

Av **LIV THOMMESEN**, bioingeniør, Cand Scient/Dr. Philos, Førsteamanuensis, Bioingeniørutdanningen, Avdeling for mat- og medisinsk teknologi (AMMT) Høgskolen i Sør-Trøndelag (HIST)

# MikroRNA – små molekyler med stor betydning i genreguleringen

**A** LLE CELLER i kroppen har det samme arvematerialet (gener), men bare en del av genene blir transkribert (er aktive) i ei bestemt celle og under bestemte forhold. Hvilke gener som til enhver tid er aktive, avhenger av hvilke stimuli cellen blir utsatt for. Dette vil være ulikt for ulike celler og vev, og avhengig av hvor i utviklingen en organisme er. Sykdom vil eksempelvis påvirke hvilke gener som uttrykkes. Transkripsjon reguleres av både generelle og promotorspesifikke transkripsjonsfaktorer (proteiner). I de senere år har også mikroRNA sin rolle blitt kartlagt.

## Materiale og metode

Artikkelen er basert på et ikke-systematisk PubMed-søk (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>). I tillegg er følgende databaser benyttet; ExPasy Proteomic server (<http://us.expasy.org/>) og Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/>)

Relevante artikler ble valgt ut på grunnlag av tittel og sammendrag, samt forfattere/fagmiljø og faglig nivå på tidsskriftet hvor artiklene er trykt.

## miRNA – en stor familie av genregulatorer

MikroRNA (miRNA) er enkelttrådet RNA med en lengde på 21-23 nukleotider (nt) som bidrar til sekvensspesifikk genregulering. miRNA finnes i planter og dyr, de er ikke-kodende, det vil si at de blir ikke translatert til protein. Man antar at det humane genomet inneholder ca 1000 miRNA (<http://microrna.sanger.ac.uk/>). Ett bestemt miRNA

kan regulere hundrevis av målgener, og et spesifikt målgen kan reguleres av flere ulike miRNA.

miRNA har nå vist seg å være en sentral regulator av genekspresjon og styrer prosesser som differensiering, cellevekst og apoptose, og man antar derfor at miRNA har en sentral rolle i sykdomsutvikling. miRNA utgjør én – fire prosent av alle uttrykte transkript i det humane genomet, noe som gjør miRNA til den største klassen av genregulatorer. miRNA grupperes i familier etter sekvenslikhet i 5'-enden av modent miRNA, men hvorvidt miRNA innen samme familie kontrollerer de samme biologiske hendelsene, er fortsatt uvisst (1).

## Oppdagelsen av miRNA

I 1990 forsøkte en gruppe plantebiologer å forsterke den blårøde fargen til petuniaplanten ved å øke syntesen av anthocyanin. Dette ble gjort ved å

## Sammendrag

Bakgrunn: I de siste årene har det blitt kartlagt en ny gruppe transkripsjonsregulatorer, mikroRNA (miRNA). Intens forskning forsøker å avklare miRNA sin rolle i normale og ved patologiske tilstander.

Materiale og metode: Artikkelen er basert på et ikke-systematisk PubMed-søk. Relevante artikler ble valgt ut på grunnlag av tittel og sammendrag, samt forfattere/fagmiljø og faglig nivå på tidsskriftet hvor artiklene er trykt.

Resultater og konklusjon: miRNA er en omfattende klasse av små ikke-proteinkodende RNA som fungerer som sekvensspesifikke regulatorer av transkripsjon. miRNA regulerer et mangfold av biologiske prosesser som differensiering, apoptose (programmert celledød) og cellevekst. De siste årenes forskning tyder på at miRNA og miRNA-mutasjoner spiller en rolle ved kreftutvikling, blant annet ved at miRNA fungerer som tumorsuppressorer (hemmere av cellevekst) og onkogen (aktivatorer av cellevekst). Syntetiske miRNA benyttes i dag i molekylærbiologisk forskning, og danner grunnlaget for å postulere funksjon til nye og ukjente gener.

