

Sinteza, mehanizmi regulacije i uloga mikroRNA

Čolić, Valentina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:181:032921>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



**ODJEL ZA
BIOLOGIJU**
Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Valentina Čolić

Sinteza, mehanizmi regulacije i uloga mikroRNA

Završni rad

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Završni rad

SINTEZA, MEHANIZMI REGULACIJE I ULOGA mikroRNA

Valentina Čolić

Rad je izrađen: na Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka

Mentor: dr. sc. Rosemary Vuković, doc.

Kratak sažetak:

MiRNA razred su malih (~22-25 nukleotida), jednolančanih, evolucijski vrlo očuvanih, nekodirajućih molekula RNA koje imaju specifičnu ulogu u kontroli genske ekspresije na post-translacijskoj i transkripcijskoj razini. Kod životinja se miRNA sintetiziraju u dva koraka, djelovanjem dva enzima endoribonukleaza III (RNaza III) lokalizirana u jezgri i citoplazmi, dok se dorada miRNA u biljkama u cijelosti odvija u citoplazmi i provodi pomoću jedne RNaze III. Kao dio kompleksa miRISC, zrela miRNA prepoznaje ciljnu mRNA. Nakon prepoznavanja, ovisno o stupnju komplementarnosti, dolazi do egzonukleazne aktivnosti proteina Ago. Kod životinja je utvrđeno da miRNA reguliraju signalne putove te osnovne stanične procese poput proliferacije, diferencijacije, te da imaju važnu ulogu u neuralnom razvoju, imunitetu te održavanju homeostaze reguliranjem programirane stanične smrti, itd. Biljne pak miRNA na specifičan način reguliraju razvoj biljnih organa poput listova i cvijeta, kao i vaskularni razvoj, homeostazu fitohormona i nutrijenata, a uključene su i u odgovor na stres do kojeg dolazi uslijed djelovanja biotičkih i abiotičkih čimbenika.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: mikroRNA, dorada, RISC, Ago, uloga

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju

BASIC DOCUMENTATION CARD**Final thesis****Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Department of Biology****Undergraduate university study programme in Biology****Scientific Area:** Natural sciences**Scientific Field:** Biology**SYNTHESIS, MECHANISMS OF REGULATION AND FUNCTION OF microRNA****Valentina Čolić****Thesis performed at:** Subdepartment of Plant Ecophysiology and Biochemistry**Supervisor:** Rosemary Vuković, PhD, Asst. Prof.

Short Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of small, noncoding RNAs, approximately ~22-25 nucleotides long, single-stranded, evolutionary conserved, which are known to play specific regulatory role on post-transcription and transcription level. In animals, miRNAs synthesis occurs in two steps, processed by two exonucleases III (RNase III), which are localised in nucleus and cytoplasm, while plant miRNA processing is dependent on one RNase III, which is localised in cytoplasm. As a part of microRNA-induced silencing complex, miRNAs are able to recognise the target mRNAs. After recognition, depending on the degree of complementarity, the exonuclease (slicer) activity of Ago protein occurs. In animals, it was determined that miRNA regulates signal pathways and basic cellular processes such as proliferation, differentiation, and play an important role in neural development, immunity, and homeostatic maintenance by regulating programmed cell death, etc. Plants miRNAs specifically regulate the development of plant organs such as leaves and flowers, as well as vascular development, phytohormones and nutrition homeostasis, and are included in response to the stress caused by the action of biotic and abiotic factors.

Original in: Croatian**Keywords:** microRNA, processing, RISC, Ago, role**Date of grading:**

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in National university library in Zagreb in electronic form. It is also available on the web site of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Sadržaj

| | |
|---|----|
| Uvod..... | 1 |
| 2. Otkriće mikroRNA..... | 2 |
| 3. Sinteza miRNA..... | 3 |
| 3.1. MiRNA geni..... | 3 |
| 3.2. Sinteza i dorada životinjske miRNA..... | 3 |
| 3.2.1. Uklapanje životinjske miRNA u kompleks RISC..... | 5 |
| 3.3. Sinteza i obrada miRNA u biljkama..... | 7 |
| 3.3.1. Uklapanje biljne miRNA u kompleks RISC..... | 8 |
| 4. Mehanizmi regulacije genske ekspresije..... | 10 |
| 4.1. Mehanizam prepoznavanja ciljnih mRNA..... | 10 |
| 4.2. Molekule miRNA u post-transkripcijskoj regulaciji ekspresije gena vezanjem na 3'-UTR ciljnih gena..... | 11 |
| 4.2.1. Inhibicija inicijacije translacije..... | 11 |
| 4.3. Molekula miRNA u posttranskripcijskoj regulaciji ekspresije gena vezanjem na 5'-UTR ciljnih gena..... | 14 |
| 4.3.1. Utišavanje translacije..... | 14 |
| 4.4. Regulacija na razini transkripcije..... | 15 |
| 5. Uloge miRNA..... | 16 |
| 5.1. Uloge miRNA u životinjskim organizmima..... | 16 |
| 5.2. Uloge miRNA u biljnim organizmima..... | 18 |
| 6. Zaključak..... | 20 |
| 7. Literatura..... | 21 |

Kratice

miRNA – mikroRNA (od engl. *microRNA*)

RNA – ribonukleinska kiselina (od engl. *Ribonucleic acid*)

mRNA – glasnička RNA (od engl. *messenger RNA*)

rRNA-ribosomalna RNA (od engl. *ribosomal RNA*)

tRNA – transportna RNA (od engl. *transfer RNA*)

siRNA, od engl. *small interfering RNA*

piRNA – piwi-vezujuće (od engl. *piwi interacting RNA*)

snRNA – male jezgrine RNA (od engl. *small nuclear RNA*)

RNaza III – endoribonukleaza III

Ago – Argonaut

miRISC – kompleks za utišavanje induciran molekulom mikroRNA (od engl. *microRNA-induced silencing complex*)

let-7 od engl. *lethal-7*

3'-UTR-3' – netranslatirana regija (od engl. *3'-untranslated region*)

5'-UTR-5' – netranslatirana regij (od engl. *5'-untranslated region*)

pri-miRNA – primarna miRNA (od engl. *primary miRNA*)

pre-miRNA – prekursor miRNA (od engl. *precursor-miRNA*)

DGCR-8 od engl. *DiGeorge syndrome critical region gene 8*

dsRNA – dvolančanu molekulu RNA (od engl. *double-stranded RNA*)

EXP-5 – eksprotin-5

GTP – gvanozin-trifosfat

GDP – gvanozin-difosfat

LoQS od engl. *loquacious*

TRBP-RNA od engl. *transactivation response RNA-binding protein*

PRKPRA od engl. *protein activator of interferon induced protein kinase*

RLC od engl. *RISC loading complex*

DCL1 od engl. *dicer-like 1*

poli-(A) rep – poliadenilatni rep

SE – dsRNA-vezujući protein (od engl. *SERRATE*)

HYL1 – protein s motivom cinkovog prsta (od engl. *hyponastic leaves1*)

CBC – kompleks kapa-vezujućih proteina jezgre (od engl. *nuclear cap-binding complex*)

HST – nukleoplazmatski transporter (od engl. *HASTY*)

eIF – eukariotski inicijacijski faktor

eIF4E – citoplazmatski eukariotski faktor inicijacije 4E

m⁷G – kapu-7-metilgvanozin (od engl. *7-methylguanosine*)

eIF4A – citoplazmatski eukariotski faktor inicijacije 4A

eIF4G – citoplazmatski eukariotski faktor inicijacije 4G

eIF3 – citoplazmatski eukariotski faktor inicijacije 3

PABP1 – poli-(A) vezujući protein (od engl. *poly(A)-binding protein*)

NMD od engl. *nonsense-mediated decay*

PTC – prijevremeni terminacijski kodon (od engl. *premature termination codon*)

GW138 od engl. *Gawky*

CAF1, od engl. *chromatin assembly factor-1*

CCR4, od engl. *chemokine receptor type 4*

HCV – virus hepatitisa C

HuH – 7-ljudske stanice tumora jetre (od engl. *human hepatoma cells*)

XRN1 – 5'-3' egzoribonukleaza

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (od engl. *deoxyribonucleic acid*)

SNP – polimorfizmi jednog nukleotida (od engl. *single nucleotide polymorphism*)

HDAC4 – histon-deacetilazu 4 (od engl. *Histone deacetylases*)

HIV – virus humane imunodeficijencije (od engl. *human immunodeficiency virus*)

PCD – programirana stanična smrt (od engl. *programmed cell death*)

EC miRNA – ekstracelularne miRNA

DNaze – deoksiribonukleaza (od engl. *Deoxyribonuclease*)

TF – transkripcijski faktor

HD – ZIP protein (od engl. *homeodomain-leucine zipper protein*)

ARF od engl. *auxin response factors*

ABA – abscizinska kiselina (od engl. *abscisic acid*)

GA – giberelinska kiselina (od engl. *Gibberellin*)

1. Uvod

RNA (ribonukleinska kiselina) smatra se pramolekulom života, budući da je jedina molekula koja nosi genetičku informaciju i ima katalitičku ulogu (Alberts i sur. 2002). Osnovne RNA molekule jesu glasnička RNA (mRNA, od engl. *messenger RNA*), ribosomalna RNA (rRNA, od engl. *ribosomal RNA*) te transportna RNA (tRNA, od engl. *transfer RNA*). Uz to, postoje razredi malih, nekodirajućih molekula RNA poput male interferirajuće RNA (siRNA, od engl. *small interfering RNA*), mikroRNA (miRNA, od engl. *micro RNA*), piwi-vezujuće (piRNA, od engl. *piwi interacting RNA*), male jezgrine RNA (snRNA, od engl. *small nuclear RNA*) itd.

