve tiroid karsinomu	Nokta mutasyonları
Ras N	Akut miyeloid ve lenfositik lösemiler, tiroid karsinomu	Nokta mutasyonları

### 7.1. miR 17-92 Geni

miR 17-92 geni onkogenik işlev gösteren miRNA'lar için iyi bir örnektir. 13q31 kromozomunda yer alan polisistronik miRNA'dır. 13q31 lokusu akciğer kanseri ve lenfomanın çeşitli türlerinden amplifiye edilmiştir. miR-17-92 ekspresyonu, normal dokulara göre kıyaslanırsa akciğer kanseri ve lenfoma içeren özellikle onların en agresif formu olan küçük akciğer kanseri ve insan B hücre lenfomasında artış göstermektedir. İki tumor baskılayıcı gen olan PTEN ve RB 2'yi hedefleyerek bu genlerin inaktive olmasını sağlarlar<sup>2,12,13</sup> (Şekil 2).



Şekil 2. miR 17-92' nin fonksiyonu.

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten): 10q23 bölgesinde bulunan bir TSG'dir. 13 k-Akt-PKB yolu üzerinden apoptozisi uyarır. Bu gen bir fosfatı kodlar ve bu enzim tümör büyümesinde rol alan protein kinazları antagonize ederek görev yapar. Pten proteini, fosfatidilinositol 3,4,5-bisfosfat(PIP3) gibi, fosfatidilinositidlerin 3.pozisyonundaki fosfatı uzaklaştıran bir lipid fosfatazdır. PTEN proteininin inaktivasyonu ya da ortadan kalkması, PIP3 düzeyinin artmasına, Akt'ın aktivasyonuna ve programlı hücre ölümünün engellenmesine neden olarak tümör gelişmesini hızlandırır<sup>2,12,13</sup>.

Retinoblastoma geni (RB): İlk bulunan TSG'dir. 13q14'de lokalize halde bulunur. Hüresel diferansiyasyonda çok önemli işleve sahiptir. Nonsens mutasyonlar, delesyonlar ve azalmış RNA ekspresyonunda inaktive olurlar. RB gen ailesi, hücre siklusunu G1 fazını inhibe ederler. P16 siklin D-CDK4/6 RB yolu: RB gen ürünleri, hücre siklusunun istirahat fazında E2F transkripsiyon faktörüne bağlanır.E2F RB genine bağlı olduğu sürece S fazındaki tetikleyici genleri aktive edemez. RB, G1'in sonunda siklin/CDK kompleksleri tarafından fosforile edilir ve mitozun sonunda defosforile olurlar. RB fosforile edilince E2F'den ayrılıp E2F S fazını başlatır. RB mutasyonları, p16 inaktivasyonunu, siklin D ve CDK4-6'ün aşırı ekspresyonunu ve sonuçta

bu siklusun dengesini bozarak kontrolsüz çoğalmaya yol açar<sup>2,12,13</sup>.

C-Myc: C-Myc genleri, DNA'ya bağlanan üç nükleer fosfoproteini kodlar. Bu proteinler hücre proliferasyonunda ve diferasyonunda etkilidirler ve DNA sentezinin başlamasında rol alırlar. Bu gen sıklıkla amplifikasyon ve transkripsiyonal disregulasyon ile onkogen halini alır. C-Myc amplifikasyonu olan hücrelerde büyüme faktörü gereksinimi azalır, hücre siklusunda G1 fazı kısalır ve bunun sonucunda proliferasyon oluşur. Son çalışmalar, miRNA 17-92'nin ekspresyonunun C-Myc geninin ekspresyonuyla bağlantılı olduğunu göstermiştir. miR-17-92 ve C-Myc geninin her ikisinde hücre siklusunun transkripsiyon faktörü olan E<sub>2</sub>F'in ekspresyonunu düzenleyerek işlev görürler<sup>2,13,14</sup>.

