



ARTÍCULO DE REVISIÓN

MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica

Ángel Lugo-Trampe,¹ Karina del Carmen Trujillo-Murillo.^{2*}

¹Departamento de Genética. Facultad de Medicina y Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México.

²Servicio de Endocrinología. Facultad de Medicina y Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, UANL, México.

Recibido: marzo, 2009. Aceptado: abril, 2009.

PALABRAS CLAVE

MicroARNs; Expresión génica; México; ARN citoplasmático pequeño; silenciador del gen.

Resumen

El descubrimiento de nuevos sistemas de regulación génica bajo el control de RNA pequeños ha tenido un impacto significativo en la biología molecular. Los MicroRNA (miRNA) son una clase de RNA pequeños no codificantes (aquellos que no codifican para proteínas) que regulan la expresión génica pos-transcripcional. Se unen por apareamiento imperfecto a sus RNA mensajeros blanco (RNAm), generalmente en la región 3'-no traducible, bloqueando la síntesis de proteínas por desestabilización del RNAm y represión traduccional.

Un gran número de miRNA han sido identificados en el genoma de varias especies incluyendo el humano, y el número de miRNA sigue incrementándose debido a los esfuerzos combinados de la biología molecular y a la predicción bioinformática. Se ha descrito que estas moléculas regulan funciones celulares, por lo que no es sorprendente que los miRNA estén implicados en una gran variedad de enfermedades, como el cáncer y la diabetes mellitus.

El propósito de esta revisión es brindar información actualizada sobre la síntesis de los miRNA y los avances en el entendimiento de los mecanismos de silenciamiento génico mediados por los miRNA, así como su uso potencial para el diagnóstico de enfermedades y su terapia.

KEY WORDS

Gene expression; Gene silencing; Mexico; MicroRNAs; RNA, Small Cytoplasmic.

MicroRNAs: Key regulators of genic expression

Abstract

The discovery of novel gene regulatory systems under the control of small RNAs has had a significant impact on molecular biology. MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs (those that do not encode protein) that regulate gene expression post-transcriptionally. They bind with imperfect complementary to their target messenger RNAs (mRNAs), generally within the 3'-untranslated region, and repress protein

*Correspondencia: Dra. Karina del Carmen Trujillo Murillo. Servicio de Endocrinología. Facultad de Medicina y Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, UANL. Avenida Francisco I. Madero y Avenida Gonzalitos s/n. Colonia Mitras Centro. C P 64460, Monterrey, Nuevo León, México. Teléfono: (+52 81) 8123 1241. Correo electrónico: kary_trujillo@hotmail.com

production by destabilizing the mRNA and translational silencing. Large numbers of miRNAs have been identified in the genomes of various species including human; yet the number of the miRNA is still rising due to the combined efforts of molecular biology and bioinformatic prediction. It has been reported that these molecules regulate cellular functions, therefore not surprising that microRNAs are implicated in a wide variety of diseases (i.e. cancer and diabetes mellitus). The purpose of this review is to provide current information on miRNA synthesis and the progress in the understanding of the mechanisms of miRNA-mediated gene silencing, as well as the potential use of miRNAs for diagnosis and therapy of diseases.

