

Prostat Kanseri İlişkili MikroRNA Kümelerinin Tespiti

Detection of microRNA Clusters Associated with Prostate Cancer

İsmail Haberal, Hasan Oğul
Bilgisayar Mühendisliği Bölümü
Başkent Üniversitesi
{ihaberal,hogul}@baskent.edu.tr

MikroRNA'lar (miRNA'lar), normal olarak transkripsiyon sonrası seviyede hedef mRNA ifadelerinin negatif düzenleyicileri olarak işlev gören, yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda, küçük kodlamayan RNA'ların bir sınıfıdır. Bir ya da birden fazla hedef geni baskılayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü gibi süreçlerde rol oynarlar. Son gelişmeler miRNA mutasyonları ya da yanlış ifadeleri, çeşitli insan kanserleri ile ilişkili olduğunu ve miRNAlar tümör baskılayıcılar ve onkogenler olarak işlev yaptığını göstermiştir. miRNAlar kanser ile ilişkili genlerin ekspresyonunu bastırarak ve kanserin teşhisi ve tedavisinde faydalı olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada, mikroRNA'ların prostat kanseri üzerindeki etkisini incelemek üzere normal ve hasta dokulardan alınan mikrodizi tabanlı ifade verileri kullanılarak hiyerarşik mikroRNA kümeleri elde edilmiştir. Kümeleme sonuçları biyolojik anlamlılıkları açısından irdelenmiştir. Bu yaklaşımın kanser mikroRNA ilişkilerinin tespitinde faydalı olacağı görülmektedir.

Anahtar Kelimeler—MikroRNA ve kanser, Prostat kanseri ve mikroRNA, miRNA analizi

Abstract—MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs of 22 nucleotides which normally function as negative regulators of target mRNA expression at the posttranscriptional level. miRNAs play a role for one or more target genes by suppressing in processes as growth, differentiation, proliferation and cell death. Recent evidence has shown that miRNA mutations or mis-expression correlate with various human cancers and indicates that miRNAs can function as tumour suppressors and oncogenes. MicroRNAs have been shown to repress the expression of important cancer-related genes and might prove useful in the diagnosis and treatment of cancer. In this study, hierarchical microRNA clusters are obtained through microarray expression data in order to analyze the microRNA prostate cancer relationships. Clustering results are evaluated by their biological relevance. It is seen that such approach can be useful in detectitn relationships between microRNAs and diseases.

Index Terms—MikroRNA and cancer, Prostate cancer and mikroRNA, Analysis of miRNA

I. GİRİŞ

mikroRNA'lar (miRNA), transkripsiyonel düzeyde gen ifade edilmesini düzenleyen, yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda, endojen kaynaklı, protein kodlamayan RNA ailesinin bir üyesidir. miRNA'lar gelişim, farklılaşma, hücre proliferasyonu, hematopoezis, anjiyogenezis ve apoptozisinde yer aldığı önemli birçok biyolojik işleve sahiptir. Buna göre değiştirilmiş miRNA ifadesi, kanser de dahil olmak üzere, insan hastalıklarına etkisi muhtemeldir.

İlk miRNA, Victor Ambros ve meslektaşları Rosalind Lee ve Rhonda Feinbaum tarafından 1993 yılında keşfedilmiştir. miRNA molekülü, büyük efektör protein kompleksi olarak bilinen RISC kompleksi ile birleşir. miRNA RISC'in başlıca bileşeni olan Ago proteinine yüklenir. miRNA içeren RISC kompleksi miRISC olarak adlandırılır. Bu kompleks miRNA'nın hedef mRNA'yı bulmasına ve hedef mRNA ile baz eşleşmesi yaparak transkripsiyonel düzeyde gen ifadenemesinin baskılanmasına yol açar. miRNA aracılı translasyon baskılanması üç türlü olmaktadır; mRNA'nın parçalanması, mRNA translasyonunun baskılanması ve mRNA'nın sitoplazmik P-cisimciği (P-body) içerisinde parçalanması.

miRNA'lar hücrenin normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gerekli olan çok önemli rollere sahiptir. Bundan dolayı, miRNA'ların ifade edilme düzeylerindeki değişimlerin kanserleri de içeren çok çeşitli hastalıklarda etkin rol oynaması hiç de şaşırtıcı değildir. Yapılan çalışmalar miRNA'ların kanser gelişimi, invazyonu ve metastazında kritik rol oynadığını göstermektedir. İlk kez kronik lenfoblastik lösemide (KLL) miRNA'ların insan kanserleriyle olan ilişkisini ortaya koymuşlardır [12]. Bu ilk çalışmayı takiben, miRNA'ların çeşitli kanserlerle ilişkisini belirlemeye yönelik araştırmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

