



## MikroRNA Biyogenezi

Mustafa HİTİT<sup>1</sup>, Ercan KURAR<sup>2</sup>✉, Aydın GÜZELOĞLU<sup>1</sup>

1. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE.
2. Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
24.09.2014	07.11.2014	20.12.2015

**Öz:** MikroRNA'lar (miRNA) kodlama yapmayan 21-24 nükleotid uzunluğunda RNA molekülleridir. Genel olarak translasyonun baskılanmasına veya mRNA'nın yıkılmasına neden olurlar. MikroRNA ilk keşfedildiğinde solucanlarda olağandışı spesifik gen ekspresyon mekanizması olarak düşünülmeye rağmen, artık günümüzde ökaryotlarda önemli gen ekspresyon düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir. MikroRNA biyogenezi çekirdekte RNA polimeraz II aracılığında transkripsiyon ile başlar ve hairpin yapısında olgun miRNA dizisini içeren uzun miRNA (pri-miRNA)'dan oluşur. Hairpin yapısı Drosha (RNAaz III enzimi) ve kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8)'den oluşan mikroprosesör tarafından kesilir. Oluşan prekürsör miRNA (pre-miRNA) nükleustan Exportin-5 ile sitoplazmaya taşınır ve diğer RNAaz III enzimi olan Dicer tarafından 21-24 nükleotid uzunluğundaki dubleks miRNA'ya kesilir. Olgun diziyi kesilecek olan iplik miRNA, RNA indüklenmiş susturma kompleksinde (RISC) Argonaute'a yüklenir. MikroRNA'nın 2-8 nükleotidlik çekirdek dizisi hedef mRNA ile tam olarak eşlendiğinde mRNA'nın destabilizasyonu sağlanır. Ancak tam olarak eşlenmediği zaman translasyon baskılanmaya neden olur. MikroRNA'ların gelişim, farklılaşma ve diğer fizyolojik fonksiyonlarda önemli rol aldığı gösterilmesine rağmen, düzensiz ifadesi durumunda farklı patolojik olaylar ile ilişkilendirilmiştir. MikroRNA biyogenezinin farklı fizyolojik süreçlerde ve hastalıklarda epigenetik etkisinin moleküler düzeyde anlaşılmasının potansiyel önemi bulunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyogenez, Gen ekspresyonu, MikroRNA.

## MicroRNA Biogenesis

**Abstract:** MicroRNAs (miRNA) are non-coding RNA molecules with 21-24 nucleotide length. Basically, miRNAs cause either inhibition of protein translation or degradation of mRNA. Although it was thought to be an unusual specific gene expression mechanism when first discovered, it is now accepted as a pivotal regulator of gene expression. Biogenesis of miRNA begins with RNA polymerase II in nucleus and turns out to be long hairpin that contains mature long miRNA sequence (pri-miRNA). Hairpin structure is cleaved by microprocessor complex composed of Drosha (RNase III) and DiGeorge critical syndrome region 8 (DGCR8). Pre-miRNA is transported by Exportin 5 from nucleus to cytoplasm and in turn cleaved to 21-24 nucleotide long miRNA duplex by RNase III (Dicer). The strand converted to mature sequence is loaded to Argonaute on RNA induced silencing complex (RISC). MicroRNAs has seed a sequence, 2-8 nucleotide in length. When the seed sequence binds to target mRNA with a perfect complementarity, it destabilizes the mRNA. However, when it binds to target mRNA with imperfect complementarity, causes the inhibition of translation. Although miRNAs play role in development, differentiation, and other physiological events, aberrant expression of miRNA is associated with different pathological conditions. The understanding of epigenetic effect of miRNA biogenesis on different physiological processes and diseases has potential importance at the molecular level.

