

Ογκογόνα Μικρο - RNAs (oncomirs): microRNAs με Ρόλο στον Καρκίνο

Στέλλα Λογοθέτη, Αθηνά Γιαρίκα, Δημήτριος Μήκας, Σπύρος Βλαχόπουλος και Βασίλειος Ζουμπουρλής
Μονάδα Βιοϊατρικών Εφαρμογών, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, e-mail: vzub@eie.gr

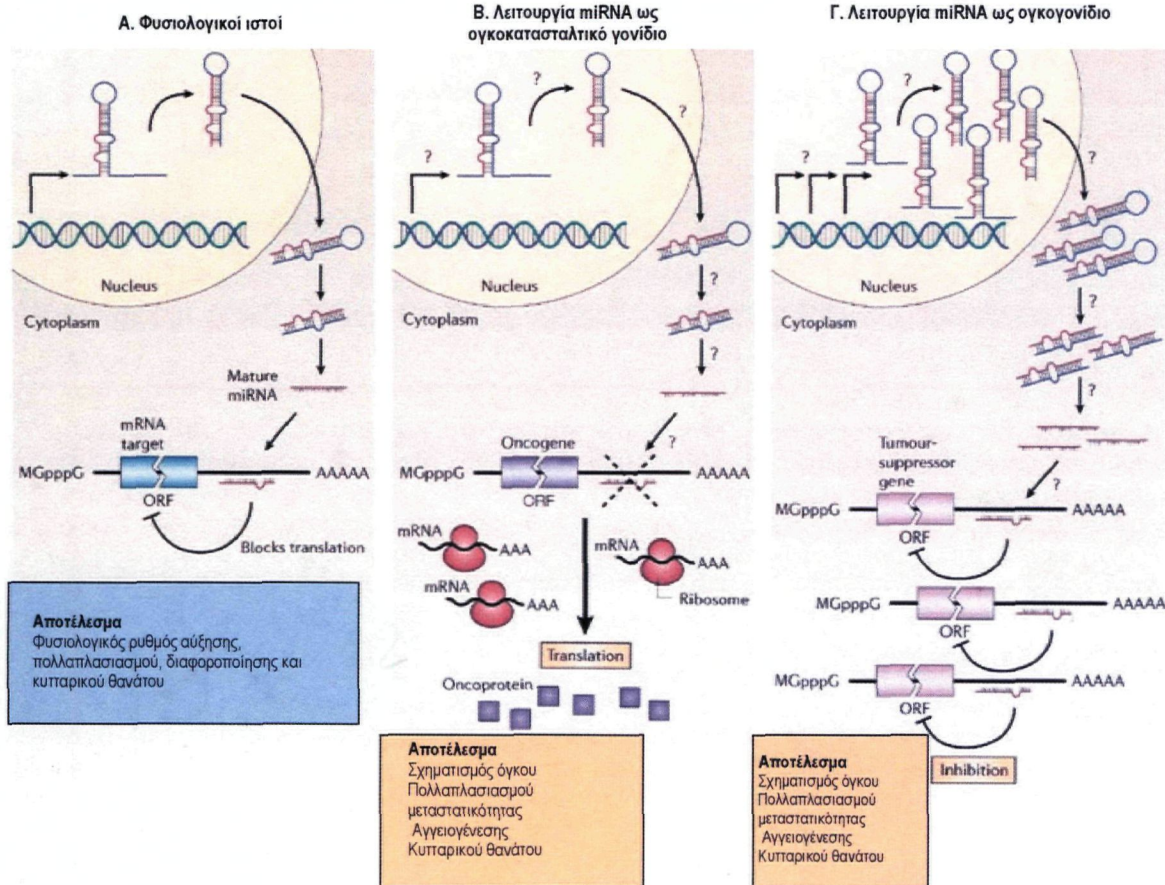
Τα μικρό-RNAs (miRNAs) είναι μια πολυπληθής οικογένεια μικρών μορίων RNAs που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αλλά δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές γονιδίων και συμμετέχουν σε ποικίλες βιολογικές διαδικασίες. Δεδομένα της βιοπληροφορικής υποδεικνύουν ότι κάθε μόριο miRNA μπορεί να ελέγξει εκατοντάδες γονιδιακούς στόχους, υποδηλώνοντας έτσι τη δυναμική επίδραση των miRNAs σε σχεδόν οποιοδήποτε γενετικό μονοπάτι. Πρόσφατα δεδομένα συσχετίζουν τις μεταλλάξεις ή την υπερέκφραση διαφόρων miRNAs με διάφορους καρκίνους του ανθρώπου. Το γεγονός αυτό καθιστά τα miRNAs πιθανά ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα miRNAs κατασιέλλουν την έκφραση σημαντικών γονιδίων που εμπλέκονται στον καρκίνο, και κατά συνέπεια θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου.

