

Derleme/ Review

miRNA'lar: Biyogenezi, Analiz Yöntemleri ve Biyobelirteç Potansiyeli

miRNAs: Biogenesis, Analysis Methods and Biomarker Potential

İrem Gülfem ALBAYRAK¹*

¹ Üsküdar Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, TÜRKİYE.

* Sorumlu yazar: İrem Gülfem ALBAYRAK; E-mail: iremgulfem.albayrak@uskudar.edu.tr

ÖZET

miRNA'lar transkripsiyon sonrası gen anlatımının düzenlenmesinde görev alan, yaklaşık 22 nükleotit uzunluğundaki kodlama yapmayan küçük RNA molekülleridir. Hedef mRNA'ya bağlanan miRNA'lar, transkripsiyonun baskılanmasına veya mRNA'nın degradasyonuna neden olurlar. Hücre çoğalması, farklılaşması ve sağ kalımında rol oynayan miRNA'ların çeşitli hastalıklar ile ilişkili mekanizmalarda da görev aldıkları bilinmektedir. Hastalıklarla ilgili miRNA'ların belirlenmesinin çeşitli hastalıkların moleküler mekanizmasını anlama ve tedavi etmede daha güvenilir moleküler hedefler olabileceği düşünülmektedir. Bu derlemede, miRNA'ların biyogenezi, izolasyon yöntemleri ve hedef mRNA'ların belirlenmesi için kullanılan tekniklerle, miRNA'ların çeşitli hastalıklardaki rollerine değinilmiştir.

Anahtar Kelimeler: miRNA, Gen Anlatımı, Biyobelirteç.

ABSTRACT

miRNAs are small non-coding RNA molecules, approximately 22 nucleotides in length, that are involved in the regulation of post-translational gene expression. miRNAs bind to target mRNA, causing translation suppression or degradation of mRNA. It is known that miRNAs, which play a role in cell proliferation, differentiation and survival, are also involved in mechanisms associated with various diseases. It is thought that the identification of disease-associated miRNAs may provide more reliable molecular targets for understanding and treating the molecular mechanism of various diseases. In this review study, biogenesis of miRNAs, isolation methods, techniques used to identify target mRNAs and the role of miRNAs in various diseases are mentioned.

Keywords: miRNA, Gene Expression, Biomarker.

GİRİŞ

miRNA'lar; yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda, kodlama yapmayan küçük RNA molekülleri olup, gen ifadesinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenlenmesinde görev alırlar (Chen ve ark., 2014). miRNA'lar hedef mesajcı RNA'lara (mRNA) bağlanarak mRNA transkripsiyonunu baskılar veya mRNA'ları degrade eder. Bu mekanizma ile hücre farklılaşması, çoğalması ve sağ kalımında rol oynamaktadırlar (Bartel, 2004).

miRNA'lar ilk kez 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiştir (Lee, 1993). Bundan yaklaşık 7 yıl sonra ilk memeli miRNA'sı (let-7) bulunmuştur (Reinhart, 2000). Bu iki önemli araştırma, birçok miRNA'nın ve diğer kodlanmayan RNA'ların transkripsiyonunu ortaya çıkaran bir dizi genomik araştırmaya öncülük etmiştir (Lee, 1993; Pasquinelli,

2000; Reinhart, 2000; Bartel, 2004; Esteller, 2011). İnsan genomunda ise yaklaşık 2000 miRNA geni yer almaktadır (Chen ve ark., 2014).

miRNA'lar gelişimsel zamanlama, embriyogenez, hücre farklılaşması, organogenez, metabolizma ve apoptozis gibi biyolojik süreçlerle birlikte, kanser dahil birçok hastalıkta önemli rol oynamaktadır (Pfeffer ve ark., 2004). Düzensiz miRNA ekspresyonunun birçok hastalık patogenezinde yer aldığı bildirilmektedir (O'Connell ve ark., 2010). miRNA'ların anlatım bozuklukları veya eksiklikleri çeşitli patofizyolojik bozukluklarla ilişkilidir (Chen ve ark., 2004; Zhao ve ark., 2006). miRNA'ların, hücre proliferasyonu, farklılaşma, apoptoz ve tümör oluşumu gibi çeşitli biyolojik süreçlerle ilişkili olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır

(Ambros, 2004). miRNA'ların işlevlerinin belirlenmesi çeşitli hastalıkların, hücrel ve gelişimsel biyolojinin moleküler süreçlerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (Coussens, 2002; Bartel, 2004; Roush ve Slack, 2008; Esteller, 2011; Iorio, 2012; Tili, 2013; Gurha, 2016; Rupaimoole, 2016). Bu açıdan bakıldığında, miRNA aracılı gen anlatımı düzenlenmesi önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir (Filipowicz ve ark., 2008).

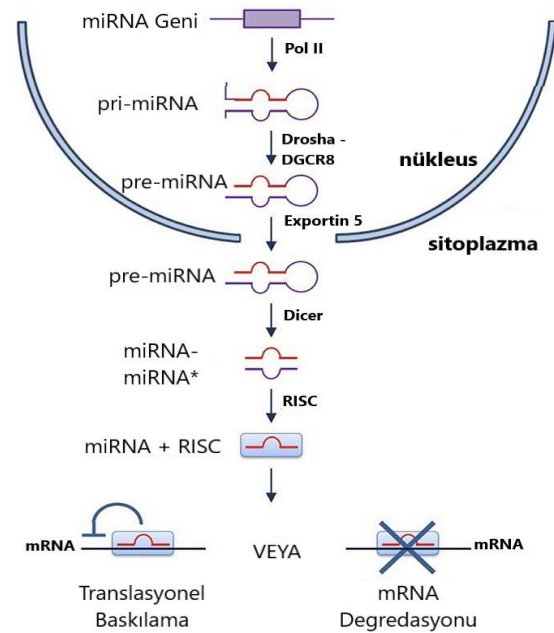
miRNA Biyogenezi

miRNA biyogenezi (Şekil 1.), iki aşamada gerçekleşen karmaşık bir süreç olup, çekirdekte RNA polimeraz II tarafından gerçekleştirilen transkripsiyon ile başlamaktadır. İlk aşamada pri-miRNA adı verilen, saç tokası yapısında ve olgun miRNA dizisini içeren uzun bir RNA oluşmaktadır (Winter ve ark., 2009). Saç tokası yapısı, Drosha (RNAaz III enzimi) ve kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8)'den (Pasha) oluşan mikroprosesör tarafından kesilir. Bu kesimin ardından, öncü miRNA (pre-miRNA) adı verilen 60-70 nükleotid uzunluğunda RNA molekülü oluşturulur. Oluşan bu pre-miRNA nükleustan sitoplazmaya Exportin-5 (XPO5) aracılığı ile taşınır (Yi ve ark., 2003). İkinci aşamada sitoplazmada bulunan pre-miRNA ribonükleaz enzimi olan Dicer tarafından 21-24 nükleotid uzunluğunda dubleks miRNA'ya kesilir. miRNA'nın olgun dizisini oluşturmak üzere kesilecek olan iplik, miRNA indüklenmiş susturma kompleksini oluşturan (RNA- induces silencing complex; RISC) argonat proteinine yüklenir (Filipowicz ve ark., 2008; O'Connell ve ark., 2010).

miRNA-mRNA bağlantısı, miRNA'ların sahip olduğu 6-8 nükleotit uzunluğundaki tohum dizisi aracılığı ile gerçekleşir ve miRNA'nın hedeflediği mRNA'nın 3' kodlanmayan bölgesine (UTR) bağlanması ile transkripsiyon sonrası düzenleme gerçekleştirilir. Bu spesifik baz eşleşmesinin ardından, miRNA RISC'i indükler ve mRNA'nın yıkımına ya da translasyonun baskılanmasına neden olur (Lewis ve ark., 2005; Filipowicz ve ark., 2008).

