

"¡SILENCIO MENSAJEROS! QUÉ SON Y CÓMO ACTÚAN LOS MICRORNAs"*

Fabián Flores¹, Miguel Ángel Martínez², Catalina Arenas^{2,3}, Alejandra Covarrubias³ y José Luis Reyes³

RESUMEN

Los microRNAs son moléculas pequeñas de RNA con la capacidad de reconocer, por complementariedad de bases, ciertas regiones de un RNA mensajero blanco. Esta unión resulta en la inhibición de la expresión de dicho mensajero, es decir, su silenciamiento. En esta revisión se describirán los avances recientes en la identificación, biogénesis, distribución genómica así como los mecanismos de acción de los microRNAs en plantas y animales. Al mismo tiempo se mencionarán aquellos otros RNAs pequeños que existen tanto en plantas como en animales y a los cuales también se les ha propuesto una porción regulatoria. Finalmente, se resaltarán algunas de las preguntas aun no contestadas sobre los microRNAs, las cuales constituyen retos importantes para las siguientes generaciones de investigadores.

PALABRAS CLAVE: microRNAs, siRNAs, RISC, Dicer, Argonauta

ABSTRACT

MicroRNAs are short RNA molecules that base-pair to complementary regions in target messenger RNAs. Binding of microRNAs results in the inhibition of target mRNA expression, termed RNA silencing. Here, we will review recent progress in the identification, biogenesis genomic arrangement and mechanisms of action of plant and animal microRNAs. In addition, we will present other small RNAs found in both plants and animals that have also been proposed as regulators of gene expression as well. Finally, we highlight what we consider to be current questions in the field, as important challenges for future researchers.

KEY WORDS: microRNAs, siRNAs, RISC, Dicer, Argonaute

INTRODUCCIÓN

En el año 1993, un grupo de investigadores de la Universidad de Harvard se encontraba estudiando la regulación del desarrollo larvario en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. El gen en el que centraban su atención era *lin-4*, el cual es esencial para el desarrollo post-embriónico del nemátodo. Lo único que sabían en ese tiempo era que en la etapa larvaria 1, *lin-4* regula negativamente los niveles de una proteína llamada LIN-14. Mostrando una gran pericia y perseverancia, el grupo dirigido por Victor Ambros encontró

que *lin-4* no es un gen que codifica para una proteína, sino que da origen a dos RNAs: uno de 22 nucleótidos (nt) y otro de aproximadamente 60 nucleótidos el que potencialmente podría formar una estructura de tallo-asa y ser el precursor del RNA más corto (1). Tiempo después, se descubrió que la manera en la que el RNA *lin-4* de 22 nt regula la producción de la proteína LIN-14 es uniéndose al RNA mensajero de *lin-14* por complementariedad de bases, evitando así su traducción. Estas fueron las primeras observaciones descritas en

las que un RNA pequeño se unía directamente a un RNA mensajero (mRNA) para inhibir su expresión. Sin embargo, la importancia de estos descubrimientos se mantuvo latente hasta el año 2001, cuando se encontraron decenas de RNAs de tamaños cercanos a 21 nt en el mismo nemátodo (*C. elegans*), en plantas (*A. thaliana*) en moscas (*D. melanogaster*) y en vertebrados (*Homo sapiens*). A estos RNAs recién descubiertos se les bautizó como microRNAs (miRNAs) (2-4).

Actualmente se sabe que los miRNAs participan en un sinnúmero

*Recibido: 4 de octubre de 2007 Aceptado: 13 de noviembre de 2007

¹ Posgrado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Fisiología Celular, UNAM Ciudad Universitaria, México, DF; ²Posgrado en Ciencias Bioquímicas, y ³Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mor. México. Correspondencia: Dr. José Luis Reyes, Departamento de Biología Molecular de Plantas. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa. Cuernavaca, Mor. C. P. 62210. Teléfono: (777) 329-1668 Fax: (777) 313-6600 Correo E: jlreyes@ibt.unam.mx