Nøkkelord: mikroRNA, transcriptional regulation, tumour suppressor, proto-oncogene.

Bioingeniøren er godkjent som vitenskapelig tidsskrift. Denne oversiktsartikkelen er invitert og akseptert av fagredaktør Kirsti Berg.



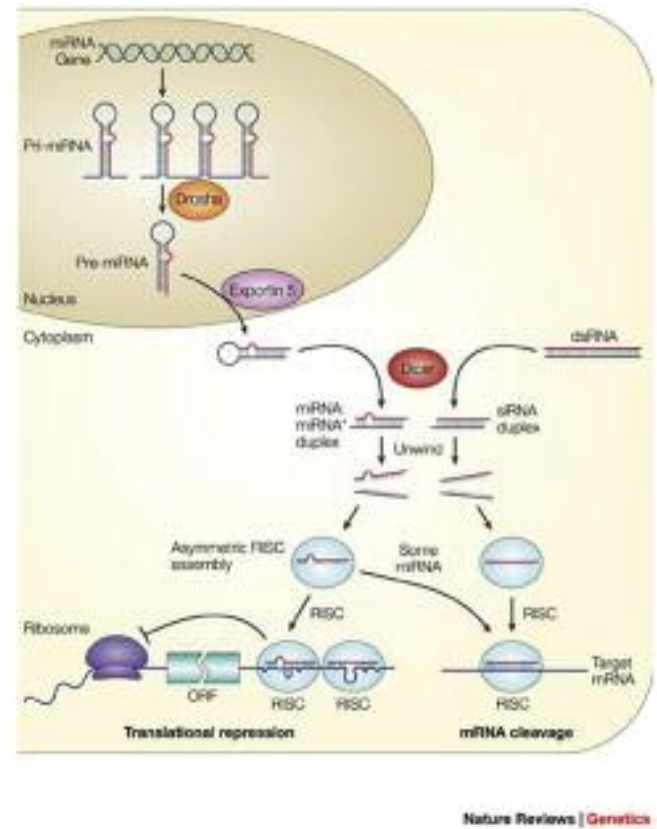
**FIGUR 1. Co-suppression.**

I et forsøk på å gi petuniaplanten dypere blåfarge, ble det laget genmodifiserte planter med økt syntese av anthocyanin. Resultatet ble hvite eller hvitflekke planter.

overuttrykke enzymet chalcone synthase (medfører økt syntese av anthocyanin) i planteceller. Uventet ble resultatet petuniaplantar som var hvite eller hvitflekke (figur 1). Fenomenet ble kalt co-suppression, men mekanismene bak var ukjente. (2,3).

Tre år senere (1993), innenfor fagområdet utviklingsbiologi og ved bruk av nematoden *C. Elegans* som modellsystem, ble det identifisert to *lin-4* transkript, hvor det minste transkriptet var komplementært til repeterende sekvenser i 3'-ikke-translatert område av genet *lin-14* mRNA (4). Disse funnene tydet på at *lin-4* kunne regulere *lin-14* translasjon via en anti-sense RNA: mRNA interaksjon, og dermed spille en viktig rolle i utviklingen av *C. Elegans*. Det ble vist at denne reguleringen var avgjørende for å komme fra larvestadiet i postembryo utviklingen i *C. Elegans*, og studien var den første som beskrev funksjonen til endogent miRNA.

Den biologiske betydningen av miRNA fikk ytterligere fokus da Fire et al (5) skaffet bevis for at dobbeltrådet (ds)RNA deltok i et fenomen kalt RNA interferens (RNAi). Andrew Fire og Craig Mello fikk



**FIGUR 2. Biogenese av mikroRNA.**

miRNA-sekvenser transkriberes til pri-miRNA og prosesseres videre til pre-miRNA og modent miRNA vha proteinkompleksene Drosha, Exportin 5 og Dicer. Modent miRNA assosierer med proteinkomplekset RISC og hemmer posttranskripsjonelt genuttrykk. (For detaljer, se tekst). Figuren er modifisert etter Lin H. og Hannon GJ. Nature; 2004, 5.