miRNA İzolasyonu

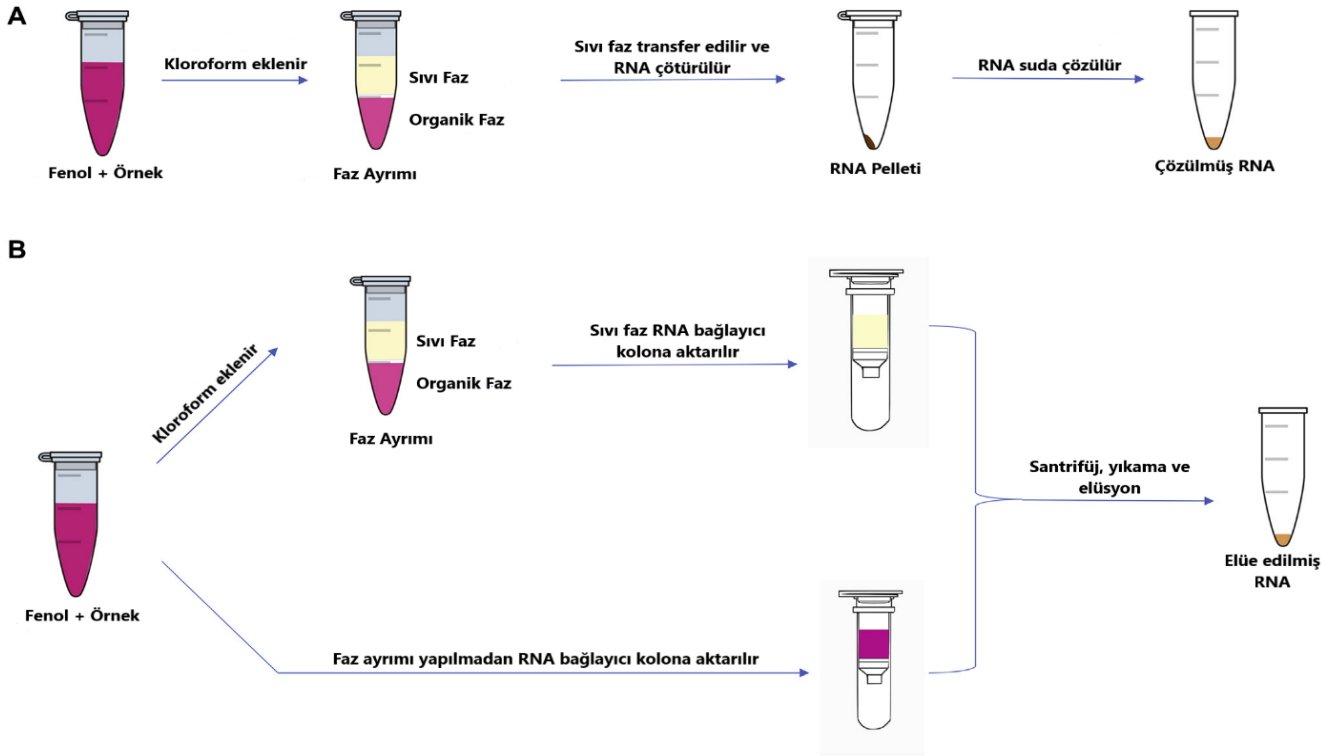
miRNA'lar hücre, doku; serum, plazma ve gözyaşı gibi vücut sıvılarından izole edilebilmektedir (Weber ve ark., 2010). miRNA'lar ile yapılan ilk çalışmalarda sıklıkla TRIzol (Thermo Fisher Scientific) ile fenol-kloroform ekstraksiyonu yöntemi kullanılmıştır. Ancak bu yöntemde kontaminasyon ihtimali yüksektir. Ek olarak, düşük guanin-sitozin içeriğine sahip miRNA'ların, az miktarda hücreden fenol-kloroform ekstraksiyonu sırasında seçici olarak kaybolduğu ve bunun, uzun nükleik asitlerle karşılaştırıldığında küçük nükleik asitlerin çöktülmesinin verimsizliğinden kaynaklandığı gösterilmiştir. miRNA izolasyonunda kolon temelli yöntemler kullanılması ile bu sorunlar engellenebilmektedir (Kim ve ark., 2012).