**Keywords:** Biogenesis, Gene expression, MicroRNA.

## GİRİŞ

MikroRNA (miRNA), 1993 yılında iki bağımsız çalışmada (1,2) eş zamanlı olarak *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)'da gen ekspresyonunun postranskripsiyonel düzenleyicisi olarak keşfedilmiştir. Lin-4 olarak keşfedilmiş miRNA, hedef genin ekspresyonunu azalttığı ve DNA dizi analizinde protein ürününün bulunmadığı gözlenmiştir (1). Protein kodlayan genlerin genomun küçük bir kısmından (%0.5-2) ifade edildiği bilinmesine rağmen, miRNA'lar memeli, sinek ve solucan genlerinin sadece %1-2'sini oluşturmaktadır. Ayrıca, her bir miRNA'nın yüzlerce hedef geni kontrol edebildiği tahmin edilmektedir (3). İnsan genomunda kodlanan binlerce miRNA vardır ve bu miRNA'ların hedef genlerinin hücre gelişimi, farklılaşması, proliferasyonu ve apoptosis yollarında düzenleyici rolü bulunmaktadır. Ancak, düzensiz miRNA ekspresyonunun birçok hastalık patogeneziinde yer aldığı bildirilmektedir (4). Bu açıdan bakıldığında, miRNA aracılı gen ekspresyonu önemli ve vazgeçilmez bir mekanizma olarak kabul edilmektedir.

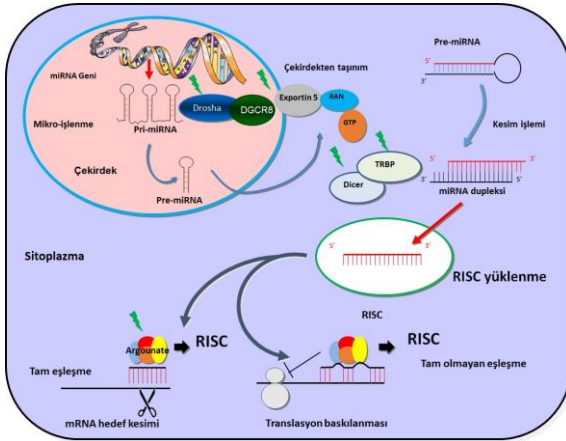
Aslında, miRNA aracılı gen düzenlenmesi RNA interferans (RNAi) olarak bilinen mekanizmanın bir parçasıdır ve bazı küçük RNA'lardan (örn; siRNA, piRNA) oluşmaktadır. siRNA'lar komplementer nükleotid diziler olarak spesifik hedef genlerin ekspresyonunu baskımlarken, piRNA'lar germ hattı bütünlük ve fertilitiyi sürdüren aktif mobil elementlerin fonksiyonunu engellemektedir (5).

Lin-4'ün, Lin-14 mRNA'sının 3'-UTR (untranslated region) bölgesinin (2) tamamlayıcı olan 22 ve 61 nükleotidlik (1) iki transkripti mevcuttur. Lin-14 mRNA'sı farklı türlerin embriyosunda ve *C. elegans*'ın 1. larva aşamasında mevcut LIN-14 proteinini kodlamaktadır (2). Lin-14'ün RNA-RNA interaksyonu Lin-4 ile baskılanır ve LIN-14 protein seviyesinde önemli oranda azalışa neden olur, ancak Lin-14 mRNA seviyesi sabit kalır. Bu bulgular, Lin-4'ün Lin-14'ün kodlama yapmayan bölgesine eşlenmesi, LIN-14 proteinini'nin baskılanması sonucunda 1. larva

aşamasından 2. larva aşamasına geçişe neden olan bir modeli ortaya çıkarmıştır (1,2). Daha sonra, geç larva döneminden yetişkin hücre dönemine geçişe izin veren Let-7 keşfedilmiştir. Lin-4'e benzer olarak, Let-7'de Lin-41'in translasyonu baskılayan 21 nükleotidlik düzenleyici bir RNA kodlamaktadır. Northern blot analizinde, Let-7'ninde 21 ve 70 nükleotidlik iki transkripti tespit edilmiştir (6). *Drosophila*, insan ve diğer türlerde de Let-7 RNA'sının varlığı tespit edilmiştir (7). Daha sonra, gelişim aşamalarından ziyade sadece belli hücre tiplerinde ifade edilen, 21 nükleotidlik, küçük düzenleyici RNA'lar *D. melanogaster*'de keşfedilmiş ve bu küçük düzenleyici RNA'lar mikroRNA'lar olarak isimlendirilmiştir (8). miRNA'ların keşfinden sonra diğer hayvan ve bitki türleri ile tek hücreli canlılarda da varlığı saptanmıştır. İlk zamanlarda, insan genomunda 250 miRNA'nın varlığı tahmin ediliyordu (7). Ancak, güncel miRNA veritabanının 21. Versiyonunda, 223 canlı türünde 28645 hairpin prekürsörü ve 35828 olgun miRNA'nın gen ifadesi bulunmaktadır (9).

