

DERLEME

mikroRNA'lar (miRNA) ve Kanser

Özkan BAĞCI

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Isparta.

ÖZET

mikroRNA'lar (miRNA) bitkiler, hayvanlar ve bazı virüslerde gen ifadesini düzenleyen, protein kodlamayan küçük ve kısa RNA'lardır. miRNA'lar, protein kodlayan genlerin transkriptleri olan hedef mRNA'lara bağlanabilirler ve translasyonu negatif olarak regüle edebildikleri gibi, mRNA'ları degradasyona uğratarak da işlev gösterebilirler. miRNA'lar apoptoz, kök hücrelerin farklılaşması, hücre siklusunun regülasyonu ve kanser patogenezi gibi birçok biyolojik süreçte işlev gösterebilmektedirler. Karsinogenez süreci ile ilişkili miRNA'lar hedef aldıkları mRNA'lara göre tümör baskılayıcı veya onkojenik özellik gösterebilirler. Bu derlemede kanserin patogenezinde epigenetik mekanizmalardan miRNA'ların etkisi tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: miRNA. Kanser. Epigenetik.

microRNAs (miRNA) and Cancer

ABSTRACT

microRNAs (miRNA) are small and short, non-coding RNAs that regulate gene expression in plants, animals and some viruses. miRNAs can bind to target messenger RNA (mRNA) transcripts of protein-coding genes and negatively control their translation or cause mRNA degradation. miRNAs such as apoptosis, differentiation of stem cells, cell cycle regulation and the pathogenesis of cancer may act in many biological processes. miRNAs associated with process of carcinogenesis may function tumor suppressor or oncogenic, according to their mRNA targets. In this review, the effect of miRNAs from epigenetic mechanisms in the pathogenesis of cancer is discussed.

Key Words: miRNA. Cancer. Epigenetics.

miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan ve gen ifadesini post-transkripsiyonel olarak regüle eden kısa RNA'lardır. İlk defa *C.elegans*'ın gelişimini çalışan Lee ve arkadaşları tarafından 1993 yılında tanımlanmıştır. İlk tanımlanan miRNA, lin-4'dür¹⁻⁴. Günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda, *miRBase release 20* veri tabanında kayıtlı 1872 öncül insan miRNA sekansı tanımlanmıştır. Tanımlanan bu miRNA'ların en çok 1.kromozomda (161) en az ise Y kromozomunda (2) bulunduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar, insan miRNA'larının %50 den fazlasının kanserle ilişkili genomik bölgelerde ve kırılma noktalarına yakın bölgelerde lokalize olduğunu saptamıştır⁵. miRNA'lar gen

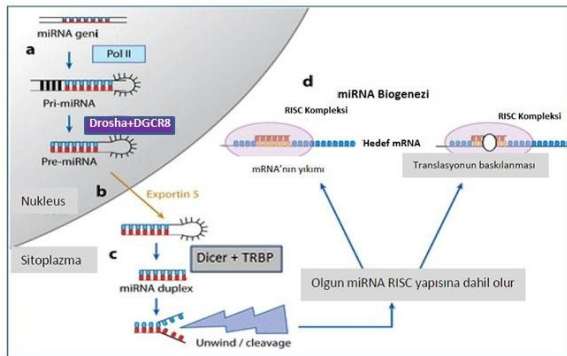
ifadesinin post-transkripsiyonel olarak düzenlenmesinin yanı sıra, organizmanın gelişimsel sürecinde, farklılaşma, apoptoz, hücre proliferasyonu ve kanser gibi birçok biyolojik süreçlerde rol oynayabilmektedirler⁶⁻⁸. miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki sapmaların, miyokard infarktüsü'nden otoimmün hastalıklara kadar geniş bir yelpazede rolünün olduğu bildirilmiştir. mir-106b'nin kalp yetmezliğinde ilgili genlerin ekspresyonlarını değiştirdiği rapor edilmiştir⁹. Buna ilave-ten, mir-106b'nin şizofreni ile de ilişkili olabileceği bildirilmiştir¹⁰. mir-143'ün MAP kinaz sinyal yolunda rol alan ERK5 proteinini hedef alarak adipositlerin farklılaşmasını baskılayarak obezite ile ilişkili olduğunu gösterildi¹¹. Bununla birlikte, miRNA'lar doğrudan ya da dolaylı olarak epigenetik mekanizmalarla gen ifadesini etkileyebilmektedir. miR-101'in hepatit B virüsleri tarafından regülasyonunun bozulması sonucunda, DNA metil transferaz 3A'nın hedeflenmesi yoluyla, DNA metilasyonunun bozulmasını indüklediği rapor edildi¹². Bugün için, tüm insan genlerinin yaklaşık %30-60'nın miRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir¹³.

