

# MikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi

Dilek Aşçı Çelik, Pınar Aslan Koşar, Nurten Özçelik

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Isparta, Türkiye.

## Özet

MikroRNA'lar (miRNA'lar), endojen küçük RNA'ların bir sınıfını oluşturan, protein kodlamayan, yaklaşık 20-23 nükleotid uzunluğunda RNA molekülleridir. Bu moleküllerin özellikle hücre tipinin belirlenmesi ve hücre farklılaşması olmak üzere pek çok fizyolojik olaylarda ve patolojik durumlarda önemli düzenleyici roller aldığı gösterilmiştir. Ayrıca kanserde hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı rol oynadıkları açığa çıkmıştır. Pek çok kanserde bazı miRNA'ların onkogen, bazılarının ise tümör baskılayıcı gen gibi işlev görmesi, tümör ilerlemesi, metastazı ve invazyonunda miRNA'ların düzenleyici olduğunu göstermektedir. miRNA'ların karsinogenezde etkili olabileceklerinin anlaşılmasıyla birlikte, farklı kanser türlerinde spesifik hücre tiplerinde miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelenmiş, miRNA'ların normal ve patolojik dokular arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Gen ekspresyonunu düzenlediği gösterilen miRNA'ların kanser hücrelerindeki seviyelerinin normal hücrelerle karşılaştırılması kanserin tanı, takip ve tedavisinde önem kazanmıştır. Son yıllarda işlevlerinin ve kanserdeki rollerinin anlaşılmasına başlanması ile miRNA'lar kanserin moleküler patolojisinin anlaşılmasında ve moleküler hedefe yönelik tedaviler geliştirilmesinde umut olmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** MikroRNA, kanser, onkogen, tümör süpressör gen

## Abstract

### Micro RNAs and their relation with cancer

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding endogenous RNA molecules usually 20-23 nucleotides in length. They have shown a role in many physiological and pathological processes including cell characterization and differentiation. Additionally some miRNAs were identified as oncogenes while some others are tumor-suppressors in cancer. This data indicates their modulatory effects on tumor progression, invasion and metastasis. After the effects of miRNA's on carcinogenesis were discovered, expression levels of miRNAs on different cancer and normal cell lines were evaluated and differences found between normal and pathological tissues. Comparisons of miRNA expression levels between cancer and normal cells have gained attention on diagnosis, prognosis and treatment of cancer. With the increasing knowledge about miRNA functions and their roles in cancer, they became a new hope for understanding molecular pathology of cancer and for developing molecular targeting treatment methods.

**Keywords:** MicroRNA, cancer, oncogene, tumor suppressor gene

**Yazışma Adresi:** Arş. Gör. Dilek Aşçı Çelik  
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD,  
Isparta  
Tel: 0246 211 33 36  
E-mail: diileek@gmail.com