### 1. MikroRNA Biyogenezi

miRNA biyogenezi, çekirdekte RNA polimeraz II aracılığında transkripsiyon ile başlamakta ve hairpin yapısında olgun miRNA dizisini içeren uzun miRNA (pri-miRNA) oluşmaktadır (10). Hairpin yapısı, Drosha (RNAaz III enzimi) ve kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8)'den (Pasha) oluşan mikroprosesör tarafından kesilir ve 60-70 nükleotid uzunluğunda prekürsör miRNA'nın (pre-miRNA) oluşmasına neden olur. Prekürsör hairpin nükleustan Exportin-5 (XPO5) ile sitoplazmaya taşınır ve diğer bir RNAaz III enzimi olan Dicer tarafından 21-24 nükleotid uzunluğunda dubleks miRNA'ya kesilir. Olgun diziyi kesilecek olan iplik, miRNA indüklenmiş susturma kompleksini oluşturan (RISC) Argonaute'a yüklenir. Eksik baz eşleşmesiyle, miRNA RISC'i indükler ve mRNA destabilizasyonu ya da translasyonel baskılanmaya neden olur (Şekil 1).



**Şekil 1.** Genel mikroRNA yolu (Yang ve Lai'den düzenlenmiştir, 11).

miRNA: mikroRNA, DGCR8: DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8, Drosha: RNAaz III enzimi, GTP: guanozin trifosfat, RAN: RAS-ilişkili Nükleer protein, RISC: RNA indüklenmiş susturma kompleksi, pri-mikroRNA: primer mikroRNA, TRBP: HIV-1 TAR RNA-bağlanma proteini.

**Figure 1.** General microRNA pathway (Adapted from Yang and Lai, 11).

miRNA: microRNA, DGCR8: DiGeorge critical syndrome region 8, Drosha: RNase III enzyme, GTP: guanosine triphosphate, RAN: RAS-related Nuclear protein, RISC: RNA-induced silencing complex, pri-microRNA: primary microRNA, TRBP: HIV-1 TAR RNA-binding protein.

## 2. MikroRNA Genleri

Ökaryotik organizmalar yüzlerce miRNA genini kodlamaktadır. Bazı miRNA'lar protein kodlayan genlerde, bazıları ise kodlama yapmayan transkripsiyon ünitelerinde bulunurlar (12). Memeli miRNA'larının %70'i intronlarda ve çoğunluğu protein kodlayan genlerde yer alır. Geriye kalan miRNA'lar kodlama yapmayan transkripsiyon ünitelerinde eşit oranlarda ekzonik ve intronik bölgelerde bulunmaktadır. Alternatif olarak *C. elegans*'ta miRNA'ların %15'i konakçı genin promotorunun kontrolü altındadır. Geri kalanlar ise bağımsız promotorlar tarafından düzenlenmektedir (13). miRNA genlerinin %30'u protein kodlayan genleri antisense yönünde üst üste getirir ve miRNA'yı kendi promotorları ile bırakır. Bazı durumlarda, konakçı gen ile miRNA arasında ekspresyonda karşılıklı direkt bir ilişki bulunmaktadır (14).

"Kümeler" olarak bilinen ve uzun transkripsiyonel üniteler halinde ifade edilen çoklu miRNA'lar yaygın olarak bulunmaktadır (15).

Genomik düzen içindeki miRNA'lar bazı durumlarda bir miRNA ailesinin üyeleri olarak ele alınır. Tipik olarak, genomik lokalizasyona bakılmaksızın bir miRNA ailesi 2-7 nükleotid uzunluğunda çekirdek dizisini paylaşan bütün miRNA'ları kapsamaktadır (3). Örneğin, insan genomunda Let-7 ailesinin 13 farklı üyesi vardır ve bunların 7 tanesi kümeler içinde diğer Let-7 miRNA'ları ile birlikte bulunmaktadır (16). miR-34 ailesi özdeş çekirdek dizisi olan üç miRNA'dan (a, b, c) oluşmakta ve birçok türün gametlerinde gametogeneze önemli rol oynayan değişken ekspresyon profiline sahiptir (17). Hedefin tanınmasında çekirdek dizisi belirleyici olduğu için, miRNA aileleri ortak genleri düzenleme kapasitesine sahiptir (12). Örneğin, protein kodlayan dynamin-3 anlamlı ipliğinin intronu içinde miR-3120'yi buldururken, aynı introna sahip antisense ipliğinde ise miR-214'ü buldurmaktadır (18).

