

Increasing the specific expression of Cdk9 gene by single-stranded adult microRNA-1 in fibroblast cells

Zohre Bolandi, Hosein Ghanbarian*

Department of Biotechnology, Faculty of New Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

(Received: 2017/06/11 Accept: 2017/07/11)

Abstract

Background: MicroRNAs (miRNAs) are endogenous, non-coding short RNAs (~22 nucleotides) that can downregulate gene expression by repression of translation, mRNA degradation, or transcriptional repression. miRNA misregulation has been implicated in pathogenic alterations such as cancer. In order to investigate the microRNA functions in gene regulation and/or to modulate their expression in pathogenic conditions, microRNAs are overexpressed by using plasmid or synthetic RNA duplexes designed to mimic the miRNA of interest.

Materials and Methods: Mouse fibroblast cells were cultured in DMEM containing 10% FBS, 100 U/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin. Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, 11668-027) was used for transfection according to the manufacturer's instructions. RNA was extracted from cells and tissues using Qiazol (Qiagen, Germany), according to the manufacturer's protocol. 2 µg RNA samples were reverse transcribed to cDNA using microRNA-1 specific stem loop and random hexamer primers and MLV reverse transcriptase. q-PCR was performed with the 'SYBR Green I Master Mix' kit.

Findings: miR-1 expressing plasmid (pPRO-miR-1) was transfected into fibroblast cells. Quantitative real time PCR determination showed that Cdk9 expression was inhibited in transfected cells compared to control. Similarly, downregulation of Cdk9 was also observed following transfection of 22 nucleotides mature double stranded miR-1. Interestingly, transfection of synthetic 22 nucleotides mature single stranded miR-1 (miR-1-3p) induced Cdk9 expression in the fibroblast cells.

Conclusion: Unlike miR-expressing vector or synthetic RNA duplexes designed to mimic the miRNA of interest that can downregulate gene expression, synthetic 22 nucleotides mature single stranded microRNA probably induces gene expression in a locus-specific manner.

Keywords: microRNA-1, Cdk9, locus-specific induction

*Corresponding author: Hosein Ghanbarian
Email: hghanbarian@sbmu.ac.ir

افزایش بیان اختصاصی ژن Cdk9 بوسیله microRNA-1 بالغ تک رشته در سلول های فیبروبلاست

زهرا بلندی، حسین قنبریان*

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۳/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۴/۲۰

چکیده:

سابقه و هدف: microRNA ها، RNA کوچک (۲۲ بازی) غیر کد شونده هستند که قادرند بیان ژنها را از مسیرهای جلوگیری از ترجمه، رونویسی و تخریب RNA مهار کنند. با وجود نقش تنظیمی miR ها در شرایط فیزیولوژیک، تغییر بیان microRNA ها در شرایط بیماری مانند سرطان مشاهده می شود. بنابراین به منظور تنظیم میزان بیان miR ها در شرایط بیماری و با جهت مطالعه نقش تنظیمی آنها، بیان microRNA ها را با استفاده از وکتور های بیان کننده و یا از طریق سنتز miR بالغ دو رشته ای افزایش می دهند.

مواد و روش بررسی: در این مطالعه تجربی تاثیر تنظیمی miR-1 تک رشته ای و دو رشته ای بر بیان ژن Cdk9 بررسی شد. سلول های فیبروبلاست موشی در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم، 100 U/ml پنی سیلین، و 0.1 mg/ml استرپتومایسین کشت داده شدند. به منظور افزایش بیان miR-1 در سلول های فیبروبلاست، پلاسمید بیان کننده miR-1 (pPRO-miR-1)، miR-1 سنتزی دو رشته ای و تک رشته ای (۳ گروه) با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen, 11668-027) و طبق پروتکل های موجود به سلول ها ترانسفکت شده و RNA سلول ها بعد از ۴۸ ساعت بوسیله محلول کیازول (Qiagen, Germany) استخراج گردید. cDNA سازی از 2 µg RNA در حضور آنزیم MLV ریورس ترانسکریپتاز و پرایمرهای Random hexamer و پرایمر اختصاصی microRNA-1 (شرکت زیست رویش) انجام شد. جهت انجام q-PCR از کیت SYBR Green I Master Mix استفاده شد. جهت بررسی اختلاف بین گروه ها از آزمون واریانس ANOVA استفاده شد و سطح اختلاف معناداری بین گروه ها (p value) کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها: پس از ترانسفکت سلول ها با پلاسمید بیان کننده miR-1 (pPRO-miR-1)، کاهش ۲ برابر بیان ژن Cdk9 در سلول های ترانسفکت شده نسبت به گروه کنترل با انجام آزمایش Real time PCR نشان داده شد (p < ۰/۰۱). نتایج مشابهی بعد از ترانسفکت سلول ها با miR-1 بالغ دو رشته ای (۲۲ نوکلئوتید) مشاهده شد. در ادامه با هدف مقایسه نقش تنظیمی miR-1 بالغ دورشته با تک رشته، سلول ها با miR-1 بالغ تک رشته (۲۲ نوکلئوتید) ترانسفکت شدند. نتایج حاصل از آزمایش q-PCR و وسترن بلات نشان داد که miR-1 بالغ تک رشته برخلاف miR-1 دورشته و یا پلاسمید بیان کننده miR ۲ برابر میزان بیان Cdk9 افزایش می دهند (p < ۰/۰۰۱).