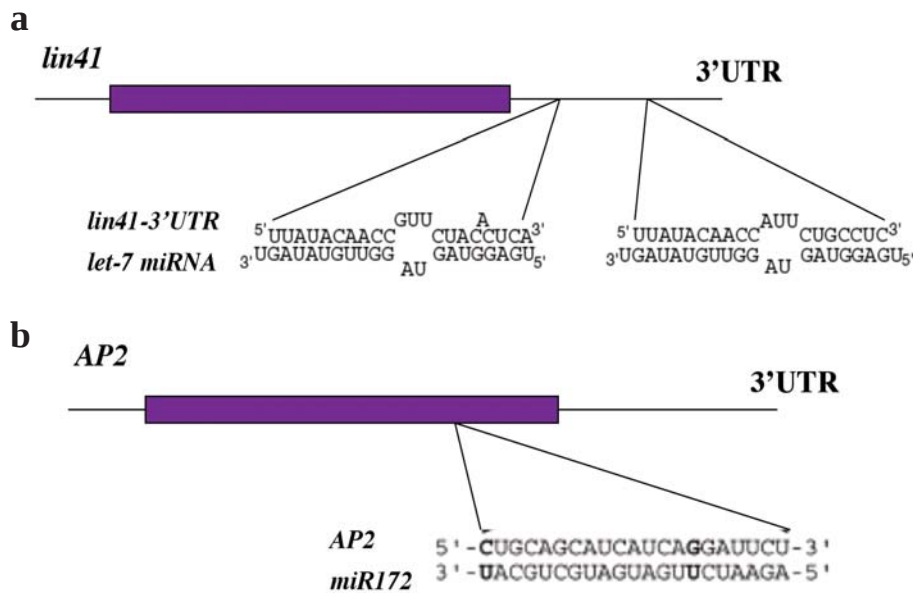


Figura 1. Interacción de microRNAs con sus mensajeros blanco.

- a) Apareamiento de *let-7* con el mensajero de *lin41*. El apareamiento imperfecto ocurre en la región 3' no traducida (3'UTR), en dos sitios diferentes.
- b) Apareamiento de *miR172* con el RNAm de *APETALA2* (*AP2*). El apareamiento casi perfecto ocurre en la región codificante de *AP2*.

En ambos casos se muestran los mensajeros con una caja morada para indicar la región codificante del RNAm.

de procesos, regulando la expresión de una gran cantidad de RNA mensajeros involucrados en diferentes procesos tales como la diferenciación, la proliferación y la muerte celular, entre otras. A la fecha se han encontrado numerosos miRNAs, de los cuales varios se encuentran conservados en muy diversas especies, lo que sugiere que la regulación por miRNAs es un mecanismo que adoptaron los organismos multicelulares tempranamente en su evolución. El enorme número de miRNAs que se han descubierto fue motivo para que la comunidad que los estudia, desarrollara una base de datos especializada en la que se anotan y organizan, y en algunos casos se incluye información sobre los posibles mRNA que estos regulan (5). A pesar de que la lista de miRNAs encontrados experimentalmente sigue creciendo, aún no se han identificado todos: en humanos se calcula que aproximadamente el 1% de los genes corresponden a miRNAs y éstos a su vez

podrían regular hasta un 30% de los genes (5). De estos y otro tipo de estudios se sabe que en animales, los miRNAs se unen por complementariedad imperfecta a las regiones no traducibles del extremo 3' del mensajero y que inhiben su traducción por un mecanismo poco definido. Por el contrario, en plantas los miRNAs se unen de manera perfecta o casi perfecta a las regiones codificantes de los mRNA, y es esta complementariedad la que dispara la degradación del mRNA (Fig. 1) (6).

¿Qué es un microRNA?

Al igual que el miembro fundador *lin-4*, los miRNAs son RNAs de cadena sencilla que varían en tamaño desde 17 hasta 25 nt, teniendo como tamaño más común 21 nt. Una particularidad importante de los miRNAs es que todos sus precursores forman estructuras tipo tallo y asa, lo que se ha convertido en una propiedad esencial para los grupos que están interesados en su identificación. En general, los

microRNAs se transcriben de regiones intergénicas, ya sea de manera individual o en grupos de varios microRNA contenidos en un sólo transcrito, aunque también se ha visto que hay muchas regiones intrónicas que los contienen individualmente o en grupos (6). Algunos microRNAs se expresan de manera ubícu, mientras muchos otros lo hacen de forma tejido-específica, o incluso temporal, dependiendo de la etapa de desarrollo en la que se encuentre la célula o tejido, como es el caso de *lin-4*. Algo importante de resaltar es que no se ha caracterizado las secuencias promotoras encargadas de su transcripción, aunque si se sabe que pueden ser transcritos por la RNA polimerasa II que normalmente se encarga de transcribir los genes que codifican proteínas, o por la RNA polimerasa III cuyos productos son constitutivos.

