

miRNAlar ve Meme Kanserindeki Etkileri Micrnas and Their Roles in Breast Cancer

Özlem Küçükhüseyin¹, Oğuz Öztürk¹

¹Istanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Kısaltılmış Başlık (Running Title) : miRNA&Meme Kanseri

Yazının İlişkili Olduğu Tıp Disiplini: Fizyoloji, Genetik, Onkoloji, Biyokimya, Moleküler Tıp

ÖZET

Meme kanserinde etkili olan moleküler mekanizmalarının tarifi için son yıllarda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bununla birlikte bugüne kadar, bu hastalık için birçok tedavi stratejisi geliştirilmiştir. Ancak ne yazık ki bu tedaviler, hastalarda farklı yanıtların ve/veya adjuvan tedavi resistansı gelişiminin oluşumuna neden olmuştur. miRNAların gen ekspresyonunun regülatörleri olarak görev yaptıklarının belirlenmesinden sonra hem potansiyel terapötik hedef haline gelmiş hem de aday diagnostik ve prognostik indikatör olarak değerlendirilmiştir. Sonuçta meme kanseri gen ekspresyon işaretlerine dayanan alt tiplendirmesine benzer olarak miRNA işaretlerinin de tümörlerin sınıflandırılmasında biyomarker ve prognostik indikatör olarak kullanılmasının yakın gelekte mümkün olacağı ve bu şekilde bireysel rasyonel tedavilerin sağlanabileceği gösterilmiştir. Ayrıca miRNA ekspresyon modellerinin yapılması, bu alt tiplerin altında yatan moleküler temelleri de açıklayabilir ve hedeflenen tedavi modellerinin geliştirilmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (30). Bu derlemede miRNAların genel etki mekanizmaları ve meme kanserindeki etki mekanizmaları tartışılacaktır.

ABSTRACT

In recent years studies are accelerated in determining the possible molecular mechanisms of breast cancer in addition to the development of many treatment strategies. However these treatment strategies cause different curative responses and/or development of adjuvant therapy resistance in breast cancer patients. On the other hand, with more recent studies declaring the roles of miRNAs as the regulators of gene expression miRNAs became new potential therapeutic targets and thus evaluated as candidate diagnostic and prognostic indicators of breast cancer. Eventually it was expected that in near future miRNAs have parts in both tumor classification and efficient treatment strategies as novel biomarkers and prognostic indicators as well as in the classification of breast cancer according to tumor gene expression markers. In addition it was thought that creating of miRNA expression models could explain the molecular basis of the subtypes and also could contribute to the development of targeted treatment models. Thus the biological roles of miRNAs in several diseases and effective mechanisms in breast cancers will be discussed in this review.

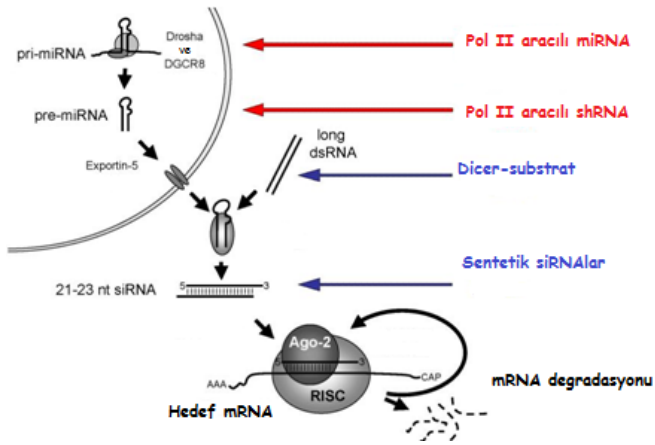
Giriş

RNA interference (RNAi) sistemi canlı hücrelerde hangi genlerin aktif olduğunu ve bu genlerin nasıl etkin olduklarını kontrol eden bir sistemdir. RNAi'nin 3 tipi vardır : endojen kaynaklı micro RNA (miRNA/miR), eksojen olarak small interfering RNA (siRNA), ve eşey hücrelerindeki piwi-interacting RNA (piRNA). Yaklaşık olarak 21-23 nükleotid uzunluktaki bu tek zincirli küçük RNAların post-transkripsiyonel gen regülasyonunda önemli görevleri vardır : genlerin direk ürünleri olan RNA'lara bağlanarak bu RNAların aktivitelerini azaltabilirler (mRNA translasyonunu engelleyebilir) ya da arttırabilirler. RNAi'ler kodlamayan RNA'lardandır (non-coding RNA), yani DNA'dan transkripsiyonu yapılan ama proteine çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanırlar(1,a,b,c,1a,1b,1c). RNAi parazitik genlere karşı hücreleri korumada önemli bir role sahip olmakla birlikte büyüme ve gelişme (1), proliferasyon, hücre döngüsü (2), kromozom organizasyonu (3) ve tümörigenez (2) üzerinde de önemli rol oynamaktadır.

mikroRNAlar : 20-21 nükleotid uzunluktaki miRNAlar posttranskripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu kontrol eden RNA regülatörleridir. İnsanlarda yaklaşık 706 adet miRNA (2) tespit edilmiş olup genomun %30'unu kontrol etmektedir. Bununla beraber miRBase veritabanında farklı organizmalara ait yani, her biri farklı genomik organizasyona ve farklı biyogenetik mekanizmaya sahip, 5000'den fazla miRNA girişi yapılmıştır.

miRNAların araştırıldığı ilk çalışmalar *C.elegans*'ta yapılmış olup, bu çalışmalarda gelişim ile ilişkili bulunan ilk mikroRNA geni olan *lin-4*'ün keşfi sağlanmıştır (4,5). Nitekim bundan sonraki çalışmalarda miRNAların gelişim sırasında embriyogenezde, diferansiyasyonda, gelişim zamanlamasında, organogenezde, büyüme kontrolünde, proliferasyonda, programlanmış hücre ölümünde, immün yanıt ve lenfosit fonksiyonunda rol oynadıklarını (6-9), dolayısıyla da kök hücre, embriyo, beyin, kalp, karaciğer gibi tüm hayvan dokularının normal gelişiminden sorumlu oldukları bildirilmiştir (10) Örneğin *miR-155*'in immün yanıt ve lenfosit fonksiyonunda rol oynadığı; *miR-14* delesyonunun TAG ve DAG düzeylerini arttırdığı (7); *miR-17-5p* ve *miR-20*'nin insanlarda elongasyon faktörü E2F1 ekspresyonunun regülasyonuna katılarak proliferasyonu düzenlediği gösterilmiştir (8). Bununla birlikte, miRNA ekspresyonunun doku spesifik ve/veya gelişim evrelerine spesifik paternlere sahip olduğunu göstermiştir; örneğin, *miR-1* kalp, *miR-122* karaciğer, *miR-124a* beyinde bulunur (1,10,11). Son çalışmalarda ise miRNA ekspresyon profillerinin kanser gibi birçok hastalıkta değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (1,10).

miRNA'ların nasıl etki gösterdiğinin araştırıldığı moleküler temelli çalışmalar, çoğu miRNA geninin büyüklüğü yüzlerce nükleotidden onlarca kilobaza kadar değişen stem-loop yapısında primer miRNA (pri-miRNA) oluşturmak üzere RNA polimeraz II (Pol II) tarafından transkribe edilerek miRNA biyogenezini başlattığını göstermiştir (12,13). Ancak Alu-tekrar bölgeleri olan bazı miRNAlar, RNA polimeraz III tarafından transkribe edilmektedir (14). mRNAlar gibi Pol-II ile transkribe olan pri-miRNA transkriptlerinin de splicing mekanizmasına sahip poliadenillenmiş poli-A kuyruğu ve bir başlığı, 5'-cap yapısı vardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda çoğu memeli miRNAlarının intronlarda yer aldığı ve miRNA işlenmesinin splicingden önce gerçekleştiği gösterilmiştir (10). Pri-miRNA, nükleus içinde, mikroprocessor adı verilen bir multiprotein kompleksi tarafından 70-90 bç lik fragmentlere bölünerek, hairpin yapıda precursor miRNA (pre-miRNA)'yı meydana getirir. Mikroprocessor kompleksinin merkezinde Droscha adı verilen RNaz III kesim enzimi ve DGCR8/Pahsa adı verilen, çift zincirli RNAları bağlayan protein domeni yer alır. Nükleus içinde oluşan pre-miRNA'lar exportin 5 tarafından tanınarak Ran-GTP-bağımlı bir mekanizma ile sitoplazmaya taşınır Dicer ile 21-23 bç'lik miRNA'lar elde edilir (1,10,15). Sitoplazmaya taşınan pre-miRNA, Dicer adı verilen diğer bir RNaz III enzimiyle, ~22-nt uzunluğunda matür miRNA:miRNA* dupleksini oluşturmak üzere kesilir. Bu dubleks insan hücrelerinde dsRBD proteini, TRBP/Loquacious, ile etkileşir (10,15). İnsan hücrelerinde TRBP, Argonaute proteini olan Ago2 (ve muhtemelen diğer Ago proteinleri de) ve ardından Dicer ile bir araya gelerek trimerik bir ribonükleoprotein kompleksi olan RISC (RNA-induced silencing complex/ RISC) oluşumunu başlatır. Rölatif olarak baz eşleşmesinde daha düşük stabilitesi olan miRNA* zinciri degrade edilir. Aktif olan miRNA'lar ise RISC kompleksine entegre olduktan sonra kendi tamamlayıcı mRNA hedefine yönelir. Bu yönelme baz eşleşmesi etkileşimine dayanır. miRNA ile tam eşleşme ya da kısmi komplementerlik, ya hedef mRNA'nın argonaute proteinleri tarafından kesilerek degrade edilmesine ya da translasyonel baskılanmaya neden olur. Bir miRNA bir veya daha çok mRNA'ya tamamlayıcıdır (komplemanterdir) (10,15,16). Yakın zamanda yapılan daha derin dizileme çalışmaları miRNA'nın miRNA*'ya ortalama oranının ~100:1 olduğunu ancak her iki zincirin de fonksiyonel olduğu durumlarda bu oranın daha da düşük olduğunu göstermektedir (15,17). Bununla birlikte diğer bazı çalışmalarda bazı miRNA'ların, heterokromatik miRNAlar, DNA ile etkileşime girerek transkripsiyonel represyon yaptığı bildirilmiştir (6).