## 3. MikroRNA'nın Transkripsiyonu

miRNA'ların büyük çoğunluğu RNA polimeraz II tarafından ifade edilmektedir. miRNA primer transkripti olarak bilinen ilk RNA'lar diğer RNA polimeraz II transkriptleri gibi 5' metillenmiş şapka ve 3' poliadenillenmiş kuyruk alırken (19), Alu tekrarlarına yakın olan miRNA'ların RNA polimeraz III tarafından transkribe olduğu gösterilmiştir (20). miRNA'nın intronik olduğu durumlarda, prekürsörün salınımı mRNA splicingden önce meydana gelebilmektedir (21). İnsan miRNA'larının genom kapsamlı analizleri miRNA'ların kendi promotor haritalarını ve kromatin imzalarını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bu çalışmalarda intronik miRNA'ların 1/3'ünün konakçı genlerinden bağımsız ifadesi gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, miRNA'lar transkripsiyon başlangıç bölgelerinin upstream dizilerindeki binlerce nükleotid içinde lokalize olabilir. Birçok promotor, Pol II protomolarının özelliklerine benzer TATA kutusu ve başlangıç elemanlarını kapsamaktadır (22).

Transkripsiyon faktörlerini miRNA'lar ile karşılaştırmak için genom kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Fare embriyonik kök hücrelerinde, Oct4, Sox2, Nanog ve Tcf3'ün de içinde bulunduğu pluripotent transkripsiyon faktörleri fare embriyonik kök hücrelerinde ifade edilen miRNA'lar ile ilişkilendirilmiştir (23). miR-3960'ın transkripsiyon

faktörlerini kodlayan 73 mRNA'nın 3'-UTR'ında hedef bağlanma bölgesi bulunmaktadır (24). Transkripsiyon faktörleri miRNA ekspresyonunu pozitif veya negatif olarak düzenleyebildiği için, geri besleme döngüsü miRNA'nın kendi ekspresyonunu baskılayabilir veya artırabilir.

### 3.1. Pri-mikroRNA'nın İşlenme Süreci

RNA polimeraz II tarafından pri-miRNA transkriptlerine kesilen miRNA'lar, mikroprosesör kompleks tarafından prekürsör formuna dönüştürülmektedir (25). Mikroprosesör kompleks RNAaz III enzimi Drosha ve DGCR8'den (DiGeorge syndrome critical region 8 ve ayrıca Drosha'nın partneri Pasha olarak bilinir) meydana gelmektedir (25,26). RNAaz III enzimi RNA'yı kesmekte ve karakteristik olarak pre-miRNA'nın 3' ucunda 2 nükleotidlik bir çıkıntı bırakmaktadır (26). Drosha, primer transkriptten hairpin yapısının salınması için bir kesik yapımından sorumlu iki tane RNAaz III domaini içermektedir (26). Drosha bir tane tanınabilir çift-iplikli RNA bağlanma domainine (dsRBD) sahiptir. Ancak, Drosha RNA substratına direk olarak bağlanan iki dsRBD'li DGCR8'e ihtiyaç duymaktadır (27).

Mikroprosesör kompleks, hücre içinde çok sayıda miRNA'nın işlenmesinden sorumludur. Bu nedenle, RNA'nın yapısı, mikroprosesör kompleks tarafından tanınma açısından RNA dizisinden daha önemlidir. Primer transkript içinde, yaklaşık 65 nükleotidlik prekürsör dizisi terminal loop'u takiben kısmi baz-eşleşmesi olan kök bölgesini kapsar. miRNA'da birkaç önemli yapısal komponentin varlığı bildirilmiştir. Bu komponentin oluşumunda ise; prekürsör hairpin yapısının, çift iplikli kökün, kökü yanlarından destekleyen tek iplikli RNA segmentinin (ssRNA) ve 10 nükleotide sahip olan terminal ilmiğin önemi vurgulanmıştır (28,29). Drosha'nın kesim bölgesinin genel olarak tek iplik bazal bölgeden kökün temelini olan mesafenin belirlenmesiyle ayarlandığı ve bunun için ilmik yapısına gerek duyulmadığı gösterilmiştir (29). Ancak, terminal ilmiğin kesim reaksiyonunun etkinliği üzerine büyük derecede etkisi bildirilmiştir (30). *In vivo* olarak primer miRNA'dan prekürsör miRNA'nın tam olarak saptanması ve işlenmesi için tek iplikli yan dizi (flanking), hairpin kökü ve terminal ilmik

mikroprosesörün çalışmasına katkıda bulunmaktadır.