Biogénesis de los microRNAs

Casi paralelamente al descubrimiento de los miRNAs, se describió una nueva y efectiva forma de inhibir la traducción de los RNAs mensajeros a placer del experimentador. Esta técnica consiste en generar un RNA de doble hebra (dsRNA, del inglés "double-stranded RNA") correspondiente a un fragmento del mRNA que se desea interferir. Al introducir el dsRNA en las células, se dispara la degradación del mRNA endógeno que comparte las secuencias presentes en el dsRNA. A este fenómeno se le llamó interferencia por RNA o en corto *RNAi* (del inglés "RNA interference"), el cual ha impactado en gran medida la investigación básica en el área biológica por constituir una herramienta que por su versatilidad ha resultado de gran utilidad. Gracias al descubrimiento del *RNAi* y a la gran curiosidad que despertó su mecanismo de acción, se empezó a identificar los factores involucrados, ayudando a delinear un modelo muy detallado de

cómo éste se lleva a cabo: el dsRNA es procesado para generar moléculas pequeñas de aproximadamente 21 a 22 nucleótidos llamados *siRNAs* (por "small interfering RNAs"), con las mismas características bioquímicas de los *miRNAs* que les permiten utilizar la maquinaria celular para silenciar RNAs endógenos. Lo más interesante es que al estudiar el fenómeno de RNAi se ha descubierto que muchas de las proteínas involucradas en esta vía también participan en el procesamiento y actividad de los *miRNAs* (6).

En consecuencia, se ha podido definir también el panorama general de la biogénesis de los *miRNAs* en animales (Fig. 2), los genes de *miRNAs* se transcriben por las RNA polimerasas II o III y el transcrito primario es llamado *pri-miRNA*. En general, se piensa que los *pri-miRNAs* son transcritos de varios cientos de nucleótidos, aunque en realidad no se ha hecho un análisis exhaustivo de las secuencias que los delimitan, ya sea en plantas o animales. Dentro del *pri-miRNA* se encuentra una estructura de tallo-asa de entre 60-70 nt conocida como el *pre-miRNA*, la cual resulta de su procesamiento en el núcleo de las células animales por un complejo proteínico llamado microprocesador, el cual está formado por Drosha (una RNasa tipo III) y una proteína con dominios de unión a RNA de doble hebra llamada Pasha (7). El *pre-miRNA* es trasladado al citoplasma mediante la exportina 5 en un proceso dependiente de GTP. Una vez en el citoplasma, sufre otro procesamiento en el que se remueve el asa terminal y se reduce a una cadena doble de ~21 pares de bases (pb). La remoción del asa es llevada a cabo por otra RNasa del tipo III llamada Dicer. Es entonces cuando el RNA pequeño de doble cadena es reclutado al complejo conocido como RISC (del inglés "RNA Induced Silencing Complex") que es el efector del silenciamiento de los RNAs. En este

