

# MicroRNA의 이해와 LNA

## What is microRNA?

MicroRNA(약칭 miRNA)는 약 22개 nucleotide로 이루어진 non-coding RNA로 유전자 발현을 조절하는 역할을 한다. 이 microRNA는 유전자의 전사 후(post-transcription) 단계에서 작용하며, 포유류의 경우 유전자의 60% 정도가 microRNA에 의해 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다. MicroRNA는 다양한 생체 내 프로세스에서 중요한 역할을 하며 암, 심장 질환, 신경관련 질병에 연관이 있는 것으로 밝혀졌다.

### MicroRNA 연구

MicroRNA는 1993년 Victor Ambros 연구진이 *C. elegans*에서 *lin-14*를 연구하는 과정에서 발견하였다. 이들은 LIN-14 단백질이 *lin-14* 유전자가 코딩하는 짧은 RNA에 의해 조절되는 것을 밝혀냈다. *lin-14* 유전자로부터 생성된 61 nt의 precursor가 22 nt RNA로 성숙되고, 이 22 nt RNA는 *lin-14* mRNA의 3' UTR에 있는 서열과 일부 상보적인 서열을 포함하고 있었다. 이들 서열의 일부 상보성으로 *lin-14* mRNA가 LIN-14 단백질로 translation 되는 것이 저해되었다. 당시에는 이런 연구 결과가 *C. elegans*와 같은 선충류의 특이한 성질이라고 여겨졌지만, 결과적으로 *lin-4* small RNA가 최초의 microRNA로 밝혀지게 된 것이다.

최신 miRBase(Release 20, June 2013)에 보고된 바에 의하면 24,521개의 microRNA가 밝혀졌고, microRNA 연구가 빠르게 성장하고 있는 것을 확인할 수 있다. 그러나 대부분의 microRNA 기능은 여전히 밝혀지지 않은 상태이다.

### miRBase: microRNA database ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org))

miRBase database는 발표된 microRNA 서열과 annotation을 검색할 수 있는 database이다. miRBase Sequence database는 microRNA transcript의 predicted hairpin portion 뿐만 아니라 mature microRNA의 위치와 서열에 대한 정보를 제공한다. Hairpin과 mature 서열로 검색 및 브라우징이 가능하고, microRNA 이름, 키워드, reference 및 annotation으로도 검색할 수 있다. 모든 서열 및 annotation data는 다운로드 가능하다.

### MicroRNA 생성

MicroRNA 유전자는 RNA polymerase II에 의해 전사되어 large primary transcripts(pri-microRNA)가 되고, pri-microRNA는 RNase III 효소인 Drosha를 포함한 단백질 복합체에 의해 약 70 nt 길이의 precursor microRNA(pre-microRNA)가 된다. pre-microRNA는 세포질로 이동하고 두번째 RNase III 효소인 DICER에 의해 약 22 nt의 mature microRNA가 된다. Mature microRNA는 ribonuclear particle로 들어가 RNA-induced silencing complex인 RISC가 되고, 여기서 microRNA가 mRNA의 타겟 사이트에 결합하여 translation을 저해하거나 타겟 mRNA를 분해함으로써 gene silencing이 진행된다(그림 1).