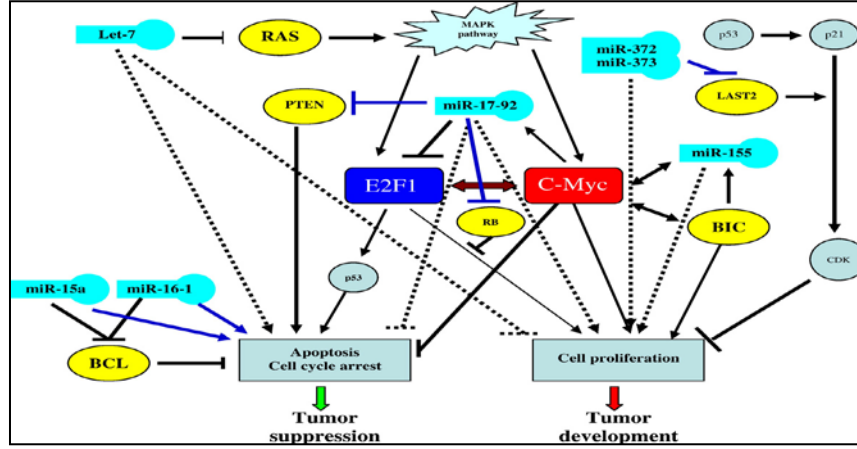
### **7.2. miR 372 ve miR 373 Geni**

Bu iki onkogenik miRNA'lar LATS<sub>2</sub> tümör supresör genin ekspresyonunu direkt inhibe ederek, p53 aracılı CDK 'yi inhibe ederek hücre proliferasyonu ve tümör gelişimini aktifleştirirler<sup>2,15</sup> (Şekil 3).

### **miR-21 Geni**

Meme kanseri, glioblastoma ve pankreatik kanser gibi çeşitli kanserlerde yüksek derecede eksprese edilirler. Pro-Apopitotik genleri inhibe ederek onkogen olarak işlev yaparlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda miR-21 geninin tümör supresör olan PTEN'i hedefleyerek etkisini gösterdiği bildirilmiştir<sup>2,12</sup>.





Şekil 3. miRNA'nın kanser patolojisini kapsayan moleküler mekanizması.

## 8. Tümör Supressör Gen Olarak miRNA'lar

Bu genler hücre bölünmesinin baskılanmasından sorumlu genlerdir. Birçok tümörde bu genlerin hasar görmesi veya inaktive olması nedeniyle hücre çoğalması negatif yönde düzenlenerek tümör hücreleri anormal çoğalma gösterirler<sup>2</sup>.

### 8.1. Let-7 Geni

miRNA ailesinin bir üyesidir. Let-7 ailesi, C.elegans, Drosophila ve omurgalılarda da içeren çok sayıda canlıda bulunurlar. İnsan kanserlerinde genelde delesyona uğramış kromozom bölgesinde yer alırlar. Özellikle akciğer kanserinin patogenezinde önemli rol oynar. Ras onkogeni, let-7'nin direk hedefidir ve let-7 Ras ekspresyonunu transkripsiyonel baskılama için RAS mRNA'sının 3'UTR bölgesiyle etkileşerek yaparlar. Ras proteinleri, mitojenik sinyal yolunda büyüme faktörü reseptörlerini, Raf protein-serin/treonin kinazların aktivasyonunu sağlayan anahtar rolü üstlenmiştir. Bu işlem, ERK MAP kinazların aktifleşmesiyle sonuçlanan protein kinaz döngüsünü başlatır<sup>2,3,9,15</sup>.