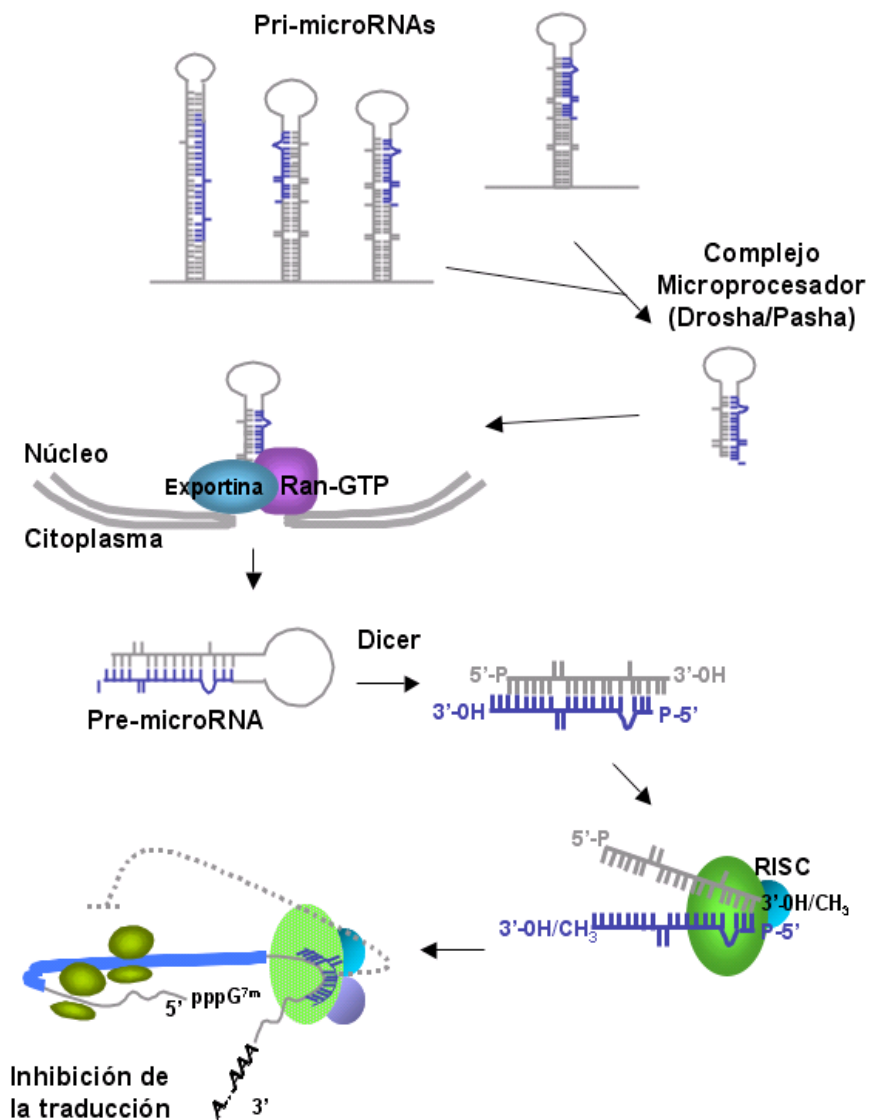


Figura 2. Biogénesis y mecanismo de acción más frecuente en animales.

Dos distintos transcritos primarios que pueden ser precursores, ya sea conteniendo uno o varios *miRNAs*, son primeramente convertidos por el microprocesador en *pre-miRNAs* que son llevados al citoplasma por exportina 5. El mensajero blanco se muestra unido a ribosomas y a RISC, con el *miRNA* dirigiendo la inhibición de su traducción. El *miRNA* se muestra como una cadena en azul a lo largo de su maduración.

complejo se encuentra una proteína llamada Argonauta (Ago) cuyas funciones son: 1) degradar una de las dos hebras del RNA pequeño, producto de Dicer, para dar como resultado final al *miRNA* funcional y 2) posteriormente detener la traducción cuando la homología y por lo tanto su hibridación es parcial; o por el contrario para degradar al RNAm blanco cuando su hibridación con el *miRNA* es total. En animales, la secuencia o secuencias

blanco reconocidas por los *miRNAs* se localizan generalmente en las regiones 3' no traducida de los RNA mensajeros (Fig. 1a).

Las plantas no poseen un complejo microprocesador como en el caso de animales, sino que en su lugar la proteína **DCL1 (DICER-LIKE 1)**, un homólogo de Dicer se encarga de procesar los *pri-microRNAs* a *pre-microRNAs* y después éstos a RNAs pequeños de doble cadena (Fig. 3).

Como particularidad, y a diferencia de lo que ocurre en animales, en plantas existe una modificación química por la cual el extremo 3' del miRNA maduro es metilado por la proteína *HEN1*. Una vez procesados, los RNAs dúplex de aproximadamente 21 pb son transportados al citoplasma por *HASTY* (un homólogo de exportina 5) por un mecanismo dependiente de Ran-GTP y ya en el citoplasma, son reclutados por el complejo RISC, en donde una de las dos hebras del RNA es degradada para dar lugar al miRNA maduro. El complejo RISC que contiene a *AGO1* y un miRNA puede entonces encontrar un mensajero blan-

co (8). Contrario a lo que ocurre en animales en las plantas la hibridación microRNA/mRNA es total y se lleva a cabo generalmente en la región codificante del mRNA, lo cual dispara la degradación del mensajero reconocido (Fig. 1B y Fig. 3).