Müracaat tarihi: 15.02.2013  
Kabul tarihi: 18.06.2013

## Giriş

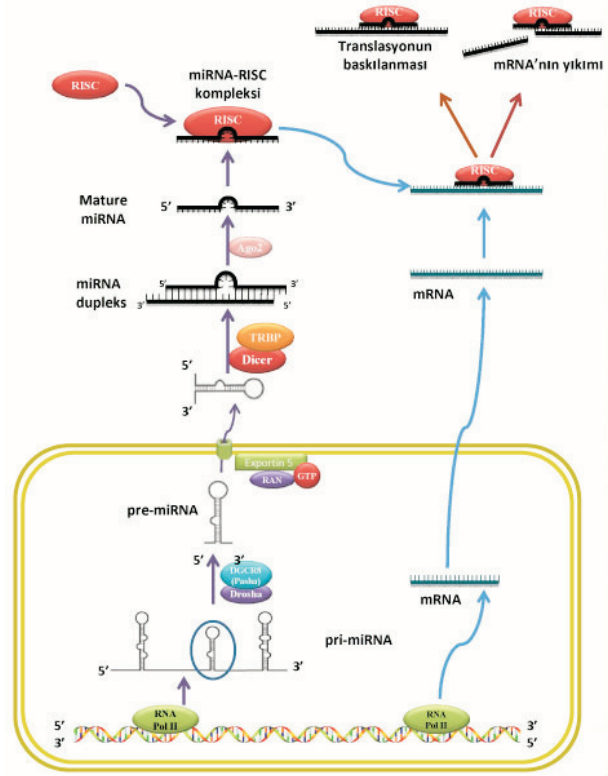
MikroRNA'lar (miRNA'lar), endojen küçük RNA'ların (small RNA) bir sınıfını oluşturan, protein kodlamayan RNA molekülleridir (1,2). Yaklaşık 20-23 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli miRNA'ların sayısı insanlarda bini geçmektedir (3). Bu moleküllerin çeşitli biyolojik olaylarda ve patolojik durumlarda önemli düzenleyici roller aldığı gösterilmiştir. miRNA'ların hücrel gen ekspresyonunu transkripsiyonel ve post transkripsiyonel seviyede düzenlediği düşünülmektedir (4). mRNA'lara hedef genin düşük özgüllükte bağlanmasına, mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden olabileceği için miRNA'lar gen ifadesinin kontrolünde önemli rollere sahiptir (5,6).

miRNA'lar özellikle hücre tipinin belirlenmesi ve hücre farklılaşması olmak üzere pek çok fizyolojik işlemde rol alır. Çeşitli kanserlerde bazı miRNA'ların onkogen, bazılarının ise tümör baskılayıcı gen gibi işlev görmesi, tümör ilerlemesi, metastazı ve invazyonunda miRNA'ların düzenleyici olduğunu göstermektedir (2,7).

## MikroRNA'ların Biyogenez ve Moleküler Etki Mekanizması

miRNA'ların sentezi miRNA genlerinden RNA polimeraz II (RNA pol II) enzimi aracılığıyla öncü miRNA (pri-miRNA) sentezlenmesiyle başlar. Saç tokası şeklinde oluşan pri-miRNA nükleusta bulunan bir RNaz olan Drosha ve RNA bağlanma noktası bulunan bir protein DGCR8/Pasha'dan oluşan mikroişlemci komplekse bağlanır ve 60 ile 70 nükleotidlik parçalar haline getirilerek pre-miRNA haline dönüştürülür (2,6,8-10) Nükleusta oluşan pre-miRNA'lar Exportin 5 adı verilen molekül aracılığıyla sitoplazmaya taşınır (11). Sitoplazmaya geçen pre-miRNA RNA-pol III'ün bir türü olan dicer tarafından kesilerek 20-25 nükleotidlik olgun miRNA ve onun komplementeri miRNA\*'dan oluşan çift sarmal halini alır (12,13). Daha sonra miRNA:miRNA\* ikilisi helikaz tarafından çözülerek olgun miRNA ve miRNA\*'ya dönüşür (3,14). AGO2 adı verilen argonat proteini olgun miRNA'yı 5'ucundan seçer. AGO2, miRNA ve çeşitli proteinler, kısaca RISC olarak tanımlanan RNA ile uyarılmış susturma kompleksini oluştururlar. miRNA'yı içeren RISC kompleksi, mRNA'yı hedefleme yeteneğine sahiptir (2). Hedef seçiminde "çekirdek-seed" adı verilen bölge mRNA'ya bağlanmayı sağlayan kısımdır (15). Bununla birlikte, miRNA ya da mRNA'lara bağlanan proteinler de hedef seçimini etkiler (16).