Introducción

Los organismos eucariotas disponen de un repertorio variado de transcritos pequeños no codificantes (RNA que no codifican para proteínas) de aproximadamente 21-25 nucleótidos (nt);¹ cuyo papel como reguladores de la expresión génica es determinante en procesos de diferenciación celular y desarrollo, proliferación, adquisición y mantenimiento de un fenotipo dado, entre muchos otros.^{2, 3} Estos RNA pequeños asociados a complejos multienzimáticos son guiados para el reconocimiento de secuencias complementarias en RNA mensajeros blanco (RNAm). La interacción funcional entre ambos deriva en la degradación del RNAm y en la represión traduccional y, en algunos casos, pueden causar modificaciones epigenéticas.^{4, 5} En función de su origen y tamaño, los RNA pequeños se clasifican en varios grupos. Recientemente, un grupo de estos RNA, llamados microRNA (miRNA), ha cobrado gran importancia en el estudio de la regulación génica.^{2, 6} El primer miRNA descrito fue lin-4 que regula los diferentes estadios del desarrollo de la larva *C. elegans*.^{7, 8} Desde entonces un gran número de miRNA han sido identificados en el genoma de varias especies incluyendo al humano, y el número de miRNAs sigue incrementándose debido a los esfuerzos combinados de la biología molecular y la predicción bioinformática.^{6, 9, 10} Estos miRNA regulan la expresión génica pos-transcripcional al unirse por apareamiento imperfecto a sus RNAm blanco, generalmente en la región 3'-no traducible, bloqueando la síntesis de proteínas por desestabilización del RNAm y represión traduccional.¹¹ Se sabe, además, que juegan un papel importante en la regulación de una variedad de funciones celulares, así como en varias enfermedades incluyendo cáncer y diabetes mellitus.¹² En esta revisión se describe información actualizada sobre la síntesis de los miRNA y los avances en el entendimiento de los mecanismos de silenciamiento génico mediados por los miRNA, así como su uso potencial para el diagnóstico de enfermedades y su terapia.

Distribución genómica y síntesis de los miRNA

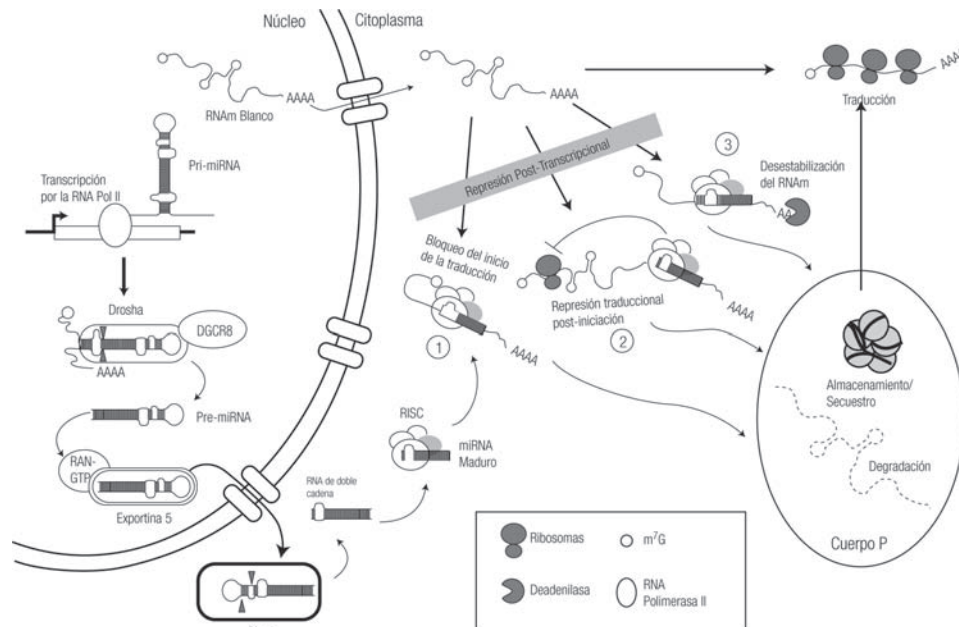
Aunque la mayoría de los genes para miRNA están distribuidos a lo largo del genoma, otros (50%) se encuentran

adyacentes formando grupos y son expresados de manera coordinada. Esta regulación se consigue mediante la síntesis de un transcrito policistrónico, que posteriormente es fragmentado para generar múltiples miRNA,^{1, 13} lo que sugiere en algunos casos una organización de tipo operón. Los genes para miRNA están localizados en exones e intrones de RNA no codificante, así como en intrones de RNA codificante; este último tipo de miRNA tiene la misma orientación que el gen en el que se aloja, por ejemplo, miR-208, que se encuentra en el intrón 28 de la cadena pesada de la proteína alfa-miosina cardíaca.^{14, 15}