Şekil 1. miRNA biyogenezisi (10). Hayvanlarda miRNA çekirdekte öncelikle pri-miRNA olarak eksprese edilir. Pri-miRNA RNaz-3, Drosha, tarafından 70-90 bç lik fragmentlere bölünerek, pre-miRNA'lar elde edilir. Pre-miRNA'lar exportin 5'ten sitoplazmaya çıkar ve Dicer ile 21-23 bç'lik miRNA'lar elde edilir. miRNA'lar, dsRNA molekülleri ile aynı mekanizmayla komplementer mRNA moleküllerinin yıkımını sağlar (18).

miRNA ve Hastalık

miRNA ökaryotik hücrelerin normal işlevinde yer aldığı gibi, birçok hastalıkla da ilişkilidir. Kanser, nöroloji, kardiyoloji, viroloji gibi birçok alanda bu konudaki çalışmalar hızla devam etmekte olup, elde edilen sonuçlarla tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır (19-21). Dominant olarak aktarılan nörodegeneratif hastalıklara örnek olarak Huntington hastalığı ve Alzheimer verilebilir. Bu hastalıklar spesifik bir gene dolayısıyla da o genin ürününe bağlıdır. Bu nedenle bu genin ürünü RNAi ile sessizleştirildiğinde, bu tür hastalıkların büyük ölçüde tedavi edileceği düşünülmektedir (22). Hepatit C virüsü günümüzde dünya popülasyonunun yaklaşık %3'ünü enfekte etmiş ve tıp dünyasının tedavisi için üzerinde büyük bir hızla çalışmaya devam ettiği önemli bir virüsdür (10). Fare hepatositleri üzerinde yapılan bir in-vivo araştırmada, anti-HCB siRNA'ların direk olarak HCVsekansına ait gen ürünü sessizleştirdiği görülmüştür

(23). Bu RNAi mekanizması için büyük bir adım olarak kabul edilmekle birlikte ayrıca AIDS tedavisi için de bir başarılı sonuç olarak değerlendirilmektedir. Eksojen ve endojen kaynaklı olarak sentezlenmiş olan siRNA'ların, HIV replikasyonu, T lenfositler ve hematopoetik kök hücrelerinin ürettiği makrofajlar gibi birçok hücrede inhibisyona yol açtığı görülmüştür (10). Çağın hastalığı olarak bilinen kansere karşı da birçok çalışma yapılmıştır. Kanserli dokuda miRNA mekanizmasının baskılandığı görülmüştür. Çünkü miRNA antiapoptotik gen olan Bcl-2'yi hedef alıp, onu sessizleştirebilmekte ve kanserli dokunun proliferasyonunu önleyebilmektedir (24).

miRNA ve Kalp Hastalığı

miRNA fonksiyonunun kalpteki global rolünün anlaşılması için yapılan deneylerde fare kalbindeki miRNAların olgulaşması engellenmiş ve deney sonucunda miRNAların kalp gelişiminde önemli bir rol oynadığı görülmüştür. Bununla birlikte insanlarda yapılan miRNA ekspresyon profili çalışmalarıyla hastalığa sahip kalpte spesifik miRNA ekspresyon düzeylerinin değiştiği gösterilmiş ve dolayısıyla miRNAların kardiyomyopatilerdeki katkılarında dikkat çekilmiştir. Ayrıca, belli miRNA'lar üzerinde yapılan araştırmalar kalp gelişimi sırasında miRNA'ların farklı rolleri de olduğunu göstermiştir (19).

miRNA ve kanser

Yapılan çalışmalarla miRNA ile bazı kanser tipleri arasında ilişkiler bulunmuştur. Calin ve ark. miRNA'ların büyük çoğunluğunun kanserle ilişkili genomik bölgelerde yerleşmiş (25) olduğunu Lu ve ark. miRNA ekspresyonlarının kanser hücrelerinde ve ilişkili normal doku hücrelerinde farklılıklar gösterdiğini (26) bildirmiştir. Günümüzde elde edilen çalışma sonuçları da neredeyse tüm kanserlerde miRNA'ların anormal ekspresyonlarına işaret etmektedir: örneğin, B hücre kronik lenfositik lösemide miR-15a ve miR-16-1 silinmiştir (27). Bununla birlikte insan akciğer kanserlerinde let-7 downregülasyonunun olduğu tespit edilmiş olup let-7'nin yüksek ekspresyon seviyelerinin akciğer kanserini inhibe ettiği bildirilmiştir (25,28,29,30).

Tablo 1. İnsan malignan tümörlerindeki miRNA ekspresyon profilindeki değişiklikler (30).

Doku/Tümör Tipi	Artmış Ekspresyon	Azalmış Ekspresyon
Meme	miR21,miR29b2	miR125b,miR145,miR10b,miR155,miR17-5p,miR27b
Ovaryum	miR141,miR200(a-c),miR221	Let-7f,miR140,miR145,miR199a, miR424
Endometrium	miR103,miR107,miR185,miR205,miR210,miR449	miR99b,miR152,miR193,miR204,miR221,let-7i,miR181(a-c)
Glioblastoma	miR221,miR21	miR181(a-c)
Lenfoma	miR155,miR17-92clusteri,miR10a	mir15a
Kolorektal	miR20a,miR24-1,miR29b-2,miR31	miR143,miR145,let-7
Tiroid	miR221,miR222,miR146,miR181b,miR197,miR346	
Hepatoselüler	miR18,miR224	miR199a,miR195,miR200a, miR-125
Testiküler	miR372,miR373,miR221,miR376a, miR301	
Pankreatik	miR21,miR24-2,miR100, miR103-1,miR107,miR125b1	miR375
Prostat	let7d,miR195,miR203	miR128a
Gastrik	miR-223,miR21,miR-1032	miR-218-2
Akciğer	miR17-92clusteri,miR17-5p	let-7 ailesi

Meme Kanseri ve miRNAlar

Liu ve ark. 2004 yılında meme kanseri olan insan ve farelerde, mikroçip teknoloji kullanılarak miRNA gen ekspresyonlarını profilemişler ve meme kanserinde, normal dokuyla karşılaştırıldığında, anormal miRNA ekspresyonunu varlığını bildirmişlerdir (2,31,32). Calin ve ark. her bir dokunun spesifik bir miRNA gen ekspresyonu olduğunu bildirmişlerdir (25). Buna karşılık Jiang et al. (33) ise insanlarda yaygın olarak görülen ve beşi meme kanseri (MDA231, T47D, SKBR3, MDA 361, and MCF-7) olmak üzere 32 kanser hücre-hattındaki 222 miRNAları incelemiş ve meme ile prostat kanser hücre hatlarının birlikte kümelenmeye eğiliminde olmasının farklı dokularda benzer miRNA ekspresyon profilinin olduğunu bildirmiştir. Shen et al. (34) genetik varyasyonlar için ailesel meme ca hikayesi olan 42 hastanın DNA örneğini incelemiş ve 17 miRNA geninin meme tümör dokusunda yüksek veya düşük ekspresyon seviyelerini göstererek BRCA1/2, ATM, PTEN, and CHEK2 gibi meme kanserindeki önemli genleri regüle ettiğini bildirmiştir (32).

