

NUEVOS E INESPERADOS MECANISMOS DE BIOGÉNESIS Y ACCIÓN DE LOS microRNAs*

Ruth Ruiz Esparza Garrido¹, Miguel Ángel Velázquez-Flores²

¹Catedrática CONACyT, Laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XX, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México. ²Laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México. Autor de correspondencia, correo E: dr.velazquez.imss@gmail.com

RESUMEN

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños (~22 nt) no codificantes cuya transcripción es regulada por componentes moleculares diversos. A la fecha, se conocen cuatro vías de biogénesis que dan origen a los miRNAs convencionales, mirtrones, simtrones y miRNAs delimitados por secuencias Alu. Notablemente, todos estos miRNAs ejercen su acción al incorporarse al complejo de silenciamiento inducido por RNA o RISC; no obstante, otros mecanismos de acción no se pueden descartar. Si bien la inhibición de la expresión génica es el efecto mejor caracterizado, actualmente hay evidencia que indica que los miRNAs también la pueden potenciar. Los mecanismos de acción más utilizados por los miRNAs -para regular la expresión de genes- incluyen la inhibición de la traducción y/o desestabilización del mRNA blanco; sin embargo, también se ha observado su acción a nivel transcripcional y como ligandos de los receptores similares a Toll 7 y 8. De esta forma, la divergencia en los mecanismos de biogénesis y acción de los miRNAs parecen garantizar la regulación de la expresión génica en momentos celulares específicos.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are small non coding RNAs (~22 nt), whose transcription is regulated by different molecular mechanisms. To date, four pathways of biogenesis are known and originate conventional miRNAs, mirtrons, simtrons, and miRNAs flanked by Alu elements. Remarkably, all these miRNAs act in conjunction with the RNA-induced silencing complex (RISC); however, other mechanisms cannot be ruled out. While attenuation of gene expression is the best characterized effect, currently there is evidence indicating the induction of gene expression by miRNAs. The mechanisms of action used by miRNAs -to regulate gene expression- include the translation inhibition and/or the mRNA target destabilization; however, miRNA action at the transcriptional level and as ligands of the Toll-like receptors 7 and 8 has also been observed. Thus, the divergence of the mechanisms of biogenesis and action of miRNAs seem to ensure the regulation of gene expression in specific cell moments.

INTRODUCCIÓN

De manera opuesta a lo que se esperaba, la secuenciación del genoma humano demostró que apenas el ~1.5% de éste corresponde a regiones codificantes, mientras que el resto (~98.5%) es DNA no codificante o basura (1-2). Sin embargo, se

ha propuesto que las regiones no codificantes del genoma funcionan como guardianes de su integridad al controlar la estabilidad (3) y expresión de los genes que lo constituyen (4-6). En estas regiones se transcriben los RNAs ribosomales (rRNAs) y de transferencia (tRNAs), así como otros transcritos como son los RNAs pequeños (pRNAs), RNAs largos, transposones y pseudogenes (Tabla 1).

PALABRAS

CLAVE:

microRNA, mRNA blanco, Región semilla, Cuerpos P, miRNA circulante.

KEY WORDS:

microRNA, mRNA target, Seed region, P bodies, Circulating miRNAs.

Tabla 1
RNAs no codificantes

RNAs no codificantes	Descripción
Transposones y retrotransposones	En conjunto, los elementos nucleares largos (LINEs; ~6,000 pares de bases) y cortos (SINEs; <500 bases) constituyen alrededor del 30% del genoma humano y sus funciones están relacionadas con la inducción de la estabilidad genómica. La transcripción de los SINEs origina RNAs de transferencia (tRNA) y ribosomales (rRNA), así como otros RNAs nucleares pequeños. Por su parte, cambios en la actividad de los LINEs se asocian con la oncogénesis y ciertos desórdenes.
Pseudogenes	A la fecha, se sabe que el genoma humano tiene ~19 mil genes. De éstos, alrededor del 1.5% codifica para proteínas. Los pseudogenes son el resultado de la duplicación génica y de eventos de retrotranscripción. Algunos de ellos se originaron por mutaciones inactivantes.
Telómeros	Son secuencias repetidas de DNA (TTAGGG; en vertebrados) que mantienen la estabilidad del genoma. El acortamiento de los telómeros se asocia con la senescencia y con un incremento en la susceptibilidad al cáncer.
RNAs pequeños	Funciones
microRNA (miRNA) Tamaño: 17-22 nt	Regulan la expresión génica al controlar la traducción y estabilidad de sus mRNAs blanco y transcripción génica. Los miRNAs circulantes pueden funcionar como ligandos de los receptores parecidos Toll TLR7 y TLR8.
RNA piwi (piRNA) Tamaño: 26-31 nt	Junto con las proteínas piwi, estos RNAs pequeños regulan epigenéticamente y post-transcripcionalmente el silenciamiento de retrotransposones y otros elementos génicos en células germinales. A diferencia de los miRNAs, los piRNAs no están conservados evolutivamente.
RNA interferente (siRNA) Tamaño: 20nt	Son moléculas de RNA de doble cadena (20-25 pares de bases) que inhiben la expresión génica por mecanismos similares a los descritos para los miRNAs. Adicionalmente, los siRNAs regulan la expresión génica al participar en la remodelación de la cromatina.
RNA nuclear (snRNA) Tamaño: ~150 nt	Están involucrados en el procesamiento "splicing" de los mRNAs y participan en la manutención de los telómeros, así como en la maduración de los snoRNAs; esto ocurre en los cuerpos de Cajal.
RNA nucleolar (snoRNA) Tamaño: 90-150 nt	Principalmente guían las modificaciones químicas de los tRNAs, rRNAs y snRNAs. Existen dos tipos de snoRNAs, los C/D –asociados con la metilación- y H/ACA –asociados con la pseudouridinilación-. Los snoRNAs pueden funcionar como miRNAs y su procesamiento puede dar origen a miRNAs.
lncRNAs Tamaño: >200 nt	Son RNAs altamente complejos que participan en la regulación génica a diferentes niveles: epigenético, transcripcional, post-transcripcional controlan el splicing y la traducción; generan endo-siRNAs y participan en el imprinting génico. Los lncRNAs que regulan la función de los miRNAs, al secuestrarlos, se conocen como lncRNAs esponja.