La vía canónica de biosíntesis de los miRNA incluye varias etapas. Inicialmente, los miRNA son transcritos por la RNA polimerasa II para generar moléculas precursoras o pri-miRNA con un casquete (7-metil-guanosina) en el extremo 5' y una cola de poli (A) en el extremo 3' (figura 1).^{16, 17} Estos transcritos primarios se autocomplementan formando estructuras en forma de tallo y bucle de ~80 nt de longitud.⁵ Posteriormente, estos pri-miRNA son procesados en el núcleo por el complejo proteico denominado "microprocesador" para generar un precursor más pequeño conocido como pre-miRNA, de ~65 nt de longitud.^{6, 18} Este complejo consiste de la enzima RNasa III Drosha y de la proteína de unión a RNA de doble cadena, denominada DGCR8 en humanos y Pasha en *Drosophila* y en *C. elegans*.^{3, 19, 20}

La proteína DGCR8 juega un papel importante en el reconocimiento de los sitios de corte de Drosha en el tallo de la estructura del pri-miRNA, dando origen al pre-miRNA (figura 1).^{3, 21} En el caso de los pri-miRNA intrónicos, éstos son procesados por el spliceosoma y componentes exosomales, para dar origen al pre-miRNA correspondiente.²² Después de la etapa de procesamiento en el núcleo, los pre-miRNA son reconocidos por el factor nuclear de exportación Exportina-5 (Exp5) el que junto con la proteína de unión a GTP Ran forman un complejo de transporte nuclear que conduce a los pre-miRNA a través de los poros del núcleo al citoplasma;^{23, 24} ahí serán reconocidos y procesados por la enzima RNasa III Dicer (figura 1). Esta enzima corta el tallo y bucle del pre-miRNA para generar un RNA dúplex formado por una cadena de miRNA maduro y una cadena de miRNA complementaria (miRNA/miRNA*) de ~22 nt de longitud. Después de la digestión, Dicer permanece asociada al miRNA dúplex, que posteriormente es liberado por acción de la RNA helicasa A en células

Figura 1. Biogénesis de los miRNA y mecanismos de regulación de expresión génica.



Los miRNA se generan a partir de un precursor (pre-miRNA), que a su vez se genera a partir de un transcrito primario (pri-miRNA). Los mecanismos utilizados por los miRNA para silenciar la expresión génica incluyen: a) inhibición al inicio de la traducción; b) represión traduccional pos-inicio, y c) desestabilización del RNAm blanco a través de un proceso de deadenilación.^{3,6}

humanas.²⁵ En seguida, el miRNA maduro es incorporado al complejo silenciador inducido por RNA (RISC).^{3,6}

En este proceso el RNA dúplex es separado, una cadena (miRNA*, sentido) es degradada, mientras que la otra cadena (miRNA, antisentido o guía) es satisfactoriamente incorporada al RISC; esta última funciona como "guía" para identificar a los RNAm blanco, con el fin de que RISC actúe sobre ellos, bloqueando la síntesis de proteínas por desestabilización del RNAm y represión traduccional.⁶ El complejo RISC está constituido por varias proteínas, entre ellas Dicer, TRBP (transactivation-response element RNA-binding protein) y, principalmente, por las proteínas Argonauta (Ago).²⁶ Las proteínas Ago están localizadas en regiones específicas del citoplasma denominados *cuerpos-P* (cuerpos de procesamiento de RNAm o cuerpos GW porque contienen a la proteína GW182), los cuales son regiones con altas tasas de degradación del RNAm vía deadenilación;²⁷ aunque también se ha identificado que en los *cuerpos-P* el RNAm puede ser almacenado y posteriormente liberado para su traducción (figura 1).²⁸