Ο καρκίνος προκαλείται από απορρύθμιση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η οποία προέρχεται από καταστροφή σε ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια (δηλαδή γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση). Τα περισσότερα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια μεταφράζονται αρχικά από DNA σε RNA και στη συνέχεια μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, προκειμένου να έχουν επίδραση στο κύτταρο. Ωστόσο, πρόσφατα στοιχεία αναιρούν αυτή τη θεμελιώδη αρχή, καθώς αποδεικνύουν ότι μικρά μόρια RNA, που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα miRNAs, μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Μόλις τώρα αρχίζει να γίνεται κατανοητό πώς αυτή η εντελώς καινούργια τάξη των γονιδιακών ρυθμίσεων εμπλέκεται σε λειτουργίες σχετικές με τον καρκίνο στον άνθρωπο. Από τα εκατοντάδες miRNAs το οποία πρόσφατα έχουν προσδιορισθεί, μόνο ένας μικρός αριθμός τους έχει χαρακτηριστεί σε άνθρωπο, μύγα και σκώληκα. Φαίνεται ότι τα μόρια αυτά ελέγχουν την κυτταρική αύξηση, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση, δηλαδή σημαντικές λειτουργίες των οποίων η απορρύθμιση οδηγεί σε σχηματισμό όγκων. Κατά συνέπεια ανώμαλη έκφραση των miRNAs σχετίζεται με ογκογένεση. Έτσι, δημιουργείται ένα νέο πεδίο έρευνας, τα ογκογόνα miRNAs (ONCOMIRS) που σχετίζονται με τον καρκίνο και τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου.

miRNAs: Μια μεγάλη οικογένεια γονιδιακών ρυθμιστών

Τα miRNAs είναι μονόκλιωνα μόρια RNA από ~22 νουκλεοτίδια, τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Συνιστούν μία νέα τάξη γονιδιακών ρυθμιστών που βρίσκονται τόσο στα φυτά, όσο και στα ζώα. Ρυθμίζουν αρνητικά τους στόχους τους με δύο διαφορετικούς τρόπους, ανάλογα με το βαθμό συμπληρωματικότητας ανάμεσα στο miRNA και το γονίδιο στόχο. Έτσι, εάν τα miRNAs έχουν τέλεια ή σχεδόν τέλεια συμπληρωματικότητα με τα mRNAs των γονιδίων-στόχων τους (τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες), τότε επάγεται το RNAi (RNA interference) μονοπάτι. Συνοπτικά, τα μετάγραφα μόρια mRNA ενώνονται με τα συμπληρωματικά τους miRNAs, με αποτέλεσμα να επάγεται η διάσπασή τους από ριβονουκλεάσες του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου miRISC (multiprotein RNA induced silencing complex). Ο παραπάνω μηχανισμός είναι πολύ συνηθισμένος στα φυτά αλλά και σε μερικά θηλαστικά. Ωστόσο τα περισσότερα miRNAs των ζώων χρησιμοποιούν ένα δεύτερο μηχανισμό που στηρίζεται στην ατελή συμπληρωματικότητά τους με τα mRNAs των γονιδίων-στόχων τους. Αυτά τα miRNAs προσδένονται με ατελή συμπληρωματικότητα στις περιοχές 3' UTRS (3' untranslated regions) των mRNA-στόχων, καταστέλλοντας τη μετάφρασή τους σε πρωτεΐνες, μέσω ενός συμπλόκου RISC παρόμοιου ή πιθανόν ταυτόσημου με εκείνο που χρησιμοποιείται στο RNAi μονοπάτι. Σ' αυτή την περίπτωση, δε συντίθενται πρωτεΐνες, όμως τα επίπεδα mRNA των πρωτεϊνών αυτών σχεδόν δεν επηρεάζονται.