senere Nobelprisen i Fysiologi og Medisin (2006) for sine funn; dsRNA induserte en mer potent genetisk interferens enn enkelttråd i *C. Elegans*. Senere ble posttranskripsjonell "gene-silencing" kartlagt som en naturlig antiviral forsvarmekanisme, med blant annet arbeidet til Hamilton et al. (6), hvor man observerte tilstedeværelse av anti-sense viralt RNA i virusinfiserte planter. Deretter kom to studier som tydet på at dsRNA på 21-23 nt var i stand til å degradere mRNA (7,8). miRNA ble definert som en ny familie av små endogene RNA. miRNA-familien har stor diversitet i sekvens og ekspresjonsmønster, er evolusjonsmessig utbredt og er involvert i sekvensspesifikk, posttranskripsjonell regulering av genekspresjon (9-11).

## Dannelse og prosessering

Biogenesen av miRNA innebærer flere enzymatiske trinn hvorav noen av de viktigste er skissert i figur 2. miRNA blir transkribert av RNA Polymerase II, og det blir initielt syntetisert et primært transkript, såkalte

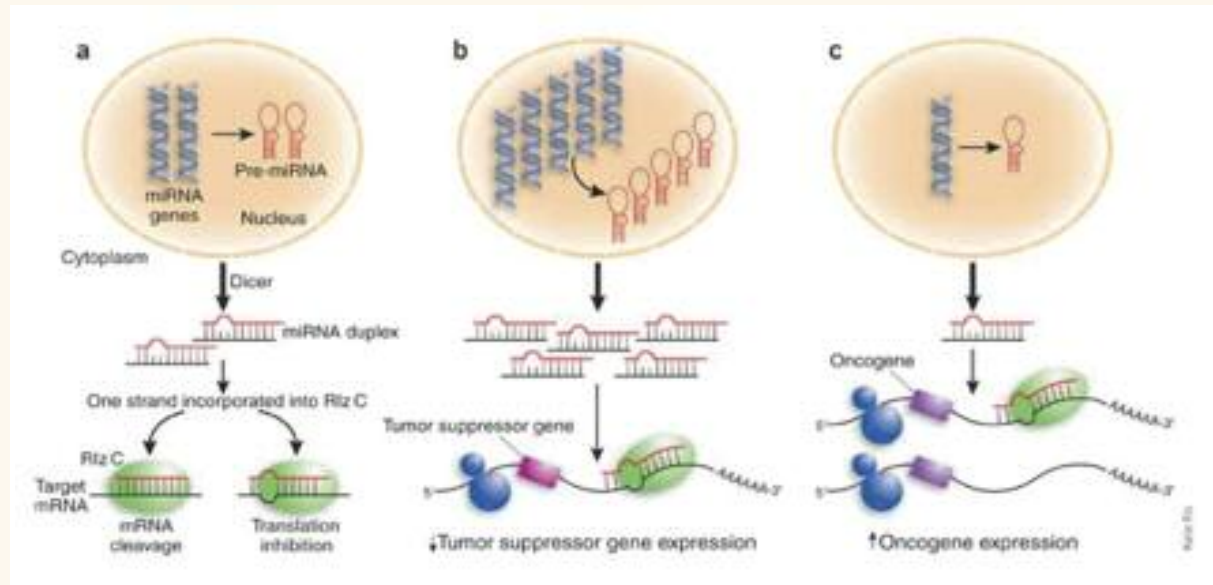
## Abstract

**Background:** In recent years a new class of transcriptional regulators has been characterized, microRNA (miRNA). Intensive research is trying to clarify the role of miRNAs in normal and pathological conditions.

**Materials and methods:** This paper is based upon a non-systematic PubMed search. Relevant publications were selected on the basis of title and abstract, as well as authors/scientific milieu and the scientific level of the publication in which the paper was published.