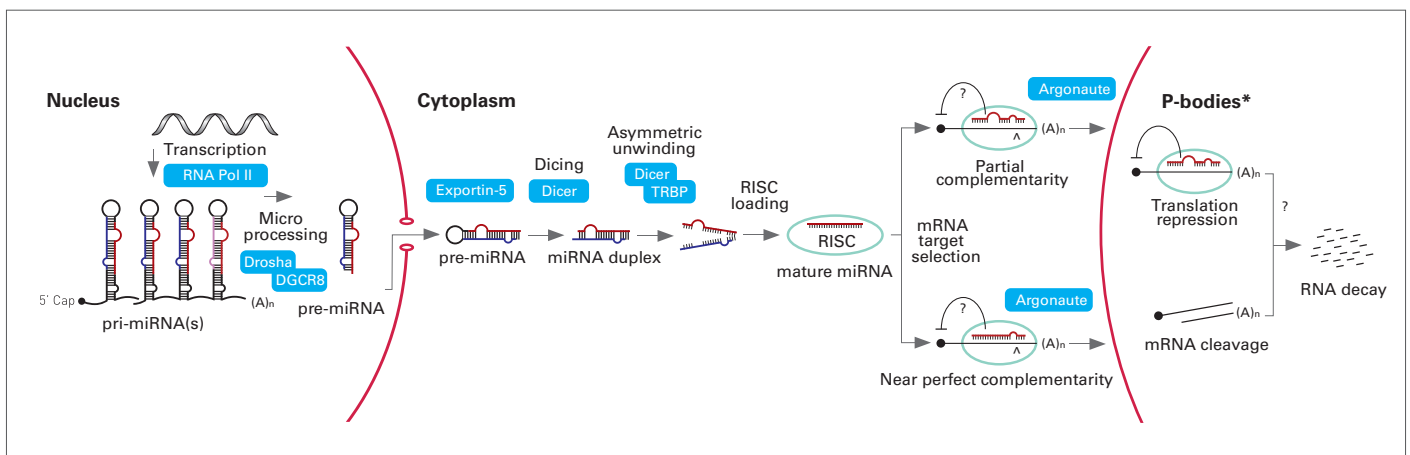


그림 1. MicroRNA biogenesis. Based on Wienholds and Plasterk, FEBS Letters 2005, 579: 5911-5922.

\* Processing bodies (P-bodies) are distinct foci within the cytoplasm of the eukaryotic cell consisting of many enzymes involved in mRNA turnover.

## MicroRNA 명명

MicroRNA의 명명은 “mir”를 앞에 붙이고, 뒤에 “-”와 숫자를 넣는다. 이때 숫자는 종종 명명한 순서를 나타내기도 하는데, 예를 들어 mir-123은 mir-156보다 앞서 명명되었으며 보다 먼저 밝혀졌을 것으로 예상된다. “mir-”는 pre-microRNA를 나타내며, 대문자가 있는 “miR-”은 mature microRNA를 의미한다.

한두 개의 서열을 제외하고 거의 동일한 서열의 microRNA들은 소문자를 추가하여 명명한다. 예를 들어 miR-121a와 miR-121b는 각각의 precursor인 mir-121a와 mir-121b에서 생성되었으며 서열도 매우 유사하다.

Mature microRNA는 동일하지만 게놈상에서 다른 부위에 위치한 pre-microRNA는 추가로 “-”와 숫자를 넣어 명명한다. 일례로 pre-microRNA인 mir-121-1과 mir-121-2는 동일한 mature microRNA(miR-121)가 되지만, 게놈상에서 다른 부위에 위치해 있다.

종에 따른 microRNA의 명명은 앞쪽에 표기한다. 예를 들어 hsa-miR-123은 인간(*Homo sapiens*) microRNA, oar-miR-123은 양(*Ovis aries*) microRNA이다. ‘v’는 viral(miRNA encoded by a viral genome), ‘d’는 *Drosophila* microRNA를 의미한다.

두 개의 mature microRNA가 동일한 pre-microRNA의 서로 다른 arms (3' arm 또는 5' arm)에서 유래한 경우, ‘-3p’ 또는 ‘-5p’를 뒤쪽에 추가하여 명명한다. (과거에는 위와 같은 구분을 ‘s’ (sense)와 ‘as’ (antisense)로 표기하였다). miR-142-3p는 3' arm에서 유래한 것이고, miR-142-5p는 5' arm에서 유래한 것이다.

MicroRNA의 명명법은 일반적으로 위와 같은 기준을 따르지만 예외의 경우도 있다.

## MicroRNA 기능

MicroRNA는 cell cycle 조절과 세포사멸, 발생 및 생리학적 단계에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 줄기 세포 분화, 조혈 작용, 저산소증, 심근과 골격근의 발생, 신경 발생, 인슐린 분비, 콜레스테롤 대사, 노화, 면역 반응 그리고 바이러스 증식에도 관여한다. 배발생(embryogenesis) 과정 중 microRNA는 조직 특이적으로 발현하거나 특정 시기에 발현하는데, 이는 분화와 조직 특이성 유지에도 microRNA가 역할을 한다는 것을 의미한다.