Εικόνα 1:

Τα miRNAs μπορούν να δράσουν ως ογκογονίδια και ως ογκοκατασταλτικά γονίδια. Α. σε φυσιολογικούς ιστούς η φυσιολογική μεταγραφή, ωρίμανση και πρόσδεση των miRNAs σε mRNA στόχους προκαλεί την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου-στόχου, με τελικό αποτέλεσμα τους φυσιολογικούς ρυθμούς κυτταρικής αύξησης, πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και κυτταρικού θανάτου. Β. η μείωση ή η καταστολή ενός miRNA που λειτουργεί ογκοκατασταλτικά οδηγεί σε σχηματισμό όγκου. Η μείωση των επιπέδων του ώριμου miRNA μπορεί να προκληθεί σε οποιοδήποτε στάδιο της βιογένεσης (υποδεικνύεται με ερωτηματικά) και να οδηγήσει σε ανώμαλη έκφραση της πρωτεΐνης-στόχου του miRNA (μωβ τετράγωνα). Συνολικά προκαλείται αυξημένος

πολλαπλασιασμός, μεταστατικότητα ή αγγειογένεση, περιορισμός της απόπτωσης, αποδιαφοροποίηση, γεγονός που οδηγούν σε σχηματισμό όγκου. Γ. η υπερέκφραση ενός miRNA που λειτουργεί ως ογκογονίδιο μπορεί επίσης να προκαλέσει σχηματισμό όγκου. Σ' αυτή την περίπτωση, τα αυξημένα επίπεδα miRNA, που παράγονται λανθασμένες χρονικές στιγμές σε λανθασμένους ιστούς μπορούν να ελαττώσουν την έκφραση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου-στόχου του miRNA (ροζ) και να οδηγήσουν σε δημιουργία καρκίνου. Η αύξηση των επιπέδων των ώριμων μορίων miRNA μπορεί να οφείλεται σε ενίσχυση του γονιδίου του miRNA, σε έναν συνεχώς ενεργό υποκινητή, σε αυξημένη σταθερότητα του μορίου miRNA (υποδεικνύεται με ερωτηματικά) ORF: open reading frame (ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης)

Το πρώτο miRNA, το lin-4, ανακαλύφθηκε πριν από μια δεκαετία στο νηματώδη σκώληκα *Cyanoghabditis elegans*. Τότε, πολλοί ερευνητές δεν εκτίμησαν τη σημαντικότητά του, αφού θεωρήθηκε μοναδικό για τον κύκλο ζωής μόνο αυτού του οργανισμού. Σήμερα ωστόσο, υπολογίζεται ότι υπάρχουν τουλάχιστον 300 miRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα, συνιστώντας ~1-4% όλων των εκφραζόμενων ανθρώπινων γονιδίων, γεγονός που καθιστά τα miRNAs μια από τις μεγαλύτερες τάξεις γονιδιακών ρυθμιστών. Τα περισσότερα

ανθρώπινα miRNAs βρίσκονται είτε μέσα σε εσώνια mRNA μορίων, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες είτε μέσα σε εσώνια mRNA μορίων που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Τα υπόλοιπα miRNAs βρίσκονται είτε σε εξώνια mRNA γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες είτε μέσα στην 3' UTR περιοχή άλλων mRNA γονιδίων, είτε τέλος ομαδοποιημένα σε ειδικά γονίδια miRNA, όπως είναι π.χ. μία ομάδα από 54 miRNAs πάνω στο χρωμόσωμα 19.

Τα miRNAs μπορούν να ταξινομηθούν σε οικογένειες με βάση την ομολογία στο 5' άκρο τους, αν και δεν είναι ακόμη γνωστό αν τα μέλη της ίδιας οικογένειας ρυθμίζουν παρόμοιες βιολογικές διαδικασίες. Πάντως πολλά μόρια miRNAs είναι εξελικτικά συντηρημένα από τα σκουλήκια μέχρι τον άνθρωπο.

Τα miRNAs ρυθμίζουν γονιδιακούς στόχους

Επειδή τα miRNAs προσδένονται συνήθως στα mRNA των γονιδίων-στόχων τους με ατελή συμπληρωματικότητα και ζευγάρισμα G-U βάσεων, είναι πολύ δύσκολο να εντοπιστούν οι στόχοι τους με απλή ανάλυση BLAST. Προκειμένου να προσεγγίσουν το θέμα, οι σύγχρονοι επιστήμονες της βιοπληροφορικής βασίστηκαν στο ότι μέσα στις miRNA οικογένειες το 5' άκρο είναι εκείνο που παίζει ρόλο στη βιολογική δράση του μορίου. Έτσι, χρησιμοποίησαν έναν "πυρήνα" με τα πρώτα 2-8 νουκλεοτίδια του 5' άκρου του ώριμου miRNA και αναζήτησαν συμπληρωματικότητα με αλληλουχίες στην 3' UTR όλων των εκφραζόμενων γονιδίων. Με αυτή την ανάλυση βρέθηκε ότι ένα μόριο miRNA μπορεί να προσδεθεί ακόμα και σε 200 διαφορετικούς γονιδιακούς στόχους που ποικίλουν, από μεταγραφικούς παράγοντες και εκκριτικούς παράγοντες έως υποδοχείς και κυτταρικούς διαβιβαστές. Δηλαδή, τα miRNAs μπορούν δυναμικά να ελέγξουν την έκφραση περίπου του 1/3 των ανθρώπινων mRNAs.