Geliş Tarihi: 05.06.2014
Kabul Tarihi: 01.10.2014

Dr. Özkan BAĞCI
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı,
Isparta
Tel: 0 505 2544464
e-posta: ozkanbagci@sdu.edu.tr

miRNA Biyogenezisi

miRNA'ların biyolojik oluşum süreci, hücre çekirdeğinde başlayıp sitoplazmada son bulan bir dizi işlemler sonucunda meydana gelmektedir¹⁴. Çoğu miRNA RNA polimeraz II tarafından yaklaşık 1kb uzunluğunda pri-mirna olarak transkribe olur. Oluşan pri-mirna'lar mRNA'lara benzer şekilde 5' uçlarında 7 metil guanozin ve 3' uçlarında ise poli adenozin taşır. Pri miRNA daki *hairpin* yapısı RNaz 3 enzimi olan ve RNA'ya bağlanan bir protein olan DGCR8 (DiGeorge critical region 8) ile birlikte çalışan *Drosha* tarafından tanınır ve kesilir. Sonuçta 70 nükleotit uzunluğunda olan pre-miRNA oluşur. Bu yapı nükleer transport kompleksi olan eksportin-5 ve RAN GTP aracılığıyla nükleus porlarından sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya gelen pre-miRNA bir başka RNaz 3 enzimi olan ve çift iplikli RNA'ya bağlanan bir protein olan TRBP ile birlikte *Dicer* tarafından yaklaşık 22 nükleotitlik çift iplikli miRNA'lara kesilir, termodinamik özelliklere göre çift iplikten biri seçilerek *Argonaute* (Ago) proteini ile birlikte RISC kompleksinde (**RNA-Induced Silencing Complex**) dahil olmasıyla komplementer mRNA'nın 3'UTR bölgesi üzerinden transkripsiyon sürecini inhibe ederler (Şekil-1)¹⁵.



Şekil 1.

Olgun mikro RNA'lar, hedef mRNA'lara 5' uçlarında bulunan 2 ve 7. nükleotitler arasındaki altı nükleotitlik komplementer sekansları aracılığı ile bağlanırlar. Bu bölgeye *seed* adı verilir. Hedef mRNA'yı baskılamak için *seed* bölgesindeki komplementer sekansın yeterli olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Altı nükleotitten oluşan *seed* bölgesinin, mRNA ile komplementer olma durumuna göre 4 farklı bağlanma tipi bulunmaktadır³.

- 6mer site: sadece *seed* bölgesindeki 6 nükleotitlik eşleşme ile karakterizedir
- 7mer-A1 site: *seed* bölgesinde nükleotit eşleşmesi ve miRNA'nın 1.nükleotitinin karşısında A nükleotitinin olması,
- 7mer-m8 site: *seed* bölgesindeki nükleotit eşleşmesine ek olarak miRNA'nın 8. nükleotitinde de eşleşmenin olması,

- 8mer site: *seed* bölgesindeki nükleotit eşleşmesi ile miRNA'nın 8. nükleotitinde de eşleşmenin olması ve miRNA'nın 1.nükleotitinin karşısında A nükleotitinin olması ile karakterizedir^{3,16}.