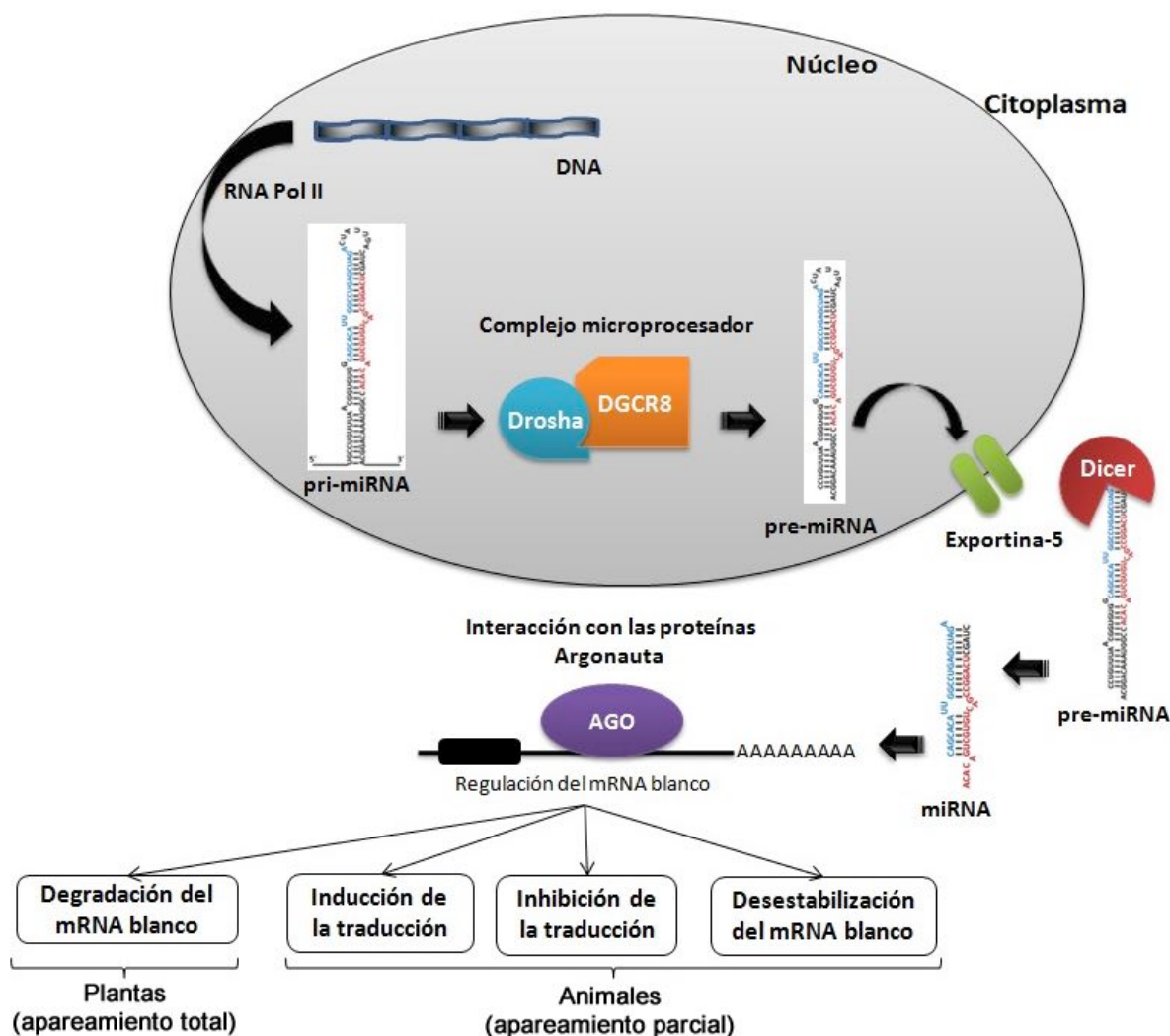


Figura 1. Biogénesis de los microRNAs convencionales. La biogénesis de la mayoría de los miRNAs está regida por la actividad de la RNA polimerasa II (pri-miRNA) y por el subsecuente procesamiento mediado por el complejo microprocesador Drosha/DGCR8 para generar al pre-miRNA. La exportación del pre-miRNA hacia el citoplasma ocurre por medio de la exportina-5 –proceso dependiente de ATP–; una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por Dicer y genera al miRNA maduro (de doble cadena). El miRNA maduro es incorporado al complejo de silenciamiento dependiente de RNA o RISC, en donde se elegirá cuál hebra, si la líder (5' → 3') o la complementaria (3' → 5'), ejercerá la regulación del mRNA blanco. En plantas el apareamiento entre el miRNA y el mRNA es total, mientras que en animales es parcial región semilla; sin embargo, existen excepciones.

Dentro de los pRNAs están los miRNAs (~22 nt), los cuales son sintetizados por medio de al menos cuatro vías biogénicas diferentes. De acuerdo a la vía de biosíntesis de la que provienen, los miRNAs se clasifican en miRNAs convencionales (vía clásica), mirtrones (originados por "splicing" alternativo) (7), simtrones "splicing-dependent mirtron" (mirtrones que no dependen del splicing) (8) y miRNAs localizados dentro de secuencias Alu (miRNAs-Alu; transcritos por la RNA polimerasa III). Independientemente de su origen, todos los miRNAs ejercen su función de manera conjunta con el complejo de silenciamiento inducido por RNA

(RISC); sin embargo, otras formas de acción para cada subtipo no se pueden descartar.

Aunque la función que mejor describe a los miRNAs es la inhibición de la traducción, actualmente está bien establecido que estos pRNAs también pueden potenciar la expresión de sus genes blanco. Los mecanismos por los que los miRNAs ejercen su función están relacionados con el control del inicio, la elongación y el término de la traducción de proteínas, así como con la regulación de la transcripción de sus genes blanco. Interesantemente, Fabbri y cols. (9) demostraron que los miRNAs circulantes (extracelulares) pueden

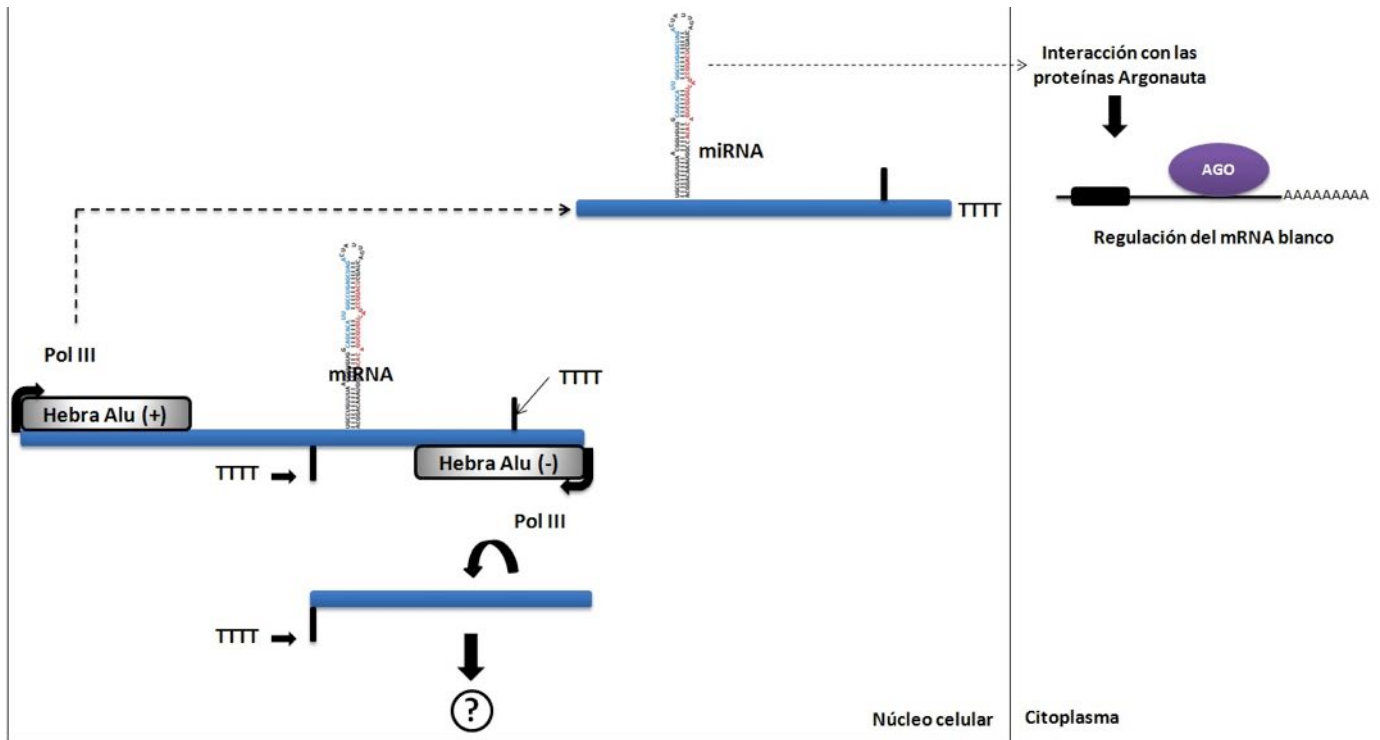


Figura 2. miRNAs delimitados por secuencias Alu. La mayoría de los miRNAs del clúster C19M están flanqueados entre secuencia Alu -hebras positivas y negativas-. La distancia en la que se localizan los miRNAs, con respecto de la secuencia Alu (-) es generalmente de 100 pb. (Tomado y modificado de referencia 15).

funcionar también como ligandos de los receptores TLR7 (Receptor similar a Toll 7) y TLR8 (Receptor similar a Toll 8), lo cual resalta la gran diversidad de mecanismos de acción por los que los miRNAs pueden controlar la expresión génica. De acuerdo a lo anterior, el objetivo de la presente revisión es describir los mecanismos de biogénesis y acción de los miRNAs menos caracterizados y con esto, hacer énfasis acerca de la complejidad que implica la regulación de la expresión de genes.

I. Biogénesis de los miRNAs

i) Vía Canónica

La vía biosintética de los miRNAs convencionales implica la generación de un transcrito primario (~70 nt) pri-miRNA, por medio de la RNA polimerasa II (Pol II), y su procesamiento posterior -por el complejo Microprocesador: Drosha (Drosha, Ribonucleasa Type III)/DGCR8 (DGCR8 Microprocessor Complex Subunit)- para generar al pre-miRNA (Fig. 1). Es importante mencionar, que el pre-miRNA generado posee dos nucleótidos salientes en el extremo 5' terminal -la cual es una marca propia de las RNAsas de tipo III- que son necesarios para su reconocimiento y exportación hacia el citoplas-

ma, por la exportina-5. Una vez en el citoplasma, el asa del pre-miRNA es procesada por DICER (Dicer 1, Ribonucleasa de tipo III) y esto permite el reconocimiento del pre-miRNA por el complejo RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA). Inicialmente se pensaba que sólo la cadena líder (5' → 3') regulaba la traducción de los mRNAs blanco; sin embargo, evidencia posterior reveló que la cadena complementaria (3' → 5') también tiene esta función (9-10).

ii) miRNAs delimitados por secuencias Alu

Diversas líneas de evidencia muestran que los miRNAs están conservados evolutivamente (12) y que el control de su expresión es dependiente de la actividad de la RNA Pol II (13). Si bien la mayoría de los miRNAs se localizan en intrones y regiones intergénicas, hay evidencia que demuestra la localización de estos RNA pequeños en elementos repetitivos de retrotransposición (14). En este sentido, Borchert y cols. (15) demostraron que ciertos miRNAs están intercalados entre repetidos Alu-retrotransposones más abundantes en el genoma- y, a diferencia de los miRNAs convencionales, éstos dependen de la actividad de la RNA Pol III (Fig. 2). Estos hallazgos extienden nuestra visión actual acerca del origen