Άλλες έρευνες, εξάλλου υποδεικνύουν ότι σημαντικό στη βιολογική δράση των miRNAs δεν είναι μόνο το 5' άκρο, αλλά και το 3', γεγονός που αυξάνει ακόμα περισσότερο τον αριθμό των πιθανών mRNA στόχων.

Δυναμικά, λοιπόν τα miRNAs έχουν επίδραση σε πολλά και διαφορετικά γενετικά μονοπάτια. Συνεπώς, η απορρύθμισή τους πιθανόν να είναι πλειοτροπική και να οδηγεί σε πολλές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου.

Γονίδια που σχετίζονται με τα miRNAs και τον καρκίνο στον άνθρωπο

Στοιχεία του μηχανισμού σύνθεσης των miRNA έχουν συσχετισθεί με την καρκινογένεση. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες Αργοναύτες, που είναι βασικά στοιχεία του συμπλόκου RISC έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται σε διάφορους καρκίνους. Τρία ανθρώπινα γονίδια Αργοναύτες, τα ago3, ago1 και ago4, τα οποία βρίσκονται ομαδοποιημένα στο χρωμόσωμα 1 (περιοχή 1p34-35), παρουσιάζουν συχνά ελλείψεις σε καρκίνους του

νεφρού, ενώ έχουν σχετισθεί και με καρκίνους του νευροεκτοδέρματος.

Ένα άλλο γονίδιο Αργοναύτης, το hiw-1, που εκφράζεται ειδικά στους όρχεις, εδράζεται στην περιοχή 12q 24.33, η οποία έχει συσχετισθεί με καρκίνους των όρχεων. Το γονίδιο αυτό έχει βρεθεί μεταλλαγμένο σε 12 από 19 καρκίνους των όρχεων. Οι παραπάνω μελέτες υποδηλώνουν ότι το hiw-1 ίσως λειτουργεί φυσιολογικά για να ρυθμίσει τον πολλαπλασιασμό των γεννητικών κυττάρων και όταν απορρυθμίζεται, λειτουργεί ως ογκογονίδιο.

Τα miRNAs στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τις ασθένειες

Μέχρι σήμερα έχουν προσδιορισθεί οι βιολογικοί ρόλοι κάποιων miRNAs. Αυτά τα miRNAs ρυθμίζουν διαδικασίες που σχετίζονται με τον καρκίνο και κατά συνέπεια, μπορούν τα ίδια να δράσουν ως ογκογόνα miRNAs (ONCOMIRS). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα miRNAs lin-4 και let-7, τα οποία ρυθμίζουν την ακριβή χρονική στιγμή της κυτταρικής διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού στον *C. elegans*. Μεταλλαγές σε αυτά τα miRNA γονίδια στον *C. elegans* οδηγούν σε ανωμαλίες κατά την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και την τελική διαφοροποίηση, χαρακτηριστικά τα οποία παρατηρούνται σε καρκινικά κύτταρα. Μάλιστα έχει βρεθεί ότι τα ομόλογα γονίδια των lin-4 και let-7 στα θηλαστικά ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, ενώ εμπλέκονται και σε διάφορους καρκίνους.

Στη *Drosophila melanogaster*, το miRNA miR-4 είναι ισχυρός καταστολέας της απόπτωσης, γεγονός που του προσδίδει χαρακτηριστικά ογκογονιδίου. Άλλα miRNAs είναι απαραίτητα κατά την ανάπτυξη και κατευθύνουν την ορθή διαφοροποίηση των κυττάρων σε διάφορους ιστούς. Περαιτέρω προσδιορισμοί νέων miRNA μορίων είναι πιθανό να αποκαλύψουν άλλους γονιδιακούς ρυθμιστές οι οποίοι συντονίζουν τον ορθό σχηματισμό των οργάνων, το σχηματισμό προτύπου σώματος και την ανάπτυξη στα έμβρυα, ενώ ίσως προσφέρουν πληροφορίες για μηχανισμούς ανθρώπινων ασθενειών, όπως είναι ο καρκίνος.