Además de estas diferencias en la biogénesis, en plantas se ha encontrado una gran diversidad de RNAs pequeños distintos a los miRNAs. Por ejemplo, el mRNA no-codificante de los genes *TAS* de *Arabidopsis* es utilizado como templado para la generación de *ta-siRNAs* (del inglés "*trans-acting siRNAs*"), otro tipo de RNAs reguladores pequeños. El transcrito de

TAS es inicialmente reconocido y cortado por un miRNA para poder ser convertido después a dsRNA por las proteínas RDR6 y SGS. El RNA de doble hebra es procesado posteriormente por otra proteína tipo Dicer, *DCL4* a *ta-siRNAs* de ~21 nt. De esta manera los *ta-siRNAs* pueden ser finalmente incorporados en RISC y dirigir el silenciamiento de otros transcritos (8). Otro tipo de RNAs pequeños reguladores descubiertos en plantas son los *nat-siRNAs* ("*natural antisense transcript siRNAs*"). Estos se originan cuando dos transcritos independientes provenientes de cadenas opuestas de una misma región

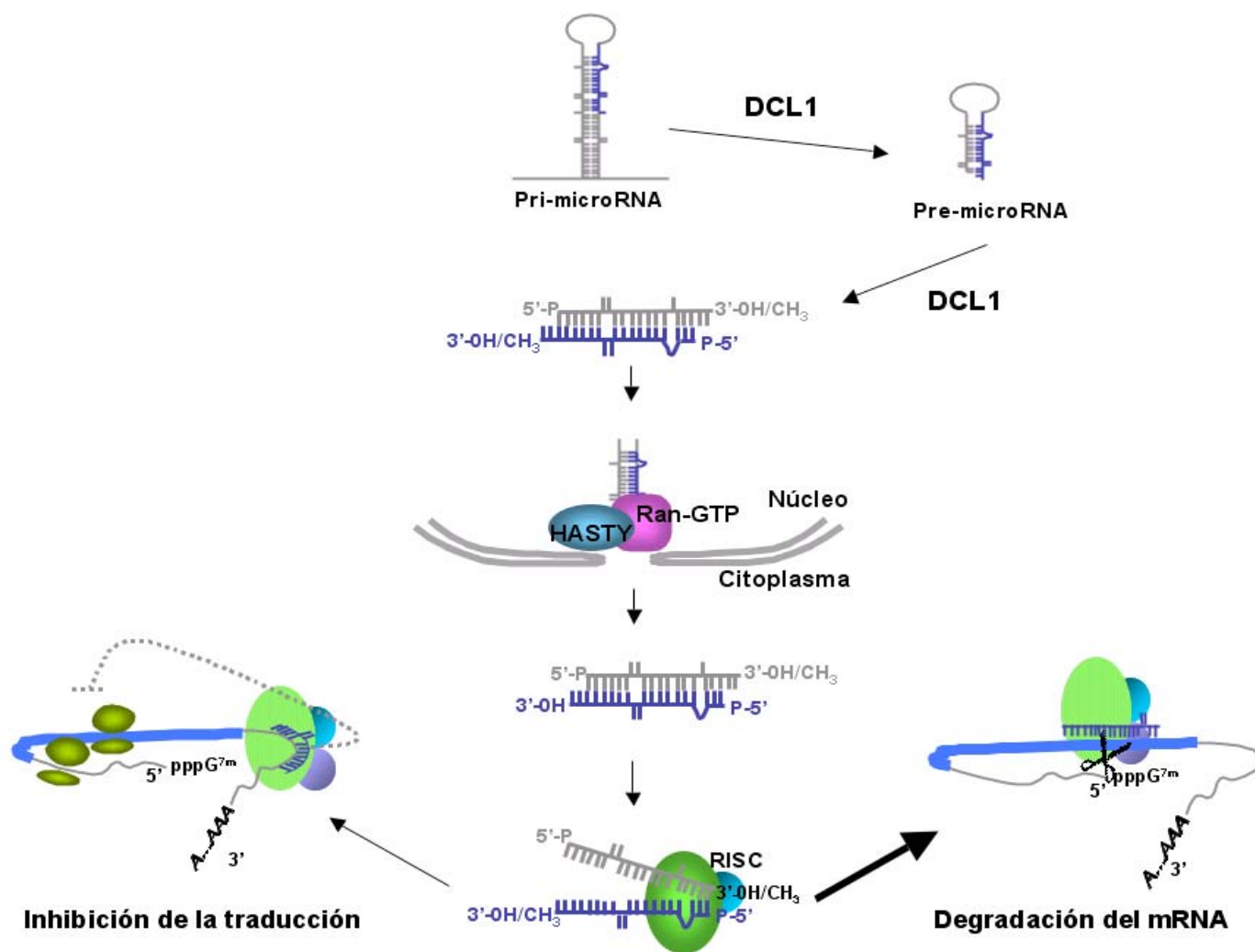


Figura 3. Biogénesis y mecanismo de acción más común en plantas.

En plantas, generalmente el transcrito primario contiene un solo miRNA. *DCL1* se encarga de los primeros pasos de maduración para que *HASTY* exporte el miRNA al citoplasma. Una de las dos cadenas es seleccionada e incorporada en RISC para dirigir la degradación el mensajero blanco. En pocos casos también se ha observado la inhibición de su traducción. El miRNA se muestra en color azul.

genómica son producidos, lo cual ocurre de forma natural en ciertos genes. Las regiones comunes de estos mensajeros pueden entonces aparearse, dando lugar a RNAs de doble hebra. Los dsRNAs resultantes son procesados por *DCL2* generando nat-siRNAs de ~24 nt que pueden entonces ser reclutados a RISC y ser