RISC içindeki miRNA'lar, hedef mRNA'ları 3' UTR bölgelerindeki baz eşleşmesine göre belirler (6). miRNA'lar, mRNA'ların 3'UTR bölgesine yüksek oranda komplementerlik gösterirse mRNA degrade olur. Ancak komplementerlik azaldıkça mRNA'nın translasyonu baskılanır (11). Genel olarak miRNA'lar post transkripsiyonel düzenlenmeyi; translasyonu baskılayarak veya mRNA hedeflerinin yıkımını sağlayarak yapar (17). (Şekil) Etkilenen mRNA'lar, RISC-proteinleri boyunca, granüler sitoplazmik 'P-organları' içinde birikir ve mRNA miktarında azalma gerçekleşir (18,19). Bu durum, mRNA miktarı ölçülerek miRNA aktivitesinin değerlendirilebilmesi açısından önemlidir. miRNA'ların DNA üzerinde kodlayan bölgelerde ve mRNA 5'UTR'lerde de bağlanma bölgeleri bulunduğu dair bilgiler literatürde yer almaktadır. Bu durum miRNA'ların, mRNA translasyonunun düzenlenmesinde etkili olabileceğini de ortaya koymaktadır (2).



Şekil: Mikro RNA'ların biyogenez

### **MikroRNA'ların Onkogenik ve Tümör Baskılayıcı Özellikleri**

miRNA'lar hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı özellik kazanabilir.

Çeşitli kanser vakalarında, ekspresyonları artan miRNA'lar onkogen miRNA olarak adlandırılmaktadır. Onkomir olarak tanımlanan miRNA'lar tümör baskılayıcı genleri ya da hücre farklılaşmasını kontrol eden genleri etkileyerek tümör gelişimine neden olabilirler (20,21). Tümör baskılayıcı miRNA'lar ise tümör oluşumunu, onkogenleri baskılayarak engeller.

### **Kanser oluşumunda etkili olduğu bilinen onkogenik ve tümör baskılayıcı miRNA'lar**

**miR 17-92 genleri:** Onkogenik işlev gören bir gen ailesidir. 13q31 kromozomunda yer alan polisistronik bir miRNA'dır. Bu gen ailesi, miR-17, miR-18a, miR-19a, miR20a, miR-19b-1, miR-92-1 olmak üzere altı miRNA kodlar. miR 17-92 ekspresyonu, normal dokulara göre küçük hücreli akciğer kanseri ve insan B hücre lenfomasında artış göstermiştir. Hematolojik malignitelerde, meme, kolon, akciğer, pankreas, prostat, mide ve lenfoma gibi kanser türlerinde yüksek seviyede ekspresyonu gerçekleşmektedir (22). Ekspresyon sonucu oluşan miRNA'lar, proliferasyonu arttırarak, apoptoz inhibisyonunu sağlayarak ve tümör anjiyogenezi tetikleyerek kanser oluşumuna neden olmaktadır. PTEN ve RB2 gibi tümör baskılayıcı genleri hedefleyerek bu genlerin inaktive olmasını sağlarlar (1,23).

**miR 372 ve miR 373 genleri:** Bu onkogenik miRNA'lar LATS2 tümör baskılayıcı genin ekspresyonunu ve p53 aracılı CDK'ı inhibe ederek tümör gelişimine neden olmaktadır (1).

**miR-21 geni:** Onkogenik fonksiyon gösteren bir miRNA'dır. Çeşitli neoplazmlarda PTEN1 ve PDCD4 gibi önemli tümör baskılayıcı genleri hedef aldığı belirlenmiştir (24). mir-21'in AML (Akut miyeloid lösemi), KLL(Kronik lenfositik lösemi) gibi hematolojik malignitelerde ve pankreas, prostat, mide, kolon, akciğer, meme ve karaciğer kanseri gibi birçok kanser türünde yüksek seviyede ekspresyonu gözlenmiştir (25,26). mir-21'in, PTEN'in mRNA'sını hedefleyerek invazyon ve metastaz olaylarında etkili olduğu bildirilmiştir (1,27).

**miR 15a ve miR 16-1 genleri:** Bu genler, kanserlerin pek çok tipinde anahtar rol oynayan anti-apoptoz gen olan Bcl-2 genini hedefleyerek normal apoptotik bir yanıt meydana getirmektedir. Bu nedenle belirtilen

genler tümör süpresör gen olarak da işlev görürler (1,27).