miRNA ve Kanser

Kanser, hücrelerin bölünmesi ve farklılaşması için normal biyolojik süreçlerin bozulmasına neden olan birçok genin ekspresyonundaki değişimlerle karakterize malign bir durumdur¹⁷. Karsinogenez sürecinde birçok genin ekspresyonundaki bozulmaların, DNA'daki nükleotit sekansı değişimlerinden ziyade, epigenetik mekanizmalarla da meydana gelebileceği son zamanlarda yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur¹⁸. Normal hücrelerde, miRNA moleküllerinin düzeyi ve transkript hedefleri denge durumunda bulunmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda, miRNA düzeyinin değiştirilmesi ile (*knock-out* veya *over-expression*) hastalık semptomlarının ortaya çıktığı gösterilmiştir^{19,20}. miRNA'lar transkripsiyon sonrası gen ifadesini etkilediğinden, kanser oluşumunda rol oynadığı bilinen genlerin ifade edilmesindeki dengeyi düzenleyen önemli bileşenlerden biri olmaya adaydır. Bu hipotezi destekleyen ilk rapor, kronik lenfositik lösemi'de (KLL) sıklıkla delesyona uğrayan olan 13q14 bölgesini çalışın Calin ve arkadaşlarından gelmiştir. Kronik lenfositik lösemi olgularının yaklaşık %50'den fazlasında hemizigot ve/veya homozigot delesyona uğrayan bu bölgede mir-15a ve mir-16-1 adlı iki miRNA geninin yerleşim gösterdiği bulunmuştur. mir-15a ve mir-16-1 genlerinin öngörülen tümör baskılayıcı rolü, iki KLL hastasında bu genlerin germ hattı nokta mutasyonlarının bulunmasıyla desteklenmiştir²¹. Yapılan bir başka çalışma, miR-15/16 transkriptlerinin hedef genlerini tanımlayarak tümör baskılayıcı mekanizmayı aydınlatmıştır²². Her iki miRNA ürünü, anti-apoptotik bir gen olan BCL2'nin 3'UTR bölgesini hedeflemektedir. Yapılan diğer çalışmalar da miRNA'ların onkogen veya tümör baskılayıcı işlevleri olabileceğini göstermiştir. İlk tanımlanan onkojenik miRNA, mir-155'dir. miR-155'in ekspresyon düzeyinin lenfomalarda arttığı ve pro-apoptotik proteinleri hedef aldığı rapor edilmiştir^{4,23,24}. Pediatrik Burkitt lenfomada da miR-155'in regülasyonunun yaklaşık 100 kat arttığı saptanmıştır²³. Buna ilaveten Burkitt lenfomanın gelişiminde önemli rol oynayan MYC onkogeninin, 13. kromozomda lokalize olan miR-17-92 grubuna direkt olarak bağlandığı ve bu miRNA'ların ekspresyonlarını aktive ettiği gösterilmiştir. miR-17-92 grubunun da hücre siklusunda önemli bir rolü olan E2F1 transkripsiyon faktörünü hedef aldığı gösterilmiştir²⁵. miRNA'lar ile solid tümörler arasındaki ilk bulgu kolorektal kanserlerde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Kolorektal kanserlerin karsinogenez sürecinde miR-143 ve miR-145'in regülasyonunun bozulduğu saptanmıştır²⁶. Akciğer kanserleri

mikroRNA'lar (miRNA) ve Kanser

üzerinde yapılan bir başka çalışmada, akciğer kanseri hücre hattı ve tümörlerinin normal akciğer dokusuyla karşılaştırıldığında, akciğer tümörlerinin %44'ünde, hücre hatlarının ise %60'ında let-7'nin ekspresyonun azaldığı rapor edilmiştir²⁷. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, let-7 ailesinin (let-7-a-2, let-7c, ve let-7g) RAS genini negatif olarak regüle ettiği ve let-7'nin regülasyonunun bozulmasıyla, akciğer kanserinin başlamasına neden olabilecek RAS geninin regülasyonunun artabileceği gösterilmiştir²⁸.

Çocukluk çağı tümörü olan, Nöroblastom olgularının yaklaşık % 20-25'inde gözlenen *MYCN* geninin yüksek kopya sayısı artışının (amplifikasyon), ileri hastalık evresi, hızlı tümör progresyonu ve kötü prognozla birliktelik gösterdiği rapor edilmiştir^{29,30}.