## MicroRNA와 유전자 발현

MicroRNA는 목적 mRNA의 3' UTR 내의 타겟 사이트에 결합하여 단백질 합성을 억제하거나 mRNA의 분해를 유발하여 gene silencing을 유도한다. mRNA에 있는 대부분의 타겟 사이트는 microRNA 염기서열과 일부만 상보적이기 때문에, 한 개의 microRNA는 여러 개의 다른 mRNA를 조절할 수 있다. 또한 한 개의 mRNA가 여러 microRNA에 대한 multiple binding site를 갖고 있을 수 있어서, 복잡한 유전자 조절 관계를 갖는다. 게다가 많은 microRNA는 매우 유사한 microRNA family의 일부이다.

## MicroRNA 바이오마커

MicroRNA는 암, 심장병, 신경관련 질병을 포함한 여러 질병들과 관련되어 있기 때문에 질병 바이오마커로서 중요한 역할을 한다. 결론적으로 microRNA는 진단이나 예후용 바이오마커, 약물반응 예보인자로서 활발히 연구되고 있다.

## MicroRNA 연구의 도전

MicroRNA 연구에는 두 가지 극복해야 할 문제점이 있다. 첫째, microRNA는 약 22 nt로 매우 짧기 때문에 기존의 DNA를 대상으로 하던 연구방법을 이용할 경우에는 microRNA를 검출할 수 있는 민감도가 떨어져 신뢰할 수 있는 데이터를 얻기가 힘들다. 둘째, microRNA family는 단일 염기 차이와 같은 높은 유사성 때문에 매우 높은 특이성과 단일 염기 mismatch 검출 능력이 있어야 한다.

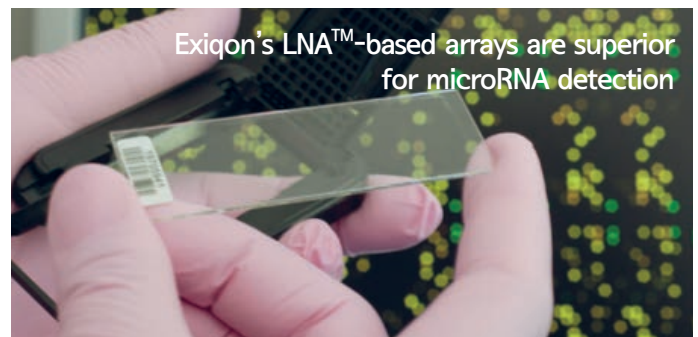
## Exiqon의 microRNA 연구

Exiqon은 Locked Nucleic Acid(LNA™) 기술을 적용한 첨단기술 제품과 서비스를 통해 microRNA 연구 발전을 이끌어왔다. LNA 기술이 적용된 probe, inhibitor, primer 제품은 microRNA를 타겟으로 높은 결합력과 특이성을 증가시킴으로써 microRNA 연구에서의 난점을 극복하고 있다.

## MicroRNA 연구 가이드

MicroRNA 연구를 위한 온라인 가이드로 RNA 분리부터 기능 분석까지 연구 단계별로 설명이 되어 있다.

자세한 내용은 [www.exiqon.com/microRNA-research-guide](http://www.exiqon.com/microRNA-research-guide)를 참조하세요.



**EXIQON**  
Seek Find Verify

## Exiqon microRNA 분석서비스

### Exiqon miRCURLY LNA™ microRNA Array, 7th gen

3100개의 miRBase ver 19.0 기반의 human, mouse, rat의 microRNA를 높은 특이성으로 Profiling

Exiqon microRNA 분석서비스는 다카라코리아의 협력회사인 지노체크를 통하여 샘플 접수, 분석 및 상담이 진행됩니다.