Meme kanseri, genetik olarak hem locus hem de allel içeriğine göre yüksek derecede heterojendir. Şimdiye kadar ailesel meme kanseri vakalarının kabaca %50'si herhangi bir bilinen kanser geni ile açıklanamamıştır. Bu tip bir heterojenite "yaygın hastalık, multiple nadir allel" ("common disease, multiple rare alleles") modeli olarak tanımlanmıştır. Calin et al. (25) bilinen insan matür miRNAlarının yarısının kanserle ilişkili genomik bölgede veya fragil bölgelerde lokasyon göstermesinin kanserde rol oynayabileceğini bildirmiştir. Bu polisiston kümesine örnek olarak 13q31kromozomunun c13 veya f25 locusundaki miR17-92 verilebilir. Bu locusun meme kanseri dahil birçok kanser tipinde heterozigote kaybına neden olduğu bilinmektedir. Meme kanseri gelişiminde rol oynayan ve kanser hücrelerinin malign özellik seviyelerinden sorumlu olan diğer miRNAlar (miR-196 and miR-10a) homeobox kümelerinde lokalizedir (25,30).

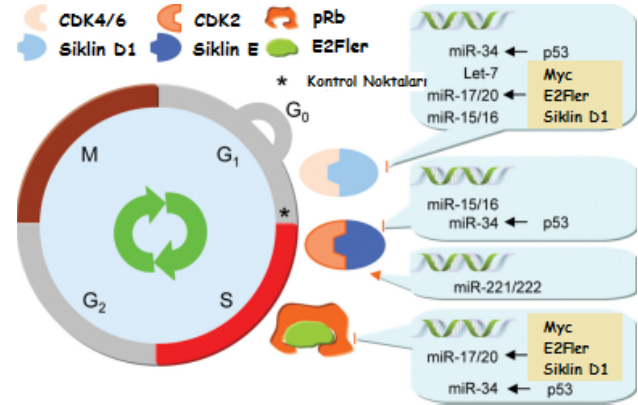
Meme ca'daki miRNA ekspresyon çalışmaları, hastalık taksonomisi ve prognostik araç geliştirilmesi açısından miRNAların önemini ve potansiyel kullanım alanını ortaya koymuştur. Hücre döngüsü, proliferasyonu ve tümörigenezin miRNAlar tarafından kontrol edildiği gösterilmiş ve hücre döngüsünü kontrol eden siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK), siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI), retinablastoma (Rb) gibi proteinlerdeki artış ve/veya anormal miRNA ekspresyonunun meme kanseri patogenezinde sık sık gözlemlendiği bildirilmiştir. Örneğin, siklin D1, hücre siklusunun G1 fazından DNA seztez fazına geçmesini kontrol eder ve meme kanserinde %50'den fazla bir oranda ekspresyon artışı tespit edilmiştir ve bu durum in vivo ve in vitro da kanser hücre proliferasyonunun hız limitleyici faktörü olarak görev

yapmaktadır. Siklin E hücre siklusunu düzenleyen diğer bir regülatör proteindir ve meme kanserinde %10'dan fazla bir oranda ekspresyon artışı vardır. Meme CA'nın erken safhasında da prognoz için iyi bir belirteç olmakla birlikte tümör agresivitesinin belirlenmesinde önemlidir. miRNA'lar; E2F, Rb, siklinler, CDKlar ve CDKI larla etkileşime girerek hücre bölünmesi ve siklus ilerleyişini kontrol ederler (2).

Bununla birlikte meme kanserinde eksprese olan miRNAlardan bazılarının tümör süpresörler olarak görev yaparken diğer bazılarının onkogenik özellik gösterdiği yapılan profileme çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır. Dolayısıyla tümör oluşumu ya tümör süpresör miRNA'ların redüksiyonu veya delesyonu ya da onkogenik miRNAların amplifikasyonu veya over-ekspresyonuyla gerçekleşebilir. Ayrıca tümör metastazı ise prometastatik miRNAların artmış ekspresyonuyla ve/veya anti-metastatik miRNAların downregülasyonuyla gerçekleşebilmektedir (35).

HÜCRE SIKLUSUNUN İLERLEMESİNDE ROL OYNAYAN miRNAlar

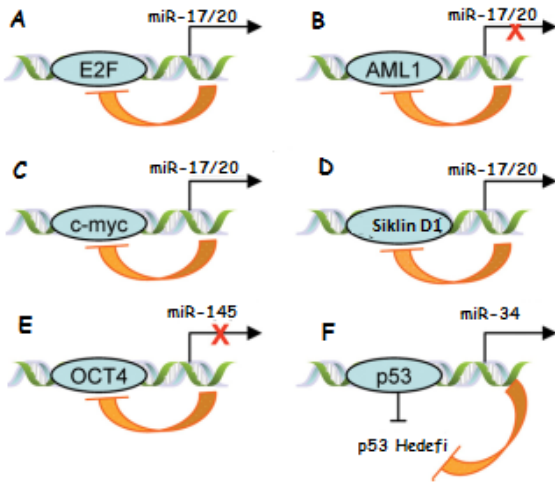
Hücre siklusunun ilerleyişini hücre siklus proteinlerini hedef alarak kontrol eden 5 grup vardır; miR-15a/16 kümesi, miR-17/20 kümesi, miR-221/222 kümesi, let-7 ailesi, miR34 ailesi (2).



Şekil 2. miRNA-hücre döngüsü ağı. miR-34 ailesi hücre döngüsünde E2F, siklin D1 ve siklin E ve siklin E ekspresyonlarını bakılayarak yer almaktadır. miRNA-34'ün direk olarak transkripsiyonel hedefi p53'tür. miR-17/20 kümesi transkripsiyonel olarak myc, E2Fler ve siklin D1 tarafından regüle edilir. miR-15/16 hücre döngüsünü siklin D1,E ve CDK4/6 inhibisyonu sağlayarak regüle eder (2).

miR-15a/16 kümesi : Kronik lenfositik lösemi hastalarının yaklaşık %70'inde miR-15a/16 kümesi delesyona uğramıştır ve/veya down regülasyon söz konusudur ve bu durum hipofiz adenomlarında, mide kanser cell-line'larında da görülmektedir. miR-15a/16 kümesi; siklin D1, E1, D3 ve CDK6 doğrultusunda hücre siklusunu G1 fazında tutar (2,36,37).

miR-17/20 kümesi : 1kb'lık genomik bölgede 6 olgun miRNA'yı kodlayan miR-17/20 kümesi, insan B hücre hatlarında ve meme kanser hücre hatlarında birçok hücre siklus proteinini (E2F, c-myc, Rb ve siklin D1 Gibi) hedefleyerek tümör gelişimini engellemektedir. Hücre siklusunun G1 fazında c-myc ve siklin D1 tetiklenerek E2F1'in Rb ile bağlı kalmasına dolayısıyla inaktivasyonuna neden olmaktadır. miR-17/20 kümesi G1/ S geçişinde yer almaktadır. Önceki çalışmalar miR-17/20 kümesinin E2F'nin resiprokal aktivasyonunun, c-myc tarafından E2F translyasyonunun engellenmesi suretiyle azalttığını bildirmiştir. Bir Rb ailesi üyesi olan Rbl2 de miR-17-5p'nin hedefidir. miRNAların direk olarak siklin D1'in inhibisyonunu sağlayarak etkili olduğunu bildiren ilk çalışmalar, meme kanseri hücre hatlarında miR17/20'nin siklin D1'in 3'UTR bölgesini hedef alarak, hücre döngüsünün durmasına ve proliferasyonun baskılanmasına neden olduğunu göstermiştir. Meme hatlarında, miR-17-5p, ayrıca östrojen reseptör- α (ER- α) koaktivörü AIB1'i de inhibe etmektedir. Sonuç olarak yapılan tüm bu çalışmalar miR-17/20 kümesinin, hücre siklus ilerlemesini sağlayan genleri etkileyerek tümör baskılayıcı olarak rol oynadığını düşündürmektedir (Şekil 2 A-D). Memeli bezlerinin aksine akciğer kanseri ve lenfomalardaki bu miRNA kümesindeki ekspresyon artışı hücre büyümesini arttırmaktadır. Bu da miR17/20 fonksiyonunun hücre tipine bağlı olduğunu göstermektedir (2,32,38,39).