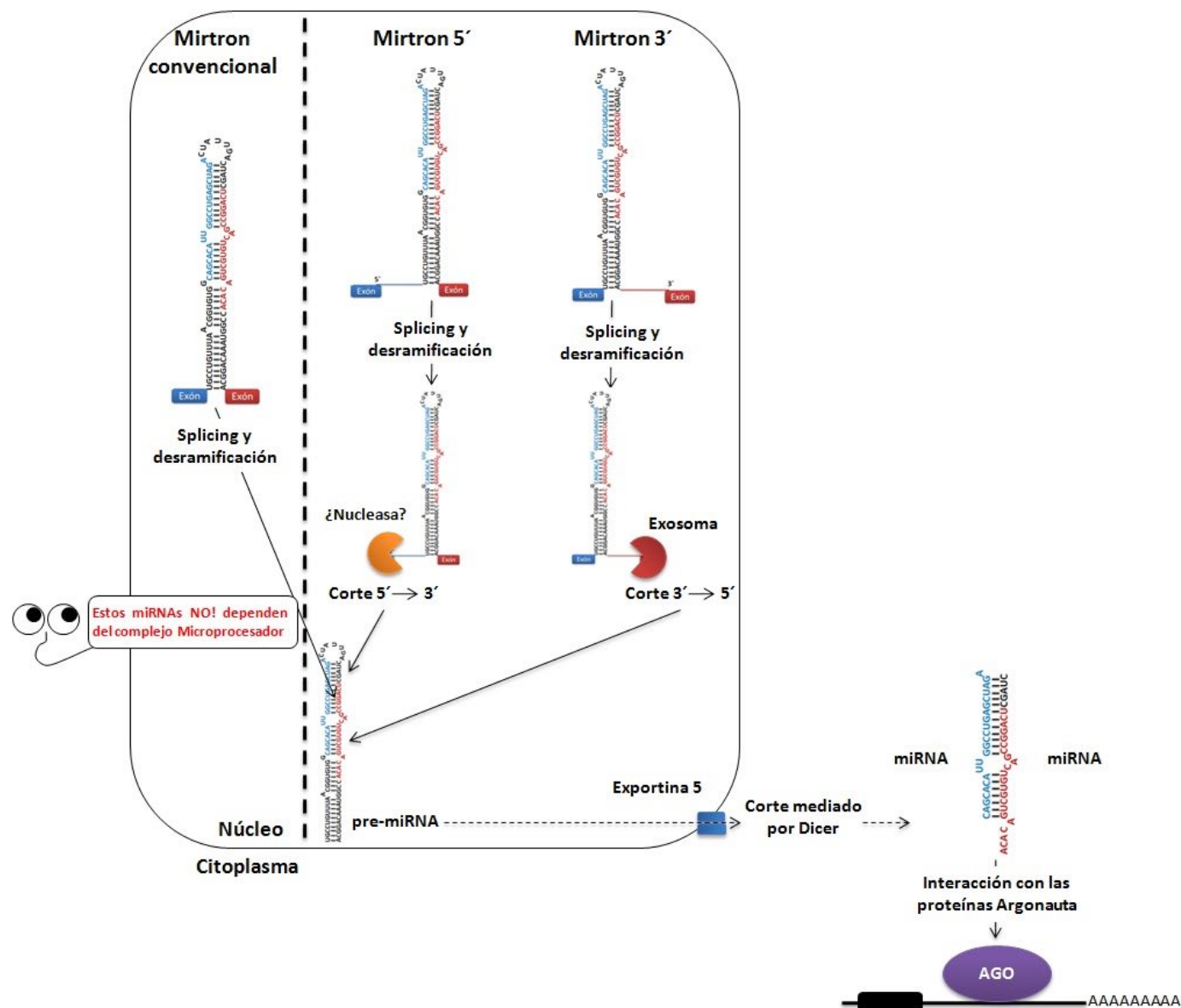


Figura 3. Mirtrones. Este tipo de miRNAs se clasifica en mirtrones convencionales y "tailed" (con extremos 5' y 3' no estructurados). El pre-miRNA de ambos tipos de mirtrones resulta del "splicing" y desramificación de intrones cortos; sin embargo, durante la biogénesis de los pre-miRNAs "tailed", es necesaria la remoción de los extremos 5' ó 3' terminales. En el caso de los mirtrones 3', se sabe que el exosoma es el encargado de remover estos extremos, mientras que para los mirtrones 5' se desconoce la enzima responsable de este proceso. (Tomado y modificado de referencia 7).

de los miRNAs y de la maquinaria que dirige su expresión.

iii) Mirtrones

Además de los mecanismos descritos anteriormente, existen miRNAs que se generan a partir de intrones de horquilla corta "short hairpin introns", los cuales se conocen como mirtrones. Este tipo de miRNAs tienen muchas de las características descritas para los miRNAs convencionales; no obstante,

hay rasgos moleculares que permiten diferenciarlos de estos últimos (Tabla 2). Los mirtrones están bien caracterizados en *Drosophila melanogaster* (*D mel*) (16) y en menor medida en otros organismos como *Caenorhabditis elegans* (*C elegans*) (16) y vertebrados (7). De acuerdo a los mecanismos que dictan su transcripción, los mirtrones se clasifican en dos subtipos: los convencionales, en donde el "splicing" define las regiones terminales 5' y 3' del pre-miRNA y los "tailed", los cuales contienen regiones 5' y 3' no estructuradas (Fig. 3). De ma-

Tabla 2
Rasgos distintivos de los mirtrones

Se generan sólo de intrones pequeños (50-120nt)
Se puede identificar muy bien el sitio del splicing y la naturaleza del extremo 3' no apareado.
Su procesamiento es independiente del complejo Drosha/Pasha y dependiente de Dicer.

nera interesante, en *D mel* existen principalmente mirtrones 3', mientras que en vertebrados se expresan principalmente mirtrones 5' (Fig. 3).

iv) Simtrones

Como ya se mencionó, la biogénesis de los miRNAs canónicos requiere de los componentes del complejo Microprocesador, Drosha y DGCR8, para generar al

miRNA maduro, mientras que para la biosíntesis de los mirtrones no son necesarios; en este caso, el pre-miRNA se genera directamente del corte de los intrones por el spliceosoma y son sustratos directos de Dicer (Fig. 4). De manera inesperada, un estudio posterior demostró que los mirtrones miR-1225 y miR-1228 se producen en ausencia de "splicing" y de forma dependiente de Drosha (8). Experimentos en los que se abatió la expresión de DGCR8, de la Exportina-5 o de Argonata 2 se demostró que la biogénesis de estos miRNAs –parecidos a mirtrones simtrones- no se afecta. Por el contrario, la presencia de la forma dominante negativa de Drosha afecta considerablemente los niveles de los simtrones 1225 y 1228. Asimismo, en este estudio se demostró que los simtrones establecen interacciones con Drosha y que *in vitro*, su procesamiento depende de la actividad de Drosha. Un punto interesante, es el hecho que tanto los simtrones como los mirtrones convencionales silencian a sus mRNA blanco al interaccionar con el complejo RISC (Fig. 4). En conjunto, estos resultados revelan otra vía no-canónica de biogénesis