MiRNA razred su malih (~22-25 nukleotida), jednolančanih, evolucijski vrlo očuvanih, nekodirajućih molekula RNA koje imaju specifičnu ulogu u kontroli genske ekspresije na post-translacijskoj (Bartel i sur. 2004) i transkripcijskoj razini (Paugh i sur. 2016). Kod životinja se miRNA sintetiziraju u dva koraka, djelovanjem dva enzima endoribonukleaza III (RNaza III) lokalizirana u jezgri i citoplazmi, dok se dorada miRNA u biljkama u cijelosti odvija u jezgri i provodi se pomoću jedne RNaze III (Wahid i sur. 2010). Zrela miRNA u konačnici kompleksira s proteinom Argonaut (Ago) u kompleks za utišavanje induciran molekulom mikroRNA (miRISC, od engl. *microRNA-induced silencing complex*) koji je prvi puta opisan kod roda *Drosophila* (Hammond i sur. 2000). Proteini Ago predstavljaju jezgru kompleksa miRISC budući da imaju egzonukleaznu aktivnost (Song i sur. 2004), dok molekula miRNA osigurava specifičnost u odabiru ciljne mRNA. Zrele miRNA mogu djelovati i izvan kompleksa miRISC. Regulacija gena putem miRNA drevni je evolucijski mehanizam kontrole ekspresije gena (Zhang i sur. 2006).

Odmah po otkriću dokazana je vremenski i tkivno-specifična ekspresija miRNA u razvoju organizama, a daljnjim su istraživanjima znanstvenici utvrdili značajnu ulogu miRNA u reguliranju signalnih putova te osnovnih staničnih procesa poput proliferacije i diferencijacije, kao i njihovu važnu ulogu u neuralnom razvoju i funkciji, imunitetu, te održavanju homeostaze reguliranjem programirane stanične smrti. Stoga aberacije u ekspresiji miRNA mogu rezultirati patološkim stanjima. Za razliku od staničnih miRNA i drugih RNA koje budu degradirane u vrlo kratkom vremenu ukoliko se nađu u ekstracelularnom mikro-okruženju, ekstracelularne, cirkulirajuće miRNA izuzetno su stabilne i mogu se dugo održati u nepovoljnim uvjetima (Sohel 2016). Biljne pak molekule miRNA na specifičan način reguliraju razvoj biljnih organa poput listova i cvjetova, kao i

vaskularni razvoj, homeostazu fitohormona, a uključene su i u odgovor na stres do kojeg dolazi uslijed djelovanja biotičkih i abiotičkih čimbenika.

2. Otkriće mikroRNA

Prva miRNA otkrivena je 1993. godine proučavanjem heterokroničnih gena kod oblića *Caenorhabditis elegans* (Lee i sur. 1993). Victor Ambros (1989) otkrio je kako uslijed nulte mutacije gena *lin-4* dolazi do nepotpunog razvoja ličinki *C. elegans* (Ambros 1989). Životinjama su nedostajale strukture karakteristične za odrasle jedinke te nisu bile sposobne polagati jaja (Ambros 1989). Kanije, iste te godine, Ruvkun i sur. (1989) otkrili su kako gen *lin-4* regulira gen *lin-14* na post-transkripcijskoj razini, tako što onemogućava njegovu ekspresiju, putem nekomplementarnog sparivanja baza s 3'-krajem netranslatirane regije (3'-UTR, od engl. *3'-untranslated region*) mRNA (Bhaskaran i Mohan 2014). Konačno je 1993. godine objavljeno otkriće mehanizma stanične regulacije koji uključuje male, nekodirajuće transkripte.

S početka se smatralo kako je ovaj fenomen regulacije ekspresije gena prisutan isključivo kod oblića *C. elegans* (Wienholds i Plasterk 2005), budući da sljedećih 7 godina nije bilo naznaka postojanja sličnih nekodirajućih molekula ni u kojim drugim organizmima. To se promijenilo 2000. godine kada je identificiran drugi heterokronični gen u oblicima, gen *let-7* (od engl. *lethal-7*), koji ne kodira protein, već molekulu RNA dužine ~22 nukleotida (Reinhart i sur. 2000). Nedugo nakon toga, Reinhart i sur. (2002) su metodom hibridizacije RNA (*Northern blot*) otkrili prisutnost miRNA u uročnjaku (*Arabidopsis thaliana*) (Reinhart i sur. 2000), nakon čega je sve veći broj molekula miRNA identificiran je bioinformatičkim i eksperimentalnim metodama u biljkama, životinjama i virusima (Cai i sur. 2010).

3. Sinteza miRNA

Za posredovanje geneze miRNA iz primarnog miRNA (pri-miRNA, od engl. *primary miRNA*) transkripta, neophodni su multiproteinski mikroprocesori koji čine bitnu razliku između životinjske i biljne sinteze i dorade miRNA. Po završetku dorade, miRNA ulazi u kompleks RISC zajedno s Ago i drugim proteinima uslijed čega nastaje zrela miRNA. Proteini Ago predstavljaju jezgru kompleksa miRISC, a sastavljeni su od 3 karakteristične domene: N-terminalne domene PAZ, srednje domene MID i C-terminalne domene PIWI (Wahid i sur. 2009). Domena PAZ veže se na RNA, dok domena PIWI nalikuje Ribonukleazi H (Li i sur. 2010).

3.1. MiRNA geni

Područja za sintezu miRNA mogu biti prisutna na raznim lokacijama unutar genoma, a na temelju smještaja u genomu postoje dva različita promotora miRNA: intrageniski, oni kojima su geni smješteni na intronima protein-kodirajućih transkripata, i intergeniski, oni kojima su geni smješteni na egzonima nekodirajućih transkripata (Ha i Kim 2014). Postoje i policistronske transkripcijske jedinice u kojima se nekoliko lokusa miRNA nalazi u blizini, što upućuje na to da se više od jedne pre-miRNA može doraditi iz istog primarnog transkripta (Altuvia i sur. 2005). Geni miRNA koji se nalaze u intronima dijele promotor s genom "domaćinom" (od engl. *host genes*) s kojim su zajedno transkribirani, potom zasebno doradjeni (Rodriguez i sur. 2004). Nasuprot tomu, intergenske miRNA su neovisne transkripcijske jedinice s vlastitim regulatornim elementima (Saini i sur. 2007). Spoznaja da miRNA mogu imati vlastite promotore unutar introna (Monteys i sur. 2010) te da imaju više mjesta početka transkripcije, čini regulaciju ekspresije ovih molekula vrlo složenom.

Sekvence TATA-kutije identificirane su uzvodno od gena miRNA (Houbaviy i sur. 2005). Osim toga, u intergeniskim genima miRNA identificirani su otoci CpG, čija je uloga u regulaciji ekspresije miRNA još uvijek nepoznata. Istraživanja su pokazala kako je ekspresija gena miRNA, koji su ugrađeni u otoke CpG, regulirana hipo- odnosno hipermetilacijom sekvenci CpG, što dodatno doprinosi ekspresiji specifičnog profila ovih miRNA, bilo u normalnim ili kancerogenim stanicama (Lujambio i sur. 2007).

3.2. Sinteza i dorada životinjske miRNA

Sve životinjske miRNA najprije se doraduju u jezgri (Wahid i sur. 2010). U sintezu i doradu uključen je velik broj različitih proteina. Životinjske miRNA inicijalno se