Τα miRNAs που εμπλέκονται στον καρκίνο

Τα miRNAs σχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνου και πιστεύεται ότι δρουν τόσο ως ογκογονίδια, όσο και ως ογκοκατασταλτικά γονίδια. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, το 50% των χαρακτηρισμένων miRNAs στον άνθρωπο βρίσκονται σε περιοχές του

γονιδιώματος γνωστές ως «εύθραυστες θέσεις», οι οποίες εμπλέκονται στον καρκίνο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα miRNAs πιθανόν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου.

Η πρώτη ένδειξη ότι τα miRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια προήλθε από μελέτες που έδειχναν ότι ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία των Β-κυττάρων παρουσιάζουν συχνά ελλείψεις ή κατασταλτικές μεταλλάξεις σε 2 ομαδοποιημένα γονίδια miRNA, τα miR-15a και miR-16-1. Αναλυτικότερα, το 65% των περιπτώσεων της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, αλλά και το 60% των καρκίνων του προστάτη και το 16-40% των πολλαπλών μυελωμάτων παρουσιάζουν έλλειψη στη χρωμοσωμική περιοχή 13q14.

Οι επιστήμονες προέβλεψαν ότι σε αυτή την περιοχή των 30kbp πρέπει να υπάρχει κάποιο ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Ωστόσο στην περιοχή αυτή βρέθηκαν μόνο τα miR-15a και miR-16-1, τα οποία εδράζονται στο εσώνιο ενός ως τότε αγνώστου μη πρωτεϊνικού γονιδίου, του *let-2*. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα miR-15-a και miR-16-1 ρυθμίζουν αρνητικά το *bcl-2*,

ένα αντιαποπτωτικό γονίδιο που συχνά υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων των λευχαιμιών και των λεμφωμάτων. Κατά συνέπεια, τα miR-15-a και miR-16-1 λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, και κατασταλτικές μεταλλάξεις σε αυτά προκαλούν αυξημένη έκφραση του *bcl-2*, επάγοντας δημιουργία λευχαιμιών και λεμφωμάτων στα αιμοποιητικά κύτταρα.

Από την άλλη πλευρά άλλα miRNA φαίνεται να έχουν δράση ογκογονιδίων. Για παράδειγμα, η έκφραση του miR-21 είναι κατά 5-100 φορές μεγαλύτερη σε γλοιώματα, σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Μελέτες του miR-21 με παρεμπόδιση της λειτουργίας του (μέθοδος antisense RNA) σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος έδειξαν ότι αυτό το μόριο ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη, εμποδίζοντας την απόπτωση, χωρίς όμως να επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, γεγονός που υποδηλώνει ρόλο ογκογονιδίου.

Η οικογένεια *let-7* ρυθμίζει αρνητικά το *Ras*: Ογκοκατασταλτική δράση του *let-7*

Τα miRNAs της οικογένειας *let-7* ήταν η πρώτη ομάδα ογκογόνων miRNAs που δείχθηκε ότι μπορούν να

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: miRNAs που σχετίζονται με ανθρώπινους καρκίνους

miRNA	ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ	ΡΟΛΟΣ
miR-15a, miR-16-1	Χρωμοσωμική περιοχή 13q14	Συχνά κατασταλμένο σε χρόνιες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες των Β-κυττάρων. Ρυθμίζουν αρνητικά το αντιαποπτωτικό γονίδιο <i>bcl2</i>	Ογκοκατασταλτικό
miR-143, miR-145	Χρωμοσωμική περιοχή 5q32-33	Ελαττωμένα επίπεδα σε καρκίνους του ορθού. Ελάττωση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του στήθους, του προστάτη, των επινεφριδίων και της λέμφου. Το miR-145 είναι ελαττωμένο σε καρκίνο του στήθους	Ογκοκατασταλτικό
miR-21	Χρωμοσωμική περιοχή 17q23.2	Αντιαποπτωτικός παράγοντας. Υπερέκφραση σε γλοιοβλαστώματα και καρκίνους του στήθους	Ογκογονίδιο
<i>let-7</i> family members	Πολλαπλές θέσεις	Ρυθμίζει αρνητικά το ογκογονίδιο <i>ras</i> . Επιδρά απευθείας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Μείωση των επιπέδων σε καρκίνους του στήθους	Ογκοκατασταλτικό
miR-142	Χρωμοσωμική περιοχή 17q22	Μία χρωμοσωμική μετατόπιση t(8;17) που τοποθετεί το <i>myc</i> δίπλα στο miR-142, έχει σαν αποτέλεσμα υπερέκφραση του γονιδίου <i>myc</i> και επιθετική λευχαιμία των Β-κυττάρων.	Όχι προσδιορισμένο
BIC/miR-155	Χρωμοσωμική περιοχή 21q21	Αυξημένη έκφραση σε λεμφώματα Burkitt, Hodgkin, μεγάλων Β-κυττάρων. Αυξημένη έκφραση σε ανθρώπινους καρκίνους του στήθους.	Ογκογονίδιο
miR-17-19b cluster	Χρωμοσωμική περιοχή 13q31-32	Αυξημένη έκφραση, που προκαλείται από το γονίδιο <i>myc</i> . Ρυθμίζει αρνητικά το ογκογονίδιο E2F1. Σε καρκίνους του ήπατος εμφανίζει απώλεια ετεροζυγωτίας. Υπερεκφράζεται σε λεμφώματα των Β-κυττάρων	Ογκογονίδιο/ογκοκατασταλτικό γονίδιο