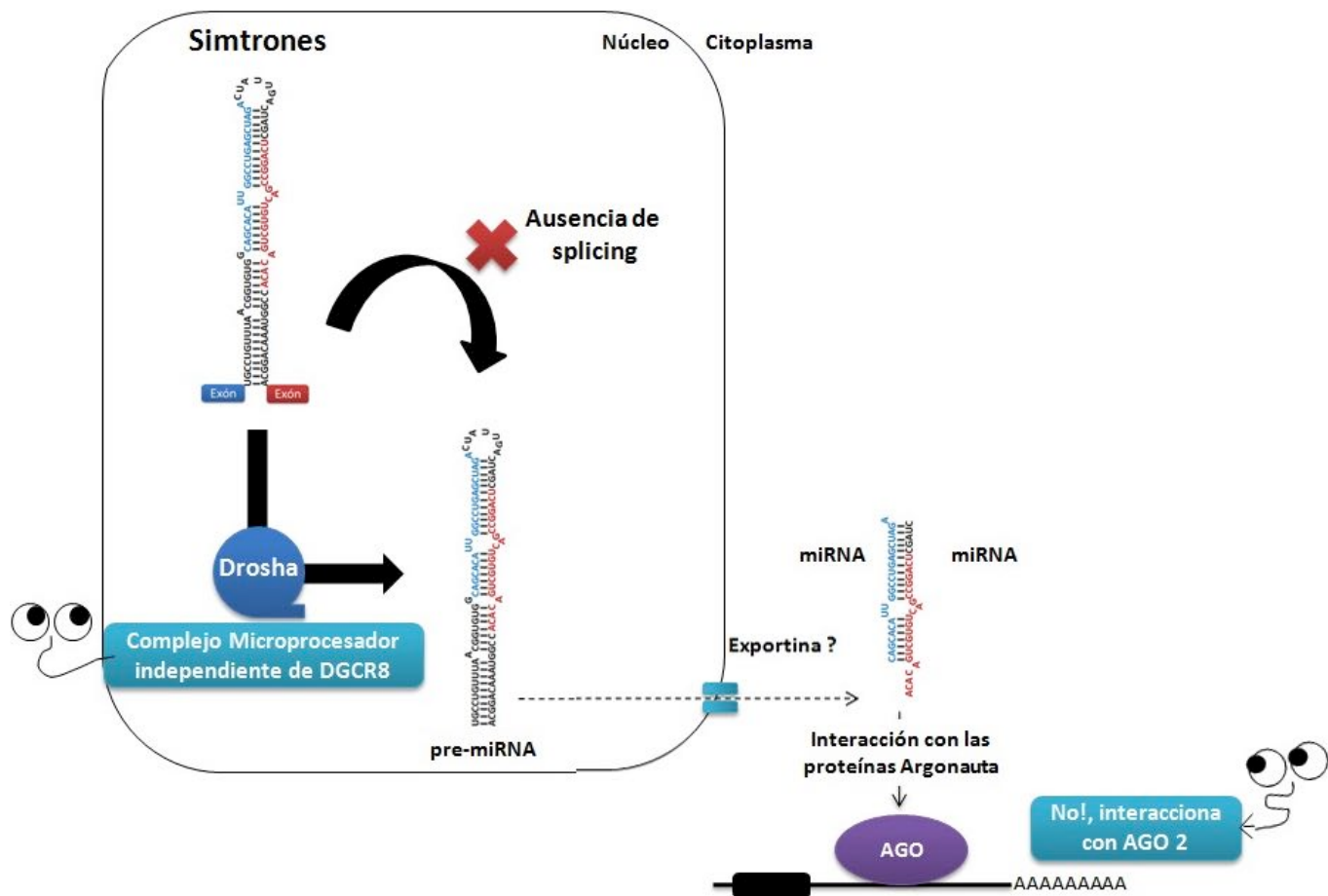


Figura 4. Simtrones. Los simtrones son mirtrones que no dependen del "splicing" y son dependientes de la actividad de Drosha. Asimismo, este tipo de mirtrones no requieren de la exportina-5 –para su exportación hacia el citoplasma- ni de AGO 2 para su incorporación al complejo RISC.

de los miRNAs que produce RNAs funcionales que regulan la expresión génica.

II. Modos de acción de los miRNAs

i) Regulación de la traducción

a) Inhibición

Los miRNAs reprimen la expresión génica por medio de varios mecanismos de acción (17). Distintas líneas de evidencia indican que los miRNAs actúan en complejos efectores que son conocidos como miRNP, miRgonauta o miRISC, en donde las proteínas Argonauta (Ago) son los constituyentes más importantes (18). El reconocimiento del mRNA blanco, por el miRNA, ocurre por un apareamiento de tipo Watson-Crick de la región semilla del miRNA (nt 2-8) con la región 3' UTR del mRNA blanco (16); no obstante, ciertos miRNAs regulan la expresión génica al aparearse con las regiones 5' uTR y/o codificantes del blanco (20-21). Importantly, la interacción miRNA-mRNA y en consecuencia, el efecto represivo de la expresión pueden alterarse en respuesta a diversos factores tales como el número de sitios blanco para un mismo miRNA, el sitio de unión del miRNA en el mRNA, la accesibilidad al sitio de unión, las secuencias que flanquean el sitio del mRNA blanco, así como la estructura secundaria del mRNA (22-24).

Actualmente, diferentes modelos se han propuesto para tratar de explicar la represión génica mediada por miRNAs, los cuales involucran mecanismos de regulación a nivel transcripcional, así como al inicio, durante y al final de la traducción. La información relacionada con el silenciamiento transcripcional inducido por RNA (RITS) es bastante pobre y sólo se sabe que ésta involucra la participación de proteínas Ago nucleares que son capaces de inducir la remodelación de la cromatina (25-26). Por su parte, los mecanismos asociados con la regulación de la traducción son mejor conocidos; sin embargo, no están del todo caracterizados. Por ejemplo, se sabe que la represión de la traducción de proteínas es controlada al degradar al mRNA blanco, debido a su deadenilación (región 3' terminal) y/o modificación de la cap (extremo 5'; "decapping"); la ausencia de la cola de poli(A) y de cap induce la degradación del mRNA por exo- y endo-nucleasas como Xrnlp y PMR1 (ribonucleasa polisomal 1), respectivamente (27-30) (Fig. 5a-b).

Durante el inicio de la traducción, la proteína Ago, constituyente del miRNP, interacciona con diversos factores que determinan el inicio de la traducción (31). Ago compete con el factor eIF4E (Factor 4E de Inicio de la traducción en eucarión-

tes), el cual dirige a los ribosomas hacia la cap del mRNA, para unirse a la estructura cap del mRNA e inhibir el inicio de la traducción (32). De igual forma, Ago regula la función de los factores PABP (proteínas de unión a la cola de poli(A)), eIF4G -interacciona con eIF4E-, eIF4A -requerido para la unión del mRNA a las subunidades ribosomales 40S- y eIF3 y eIF4, las cuales se asocian a las subunidades ribosomales pequeñas (33). También, se ha reportado que la inhibición de la traducción podría ocurrir cuando los sitios de unión del miRNA están localizados en la región 5' UTR o en secuencias codificantes del mRNA (34). Otro mecanismo que controla la inhibición del inicio de la traducción, es la participación de Ago en el control de la estructura secundaria del mRNA blanco. Existe evidencia que indica que Ago bloquea la formación de la estructura secundaria asa-cerrada que es necesaria para el inicio de la traducción. Aunque se conoce que ciertas proteínas de unión a la cola de poli(A) y cap participan en el establecimiento de la conformación asa-cerrada, los mecanismos finos se desconocen (35-36) (Fig. 5c).

Una vez que la traducción ha comenzado, Ago recluta al factor eIF6 y previene la asociación del miRNA-mRNA con la subunidad ribosomal grande (36-37) (Fig. 5d). Asimismo, el miRNP interfiere con los factores de elongación y esto conlleva a la disociación de la subunidad ribosomal y/o terminación prematura de la traducción (38) (Fig. 5e-f). Interesantemente, también se sabe que los miRNPs controlan la degradación del polipéptido nascente, el cual es degradado por la actividad de proteasas (39) (Fig. 5g).

Recientemente, se observó que los sitios de procesamiento citoplásmico cuerpos P o GW tienen una función central en la degradación de los mRNAs blanco y en la inhibición de la traducción (Fig. 5h). Los mRNAs asociados a componentes de los cuerpos P, son degradados o retenidos para su traducción posterior; esto indica que el equilibrio existente entre la expresión y la degradación de un mRNA determinado depende de la interacción de los polisomas y miRNPs con componentes específicos de estos cuerpos. Asimismo, los miRNAs y otros reguladores de la expresión génica parecen reprimir la traducción y promover el decaimiento del blanco, al reclutar componentes de los cuerpos P tales como Ago y GW182. En conjunto, estos resultados indican que los mRNAs, regulados por miRNAs, son secuestrados de la maquinaria traduccional -por componentes específicos presentes en los cuerpos P- y sometidos tanto a la degradación o inactivación para su procesamiento subsecuente (40-42) (Fig. 5h).