Şekil 3. miR-hedefleri. **A:** transkripsiyonel olarak E2F tarafından uyarılan miR-17/20 kümesi translyasyonel olarak E2F ekspresyonunu repress edememektedir. **B:** AML1 transkripsiyonel olarak miR-17/20 kümesinin ekspresyonunu inhibe ederken miR-17/20 de AML1 translyasyonunu engellemektedir. **C:** Myc, miR-17/20 kümesini uyarmakta; miR-17/20 de myc ekspresyonunu inhibe etmektedir. **D:** Cyclin D1, miR-17/20 ekspresyonunu uyarmakta; miR-17/20 translyasyonel olarak siklin D1 ekspresyonunu inhibe etmektedir. **E:** OCT4, miR-145 ekspresyonunu inhibe etmekte; miR-145 de OCT4'yi 3'UTR bölgesine bağlanarak inhibe etmektedir. **F:** p53, transkripsiyonel olarak miR-34 ailesinin ekspresyonunu uyarmakta ve miR-34 de ters olarak p53 yolundaki genleri hedeflemektedir (2).

miR-221/222 : CDK inhibitörlerini (CDKI) hedefleyerek hücre siklusunu kontrol ederler. miR-221/222'nin ektopik ekspresyonu CDK2'yi aktive ederek G1/S geçişini kolaylaştırır ve tümör büyümesini p27^{kip1} ve p57^{kip2}'nin negatif regülasyonunu sağlayarak artırır. Bu hem MCF-7 hatlarında hem de Her2/neu-pozitif primer insan meme kanseri dokularında gösterilmiştir. Ayrıca artmış miR-221/222 ekspresyonunun meme kanserinde TAMOXİFEN resistansı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (2,40,41).

let-7 : Bu aile, C. elegans'da hücre siklusundan çıkış süresini ve terminal diferensiyasyonu kontrol eder. Akciğer ve meme kanserini de içine alan çeşitli kanser tiplerinde let-7 ailesi üyelerinin miktarı azalmıştır. Akciğer kanseri hücre hatlarındaki let-7 overekspresyonu hücre siklus ilerleyişini baskılar ve hücre bölünmesi azalır. Tümör gelişimini kontrol eden let-7 mekanizması Ras, HMGA2 ve kaspaz genlerini hedef alarak etki eder. Ayrıca siklin D1, D3, A, CDK441, CCNA2, CDC25A, CDK6, CDK 8 gibi birçok önemli hücre siklus kontrol geni de let-7 tarafından baskılanır (2,35).

miR-34 : Bu aile (miR-34a, miR-34b ve miR-34c) p53 tümör süpresör ağının önemli bir parçasıdır. DNA hasarı ve onkogenik stres, p53'ü aktive eder. p53, miR-34a ve miR34b/c promotörüne bağlanarak bunların ekspresyonlarını translyasyonel seviyede indükler (Şekil 2F). miR-34 ailesinin ektopik ekspresyonu hücre döngüsünün durmasını ve apoptozu siklin D1, siklin E2, E2Fler ve CDK4/6 downregülasyonunu uyararak tetikler. Cıvık agarda, miR34b/c'nin aşırı ekspresyonu hücre proliferasyonunu ve koloni oluşumunu engeller. Ayrıca iki farklı miRNA, miR-192 ve miR-215 de p53 ağında yer almaktadır. Bu iki miRNA'nın upregülasyonu, karsinogenezi, p21^{Cip1} birikimi yoluyla baskılar (2,35,42).

MEME KANSERİNDEKİ TÜMÖR SÜPRESÖR miRNAlar, onkogenleri baskılayarak tümörigenezi inhibe edebilirler. ErbB ailesi organizma gelişiminde, hücre proliferasyonunda ve insan epitelyal malignitelerinin sürvisinde önemli bir role sahiptir. İnsan meme CA'larında ErbB2 amplifikasyonu ve/veya aşırı ekspresyonu oranı yaklaşık %20 ile %30 arasındadır. miR25 meme kanser hücrelerinde ErbB2'yi hedef alır. SKBR3 hücrelerindeki miR125a ve miR125b aşırı ekspresyonu ErbB2 protein seviyesini yaklaşık %40-%65 oranında azaltırken ErbB3 seviyesini yaklaşık %60-80 oranında azaltır. miR125a veya miR-125b aşırı ekspresyonu yapan SKBR3 hücrelerindeki büyüme, migrasyon ve invazyon kapasiteleri bozulmuştur (2,32,35).

İnsan miR-17/20 kümesinin genomik lokasyonu kromozom 13q31'dedir ve meme kanseri dahil çeşitli kanserlerde heterozigosite kaybıyla ilişkilidir. miR-17/20 kümesi siklin D1 miktarını azaltır, MCF-7 hücre proliferasyonunu baskılar, G1/S geçişini engeller. Meme kanser hücre hatlarındaki azalmış miR-17/20 ekspresyonu ters olarak yüksek siklin D1 miktarıyla ilişkilidir. İnsan meme kanser örneklerindeki miR-

17/20 ekspresyon azalışı normal meme dokusuyla karşılaştırıldığında yüksek siklin D1 miktarıyla ilişkilidir. Hedeflenen gen delesyonu göstermiştir ki miR-17/20 kümesi olmayan fareler doğumdan kısa bir süre sonra ölmektedir bu nedenle memeli tümörigenezinde miR-17/20 fonksiyonunun belirlenmesi için gen delesyon çalışmaları ve doku spesifik transgenik teknikler gereklidir (2,43).

ER- α 'ya bağlanan östrojen meme CA gelişiminde önemlidir. Primer meme kanserinde ER- α yaklaşık %75 oranında aşırı eksprese edilmektedir. miR-206'nın ekspresyonunun ER- α agonistleri tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği bildirilmiştir ve ER- α -negatif MB-MDA-231 hücrelerinde ER- α -pozitif MCF-7 hücrelerine göre daha yüksek düzeyde miR-206 seviyeleri vardır. miR-206 overekspresyonu MCF-7 hücrelerinde ER- α seviyelerini azaltır ve bu da ER- α ile miR-206 arasında bir oteregülatör feedback döngüsünün olduğunu gösterir. İnsan ER- α -pozitif meme kanser dokularında miR-206 ekspresyon oranında düşme vardır. İnsan meme CA'da miR-206 ekspresyonu ile ER- α protein seviyeleri ters orantılıdır. Buna ilaveten, mir-145'in hedefi RTK olup meme tümör gelişimini engeller. miR-205 Her3 reseptörünü hedefler ve dolayısıyla Her aracılı proliferatif sinyalizasyon engellenir (2,44).

Mir-27b: Sitokrom P450, bütün domenlerde bulunan hemoproteinlerin büyük ve farklı bir üyesidir. CYP450ler ilaç metabolizmasında, biyoaktivasyonda rol oynayan temel enzimleri içerir ve vücuttaki ilaç metabolizmasının ~%75'inden sorumludur. CYP1B1, kanserle ilişkili önemli bir molekül olup prokarsinogenlerle 17 -estradiol'ü katalistler. CYP1B1'in ayrıca meme kanseri dahil çeşitli insan kanserlerinde overeksprese olduğu bildirilmiştir. Biyoinformatik analizler, CYP1B1 mRNA'sında miR-27b sekansı ile neredeyse mükemmel bir uyum olduğunu göstermiştir. Ayrıca meme tümör dokusu ve normal doku analizleri, tümör dokusunda miR-27b ve CYP1B1 ekspresyon düzeyleri arasında ters ilişki olduğunu göstermiştir. Çoğu meme ca hastasında azalmış miR-27b ekspresyon düzeyi ve artmış CYP1B1 ekspresyon düzeyi vardır (2,32).

Mir-125a ve miR-125b: HER2 (ERBB2) geni, tirozin kinazların epidermal büyüme faktör reseptör ailesinin bir üyesini kodlar. Bu proteinin kendisine ait bir ligand bağlama domeni yoktur ve bundan dolayı büyüme faktörü bağlayamaz. Ancak, bu ailenin ligandla bağlanabilen diğer bir üyesiyle sıkıca bağlanarak bir heterodimer oluştur ve bu şekilde hem ligand bağlama aktivitesini stabilize eder hem de mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), fosfatidil inositol-3 kinaz gibi kinaz aracılı downstream sinyal yollarının artmasına neden olur. Bu genin amplifikasyonu ve/veya overekspresyonu meme tümörlerini de içine alan birçok kanser türünde bildirilmiştir (35). HER2 amplifikasyonu ve/veya overekspresyonu olan meme kanseri hastalarında miR-125a ve miR-125b'nin önemli derecede downregüle olduğu gösterilmiştir (32,35). Bu iki miRNAda

potansiyel tümör süpresörlerdendir ve biyoinformatik araştırmalar, miR-125a ve miR-125b için hedef seed-sekansların HER2 ve HER3'ün 3'UTR bölgesinde olduğunu göstermiştir (35). SKBR3 (ErbB2(HER2)-bağımlı insan meme kanseri hücre hattı) hücrelerindeki miR-125a ve miR-125b overekspresyonunun, HER2 ile HER3'ün transkript(mRNA) ve protein seviyelerini baskılayarak, düşük p-ERK1/2 ve p-AKT düzeyleriyle ilişkili anchorage-bağımlı büyümede, hücre motilitesinde ve invasiv kapasitede azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (32,35). Bununla birlikte bu etki transforme olmamış HER2-bağımsız meme kanseri hücrelerinde (MCF10A) de görülmektedir (35).