ρυθμίζουν την έκφραση ογκογονιδίων, όπως είναι τα γονίδια *ras*. Οι πρωτεΐνες *Ras* είναι GTPάσες που σχετίζονται με την κυτταρική μεμβράνη και λειτουργούν ως μόρια-σηματοδότες για τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και της διαφοροποίησης. Περίπου το 30% των ανθρώπινων όγκων παρουσιάζουν μεταλλαγμένη και ενεργοποιημένη την ογκοπρωτεΐνη *Ras*.

Τα miRNAs της οικογένειας *let-7*, συμπεριλαμβανομένων και 12 ανθρώπινων ομολόγων, χαρτογραφούνται στο γονιδίωμα σε εύθραυστες θέσεις που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα του ουροποιητικού συστήματος και των επινεφριδίων. Ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (μικροκυτταρικός καρκίνος) εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα *let-7*, ενδείξεις που αποδίδουν ογκοκατασταλτικό ρόλο στο *let-7*.

Επιπρόσθετα, έρευνες στον *C.elegans* απέδειξαν ότι κάποια μέλη της οικογένειας *let-7* αλληλεπιδρούν γενετικά με το ογκογονίδιο *ras* και ότι η οικογένεια *let-7* και το *ras* εκφράζονται αμοιβαία. Εξάλλου, στην 3' UTR περιοχή των γονιδίων *ras* εντοπίζονται πολλαπλές θέσεις συμπληρωματικότητας για τα miRNAs της οικογένειας *let-7*. Σε καρκινικές κυτταρικές σειρές από άνθρωπο έχει βρεθεί ότι τα *let-7* miRNAs ρυθμίζουν αρνητικά τα *ras*, καθώς η υπερέκφραση του *let-7* οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης *Ras*, ενώ η μείωση των επιπέδων miRNA του *let-7* οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της. Με βάση τις παραπάνω μελέτες, το miRNA του *let-7* θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό μέσο για καρκίνους του πνεύμονα οι οποίοι οφείλονται σε μεταλλάξεις των *ras*.

miRNAs που σχετίζονται με το ογκογονίδιο *myc*

Το ογκογονίδιο *myc*, το οποίο κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα βασικής έλικας-αύλακας-έλικας (basic helix-loop-helix) μπορεί να επάγει τόσο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όσο και την απόπτωση, και έχει βρεθεί μεταλλαγμένο ή ενισχυμένο σε διάφορους τύπους καρκίνου στον άνθρωπο. Είναι αξιοσημείωτο ότι φαίνεται να υπάρχει μια στενή σχέση ανάμεσα στα miRNAs και στην αυξημένη έκφραση του *myc*, γεγονός που οδηγεί σε κακοήθειες των Β-κυττάρων (π.χ. λευχαιμίες των Β-κυττάρων). Για παράδειγμα, το miR-155 έχει συνδεθεί με την υπερέκφραση του *myc* και τους καρκίνους των Β-κυττάρων. Το miR-155 εδράζεται στα νουκλεοτίδια 241-262 του γονιδίου *bic*. Το γονίδιο *bic* έχει βρεθεί πως υπερεκφράζεται, μαζί με το *myc*, σε λεμφώματα των Β-κυττάρων. Για πολλά χρόνια οι επιστήμονες προβληματίζονταν