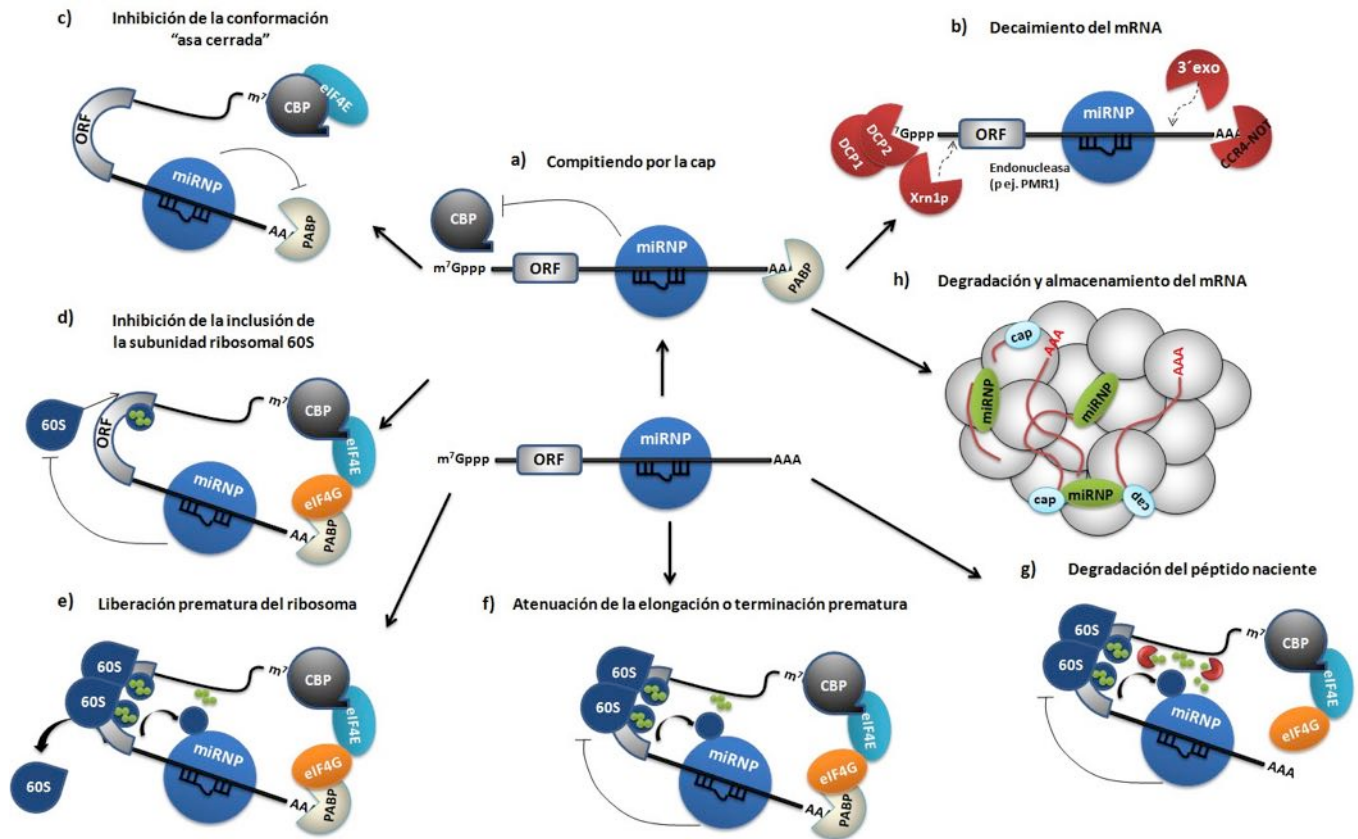


Figura 5. Los miRNAs inhiben la traducción por innumerables mecanismos. La inhibición de la expresión génica, por miRNAs, está dada por la inhibición de la traducción y/o la desestabilización de los mRNAs blanco.

b) Inducción

Como se mencionó anteriormente, la función mejor estudiada y quizás más utilizada por los miRNAs es la inhibición de la traducción; sin embargo, ciertos estudios indican que éstos también inducen la expresión de sus mRNAs blanco. En contraste a la idea que se tenía, de que los miRNAs regulan únicamente a la baja la expresión de sus mRNAs blanco –por una disminución en la estabilidad y/o en la traducción de los blancos–, Vasudevan y Steitz (43) reportaron por primera vez que la inhibición de la traducción, por los miRNAs, es reversible. Asimismo, también hay evidencia que indica que ciertos miRNAs podrían potenciar la expresión de genes en tipos celulares específicos y en condiciones celulares particulares (44).

Relacionado con esto, se sabe que en la inducción de la expresión génica, por miRNAs, están involucrados complejos proteicos conocidos como "miRNPS" (por sus siglas en inglés microRNA ribonucleoprotein complex), los cuales actúan en trans para promover la expresión de sus mRNAs blanco; este mecanismo es similar al descrito durante la inhibición de la

expresión génica. Si bien no se conoce del todo el mecanismo que rige la potenciación de la expresión, diversas líneas de evidencia sugieren que los miRNPs potencian de forma directa la expresión y/o indirecta al revertir la represión génica mediada por el complejo miRNA • miRNPs (43). De esta manera, un solo miRNA podría dirigir tanto la inducción como la represión génica, lo cual depende de la expresión de ciertos factores proteicos –que conforman lo miRNPs– en condiciones celulares específicas. Efectivamente, se sabe que el miR-145v media la sobre-expresión del gen MYOCD (miocardina) durante la diferenciación del músculo, pero inhibe la expresión de ROCK1 (Proteína Cinasa 1 Asociada a Rho) en el osteosarcoma (45-46). Similarmente, la expresión de KLF4 (Factor 4 (Gut) Similar a Kruppel) es potenciada por el miR-206 –en células en confluencia– y es inhibida por el miR-344 en células en proliferación (47) (Fig. 6). En *D. melanogaster*, se sabe que tanto AGO 1 como AGO2 son capaces de regular la inhibición de la expresión; sin embargo, sólo AGO2 induce la activación de genes cuyos mRNAs carecen de cola de poli(A) (48-49). AGO2, de manera conjunta con el RISC, se une al factor

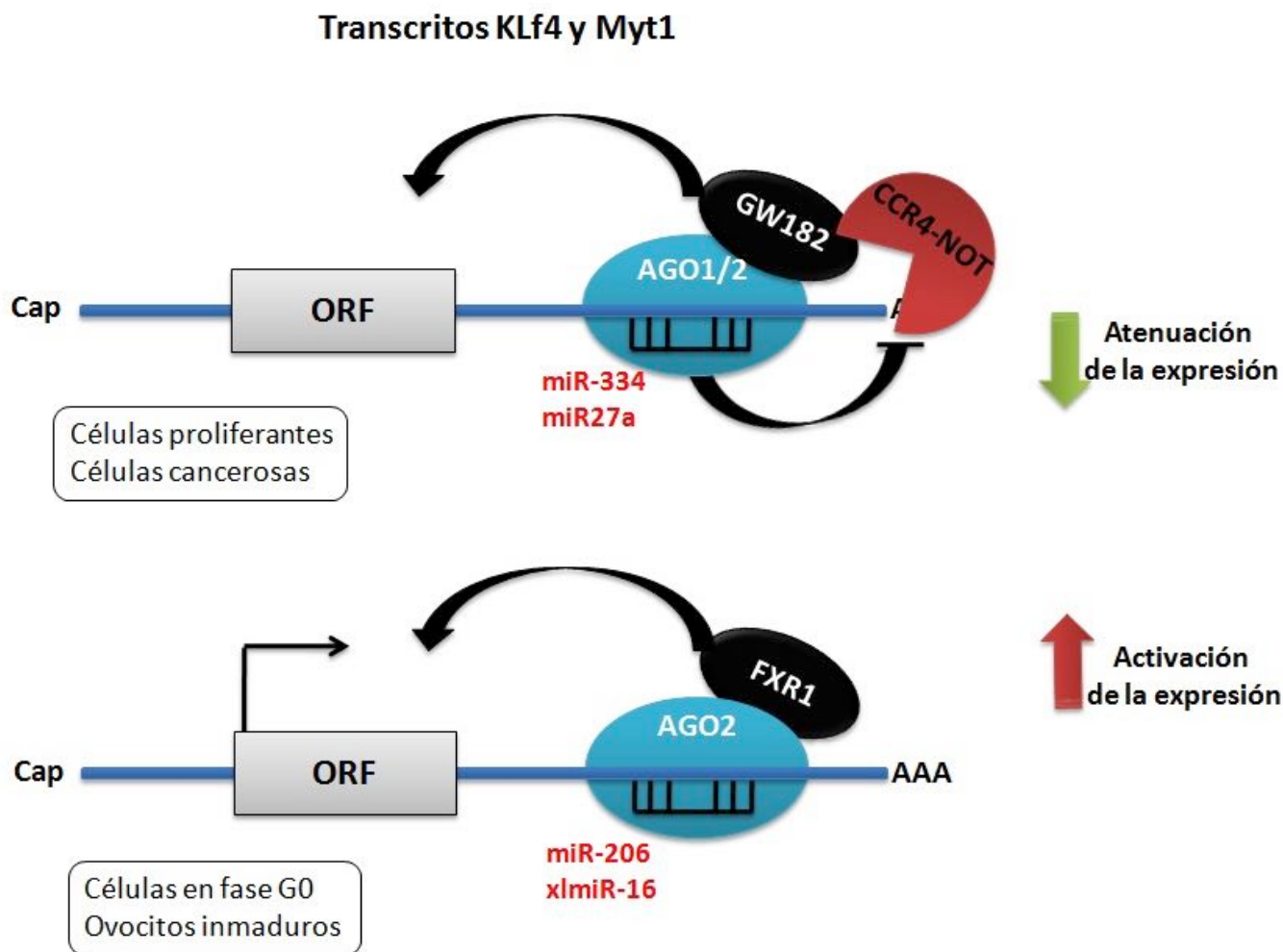


Figura 6. Inhibición y potenciación de la expresión génica mediada por miRNAs. Ciertos miRNAs son capaces de atenuar y activar la expresión génica dependiendo del contexto celular. (Tomado y modificado de la referencia 74).

de inicio de la traducción eIF4E (Factor 4E de Inicio de la Traducción en Eucariontes) e induce una conformación del mRNA de asa cerrada, lo cual induce la activación de la traducción de forma directa (32). Con base en estos resultados, podemos concluir que la inducción de la expresión génica, por miRNAs, depende del tipo celular, así como de las condiciones celulares que rigen su funcionamiento y de los factores proteicos expresados en un momento determinado.