miR-200 ailesi : İnvazyon ve metastaz malign tümör ilerlemesinin göstergelerindedir. Günümüzde anormal EMT aktivasyonunun birçok kanser türünde malign oluşumlara neden olduğu görüşü kabul edilmektedir. EMT; SNAIL ailesi ile ZFH ailesine ait transkripsiyon faktörlerini içine alan EMT-indükleyici transkripsiyonel represörler tarafından aktive edilmektedir. Bu proteinler E-cadherini kodlayan genler gibi epitelyal genlerin transkripsiyonunu engellemektedir. Yakın zamanlarda bir ZFH ailesi üyesi olan ZEB1'in meme kanseri dahil insan kanserlerinde en önemli EMT aktivatörü olduğu gösterilmiş olup fare ksenograft modellerinde ise ZEB1'in metastazı ilerlettiği gösterilmiştir. miR-200 ailesine ait miRNAlar EMT tetikleyicileri olan ZEB1 ve ZEB2 ekspresyonlarını baskılayarak epitelyal fenotipe katkıda bulunurlar. Bunun dışında miR-200 ekspresyonunun AKT2 tarafından azaltıldığı bildirilmiş olup çoğu durumda meme kanseri metastazının Akt-miR-200-E-cadherin yollarının kontrolünde olduğu ileri sürülmüştür. İlginç olarak bir çalışmada fare meme kanser hücre hatlarında miR-200 ekspresyonunun beklenmedik bir şekilde makroskopik metastazı geliştirdiği gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak araştırmacılar, bazı tümörler için metastatik bölgelerdeki tümör kolonizasyonunun mezenkimal-epidermal geçişi ile geliştiğini ve ayrıca tümörün epitelyal doğasının metastatik sonucu göstermediğini ileri sürmüşleridir. Bu çalışma miR-200 ailesinin metastaz gelişimiyle direk ilişkili olduğunu ve miR-200 seviyesindeki değişimlerin tümörigenezin gelişimiyle ilişkili olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Örneğin, normal over dokusuyla karşılaştırıldığında insan over kanserlerinde miR-200 ailesinin upregülasyonu söz konusudur. Bunun da ötesinde miR-200 ailesinin overekspresyonu önemli ölçüde düşük hayatta kalımla korelasyon göstermektedir. miR-200a ekspresyonunun önemli ölçüde olmadığı hastalarla karşılaştırıldığında yüksek miR-200a ekspresyonuna sahip over tümörlü hastalarda yaklaşık %50 civarında ortalama hayatta kalım oranı gösterilmiştir. Bunun da ötesinde miR-200 kümesini kodlayan kromozom 1'deki bölgenin birçok epitelyal, over, meme kanserleri ve melanoma vakasında amplifiye olduğu gösterilmiştir. Kanser kök hücresi ile normal kök hücrenin kendi kendilerini yenilemesinin kontrolünde 3 miRNA

kümesinin(miR-200c-141, miR-200b-200a-429 and miR-183-96-182) rolüyle ilgili olarak yeni bir çalışmada yapılmıştır. Bu miRNA'lar; insan meme kanser kök hücrelerinde, normal insan ve fare meme kök/progenitör hücrelerinde, embriyonel karsinom hücrelerinde olduğu gibi downregüledir. Araştırmacılar *BMI1* (kendi kendine yenilenmeyi sağlayan bir gen)'nin özellikle bu miRNA'lar tarafından inhibe edildiğini bildirmişlerdir ve embriyonel karsinom hücrelerindeki miR-200c'nin ektopik overekspresyonunun büyüme gerilemesine ve nöronal diferansiyasyona neden olduğunu ve in vivo da meme kanser kök hücrelerinin tümörigenisitesini baskıladığını göstermişlerdir. Bütün bu çalışmalar doğrultusunda miR-200 ailesinin tümör ilerlemesi ve metastazının regülasyonunda önemli rolleri olduğu kabul edilmektedir (35,45,46).

MiR-200c: DeltaEF1 (E-cadherin'in transkripsiyonel represörüdür), meme kanserinde epitelyal plastisiteyi regüle eder. E-cadherin down-regülasyonu epitelyal-mezenkimal dönüşümünde çok önemlidir. DeltaEF1, miR-200c için potansiyel bir hedeftir. MDA-MB-231'deki (östrojen reseptör-negatif hücre hattındaki) anormal/ektopik miR-200c ekspresyonunun E-cadherin ekspresyonunu etkileyerek hücre morfolojisini değiştirdiği bildirilmiştir (32).

MiR-206: Fonksiyonel çalışmalar miR-206 hedefinin insanlarda östrojen reseptörü- α (ER- α) olduğunu göstermektedir. miR-206, ER- α mRNA ve protein seviyelerinde azalmaya neden olmaktadır. miR-206'nın ER- α mRNA'nı susturması, 3'UTR bölgesindeki 2 sekans spesifik bölgesiyle olmaktadır (32). Yapılan çalışmalar miR-206'nın *ESR1*-mRNA'nın ekspresyonunu, *ESR1*'in 3' UTR bölgesindeki 2 bağlanma domenini engelleyerek gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca sonraki çalışmalar miR-206 ekspresyonunun feed-back loop varlığına bağlı olarak α ER agonistleri (ER β agonistleri veya progesteron tarafından değil) tarafından sıkı bir şekilde baskılandığını göstermiştir. (35). Kondo et al. (44) de çalışmasında ER α - pozitif insan meme kanser dokusunda miR-206 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiş ve miR-206'nın, ER- β veya E-cadherin gibi başka genlerle etkileşmediğini bildirmiştir. MiR-206'nın ekspresyon düzeyi meme kanser dokularında ER- α ile ters ilişkili olup bu ilişki ER- β mRNA'sında yoktur (32). Bir diğer çalışmada insanlarda, ER α -pozitif meme kanserli dokularda, *ESR1* ekspresyonunu baskılayarak MCF7 meme ca hücrelerinin büyümesini engelleyen miR-206 ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir. miR-206'ya ek olarak araştırmacılar meme kanserli olgularda *ESR1* mRNA'sını direk olarak hedefleyen diğer miRNA'ları da bildirmişlerdir: miR-18a, miR-18b, miR-193b ve miR-302c. Bunun da ötesinde miR-18a, miR-18b, miR-193b, miR-206 ve miR-302c'nin hücre siklus arrestini arttırdığı, östrojenle indüklenen proliferasyonu engellediği gösterilmiştir. ER α ekspresyonunun disregülasyonunun çoğu insan meme kanser vakalarında ayırıcı özellik

göstermesinden dolayı bu çalışmalar meme kanser patolojisine neden olan moleküler olayları açıklama da oldukça önemlidir. miR-206'nın meme kanserindeki tümör baskılayıcı rolü; metastatik meme kanser hücrelerinde parental hücrelerle karşılaştırıldığında miR-206, miR-335 ve miR-126'nın etkin downregülasyonunun ortaya konmasıyla doğrulanmıştır. Bu miRNA'ların ekspresyonlarının düzeltilmesi ise invazif kapasitelerinde azalmaya neden olmaktadır. Araştırmacılar miR-335 için 4 hedef tanımlamışlardır : *PTPRN2*, *MERTK*, *TNC* ve *SOX4*. Bunlar arasında bir ekstrasellüler matris bileşenini kodlayan *TNC* ve tümörigenezde yer alan bir transkripsiyon faktörünü kodlayan *SOX4*; metastazla ilişkili fonksiyonel hedefler olarak bildirilmiştir. Metastatik hücrelerde miR-206 ekspresyonunun düzeltilmesi proliferasyon veya apoptoza hassasiyeti etkilememekte ancak hücre morfolojisi değiştirmektedir ki bu muhtemelen hücre motilitesinde azalmaya neden olarak metastatik hücrelerin migrasyonunu sınırlandırmaktadır. Bu bulgular meme kanseri tedavisinde miR-206'nın aday gen olacağını düşündürmektedir (35)

miR-17-5p: miR-91 olarak da bilinen miR-17-5p, kromozom 13q31 da yerleşik olup bu genomik bölge meme kanseri dahil çeşitli kanser tiplerinde heterozigosite kaybına uğramıştır. miR-17-5p, hem ER- α hem de E2F'nin transkripsiyonel aktivitesini arttıran bir steroid reseptör ko-aktivatörüdür olan AIB1 (amplified in breast cancer 1) geninin mRNA'sına komplementerdir. Dolayısıyla *AIB1*, miR-17-5p'nin doğrudan hedefidir. miR-17-5p, *AIB1* mRNA transkripsiyonunu baskılayarak E2F1 ve ER fonksiyonlarını engeller. MiR-17-5p-aracılı AIB1 down-regülasyonu ayrıca östrojen reseptör aracılı ve östrojen reseptör bağımsız meme ca hücrelerinin proliferasyonunda gerilemeye de neden olur (2,30,32,35). Yakın zamanlarda insan kanserlerinin yaklaşık %50sinde overekspresyon gösteren siklin D1 geninin (*CCND1*) meme kanser hücrelerinde de miR17-5p'nin direk hedefi olduğu gösterilmiştir. miR-17-5p; meme kanser hücrelerinin proliferasyonunu, siklin D1 proteininin sentezini baskılayarak engellemektedir ve bu etki siklin-D1'i olmayan meme kanser hücrelerinde *CCND1* siRNA tarafından ortadan kaldırılmaktadır. Bu çalışma ayrıca siklin D'in miR-17-5p ekspresyonunu indükleyerek kendi ekspresyonu negatif feedback ile sınırlandırdığı bir regülatör mekanizmayı tanımlamaktadır (35).