Şekil 1. miRNA Biyogenezi (Jafri ve ark., 2019)

İlk kolon temelli yöntem, fenol-kloroform ekstraksiyonundan sulu fazın bir RNA adsorpsiyon kolonuna yüklenmesini, ardından miRNA'nın yıkanmasını ve elüsyonunu içermektedir (Şekil 2.A). mirVana (Thermo Fisher Scientific) ve miRNEasy (Qiagen) kitleri bu yöntem için yaygın olarak kullanılan 2 kittir. Direct-zol kitleri (Zymo Research) gibi kitler, faz ayırma adımını atlamaktadır. miRNA içeren fenol reaktifi doğrudan bir RNA adsorpsiyon kolonuna yüklenebilir; ardından yıkama ve miRNA

elüsyonu yapılabilir (Şekil 2.B) (Lu ve Rothenberg, 2018).



Şekil 2. miRNA ekstraksiyon yöntemleri. A. Fenol-kloroform temelli faz ayırımının ardından RNA pelletinin eldesi ve RNA'nın nükleazsız suda çözülmesi. B. Fenol-kloroform uygulamasının ardından elde edilen sıvı faz RNA bağlayıcı bir kolona aktarılabilir. Yıkama aşamalarından sonra RNA nükleazsız su ile elüe edilir. Alternatif olarak, bazı miRNA ekstraksiyon kitleri faz ayırımı aşamasını atlamaktadır. Fenol ile homojenize edilmiş örnekler direkt olarak RNA bağlayıcı kolona yüklenerek ardından yıkama ve RNA elüsyonu aşamaları gerçekleştirilir. Üretici tarafından fenol bazlı reaktif yerine özel bir lizis tamponu da sağlanabilmektedir (Lu ve Rothenberg, 2018)

Kolon temelli yöntemlerde, RNA verimini ve kalitesini önemli ölçüde azaltacağından, kolonları fazla doldurmamaya dikkat edilmesi gerekmektedir. miRNA izolasyonu için tasarlanmış çoğu ticari kit, öncelikle miRNA'ları da içeren total RNA izolasyonu için bir protokole ve ardından elde edilen bu total RNA'dan küçük boyuttaki RNA'ların ayrılması için alternatif bir protokole sahiptir (Lu ve Rothenberg, 2018).

miRNA'ların vücut sıvılarından elde edilmesinde de bazı sorunlar yaşanmaktadır. Vücut sıvılarından elde edilen miRNA verimi hücre veya doku örneklerine göre çok daha düşüktür. Genellikle piyasada bulunan bazı kitlerin örnek başlangıç

hacmi sınırını aşacak kadar büyük miktarlarda vücut sıvısı örneğine ihtiyaç duyulmaktadır (Moldovan ve ark., 2014).

miRNA Anlatım Analizi ve Hedef Genlerin Belirlenmesi

miRNA anlatımı hem doku örneklerinden hem de serum ya da plazma gibi hücre içermeyen biyolojik sıvılardan tespit edilebilir. miRNA'ların tespiti için kantitatif PCR (qPCR), in situ hibridizasyon, mikroçip ve RNA dizileme metotları kullanılmaktadır (Lu ve Rothenberg, 2018).