**Let-7 geni:** İlk keşfedilen miRNA' olan let-7, aynı zamanda tümör baskılayıcı işlev gösterdiği belirlenen ilk miRNA'lardandır. Let-7'nin kanserlerde genellikle delesyona uğrayan bir kromozomal bölgede bulunması ve gen ifadesinin azalmasının onkogenik farklılaşma kaybına yol açtığı belirlenmesi tümör baskılayıcı etki gösteren bir miRNA olarak kabul edilmesine sebep olmuştur (20).

**miR-29:** miR-29a, miR-29b, miR-29c olmak üzere üç adet izoformu bulunan miR-29, genlerinin üyelerinin KLL (26), akciğer kanseri (28), invaziv meme kanseri (29), AML'de (26) etkili olduğu gösterilmiştir.

**miR-143:** Çeşitli kanser çalışmaları bu genin anormal hücre büyümesini baskıladığını göstermiştir. Meme, serviks, kolorektal, mesane ve hipofiz tümörlerinde, miR-143'ün tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı bildirilmektedir. Serviks kanserinde hücre proliferasyonunu baskıladığı, kolorektal kanser hücrelerinde ise KRAS ve KRAS'ın aşağı sinyal yolunu doğrudan inhibe ettiği gösterilmiştir (30).

### **MikroRNA'ların Kanser ile İlişkisi**

Protein kodlayan onkogen ve/veya tümör süpresör genlerdeki değişimlerin kansere neden olduğu bilinmektedir. Son yıllarda tümör oluşumunda miRNA'ların da etkili olduğunun gösterilmesi ile kanserin genetik nedenlerinin daha karmaşık olduğu bildirilmiştir (20). Kanserle ilişkilendirilmiş genomik alanlar ya da frajil bölgelerin %50'sinden fazlasının miRNA'yı kodlayan genlerden oluşması miRNA'ların kanser patojenezinde önemli olduğunu ortaya koymuştur (27). Pek çok çalışma miRNA'ların hücre büyümesi ve apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinde rol aldığını göstermiştir (31,32).

miRNA'ların karsinogenezde etkili olabileceğinin anlaşılmasıyla birlikte, farklı kanser türlerinde spesifik hücre tiplerinde miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelenmiş, miRNA'ların normal ve patolojik dokular arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir (33,34). mRNA ekspresyon profilini belirlemede kullanılan yöntemler aynı zamanda miRNA'ların kanserdeki potansiyel rolünü/rollerini tespit etmek için yapılan çalışmalarda da kullanılmaktadır. Çeşitli miRNA'ların kanser hücrelerinin farklılaşmasında, tümör progresyonu ve metastazında spesifik rol oynadığı gösterilmiştir (35). miRNA genleri ve kanser arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışma Calin ve ark. (36) tarafından

yapılmıştır. KLL hastaları ile yapılan çalışmada, hastaların yarısından fazlasında görülen 13q14 delesyonundan daha önce düşünüldüğü gibi bir “tümör baskılayıcı” geni hedeflemek yerine miR-15 ve miR-16 genlerinin sorumlu olabileceğini göstermişlerdir. Cimmino ve ark. (37) BCL2 antiapoptotik geninin iki farklı miRNA tarafından manipüle edildiğini ve BCL2'nin aşırı eksprese olduğu lösemi hücre serilerinde terapötik olarak kullanılabileceklerini bildirmişlerdir.

Solid tümörler ve normal dokuların miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılık Michael ve ark. (38) tarafından rapor edilmiştir. Benzer şekilde meme kanserinde (2), Burkitt's lenfomada (39), malign beyin tümörlerinde (40), tiroid kanserinde (41), akciğer kanserinde (42), prostat kanserinde (23), mesane kanserinde ve kolon kanserinde miRNA seviyelerinde değişiklikler (43) olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.