let-7 ailesi : let-7 çoğu insan kanser türlerinde çok az eksprese edilmektedir ya da delesyona uğramıştır. Hem hematolojik maliniteler hem de solid tümörlerden elde edilen bilgiler doğrultusunda her birinin tümör inisiasyonunda rol oynayan minör bir hücre popülasyonundan oluştuğu bildirilmiştir. Bu tümör başlatıcı hücreler (T-ICler) tümör kök hücrelerin özelliklerine sahip olup asimetrik hücre bölünmesine ve kendi kendine yenilenme özelliğine sahiptir. T-ICler tümörde daha çok differansiyasyon olmuş hücreler yığını arasında sadece minör bir fraksiyon oluştururlar. Kanser kök

hücre hipotezine dayanarak, T-ICler inisiasyon, progresyon, metastaz ve tedavi direncinden sorumludur. Meme T-ICleri (BT-ICleri) hücre suspansiyonlarının CD44+CD24-purifikasyonu ve bunların sıralamadaki azlığına göre ya da kendi kendine replike olan hücrelerin (mammospheres) küresel biçimli yığınlarının purifikasyonu ile elde edilirler. Meme kanser hücre hatlarında yapılan bir çalışmada kendi kendine yenilenen ve farklılaşmış hücrelerdeki miRNA ekspresyonları karşılaştırılmış ve let-7 ekspresyonunun BT-IClerde çok fazla miktarda azaldığı ve farklılaşma ile arttığı gösterilmiştir. BT-IClere let-7 uygulaması bunların in vivo proliferatif kapasitesilerinin, mammosphere oluşturma kapasitesilerinin, tümör formasyon ve metastaz kapasitesinin azalmasına neden olmuştur. Aksine let-7 knock-downu in vitro da non-T-IClerde kendi kendine yenilenmeyi arttırmıştır. let-7'nin bilinen onkogenik hedefleri arasında *H-RAS* ve *HMGA2* bulunmaktadır ve bunlar let-7 overekspresyonu ile downregüle edilmektedir. BT-IC ile zenginleştirilmiş bir hücre hattında *HMGA2* knock-downu farklılaşmayı artırıp kendi kendine yenilenmeyi etkilemezken *H-RAS* susturulması kendi kendine yenilenmeyi azaltmış ancak farklılaşma üzerine etki göstermemiştir. Bu sonuçlar let-7'nin birçok BT-IC kök hücre benzeri özelliği regüle ettiğini ve let-7'nin teröpatik RNA kullanarak tümör kök hücrelerine saldıran tek güç olduğunu göstermektedir. *let-7* miRNA'sının tümöre sunumu, hücrelerel diferansiyasyonun indüklenmesinden dolayı potansiyel olarak kök hücreleri azalmaktadır. Yeni yapılan bir çalışmada, RKIP (Raf kinase inhibitory protein) proteinini let-7 ve meme kanser metastazı ile ilişkilendirmiştir. RKIP (PEBP1 olarak da bilinir) MAPK, G protein ilişkili reseptör kinaz-2 ve NF- κ B sinyal yollarını inhibe etmektedir. Araştırmacılar fare modellerinde RKIP'in meme kanser hücrelerinin metastatik invazyonunu inhibe ettiğini ve meme kanser hücre intravazyonunu ile kemik metastazını repress ettiğini bildirmişlerdir. MAPK inhibisyonu MYC tarafından *LIN28* transkripsiyonunu azaltmaktadır ve let-7 biyogenez inhibitörü olan *LIN28*'in downregülasyonu meme kanser hücrelerinde let-7 ekspresyonunu arttırmaktadır. Bunun sonucunda da SNAIL gibi proinvaziv ve prometastatik genleri aktive eden, kromatin-remodelleme proteini olan *HMGA2* ekspresyonu azalmaktadır. Sonuç olarak RKIP; MAPK, MYC, *LIN28*, let-7 kaskadları ve *HMGA2* gibi let-7'nin downstream hedef proteinleri yoluyla invazyon ve metastazı repress etmektedir (2,35,47-49).

miR-34a : miR-34a birçok kanser türünde downregüle edilir ve p53 tarafından transkripsiyonel olarak regüle edilmektedir. Normal epitelial hücre hatları ve HER-2+ hücre hatlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada miR-34a seviyelerinin; üçlü negatif ve mezenkimal meme kanser hücre hatlarında azaldığı bildirilmiştir. Araştırmacılar meme kanserinin bu alt tiplerindeki p53 mutasyonlarının, düşük miR-34a ekspresyonuna katkıda bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. (2,35,42).

miR-31: miR-31'in prometastatik genlerin ekspresyonlarını inhibe ederek bir çok kademede metastazı engellediği bildirilmiştir. miR-31 normal meme hücrelerinde ekspresyondadır ancak tümörün metastatik safhasına bağlı olarak miktarı değişmektedir. miR-31 miktarı non-metastatik meme kanser hücre hatlarında kısmen azalmıştır ve metastatik fare ve insan meme kanser hücre hatlarında neredeyse tespit edilememektedir. Araştırmacılar miR-31'in metastatik meme kanser hücre hatlarına uygulanmasının in vitro da metastazla ilgili fonksiyonların (motilite, invazyon ve anoikis resistansı); in vivo da metastazın baskılanmasına neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca her ne kadar miR-31'i overeksprese eden meme kanser hücreleri daha büyük ve proliferatif tümörler oluştursa da bu tümörler çok iyi kapsüle edildiklerinden daha az invaziftirler ve bundan dolayı da miR31, metastazı, metastazın erken safhalarında engellemektedir. miR31 overeksprese eden hücrelerin doğrudan dolaşıma injeksiyonun hücrelerin hayatta kalımları ile akciğerlerde sekonder tümör oluşumunu engellemesi miR-31'in metastazı birçok kademede engellediğini düşündürmektedir. Aksine, in vivo da miR-31 inhibisyonu invazif yeteneği arttırmakta ve metastazı ilerletmektedir. miR-31'in fonksiyonel olarak anti-metastatik etkisini uyguladığı ilişkili mRNA hedeflerini belirlemek için araştırmacılar, miRNA-hedef tahmin algoritmaları, TargetScan ve PicTar tarafından belirlenmiş miR-31'in kabul edilmiş olan hedefleri için gen-ontoloji analizleri yapmışlar. Bu yaklaşımla, insan meme kanser hücrelerinde miR-31 için 6 hedef olduğunu onaylamışlardır: *frizzled3 (Fzd3)*, *integrin α -5 (ITGA5)*, *miyozin fosfat-Rho-interacting protein (M-RIP)*, *matriks metalloproteinaz 16 (MMP16)*, *radiksin (RDX)* ve *ras homologu olan gen ailesinin üyesi A (ras homolog gene family member A) (RhoA)*. İlginç olarak araştırmacılar, metastatik meme kanser hücrelerinde bu genlerden 3'ünün: *ITGA5*, *RDX* and *RhoA* re-eksprese olarak miR-31'e atfedilen motilite defektlerini ortadan kaldırdığını, bozulmuş olan invazyon ve direnç defektlerini tersine çevirdiğini göstermişler ve dolayısıyla bu 3 genin miR-31 için önemli fonksiyonel hedefler olduklarını ileri sürmüşlerdir. Sonuç olarak bütün bu bulgular miR-31'in meme kanseri için etkin bir teröpatik hedef olabileceğini göstermektedir çünkü miR-31 antimetastatik etkisini birçok prometastatik geni hedefleyerek göstermektedir (35,50).

MEME CA'DAKİ ONKOGENİK miRNALAR :

miR-27a : miR-27a meme kanserinde onkomiR olarak bildirilmiş olup transkripsiyonel ko-faktör olan ZBTB10 genini regüle eder. miR-27a'nın potansiyel hedefi olan bu çinko parmak ZBTB10 geni, hücre siklusunun G0-G1'den S fazına geçişini sağlayan ve bir transkripsiyon faktörü olduğu düşünülen onkogen spesifik proteinlerin (Sp) kabul edilen represörüdür. MDA-MB-231 hücrelerindeki miR-27a inaktivasyonu ZBTB10 ekspresyonunu arttırdığı ve Sp genlerinin miktarını azalttığı bildirilmiştir. Bununla birlikte miR-27a, MDA-MB-231 hücrelerinde, *cdc2/siklin B* inhibitörü olan *Myt-1* ekspresyonunu baskılayarak *cdc2/siklin B* aktivitesini artırır ve meme kanser hücrelerini proliferasyona teşvik eder (2,32). Tedaviye yönelik yapılan çalışmalarda ise histon deasetilaz inhibitörü olan LAQ824 ile proapoptotik doz kullanılarak yapılan tedavi sonrasında

SKBR3 hücre hatlarında miR-27a'nın downregülasyonu bildirilmiştir (32).

miR-10b : miR-10b, insan kanser hücrelerinde potansiyel metastatik etkisi olan ilk miRNA olarak bulunmuştur. Çoğu meme tümöründe overeksprese olan miR-155'in aksine miR-10b sadece metastatik kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese olmaktadır ve in vitro da hücre migrasyonu ile invazyonunu ilerlettiği in vivo da tümör invazyonu ve metastazını başlattığı bildirilmiştir. miR-10b ekspresyonu transkripsiyon faktörü olan Twist tarafından tetiklenir ve ardından miR-10b diğer bir transkripsiyon faktörü olan homeobox D10 (HOXD10) translasyonunu inhibe eder. Bu inhibisyon ise kanser hücre migrasyonu ve invazyonunu tetikleyen bir prometastatik gen olan *RHOC* (ras homologue gene family member C) ekspresyonunun indüksiyonunu da içeren birçok hücrel değişimlere neden olan yolakları çalıştırır (35).