نتیجه گیری: بر خلاف پلاسمید بیان کننده microRNA و miR بالغ دو رشته ای که باعث کاهش بیان ژن هدف می شوند، احتمال دارد microRNA تک رشته نقش فعال کننده بیان ژن هدف را داشته باشد.

واژگان کلیدی: microRNA-1، Cdk9، افزایش بیان اختصاصی

* نویسنده مسئول: حسین قنبریان

پست الکترونیک: hghanbarian@sbmu.ac.ir

مقدمه:

miRNA ها ملکول های RNA غیر کد شونده کوچک ۲۲ نوکلئوتیدی هستند که با اتصال به ناحیه ۳' mRNA هدف، نقش تنظیمی خود را ایفا می کنند. این مولکول های کوچک برای اولین بار توسط Lee و همکارانشان در *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) در سال ۱۹۹۳ شناسایی شدند (۱). از سال ۱۹۹۳ به بعد، microRNA ها در بسیاری از موجودات از جمله گیاهان، ویروس، جلبک ها و جانوران شناسایی شدند (۲).

بسیاری از miRNA ها در پستانداران در زمان خاصی از تکامل و همچنین در بافت مشخصی بیان می شوند (۳، ۴). به عنوان مثال، miR-1 فقط در قلب و عضلات اسکلتی بیان می شود و با تنظیم بیان ژن *Cdk9* و سایر ژنهای کلیدی قلب، در تکامل و تمایز سلول های قلبی دخالت دارند (۵). تحقیقات متعددی نشان داده است که بسیاری از مسیرها و فرایندهای سلولی از قبیل تکامل، تکثیر، مرگ سلولی، مسیرهای متابولیک و غیره توسط microRNA ها کنترل می شوند (۶-۱۲).

microRNA ها بصورت یک رشته RNA بلند (pri-miRNAs) بوسیله آنزیم RNA پلیمراز II در داخل هسته رونویسی می شوند. اولیه رونویسی شده توسط آنزیم های *Drosha* (RNASEN) و *DGCR8* در داخل هسته بریده شده و شکل سنجاقی سری (*hairpin*) پیدا می کنند. این RNA که pre-miRNA نامیده می شود به اندازه ۷۰-۸۰ نوکلئوتید است (۱۳، ۱۴). Pre-miRNA به داخل سیتوپلاسم منتقل شده و نهایتاً توسط آنزیم *Dicer* بریده شده و به شکل RNA دو رشته ای ۲۲ نوکلئوتید در می آید که microRNA بالغ نامیده می شود (۱۵-۱۹). microRNA بالغ دو رشته ای در ادامه وارد کمپلکس RISC شده و در مسیر حرکت به سمت RNA های هدف، یکی از رشته های miR از کمپلکس جدا شده و تخریب می شود. ولی رشته دیگر به ناحیه ۳' RNA های هدف متصل شده و روند ترجمه RNA به پروتئین را مهار می کند (۲۰-۲۲).