Lamy ve ark. (43), 283 miRNA'nın mesane, prostat ve kolon kanserlerinde genomik DNA'daki kopya sayısı değişimini araştırmışlardır. Prostat ve kolon kanserlerinde kopya sayısının arttığı bölgelerde miRNA'ların yüksek oranda bulunduğunu, kopya sayısının azaldığı bölgelerde ise az olduğunu gözlemlemişlerdir. Mesane kanserinde ise kopya sayısı ile miRNA seviyesi arasında ters ilişkinin olduğunu belirlemişlerdir. Takamizawa ve ark.(44) akciğer kanseri ile ilgili in vitro ve in vivo çalışmalarında, azalmış let-7 ekspresyonu gözlemlemişlerdir. Ras ve myc onkogenlerinin, p53 tümör baskılayıcı gen ile birlikte, akciğer kanserinde anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Akciğer tümör dokusunda, normal akciğer dokusuna göre, let-7 seviyesinde belirgin miktarda azalma, Ras proteini miktarında ise dikkat çekici bir artış olduğu saptanmıştır. Ras'ın let-7 ile düzenlenmesinin akciğer onkogeninde bir mekanizma olduğunu ileri sürmüşlerdir (45). Let-7'nin tersine miR17-92 ekspresyonu, akciğer kanserlerinin en agresif şekli olan küçük hücreli akciğer kanserinde artış göstermektedir (23). Çalışmalar miR17-92 ile küçük hücreli akciğer kanserlerinde aşırı miktarda sentezlendiği bilinen c-myc onkogeni arasında bir bağıntı olduğunu göstermiştir (22). Let-7'nin meme kanserinde de etkili olduğu gösterilmiş ve artan let-7 miktarının meme dokusunda, kanserli hücrelerin artışını yavaşlattığını ortaya konmuştur (46). İorio ve ark. (29) miRNA ifadelerinin normal ve neoplastik meme dokusu arasında farklılık gösterdiğini, özellikle miR-125b, miR145, miR-21 ve miR-155

miRNA'larının ifadelerinin meme kanseri dokusunda oldukça azalmış olduğunu gözlemlemişlerdir. 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.

Chan ve ark. mir-21'in glioblastom hastalarında anlamlı şekilde arttığını ve mir-21 susturulmuş glioblastom hücre serilerinin kaspaz aktivasyonu ile apoptozise yönlendiklerini bildirmişlerdir (40). Lars ve ark. (47) 106 mesane tümörü ve 11 normal ürotelyumda 290 miRNA'nın ekspresyonunu karşılaştırmışlar, mir-145, mir-143, mir-125b'nin miRNA'nın ekspresyonu azalırken; mir-21 ekspresyonunun arttığını bulmuşlardır. Kanser dokusunda mir-145'in en çok ekspresyonu azalan ve mir-21'in kanser dokusunda en çok ekspresyonu artan miRNA'lar olduğunu belirtmişlerdir. James ve ark. (48) 52 ürotelyal karsinom, 6 ürotelyal karsinom hücre serisi ve 20 normal ürotelyumla 322 miRNA'nın ekspresyonunu RT-PCR yöntemiyle analiz etmişlerdir. mir-133b, mir-125b, mir-143, mir-100, mir99a ve mir-204'ün düşük dereceli ürotelyal karsinoma göre normal ürotelyumda fazla eksprese olduğunu saptamışlardır. miRNA değişimlerinin tümör progresyonunu tahmin etmede kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Chen ve ark. (49) mir-143'ün KRAS onkogeninin translasyonunu kolorektal kanser hücrelerinde inhibe ettiğini saptamıştır. Akao ve ark. (50), 63 kolorektal kanser, 65 adenoma dokusu ve tümör içermeyen komşu dokularda miRNA profilini incelemiş, mir-143 ve mir-145'in ifadelerinin kanser ve adenoma dokularında azaldığını tespit etmişlerdir. Bu azalmanın tümörögenезin erken safhalarında olduğunu ve mir-143 kullanılarak yapılan RNA bazlı tedavinin kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği belirtmişlerdir (50). Saetrom ve ark. (51), BMPRII geninde mir-125b'nin bağlandığı bölgedeki polimorfizmin meme kanseri riskini arttırdığını belirtmişlerdir. Çocukluk çağı lösemilerinde mir-125b ekspresyonunun arttığı ve mir-125b'nin onkogenik potansiyelde olduğu bildirilmiştir (52). Kanserde herhangi bir genin tek başına incelenmesi yerine, gen ekspresyonunun genel analizi, tanı açısından önem kazanmıştır. DNA mikrodizininin kullanımı, onbinlerce genin aynı anda incelenmesine olanak vermiştir. Farklı tümörlerin gen ekspresyon profilleri kıyaslanarak, moleküler bir sınıflama yöntemi geliştirilmiştir. Bu tür çalışmalar, gen ekspresyon profillerinin, başka özellikleri bakımından