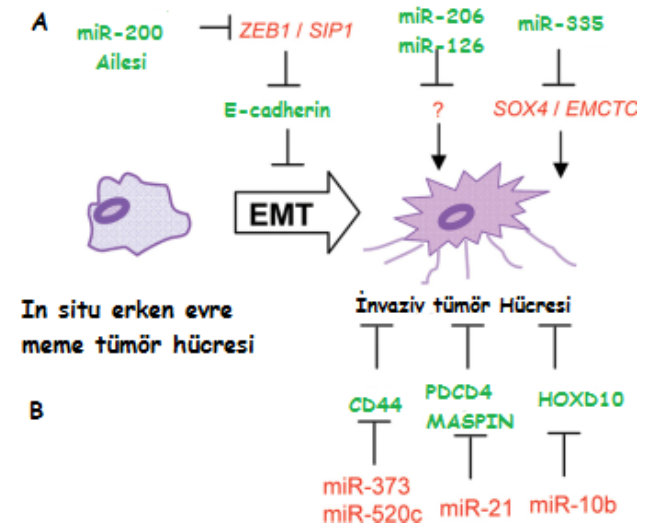
miR-21: miR-21 de meme kanseri dahil çoğu tümörde overeksprese durumdadır. Meme tümörlerinde normal meme dokularıyla karşılaştırıldığında oldukça yüksek seviyede upregüle olmaktadır ve onkogenik fonksiyon göstermektedir. Hücre kültürlerinde miR-21'in onkogenik rolünü araştıran çalışmalar fare ksenograftlarında da yapılmış olup miR-21 knock down'unun hücre büyümesini engelleyerek meme tümör gelişimini baskıladığı bildirilmiştir. MCF-7 hücrelerinde tümör süpresör olan tropomiyosin 1 (TPM1) miR-21'in hedeflerinden biridir. TPM1, aktin filament bağlama proteinlerine dahil olan bir tropomiyosin izoformudur. Meme kanseri dokularından kökenlenen epitel hücrelerinde ekspresyonu yoktur. TPM1 downregülasyonu, bağlanma yerinden bağımsız (anchorage-independent reorganization) mikrofilament reorganizasyonunu ve bağlanma yerinden bağımsız büyümeyi (anchorage-independent growth) artırır (32). miR-21 hedeflerine daha geniş bir çerçeveden bakıldığında birçok p53 ile regüle edilen mRNAların (FAM3c, ACTA2, APAF1, BTG2, FAS, CDKN1A (p21), PDCD4 ve SESN1 gibi) da olduğu görülür ki bu da aklı miR-21 ile p53 tümör süpresör yolağı arasında fonksiyonel bir bağ olabileceğini getirir (2,32,35). miR-21'in tümör süpresör gen programlı hücre ölümünü down-regüle etmesi de miR-21'in hücre proliferasyonundaki etkisini ortaya koyar (35). Yapılan farmakolojik çalışmalarda da araştırmacılar, MCF-7 hücrelerindeki miR-21 antagonizasyonunun apoptoza neden olduğunu ve bunun da anti-miR-21 ile transfekte edilen hücreler ile bu hücrelerden kökenlenen tümörlerdeki düşük Bcl-2 protein ekspresyonu ile ilişkili olduğunu göstermişler ve Bcl-2'nin dolaylı olarak miR-21 hedefi olabileceğini ileri sürmüşlerdir. miR-21'in diğer önemli bir hedefi ise fosfataz ve tensin homoloğu tümör süpresör gen olan *PTEN*'dir. Ayrıca *Maspin* de miR-21'in direk hedefidir. Bu 3 genin metastatik meme kanser hücre hatlarında invazif kapasitedeki düşmelerden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak miR-21 onkogenik bir miRNA'dır ve sadece tümör gelişiminde değil ayrıca invazyon ile tümör metastazında birçok anti-metastatik geni hedefleyerek önemli rol oynamaktadır (35).

miR-155: miR-155, meme kanseri dahil çoğu insan malignitelerinde overeksprese durumdadır. Farelerde normal meme bezi epitelyum (NMuMG) hücrelerinde yapılan bir çalışmada miR-155'in TGF-β/Smad4 yolu ile upregüle edildiği ve TGF-β ile uyarılan EMT ve hücre invazyonuna aracılık ettiği bildirilmiştir. Mekanizmada miR-155'in hücre adezyonu, motilitesi, polaritesi gibi birçok hücrel olayları regüle eden ve ayrıca hücre bağlantı oluşumunda ve stabilizasyonunda önemli bir aracı olan *RhoA* ekspresyonunu doğrudan inhibe ettiği gösterilmiştir. Daha sonraki çalışmalarla da araştırmacılar, invazif tümörlerde (non-invazif kanser dokularında değil) miR-155'in oldukça yüksek oranda eksprese edildiğini göstererek, insan primer meme karsinomlarında miR-155'in kanser invazivitesiyle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (35,51,52).

miR-373/520c ailesi: Metastatik olmayan meme kanser hücre (MCF-7) hatlarında miR-373/520c ailesinin prometastatik özellikte olduğu gösterilmiştir. In vivo ve in vitro da yapılan diğer çalışmalar da miR-373 ve miR-520c'nin kanser hücre migrasyonu ve invazyonunu ilerlettiğini göstermiştir. Mekanizma çalışmaları, bazı kanser hücre hatlarının migrasyon için miR373'e gereksinim duyduğunu ve bu hücrelerin migratör fenotipe, metastaz represörü olan CD44 ekspresyonunu inhibe ederek geçtiğini bildirilmiştir (35).

MEME KANSERİNDEKİ METASTATİK miRNALAR :

Metastaz herhangi bir kanser türünün ilerleyişinde son ve fatal basamak olup karmaşık bir süreç olarak ifade edilmektedir, çünkü primer solid tümör hücreleri komşu hücreleri istila ederek sekonder tümöre gelişirler (Şekil 3 A ve B) (2,32). Tümör hücre intravazyonu, dolaşımında bulunuşu, uzak organlara ekstravazyonu, anjiyogenez ve sınırsız büyümesi metastatik sürecin içindedir. Bu süreçlerdeki moleküler ihtiyaçlar ise doku spesifik olabilmektedir. Meme karsinomlarında daha çok kemik ya da akciğer metatazı sözkonusudur (32).



Şekil 4. Meme kanseri metastazının miRNAlar tarafından regülasyonu. A: Meme kanseri metastazındaki inhibitör miRNAlar. B: Metastazdaki indükleyici miRNAlar (2)

miRNA ve meme Ca metastaz ilişkisi son yıllarda ortaya çıkarılmıştır. Meme kanser hücreleri, büyümeye ve çoğalmaya devam edebilecekleri vücudun herhangi bir yerine yayılma potansiyeline sahiptir. Metastaz süpresör gen olan CD44 ekspresyonu meme kanser progresyonundan metastatik fenotipe kadar olan süreç boyunca azalır. miR-373 ve miR-520c, insan meme kanser hücre migrasyonunu ve invazyonunu in vitro ve in vivo da CD44 ekspresyonunu baskılamak suretiyle uyarır. miR-21, meme kanser invazyonunu ve metastazını, birçok tümör/metastaz süpresör geni hedefleyerek ilerletir. Hem primer insan meme epitelyum hücreleri hem de MCF-10A hücreleri ile karşılaştırıldığında, meme kanser hücrelerinde miR-10b'nin belirgin bir şekilde upregülasyonu söz konusudur (2). Ma et al. (53) meme Ca metastatik hücrelerinde, miR-10b'nin, metastatik olmayan hücelere göre daha fazla eksprese edildiğini göstermiştir. Metastatik olmayan hücrelerdeki miRNA-10b overekspresyonu güçlü bir invazyon ve metastazı teşvik ederken hücre proliferasyonuna etki etmez (32). miR-10b, HOXD10 genini hedefleyerek (homeobox D10'u şifreleyen mRNA'yı da engelleyerek) çok iyi karakterize edilmiş olan pro-metastatik gen olan RHOC'un ekspresyonunu arttırarak in vitroda hücre migrasyonunu kolaylaştırdığı ve in vivo da meme kanser invazyonunu başlattığı gösterilmiştir (2,32). miR-10b, in vitro da Twist (sapma) epitelyal mezenkimal geçişini (EMT) ve meme tümör metastazını ilerletir ve miR-10b direk olarak transkripsiyonel açıdan Twist ile regüle edildiği bildirilmiştir (2). Bu sonuçlar Gee et al. (54) tarafından 92 nodal metastazi olan ve 127 nod-negatif olan primer meme kanseri teşhisi konmuş hastalarda tekrar araştırılmış ve miR-10b seviyeleri ile metastaz ya da prognoz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmediği bildirilmiştir (32). Aksine, miR-335, miR-206 ve miR-126 insan meme kanser metastazının süpresör miRNAları olarak tanımlanmıştır. miR-335 veya miR-206 overekspresyonu akciğer metastatik LM2 hücreleri ile kemik metastatik BoM1 hücrelerinin migrasyonlarını azaltır. İnsan meme tümörlerindeki miR-335 ve miR-126 ekspresyonu metastatik nüks ile ters ilişkilidir (2). Tavazoie et al. (55) miR-335, miR-126 ve miR-206'nın metastatik loci'de down-regüle olduğunu göstermiştir. miR-335 ve miR-126 özellikle metastaz yapmayan döngü ile zayıf bir ilişki göstermektedir (32). Metastatik hücrelerde 6 protein kodlayan genin miR-335 tarafından baskılandığı gösterilmiştir. Bu protein hedefleri arasındaki transkripsiyon faktörlerinden tenascin C ve progenitör hücre gelişimini ve migrasyonunu regüle ettiği bilinen transkripsiyon faktörü SOX4'ün susturulması in vitro ve in vivo da metastatik potansiyeli azaltmaktadır. Bu sonuçlar; miR-335 kaybının metastazda kritik efektör olarak rol oynadığına işaret etmektedir. Benzer şekilde let-7 ailesi, kök hücre benzeri özelliklere sahip olan ve potansiyel olarak meme tümörü oluşumunu başlatan hücrelerde, çoğunlukla sabit olarak