capaces de silenciar transcritos específicos. Al igual que para los miRNAs o los ta-siRNAs, un grupo de proteínas específicas son necesarias para la biogénesis de los nat-siRNAs, muchas de las cuales se comparten en las diferentes vías de biogénesis (8). Con esta gran variedad de RNAs pequeños presente en las plantas, surge la pregunta si algo similar ocurre en animales. Sólo recientemente se ha descubierto otro tipo de RNAs pequeños en células animales que se encuentran asociados a una proteína de la familia de Argonauta, llamada Piwi. Los "piwi-interacting" RNAs (piRNAs) son de un tamaño cercano a 30 nt y su función no ha sido claramente definida, aparte de encontrarse relacionados con el silenciamiento de genes a nivel transcripcional en células germinales (9).

¿Cómo se identifica a un microRNA?

La identificación de miRNAs es una tarea muy laboriosa y compleja. La razón de ello es sencilla, no todos los RNAs de 21 nucleótidos son miRNAs. Cuando alguien se da a la tarea de identificar miRNAs por técnicas de clonación, la degradación de RNA es algo inherente al método que se escoge, sea cual sea la técnica. Así que, entre los cientos y en algunos casos miles, de secuencias de posibles miRNAs es necesario descartar todas aquellas de las cuales se sospeche sean un producto de degradación de un RNA de mayor tamaño. Desafortunadamente, la única forma de descartarlas es identificándolas una por una y sólo ocurre después de haberlas clonado y secuenciado. En general, los

miRNAs sólo corresponden a un pequeño porcentaje del total de las secuencias obtenidas, ya que en su mayoría se aíslan fragmentos de RNAs ribosomales, fragmentos de RNAs mensajeros abundantes, de tRNAs, etc., en pocas palabras, es posible clonar cualquier RNA que se degrade.