Mecanismos de regulación de expresión génica

Una característica general de los miRNA es su apareamiento imperfecto con el RNA blanco, es decir entre la cadena del miRNA y su RNAm blanco. Los miRNA generalmente se unen a la región 3' UTR (región no traducible) de sus RNAm blanco.³ Después del reconocimiento de esta región en el RNAm blanco, ¿cómo es que los miRNA reprimen la expresión génica? Actualmente, los mecanismos

de represión pos-transcripcional siguen siendo ampliamente estudiados, sin embargo, entre los mecanismos que se han propuesto se encuentran: a) bloqueo del inicio de la traducción; b) represión pos-inicio de la traducción, y c) desestabilización del RNAm blanco a través de un proceso de deadenilación (figura 1);^{11,29} aunque aparentemente diferentes, estos mecanismos no son mutuamente excluyentes.

En los tres mecanismos propuestos, los RNAm blanco son secuestrados en los *cuerpos-P* para almacenamiento o degradación; sin embargo, bajo condiciones de estrés estos RNAm almacenados pueden ser liberados y traducidos.³⁰ La maquinaria celular responsable de la degradación de los RNAm está principalmente concentrada en los *cuerpos-P*; sin embargo, no está claro si este proceso está restringido a los *cuerpos-P*, o también puede ocurrir fuera de estos cuerpos de procesamiento del RNAm.³ Debido a que solamente algunos miRNA han sido estudiados, se desconoce si otros factores celulares y condiciones modulan las funciones de los miRNA.

Perfiles de expresión de los miRNA

Con el avance en las técnicas de biología molecular actualmente es posible determinar simultáneamente los niveles de expresión de la totalidad de los miRNA descritos. Entre las técnicas disponibles se encuentra la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa en tiempo real, que permite la cuantificación desde un solo miRNA hasta 384 (lo cual se conoce como arreglo de PCR).^{31,32} También, pueden determinarse los perfiles

Cuadro 1. Métodos y fuentes para la predicción de genes blanco de miRNA

Algoritmo	Abordaje	Dirección electrónica	Referencia
miRanda*	Complementariedad	http://www.microrna.org/microrna/home.do	41
miRBase	Complementariedad	http://microrna.sanger.ac.uk/	42
TargetScan	Complementariedad	http://www.targetscan.org	45
TargetScanS	Complementariedad	http://www.targetscan.org	46
DIANA microT	Termodinámico	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/	43
PicTar	Termodinámico	http://pictar.mdc-berlin.de/	44
RNAHybrid	Termodinámico/ modelaje estadístico	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/	47
StarMir	Modelo de estructura en dos pasos	http://sfold.wadsworth.org/starmir.pl	49
RNA22	Reconocimiento de patrón	http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html	48

*miRanda es un software para identificación de dianas genómicas de miRNA

de expresión empleando técnicas de alto rendimiento como los microarreglos de expresión, de los cuales la empresa *Affymetrix*[™] ofrece la capacidad de analizar en un solo chip miRNAs de hasta 71 especies de interés en investigación y desarrollo de drogas farmacéuticas (6,703 miRNAs en total). Por otra parte, la plataforma de *Illumina*[™] se enfoca hasta ahora exclusivamente en los miRNA humanos y de ratón, permitiendo el análisis de expresión de 1146 y 656 miRNA, respectivamente. Esta última compañía también ofrece un nuevo formato de análisis de nivel intermedio (*Veracode*[™]), capaz de determinar simultáneamente los niveles de expresión de hasta 96 miRNAs. Los métodos descritos anteriormente solamente permiten estudiar a los miRNA conocidos; sin embargo, el análisis de expresión génica serial de miRNA (miRAGE) es un método que permite la identificación de nuevos miRNA.³³