Primer-miRNA'nın işlenmesi hücredeki mikroprosesör miktarı ile düzenlenmektedir. Drosha ve DGCR8 post-transkripsiyonel olarak birbirlerini düzenlediği için mikroprosesör seviyesi otomatik olarak düzenlenmiştir. Mikroprosesör kompleks daha sonra, DGCR8 mRNA'sının 5'-UTR ucunda prekürsör miRNA'ya benzeyen hairpin yapısına bağlanmakta ve mRNA'yı kesmektedir (31).

### 3.2. Prekürsör MikroRNA'ların Nükleustan Sitoplazmaya Taşınması

*In vitro* ve *in vivo* ortamlarda XPO5, Ran-GTP bağımlı durumlarda pre-miRNA'lara yüksek afinite ile bağlanmakta ve prekürsör miRNA'lar Dicer tarafından işlenmek için hücre çekirdeğinden sitoplazmaya taşınmaktadır (32). Nükleer taşıma reseptörü, kofaktör Ran-GTP kullanılarak RNA hücre çekirdeğinden taşınır. GTP sitoplazmada GDP'ye hidrolize olmakta ve RNA'nın salınmasına izin vermektedir (33). XPO5'in taşıyıcı rolü dışında, ekzonükleazlar tarafından meydana gelen degradasyonu engelleyerek pre-miRNA'ları dengelemektedir (28). Genel olarak bakıldığında, XPO5 prekürsör miRNA'yı çekirdekten sitoplazmaya taşınmanın yanı sıra Dicer mRNA'sının da sitoplazmaya taşınmasına aracılık etmektedir (34).

### 3.3. MikroRNA Olgunlaşması

Pre-miRNA'lar 21-24 nükleotidlik olgun forma dönüşebilmek için çekirdekten sitoplazmaya taşınınca Dicer tarafından işlenirler. Aslında, Dicer uzun çift zincirli RNA'ları (dsRNA) RNA susturma yolağındaki 22 nükleotidlik küçük susturucu RNA'lara kesmekle sorumludur (35). Farklı hayvan ve bitki türlerinde helikaz, PAZ, dsRNA bağlanma ve 2 tane RNAaz III domainin varlığı ile karakterize olan Dicer proteini sentezlenir. PAZ domaini prekürsör miRNA'nın kök kısmında çıkıntı yapan 2 nükleotidlik diziyi tanır. Prekürsör miRNA'lar Dicer'a düzgün bir şekilde yüklenince, her bir RNAaz domaini ipliklerden birini keserek ilmik yapısının serbest bırakılmasını sağlamaktadır (36). Dicer'ın helikaz domaininin nükleaz domaini çevresinde olduğu ve prekürsör miRNA'da bulunan ilmik bölgesini tanımaya katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (37).

### 3.3.1. MikroRNA Olgunlaşmasındaki Önemli Faktörler

Dicer aktivitesi çok sayıda farklı protein etkileşimi ile düzenlenebilmektedir. Dicer stres yanıtının bir parçası olabilir ve interferonlar Dicer ekspresyonunun önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlanmaktadır (38). Dicer'in kesim etkisini artıran bir etkileşimci protein HIV-1 TAR RNA-bağlanma (TRBP) proteini olabilir. Dicer memelilerde prekürsör miRNA'yı olgun forma herhangi bir kofaktör olmadan kesebilme yeteneğinde olmasına karşın, TRBP bu kesim aktivitesini artırmaktadır (39,40). TRBP'nin prekürsör miRNA kesiminde oynadığı rol tam olarak bilinmese de, bazı çalışmalar TRBP ve Dicer etkileşiminin Dicer proteinini dengelediğini göstermiştir (40). Ancak, TRBP'nin olmadığı durumlarda Dicer seviyesinde herhangi bir etki gözlenmemiştir (41).