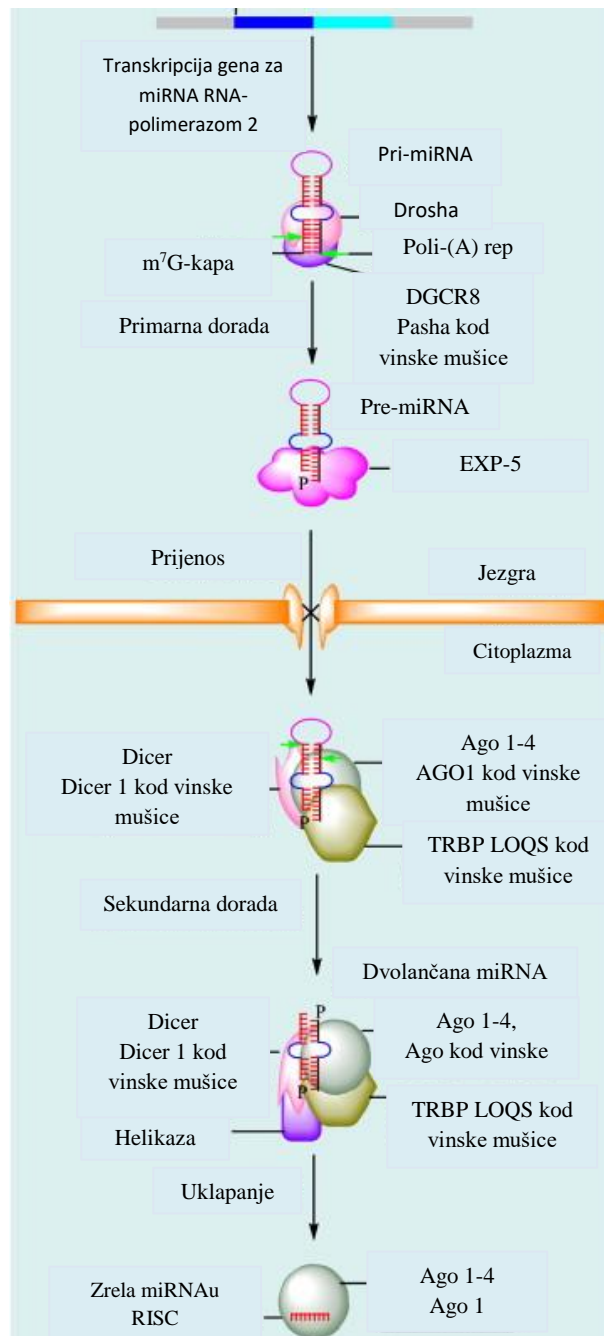
sintetiziraju s genskih lokusa miRNA, pomoću RNA-polimeraze II, iako neke lokuse transkribira i RNA-polimeraza III (Okamura i sur. 2007). Prvi korak dorade uključuje cijepanje pri-miRNA u prekursor miRNA (pre-miRNA, od engl. *precursor-miRNA*), koja također ima oblik ukosnice, dužine ~70-120 nukleotida (Wahid i sur. 2010). Ovaj korak dorade izvodi enzim Drosha koji sadrži ~160 kDa veliku ribonukleaznu domenu - RNazu III (Kim i sur. 2009). Kako bi nastao funkcionalan mikroprocesor, Drosha se dimerizira s proteinom DGCR-8 (od engl. *DiGeorge syndrome critical region gene 8*), koji veže dvolančanu molekulu RNA (dsRNA, od engl. *double-stranded RNA*) ili proteinom Pasha kod vinske mušice i oblića (Kim i sur. 2009; Slika 1; Wahid i sur. 2010). Utvrđeno je kako su proteini DGCR-8 i Drosha visoko konzervirani u životinjama, ali ne u biljkama (Bhaskaran i Mohan 2014; Kim i sur. 2009). Mehanizam pomoću kojega protein DGCR8 prepoznaje svoje supstrate pri-miRNA nije u potpunosti poznat, ali je otkriveno kako DGCR8 koristi domenu Rhed, hem-vezujuću dimernu domenu, koja se veže na dva kraja ukosnice pri-miRNA (Quick-Cleveland i sur. 2014). Tako domena Rhed direktno sudjeluje u stvaranju kompleksa DGCR8-pri-miRNA, te na taj način DGCR-8 potpomaže precizno cijepanje posredovano RNazom III, na mjestu udaljenom ~11 nukleotida od mjesta vezanja DGCR8 (Quick-Cleveland i sur. 2014). U svrhu daljnje dorade novonastala pre-miRNA se prenosi u citoplazmu Eksportinom 5 (EXP-5) (Slika 1.; Wahid i sur. 2010), Ran-GTP ovisnim transportnim receptorskim proteinom (Wahid i sur. 2010). Prijenos se odvija kroz kompleks jezgrinih pora, tj. velikih proteinskih kanala uklopljenih u jezgrinu membranu (Nakielny i Dreyfuss 1999). EXP-5 prepoznaje i veže pre-miRNA preko karakterističnih jednolančanih privjesaka dugih 2-3 nukleotida, koji su ostali nakon cijepanja mikroprocesorom (Kim i sur. 2009). Kao što je slučaj i s drugim jezgrinim transportnim proteinima, protein EXP-5 veže svoj supstrat kooperativno vežući GTP, a otpuštanje supstrata u citoplazmi popraćeno je hidrolizom GTP-a u GDP (Kim i sur. 2009).

Dok mikroprocesor Drosha određuje sekvencu zrele miRNA cijepajući pre-miRNA na jednom kraju, drugi kraj i konačnu sekvencu koju će naposljetku imati zrela miRNA određuje citoplazmatski protein Dicer, koji cijepa pre-miRNA ~22 nukleotida od prethodno stvorenog kraja (Park i sur. 2011). Tako cijepanjem pre-miRNA nastaje dvolančana molekula miRNA duga ~18-22 nukleotida. Dicer je vrlo specifičan i vrlo konzerviran protein kojega nalazimo u gotovo svim eukariotskim organizmima (Wahid i sur. 2010). Neki organizmi sadržavaju nekoliko različitih homologa proteina Dicer, pri čemu različiti izooblici imaju specifične i različite uloge (Kim i sur. 2009). Istraživanja navinskoj mušici pokazala su da Dicer-1 za funkcioniranje zahtjeva protein LoQS (od engl. *Loquacious*,

poznat i kao protein R3D1), koji sadrži dsRNA-vezujuću domenu, potrebnu za doradu pre-miRNA (Wahid i sur. 2010) (Slika 1; Wahid i sur. 2010). Ljudski pak Dicer stupa u interakciju se s dva bliska proteina, s RNA-vezujućim proteinom TRBP (od engl. *Transactivation Response RNA-Binding Protein*), i protein-kinazom PRKRA (od engl. *Protein Activator Of Interferon Induced Protein Kinase*, poznatu i kao PACT) (Slika 1.; Wahid i sur. 2010).

3.2.1. Uklapanje životinjske miRNA u kompleks RISC

Osim što imaju ulogu obrade pre-miRNA u zrele miRNA, proteini Dicer, TRBP i/ili PACT i Ago doprinose stvaranju RISC tako što stvaraju kompleks RLC (od engl. *RISC loading complex*) (Wahid i sur. 2010). Istraživanja pokazuju da se stabilni lanac dvolančane miRNA veže na proteine TRBP kompleksa RLC, dok je drugi lanac miRNA u interakciji s proteinima Ago kompleksa RLC, te je tako „označen“ za ulaz kompleks u RISC (Kim i sur. 2009). RNA-helikaza ima ulogu odmatanja dvolančane miRNA te uklanjanja „neoznačenog“ lanca miRNA (Wahid i sur. 2010). Tim mehanizmom samo jedan lanac dvolančane miRNA ostaje uklopljen u miRISC. U početku se smatralo kako je drugi lanac miRNA nefunkcionalni bioproduct miRNA biogeneze koji prolazi degradaciju, dok su kasnija istraživanja utvrdila da otpuštena miRNA može igrati važne biološke uloge (Iorio i Croce 2012).



Slika 1. Sinteza i dvostupanjska dorada životinjskih (Preuzeto i prilagođeno prema: Wahid i sur. 2010). RNA polimeraza II transkribira gene za miRNA pri čemu nastaje pri-miRNA. Drosha s proteinom DGCR8 (kod čovjeka) ili Pasha (kod vinske mušice) cijepa pri-miRNA u pre-miRNA, koju potom transportnim protein EXP-5 prenosi u citoplazmu radi daljnje dorade. Dicer, kojemu je za funkcioniranje potreban protein LoQS (kod vinske mušice) ili RNA-vezujućim protein TRBP i protein-kinaza PRKPRA (kod čovjeka) cijepa pre-miRNA te nastaje dvolančana miRNA dužine ~18-22 nukleotida. Nakon odmatanja dvolančane miRNA RNA-helikazom slijedi uklapanje s proteinima Ago.

3.3. Sinteza i obrada miRNA u biljkama

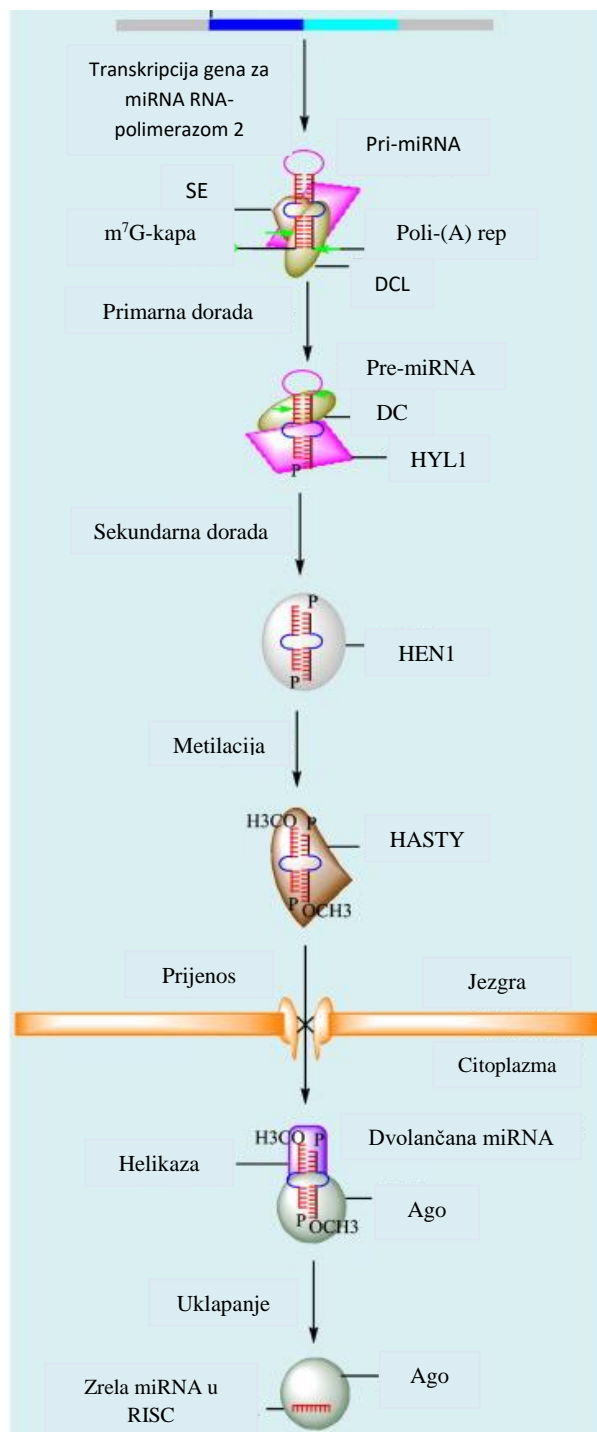
Biljne molekule miRNA vrlo su konzervirane, od mahovina sve do kritosjemenjača (Wahid i sur. 2010). Većina biljnih gena za miRNA nalaze se u intergenskim područjima (Wahid i sur. 2010), a u biljkama postoje i policistranske transkripcijske jedinice u kojima se nekoliko miRNA lokusa nalazi u blizini. Ipak, policistranska raspodjela daleko je češća u životinjskim, nego u biljnim organizmima (Jones-Rhoades i sur. 2006).