miRNA'ların hem tümör baskılayıcı (TB-miR) hem de onkogen (Onko-miR) olarak işlev görmektedir. TB-miRNA'ların düşük düzeyde ifadenmesi kansere neden olan genlerin aktivasyonuna yol açmaktadır [13]. Örneğin, miR-15/16'lar B-hücre KLL'lerin %68'inde az veya hiç ifade edilememektedir. Bu miRNA'ların hedefleri anti-apoptotik onkogen protein olan BCL-2'nin mRNA'sıdır. miR-15/16'nın az ifade

edilmesi, onkoprotein olan Bcl-2'nin aşırı ifadenmesine ve sonucunda kanser hücrelerinin apoptoza girememesine yol açarak hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına yani kansere yol açmaktadır. Aynı şekilde onko-miRNA'ların aşırı ifadenmesinde kanser oluşumunda sıklıkla karşılaşılmaktadır. Örneğin, Onko-miR, miR-21, akciğer, meme, prostat, KLL, kolon, baş boyun kanserleri gibi bir çok kanser türünde aşırı ifadenmesi hücre proliferasyonuna yol açar [14]. Ayrıca, değişmiş miRNA ifade edilme düzeyleri, tümörün oluşum ve gelişim aşamaları, proliferasyon kapasitesi ve vasküler invazyon gibi önemli histopatolojik özellikleri için biyomarker olarak kullanılabilirlerdir.

miRNA'lar, mRNA'ları hedef aldıklarından kanserin erken tanısında ve tedavi amaçlı uygulamaların geliştirilmesinde önemli faydalar sağlayacağı gerçeği ortaya çıkmıştır [10].

Bu çalışmada, prostat kanserli hastalardan elde edilen ifade verileri kullanılarak, birlikte çalışan veya benzer çalışan mikroRNA'ların analizi yapılmıştır. Kümelerin biyolojik olarak anlamlılığını değerlendirmek için TAM sunucusu [5] kullanılmıştır. Bu analiz sonucunda hangi mikroRNA'ların hangi fonksiyon, hangi küme, hangi doku ve hangi hastalık ilişkisi üzerinde kümelendiği değerlendirilmiştir.

II. MATERYAL VE METOTLAR

A. Veri Kümesi

Çalışmada, NCBI (National Center for Biotechnology Information) GEO DataSets' inden GSE21036 deney numaralı, insan prostat kanseri verilerini içeren, 142 örnek ve 373 mikroRNA'dan oluşan veri kümesi kullanılmıştır. Burada, 218 hastanın prostat tümöründe 5 yıllık takibi ile ekson yeniden sekanslama, DNA kopya sayısı, mRNA ve mikroRNA ifadesinin, birincil veya metastatik prostat kanseri değerlendirmesi raporlanmıştır [2].

B. Hiyerarşik Kümeleme

Hiyerarşik kümeleme yöntemleri, kümelerin bir ana küme olarak ele alınması ve sonra aşamalı olarak içerdiği alt kümelere ayrılması veya ayrı ayrı ele alınan kümelerin aşamalı olarak bir küme biçiminde birleştirilmesi esasına dayanır. Hiyerarşik kümeleme yöntemlerinin çıktıları dendrogramlar ile sunulmaktadır. Birleştirici ve ayrıştırıcı hiyerarşik kümeleme yöntemleri en yakın komşu algoritmasını ve en uzak komşu algoritmasını kullanmaktadır. Bu çalışmada nesne yönelimli birleştirici hiyerarşik kümeleme modeli geliştirildiği için en yakın ve en uzak komşu algoritmaları kullanılmaktadır.

C. Uygulama Yöntemi

Veri kümesine önce hiyerarşik kümeleme algoritması uygulanmıştır. Yakın ve uzak komşuları belirlemek için Euclidean Distance (Öklit Uzaklık) bağıntısı, kümeler arasındaki ortalama uzaklığın en düşük değerini temel alan Average (Ortalama Bağlantı) bağıntısı kullanılmıştır. Hiyerarşik kümeleme ile veri kümesinin 5 kümeye ayrılması hedeflenmiştir. Bu kümelerden en yüksek seviyedeki 3 küme ele alınıp analiz edilmiştir. Kümeleme sonuçları ile veri kümesinin Dendrogram (Küme ağacı)' ı oluşturularak, veri kümesindeki örnekler

ile miRNA'ların ifade değerlerinin renk olarak temsil edildiği Sıcaklık Haritası (Heat Map) grafiği çizilmiştir. En yüksek değerli 3 kümeden elde edilen mikroRNA'lar seçilip, TAM sunucusu ile analizi yapılmıştır.