Birçok durumda ise Dicer aktivitesi bazı proteinler tarafından düzenlenmektedir. Bunlar arasında RNA bağlanma proteini AUF1 (AU bağlanma faktörü 1) endojen Dicer mRNA'sına bağlanarak karşılıklı ilişki kurmakta ve Dicer mRNA'sının stabilitesini bozarak miRNA üretimini baskılamaktadır (42). Bunun yanı sıra, diğer bir RNA bağlanma proteini olan RNA bağlanma motifi proteininin (RBM3) pre-miRNA işlenmesini uyardığı tespit edilmiştir (43). Prekürsör miRNA'ların olgun forma çevrilmesi ayrıca monosit kemoatraktan protein indüklenmiş protein-1 (MCPIP1) ile uyarılabilir (44). Hücre iskeleti ilişkili endoplazmik membran protein (CLIMP-63), Dicer ile yüksek moleküler ağırlıklı kompleks yaparak Dicer proteininin ayarlanmasına katkıda bulunmaktadır (45).

Bazı durumlarda Dicer proteini kendi katalitik aktivitesini helikaz domaini yardımı ile negatif olarak düzenleyebilir. Ancak, Dicer'in helikaz domaininin delesyonu veya de mutasyonların kesim aktivitesinin artmasınaneden olduğu ancak bu durumun miRNA'lara bağlanma duyarlılığını etkilemediği bildirilmiştir (39). Ayrıca insan Dicer mRNA'sının kendisi de 3 tane korunmuş Let-7 bağlanma dizisinin hedefidir (46). Bu açıdan bakıldığında prekürsör miRNA'nın olgunlaşması genel olarak Dicer seviyesinin ve aktivitesinin ayarlanması ile birçok

yoldan düzenlenmektedir.

### 3.3.2. Argonaute Proteini Aracılı MikroRNA Olgunlaşması

miRNA'ların olgunlaşmasında kaçınılmaz olan Dicer aktivitesinin yanısıra Argonaute proteinin de miRNA olgunlaşmasında önemi göz ardı edilemez. Prekürsör miRNA'nın *in vivo* olarak işlenmesi olgun miRNA ürünlerinin miRISC'a (miRNA ile indüklenmiş susturma kompleksi) birikimi ile ilişkilendirilir ve bu yükleme kompleksi Dicer, TRBP ve Argonaute'dan meydana gelmektedir (47). Birçok miRNA'nın işlenmesi için Argonaute'ın katalitik aktivitesine ihtiyaç duyulmamasına karşın, kompleksteki Argonaute'ın varlığı olgun miRNA'nın yüklenmesine olanak sağlamaktadır. Bazı durumlarda Argonaute, endonükleotik aktivitesini pre-kürsör miRNA'lar üzerine gerçekleştirmektedir. Memeli hücrelerinde Ago2'nin Dicer'in işlenmesinden önce Ago2-kesilmiş prekürsör miRNA üreten 3' hairpin yapısını kestiği gösterilmiştir (48).

Argonaute ayrıca bazı miRNA'ların Dicer tarafından işlenmesinin atlanmasına izin verir. Memeli hücrelerinde Ago2, endonükleaz aktivitesine sahip tek Argonaute'tır. Ayrıca, Dicer'in kaybindan etkilenmeden olgun miRNA'nın katalizlenmesini sağlayabilir (49). Dicer, 21-24 nükleotidlik miRNA dupleksi oluşturduktan sonra bir iplik, miRNA ile indüklenmiş sessizleştirme kompleksini (miRISC) şekillendiren Argonaute proteinine yüklenir. Olgun miRNA, Argonaute içinde bir kılavuz olarak görev görür ve hedef mRNA'ya kofaktörü gibi davranarak, mRNA'nın stabilizasyonu bozar veya translasyonu baskılar (50).

Dicer kesimi dsRNA ürünü oluşturmaktadır. İpliklerden birinin fonksiyonel olarak aktif olması için Argonaute kompleksine girebilmesi, dolayısıyla sarılmış olan dupleksin açılması gerekir. miRISC'a yüklenen tek iplikli olgun miRNA "kılavuz" olarak isimlendirilirken, diğeri yolcu "iplik" olarak parçalanır. miRNA dupleksinin termodinamik stabilitesi hangi ipliğin miRISC'a dahil olacağını belirler. Birçok miRNA dupleksinin stabilizasyonu eksik baz eşleşmesi ile bozulur. 5' ucunda daha az istikrarlı baz eşleşmesi yapan iplik Argonaute yüklemesi için seçilir (51).