Mecanismos de acción

La identificación de nuevas formas de regulación de la expresión génica por miRNAs hace aun más complejo el estudio y entendimiento biológico de estos RNAs pequeños no codificantes. Como se mencionó antes, diversos estudios indican que la inducción de la expresión de genes, mediada por miRNAs,

es selectiva y depende de la expresión de miRNAs específicos y de componentes como los miRNPs, así como de otras proteínas de unión a RNA (43-50).

Participación del ciclo celular

La inducción de la expresión génica por los miRNPs, depende de los niveles de expresión de distintos factores proteicos que son regulados por las condiciones celulares que rigen la función de la célula en un momento dado. Se sabe que el ciclo celular tiene el potencial de determinar la regulación de la expresión génica, por miRNAs, al promover o inhibir la expresión de mRNAs específicos. Por ejemplo, los niveles proteicos de GW182/TNRC6A (Trinucleotide Repeat Containing 6A) –proteína esencial para la regulación de la inhibición de la traducción- disminuyen en la fase G0 del ciclo celular y en ovocitos maduros, lo cual induce la liberación de Ago y pro-

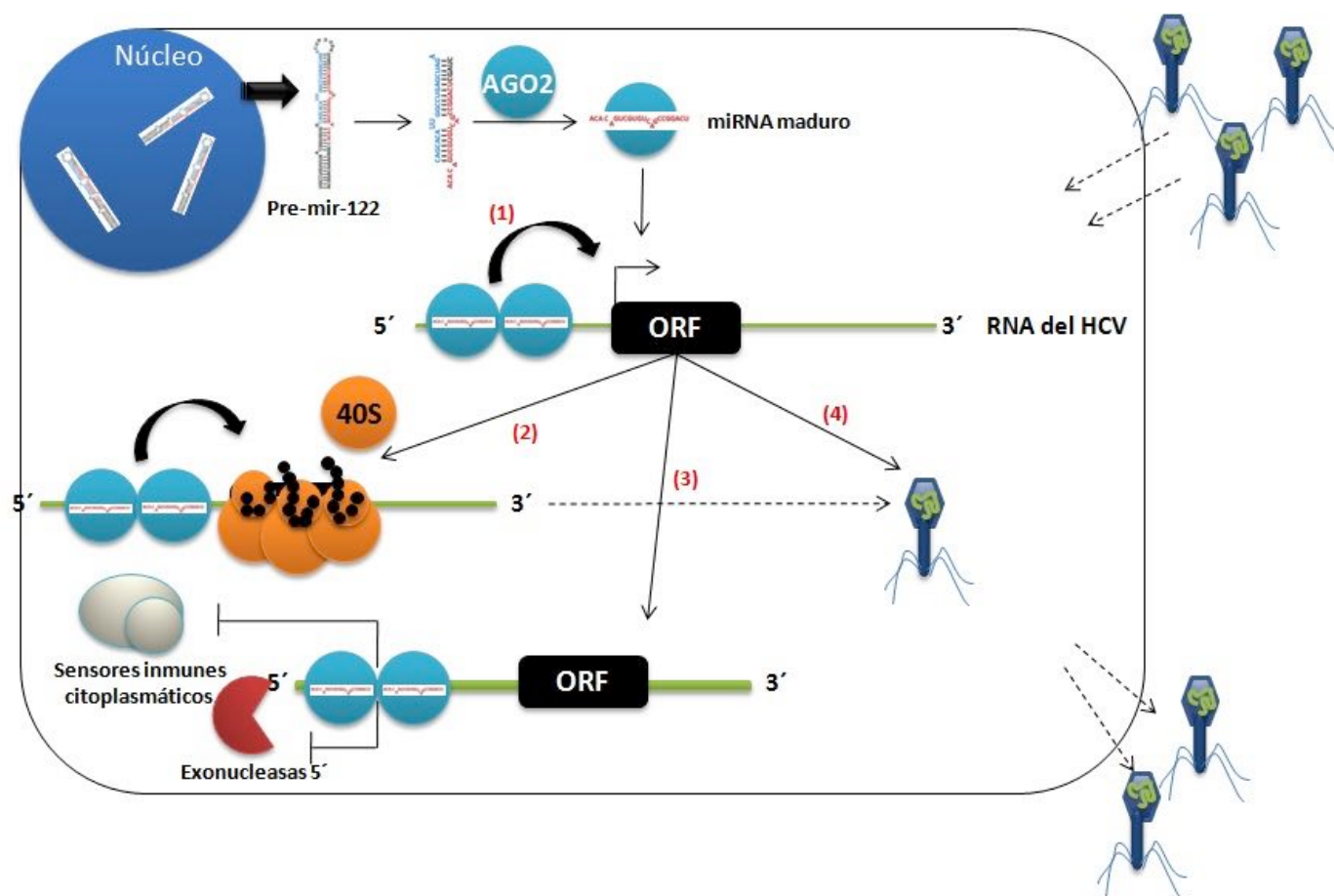


Figura 7. Activación de la expresión del virus de la hepatitis C (HCV) por el miR-122. (1) El miR-122 provee de un andamiazo para la unión de factores esenciales tales como la RNA polimerasa para la replicación del RNA. (2) Asimismo, los complejos miRNPs incrementan la asociación de la subunidad 40S ribosomal y esto resulta en un incremento en la traducción y en los niveles de proteína. (3) También, los miRNPs forman un complejo inusual en la región 5' terminal del RNA del HCV, el cual incrementa la estabilidad del RNA al proteger a esta región de la acción de exonucleasas 5' y de sensores del sistema inmune. (4) La unión del miR-122 incrementa la propagación y el ciclo de vida del virus por mecanismos desconocidos. (Tomado y modificado de la referencia 74).

mueve su interacción con la proteína FXR1 (Proteína 1 de X frágil) en el complejo miRNP. Esto resulta en la inducción de la expresión génica (Fig. 6) (51). Por lo tanto, la regulación a la baja de los niveles de expresión de GW182/TNRC6A desbloquea la inhibición de la expresión, mientras que la asociación de FXR1 con AGO2 la potencia (52-53). Similarmente, la función canónica de las proteínas Argonauta, asociada con la hidrólisis del mRNA blanco, está ausente en ovocitos maduros y células en fase G0 (54-55), por lo que su función, en estas condiciones celulares, más bien se asocia con la potenciación de la traducción (56-58).

Región 5' UTR del mRNA blanco

El miR-122, el cual se expresa sólo en el hígado, incrementa los niveles del RNA del virus de la hepa-

titis C (HVC) al interaccionar con dos sitios de unión en la región 5' UTR. Con el objetivo de conocer si la localización del sitio de unión del miRNA tiene un efecto sobre los niveles del mRNA, los autores cambiaron el sitio de unión del miR-122 a la región 3' UTR del mRNA y demostraron que la unión del miRNA ahora inhibe la traducción del RNA del HCV (59). Estos resultados indican que la potenciación de la expresión génica depende del sitio de unión del miRNA a su RNA blanco (59-60); no obstante, el mecanismo de acción del miR-122 no se conoce del todo (61). Sólo se sabe que interacciones de la región semilla y de otras regiones de este miRNA son necesarias para incrementar los niveles del RNA viral (62).

Debido a que el genoma del HCV no tiene CAP en su extremo 5' terminal y por lo tanto, carece de proteínas de unión específicas para esta región,

éste requiere de mecanismos alternativos para mantener su estabilidad –evasión de su degradación por exonucleasas- y para reclutar componentes de inicio de la traducción (28). De acuerdo a esto, se propone que el miR-122 protege a este RNA de la degradación por la exonucleasa Xrn1 e incrementa la estabilidad del RNA y acelera su unión al ribosoma; en conjunto, todo esto incrementa la expresión del gen del HCV (63-64). Componentes moleculares como el RISC, que es presentado al genoma del HCV por los miRNPs, podrían proteger las regiones 5' terminales -de RNAs de cadena sencilla- de la acción de las exonucleasas citosólicas (64). La figura 7 muestra los mecanismos por los que el miR-122 induce la expresión del gen HCV (65).

ii) Metilación del DNA por microRNAs

En plantas, la clase más abundante de RNAs pequeños (RNAsp) corresponde a RNAs de interferencia (siRNAs) heterocromáticos, los cuales se transcriben a partir de transposones y de repetidos de DNA. De manera importante, estos siRNAs dirigen la metilación del DNA –en la base citosina- en los *loci* a partir de los cuales fueron producidos; este proceso se denomina metilación del DNA dirigido por RNA (MDdR). La MDdR generalmente resulta en el silenciamiento transcripcional de transposones y ciertos genes que son adyacentes a los repetidos de DNA que originan a estos siRNAs (66-68). Similarmente, en diferentes especies de plantas se sabe que un subtipo de miRNAs –de 24nt- dirige la metilación del DNA (69).