Budući da u biljkama nisu nađeni homolozi proteina Droscha i DGCR8/Pasha, pretpostavlja se kako se dorada pri-miRNA u zrele miRNA odvija samo u jezgri (Slika 2.; Wahid i sur. 2010), budući je protein DCL1 (od engl. *Dicer-like 1*), koji ima uloge životinjskih mikroprocesora Droscha i Dicera, najzastupljeniji u jezgri (Wahid i sur. 2010). Biljne pri-miRNA sintetizira RNA-polimeraza II s genskih lokusa miRNA (Slika 2; Wahid i sur. 2010). Transkripcijom nastaje pri-miRNA koja kao i životinjska, ima oblik ukosnice, kapu na 3'-kraju i poli-(A) rep na 5'-kraju (Jones-Rhoades i sur. 2006). Prvi korak dorade izvodi protein DCL1 koji djeluje u kompleksu zajedno s dsRNA-vezujućim proteinom SE (ili SERRATE) i proteinom s motivom cinkova prsta HYL1 (od engl. *hyponastic leaves1*) te kompleksom kapa-vezujućih proteina jezgre (CBC, od engl. *nuclear cap-binding complex*) (Chen 2008, Slika 2; Wahid i sur. 2010). Kompleks CBC olakšava biogenezu miRNA vjerojatno kroz izravnu interakciju s kapom na 5' kraju pri-miRNA (Lu i Fedoroff 2000). Djelovanjem navedenih proteina, iz pri-miRNA nastaje pre-miRNA koja također ima oblik ukosnice.

Drugi korak dorade uključuje proteinski kompleks DCL1:HYN, koji cijepa pre-miRNA pri čemu nastaje dvolančana miRNA (Slika 2.; Wahid i sur. 2010). Konačna dorada do zrele miRNA uključuje metilaciju malom RNA-metiltransferazom HEN1 (od engl. *Hua Enhancer 1*) (Slika 2; Wahid i sur. 2010). Metilacija se odvija na 2'-OH skupinama nukleotida, na 3'-terminalnoj ribози svakog kraja miRNA (Jones-Rhoades i sur. 2006). Epigenetički mehanizam metilacije u ovom slučaju nije povezan s utišavanjem (Sunker i sur. 2012), budući da novonastala 2'O-metilna skupina stabilizira miRNA štiteći ih destabilizacije uzrokovane egzonukleaznim djelovanjem ili uridilacijom. Nakon dorade s proteinom DCL1 i metilacije 3'-krajeva proteinom HEN1, dvolančana miRNA prenosi se u citoplazmu uz pomoć nukleocitoplazmatskog transportera HASTY (HST) koji je homolog životinjskog transportnog proteina EXP-5 (Chen 2008; Jones-Rhoades i sur. 2006, Slika 2.; Wahid i sur. 2010).

3.3.1. Uklapanje biljne miRNA u kompleks RISC

Kada se dvolančana miRNA nađe u citoplazmi, spremna je za uklapanje u kompleks RISC. Kao i kod životinja, izbor lanca koji će se vezati za Ago određen je prema termodinamičkoj stabilnosti. U genom uročnjaka nalazimo gene za 10 proteina Ago iz 3 udaljene filogenetske grane (Vaucheret 2008). Sposobnost endonukleazne aktivnosti utvrđena je kod Ago1, Ago4, Ago7 i Ago10. Kao i kod životinja, RNA-helikaza ima ulogu u odmatanju te uklanja jednog lanca dvolančane miRNA, što rezultira stvaranjem kompleksa miRISC, u koji je s proteinom Ago uklopljena zrela miRNA (Jones-Rhoades i sur. 2006).



Slika 2. Sinteza i dorada biljnih miRNA (Preuzeto i modificirano prema: Wahid i sur. 2010) RNA polimeraza II transkribira gene za miRNA pri čemu nastaje pri-miRNA. Protein DCL1 (zajedno s proteinima SE i HYL1) posreduje nastanak pre-miRNA. Proteinski kompleks DCL1:HYN cijepa pre-miRNA uslijed čega nastaje dvolančana miRNA. Konačna dorada miRNA uključuje metilaciju dvolančane miRNA pomoću HEN1 metiltransferaze. Metiliranu dvolančanu miRNA u citoplazmu prenosi transporter HASTY. Nakon odmatanja dvolančane miRNA RNA-helikazom slijedi uklapanje s proteinima Ago.

4. Mehanizmi regulacije genske ekspresije

Regulacija genske ekspresije pomoću molekula miRNA opsežno je proučavana tijekom posljednjih desetljeća. Utvrđeno je kako pojedinačna miRNA može kontrolirati ekspresiju više od jedne ciljne mRNA, te da miRNA obično ciljaju i reguliraju skup mRNA umjesto specifičnog mRNA supstrata, što znači da svaka mRNA može biti regulirana s više miRNA (Cai i sur. 2009). S početka se smatralo kako kompleks miRISC djeluje samo na utišavanje ekspresije gena na post-transkripcijskoj razini, no kasnija istraživanja su pokazala kako miRISC može regulirati ekspresiju gena i na razini transkripcije, izravnim vezanjem na molekulu DNA (Krol i sur. 2010) Kao dio kompleksa miRISC, zrela miRNA prepoznaje ciljnu mRNA. Nakon prepoznavanja, ovisno o stupnju komplementarnosti, dolazi do endonukleazne aktivnosti proteina Ago. Osim utišavanja, kompleks miRISC može i aktivirati ekspresiju gena.

4.1. Mehanizam prepoznavanja ciljnih mRNA

U kompleksu miRISC, molekula miRNA osigurava specifičnost odabira ciljane mRNA, budući da su krajevi miRNA često heterogeni zbog adicije ili delecije 1-2 nukleotida (Azuma-Mukai i sur. 2008). Sekvence su varijabilnije na 3'-kraju, iako se varijacije mogu naći i na 5'-kraju (Azuma-Mukai i sur. 2008). Nepreciznom ili alternativnom doradom, RNaza III na 5' kraju unosi promjene koje rezultiraju raznolikim „seed“ sekvencama dugim ~2-7 nukleotida i ključnim za specifičnost miRNA (Azuma-Mukai i sur. 2008). Nasuprot tomu, na 3'-kraju nalaze se nesporeni nukleotidi, najčešće uracil i adenin, koji dodaje nepoznata uridil/adenil-transferaza (Azuma-Mukai i sur. 2008). Najvažniji mehanizam prepoznavanja predstavlja sparivanje između sekvence „seed“ miRNA i ciljne sekvence mRNA (Ellwanger i sur. 2011). Sekvenca „seed“ je područje dugo minimalno 6 nukleotida (obično ~6-8), koje se nalazi na poziciji unutar prvih 8 nukleotida od 5'-kraja (Ellwanger i sur. 2011). Prema početnoj poziciji u odnosu na 5'-kraj, definirano je nekoliko tipova sekvenci „seed“. Većina interakcija miRNA-mRNA uključuje područje „seed“, međutim, više od 60% „seed“ interakcija sadrži krivo sparane nukleotide i izbočenja, što ukazuje na to kako komplementarno sparivanje putem ovih sekvence nije nužno.

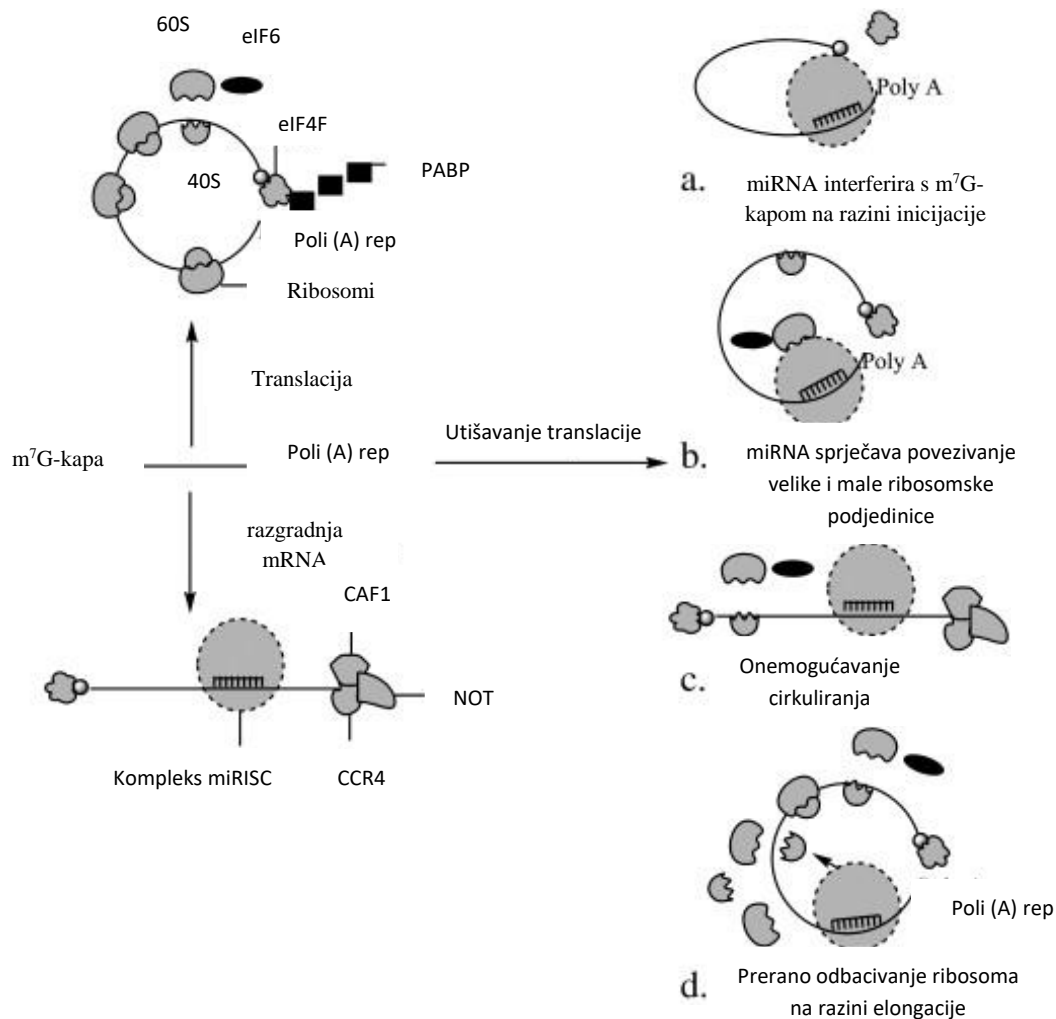
Način vezanja životinjskih miRNA na ciljnu mRNA još jedna razlika u odnosu na vezanje biljnih miRNA. Životinjske se miRNA vežu nekomplementarnim sparivanjem baza, dok se vezna mjesta za miRNA na biljnim mRNA nalaze u središtu komplementarnih regija,