Yapılan bir çalışmada, *MYCN* amplifiye tümörlerde 15 miRNA'nın ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu miRNA'lar arasında onkojenik özellik gösteren mir-17-92 grubunun (miRNA-17, miRNA-18, miRNA-19, miRNA-20, miRNA-92) varlığı gösterilmiştir³¹⁻³³. Diğer yandan araştırmacılar; tümör supresör olarak işlev gösteren p21'in miRNA-17'nin hedefi olduğunu göstermiş ve miRNA-17'nin inhibe edildiği durumlarda p21 ekspresyonunun arttığı, hücre proliferasyonunun ise azaldığını göstermişlerdir. Buna ilaveten, N-Myc'in mir-17-92 grubunun promotör bölgesine direkt olarak bağlandığını, *MYCN* ve mir-17-92 grup üyelerinin primer tümör ve hücre hatlarında ekspresyon artışlarının pozitif korelasyon gösterdiğini rapor etmişlerdir³³⁻³⁷. Buna ek olarak, N-Myc'in onko-

jenik mir17-92 grubunun promotör bölgesine bağlanarak ekspresyonlarını artırması sonucunda mir-17'nin p21'i hedef almasının yanı sıra, mir17-92 grubunun tümörleşme sürecine katkı yapacak şekilde apoptotik süreçte rol oynayan genleri hedef aldıkları gösterilmiştir³⁸. Yapılan bir başka çalışmada da N-Myc'in mir-9'u direkt olarak aktive ettiği ve mir-9'unda E-kaderin'i hedef aldığı ve bunun sonucunda nöroblastomda metastatik sürece katkı yaptığı gösterilmiştir³⁹. Nöroblastomda, 1p veya 11q allelik kaybının agresif tümör özellikleri ve kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiş olup, yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda tümör baskılayıcı olarak önerilen mir-34a'nın kromozom 1p36.22 bölgesinde, mir34b/c'nin kromozom 11q23.1 bölgesinde lokalize olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda mir34 ailesinin p53 yolağı ile ilişkili olduğu ve mir 34a/bc'nin p53 ün direkt hedefi olduğu gösterilmiştir. mir34a'nın *Cdk 4*, *Cdk 6*, *Siklin E* gibi genleri hedef aldığı ve böylece mir34 ailesinin p53 aktivasyonu üzerinden apoptoza ve hücre siklusunun durdurulmasına katkıda buldukları gösterilmiş olup, mir34a'nın *knock-down* edildiği durumlarda, p53 indüklenmiş hücre ölümünün azaldığı saptanmıştır⁴⁰⁻⁴⁴. Son zamanlarda solid tümörler ile normal dokulardaki miRNA ekspresyon profillerinin mikrodizin yöntemiyle karşılaştırılması sonucunda karsinogenez süreci ile ilişkili birçok miRNA tanımlanmıştır. Volinia ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, altı solid tümör (Meme, Kolon, Akciğer, Pankreas, Prostat, Mide) ile kendi normal dokularından oluşan 540 örne-

Tablo I- En az üç solid tümör tipinde regülasyonu artan 21 miRNA geni

miRNA	Kromozom lokalizasyonu	Meme	Akciğer	Kolon	Pankreas	Mide	Prostat
miR-21	17q23.2	+	+	+	+	+	+
miR-17-5p	13q31.3	+	+	+	+		+
miR-191	3p21.31		+	+	+	+	+
miR-29b-2	1q32.2	+		+	+		+
miR-223	Xq12			+	+	+	+
miR-128b	3p22.3		+	+	+		
miR-199a-1	19p13.2		+		+		+
miR-24-1	9q22.32			+	+	+	
miR-24-2	19p13.12			+	+	+	
miR-146	5q33.3	+			+		+
miR-155	21q21.3	+	+	+			
miR-181b-1	1q31.3	+			+		+
miR-20a	13q31.3			+	+		+
miR-107	10q23.31			+	+	+	
miR-32	9q31.3			+	+		+
miR-92-2	Xq26.2				+	+	+
miR-214	1q24.3				+	+	+
miR-30c	1p34.2			+	+		+
miR-25	7q22.1				+	+	+
miR-221	Xp11.3			+	+	+	
miR-106a	Xq26.2			+	+		+