Entonces, ¿cómo se identifica a un microRNA? Una de las estrategias más utilizadas consiste en realizar un análisis bioinformático a partir de los cientos de secuencias de RNAs pequeños obtenidas, comparándolas con diferentes bases de datos. Todo ello con la finalidad primaria de identificar a qué corresponde cada una de las secuencias aisladas. De esta manera se eliminan los fragmentos que corresponden a RNAs previamente conocidos. Sin embargo, no todos los RNAs depurados corresponden a miRNAs; todavía podrían existir muchas secuencias que no hayan sido identificadas que podrían ser confundidas con miRNAs. Por lo tanto, el siguiente paso es ubicar el o los posibles *loci* en el genoma, y explorar si los posibles transcritos de estas secuencias en él, pueden formar una estructura de tipo tallo y asa. La formación del tallo y asa en la secuencia del *locus* correspondiente es un requerimiento esencial para considerar a un miRNA como verdadero, aunque no necesariamente todos los tallos y asas son premiRNAs. Por esta última razón se hace obligatorio un análisis bioinformático adicional dirigido a identificar secuencias homólogas conservadas en otras especies. Por ejemplo, el miRNA let-7 es exactamente igual entre *C. elegans*, *D. melanogaster* y *H. sapiens* (5). Por último y como confirmación, generalmente se hacen experimentos tipo Northern blot con la finalidad de comprobar la expresión individual de las secuencias candidato. De esta manera es como se ha registrado una gran cantidad de miRNAs en la base de datos MirBase

(<http://microrna.sanger.ac.uk>), los cuales son el resultado de largas horas de depuración bioinformática (5).

Muchos microRNAs... ¿muchos blancos?

La identificación masiva de miRNAs ha promovido la generación de algoritmos computacionales para poder predecir los posibles mensajeros regulados por cada miRNA. Basados en los resultados obtenidos de los experimentos bioquímicos del mecanismo de acción de miRNAs y siRNAs y usando como RNAs blanco genes reporteros, se tiene una idea de cuáles son los requerimientos de estabilidad miRNA/RNA, lo cual permite que se puedan predecir dichos pares. Para el caso de plantas, se han hecho numerosos avances en la identificación de los mRNA regulados por miRNAs, ya que, generalmente, en estos organismos existen RNAs blanco genes reporteros, se tiene una idea de cuáles son los requerimientos de estabilidad miRNA/RNA, lo cual permite que se puedan predecir dichos pares. Para el caso de plantas, se han hecho numerosos avances en la identificación de los mRNA regulados por miRNAs, ya que, generalmente, en estos organismos existen RNAs blanco genes reporteros, se tiene una idea de cuáles son los requerimientos de estabilidad miRNA/RNA, lo cual permite que se puedan predecir dichos pares. Sin embargo, en animales, la historia no es así de sencilla; como se mencionó arriba, los miRNAs en animales se unen a su RNA blanco de manera parcial, esto es, algunas posiciones no están apareadas, como es el caso de let-7 (Fig. 1a). Por lo tanto, mientras menos nucleótidos sean necesarios, para el apareamiento, mayor será el número de posibles secuencias que podrían hibridar. Este hecho constituye un paradigma en el estudio de los miRNAs en animales, ya que se ha estimado que para cada miRNA, podría existir cerca de 200 blancos posibles y para cada blanco hasta 20 diferentes miRNAs que lo reconocen. Como podrá imaginarse el lector, estas interacciones pueden dar lugar a redes de regulación miRNAs/RNAs muy complejas y representan un gran reto para la dilucidación de los diferentes mecanismos de control de genes particulares y de grupos génicos implicados en procesos particulares.

microRNAs y control celular

Además de los procesos celulares antes mencionados en los que se ha visto la participación de los miRNAs, se han encontrado algunas condiciones patológicas relacionadas con la sobreacumulación o la ausencia de los mismos ya que, recientemente, se han descubierto algunos miRNAs que actúan como supresores tumorales u oncogenes al regular blancos involucrados en el ciclo celular. Por ejemplo, los miRNAs miR-15a y miR-16-1 regulan negativamente *BCL2*, un gen antiapoptótico cuyo producto frecuentemente se encuentra aumentado en leucemias y linfomas (10). En tumores colo-rectales, se ha reportado que los niveles de expresión de los miRNAs miR-143 y miR-145 están significativamente reducidos (11). Los niveles de miR-1 están elevados en pacientes con afección de la arteria coronaria; mientras que los niveles de miR-133 están reducidos en pacientes con hipertrofia cardíaca (12, 13).