مطالعات مختلف نشان داده است که بیان microRNA ها ممکن است در شرایط بیماری تغییر کند. بنابراین برخی مواقع جهت جلوگیری از روند بیماری، نیاز است تا میزان بیان microRNA ها را افزایش دهیم. بدین منظور معمولاً microRNA ها را یا به شکل RNA بالغ دو رشته ای و یا با استفاده از وکتور های بیان کننده microRNA به داخل سلول یا بدن موجودات هدایت می کنند. در اینجا، miR-1 به شکل های بالغ تک رشته، دو رشته و با استفاده از وکتور به داخل سلول های فیبروبلاست منتقل شده و میزان مهار بیان ژن هدف *Cdk9* در روش های مختلف انتقال مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها:

این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی در آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران در سال ۱۳۹۵ انجام شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای Real time PCR

Gene	Sequence 5'-3'
Cdk9	F: TAAAGCCAAGCACCGTCAG
	R: GATTTCCCTCAAGGCTGTGAT
Gapdh	F: CTCTCTGCTCCTCCTGTTCC
	R: ACGACCAAATCCGTTGACC

کشت سلول

سلول های فیبروبلاست جنین ۱۲/۵ روزه موش از مرکز تحقیقات بن یاخته تهیه شد. سلول ها در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco)، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین و ۰/۱ mg/ml استرپتومایسین کشت داده شدند. محیط کشت سلول ها به طور معمول یک روز در میان تعویض شد. جهت انتقال وکتور بیان کننده miR-1 و یا miR-1 بالغ به داخل سلول از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen) و طبق پروتکل مربوطه استفاده شد.

وکتور بیان کننده pPRO-miR-1

وکتور بیان کننده pPRO-miR-1 از دانشگاه Sophia Antipolis فرانسه از آزمایشگاه دکتر رسول زادگان تهیه شد. ژن miR-1 تحت پروموتور ژن Protamin بیان می شود (۵).

استخراج RNA و انجام Real time PCR

۴۸ ساعت پس از انتقال microRNA به داخل سلول، RNA کامل با استفاده از محلول کیزول (Qiagen, Germany) از سلول های ترنسفکت شده و کنترل استخراج شد. cDNA سازی با ۲ μg RNA و بوسیله آنزیم MLV reverse transcriptase (PrimeScript™ RT) انجام شد. در این راستا جهت cDNA سازی ژن *Cdk9*، از پرایمرهای random hexamer و از کیت اختصاصی miR-1 (شرکت دانش بنیان زیست رویش، تهران، ایران) برای cDNA سازی miR-1 استفاده شد. q-PCR با استفاده از کیت 'SYBR Green I Master Mix' (RR820L, TaKaRa) بوسیله دستگاه Rotor-Gene 6000 (Corbett, Australia) انجام شد. جهت نرمالیزه کردن بیان ژن *Cdk9* و miR-1 بترتیب از ژن *Gapdh* و *Snord RNA 47* به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. توالی مربوط به پرایمرها در جدول نشان داده شده است.

آزمایش Western Blot

استخراج پروتئین از سلول ها، آزمایشهای الکتروفورز و Blotting طبق روش هایی که در مطالعات قبلی اشاره شده است انجام شد (۲۳، ۲۴). آنتی بادی پلی کلونال *Cdk9* تهیه شده از خرگوش (H-169, sc-8338, Santa Cruz Biotechnology) و آنتی بادی منوکلونال موشی B-actin (T6199, Sigma) به نسبت ۱:۵۰۰ رقیق شده در بافر PBS، 2.5% Blotto، 0.05% Tween-20 و آنتی بادی ثانویه خرگوشی (goat anti-rabbit) و آنتی بادی ثانویه خرگوشی (rabbit

ساعت RNA از سلول‌ها استخراج شد و Real time PCR انجام شد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که *miR-1* دو رشته‌ای بالغ سنتزی به مانند وکتور بیان‌کننده *miR-1*، فعالیت مهاری خود را نشان داده و باعث کاهش بیان ژن *Cdk9* می‌شود (نمودار ۲).

انتقال *miR-1-3p* تک رشته به داخل سلول باعث افزایش بیان ژن *Cdk9* می‌شود

همچنان که ذکر شد انتقال *microRNA* به صورت دو رشته‌ای بالغ باعث مهار ژن هدف می‌شود. سواالی در این رابطه مطرح است، آیا *microRNA* به صورت تک رشته بالغ می‌تواند نقش مهاری خود را ایفا کند؟ جهت جواب دادن به این سوال، قسمت ۳' از *miR-1* (*miR-1-3p*) به صورت تک رشته ۲۲ نوکلئوتید سنتز شده و به سلول‌های فیبروبلاست منتقل شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که ناحیه ۳' تک رشته از *miR-1* بر خلاف حالت دو رشته‌ای باعث افزایش بیان ژن *Cdk9* می‌شود (نمودار ۳ الف). افزایش بیان ژن *Cdk9* حتی در سطح پروتئین با

(anti-mouse) (Santa Cruz Biotechnology) نشان‌دار شده با آنزیم پروکسیداز با رقت ۱:۱۰۰۰۰ استفاده شدند.