miRNA'lar sadece 21-23 baz çifti uzunluğunda olduklarından; yaklaşık 20 baz çifti uzunluğunda

primerler gerektiren geleneksel PCR ile çoğaltılabilmeleri için primer tasarlanması teknik olarak oldukça zordur. Bu sebeple ters transkriptaz sırasında miRNA'ların boyunun uzatılması gerekmektedir. Bu işlem miRNA'ya özgü stem-loop primerler kullanılarak yapılabileceği gibi; miRNA'ya 3' poli-A kuyruğu eklenmesinin ardından ters transkripsiyon sırasında evrensel bir dizi ile etiketlenmiş poly-T primeri kullanılarak da yapılabilir. Daha sonra, her bir miRNA'ya özgü forward primer- prob ve evrensel diziyeye ait bir reverse primer kullanılarak qPCR uygulaması gerçekleştirilir (Eldh ve ark., 2012; Moldovan ve ark., 2014).

miRNA'lar 5' ucundaki 2-7 nükleotitlik tohum dizisi ile mRNA'nın 3' kodlanmayan bölgesini (UTR) hedefleyerek transkripsiyon sonrası gen anlatımının baskılanmasına aracılık etmektedirler (Vishnoi ve Rani, 2017). In silico tabanlı hedef tahmin yöntemleri miRNA'nın tohum dizisine tamamlayıcılık, evrimsel olarak korunma gibi çeşitli faktörleri kullanmaktadır. Targetscan.org (Lewis ve ark., 2005; Friedman ve ark., 2009; Shin ve ark., 2010; Agarwal ve ark., 2015) ve microRNA.org (Enright ve ark., 2003; John ve ark., 2004; Betel ve ark., 2008; Betel ve ark., 2010) gibi web tabanlı algoritmalar kullanılarak çok sayıda hedef tahmini oluşturulabilmektedir ancak bu algoritmalarla oluşturulan hedeflerin yanlış olma ihtimali de bulunmaktadır (Witkos ve ark., 2011). Yakın zamanda güncellenen miRTarBase (Chou ark., 2016) ve starBase (Li ve ark., 2014), miRNA'lar ile kodlama yapmayan uzun RNA'lar arasındaki bağlantılara ait verileri de içeren kapsamlı analizler yapmaya imkan vermektedir (Imig ve ark., 2015; Rupaimoole ve Slack, 2017). Bu veritabanlarını TargetScan gibi tahmin araçlarıyla birleştirmek, araştırmacıların miRNA'ların mRNA hedeflerini daha doğru bir şekilde tahmin etmelerine yardımcı olacak ve hastalıkla ilgili miRNA'ların ve mRNA'ların daha verimli bir şekilde tanımlanmasını sağlayacaktır (Rupaimoole ve Slack, 2017). Tablo 1.'de miRNA analizi için kullanılan biyoinformatik araçlardan bazıları gösterilmiştir.

In silico olarak tahmin edilmiş hedef genlerin doğrulukları, genlere ait 3' UTR bölgelerinin bir raportör vektörün 3' UTR bölgesine klonlanması ve ardından miRNA'nın hedeflenip raportör genin aktivitesinin ölçülmesi ile gösterilebilir. Başka bir yöntem olarak, bir miRNA antagonisti ile hücreye geçici olarak transfekte edilip hem doğrudan hem de dolaylı hedefleri belirlemek için tüm transkriptom analizi gerçekleştirilebilir (Di Martino ve ark., 2016; Hodzic ve ark., 2017).

miRNA'ların Biyobelirteç Olarak Kullanılma Potansiyeli

miRNA'ların keşfi ile birlikte çeşitli hastalıklardaki rolleri de araştırılmaya başlanmıştır. miRNA'ların anlatımındaki düzensizlikler hastalıkların seyrinde önemli rol oynadığından miRNA anlatım profillerinin belirlenmesi hastalıkların teşhisi için önemlidir (Vishnoi ve Rani, 2017).

miRNA'ların retinal gelişimde ve retinanın normal işleyişe sahip olmasında önemli rolleri olduğu gösterilmiştir ve yapılan çalışmalar nöral retinada farklı seviyelerde anlatım yapan miRNA'ların varlığını doğrulamıştır (Andreeva ve Cooper, 2014). miR-183/96/182 kümesinin retina nöronlarında koruyucu görevi vardır. Bu miRNA kümesinin etkisiz hale getirildiği transgenik farelerde fotoseptörlerdeki sinaptik defektlere bağlı olarak ışığa karşı aşırı duyarlılık gözlenmiştir (Lumayag ve ark., 2013).