te se većina biljnih miRNA veže se na ciljane mRNA visoko komplementarno (Richard i Erik 2009).

4.2. Molekule miRNA u post-transkripcijskoj regulaciji ekspresije gena vezanjem na 3'-UTR ciljnih gena

4.2.1. Inhibicija inicijacije translacije

Proces translacije podijeljen je u 3 faze: inicijaciju, elongaciju i terminaciju. Inicijacija predstavlja najslabiju fazu, a kod prokariota je značajno jednostavnija nego kod eukariota kod kojih je potrebno najmanje 11 proteina zvanih eukariotskim inicijacijskim faktorima (eIF; Cooper i sur. 2007). Pri inicijaciji, protein Ago stupa u interakciju s nekoliko inicijacijskih faktora, a zabilježeno je nekoliko mehanizama kojima kompleks miRISC inhibira inicijaciju. U kapa-ovisnoj inicijaciji neophodan je citoplazmatski eukariotski faktor inicijacije 4E (eIF4E), budući da prepoznaje m⁷G-kapu, a vezanjem na nju potiče okupljanje ostalih faktora inicijacije, dok miRNA vezanjem na m⁷G-kapu onemogućava kapa-ovisnu translaciju. Osim što se veže na m⁷G-kapu, eIF4E stvara kompleks s inicijacijskim faktorima eIF4A i eIF4G (Slika 3; Wahid i sur. 2010). U interakciji s eIF3, eIF4G doprinosi povezivanju male ribosomske podjedinice 40S na 5'-kraj mRNA, te se vežu na poli-(A) vezujući protein PABP1 na 3'-kraju mRNA (Cooper i sur. 2007). Navedene interakcije između između eIF4E, eIF4G i PABP1 posreduju cirkuliranju mRNA u sofisticiranu zatvorenu petlju u kojoj se povezuju 5' m⁷G-kapa i 3' poli-(A) rep (Cooper i sur. 2007). Naime kompleks miRISC mehanizmom deadenilacije interferira sa stvaranjem konformacije zatvorene petlje (Orang i sur. 2014, Slika 3; Wahid i sur. 2010). Iste te godine, Chendrimada i sur. (2007) otkrili su još jedan mehanizam inhibicije inicijacije u koji je uključen inicijacijski faktor eIF6, koji sprječava prijevremeno spajanje velike ribosomalne podjedinice s malom (Chendrimada i sur 2007, Slika 3; Wahid i sur. 2010). Naime, kada se ljudski protein Ago 2 poveže s eIF6, velika i mala ribosomalna podjedinica nisu u mogućnosti povezati se (Eulalio i sur. 2008 Slika 3; Wahid i sur. 2010).



Slika 3. Mogući mehanizmi regulacije (Preuzeto i modificirano prema: Wahid i sur. 2010). MiRNA se udružuje s kompleksom inicijacijskih faktora eIF4F, koji sadržava podjedinice eIF4A, eIF4E i eIF4G, te privlači ribosomske podjednice koje posreduju cirkuliranje molekule mRNA u sofisticiranu zatvorenu petlju u kojoj se povezuju 5' m⁷G-kapa i 3' poli(A) rep (gore lijevo). MiRNA vezanjem na ciljnu molekulu mRNA osigurava visoko-specifično cijepanje mRNA Ago proteinima, što rezultira razgradnjom mRNA (dolje lijevo). Osim toga, miRNA posreduje utišavanje translacije nekim od navedena 4 mehanizma (desno): (a) kompleks miRISC vezanjem na m⁷G-kapu onemogućava kapa-ovisnu translaciju, ili (b) kompleks miRISC sprječava spajanje velike ribosomalne podjedinice s malom; kada se ljudski protein Ago 2 poveže s eIF6, velika i mala ribosomalna podjedinica nisu u mogućnosti povezati se, (c) kompleks miRISC mehanizmom deadenilacije interferira sa stvaranjem konformacije zatvorene petlje, (d) Osim što može djelovati na razini inicijacije, molekula miRNA vrši represiju translacije u fazi elongacije mehanizmom koji potiče prijevremenu disocijaciju ribosoma s mRNA

4.2.2. Inhibicija elongacije translacije

Nakon što je nastao inicijacijski kompleks translacija se nastavlja elongacijom polipeptidnog lanca (Cooper i sur. 2007). Sam mehanizam elongacije sličan je u prokariotskim i eukariotskim stanicama (Cooper i sur. 2007). Osim što može djelovati na razini inicijacije, molekula miRNA vrši represiju translacije u fazi elongacije mehanizmom koji potiče prijevremenu disocijaciju ribosoma s mRNA (Eulalio i sur. 2008, Sacco i Masotti 2013, Slika 3; Wahid i sur. 2010). Takvo prijevremeno odbacivanje ribosoma proučavano je u prokariotima, te je dokazano da peptidil-tRNA disocira s ribosoma prije nego što dosegne STOP-kodon (Neu-Yilik i sur. 2004). Iako mehanizam prerane disocijacije peptidil-tRNA nije najjasniji, okidač preranog odbacivanja ribosoma može biti degradacijski proces NMD (od engl. *nonsense-mediated decay*), uzrokovan prijevremenim terminacijski kodonom PTC (od engl. *premature termination codon*) koji se nalazi uzvodno od krajnjeg introna u aberantnim mRNA (Neu-Yilik i sur. 2004).

4.2.3. Razgradnja mRNA

Životinjske miRNA mogu inducirati razgradnju mRNA usprkos nekomplementarnom sparivanju (Lim i sur. 2005; Wu i sur. 2006). Provedena istraživanja ukazuju na to da miRNA u životinjskim stanicama ne uzrokuje razgradnju ciljne mRNA endonukleaznim cijepanjem pomoću proteina Ago, već usmjerava mRNA u degradacijske aparate gdje se odvijaju deadenilacija i uklanjanje m⁷G-kape (Eulalio i sur. 2008). To nije slučaj kada su miRNA i ciljna mRNA potpuno komplementarno sparene (Eulalio i sur. 2008). Iako miRNA posredovana razgradnja mRNA primarno zahtjeva proteine Ago, razgradnja se ne može odviti bez kompleksa za deadenilizaciju i kompleksa za uklanjanje kape (Behm-Ansmant i sur. 2006). Deadenilacijom 3'-kraja i/ili uklanjanjem kape na 5'-kraju, miRNA izlaže mRNA molekulu te označava početak razgradnje. Citoplazmatska razgradnja većine eukariotskih mRNA započinje skraćivanjem njihovih poli(A) repova, odnosno deadenilacijom pomoću egzoribonukleaznog deadenilacijskog kompleksa, koji se sastoji od nekoliko proteina (CAF1 od engl. *chromatin assembly factor-1*, CCR4 od engl. *hemokine receptor type 4* i NOT) (Eulalio i sur. 2008; Cooper i sur. 2007). Interakcija između GW138 (od engl. Gawky) i PABP pojačava proces deadenilacije, iako proteini PABP nisu direktno odgovorni za to (Wu i sur. 2006).

4.3. Molekula miRNA u posttranskripcijskoj regulaciji ekspresije gena vezanjem na 5'-UTR ciljnih gena

Regulacija translacije posredovana molekulama miRNA može se odvijati putem sparivanja na područja 5'-UTR ciljne mRNA. U odnosu na vezna mjesta na područjima 3'-UTR, vezna mjesta za miRNA na 5'-UTR ili izvorištu replikacije su manje funkcionalna ili gotovo nefunkcionalna (Lytle i sur. 2007). Iako miRNA mogu aktivirati i utišati ekspresiju gena vezanjem na 5'-UTR, uočeno je da interakcije miRNA putem 5'-UTR učestalije induciraju aktivaciju translacije, umjesto represije (Jopling i sur. 2005).

4.3.1. Utišavanje translacije

Proučavajući molekulu miR-2 u embrionalnim stanicama vinske mušice, Moretti i sur. (2010) objavili su model miRNA-posredovanog utišavanja putem vezanja na područje 5'-UTR mRNA. Uočili su da molekula miR-2 inducira deadenilaciju mRNA te inhibira formiranje 80S funkcionalnog ribosomskog kompleksa, čime inhibira inicijaciju translacije kod kapa-ovisne translacije (Sacco i Masotti 2013). Osim toga, dokazano je da molekule miRNA imaju ulogu steričkih regulatora kada se vežu na 5'-UTR ciljne mRNA jer uzrokuju steričke smetnje koje ometaju kapa-ovisnu translaciju na ribosomima (Moretti i sur. 2010).