πώς ένα γονίδιο που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη και είναι σε πολύ μικρό βαθμό συντηρημένο ανάμεσα στα πτηνά, τους επιμύες και τον άνθρωπο μπορούσε να προάγει λεμφώματα σε κύτταρα στα οποία υπερεκφραζόταν ταυτόχρονα και το *myc*. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η μόνη φυλογενετικά συντηρημένη περιοχή μέσα στο γονίδιο *bic* είναι εκείνη που κωδικοποιεί το miR-155 miRNA. Βρέθηκε ακόμη ότι το miR-155 υπερεκφράζεται σε λέμφωμα του Hodgkin και σε πρωτογενή λεμφώματα των μεγάλων Β-κυττάρων. Κατά συνέπεια, φαίνεται ότι το miR-155 μπορεί, σε συνεργασία με το *myc*, να λειτουργήσει ως ογκογονίδιο, ενώ κανονικά δρα κατά την επιλογή των Β-κυττάρων και πιθανόν στοχεύει γονίδια τα οποία ανταγωνίζονται το βιοχημικό μονοπάτι του γονιδίου *myc*.

Άλλες μελέτες αποδεικνύουν περισσότερο άμεση σχέση μεταξύ των miRNAs, του γονιδίου *myc* και του καρκίνου. Η περιοχή 13q31 εμφανίζεται ενισχυμένη σε διάφορα λεμφώματα. Ωστόσο, το μόνο γονίδιο που υπερεκφράζεται μέσα σε αυτή την περιοχή είναι το C13orf25. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μία ομάδα miRNAs, την ομάδα *mir-17-92*, η οποία περιλαμβάνει 7 miRNAs: τα 1) miR-17-5p, 2) miR-17-3p, 3) miR-18a, 4) miR-19a, 5) miR-20a, 6) miR-19b-1 και 7) miR-92-1. Φαίνεται, δηλαδή, ότι η αυξημένη έκφραση αυτής της ομάδας miRNAs εμπλέκεται στη δημιουργία καρκίνου. Πράγματι, όταν οι επιστήμονες υπερέκφρασαν αυτή την ομάδα γονιδίων σε αιμοποιητικά κύτταρα ποντικών, στα οποία υπερεκφραζόταν επίσης το *myc*, παρατήρησαν ότι τα ποντίκια εμφάνισαν κακοήθη λεμφώματα γρηγορότερα από εκείνα τα ποντίκια στα οποία εκφραζόταν μόνο το *myc*. Παρόμοια πειράματα στα οποία υπερεκφραζόταν μόνο ένα από οποιοδήποτε από τα 7 miRNAs της ομάδας *mir-17-92* δεν οδήγησαν σε επιτάχυνση της εμφάνισης των λεμφωμάτων. Τα πειράματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα miRNAs της ομάδας *mir-17-92* δρουν συνεργιστικά ως ογκογονίδια, στοχεύοντας πιθανόν αποπτωτικούς παράγοντες, οι οποίοι ενεργοποιούνται κατά την υπερέκφραση του γονιδίου *myc*.

Το επόμενο βήμα ήταν η αναζήτηση γονιδίων-στόχων της *myc* -ρυθμιζόμενης ομάδας *mir-17-92*. Βρέθηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας E2F1, ο οποίος ρυθμίζει γονίδια που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA, την κυτταρική διαίρεση και την απόπτωση αποτελεί στόχο των miRNAs miR-17-5p και miR-20a της ομάδας *mir-17-92*. Ο παράγοντας E2F1 μάλιστα αλληλεπιδρά με το *myc*, δημιουργώντας μ' αυτό μία έλικα θετικής ανάδρασης. Πρόσφατα έχει διατυπωθεί ένα μοντέλο που συσχετίζει το *mir-17-92* με τις πρωτεΐνες

MYC και E2F1. Σύμφωνα με αυτό, το miR-17-92 δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο αφού το myc επάγει τη μεταγραφή τόσο του E2F1 όσο και του miR-17-92. Τα miRNAs του miR-17-92, στη συνέχεια παρεμποδίζουν τη μετάφραση του E2F1 με αποτέλεσμα να εμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το παραπάνω μοντέλο έρχεται σε αντίθεση με τις μελέτες που αποδεικνύουν ότι η ομάδα του miR-17-92 λειτουργεί ως ογκογονίδιο, αφού βρίσκεται υπερεκφρασμένη στα λεμφώματα.

Η ογκογενετική και ογκοκατασταλτική φύση της ομάδας miR-17-92 είναι μία ένδειξη της περιπλοκότητας της γονιδιακής ρύθμισης μέσω των miRNAs. Είναι πιθανό η ομάδα miR-17-92 να λειτουργεί είτε ως ογκογονίδιο και είτε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων στα οποία εκφράζεται και τα μόρια-στόχους του τα οποία είναι παρόντα σ' αυτά τα κύτταρα.