Anteriormente, los niveles de sensibilidad eran una desventaja al analizar miRNA, no obstante, con las actuales estrategias de amplificación de transcritos esta limitante ha sido superada, requiriéndose ahora solamente nanogramos de RNA total.^{31, 32, 34, 35} Es importante destacar que también existen otras estrategias en las que no se amplifica el material genético, sino que únicamente se intensifica la señal obtenida durante el análisis de los perfiles de expresión de miRNA. Para ello se utiliza un método llamado RAKE (abreviado del inglés, RNA primed-array based Klenow enzyme assay).³⁶ Finalmente, el desarrollo de métodos de análisis de miRNA que amalgaman la biotecnología con la nanotecnología ofrecen la capacidad de detectar y cuantificar en el rango de femtomolar. Estos esfuerzos en modelos experimentales han mostrado excelentes resultados y alta sensibilidad, por lo que se espera en un futuro próximo que estas metodologías sean

de uso cotidiano en procedimientos de investigación y diagnóstico.^{37, 38}

Predicción de genes blanco de miRNA

Recientemente, varios métodos computacionales se han desarrollado para la predicción de genes blanco de los miRNA. En el caso de los RNAm blanco de los miRNA animales el hecho de que sean muy cortos y de que los dúplex miRNA-RNAm no son plenamente complementarios, convierten en todo un reto la elucidación de los patrones de hibridación.³⁹ Abordajes bioinformáticos y experimentales han revelado que no solamente el patrón de unión juega un papel importante en el reconocimiento del blanco, sino también en la relación con el miRNA.⁴⁰ En la actualidad existen disponibles numerosas fuentes de herramientas bioinformáticas para la predicción de genes blanco de miRNA que se detallan en el **cuadro 1**. La mayoría de los algoritmos consideran la complementariedad de secuencia miRNA-RNAm^{41, 42} y la termodinámica del híbrido miRNA-RNAm,^{43, 44} otros la conservación de secuencias blanco entre las especies,^{45, 46} y algunos más toman en cuenta la estructura secundaria del RNAm y los cambios después de la formación del híbrido miRNA-RNAm.⁴⁷⁻⁴⁹ Resultados derivados del empleo de estos algoritmos bioinformáticos de análisis han sido validados en ensayos experimentales, retroalimentando, reforzando y validando los algoritmos de predicción *in silico* de genes blanco.⁵⁰

Aplicaciones de los miRNA en diagnóstico, pronóstico y terapia

El descubrimiento de los mecanismos de regulación de la expresión génica ha permitido la generación de nuevas

alternativas para el estudio, diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades. Desde la primera descripción de miRNA en mamíferos, se han efectuado diversos estudios con enfoque terapéutico; sin embargo, solamente son aplicables en aquellos padecimientos en los que el mecanismo patogénico de la enfermedad implica alteraciones en la expresión génica.

El miR-375, el cual es expresado en altos niveles en los islotes pancreáticos, es requerido para la homeostasis normal de la glucosa. Los modelos animales carentes de este miRNA muestran un fenotipo hiperglicémico; mientras que en los modelos animales obesos carentes del mismo miRNA disminuye dramáticamente la capacidad endocrina del páncreas, dando como resultado un estado diabético severo.⁵¹ También, se ha reportado que la sobreexpresión de miR-30d incrementa la expresión de insulina, mientras que su inhibición bloquea la transcripción del gen de insulina estimulada por glucosa.⁵² Estos hallazgos aportan bases para continuar el estudio del papel de los miRNAs en el desarrollo patogénico de la diabetes mellitus, así como en el desarrollo de esquemas terapéuticos basados en miRNA.

Por otra parte, estudios de análisis de perfiles de expresión en leucemias agudas han revelado similitudes en el agrupamiento basado en riesgo o en respuesta al tratamiento, o de acuerdo con su linaje, al comparar los perfiles de expresión basados en genes codificantes y en miRNAs.⁵³ Resultados similares se han reportado para cáncer de cabeza y cuello, tumores cerebrales, cáncer de colon y cáncer de pulmón, por mencionar sólo algunos.⁵⁴⁻⁵⁷ La importancia de este hallazgo radica en el potencial diagnóstico que tiene determinar la "firma genética" basada en miRNA, ya que analizando un menor número de transcritos no codificantes (miRNA) se obtiene el mismo agrupamiento que analizando una gran cantidad de transcritos codificantes (microarreglos de expresión). Con estos ejemplos se demuestra el potencial diagnóstico y pronóstico que se obtiene al analizar el perfil de expresión de miRNA.