**Results and conclusion:** miRNA constitutes a comprehensive class of small non-coding RNAs with sequence-specific regulation of transcription. miRNA regulates a diversity of biological processes such as differentiation, apoptosis and proliferation. Recent research points to miRNA and miRNA mutations as crucial in cancer development, i.e. miRNAs acting as tumor suppressors (inhibit proliferation) or oncogenes (promote proliferation). Synthetic miRNAs are tools utilized in molecular biological research in order to illuminate the function of new and unknown genes.

**Keywords:** mikroRNA, transcriptional regulation, tumour suppressor, proto-oncogene.



**FIGUR 3. miRNA og kreft.**

A) Normal prosessering av miRNA.

B) Overuttrykk av miRNA transkript som hemmer tumor suppressorgener, fører til mindre tumor suppressorproteiner og økt cellevekst. C) Bortfall eller mindre uttrykk av miRNA transkript som hemmer onkogener, fører til økt cellevekst (RizC = RISC). Figuren er modifisert etter Esquela-Kerscher A. og Slack FJ. *Nature*, 2006; 6, 259.

*pri*-miRNA (Fig 2). Disse *pri*-miRNA blir prosessert i kjernen av RNAse II enzymet Droscha til et 70 nt pre-miRNA (12-14) som foldes til en perfekt hårnålsstruktur (15). Pre-miRNA blir deretter eksportert til cytoplasma av exportin 5, og prosesseres videre til modent og funksjonelt miRNA (21-23nt) ved hjelp av endonukleasen Dicer (15). Det modne miRNA danner hjørnet i RISC-komplekset (RNA-indusert silencing complex). RISC kløyver og degraderer mRNA eller undertrykker translasjonen av mRNA (figur 2).

miRNA-transkriptet hemmer genuttrykket på en av to måter, avhengig av grad av komplementaritet mellom miRNA og målgen. Ved fullstendig komplementaritet binder miRNA seg til mRNA og fører til at mRNA degraderes. Ved ufullstendig komplementaritet hemmer miRNA translasjon ved å binde seg til 3'-uttranslatert område av mRNA.

## miRNA og kreft

Det første belegget for at miRNA kunne være involvert i kreft kom fra en studie hvor man fant at *miR-15a* og *miR-16-1* var lokalisert innen en 30 kb delelesjon funnet i kronisk lymfatisk leukemi (CCL), og at disse transkriptene var borte eller lite uttrykt i de fleste tilfellene av denne kreftformen (16). Denne delelesjonen forekom også i 16 – 40 prosent i multiple myelom og i 60 prosent av prostatakreft. Det ble derfor antatt at tumor-suppressor-gener må ligge innenfor denne regionen. I hypofyseadenomer finner man også nedregulering av

*miR-15a* og *miR-16-1*, og nivået av nedregulering korrelerer med størrelsen på tumorens diameter, noe som tyder på at disse miRNA hemmer tumorvekst (17).

Det er også vist nylig at *miR-15a* og *miR-16-1* hemmer *bcl-2*, som er et anti-apoptotisk gen som ofte er overuttrykt i ulike kreftformer (18). Delesjon av eller nedregulering av *miR-15a* og *miR-16-1* fører til økt uttrykk av Bcl-2 proteinet, og følgene blir økt cellevekst. Rollen til *miR-16-1* i kreft har blitt ytterligere forsterket ved at man har funnet kimcellemutasjoner i transkriptet *miR-16-1* og vist at dette ofte er nedregulert i leukemier. miRNA sin påvirkning av tumor-suppressor og onkogener er forklart i figur 3.

Andre studier har også vist en sterk sammenheng mellom opphevet uttrykk av miRNA og kreftutvikling. Modent miRNA-nivå av *miR-143* og *miR-145* er signifikant redusert i tykktarmskreft (19). Interessant i denne sammenheng er at man finner hårnålsstruktur av pre-miRNA transkript i samme mengde i normalt og i sykt vev, noe som indikerer at det er prosesseringen av *miR-143* og *miR-145* som kan være ødelagt i disse cellene. Den samme miRNA-nedreguleringen er også observert i andre kreftformer (bryst, prostata, cervix mfl).