Argonaute proteinlerinin miRNA yüklenmesi için PAZ, PIWI ve MID olarak isimlendirilen üç domaini vardır. Kılavuz RNA'nın 3' ucu PAZ domaini ile bağlantı halindedir ve birinci nükleotid üzerindeki 5' ucu monofosfat ise MID domaini tarafından stabilize edilir. Kılavuz RNA'nın merkez bölgesi ise PIWI domaininde bulunur. Bu bölge katalitik olarak aktiftir ve kılavuz iplik ile kusursuz eşleşme yapan mRNA hedefinin kesilmesine aracılık eder. Hayvanlarda miRNA'lar, mRNA hedeflerinin kesilmesi için yeteri kadar baz eşleşmesinden yoksundur. Bunun yerine, Argonaute kofaktörler ile etkileşim halinde olup mRNA'nın deadenilasyonunu veya kesimini kolaylaştırır. Ayrıca protein translasyonunu baskılar (50).

### SONUÇ

mRNA'ların farklı fizyolojik süreçlerde ve hastalıklarda gen ekspresyonu üzerine etkileri tespit edilmiştir. Son yıllarda, farklı hastalıkların teşhisinde miRNA'ların potansiyel markör olabileceği ve miRNA'ların alternatif terapötik uygulamalarını kapsayan bazı gelişmeler sağladığı bildirilmektedir. Farklı fizyolojik olaylar ve hastalıkların patogenezi, epigenetik mekanizmaların moleküler düzeyde anlaşılması ve alternatif uygulamalar için miRNA biyogenez yoluyla potansiyel hedef olarak gözükmektedir.

### KAYNAKLAR

- Lee RC., Feinbaum RL., Ambros V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-854.
- Wightman B., Ha I., Ruvkun G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75, 855-862.
- Bartel DP., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136, 215-233.
- O'Connell RM., Rao DS., Chaudhuri AA., Baltimore D., 2010. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Review Immunology*, 10, 111-122.
- Yousef M., Allmer J., 2014. *miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis*. 1st ed., 1-2, Humana Press, Springer Protocols.
- Reinhart BJ., Slack FJ., Basson M., Pasquinelli AE., Bettinger JC., Rougvie AE., Horvitz HR., Ruvkun G., 2000. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, 901-906.
- Bartel DP., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-297.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294, 853-858.
- Kozomara A., Griffiths-Jones S., 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acid Research*, 42 (Database issue): D68-D73.
- Winter J., Jung S., Keller S., Gregory RL., Diederichs S., 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11, 228-234.
- Yang JS., Lai EC., 2011. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular Cell*, 43, 892-903.
- Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst JL., Bradley A., 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, 14, 1902-1910.
- Martinez NJ., Ow MC., Barrasa MI., Hammell M., Sequerra R., Doucette-Stamm L., Roth FP., Ambros VR., Walhout AJ., 2008. A *C. elegans* genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity. *Genes & Development*, 22, 2535-2549.
- Baskerville S., Bartel DP., 2005. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 11, 241-247.
- Lee Y., Jeon K., Lee JT., Kim S., Kim VN., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *European Molecular Biology Organization*, 21, 4663-4670.