ğin miRNA ekspresyon profillerinin mikrodizin ile karşılaştırılması sonucunda en az üç solid tümör tipinde regülasyonu artan 21 miRNA genini rapor etmişlerdir (Tablo-I)⁴⁵. Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, miR-17-5p ve miR-17-3p'nin kolorektal kanserli olgularda TIMP3 genini hedef alarak kolorektal kanser oluşumunu indüklediklerini gösterdiler⁴⁶. Bununla birlikte bir solid tümörün prognostik olarak farklı evrelerinde, farklı miRNA'ların eksprese olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Marie-Charlotte ve arkadaşlarının hayvan deneyleri üzerinden yaptıkları çalışmada, metastatik kanser hücreleri ile primer tümör arasında miRNA ekspresyon profillerinin farklı olduğunu rapor ettiler⁴⁷. Bu durum karsinogenez sürecinin aşamalarında farklı miRNA'ların eksprese olabileceğini göstermektedir. Spesifik olarak miRNA genlerinin çeşitli solid tümörlerde karsinogenez süreci ile ilişkisinin gösterilmesine karşın, miRNA'ların oluşum sürecinde anahtar rollere sahip olan *Dicer* ve *Drosha* enzimleri üzerinde yapılan bir çalışmada, bu enzimlerin evre-4 nöroblastom olgularında, evre-4s nöroblastom olgularına göre daha düşük seviyede eksprese olduğu gösterilmiştir⁴⁸. Yumurtalık kanseri olgularında yapılan bir başka çalışmada, *Dicer*'in düşük düzey ekspresyonu ile ileri evre tümör arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır⁴⁹. Avery-Kiejda ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, meme tümörlerinin normal dokularla karşılaştırılması sonucunda, *Dicer*'in tümör dokularında düşük düzeyde eksprese olduğu, primer tümör dokusu ile lenf nodu metastazlarının karşılaştırılmasında ise *Dicer*'in ekspresyonunun anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir⁵⁰.

Sonuç

Sonuç olarak araştırmacılar, miRNA genlerinin dışında, miRNA oluşum sürecindeki anahtar moleküllerinde tümör oluşumuyla ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. miRNA'ların karsinogenez sürecindeki olası rollerinin gösterilmesiyle birlikte kanser tedavisinde terapötik bir ajan olabileceği ileri sürülmüş ve farklı hücre modellerinde yapılan in vitro çalışmalarda ilgili miRNA'ların susturulmasıyla apoptotik sürecin indüklendiği gösterilmiştir^{51,52}. Son zamanlarda plazma, serum, idrar ve tükürük gibi biyolojik örneklerde bulunan miRNA'larda diyagnostik biobelirteç olarak önerilmektedir. miR-141'in serumdaki ekspresyon seviyesi ileri evre prostat kanseri ile sağlıklı bireyleri farklı bulunmuştur. Buna ilaveten, miR-126 ve miR-182'nin idrardaki düzeylerinin mesane kanserini tespit etmede kullanılabileceği, tükürükteki miR-125a ve miR-200a'nın düşük düzeylerinin oral skuamöz hücreli karsinom ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür⁵³⁻⁵⁵. Organizmadaki bir çok biyolojik süreçte rol oynayan miRNA'lar, önümüzdeki yıllarda kanser dahil bir çok hastalık için hem ilaç hedefi hem de tanı kriteri olarak

kullanılacak en güçlü biyolojik moleküllerden biri olarak düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes 151 small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75:843-854.
2. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136:215-233.
3. Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int.J.Cancer* 2008; 122:969-977.
4. Obernosterer G, Leuschner PJ, Alenius M, Martinez J. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA* 2006; 12: 1161-1167.
5. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:2999-3004.
6. Baehrecke EH. miRNAs: micro managers of programmed cell death. *Current Biology* 2003;12:473-5.
7. Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 2003;263:1336-8.
8. Ke XS, Liu CM, Liu DP, Liang CC. MicroRNAs: key participants in gene regulatory networks. *Curr Opin Chem Biol* 2003;4:516-23.
9. Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007;3:258-67.
10. Perkins DO, Jeffries CD, Jarskog LF, et al. microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Genome Biol* 2007;2:27
11. Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther* 2006;6:496-502.
12. Wei X, Xiang T, Ren G, et al. miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A. *Cell Signal* 2013;2:439-46.
13. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120:15-20.
14. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10:126-139.
15. Ramiro G, George A, Calin, and Carlo M. Croce. MicroRNAs in Cancer, *Annual Review of Medicine* 2009;60:167-179.
16. Takaya S, Pal S, MicroRNAs-targeting and target prediction. *New Biotechnology* 2010; 3:243-249.
17. Douglas H, Robert AW, The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
18. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;6: 415-28.
19. Dalmay T, Edwards DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene* 2006; 25:6170-6175.
20. Dalmay T. MicroRNAs and cancer. *J.Intern.Med.* 2008;263:366-375.
21. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci* 2002;99:15524-15529.