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 (1).

Kanser patolojisinde miRNA'nın işlevlerini çalışmak için up ya da down miRNA ekspresyonunu düzenlemek önem kazanmıştır. Bu amaçla miRNA'nın işlevi çalışılırken antisens inhibitörler, transgenikler, spesifik promotörler, real time PCR ve miRNA mikroarray gibi çeşitli yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (1,53).

### Sonuç

miRNA'ların keşiflerinden bu yana biyogenezi ve moleküler etki mekanizması ile ilgili oldukça fazla bilgi edinilmiştir. Son yıllarda başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın gelişiminde miRNA'ların düzenlenmesindeki bozuklukların yer aldığı gösterilmiş, ifade profillerinin tanı ve tedavide faydalı kriterler sağlayacağı öngörülmüştür. Büyüme, gelişme, farklılaşma ve hücre çoğalması gibi olayları kontrol eden miRNA'larda kanserleşme sürecinde işlev bozuklukları ortaya çıkmaktadır. Kanserli dokularda miRNA'ların ifade düzeylerinin belirlenmesi ve hedefledikleri mRNA'ların değerlendirilmesi ile miRNA'ların kanserin erken tanısında ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli faydalar sağlayacağı düşünülmektedir.

Tümör dokuları ve normal dokularda farklı seviyelerde ifade edilen miRNA'ların tanınması, bu miRNA'ların insan kanserlerindeki görevlerinin belirlenmesi çeşitli kanserlerdeki rolünün aydınlatılabilmesi için yararlı olabilir

miRNA ekspresyon profili, miRNA'ların kanser patogeneziindeki fonksiyonunu araştırmak için iyi bir başlangıç noktasıdır. Belirli bir miRNA'nın kanserli hücredeki yokluğu ya da fazla sentezlenmesi miRNA'nın kanser başlangıcı ve gelişimindeki özel rolünü çalışmaya imkân vermektedir. miRNA'lar kanserin moleküler patolojisi ile ilgili sorulara cevap olmaya aday gözükmektedir. Çeşitli kanserlerde miRNA'ların tanı ve tedavide kullanılabilmesi için verilerin belirli standartlara getirilmesi ve hedeflerinin doğru tanımlanması gerekmektedir. Her miRNA molekülü çok sayıda farklı mRNA'ya, her mRNA'da farklı miRNA'lara bağlanabilmektedir. Bu nedenle miRNA'ların ifade etkinliklerini ve hedeflerini belirlemeye yönelik yeni bulgulara ihtiyaç

duyulmaktadır.

### Kaynaklar

1. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, et al. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. 2006;103:9136-41.
2. Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Molecular Oncology*. 2010;4:230-41.
3. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing (Reprinted from *Cell*, vol 123, pg 631-640, 2005). *Cell* 2007; 131: 63-73.
4. Jackson RJ, Standart N. How do microRNA's regulate gene expression? *Sci STKE*. 2007;1:367.
5. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004; 431(7006):350-5.
6. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function (reprinted from *Cell*, vol 116, pg 281-297, 2004). *Cell* 2007;131:11-29.
7. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA. MicroRNAs-the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer* 2009;9(4):293-302.
8. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna-A Publication of the Rna Society*.2004; 10:185-91.
9. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95-8.
10. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development* 2003;17:3011-6.
11. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med*. 2006;12(12):580-7.
12. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C-elegans* developmental timing. *Cell* 2001;106:23-34.
13. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint 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;293:834-8.
14. Lin SL, Chang D, Ying SY. Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly. *Gene* 2005;356:32-8.
15. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics* 2009;10:94-108.
16. Forman JJ, Collier HA. The code within the code: MicroRNAs target coding regions. *Cell Cycle* 2010;9(8)1533-41.