Η δημιουργία του προφίλ των miRNA είναι πιθανό να βοηθήσει στη διάγνωση του καρκίνου

Αναλύσεις των miRNA με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών και με στύπωμα κατά Northern έχουν δείξει ότι στον άνθρωπο υπάρχουν ιστοειδικές αποτυπώσεις των miRNA γονιδίων. Οι ερευνητές έχουν στραφεί στη χρήση των αποτυπώσεων έκφρασης των miRNA προκειμένου να ταξινομήσουν τους καρκίνους και να εντοπίσουν καρκινικούς διαγνωστικούς δείκτες.

Πρόσφατα, όγκοι από διάφορους ιστούς ταξινομήθηκαν μόνο με βάση το προφίλ έκφρασης των miRNA τους. Με αυτό τον τρόπο, οι όγκοι ομαδοποιήθηκαν με βάση την εμβρυϊκή γραμμή από την οποία προέκυψαν οι ιστοί. Για παράδειγμα, όγκοι ενδοθλιακής προέλευσης, όπως του παχέος εντέρου, του ήπατος, του παγκρέατος και του στομάχου ομαδοποιήθηκαν μαζί, ενώ όγκοι αιμοποιητικής προέλευσης ομαδοποιήθηκαν επίσης μαζί. Οι ίδιοι όγκοι δεν μπόρεσαν να ομαδοποιηθούν με ένα συναφή τρόπο, όταν έγινε προσπάθεια ταξινόμησης των όγκων με βάση 16000 mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Επομένως, οι αποτυπώσεις των miRNAs στους όγκους αντικατοπτρίζουν την αναπτυξιακή τους ιστορία, υπόθεση που συμβαδίζει με το γεγονός ότι τα miRNAs κατευθύνουν ιστοειδικές αναπτυξιακές διαδικασίες. Η διαφορική έκφραση κάποιων miRNAs έχει ήδη αποδειχτεί ότι είναι ένας ακριβής διαγνωστικός δείκτης καρκίνου. Από θεραπευτικής σκοπιάς, εξάλλου, η μελέτη του προφίλ έκφρασης των miRNAs ίσως αποδειχτεί ένα

πολύτιμο εργαλείο για τον καθορισμό της θεραπευτικής αγωγής των ασθενών.

Μελλοντικές θεραπείες με τη χρήση των miRNAs

Ο ενδεχόμενος ρόλος των miRNAs ως ογκοκατασταλτικά γονίδια θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά τις θεραπείες που εμποδίζουν την ανάπτυξη των όγκων. Μελλοντικά, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, συμπληρωματικά ως προς τα miRNAs (AMOS: anti-mi RNA oligonucleotides), τα οποία να αδρανοποιούν τα miRNAs στους όγκους, ώστε να επιβραδύνουν την ανάπτυξή τους. Τα μόρια αυτά είναι περισσότερο σταθερά και λιγότερο τοξικά από μόρια που χρησιμοποιούνται σε άλλες καρκινικές θεραπείες. Η εισαγωγή τους στα κύτταρα θα μπορούσε να επιτυγχάνεται με τη χρήση ιών ή λιποσωμάτων. Βέβαια, οι παραπάνω μέθοδοι χρειάζονται περισσότερη μελέτη και ανάπτυξη, προτού χρησιμοποιηθούν ευρέως στην κλινική πράξη.

Το κατά πόσο τα miRNAs θα αποτελέσουν το «μαγικό όπλο» του μέλλοντος παραμένει ένα ζήτημα προς μελέτη. Παρόλα αυτά, η έρευνα των miRNAs αναμφίβολα μπορεί να προσφέρει περισσότερες πληροφορίες στην αποσαφήνιση των μηχανισμών της ογκογένεσης. ■

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
2. Calin, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; 99: 15524-15529
3. Cimmino, A. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2005; 102: 13944-13949
4. Michael, M. Z. , O'Connor, S. M. , van Holst Pellekaan, N. G. , Young, G. P. & James, R. J. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.* 2003;1: 882-891
5. Lu, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435: 834-838
6. Chan, J. A. , Krichevsky, A. M. & Kosik, K. S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 6029-6033
7. 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: 167-169
8. He, L. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005;435: 828-833
9. O'Donnell, K. A. , Wentzel, E. A. , Zeller, K. I. , Dang, C. V. & Mendell, J. T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005;435: 839-843
10. Johnson, S. M. et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005;120: 635-647
11. Calin, G. A. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2004;101: 2999-3004