down-regüle edilen miRNAlardandır. let-7 ailesi üyeleri H-RAS ve HMGA2 gibi birden fazla hedefi susturabilmektedir (32). miR-200 ailesi ve miR-205 tümör metastazında önemli bir erken evre olarak kabul edilen EMT'yi regüle ederler. Mezenkimal fenotipteki invazif meme kanseri hücre hatlarında, bu miRNAların ekspresyonları azalır. düşük ekspresyonu, TGF-B aracılı EMT'yi önler. Aksine bu miRNAların mezenkimal hücrelerde aşırı ekspresyonları mezenkimalden epitelyal dönüşümünü başlatır. miR-200 ailesi EMT indüksiyonu ve tümör metastazında rol alan ZEB1 ve SIP1'i repress eder. ZEB1-miR200 ailesi feed-forward döngüsü EMT'yi stabilize edebilir ve dolayısıyla kanser hücre invazyonunu ilerletebilir. miRNAların metastazi regüle ettiğiyle ilgili kültür hücrelerinde yapılan bu bulgulardan dolayı transgenik ve knockout farelerde yapılan ve yapılacak olan in vivo miRNA çalışmaları oldukça önem arz etmektedir (2,32).

Sonuç olarak miRNAların gerek hücre siklusu regülasyonundaki önemi, gerek onkogenik, tümör süpresör ya da metastatik özellik göstermesi meme kanseri teşhis ve tedavisindeki önemini ortaya koymaktadır. Gerçekten de son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle de miRNAların dominant olarak aktarılan nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün rahatsızlıklar, kanser ve viral enfeksiyonların gelişiminde önemli rol oynadıkları göz önünde bulundurulduğunda, RNA mekanizmalarının açığa çıkartılmasının ve terapötik kullanımının teşhis ve tedavideki önemi gün geçtikçe güçlenmektedir. Dolayısıyla miRNAların bu hastalıkların tedavilerinde kullanılmaya başlanmasının yeni bir çığır açacağı beklenmekte olup geliştirilecek olan terapötik yaklaşımların gerek hastalar gerekse klinisyenler için umut vaad edici olduğu düşünülmektedir (1,24).

Kaynaklar

1. Nakahara K, Carthew RW. Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(2):127-133.
2. Yu Z, Baserga R, Chen L, Wang C, Lisanti MP, Pestell RG. microRNA, cell cycle, and human breast cancer. *Am J Pathol.* 2010;176(3):1058-64.
3. Reinhart BJ, Bartel DP: Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* 2002, 297:1831
4. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-54
5. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75:855-62
6. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;23;116(2):281-97.
7. Michael T, McManus. Small RNAs and Immunity 2004, *Immunity*, Vol. 21, 747-756.
8. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT: c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005, 435:839-843
9. Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development.* 2005 Nov;132(21):4653-62.
10. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(2-3):75-86.
11. Carthew RW. Gene regulation by microRNAs. *Curr Opin Genet Dev.* 2006;16(2):203-8.
12. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10:1957-66.
13. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, et al. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23:4051-60
14. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:1097-101
15. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007 23:175-205.
16. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;19(1):92-105.
17. Ruby JG, Jan C, Player C, Axtell MJ, Lee W, et al. 2006. Large-scale sequencing reveals 21 URNs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell* 127:1193-207
18. Scherr M, Eder M. Gene silencing by small regulatory RNAs in mammalian cells. *Cell Cycle.* 2007;15;6(4):444-9.
19. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Høydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW 2nd, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2007;13(5):613-8.
20. Xiao C., & Rajewsky, K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 2009;136(1), 26-36.
21. Cameron JE, Yin Q, Fewell C, Lacey M, McBride J, Wang X, Lin Z, Schaefer BC, Flemington EK. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *Journal of Virology* 2008;82(4), 1946-1958.
22. Gonzalez-Alegre P. Therapeutic RNA interference for neurodegenerative diseases: from promise to progress. *Pharmacol Ther* 2007 114: 34-55
23. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002;418:38-39.
24. Hammond SM. RNAi, microRNAs, and human disease. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006 Nov;58 Suppl 1:s63-8.
25. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;2;101(9):2999-3004
26. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;9;435(7043):834-8.
27. Guarnieri DJ, DiLeone RJ. MicroRNAs: A new class of gene regulators. *Ann. Med.* 2008;40(3):197-208
28. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005;11;120(5):635-47
29. 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.
30. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Kerin MJ. MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer *J Oncol.* 2009;2009:950201.
31. Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamlieel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genomewide microRNA

- profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(26):9740-4.
32. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:369-378.
 33. Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res*. 2005 Sep 28;33(17):5394-403.
 34. Shen J, Ambrosone CB, Zhao H. Novel genetic variants in microRNA genes and familial breast cancer. *Int J Cancer* 2009;124(5):1178-82.
 35. O'Day E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(2):201.
 36. Liu Q, Fu H, Sun F, Zhang H, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X. miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Res* 2008;36:5391-5404.
 37. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zanasi N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia, *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:5166-5171.
 38. Hossain A, Kuo MT, Saunders GF. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol* 2006;26:8191-8201.
 39. Yu Z, Wang C, Wang M, Li Z, Casimiro MC, Liu M, Wu K, Whittle J, Ju X, Hyslop T, McCue P, Pestell RG. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *J Cell Biol* 2008;182:509-517.
 40. Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B, Roy S, Datta J, Shapiro CL, Jacob S, Majumder S. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* 2008;283:29897-29903.
 41. Zhao JJ, Lin J, Yang H, Kong W, He L, Ma X, Coppola D, Cheng JQ. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem* 2008;283:31079-31086.
 42. Sun F, Fu H, Liu Q, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X. Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett* 2008;582:1564-1568.
 43. Eiriksdottir G, Johannesdottir G, Ingvarsson S, Bjornsdottir IB, Jonasson JG, Agnarsson BA, Hallgrimsson J, Gudmundsson J, Egilsson V, Sigurdsson H, Barkardottir RB. Mapping loss of heterozygosity at chromosome 13q: loss at 13q12-q13 is associated with breast tumour progression and poor prognosis. *Eur J Cancer* 1998;34:2076-2081.
 44. Kondo N, Toyama T, Sugiura H, Fujii Y, Yamashita H. miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer. *Cancer Res* 2008;68:5004-5008.
 45. Korpala M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 2008; 283:14910-14914.
 46. Iliopoulos D, Polytaichou C, Hatziaepostolou M, Kottakis F, Maroulakou IG, Struhl K, Tschichlis PN: MicroRNAs differentially regulated by Akt isoforms control EMT and stem cell renewal in cancer cells. *Sci Signal* 2009, 2:ra62.
 47. Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 2006;124:1111-1115.
 48. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007;131:1109-1123.
 49. Dangi-Garimella S, Yun J, Eves EM, Newman M, Erkeland SJ, Hammond SM, Minn AJ, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *EMBO J* 2009;28:347-358.
 50. Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szasz AM, Wang ZC, Brock JE, Richardson AL, Weinberg RA. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 2009;137:1032-1046.
 51. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2257-2261.
 52. Kong W, Yang H, He L, Zhao J-j, Coppola D, Dalton WS, Cheng JQ. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* 2008;28:6773-6784.
 53. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 2007;449(7163), 682-688.
 54. Gee HE, Camps C, Buffa FM, Colella S, Sheldon H, Gleadle JM, Ragoussis J, Harris AL. MicroRNA-10b and breast cancer metastasis. *Nature* 2008;455:E8-E9.
 55. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massague J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008; 451(7175), 147-152.