III. BULGULAR

Veri kümesine hiyerarşik kümeleme algoritması uygulanması sonucu 373 mikroRNA'nın 5 kümeye dağılımı Tablo I'de gösterilmiştir. Tabloya göre, 1. ve 5. kümelerdeki mikroRNA dağılımı daha az görünmektedir. Çalışmada, en yüksek miRNA sayısına sahip ilk üç küme olan 2.küme, 3. küme ve 4. küme analiz edilmek için seçilmiştir.

Küme	miRNA sayısı	sayısı
1. Küme	29	8
2. Küme	130	35
3. Küme	136	36
4. Küme	77	21
5. Küme	1	0

Tablo I : Kümelerin dağılımı

Hiyerarşik kümeleme sonucunda ortalama bağlantılı dendrogram Şekil 1' de gösterilmiştir.

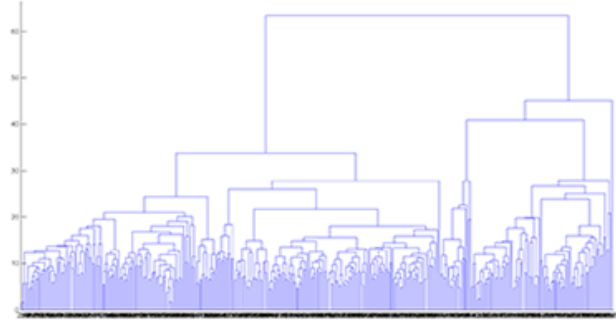


Fig. 1: Şekil 1: Ortalama bağlantılı dendrogram

En çok miRNA içeren 3.küme için sıcaklık haritası Şekil 2' de gösterilmiştir.

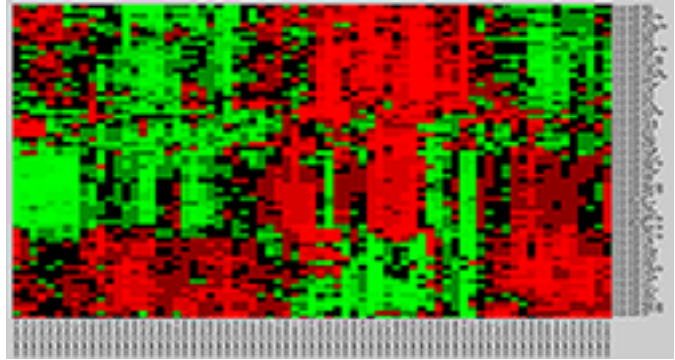


Fig. 2: Şekil 2: Sıcaklık Haritası (Heat Map)

Elde edilen hiyerarşik kümeleme sonucunda en belirgin 3 küme için fonksiyonel zenginleştirme analizi yapılmıştır. Bu amaçla TAM (Tool for annotations of miRNAs) adı verilen

araç kullanılmıştır.

TAM, İnsan mikroRNA'ları hakkında bilgi vermek için oluşturulmuş bir araçtır. TAM, çeşitli kurallara göre farkı kümeler halinde miRNA'lar ile entegre edilmiştir ve miRNA listeleri arkasında biyolojik anlamlı fonksiyonlar ile araştırmalar sağlar [4].

Verilen herhangi bir miRNA listesi için TAM; mikroRNA ailelerinin zenginleştirilmesini veya seyreltilmesini belirler, zenginleştirilmiş veya seyreltilmiş mikroRNA kümelerini keşfeder, zenginleştirilmiş veya seyreltilmiş mikroRNA ilişkili, hastalık, fonksiyon veya dokuları belirler.

TAM, 413 farklı mikroRNA'dan oluşan 238 mikroRNA kümesi içermektedir [5]. Bu üç kümeden elde edilen 343 mikroRNA, TAM sunucusuna yüklenerek, analiz edilmiş ve sonuçlar 4 kategori altında listelenmiştir. Bu sonuçlar EK-2' de verilmiştir. Sonuçlara göre P-Value değeri 0.05 'den küçük olanlar miRNA'ların etki ettiği, anlamlı sonuçlar olarak değerlendirilmiştir.

Küme kategorisi incelendiğinde, hsa-mir-106a, hsa-mir-17 ve hsa-mir-188 kümeleri anlamlı değerler vermiştir ($p < 0.05$).

Aile kategorisi incelendiğinde, mir-15, mir-17, mir-181, mir30, mir-8 aileleri anlamlı değerler vermiştir ($p < 0.05$).