Merkezi sinir sistemi hastalıklarının nedeni de miRNA'ların değişen anlatım profillerine bağlanabilmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin inme sonrası nörolojik iyileşmeye katkıda bulunduğu bilinmektedir. Serebral iskemiden sonra astrositlere ve nöronlara miR-133b'nin taşınmasında görev alan eksozomların keşfinden sonra, miR-133b'nin felçten sonra nörit büyümesini uyararak iyileşmeye katkı sağladığı teorisi ortaya atılmıştır (Xin ve ark., 2012).

miRNA'lar kardiyak dokunun gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Romaine ve ark., 2015). Çeşitli miRNA'lar ve özellikle miR-143, miyokardiyal hücre morfolojisini düzenlemektedir ve kalpteki

odacıkların işleyişi ve oluşumu için gereklidir. Vas-küler düz kas hücrelerinin farklılaşması da miR-143 ve miR-145 aracılığı ile düzenlenmektedir (Zhao ve ark., 2015). Son yıllarda miRNA anlatım profillerindeki düzensizliklerin çeşitli kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. miR 143/145 anlatımındaki azalmanın akut ve kronik vasküler strese neden olduğu rapor edilmiştir (Zhao ve ark., 2015).

miRNAlar meme kanseri için biyobelirteç olma potansiyeline sahiptir. Yapılan bir çalışmada 3 miRNA'nın anlatımının (miR-29a, miR-181a, ve miR-652), mamografi ile kombinasyon halinde doğru alt tipe özgü meme tümörünün teşhisini kolaylaştırma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2014). miR-10b'nin aşırı anlatımı, meme kanseri modellerinde invazyon ve metastazı başlattığı ve primer meme karsinomlarındaki anlatımı klinik ilerleme ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Gee ve ark., 2008). miR-486'nın akciğer kanserinde potansiyel bir tümör baskılayıcısı olduğu bildirilmiştir (Peng ve ark., 2013).

Sonuç

miRNA'lar transkripsiyon sonrası gen anlatımını düzenleyerek ve hücre farklılaşması, çoğalması ve hayatta kalmasında önemli bir rol oynamaktadırlar (Chen ve ark., 2014). İlk miRNA 1993 yılında *C. elegans*'ta keşfedilmiş ve kısa süre sonra hayvan, bitki ve bazı virüslerde de varlığı gösterilmiştir (Lee, 1993). miRNA'ların keşfi ile birlikte çeşitli hastalıklardaki rolleri de araştırılmaya başlanmıştır. miRNA anlatımı hem doku örneklerinden hem de serum ya da plazma gibi hücre içermeyen biyolojik sıvılardan tespit edilebilir (Lu ve Rothenberg, 2018). miRNA'ların anlatımındaki düzensizlikler hastalıkların seyrinde önemli rol oynadığından miRNA anlatım profillerinin belirlenmesi hastalıkların teşhisi için önemlidir (Vishnoi ve Rani, 2017).

miRNA terapötiklerini içeren önemli sayıda preklinik çalışma yapılmış olmasına karşın şimdiye kadar çok az sayıda miRNA terapötikleri klinik

geliştirmeye taşınmıştır. miRNA tabanlı terapötiklerin geliştirilmesinde en büyük zorluklardan biri her hastalık türü için en iyi miRNA adayını ve miRNA hedeflerini belirlemektir. Diğer bir zorluk da terapötik adaya daha yüksek stabilite kazandıran, dokuya özgü hedeflemeyi sağlayan ve potansiyel toksisiteleri ve hedef dışı etkileri önleyen miRNA dağıtım araçlarının tasarımıdır (Rupaimoole ve ark., 2011; Cheng ve Slack, 2012; Li ve Rana, 2014).