**GENOCHECK**  
Genome Partner For Your Life

## What is LNA?

LNA oligonucleotide는 기존 DNA나 RNA oligonucleotide에 비해 상보적 가닥과의 높은 결합력을 보유한다. 그 결과, LNA oligonucleotide는 높은 민감성과 특이성을 나타내며, 매우 유사하거나 짧은 DNA 또는 RNA 타겟을 분석하는데 유용하다.

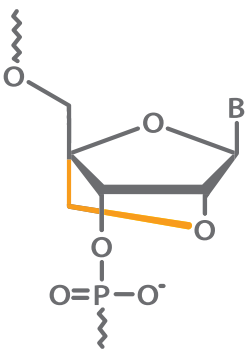
### LNA oligonucleotide 장점

- 뛰어난 민감성- DNA와 RNA에 비해 높은 민감도
- 균일한 검출- GC 함량에 영향 받지 않고 모든 microRNA 검출 가능
- 높은 특이성- 단일 염기 mismatch 검출 가능
- 높은 안정성- *in vivo*와 *in vitro*에서 small RNA에 강한 결합력 보유
- 뛰어난 적용성- 체액이나 FFPE 샘플에서 microRNA 검출 가능

### LNA란?

Locked Nucleic Acid(LNA™)는 강한 결합력을 가진 RNA analog로, ribose ring이 “locked” 되어 있어 Watson-Crick binding에 이상적인 구조이다(그림 2). 결과적으로 LNA를 포함한 oligonucleotide는 상보적 DNA나 RNA 가닥에 결합할 때 높은 온도에서도 안정성을 가진다. Oligonucleotide에 LNA monomer가 삽입될 때마다 이중 가닥의 melting temperature(Tm)가 2-8℃씩 증가하여(그림 3), 기존의 DNA 또는 RNA oligonucleotide에 비해 짧으면서도 높은 Tm값을 갖는 oligo 제작이 가능하다. 이러한 특징은 짧거나 유사성이 높은 서열을 검출할 때 매우 중요한 역할을 한다.

LNA oligonucleotide는 LNA를 일부 포함한 DNA 또는 RNA 혼합물로 구성되어 있기 때문에, oligonucleotide의 LNA 콘텐츠를 변화시킴으로써 민감성과 특이성을 최적화시킬 수 있다. Oligonucleotide에 LNA가 삽입되면 PCR, microarray와 *in situ* hybridization과 같은 hybridization을 기본으로 하는 실험에서 민감성과 특이성을 향상시킬 수 있다. 또한, GC 함량에 관계 없이 모든 서열에 대해 비슷한 결합력을 갖는 LNA oligonucleotide를 디자인할 수 있다.



**그림 2. The structure of LNA.** The ribose ring is connected by a methylene bridge (orange) between the 2'-O and 4'-C atoms thus “locking” the ribose ring in the ideal conformation for Watson-Crick binding. When incorporated into a DNA or RNA oligonucleotide, LNA makes the pairing with the complementary strand more rapid and increases the stability of the resulting duplex.

	Same length, higher T <sub>m</sub>	Shorter length, similar T <sub>m</sub>
DNA	23-mer   tcgatcgattagctactagctga   T <sub>m</sub> : 60°C	23-mer   tcgatcgattagctactagctga   T <sub>m</sub> : 60°C
DNA/LNA™	23-mer   tcgatcgattAgctactagctga   T <sub>m</sub> : 64°C	16-mer   ---atcgattAgctActga---   T <sub>m</sub> : 49°C
DNA/LNA™	23-mer   tcgatcGattAgctAcGtaCgta   T <sub>m</sub> : 78°C	8-mer   .....aGctacGt.....   T <sub>m</sub> : 61°C