Además de los miRNAs convencionales (~21 nt), en el arroz (*Oryza sativa*) se han identificado docenas de *loci* a partir de los cuales se transcriben miRNAs de 24 nt conocidos como miRNAs largos (miRNAsl). Al igual que los siRNAs mencionados anteriormente, este tipo de miRNAs dirige la metilación y represión de los *loci* que los originan regulación en *cis*, así como de genes blanco localizados en otras regiones genómicas regulación en *trans* (69). Con estos datos se revela que los miRNAs regulan la expresión de genes al modificar la estructura de la cromatina regulación transcripcional en plantas; si esto ocurre en animales tiene que ser demostrado.

iii) Los miRNAs miR-21 y miR-29a son ligandos de los receptores TLR7 y TLR8

Diferentes líneas de evidencia indican que las células son capaces de adaptarse a su microambiente por medio de la secreción de vesículas denominadas exosomas. Los exosomas son vesículas de 50-120 nm de diámetro que contienen proteínas, moléculas presentadoras de antígenos, mRNAs, RNAs no codi-

ficantes y DNA (70-72). Al transportar proteínas y RNAs los exosomas modulan la función de las células receptoras y órganos a distancia. Aun cuando no se conoce bien cómo los exosomas participan en la comunicación célula-célula, varios estudios indican que las interacciones ligando-receptor tienen una función importante en este proceso (73).

A la fecha, existe evidencia suficiente que indica que los miRNAs son liberados hacia el espacio extracelular en exosomas; sin embargo, los mecanismos que rigen la elección de cuáles miRNAs se endocitan en los exosomas, el reconocimiento de los exosomas por la célula receptora y la función de estos miRNAs en su nuevo nicho celular están pobremente descritos. De manera general, se sabe que los miRNAs exógenos regulan la expresión de la célula receptora por la vía canónica que involucra la unión a su mRNA blanco; sin embargo, Fabbri y cols. (9) demostraron que los miRs 21 y 29a funcionan por un mecanismo distinto. Estudios de inmunoprecipitación demostraron la interacción de estos miRNAs con los receptores TLR7 y TLR8 en células del sistema inmune. Interesantemente, la unión de los miRs 21 y 29a a estos receptores disparó la respuesta inflamatoria prometastática, lo cual tuvo como resultado la inducción del crecimiento tumoral y de la metástasis. De esta manera, es el primer indicio de que los miRNAs funcionan como agonistas paracrinos de los TLRs para regular el microambiente tumoral (Fig. 8).

COMENTARIOS FINALES

El estudio de los miRNAs ha permitido identificar diversos mecanismos por los que la célula controla la expresión génica en condiciones específicas. Evidencia inicial indicaba que la biogénesis y los modos de acción de los miRNAs eran muy conservados y poco flexibles; sin embargo, ahora se conocen al menos cuatro vías biogénicas y múltiples modos de acción de estos pRNAs. Por lo que, la regulación de la expresión génica- por miRNAs- parece ser sumamente compleja y resalta el cuidado que debemos de tener en la interpretación de los resultados obtenidos durante su estudio. Como si no fuera suficiente, los miRNAs también forman parte de la comunicación paracrina al ser secretados, en exosomas, hacia el espacio extracelular. El mecanismo por el que estos miRNAs circulantes ejercen su efecto involucra el reconocimiento del mRNA blanco y su interacción directa con los receptores TLR 7 y TLR8.

CONCLUSIONES

Los miRNAs son reguladores de la expresión génica altamente complejos en cuanto a los mecanismos

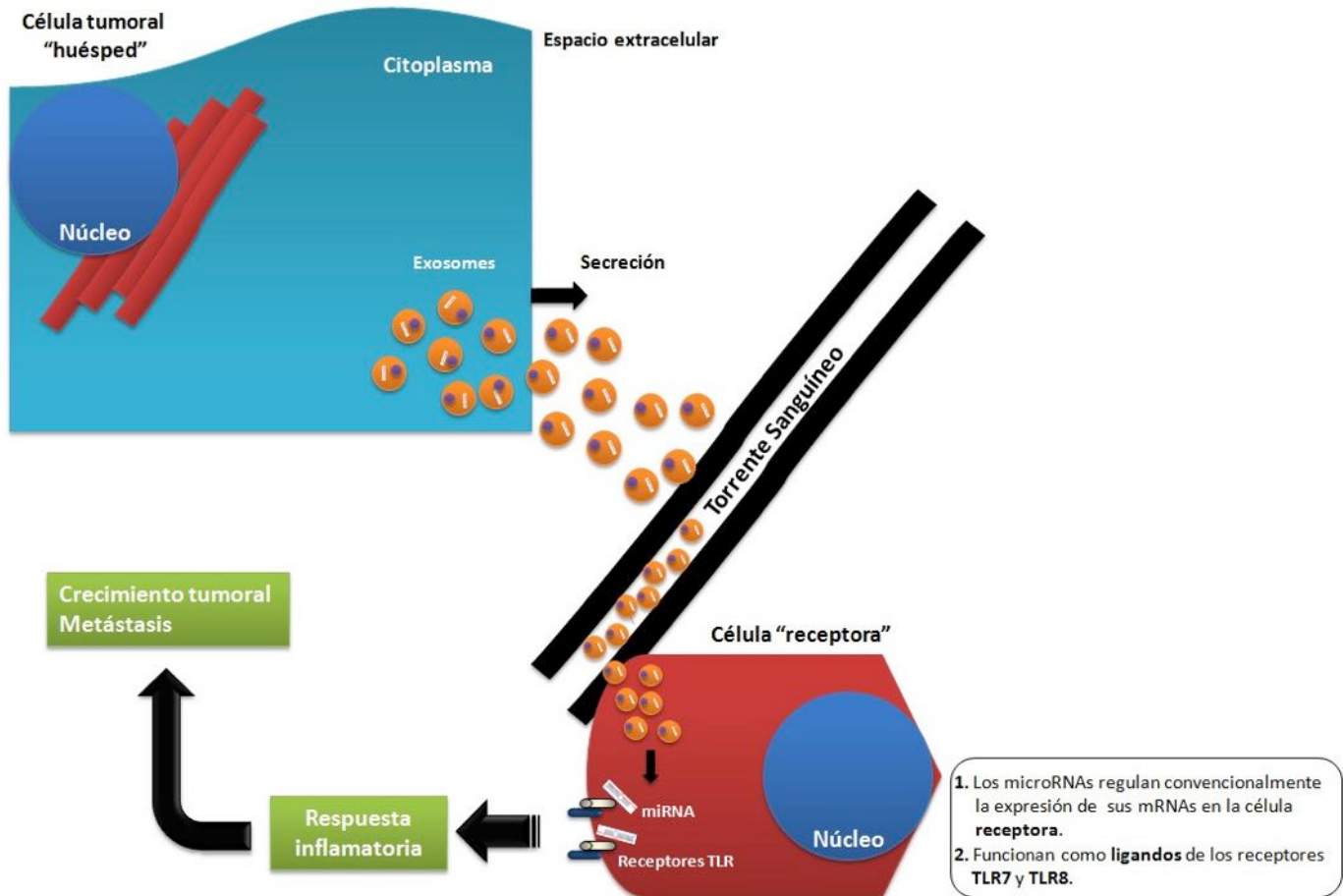


Figura 8. Los microRNAs funcionan como ligandos de los receptores TLR7 y TLR8. Fabbri y cols. demostraron que los miRNAs circulantes miR-21 y miR-29a inducen la respuesta inflamatoria de manera dependiente de la activación de los receptores TLR7 (en el ratón) y TLR8 (en el humano). Esto tiene como resultado la inducción del crecimiento tumoral y de la metástasis.

de biosíntesis y de acción que los rigen. Estos pRNAs pueden atenuar e inducir la expresión génica a diferentes niveles de regulación y su secreción permite la adaptación del sistema a condiciones específicas, y sugiere innumerables mecanismos de acción en la célula receptora.

GLOSARIO

RNAs pequeños no codificantes. RNAs con un tamaño menor que 200 pares de bases (pb).

RNAs largos no codificantes. RNAs con un tamaño mayor que 200 pb.

Transposón. Secuencia de DNA que puede moverse a diferentes partes del genoma.

Pseudogenes. Genes que han perdido su función. Algunos de ellos codifican para proteínas truncas o no funcionales.

Secuencia Alu. Elementos móviles más abundantes del genoma humano. Están altamente conservados en los primates.

Ribonucleasa de tipo III. Enzima que cataliza la hidrólisis de RNA de doble cadena.

Drosha. Ribonucleasa de tipo III.

Dicer. Ribonucleasa de tipo III.

Endonucleasa. Enzima que cataliza la ruptura de enlaces fosfodiéster dentro de una cadena polinucleotídica.

Exonucleasa. Enzima que cataliza la ruptura de enlaces fosfodiéster en los extremos 5' ó 3' de una cadena polinucleotídica.

Exportinas. Grupo de proteínas involucradas en el transporte de RNA y/o proteínas del núcleo hacia el citoplasma; es un proceso dependiente de energía.

Argonauta. Familia de proteínas que tienen una función central en el silenciamiento del ácido ribonucleico (RNA); son componentes esenciales del sitio catalítico del Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC).

RISC. Complejo ribonucleoproteico formado por proteínas (Argonauta) y RNA que participa en el silenciamiento de genes.

Splicing o empalme alternativo. Edición del pre-mRNA naciente. Este proceso involucra la eliminación de los intrones y la unión de los exones.