4.3.2. Aktivacija translacije

Kod sisavac je jetrena molekula miR-122 uključena u regulaciju metabolizma lipida i kolesterola (Sacco i Masotti 2013). Virus hepatitisa C (HCV) evolucijski je razvio mehanizam kojim koristi ovu miRNA za regulaciju vlastite replikacije. Ujedno, HCV je prvi primjer miRNA-ovisne aktivacije translacije putem vezanja na 5'-UTR ciljne mRNA. (Jopling i sur. 2008) Vezanje molekule miR-122 na 5'-UTR ne utječe na stabilnost RNA, već pojačava proces translacije, što u konačnici rezultira obiljem virusnih molekula RNA (Jopling i sur. 2008). Prilikom ovog istraživanja uočeno je da HCV-a ima četiri vezna mjesta za miR-122: prvo na 3'-UTR, druga dva na 5'-UTR, te posljednje vezno mjesto se nalazi uzvodno od unutrašnjeg ribosomskog ulaznog mjesta IRES (od engl. *internal ribosome entry site*), RNA strukture koja omogućava kapa-neovisnu inicijaciju translacije u sredini virusnog genoma RNA (Jopling i sur. 2005). Kao najvažnije, otkriveno je da molekula miR-122 održava postojanje HCV-a u jetri, budući da je utišavanje gena *miR-122* u staničnoj liniji HuH-7 (od engl. *hemochromatotic*) rezultiralo značajnim smanjenjem stope replikacije virusne RNA (Jopling i sur. 2005). Budući da genom HCV-a nema strukturu m⁷G-kape niti

poli(A) repa, miRNA djeluje umjesto strukture m⁷G-kape te na taj način ubrzava vezanje ribosoma (Orang i sur. 2014). Osim što molekula miR-122 ubrzava vezanje ribosoma te tako potiče translaciju, protein Ago2 i molekula miR-122 mogu djelovati kooperativno te alternativnim mehanizmom usporiti degradaciju virusnog genoma inhibirajući visoko procesivnu 5'-3' egzoribonukleazu XRN1 domaćina (Shimakami i sur. 2012).

4.4. Regulacija na razini transkripcije

Prisutnost miRNA u jezgri te molekularni mehanizmi za unos zrele miRNA u jezgru naglašavaju njihov potencijal aktivacije transkripcije (Paugh i sur. 2016). Još nisu definirani točni mehanizmi regulacije za ovakve miRNA-DNA interakcije. Ranije je dokazano da je DNA sposobna formirati strukturu trostruke zavojnice *Hoogsteen* interakcijama između velikog utora DNA s drugom DNA ili RNA (Catalanotto i sur. 2016). Na temelju tih saznanja pretpostavlja se da miRNA formira trostruku uzvojnica s dvolančanom DNA također putem *Hoogsteen* vodikovih veza (Catalanotto i sur. 2016). Na taj način miRNA može promijeniti funkciju gena, budući da je u izravnoj interakciji s ciljnim DNA sekvencama u regulacijskim regijama i promotorima gena (Paugh i sur. 2016). Računalnim tehnikama Paugh i sur. (2016) godine pokazali su da ljudski genom, ali i genom drugih vrsta sadrži triplet vezujuće sekvence koje favoriziraju stvaranje miRNA-DNA tripleta. Molekularni mehanizmi heterotripleta potiču konformacijske promjene koje uključuju odmotavanje dvolančane DNA što rezultira aktivacijom transkripcije gena. Osim toga, zabilježena je prisutnost specifičnih veznih proteina tripleta, koji mogu mjenjati topografiju promotorskih regija i samim time potaknuti vezanje transkripcijskih faktora (Paugh i sur. 2016).

5. Uloge miRNA

5.1. Uloge miRNA u životinjskim organizmima

Regulatorna uloga miRNA utvrđena je prije no što su dobili status malih, nekodirajućih molekula. Proučavanja provedena na obliću *C. elegans*, zebrici, rodu *Xenopus*, vinskoj mušici i drugim modelnim organizmima, kao i na kulturama ljudskih stanica dale su uvid širok spektar uloga. Većina miRNA je detektirana u staničnom mikrookruženju (Sohel 2016), a utvrđeno je da reguliraju signalne putove te osnovne stanične procese poput proliferacije, diferencijacije, te da imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze reguliranjem programirane stanične smrti, neuralnom modeliranju, imunitetu, hematopoetskoj diferencijaciji.

Aberantna ekspresija miRNA može rezultirati patološkim posljedicama (Sohel 2016). Primjerice polimorfizmi jednog nukleotida (SNP, od engl. *single nucleotide polymorphism*) mogu potaknuti različite biološke procese, primjerice karcinogenezu (Xu i sur. 2014). Polimorfizam jednog nukleotida u sekvenci pre-miR-146a rezultira zamjenom G u C, što utječe na ekspresiju zrele miR-146a, a takva aberantna ekspresija povezana je s predispozicijom za oboljenje od malignih tumora dojke i jajnika (Xu i sur. 2014).

Zanimljivo je da različite molekule miRNA mogu regulirati isti ciljni gen tijekom diferencijacije, kao što na primjer molekula miR-1 potiče miogenezu ciljajući HDAC4 histon-deacetilazu 4, koju cilja i molekula miR-140 prilikom regulacije diferencijacije osteoblasta te skeletogeneze (Kloosterman i Plasterk 2006).

Regulacija rasta tijela ostala je fascinantna i neriješena misterija u biologiji (Lui 2017). Jedna od ključnih komponenti rasta tijela je rast skeleta (Lui 2017). Hrskavične ploče rasta su strukture unutar kostiju koje se nalaze između metafize i epifize, a odgovorne su za longitudinalni rast kostiju. Utvrđeno je da su molekule miRNA iz obitelji miR-140 i let-7 važni regulatori ploča rasta čime postreduju rastu čitavog tijela (Lui 2017).

MiRNA na specifičan način reguliraju staničnu i humoralnu imunost regulirajući stanice koje posjeduju specifičnu imunost, tj. T i B limfocite, a osim toga miRNA su sposobne djelovati kao intracelularni imunološki posrednici (Lu i Liston 2009). Primjerice, molekule miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 i miR-382 napadaju genom HIV-a (virus humane imunodeficijencije) tako što utišavaju transkripciju nužnu za retrovirusnu proliferaciju (Huang i sur. 2007). Nadalje, za molekulu miR-181 utvrđena je uloga pozitivnog regulatora diferencijacije B-limfocita, a za molekulu miR-150 je dokazano da utječe na imunski odgovor zrelih B limfocita, osim što regulira njihovu ranu diferencijaciju.

(Lu i Liston 2009). Pored toga što utječu na aktivaciju T stanica, molekule miR-23 imaju središnju ulogu u diferencijaciji T limfocita (Cho i sur. 2016).

Rak želuca drugi je vodeći uzrok smrti povezanih s rakom u svijetu. Uspoređujući ekspresijske profile miRNA u normalnim, te rakom zahvaćenim mukoznim tkivima, uočena je povećana ekspresija molekule miR-93 u tkivima zahvaćenim rakom. Naime, dokazano je da molekula miR-93 potiče staničnu proliferaciju i migraciju. Budući da molekula miR-93 djeluje kao pozitivni regulator raka želuca, ova miRNA može biti obećavajući biomarker i terapijski cilj prilikom liječenja raka želuca (Guan i sur. 2017). Nasuprot tomu, neke molekule miRNA inhibiraju staničnu proliferaciju. Proučavajući ekspresijski profil u stanicama raka dojke, uočeno je kako utišavanje gena *miR-320* potiče staničnu proliferaciju stanica raka *in vitro*, dok povećana ekspresija gena *miR-320* ima suprotan učinak inhibicije stanične proliferacije (Bai i sur. 2017).

Programirana stanična smrt (PCD, od engl. *programmed cell death*) genetički je određen i reguliran proces neophodan za održavanje homeostaze organizma. Pod pojmom PCD podrazumijevamo apoptozu, nekroptozu i autofagiju (Su i sur. 2015). Inducirajući apoptozu, molekula mir-491 doprinosi značajnom smanjenju broja stanica raka debelog crijeva (Su i sur. 2015). Značajan broj autofagnih kaskada reguliran je pomoću miRNA, primjerice molekula miR-30 je među prvim miRNA za koje je dokazano da posreduju autofagiju (Gozuacik i sur. 2017). Nekoliko studija dalo je uvid o miRNA posredovanoj regulaciji programirane nekroze. Naprimjer, molekula miR-874 pojačava nekroptozu vezanjem na Kaspazu-8 (Su i sur. 2015).

Velik broj miRNA koje su specifične za mozak sisavaca posebice su eksprimirane u neokorteksu i malom mozgu (Mehler 2008). Imaju važnu ulogu u neuralnom razvoju, održavanju svojstava zrelih neurona i sinaptičkoj i neuronskoj plastičnosti (Mehler 2008). Osim toga, miRNA su uključene u fiziološke funkcije mozga poput učenja, pamćenja, emocija, te su povezane sa širokim spektrom neuroloških i psihijatrijskih bolesti (Mehler 2008; Wang i sur. 2012). Primjerice, molekula miR-124 intenzivno je uključena u utišavanje ne-neuronskih gena tijekom razvoja mozga, zbog čega je bitan faktor za očuvanje neuralnog identiteta (Wang i sur. 2012). Istraživanja molekula miR-124 su pokazala da je uključena u regulaciju učenja i memorije u odraslom mozgu (Wang i sur. 2012).