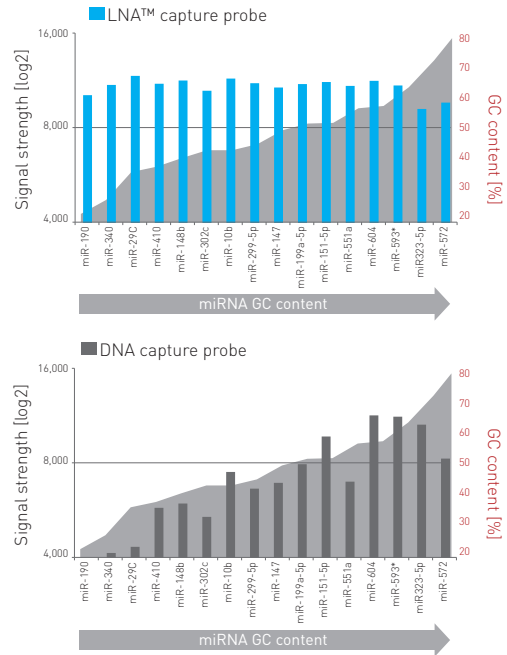
+ LNA™

DNA: atcg LNA: ATCG

**그림 3. Replace DNA with LNA for higher T<sub>m</sub>.** On the left, progressive substitution of DNA nucleotides with LNA increases the melting temperature of the oligonucleotide while maintaining the recognition sequence and specificity of the probe. On the right, LNA substitutions allow shortening of the probe while maintaining the same T<sub>m</sub>.

### Tm normalization: GC 함량에 관계 없이 강력한 검출 가능

LNA oligonucleotide는 LNA 함량을 변화시켜 Tm값과 결합력을 조절할 수 있다. 이러한 특징은 다양한 GC 함량을 갖는 짧은 서열 집단의 Tm값을 균일화할 수 있다. 또한 AT 함량이 높아 Tm값이 낮은 경우에는 더 많은 LNA를 추가하여 Tm값을 높일 수도 있다. 이를 통해 좁은 Tm값 범위를 갖는 LNA oligonucleotide들을 디자인할 수 있으며, 이는 microarray, PCR 뿐만 아니라 같은 조건에서 동시에 많은 타겟들을 특이적으로 결합하는 실험에 유용하다. Tm normalization의 효과는 DNA probe와 LNA probe를 이용하여 GC 함량이 다양한 microRNA를 검출한 비교실험에서 입증되었다(그림 4).



**그림 4. The power of T<sub>m</sub> normalization.** The signal from DNA-based capture probes varies with GC content and results in poor detection of many microRNAs, whereas LNA probes offer robust detection of all microRNAs. Signal intensity from microarray experiments using LNA-enhanced (blue) or DNA-based (gray) capture probes. MicroRNA targets with varying GC content were added at 100amol each.

### 뛰어난 단일 염기 검출

단일 염기 차이를 가진 유사한 염기서열도 LNA oligonucleotide를 이용하면 검출이 가능하다. 완전히 match한 경우와 mismatch가 있는 경우의 Tm값 차이로 나타낸다. Oligonucleotide에 LNA를 삽입하면 완전히 match한 경우와 mismatch가 있는 경우의 delta Tm 값 차이를 8℃까지 증가시킬 수 있고, Tm값 차이의 증가는 microRNA family와 같이 유사한 염기서열간 차이를 식별할 수 있게 해준다.

### 넓은 적용 가능성

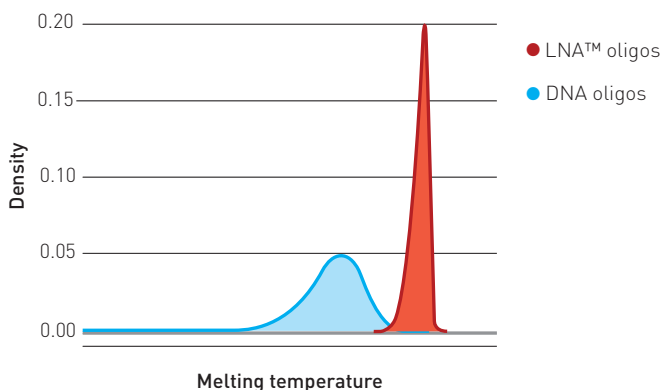
LNA에 의한 결합력 증가 효과는 LNA oligonucleotide의 침투 특성을 향상시켜 *in vivo* 연구에도 적합하다. 또한 oligonucleotide에 LNA를 삽입하면 endonuclease나 exonuclease에 저항성을 증가시켜 *in vitro* 와 *in vivo* 에서 안정성을 갖게 한다.