Esplíceosoma. Complejo molecular constituido por RNAs pequeños nucleares (snRNAs) y proteínas que está encargado del "splicing".

Cola de poli-A. Cadena de adeninas (100-250 residuos) presentes en el extremo 3' de los mRNAs; su presencia impide la degradación del mRNA.

Cap. Unión del 7-metilguanilato a la región 5' terminal de los mRNAs. Es importante para la maduración y estabilidad del mRNA durante la traducción.

Exosomas. Vesículas secretadas por la célula hacia el espacio extracelular; su diámetro es de ~50-120 nm.

Agonista. Molécula que se une y activa a un receptor para producir la respuesta una respuesta biológica.

Antagonista. Molécula que bloquea la acción del agonista.



REFERENCIAS

- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratt E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glades A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Hall LL, Lawrence JB (2016) RNA as a fundamental component of interphase chromosomes: could repeats prove key? *Curr Opin Genet Dev* 37: 137-147.
- de Andres-Pablo A, Morillon A, Wery M (2016) LncRNAs, lost in translation or licence to regulate? *Curr Genet* [Epub ahead of print]
- Zou Y, Liu W, Zhang J, Xiang D (2016) miR-153 regulates apoptosis and autophagy of cardiomyocytes by targeting Mcl-1. *Mol Med Rep* doi: 10.3892/mmr.2016.5309. [Epub ahead of print]

6. Zaho L, Kunst L (2016) SUPERKILLER complex components are required for the RNA exosome-mediated control of cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant Physiol* pii: pp.00450.2016. [Epub ahead of print]
7. Wen J, Ladewig E, Shenker S, Mohammed J, Lai EC (2015) Analysis of Nearly One Thousand Mammalian Mirtrons Reveals Novel Features of Dicer Substrates. *PLoS Comput Biol* 11: e1004441.
8. Havens MA, Reich AA, Duelli DM, Hastings ML (2012) Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res* 40: 4626-4640.
9. Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, Lovat F, Fadda P, Mao C, Nuovo GJ, Zanesi N, Crawford M, Ozer GH, Wernicke D, Alder H, Caligiuri MA, Nana-Sinkam P, Perrotti D, Croce CM (2012) MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E2110-6.
10. Mah SM, Buske C, Humphries RK, Kuchenbauer F (2010) miRNA*: a passenger stranded in RNA-induced silencing complex? *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 20: 141-8.
11. Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, Jarzab B, de la Chapelle A (2009) Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1502-1505.
12. Lewis BP, Burge BC, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15-20.
13. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10: 1957-1966.
14. Smalheiser NR, Torvik VI (2005) Mammalian microRNAs derived from genomic repeats. *Trends Genet* 21: 322-326.
15. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 13: 1097-1101.
16. Chung Wj, Agius P, Westholm JO, Chen M, Okamura K, Robine N, Leslie CS, Lai EC (2011) Computational and experimental identification of mirtrons in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res* 21: 286-300.
17. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J (2009) A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, proteomics & Bioinformatics* 7: 147-154.
18. Steitz A, Vasudevan S (2009) miRNPs: versatile regulators of gene expression in vertebrate cells. *Biochem Society Transactions* 37: 931-935.
19. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15-20.
20. Lee I, Ajay SS, Book KL, Kim HS, Hong SH, Kim NH, Dhanasekaran SM, Chinnaiyan AM, Athey BD (2009) New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res* 19: 1175-1183.
21. Brummer A, Hausser J (2014) MicroRNA binding sites in the coding region of mRNA: extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation. *BioEssays* 36: 617-626.
22. Brodersen P, Voinnet O (2009) Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 141-148.
23. Majoros WH, Ohler U (2007) Spatial preferences of microRNA targets in 3' untranslated regions. *BMC Genomics* 8: article 152.
24. Ohler U, Yekta S, Lim LP, Bartel DP, Burge CB (2004) Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. *RNA* 10: 1309-1322.
25. Grewal SIS, Elgin SCR (2007) Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447: 399-406.
26. Finnegan EJ, Matzke MA (2003) The small world. *Journal of Cell Science* 116: 4689-4693.
27. Fabian ME, Sonenberg N, Filipowicz (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry* 79: 351-379.
28. Garneau NL, Wilus CJ (2007) The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 113-126.
29. Valencia-Sánchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes and Development* 20: 515-524.
30. Bagga S, Bracht J, Hunter J, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE (2005) Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122: 553-563.
31. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai et al. RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317: 1764-1767.

32. Iwasaki S, Tomari Y (2009) Argonaute-mediated translational repression (and activation). *Fly* 3: 204-206.
33. Wang B, Yane, A Novina CD (2008) MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5343-5348.
34. Lytle JR, Yario TA, Steits JA (2007) Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 9667-9672.
35. Eulalio A, Huntinger E, Izaurralde E (2008) Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132: 9-14.
36. Ding XC, Grosshans H (2009) Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J* 28: 213-222.
37. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447: 823-828.
38. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317: 1764-1767.
39. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W (2007) Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 17: 118-126.
40. Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Luhrmann R (2005) A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA* 11: 717-727.
41. Sen GL, Blau HM (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7: 633-636.
42. Eystathiou T, Jakymiw A, Chan EK, Séraphin B, Cougot N, Fritzler MJ (2003) The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA* 9: 1171-1173.
43. Vasudevan S and Steitz JA (2007) "AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2". *Cell* 128: 1105-1118.
44. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R (2008) MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 1608-1613.
45. Li E, Zahng J, Yuan T, Ma B (2014) miR-145 inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion by targeting ROCK1. *Tumour Biol* 35: 7645-7650.
46. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee TH, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D (2009) miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 460: 705-710.
47. Lin CC, Liu LZ, Addison JB, Wonderlin WF, Ivanov AV, Ruppert JM (2011) A KLF4-miRNA-206 autoregulatory feedback loop can promote or inhibit protein translation depending upon cell context. *Mol Cell Biol* 31: 2513-2527.
48. Turchinovich A, Burwinkel B (2012) Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol* 9: 1066-1075.
49. Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W (2004) Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* 10: 1518-1525.
50. Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R. (2006) Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17337-17342.
51. Yang Z, Jakymiw A, Wood MR, Eystathiou T, Rubin RL, Fritzler MJ, Chan EK (2004) GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J Cell Sci* 117: 5567-5578.
52. Bhattacharyya SN, Filipowicz W (2007) Argonautes and company: sailing against the wind. *Cell* 128: 1027-1028.
53. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318: 1931-1934.
54. Truesdell SS, Mortensen RD, Seo M, Schroeder JC, Lee JH, LeTonqueze O, Vasudevan S (2012) MicroRNA-mediated mRNA translation activation in quiescent cells and oocytes involves recruitment of a nuclear microRNP. *Sci Rep* 2: 842.
55. Lund E, Sheets MD, Imboeden SB, Dahlberg JE (2011) Limiting Ago protein restricts RNAi and microRNA biogenesis during early development in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 25: 1121-1131.
56. Mortensen RD, Serra M, Steitz JA, Vasudevan S (2011) Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes

- by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 8281-8286.
57. Kim HH, Kuwano Y, Srikantan S, Lee EK, Martindale JL, Gorospe M. (2009) HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev* 23: 1743-1748.
 58. Mertens-Talcott SU, Chintharlapalli S, Li X, Safe S (2007) The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 67: 11001-11011.
 59. Jopling CL, Schütz S, Sarnow (2008) Position-dependent function of a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host and Microbe* 4: 77-85.
 60. Niepmann M (2009) Activation of hepatitis C virus translation by a liver-specific microRNA. *Cell Cycle* 8: 1473-1477.
 61. Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO Journal* 27: 3300-3310.
 62. Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM (2011) Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *PNAS* 108: 3193-3198.
 63. Li Y, Masaki T, Yamane D, McGivern DR, Lemon M (2013) Competing and non-competing activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication. *PNAS* 110: 1881-1886.
 64. Shimakami T, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM (2012) Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 941-946.
 65. Tsai NP, Lin YL, Wei LN (2009) MicroRNA mir-346 targets the 5' untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem J* 424: 411-418.
 66. Chan SW, Henderson IR, Jacobsen SE (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet* 6: 351-360.
 67. Matzke M, Kanno T, Salinger L, Huettel B, Matzke AJ (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol* 21: 367-376.
 68. Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76: 567-576.
 69. Wu L, Zhou H, Zhang Q, Zhang J, Ni F, Liu C, Qi Y (2010) DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol Cell* 38: 465-475.
 70. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J (2011) Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2: 180.
 71. Al-Nedawi Km Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 10: 619-624.
 72. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol* 9: 654-659.
 73. Yamaguchi T, Izumi Y, Nakamura Y, Yamazaki T, Shiota M, Sano S, Tanaka M, Osada-Oka M, Shimada K, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H (2015) Repeated remote ischemic conditioning attenuates left ventricular remodeling via exosome-mediated intercellular communication on chronic heart failure after myocardial infarction. *Int J Cardiol* 178: 239-246.
 74. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M (2014) Mechanisms of miRNA Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics* 2014: 970607.