Una propuesta terapéutica reciente es el empleo del miR-203 en procedimientos de terapia génica para el tratamiento de enfermedades oncogénicas en las que la expresión del gen ABL juega un papel fundamental en el mantenimiento y progresión de la enfermedad (linfomas ABL+, y leucemias BCR-ABL+). Esta propuesta surge después de un extenso estudio en el que finalmente validan al gen ABL como diana de la represión ejercida por miR-203.⁵⁰

El bloqueo en la síntesis de algunos miRNA ha demostrado ser un potencial blanco farmacológico; tal es el caso de la molécula diazobenzona 2 que bloquea la síntesis del miR-21, el cual está implicado en varios tipos de cáncer como los de cerebro, pulmón, colon, mama y ovario.⁵⁸ Se espera que en un futuro los tratamientos terapéuticos con miRNA sintéticos o bloqueadores de la síntesis de miRNA provean terapias más selectivas que las drogas quimioterapéuticas convencionales, y con menores efectos adversos. Sin embargo, una regulación errónea puede desencadenar la sobre- o sub-expresión

de genes que promuevan el desarrollo de algún tipo de cáncer u otra enfermedad, por lo que el estudio del papel de los miRNA en la regulación de la expresión génica y la identificación de todos sus genes blanco permitirá el diseño de drogas que bloqueen específicamente la vía patogénica de padecimientos en los que la desregulación de la expresión génica juegue un papel central.

El reciente descubrimiento de miRNA en suero y plasma en una forma estable y protegidos de la actividad de RNAsas endógenas, abre la posibilidad de emplearlos como biomarcadores en varios tipos de cáncer y otras enfermedades.¹² Resultados *in vitro* revelan el potencial terapéutico de algunos miRNA que actúan bloqueando la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1).⁵⁹ Resultados similares han sido obtenidos contra el virus de la hepatitis C (VHC) al sobre-expresar *in vitro* a miR-199a, mostrando inhibición de la replicación viral. Lo que sugiere que miR-199a regula negativamente la replicación del VHC, por lo que podría emplearse como una nueva terapia antiviral.⁶⁰

Conclusión

Desde su descubrimiento los miRNA han revolucionado y cambiado la concepción tradicional de los mecanismos de regulación de la expresión génica. El estudio de los mecanismos de regulación mediados por miRNA e identificación de sus genes blanco en enfermedades como cáncer, diabetes mellitus e infecciones virales, por mencionar sólo algunas, han arrojado resultados alentadores que aportan las bases para la aplicación de los miRNA en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades, así como en el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas más selectivas y con menores o nulos efectos adversos. En resumen, el estudio de los miRNA representa un área de oportunidad importante en la investigación biomédica.

Referencias

- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005;435:839-43.
- Robinson VL. Rethinking the central dogma: Noncoding RNAs are biologically relevant. *Urol Oncol* 2009;27:304-6.
- Chu CY, Rana TM. Small RNAs: Regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol* 2007;213:412-9.
- Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, et al. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 2005;15:331-41.
- Vázquez-Ortiz G, Pina-Sánchez P, Salcedo M. Great potential of small RNAs: RNA interference and microRNA. *Rev Invest Clin* 2006;58:335-49.
- Ma C, Liu Y, He L. MicroRNAs - powerful repression comes from small RNAs. *Sci China C Life Sci* 2009;52:323-30.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-54.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Post transcriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993;75:855-62.
- Watanabe Y, Kishi A, Yachie N, et al. Computational analysis of microRNA-mediated antiviral defense in humans. *FEBS Lett* 2007;581:4603-10.