Fonksiyon kategorisi incelendiğinde, Akt pathway, Angiogenesis, Apoptosis, Bone regeneration, Cell cycle related, Cell differentiation, Cell proliferation, Granulopoiesis, HCV infection, HIV latency, Hormones regulation, Human embryonic stem cell (hESC) regulation, Immune response, Inflammation, Muscle development, cell proliferation(Hwang etal BJC2006), immune system(Xiao's Cell2009), miRNA tumor suppressors ve onco-miRNAs değerlerinin anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

İnsan microRNA Hastalık Veritabanı (Human MicroRNA Disease Database -HMDD) kategorisi incelendiğinde, ACTH-Secreting Pituitary Adenoma, Adenocarcinoma, Adrenocortical Carcinoma, Alzheimer Disease, Autistic Disorder, Azoospermia, Breast Neoplasms, Carcinoma Hepatocellular, Carcinoma Renal Cell, Cardiomyopathy Hypertrophic, Colonic Neoplasms, Colorectal Neoplasms, Endometriosis, Glioma, Head and Neck Neoplasms, Heart Failure, Hematologic Neoplasms, Hepatitis B, Hepatitis C Chronic, Hodgkin Disease, Leukemia, Leukemia B-Cell, Leukemia Lymphocytic Chronic B-Cell, Leukemia Myeloid, Leukemia Myeloid Acute, Leukemia-Lymphoma Adult T-Cell, Liver Neoplasms, Lung Neoplasms, Lupus Vulgaris, Lymphoma, Lymphoma B-Cell, Marek Disease, Medulloblastoma, Melanoma, Muscular Disorders Atrophic, Myeloproliferative Disorders, Neoplasms, Neurodegenerative Diseases, Ovarian Neoplasms, Pancreatic Neoplasms, Polycythemia Vera, Precursor B-Cell Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma, Precursor Cell Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma, Prostatic Neoplasms, Psoriasis, Retinal Degeneration, Retinal Neovascularization, Salivary Gland Neoplasms, Schizophrenia, Stomach Neoplasms, Thyroid Neoplasms, Urinary Bladder Neoplasms ve Uterine Cervical Neoplasms değerlerinin anlamlı olduğu ortaya çıkmıştır ($p < 0.05$).

Son olarak doku kategorisi incelendiğinde, Adrenal, Brain,

Heart Muscle, Placenta ve Testicle değerleri elde edilmiştir fakat bu değerler anlamlı değerler değildir çünkü p değeri 0.05'ten büyük çıkmıştır.

IV. SONUÇ VE TARTIŞMA

MikroRNA'ların kümelmesiyle ilgili çok fazla çalışma yoktur. Bu çalışmada spesifik bir kanser türüne özgü hiyerarşik miRNA kümeleri elde edilmiştir.

Elde edilen kümelerin biyolojik olarak anlamlı olduğu doğrulanmıştır. Bu yaklaşımın miRNA – kanser ilişkilerinin anlaşılmasında ve klinik uygulamalara rehberlik etmek üzere faydalı olacağı görülmüştür.

REFERENCES

- [1] Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H., et al. "Integrative genomic profiling of human prostate cancer.", *Cancer Cell*, Volume 18, Issue 1, 1-2, 2010
- [2] GDS3257 Data Set, The National Center for Biotechnology Information(NBCI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE21036>
- [3] Ethem Alpaydın."Yapay Öğrenme", Boğ.Ünv Yayınları
- [4] Ming Lu, Bing Shi, Juan Wang, Qun Cao and Qinghua Cui. "TAM: A method for enrichment and depletion analysis of a microRNA category in a list of microRNAs". *BMC Bioinformatics*, 11:419, 2010
- [5] TAM: Tool for annotations of miRNAs, <http://202.38.126.151/hmdd/tools/tam.html>
- [6] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer". *Nature Reviews Cancer*, 6(4):259-269, 2006
- [7] Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W, Cui Q. "An analysis of human microRNA and disease associations". *PLOS ONE*, 3(10):e3420, 2008
- [8] Backes C, Meese E, Lenhof HP, Keller A. "A dictionary on microRNAs and their putative target pathways". *Nucleic Acids Research*, 38(13):4476-4486, 2010
- [9] Calin GA, et al. "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9):2999-3004, 2004
- [10] Faruk Saydam, İrfan Değirmenci, Hasan Veysi Güneş. "MikroRNA'lar ve Kanser", *Dicle Medical Journal*, 38 (1): 113-120, 2011
- [11] Nagehan E. Tunali, N. Ozan Tiryakioğlu, "The Role of Micro-RNAs in Cancer: Review", *Türkiye Klinikleri J Med Sci*,30(5):1690-700, 2010
- [12] Calin G A., et al. "Frequent deletions and downregulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:15524-15529, 2002
- [13] Aurora Esquela-Kerscher, Frank J. Slack. "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer", *Nature Reviews Cancer* 6, 259-269, 2006
- [14] Eis P, Tam W, Sun L, et al. "Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas". *PNAS*, 102:3627-3632, 2005
- [15] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14". *Cell*, 75:843-854, 1993