Značajan broj miRNA prisutan je u ekstracelularnim tekućinama poput seruma, plazme, sline, urina, cerebrospinalne tekućine i dr (Jansson i Lund 2012). Takve ekstracelularne (EC) cirkulirajuće miRNA otporne su na aktivnost RNaze i ekstremne varijacije pH i temperature, a sam mehanizam kojim EC miRNA održavaju stabilnost u

okruženju bogatom RN-azama nije razjašnjen (Sohel 2016). Jedna od najranijih teorija sugerira da su EC miRNA konjugirane s proteinima koji ih štite od aktivnosti DNaze i RNaze, dok druge teorije podržavaju miRNA pakiranje u lipidne vezikule ili povezivanje s lipoproteinskim kompleksima (Sohel 2016). Cirkulirajuće miRNA predstavljaju važne biomarkere budućnosti. Primjerice, povećana ekspresija gena *miR-21* važna je za dijagnostičku i prognostičku sliku u nekoliko malignih tumora kod ljudi (Xu i sur. 2013). Dakle, kod oboljelih od epitelnog ovarijskog karcinoma, količina molekula miR-21 u serumu značajno je veća nego kod zdravih osoba (Xu i sur. 2013)

5.2. Uloge miRNA u biljnim organizmima

Istraživanja provedena na biljkama poput uročnjaka, riže, sirka, kukuruza i drugih, dale su uvid u funkcije biljnih miRNA. Biljne miRNA su klasificirane u 4 skupine prema konzerviranosti među vrstama: vrlo konzervirane, umjereno konzervirane, malo konzervirane i nekonzervirane (Zhang i sur. 2006). Konzerviranost je indikator miRNA funkcije (Zhang i sur. 2006). Tako konzervirane miRNA imaju važnu ulogu u regulaciji prijenosa signala te regulaciji morfologije lista i cvijeta (Zhang i sur. 2006), dok nekonzervirane miRNA imaju specifične uloge kod specifičnih biljnih vrsta, kao primjerice ulogu u diferencijaciji vlakana pamuka i njihov rast u dužinu (Zhang i sur. 2006).

Listovi su biljni organi koji imaju ulogu u procesu fotosinteze, te čine velik dio biomase biljke. Kako bi listovi imali karakterističnu veličinu i oblik, razvoj listova mora biti strogo kontroliran. Identificirano je da su oko 50% ciljeva miRNA transkripcijski faktori (TF), pri čemu miRNA koje reguliraju razvoj biljaka kontroliraju razinu TF važnih u razvoju biljke (Zhang i sur. 2006). Detaljne analize razvoja listova upućuju na ulogu miR-319 u morfologiji i veličini listova (Schommer i sur. 2010). Pored toga, molekule miR-165, miR-166 i miR159/JAW su esencijalne za kontrolu razvoja listova direktnom regulacijom gena za dva transkripcijska faktora HD-ZIP (od engl. *Homeodomain-leucine zipper* i TCP obitelj transkripcijskih faktora (Zhang i sur. 2006).

Razvoj cvijeta jedna je od najvažnijih faza biljnog razvoja, posebice kod cvjetnica. Kod uročnjaka prekomjerna ekspresija gena *miR-172* uzrokuje razvojne abnormalnosti cvijeta, kao naprimjer odsutnost petala, a sepale se transformiraju u karpele (Wanid i sur. 2010).

Proteini HD-ZIP reguliraju vaskularni razvoj i formiranje meristema. Član obitelji HD-ZIP proteina je protein ATHB15, koji je ciljna molekula miR-166 (Zhang i sur. 2006).

Prekomjerna ekspresija gena *miR-166a* rezultira opadanjem razine ATHB15, što uzrokuje ubrzanu diferencijaciju vaskularnih stanica (Zhang i sur. 2006).

Molekule miRNA u biljkama reguliraju homeostazu hormona i ključne su regulatorne komponente hormonskih signalnih puteva (Woodward i Bartel 2005; Zhang i sur. 2006). Biljni hormoni imaju važnu ulogu u formiranju biljnih organa i čitave biljke, te u odgovorima na stres. Auksin je posebice važan regulator rasta i razvoja biljaka budući da ima ulogu u dijeljenju stanica, njihovom produženom rastu i diferencijaciji (Woodward i Bartel 2005; Zhang i sur. 2006). Auksin djeluje preko obitelji DNA-vezujućih proteina ARF (od engl. *auxin response factors*) (Zhang i sur. 2006). Istraživanja na uročnjaku pokazala su kako biljke čiji su proteini ARF rezistentni na miR-160 imaju razvojne abnormalnosti (Zhang i sur. 2006).

Biljke su razvile složene mehanizme kako bi preživjele različite stresne okolnosti, a miRNA imaju važnu ulogu u tim mehanizmima (Zhang i sur. 2006). Različiti biotički i abiotički stresni čimbenici okoliša induciraju prekomjerno ili smanjenu ekspresiju miRNA, a pored toga i biljke imaju mehanizme kojima potiču sintetiziranje određenih miRNA (Zhang i sur. 2006). Naprimjer, ABA (od engl. *abscisic acid*) i GA (*gibberellin*) su dva fitohormona uključena u odgovor na stres. Istraživanja su pokazala da tretmani ABA i GA reguliraju ekspresiju gena *miR-159*, koji ima ulogu u kontroli razvoja cvijeta (Zhang i sur. 2006).

Osim navedenih uloga, biljne miRNA reguliraju homeostazu nutrijenata u biljkama (Paul i sur. 2015). Najkonzerviranija miRNA obitelj među različitim biljnim vrstama; miR-164, miR-172, miR-398 i miR-399 uključena je u održavanje homeostaze 5 različitih nutrijenata (Paul i sur. 2015). Druge su pak miRNA uključene u stresni odgovor pri suficitu ili deficitu određenog nutrijenta (Paul i sur. 2015). Ksilem i floem posreduju transport vode i nutrijenata u biljkama, a komunikacija posredovana floemom ima važnu ulogu jer omogućuje staničnu komunikaciju tijekom različitih biotičkih i abiotičkih stresnih odgovora (Paul i sur. 2015). U nedostatku sumpora, molekula miR-395 se akumulira u floemu zajedno s miR-399 i miR-2111, iz čega proizlazi da određene miRNA reguliraju stanje nutritivne homeostaze reguliranjem ekspresije transportera koji su uključeni u unos hranjivih tvari i njihovu mobilizaciju (Paul i sur. 2015).

6. Zaključak

Iako su duge tek ~22-25 nukleotida, molekule miRNA imaju važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena, zbog čega su posljednjih 30 godina intenzivno istraživane. Samostalno ili kao dio složenog kompleksa RISC reguliraju ekspresiju velikog broja gena, aktivacijom ili utišavanjem ekspresije na razini transkripcije kao i na post-transkripcijskoj razini.

Otkriće miRNA u biljkama ukazuje na to da su molekule miRNA nastale rano tijekom evolucije eukariota, što ističe važnost njihovog utjecaja na ekspresiju gena. Biljke čine važan dio ekosustava, a služe nam kao lijekovi, hrana i dr. Precizno poznavanje mehanizama miRNA regulacije u biljkama potencijal je za genetičku manipulaciju biljaka u svrhu poboljšanja produktivnosti, nutritivne vrijednosti ili pak poticanja sinteze željenog sekundarnog metabolita.

Nešto intenzivnije istraživane, životinjske miRNA, imaju krucijalnu ulogu u regulaciji gotovo svih bioloških procesa, a za normalno funkcioniranje organizma neophodna je i pravilna regulacija ekspresije miRNA, budući da aberantna ekspresija može rezultirati različitim neurodegenerativnim i psihijatrijskim bolestima, razvojem karcinoma i dr. Savršeno razumjevanje funkcioniranja molekula miRNA neophodno je kako bi se uvidile abnormalnosti u miRNA funkcioniranju u svrhu razvijanja miRNA lijekova i terapeutika. Također, je otkriće cirkulirajućih miRNA od velike važnosti za čovjeka, budući da su zbog svoje stabilnosti važni biomarkeri kojima se može dijagnosticirati nekoliko vrsta malignih tumora.

7. Literatura

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th. ed., New York, Garland Science.
- Altuvia, Y., Landgraf, P., Lithwick, G., Elefant, N., Pfeffer, S., Aravin, A., Brownstein, M.J., Tuschl, T., Margalit, H. (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Research* 33: 2697-706
- Ambros, V. (1989) A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell*, 57: 49-57
- Azuma-Mukai, A., Oguri, H., Mituyama, T., Qian, Z.R., Asai, K., Siomi, H., Siomi, M.C. (2008) Characterisation of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 7964-9
- Bartel, B., Woodward, A.W. (2005) A Receptor for Auxin. *Plant cell*, 17(9): 2425–2429
- Bartel, D. (2004) MicroRNA: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116:281-97
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., Izaurralde, E. (2006) mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & Development*, 20(14): 1885–1898
- Bhaskaran, M., Mohan, M. (2014) MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Veterinary Pathology*, 51: 759–774
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77:71-94
- Cai, Y., Yu, X., Hu, S., Yu, J. (2009) A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 7: 147–154
- Catalanotto, C., Cogoni, C., Zardo, G. (2016) MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10): 1712.
- Chen, X. (2008) *MicroRNA Metabolism in Plants*. U: Compans, R., Malissen, B., Aktories, K., Rappuoli, R., Galan, J., Ahmed, R., Palme, K., Casadevall, A., Garcia-Sastre, A., Iwasaki, A., Akira, S. (ur.) Springer Verlag, Njemačka, str. 510–519