LNA oligonucleotide는 RNA 및 DNA와 유사한 물리적 특성(e.g. 수용성)을 가지고 있기 때문에 기존의 실험 방법에도 쉽게 적용 가능하다.

### MicroRNA 연구에 적합한 LNA

길이가 짧고 GC 함량이 다양한(5-95%) microRNA는 기존의 DNA나 RNA oligo를 이용하는 방법으로 분석하는데 어려움이 있다. 왜냐하면 DNA나 RNA를 기초로 한 microRNA 분석 방법은 GC 함량에 따라 Tm 값이 변하기 때문에 불확실하고 안정적이지 않다. 이러한 단점 때문에 microarray profiling과 많은 microRNA를 대상으로 하는 스케일이 큰 실험이 같은 조건에서 진행될 경우 문제를 일으키게 된다.

이런 문제점들은 LNA가 포함된 oligonucleotide를 사용하면 극복 가능하다. LNA 함량을 변화시킴으로써, microRNA의 GC 함량에 관계없이 특정 Tm값을 갖는 oligonucleotide를 디자인할 수 있다. Exiqon은 LNA 기술을 이용하여 primer, probe 및 inhibitor의 Tm값을 균일화시켜 같은 조건에서도 실험이 제대로 수행되도록 하였다(그림 5).



**그림 5. LNA microRNA inhibitors have high uniform potency.** The affinity of traditional full length microRNA inhibitors is highly influenced by the GC-content resulting in a Tm span of more than 40°C. In contrast, Exiqon's inhibitors span just 10°C around an optimal temperature.

MicroRNA 연구의 또 다른 어려움은 서열간의 매우 높은 유사성이다. 일부 microRNA family는 단일 염기 차이를 갖고 있는 경우도 있다. LNA를 포함한 primer와 probe는 서열 구별 능력이 향상되어, 매우 유사한 서열의 microRNA도 구별이 가능하다.

### 다양한 연구에 적용 가능한 LNA

LNA 기술은 microRNA 연구뿐만 아니라 미량이거나 염기서열이 짧고 유사한 샘플의 연구에도 적용할 수 있다(그림 6). LNA는 매우 짧은 염기서열을 이용한 연구에서도 획기적으로 검출효율을 높일 수 있으며, 특히 성과 민감성을 요하는 non-coding RNA와 small RNA 연구에서도 유용하다.

LNA에 대한 자료는 [www.exiqon.com/lna-technology](http://www.exiqon.com/lna-technology) 에서 열람 가능하다.

### DNA

- Real-time /quantitative PCR
- SNP detection/allele specific PCR
- Methylation analysis
- Bead-based applications
- Chromosomal FISH
- Comparative genome hybridization
- Proteomics of isolated chromatin segments (PICH)
- Antigene inhibition
- Mutagenesis

### mRNA

- Real-time /quantitative PCR
- Microarray analysis
- In situ hybridization
- Northern blotting
- Bead-based applications
- Fluorescence activated cell sorting
- Isolation
- Inhibition of RNA function
- RNA modification (frame shifting/exon skipping)
- DNAzymes

### ncRNA

- Real-time /quantitative PCR
- Microarray analysis
- In situ hybridization
- Northern blotting
- Fluorescence activated cell sorting
- Inhibition of RNA function
- RNA modification (frame shifting/exon skipping)

### miRNA

- Real-time /quantitative PCR
- Microarray analysis
- In situ hybridization
- Northern blotting
- Bead-based applications
- Inhibition of RNA function

#### PCR based approaches

#### Hybridization based approaches

#### In vivo based approaches

**그림 6. Proven LNA applications.** LNA is a powerful tool in many applications where standard DNA or RNA oligonucleotides do not have sufficient affinity or specificity. The figure shows an overview of some of the LNA applications that have been used for the study of RNA and DNA.



See how LNA™ works...  
Watch the LNA™ movie at  
[www.exiqon.com/e-talk](http://www.exiqon.com/e-talk)