Ras geni: Ras ailesi H-ras, K-ras ve N-ras'tan oluşur. Ras genleri insan

kanserlerinin yaklaşık %20'sinde, barsak kanserlerinin % 50'sinde ve akciğer kanserlerinin %25'inde rol oynamaktadır. Tümör gelişimi sırasında gerçekleşen mutasyonlar sonucunda tümör hücrelerinde ortaya çıkmıştır. Ras genindeki nokta mutasyonunun kanser gelişiminde rolü vardır. Ras genleri birçok değişik büyüme faktörü reseptörlerinden gelen mitojenik sinyallerin iletiminde görev yapan, guanin nükleotid bağlayan proteinleri kodlar. Ras proteinlerinin aktivitesi GTP veya GDP bağlanmasına göre değiştiğinden, protein aktif (GTP-bağımlı) ve inaktif (GDP-bağımlı) durumlar arasında gidip gelir. Ras onkogenlerine özgü mutasyonlar, Ras proteinlerinin sürekli olarak, GTP'ye bağlı aktif durumunu korumasına neden olur. Bu olay, normal Ras proteine bağlı GTP'nin parçalanmasını uyaran GAP'a (GTPaz aktive eden protein) onkojenik Ras'ın yanıt vermemesinden kaynaklanır. Hücre içindeki GTPaz aktivitesinin azalması sonucunda onkojenik Ras proteinleri aktif halde olur. Sonuçta GTP-bağılı kalarak hücrenin kontrolsüz çoğalmasına neden olurlar<sup>2,15</sup> (Tablo 2).

### 8.2. miR 15a ve miR 16-1 Geni

miR 15a ve miR 16-1 genleri kanserlerin pekçok tipinde anahtar rol oynayan anti-apoptoz gen olan Bcl-2 genini hedefleyerek normal apoptotik bir yanıt meydana getirmektedirler. Bu bakımdan miRNA'lar tümör süpresör gen olarak işlev görürler. Hücreyi ölüme götüren durumlarda apoptozu engelleyerek hücrenin sağ kalmasını sağlar. Bcl-2'nin yüksek oranda ekspresyonuna yol açan bir kromozom translokasyonu sonucunda, bcl-2 onkogeni oluşur. Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan birincisi proapoptotik etkiyle apoptozisi indükler ve Sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indükler. Diğer etkisi ise anti-apoptotiktir, apoptozisi baskılayıcı etkiye sahiptir ve sitokrom C'nin salıverilmesini baskılar<sup>2,15,16</sup> (Şekil 3).

### 9. Biyomarker olarak kullanımı

Pek çok miRNA'lar normal dokulara kıyasla belirli kanser dokularında farklı şekilde eksprese olmaktadır. Örneğin; Let-7'nin ekspresyonu akciğer

kanserinde azalmaktadır, fakat meme yada kolon kanseri gibi diğer kanserlerde ekspresyonu artar. Bu bulgular miRNA'ların biyomarker olarak kullanılabileceğine ve kanserlerin saptanmasında güçlü bir tanısal araç olarak kullanılabileceğini desteklemektedir<sup>2,3</sup>.Günümüzde miRNA'ların tanısal amaçlı kullanım alanları hızla çoğalmaktadır.

### Kaynaklar

1. Costa FF: Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. *Gene* 2005; 357: 83–94.
2. Zhang B, Pan X, Cobb GP et al: MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2006; 289: 3–16.
3. Hwang HW, Mendell JT: MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 2006;1-5.
4. [www.ambion.com/techlib/resources/miRNA](http://www.ambion.com/techlib/resources/miRNA). Erişim tarihi: 01/05/2009.
5. [www.microna.sanger.ac.uk/](http://www.microna.sanger.ac.uk/). Erişim tarihi: 01/05/2009.
6. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, et al: MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 2006; 12:580–587.
7. Lee Y: MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051–4060.
8. Calin GA, Sevignani C, Dan DC, et al: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 2999–3004.
9. Wiemer AC: The role of microRNAs in cancer: No small matter. *Eur J Cancer* 2007;43: 1529–1544.
10. Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, et al: Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA*, 2004; 10: 544–550.
11. Jiang JM, Lee EJ, Gusev Y, et al: Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 5394–5403.
12. Hammond SM: MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16: 4–9.

13. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al: Apolycistronic microRNA cluster, miR17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 9628-9632.
14. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, et al: c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; 435: 839-843.
15. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al: Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408: 86-89.
16. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al: MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 11755-11760.

**Yazışma Adresi :**

Doktora öđr. Gönül Şeyda SEYDEL  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı

Tel: 0322 3386060-3466-3467

Fax: 0322 3386943