Hem hastalıkla ilgili proteinlerle hem de bunlarla bağlantılı miRNA'lar ile çalışmak, çeşitli hastalıkların moleküler mekanizmasını anlama ve tedavi etmede daha güvenilir moleküler hedefler sağlayabilecektir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Agarwal V, Bell G W, Nam JW, Bartel D P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, (4), e05005.
- Ambros V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, (431):350-355.
- Andreeva K, Cooper N G F. (2014). MicroRNAs in the neural retina. *International Journal of Genomics* 2014,165897.
- Bartel D P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, (116), 281-297.
- Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. (2010). Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biology* 11(8), 1-14.
- Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. (2008). The microRNA.org resource: Targets and expression. *Nucleic Acids Research* (12),149-153.
- Busk PK. (2014). A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. *BMC Bioinformatics* 15(1).

- Chen C Z, Li L, Lodish H F, Bartel DP. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 303(5654),83–86.
- Chen Y, Fu L L, Wen X, Liu B, Huang J, Wang J H, et al. (2014). Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy. *Apoptosis*, 19(8), 1177–1189.
- Cheng CJ, Slack FJ. (2012). The duality of oncomiR addiction in the maintenance and treatment of cancer. *Cancer Journal*, (18),232–237.
- Chou CH, Chang NW, Shrestha S, Hsu S D a, Lin YL, et al. (2016). miRTarBase 2016: Update to the Experimental-validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Research*, (44), 239–247.
- Coussens LM, Werb Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917),860–867.
- DiMartino MT, Amodio N, Tassone P, Tagliaferri P. (2016). Function analysis of microRNA in multiple myeloma. *Methods in Molecular Biology*, (1375),181–194.
- Eldh M, Lötvalld J, Malmhäll C, Ekström K. (2012). Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods. *Molecular Immunology*, 50(4),278–286.
- Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. (2003). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome biology* 5(1).
- Esteller M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 12, 861–874.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers insight? *Nature Reviews Genetics*, (9), 102–114.
- Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1),92–105.
- Gee HE, Camps C, Buffa FM, Colella S, Sheldon H, Gleadle JM et al. (2008). MicroRNA-10b and breast cancer metastasis. *Nature*, (455), 8–9.
- Gurha P. (2016). MicroRNAs in cardiovascular disease. *Current Opinion in Cardiology*, (31), 249–254.
- Hodzic J, Sie D, Vermeulen A, Van Beusechem VW. (2017). Functional screening identifies human miRNAs that modulate adenovirus propagation in prosta-tecancer cells. *Human Gene Therapy*, 28(9), 766–780.
- Huang TH, Fan B, Rothschild MF, Hu ZL, Li K, Zhao SH. (2007). MiR Finder: An improved approach and software implementation for genome-wide fast microRNA precursors. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 1–10.
- Imig J, Brunschweiler A, Brümmer A, Guennewig B, Mittal N, Kishore S et al. (2015). MiR-CLIP capture of a miRNA targetome uncovers a lincRNA H19-miR-106a interaction. *Nature Chemical Biology*, 11(2):107–114.
- Iorio M V. (2012). MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine*, 4,143–159.
- Jafri I, Alsharif G, Bland GN, Gambhir KK. (2019). Erythrocyte miRNA 144 and miRNA 451 as cell aging biomarkers in African American adults. *The Open Biochemistry Journal*, 13(1), 81–87.
- Jiang Q, Wang Y, Hao Y, Juan L, Teng M, Zhang X, et al. (2009). miR2 Disease: A manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Research* 37(Supp. 1).
- John B, Enright A J, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. (2004). Human microRNA targets. *PLoS Biology*, 2(11),e363.
- Kalvari I, Argasinska J, Quinones-Olvera N, Nawrocki EP, Rivas E, Eddy SR, et al. (2018). Rfam 13.0: Shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families. *Nucleic Acids Research*, 46, 335–342.
- Kim YK, Yeo J, Kim B, Ha M, Kim VN. (2012). Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from a small number of cells. *Molecular Cell*, 46,893–895.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. (2014). MiR Base: Annotating high confidence microRNA using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 42.