10. Rajewsky N. MicroRNA target predictions in animals. *Nat Genet* 2006;38 Suppl:S8-13.
11. Cannell IG, Kong YW, Bushell M. How do microRNAs regulate gene expression? *Biochem Soc Trans* 2008;36:1224-31.
12. Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: A new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9(6):703-11.
13. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
14. Rodríguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004;14:1902-10.
15. Ying SY, Lin SL. Current perspectives in intronic micro RNAs (miRNAs). *J Biomed Sci* 2006;13:5-15.
16. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 2004;23:4051-60.
17. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004;10:1957-66.
18. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415-9.
19. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004;432:231-5.
20. Han J, Lee Y, Yeom KH, et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004;18:3016-27.
21. Han J, Lee Y, Yeom KH, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006;125:887-901.
22. Tang G. siRNA and miRNA: An insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* 2005;30:106-14.
23. Yi R, Qin Y, Macara IG, et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003;17:3011-6.
24. Lund E, Guttlinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004;303:95-8.
25. Robb GB, Rana TM. RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell* 2007;26:523-37.
26. Joshua-Tor L. The Argonautes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006;71:67-72.
27. Sen GL, Blau HM. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 2005;7:633-6.
28. Lian S, Jakymiw A, Eystathioy T, et al. GW bodies, microRNAs and the cell cycle. *Cell Cycle* 2006;5:242-5.
29. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4034-9.
30. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, et al. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 2006;125:1111-24.
31. Schmittgen TD, Jiang J, Liu Q, et al. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e43.
32. Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J. High-throughput real-time PCR. *Methods Mol Biol* 2008;429:89-98.
33. Cummins JM, He Y, Leary RJ, et al. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:3687-92.
34. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e179.
35. Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques* 2005;39:519-25.
36. Nelson PT, Baldwin DA, Searce LM, et al. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods* 2004;1:155-61.
37. Fan Y, Chen X, Trigg AD, et al. Detection of MicroRNAs using target-guided formation of conducting polymer nanowires in nanogaps. *J Am Chem Soc* 2007;129:5437-43.
38. Fang S, Lee HJ, Wark AW, et al. Attomole microarray detection of microRNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions. *J Am Chem Soc* 2006;128:14044-6.
39. Watanabe Y, Tomita M, Kanai A. Computational methods for microRNA target prediction. *Methods Enzymol* 2007;427:65-86.
40. Yoon S, Garg A, Park HS, et al. Exploiting binary abstractions in deciphering gene interactions. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2006;1:5858-63.
41. Enright AJ, John B, Gaul U, et al. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* 2003;5:R1.
42. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D140-4.
43. Kiriakidou M, Nelson PT, Kouranov A, et al. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* 2004;18:1165-78.
44. Krek A, Grun D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005;37:495-500.
45. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, et al. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003;115:787-98.
46. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15-20.
47. Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, et al. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *Rna* 2004;10:1507-17.
48. Miranda KC, Huynh T, Tay Y, et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006;126:1203-17.
49. Long D, Lee R, Williams P, et al. Potent effect of target structure on microRNA function. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:287-94.
50. Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 2008;13:496-506.
51. Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, et al. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:5813-8.
52. Tang X, Muniappan L, Tang G, et al. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic β cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. *Rna* 2009;15:287-93.
53. Ju X, Li D, Shi Q, et al. Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2009;26:1-10.
54. Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, et al. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:2850-5.
55. Pang JC, Kwok WK, Chen Z, et al. Oncogenic role of microRNAs in brain tumors. *Acta Neuropathol* 2009.
56. Liang Y. An expression meta-analysis of predicted microRNA targets identifies a diagnostic signature for lung cancer. *BMC Med Genomics* 2008;1:61.
57. Faber C, Kirchner T, Hlubek F. The impact of microRNAs on colorectal cancer. *Virchows Arch* 2009;454:359-67.
58. Gumireddy K, Young DD, Xiong X, et al. Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008;47:7482-4.
59. Chable-Bessia C, Meziane O, Latreille D, et al. Suppression of HIV-1 replication by microRNA effectors. *Retrovirology* 2009;6:26.
60. Murakami Y, Aly HH, Tajima A, et al. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J Hepatol* 2009;50:453-60.