P53-proteinnet er en tumorsuppressor som stopper celledeling og øker apoptose ved DNA-skade, onkogen stress og liknende. Nylig ble flere miRNA som er regulert av transkripsjonsfaktoren P53 identifisert (20-22). Studiene viser *miR-34a* og *miR-34b/c* som direkte og konservative p53 målgener, og at disse miRNA forårsaker induksjon av apoptose,

cellesyklusarrest og cellealdring. *miR-34* ser ut til å være en sentral mediator av p53-funksjonen. Eksperimentelle forsøk hvor man overuttrykte *miR-34* førte til cellyklusarrest i G1 fasen. I en annen studie fant man at *miR-34b* og *miR-34c* hemmet proliferasjon og kolonidannelse *in vitro* (23). Ved å hemme *miR-34* i cellelinjer, fant man at hastigheten for apoptose induisert av DNA-skade ble sterkt redusert (24).

En nyere studie viser at cirka 50 prosent av alle kjente miRNA-sekvenser er lokalisert på områder av genomet som er assosiert med kreft, såkalte fragile områder. *MiR-125b-1*, en homolog av *C. Elegans lin-4*, er lokalisert på kromosom 11q24, og dette området er ofte borte i bryst-, lunge-, ovarie- og livmorhalskreft (25).

En annen studie knytter *miR-125b-1* til leukemi, og beskriver en pasient med B-celle akutt lymfoblastisk leukemi hvor man fant en insersjon av denne miRNA i lokus til IgG tunge kjede lokus (26). Denne studien tyder på at *miR-125b-1* kan fungerer som et oncomir (fremmer kreftutvikling). En annen studie viser at *miR-21* er oppregulert i glioblastom (27); *miR-21* ble funnet å være uttrykt 5-100 ganger mer i tumor sammenliknet med normalt vev. Ved å slå ut *miR-21* i gliomaceller, fant man at *miR-21* kontrollerte cellevekst ved å hemme apoptose, noe som tyder på at *miR-21* har en onkogen rolle i denne kreftformen.

## miRNA brukt i diagnostikk

miRNA kan vise seg å være nyttig i klassifisering av kreftformer, og langt bedre enn den mer vanlige klassifisering foretatt ved hjelp av mRNA ekspressionsanalyser. Lue et al. (28) benyttet miRNA mikroarray teknologi (høykapasitetsanalyser) for å undersøke systematisk profilen til 217 miRNA transkript i primære tumorer, tumorderiverte cellelinjer og i normalt vev. Resultatet viste at miRNA har ulik profil i kreft sammenliknet med normalt vev, og profilene varierer med de ulike kreftformene. Man fant også at profilene var overraskende informative ved at de gjenspeiler kreftens utviklingslinje og differensieringsstadium.

Også andre studier tyder på at miRNA kan benyttes diagnostisk og prognostisk. Nylig ble det vist at *let-7*, *miR-181b* og *miR-200c* var overrepresentert i kreftmateriale fra tykktarm sammenliknet med normalt vev. Uttrykket av *let-7* og *miR-181b* var assosiert med en klinisk respons til kjemoterapi, men var likevel ikke en signifikant prognostisk markør for overlevelse (29).

## miRNA-terapi

Oppdagelsen av miRNA som viktige krefthemmende transkripter vil sannsynlig få stor betydning i gen-terapi, hvor man ønsker å blokkere tumorprogresjon.

Storskala screening, hvor man sammenlikner miRNA-nivået i tumor versus normalt vev, vil være nyttig for å identifisere nye miRNA som er involvert i kreft. I framtida vil man forvente at syntetiske anti-sense oligonukleotider, som koder for sekvenser som er komplementære til modne onkogene miRNA (såkalte antagomiR), effektivt kan inaktivere miRNA i kreft og hemme veksten. Bruk av slike antagomiR konjugert med kolesterol, har vist seg å være effektivt for å hindre miRNA-aktivitet i ulike organ når de injiseres i mus, og kan bli et lovende terapeutisk agens (30). Omvendt, teknikker for å overuttrykke miRNA som fungerer om tumorsuppressorer, kan bli brukt for å hemme spesifikk tumorvekst.