- 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.
- 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.
- Li JH, Liu S, Zhou H, Qu LH, Yang JH. (2014). StarBase v2.0: Decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Research*, 2.
- Li Z, Rana TM. (2014). Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13(8), 622–638.
- Lu TX, Rothenberg ME. (2018). MicroRNA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(4), 1202–1207.
- Lumayag S, Haldin CE, Corbett NJ, Wahlin KJ, Cowan C, Turturro S, et al. (2013). Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6), 507–516.
- Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsh CB, ve Piper M. (2014). Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(3), 371–390.
- O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10, 111–122.
- Pasquinelli A. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, 86–89.
- Peng Y, Dai Y, Hitchcock C, Yang X, Kassis E S, Liu L, et al. (2013). Insulin growth factor signaling is regulated by microRNA-486, an underexpressed microRNA in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(37), 15043–15048.
- Pfeffer S, Zavolan M, Grässer F A, Chien H, Russo J J, Ju J, et al. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 304(5671), 734–736.
- Rupaimoole R, Calin GA, Lopez-Berestein G, Sood AK. (2016). miRNA deregulation in cancer cells and the tumor micro environment. *Cancer Discovery*, 6(3), 235–246.
- Reinhart B. (2000). The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature*, 403, 901–906.
- Romaine SPR, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. (2015). MicroRNAs in cardiovascular disease: An introduction for clinicians. *Heart*, 101, 921–928.
- Roush S, Slack FJ. (2008). The *let-7* family of microRNAs. *Trends in Cell Biology*, 18, 505–516.
- Rupaimoole R, Han HD, Lopez-Berestein G, Sood AK. (2011). MicroRNA therapeutics: principles, expectations, and challenges. *Chinese Journal of Cancer*, 30(6), 368–370.
- Rupaimoole R, Slack FJ. (2017). MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16, 203–221.
- Shin C, Nam JW, Farh KKH, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP. (2010). Expanding the MicroRNA targeting code: functional sites with centred pairing. *Molecular Cell*, 38(6), 789–802.
- Tili E, Michaille JJ, Croce CM. (2013). MicroRNA splay a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. *Immunological Reviews*, 253(1), 167–184.
- Vishnoi A, Rani S. (2017). MiRNA biogenesis and deregulation of diseases: An overview. *Methods in Molecular Biology*, 1509:1–10.
- Wang D, Gu J, Wang T, Ding Z. (2014). OncoMiRDB: A database for the experimentally verified oncogenic and tumour-suppressive microRNAs. *Bioinformatics*, 30(15), 2237–2238.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang K H, Lee M J, et al. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733–1741.

- Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. (2009). Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis is pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, (11),228–234.
- Witkos TM, Koscianska E, Krzyzosiak W. (2011). Practical aspects of microRNA target prediction. *Current Molecular Medicine*, 11(2), 93–109.
- Xin H, Li Y, Buller B, Katakowski M, Zhang Y, Wang X, et al. (2012). Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite out growth. *Stem Cells*, 30(7),1556–1564.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hair pin RNAs. *Genes and Development*, 17(24),3011–3016.
- Zhang Y, Zang Q, Xu B, Zheng W, Ban R, Zhang H, et al. (2016). IsomiR Bank: A research resources for tracking Iso miRs. *Bioinformatics*, 32(13), 2069–2071.
- Zhao JJ, Hua YJ, Sun DG, Meng XX, Xiao HS, Ma X. (2006). Genome-wide microRNA profiling in human fetal nervous tissues by oligonucleotide microarray. *Child's Nervous System*, 22(11),1419–1425.
- Zhao W, Zhao SP, Zhao YH. MicroRNA-143/-145 in cardiovascular diseases. *BioMed Research International*, 531740.
- Zhu J, Zheng Z, Wang J, Sun J, Wang P, ChengX, et al. (2014). Different miRNA expression profiles between human breast cancer tumors and serum. *Frontiers in Genetics* 5,149.