16. Mondol V., Pasquinelli AE., 2012. Let's make it happen: the role of let-7 microRNA in development. *Current Topics in Developmental Biology*, 99, 1-30.
17. Bouhallier F., Allioli N., Laval F., Chalmel F., Perrard MH., Durand P., Samarut J., Pain B., Rouault JP., 2010. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *RNA*, 16, 720-731.
18. Scott H., Howarth J., Lee YB., Wong LF., Bantounas I., Phylactou L., Verkade P., Uney JB., 2012. MiR-3120 is a mirror microRNA that targets heat shock cognate protein 70 and auxilin messenger RNAs and regulates clathrin vesicle uncoating. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 14726-14733.
19. Lee Y., Kim M., Han J., Yeom KH., Lee S., Baek SH., Kim VN., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *European Molecular Biology Organization*, 23, 4051-4060.
20. Borchert GM., Lanier W., Davidson BL., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural Molecular Biology*, 13, 1097-1101.
21. Morlando M., Ballarino M., Gromak N., Pagano F., Bozzoni I., Proudfoot NJ., 2008. Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nature Structural Molecular Biology*, 15, 902-909.
22. Monteys AM., Spengler RM., Wan J., Tecedor L., Lennox KA., Xing Y., Davidson BL., 2010. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA*, 16, 495-505.
23. Marson A., Levine SS., Cole MF., Frampton GM., Brambrink T., Johnstone S., Guenther MG., Johnston WK., Wernig M., Newman J., Calabrese JM., Dennis LM., Volkert TL., Gupta S., Love J., Hannett N., Sharp PA., Bartel DP., Jaenisch R., Young RA., 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 134, 521-533.
24. Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S., 2014. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes. *Bioinformatics*, 10, 423-427.
25. Denli AM., Tops BB., Plasterk RH., Ketting RF., Hannon GJ., 2004. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature*, 432, 231-235.
26. Han J., Lee Y., Yeom KH., Kim YK., Jin H., Kim VN., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*, 18, 3016-3027.
27. Yeom KH., Lee Y., Han J., Suh MR., Kim VN., 2006. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Research*, 34, 4622-4629.
28. Zeng Y., Cullen BR., 2005. Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 27595-27603.
29. Han J., Lee Y., Yeom KH., Nam JW., Heo I., Rhee JK., Sohn SY., Cho Y., Zhang BT., Kim VN., 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125, 887-901.
30. Zhang X., Zeng Y., 2010. The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer. *Nucleic Acids Research*, 38, 7689-7697.
31. Triboulet R., Chang HM., Lapierre RJ., Gregory RI., 2009. Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the microprocessor. *RNA*, 15, 1005-1011.
32. Bohnsack MT., Czaplinski K., Gorlich D., 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10, 185-191.
33. Lei EP., Silver PA., 2002. Protein and RNA export from the nucleus. *Developmental Cell*, 2, 261-272.
34. Bennasser Y., Chable-Bessia C., Triboulet R., Gibbings D., Gwizdek C., Dargemont C., Kremer EJ., Voinnet O., Benkirane M., 2011. Competition for XPO5 binding between Dicer mRNA, pre-miRNA and viral RNA regulates human Dicer levels. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18, 323-327.
35. Bernstein E., Caudy AA., Hammond SM., Hannon GJ., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 363-366.

36. MacRae IJ., Doudna JA., 2007. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 17, 138-145.
37. Lau PW., Guiley KZ., De N., Potter CS., Carragher B., MacRae IJ., 2012. The molecular architecture of human Dicer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19, 436-440.
38. Wiesen JL., Tomasi TB., 2009. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Molecular Immunology*, 46, 1222-1228.
39. Ma E., MacRae IJ., Kirsch JF., Doudna JA., 2008. Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *Journal of Molecular Biology*, 380, 237-243.
40. Koscianska E., Starega-Roslan J., Krzyzosiak WJ., 2011. The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors. *PLoS One*, 6, 28548.
41. Haase AD., Jaskiewicz L., Zhang H., Lainé S., Sack R., Gatignol A., Filipowicz W., 2005. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *European Molecular Biology Organization*, 6, 961-967.
42. Abdelmohsen K., Tominaga-Yamanaka K., Srikantan S., Yoon JH., Kang MJ., Gorospe M., 2012. RNA-binding protein AUF1 represses Dicer expression. *Nucleic Acids Research*, 40, 11531-11544.
43. Dresios J., Aschrafi A., Owens GC., Vanderklish PW., Edelman GM., Mauro VP., 2005. Cold stress-induced protein RBM3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 1865-1870.
44. Suzuki HI., Arase M., Matsuyama H., Choi YL., Ueno T., Mano H., Sugimoto K., Miyazono K., 2011. MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation. *Molecular Cell*, 44, 424-436.
45. Pépin G., Perron MP., Provost P., 2012. Regulation of human Dicer by the resident ER membrane protein CLIMP-63. *Nucleic Acids Research*, 40, 11603-11617.
46. Forman JJ., Legesse-Miller A., Collier HA., 2008. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 14879-14884.
47. Gregory RI., Chendrimada TP., Cooch N., Shiekhattar R., 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123, 631-640.
48. Diederichs S., Haber DA., 2007. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, 131, 1097-1108.
49. Rivas FV., Tolia NH., Song JJ., Aragon JP., Liu J., Hannon GJ., Joshua-Tor L., 2005. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12, 340-349.
50. Pasquinelli AE., 2012. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics*, 13, 271-282.
51. Schwarz DS., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore PD., 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115, 199-208.