mikroRNA'lar (miRNA) ve Kanser

22. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc.Natl.Acad.Sci* 2005;102:13944-13949.
23. Metzler M, Wilda M, Busch K, et al. High Expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt Lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;2: 167-169.
24. Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, et al. Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Bioc-him.Biophys.Acta* 2004;1677:129-141.
25. O'Donnell K A, Wentzel EA, Zeller KI, Dang C V, Mendell JT. c-Myc regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*2005; 435: 839-843.
26. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular Cancer Research* 2003; 1: 882-891.
27. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Research* 2004;64:3753-3756.
28. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120:635-647.
29. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984; 465:1121-4.
30. Brodeur GM, Seeger RC, Sather H, et al. Clinical implications of oncogene activation in human neuroblastomas. *Cancer* 1986; 5:541-5.
31. Chen Y, Stallings RL. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res* 2007; 67:976-983.
32. Schulte JH, Horn S, Otto T, et al. MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. *Int J Cancer* 2008;122:699-704.
33. Afanasyeva EA, Hotz-Wagenblatt A, Glatting KH, Westermann F. New miRNAs cloned from neuroblastoma. *BMC Genomics* 2008;9:52.
34. Fontana L, Fiori ME, Albin S, et al. Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS ONE* 2008; 5:e2236.
35. Schulte JH, Marschall T, Martin M, et al. Deep sequencing reveals differential expression of microRNAs in favorable versus unfavorable neuroblastoma. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:5919-5928.
36. Loven J, Zinin N, Wahlstrom T, et al. MYCN-regulated microRNAs repress estrogen receptor-alpha (ESR1) expression and neuronal differentiation in human neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107:1553-1558.
37. Shohet JM, Ghosh R, Coarfa C, et al. A Genome-wide Search for MYCN Binding sites Reveals Both New Oncogenic and Tumor Suppressor MicroRNAs Associated with Aggressive Neuroblastoma. *Cancer Res* 2011; 71:1-11.
38. Mestdagh P, Bostrom AK, Impens F, et al. The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF-beta pathway in neuroblastoma. *Mol Cell* 2010; 40:762-773.
39. Ma L, Young J, Prabhala H, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 2010; 12:247-256.
40. Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 2007;26:5017- 5022.
41. Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, et al. Transcriptional activation of miR- 34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol. Cell* 2007; 26: 731-743.
42. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol. Cell* 2007;26:745-752.
43. Tivnan A, Tracey L, Buckley PG, Alcock LC, Davidoff AM, Stallings RL. MicroRNA-34a is a potent tumor suppressor molecule in vivo in neuroblastoma. *BMC Cancer* 2011;11:33.
44. Cole KA, Attiyeh EF, Mosse YP, Laquaglia MJ, Diskin SJ, Brodeur GM, Maris JM. A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene. *Mol Cancer Res* 2008;6:735-742.
45. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci* 2006;7:2257-2261.
46. Xiangling Y, William WD, Haoran L, et al. Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion. *Nucleic Acids Res* 2013; 2013;21: 9688-9704.
47. Marie-Charlotte VD, Bernd TS, Achim DG, Robert K. Malignancy Associated MicroRNA Expression Changes in Canine Mammary Cancer of Different Malignancies. *ISRN Veterinary Science* 2014;2014:5
48. Lin RJ, Lin YC, Chen J, et al. microRNA signature and expression of Dicer and Drosha can predict prognosis and delineate risk groups in neuroblastoma. *Cancer Res* 2010; 70:7841-7850.
49. William M M, Yvonne GL, Liz YH, et al. Dicer, Drosha, and Outcomes in Patients with Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2008;25: 2641-2650.
50. Avery-Kiejda KA, Braye SG, Forbes JF, Scott RJ. The expression of Dicer and Drosha in matched normal tissues, tumours and lymph node metastases in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2014;14:253
51. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007; 26:2799-803.
52. Rouya C, Siddiqui N, Morita M, Duchaine TF, Fabian MR, Sonenberg N. Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1. *RNA* 2014;20:7
53. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:10513-10518.
54. Hanke M, Hoefig K, Merz H, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 2010; 28:655-661.
55. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2009;15:5473-5477.