17. Meister G. miRNAs get an early start on translational silencing. *Cell* 2007; 131: 25-8.
18. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Tabea Z, Cougot N, Basyuk E, et al. Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. *Science* 2005; 309:1573-76.
19. Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, Ferrell JE, et al. Concordant Regulation of Translation and mRNA Abundance for Hundreds of Targets of a Human microRNA. *Plos Biology* 2009; 7 (11): e1000238
20. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(11): 857-66.
21. Wiemer EAC. The role of microRNAs in cancer: No small matter. *European Journal of Cancer*. 2007;43 (10):1529-44.
22. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; 435: 839-43.
23. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 9628-32
24. Meng F, Henson RH, Wehbe-Janek H. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133:647-58.
25. Volinia S, Calin G, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature in human solid tumors defines cancer targets. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 2006;103:2257-61.
26. 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.
27. 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.
28. Lin PY, Yu SL, Yang PC. MicroRNA in lung cancer. *British Journal of Cancer* 2010; 103:1144-48.
29. Iorio MV, Ferracin M, Liu C, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research* 2005; 65:7065-70.
30. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 2008;72:397-402.
31. 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; 33:1290-7.
32. Tanno B, Cesi V, Vitali R, Sesti F, Giuffrida ML, Mancini C et al. Silencing of endogenous IGFBP-5 by micro RNA interference affects proliferation, apoptosis and differentiation of neuroblastoma cells. *Cell Death and Differentiation* 2005;12:213-23.
33. 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.
34. Zhou YM, Chen LJ, Barlogie B, Stephens O, Wu XS, Williams DR, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:7904-9.
35. Kim YK, Yeo J, Ha M, Kim B, Kim VN. Cell adhesion-dependent control of microRNA decay. *Molecular Cell* 2011;43:1005-14
36. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U SA* 2002; 99(24):15524-9.
37. 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 U S A* 2005;102(39):13944-9.
38. 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;1:882-91
39. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:167-9.
40. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005;65:6029-33.
41. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanorachchi S, Nagy R, Volinia S, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:19075-80.
42. Seveli S, Uzumcu A, Solak M, Ittman M, Ozen M. The function microRNAs, small potent molecules in human prostate cancer. *Prostate Cancer P D* 2010;13:208-17.
43. Lamy P, Andersen CL, Dyrskjøl L, Tørring N, Ørntoft T, Wiuf C. Are microRNAs located in genomic regions associated with cancer? *Br J Cancer* 2006; 95 (10): 1415-8.
44. 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.
45. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M,

- Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 MicroRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-47.
46. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007; 131: 1109-23.
47. Lars D, Marie S and Jesper B. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. *Cancer Res.*2009;69 4851-60.
48. James W F, Saiful M, Helen C O, Freddie C H. Distinct microRNA alterations characterize high and low grade cancer. *Cancer res.* 2009;69:8472-81.
49. Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, et al. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene.*2009;28(10):1385-92.
50. Akao Y, Nakagawa Y, Hirata I, Iio A, Itoh T, Kojima K, et al. Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors. *Cancer Gene Ther.* 2010;17(6):398-408.
51. Saetrom P, Biesinger J, Li S M, Smith D, Thomas L F, Majzoub K, et al. A risk variant in an miR-125b binding site in BMPR1B is associated with breast cancer pathogenesis. *Cancer Res.* 2009; 69(18): 7459-65.
52. Gefen N, Binder V, Zaliouva M, Linka Y, Morrow M, Novosel A, et al. Hsa-mir 125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival advantage to growth inhibitory signals independent of p53. *Leukemia.*2010; 24(1): 89-96.
53. Jiang JM, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:5394–5403.