## RNA-interferens som molekylærbiologisk verktøy

Den selektive og robuste effekten av RNA-interferens (RNAi) på genekspressjon, gjør RNAi til en verdifull teknikk som benyttes i molekylærbiologisk forskning, både i cellekulturer og i levende organismer (*C. Elegans* er mye brukt). Syntetiske siRNA (small interference RNA) eller sh-RNA (short-hairpin RNA) med en sekvens komplementær til spesifikke gener, kan transfekteres inn i celler. Man kan deretter undersøke den biologiske effekten av å "slå ut et gen" (for eksempel se på effekten på vekst, apoptose, migrasjon, lokalisasjon). RNAi kan også benyttes for storskala screening hvor man systematisk slår ut ett og ett gen i ei celle, noe som kan hjelpe til å identifisere de komponentene som er nødvendige i en spesiell cellulær prosess eller en hendelse (eksempelvis celledeling).

## Konklusjon

MikroRNAs rolle i genregulering er fortsatt for det meste ukjent, men forskningsresultater så langt tyder på at denne familien av regulatorer har stor betydning i transkripsjonell aktivering og hemming av genuttrykk. Ny kunnskap om miRNA åpner for bedre diagnostikk, prognostikk og forhåpninger om at miRNA kan benyttes i behandling av sykdommer.

## Referanser

1. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004; 5(7):522-31.
2. Napoli C, Lemieux C, Jørgensen, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.* 1990; 2(4):279-289.
3. Jørgensen R. Altered gene expression in plants due to transinteractions between homologous genes.



- Trends in Biotechnology. 1990;8(12):340-344.
4. Wightman B, Burglin TR, Gatto J, Arasu P et al. Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes and Development*. 1991;5(10):1813-1824.
  5. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-811.
  6. Hamilton, AJ; Baulcombe, DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 1999;286(5441):950-952.
  7. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000;101(1):25-33.
  8. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development*. 2001;15(2):188-200.
  9. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-858.
  10. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):858-862.
  11. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):862-864.
  12. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004;10(12):1957-1966.
  13. Lee Y, Ahn C, Han J. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-419.
  14. Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO Journal*. 2002;21(17):4663-4670.
  15. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF et al. (November 2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex". *Nature* 432 (7014): 231-5.
  16. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R et al. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Nov 26; 99(24):15524-9.
  17. Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A et al. miR-15° and miR-16-1 down-regulated in pituitary adenomas. *J Cell Physiol*. 2005; 204(1):280-5.
  18. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102 (39):13944-9.
  19. Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, Yang L et al. Clonopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Dis Markers*. 2009;26(1):27-34.
  20. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ et al. P-53 mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol*. 2007;17(15):1298-307.
  21. He X, He L, Hannon GJ. The guardian's little helper: microRNA in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res*. 2007 Dec 1;67(23):11099-101.
  22. Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D et al. Differential regulation of microRNA by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*. 2007; 6(13):1586-93.
  23. Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W et al. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res*. 2007 Sep 15;67(18):8433-8.
  24. Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 2007 Jun 8;26(5):731-43. Epub 2007. May 31
  25. Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M et al. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA*. 2005;11(4):371-382.
  26. Sonoki T, Iwanaga E, Mitsuya H, Asou N. Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2005 Nov;19(11):2009-10.
  27. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):6029-33.
  28. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834-8.
  29. Nakajima G, Hayashi K, Xi Y, Kudo K et al. Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer Genomics Proteomics 2006 Oct;3(5):317-324.
  30. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG et al. Silencing of microRNA in vivo with antagomirs. *Nature* 2005 Dec 1;438(7068):685-9.