- Chendrimada, T., Gregory, R., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., Shiekhattar, R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436: 740-4
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., Shiekhattar, R. (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, 447: 823-8
- Cho, S., Wu, C.J., Yasuda, T., Cruz, L.O., Khan, A.A., Lin, L.L., Nguyen, D.T., Miller, M., Lee, H.M., Kuo, M.L., Broide, D.H., Rajewsky, K., Rudensky, A.Y., Lu, L.F. (2016) miR-23~27~24 clusters control effector T cell differentiation and function, 213(2):235-49
- Bai J.W., Wang X., Zhang Y.F., Yao G.D., Liu H. (2017) MicroRNA-320 inhibits cell proliferation and invasion in breast cancer cells by targeting SOX4. *Oncology letters*, 14(6): 7145–7152
- Cooper, G.M., Hausman R.E. (2009) *The Cell: a Molecular Approach*, 5th ed., Washington, ASM Press
- Ellwanger, D., Büttner, F., Mewes, H., Stümpflen, V. (2011) The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinformatics* 27: 1346–1350
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Izaurralde, E. (2008) Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell*, 132: 9-14
- Gabriele Neu-Yilik, G., Gehring, N.H., Hentze, M.W., Kulozik, A.E. (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: from vacuum cleaner to Swiss army knife. *Genome Biology*, 5:218
- Gozuacik, D., Akkoc, Y., Ozturk, D.G., Kocak, M. (2017) Autophagy-Regulating microRNAs and Cancer. *Frontiers in Oncology*, 7: 65
- Guan, H., Li, W., Wang, J., Li, Y., Tang, Y., Lu, S. (2017) MicroRNA-93 promotes proliferation and metastasis of gastric cancer via targeting TIMP2. *PLoS One*, 12(12):e0189490
- Ha, M., Kim, V. (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15: 509-24
- Hammond, S., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404:293-6

- Hausser, J., Syed, A., Bilen, B., Zavolan, M. (2013) Analysis of CDS-located miRNA target sites suggests that they can effectively inhibit translation. *Genome Research*, 23: 604-615
- Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., Tollervey, D. (2013) Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell*, 153: 654-665
- Houbaviy, H., Dennis, L., Jaenisch, R. (2005) Sharp Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene. *RNA*, 11: 1245–1257
- Huang, J., Wang, F., Argyris, E., Chen, K., Liang, Z., Tian, H., Huang, W., Squires, K., Verlinghieri, G., Zhang, H. (2007) Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4⁺ T lymphocytes. *Nature medicine*, 13(10):1241-7
- Iorio, M.V., Croce, C.M. (2012) MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. *EMBO Molecular Medicine*, 4: 143-159
- Jangra, R.K., Yi, M., Lemon, S.M. (2010) Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *Journal of virology*, 84(13):6615-25
- Jansson, M.D., Lund, J.A. (2012) MicroRNA and cancer. *Molecular oncology*, 6: 590-610
- Jones-Rhoades, M., Bartel D, Bartel B. (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57:19-53
- Jopling, C.L., Schütz, S., Sarnow, P. (2008) Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell host & microbe*, 4(1):77-85
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M, Lemon, S.M., Sarnow, P. (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 309: 1577-81
- Kloosterman, W.P., Plasterk, R.H. (2006) The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. *Developmental cell*, 11: 441-450
- Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 11: 597-610
- Lai, E. (2000) MicroRNAs are complementary to 3' UTR motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature Genetics*, 30: 363-364

- Lee, R., Feinbaum R., Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-1*. *Cell*, 75:843-54
- Lewis, B., Shih, I., Jones-Rhoades, M., Bartel, D. (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 115: 787-98.
- Li, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Wu, L., Qi, Y., Zhou, J. (2010) Identification of MicroRNAs Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Plant Innate Immunity. *Plant Physiology*, 152: 2222–2231
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., Johnson, J.M. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433: 769-73
- Lu, C., Fedoroff, N. (2000) A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell*, 12:2351-2366
- Lu, L.F., Liston, A. (2009) MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system.
- Lui, J.C. (2017) Regulation of body growth by microRNAs. *Molecular and cellular endocrinology*, 456:2-8
- Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, M.F., Cerrato, C., Setién, F., Casado, S., Suarez-Gauthier, A., Sanchez-Cespedes, M., Git, A., Spiteri, I., Das, P.P., Caldas, C., Miska, E., Esteller, M. (2007) Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Research*, 67:1424-9
- MacFarlane, L.A., Murphy, P.R., (2010) MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11: 537-561
- Maher, C., Stein, L., Ware, D. (2006) Evolution of *Arabidopsis* microRNA families through duplication events. *Genome Research*, 16: 510-519
- Mehler, M.W. (2008) Epigenetic Principles and Mechanisms Underlying Nervous System Functions in Health and Disease. *Progress in Neurobiology*, 86(4): 305–341.
- Menez, J., Heurgué-Hamard, V., Buckingham, R.H. (2000) Sequestration of specific tRNA species cognate to the last sense codon of an overproduced gratuitous protein. *Nucleic Acids Research*, 28: 4725–4732

- Monteys, A., Spengler, R., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K., Xing, Y., Davidson, B. (2010) Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA*, 16: 495-505
- Moretti, F., Thermann, R., Hentze, M.W. (2010) Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. *RNA*, 16: 2493-2502
- Nakielnny, S., Dreyfuss, G. (1999) Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell*, 99: 677-90
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., Lai, E.C. (2007) The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130(1): 89-100
- Orang, A.V., Safaralizadeh, R., Kazemzadeh-Bavili, M. (2014) Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *International Journal of Genomics*, 2014: 970607
- Paugh, S.W., Coss, D.R., Bao, J., Laudermilk, L.T., Grade, C.R., Ferreira, A.M., Waddell, M.B., Ridout, G., Naeve, D., Leuze, M., LoCascio, P.F., Panetta, J.C., Wilkinson, M.R., Pui, C.H., Naeve, C.W., Uberbacher, E.C., Bonten, E.J., Evans, W.E. (2016) MicroRNAs Form Triplexes with Double Stranded DNA at Sequence-Specific Binding Sites; a Eukaryotic Mechanism via which microRNAs Could Directly Alter Gene Expression. *PLoS Computational Biology*, 12(2):e1004744
- Paul, S., Datta, S.K., Datta, K. (2015) miRNA regulation of nutrient homeostasis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6: 232
- Pillai, R.S., Artus, C.G., Filipowicz, W. (2004) Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA*, 10: 1518–1525
- Quick-Cleveland, J., Jacob, J., Weitz, S., Shoffner, G., Senturia, R., Guo, F. (2014) The DGCR8 RNA-binding heme domain recognizes primary microRNAs by clamping the hairpin. *Cell Reports*, 7: 1994-2005
- Reinhart, B., Weinstein, E., Rhoades, M., Bartel, B., Bartel, D. (2002) MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, 16: 1616–1626
- Reinhart, B.J., Slack, F., Basson, M., Pasquinelli, A., Bettinger, J., Rougvie, A., Horvitz H., Ruvkun, G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403: 901-6.

- Richard, W., Carthew, R.W, Erik, J., Sontheimer E.J. (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136: 642-655
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J., Bradley, A. (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, 14:1902-10
- Rogers, K. i Chen, X. (2013) Biogeneses, Turnover and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *Plant Cell*, 25: 2383-2399
- Rogers, K., Chen, X. (2013) Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *Plant Cell*, 25: 2383–2399
- Sacco, L., Masotti, A. (2012) Recent Insights and Novel Bioinformatics Tools to Understand the Role of MicroRNAs Binding to 5' Untranslated Region. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 480–95
- Saini, H., Griffiths-Jones, S., Enright, A. (2007) Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:17719-24
- Schommer, C., Bresso, E.G. Silvana V. Spinelli, S.V., Palatnik, J.F. (2012) Role of MicroRNA miR319 in Plant Development. U: Ramanjulu Sunkar (ur). *MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses*. Springer, Berlin, str. 29-49
- Shimakami, T., Yamane, D., Jangra, R.K., Kempf, B.J., Spaniel, C., Barton, D.J., Stanley, M., Lemon, S.M. (2012) Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *National Academy of Sciences*, 109: 941–946
- Sohel, M.H. (2016) *Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges*
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305(5689):1434-7
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., Yu, Q. (2015) MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget*, 6(11): 8474–8490
- Sunkar, R., Li, Y., Jagadeeswaran G. (2012) Functions of microRNA in plant stress responses. *Trends Plant Science*, 12: 196-203
- Vaucheret, H. (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Science*, 13: 350-8
- Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., Kim, Y. (2010) MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. U: F. Bou-Abdallah (ur.) *Biochimica*

et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Elsevier, Netherlands str. 1231-1243

- Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., Yokoyama, S. (2007) Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes & Development*, 21:1857-62
- Wang, W., Kwon, E.J., Tsai, L.H. (2012) MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. *Learning and memory*, 19: 359-368
- Wienholds, E., Plasterk, R.H. (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Letters*, 579(26):5911-22
- Wu, L., Fan, J. Belasco, J.G.(2006) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *National Academy of Sciences*, 103: 4034-9
- Xu, Y.Z., Xi, Q.H., Zhang, X.Q. (2013) Identification of serum microRNA-21 as a biomarker for early detection and prognosis in human epithelial ovarian cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(2):1057-60
- Xu, Z., Zhang, L., Cao, H., Bai, B. (2014) MiR-146a rs2910164 G/C polymorphism and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis. *BioMed Central*, 15: 117
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P., Anderson, T.A. (2006) Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *Developmental Biology*, 289:31-6
- Zhang, C. (2013) Novel functions for small RNA molecules. *Current opinion in molecular therapeutics*, 11(6): 641–651