Por otro lado, en *A. thaliana*, además de la participación en el control del desarrollo, se ha encontrado miRNAs involucrados en la regulación de la percepción de nutrientes. El miRNA miR-395 se expresa en deficiencia de sulfato afectando la expresión de enzimas involucradas en la asimilación del mismo (14) y el miRNA miR-399 se expresa en respuesta a la deficiencia de fósforo, teniendo como blanco al transcrito del gen *UBC24* que codifica para una enzima involucrada en la degradación de pro-

teínas (14). Finalmente, incluso se ha identificado a un nat-siRNA como importante en la respuesta a estrés salino en *A. thaliana* (8).

Así, los microRNAs no solamente son importantes como reguladores del desarrollo celular o reguladores que previenen o promueven ciertas enfermedades, sino como moléculas que mantienen el equilibrio metabólico general.

Retos a futuro

Evidentemente, para los investigadores interesados en los mecanismos básicos de los miRNAs, el reto más importante a largo plazo es identificar el número real de miRNAs en las diferentes especies, así como encontrar los RNAs que son regulados por éstos, todo ello con el fin de integrar las diferentes redes de control que pudieran existir en un organismo dado para un proceso determinado. Considerando el número creciente de miRNAs que se registran en el MirBase, ésta tarea no será nada fácil. Esto, sin tomar en cuenta el papel regulador que puedan tener los otros RNAs pequeños existentes en la célula, tales como los ta-siRNAs, nat-siRNAs, piRNAs u otros cuya existencia aún no hemos descubierto.

Una idea que ha entusiasmado tanto a investigadores como a las grandes compañías farmacéuticas es el uso del fenómeno de RNAi. A la fecha se ha intentado utilizar esta metodología utilizando RNAs pequeños de doble cadena (siRNAs) para inducir el

silenciamiento de RNAs blanco específicos por la vía de RNAi, sin embargo, este tipo de herramientas se ha visto enriquecida con la posibilidad de silenciar el transcrito que se desee, utilizando miRNAs artificiales, diseñados específicamente para el blanco deseado (15, 16). Sin embargo, ahora el reto más grande en el desarrollo de este tipo de tecnología es hacer llegar el miRNA de una forma efectiva a la célula o tejido blanco. Aún con estas limitaciones, el potencial de esta tecnología deja abierta la esperanza de poder utilizarla en el diseño de terapias para contrarrestar enfermedades que afectan al humano como el SIDA, el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, etc. Cabe mencionar que esta metodología se ha convertido en una herramienta poderosa que, junto con el RNAi, ha ampliado las posibilidades para el análisis de diferentes procesos biológicos en organismos diversos ya que, permite disminuir o anular (silenciar) la producción de una proteína dada, emulando la generación de mutaciones dirigidas en genes específicos. Sin duda, un conocimiento más profundo de cómo los RNAs pequeños se regulan, cómo funcionan y qué procesos celulares regulan estos, impactará no sólo al mayor y mejor entendimiento de los mismos, sino que también incrementará el potencial utilitario de esta herramienta para resolver diversos problemas que aquejan a la raza humana y al medio ambiente que la rodea.

REFERENCIAS

1. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75(5): 843-854.
2. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 294(5543): 853-858.
3. Lee R, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 294(5543): 862-864.
4. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 294(5543): 858-862.

5. Griffiths-Jones S (2006) miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol.* 342: 129-138.
6. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116(2): 281-297.
7. Kim VN (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(5): 376-385.
8. Vaucheret H (2006) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* 20(7): 759-771.
9. Kim VN (2006) Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes. *Genes Dev.* 20(15): 1993-1997.
10. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(39): 13944-13949.
11. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ (2003) Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular Cancer Research: MCR.* 1(12): 882-891.
12. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z (2007) The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med.* 13(4): 486-491.
13. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Høydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW 2nd, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. (2007) MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 13(5): 613-618.
14. Chiou TJ (2007) The role of microRNAs in sensing nutrient stress. *Plant Cell Environ.* 30(3): 323-332.
15. Tiscornia G, Tergaonkar V, Galimi F, Verma IM (2004) CRE recombinase-inducible RNA interference mediated by lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(19): 7347-7351.
16. Niu QW, Lin SS, Reyes JL, Chen KC, Wu HW, Yeh SD, Chua NH (2006) Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat Biotechnol.* 24(11): 1420-1428.