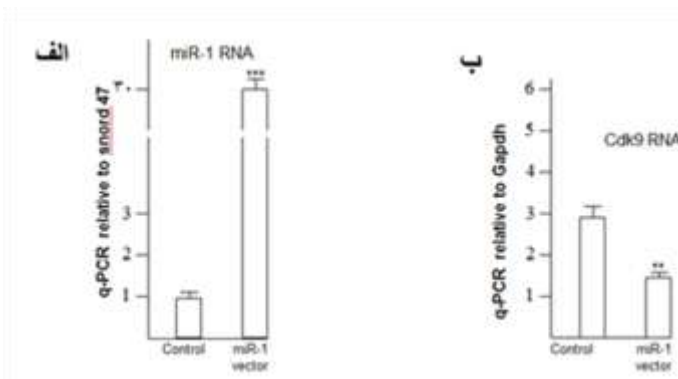
آنالیز آماری

جهت بررسی اختلاف بین گروه‌ها از آزمون واریانس ANOVA استفاده شد و سطح اختلاف معناداری بین گروه‌ها *p* value کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

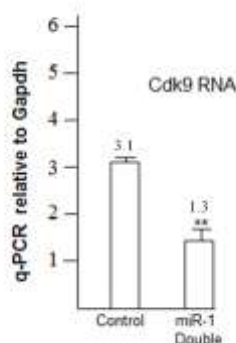
یافته‌ها:

انتقال وکتور بیان‌کننده *miR-1* به داخل سلول باعث کاهش بیان ژن *Cdk9* می‌شود.

در بسیاری از موارد جهت مطالعه نقش *microRNA* ها در سلول‌های مختلف، بیان آنها را در داخل سلول افزایش می‌دهند. این افزایش بیان با استفاده از یک وکتور یوکاریوتی انجام می‌شود که پیش‌ساز *microRNA* را در داخل وکتور کلون و بیان می‌کنند. در مرحله اول تحقیق، ما هم پیش‌ساز *miR-1* موشی را در داخل وکتور pPRO-*miR-1* کلون کرده و



نمودار ۱ انتقال وکتور بیان‌کننده *miR-1* به داخل سلول باعث کاهش بیان ژن *Cdk9* می‌شود. الف) افزایش بیان *miR-1* در سلول‌های فیبروبلاست بوسیله آزمایش Real time PCR اندازه‌گیری شد. ب) بیان ژن *Cdk9* در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور و سلول‌های کنترل بوسیله آزمایش Real time PCR اندازه‌گیری شد. *** سطح معناداری $p < 0.001$ و * سطح معناداری $p < 0.05$ را نشان می‌دهد.

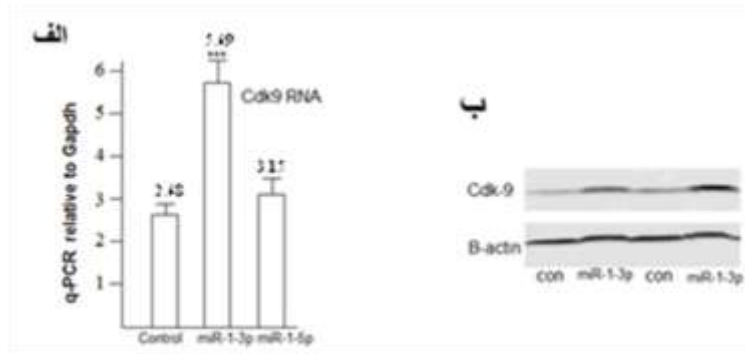


نمودار ۲ *miR-1* دو رشته‌ای باعث کاهش بیان ژن *Cdk9* می‌شود. بیان ژن *Cdk9* در سلول‌های ترنسفکت شده با *miR-1* دورشته‌ای و سلول‌های کنترل بوسیله آزمایش Real time PCR اندازه‌گیری شد. *** سطح معناداری $p < 0.001$ و * سطح معناداری $p < 0.05$ را نشان می‌دهد.

وکتور بیان‌کننده *miR-1* به داخل سلول‌های فیبروبلاست منتقل شد. افزایش بیان *miR-1* پس از استخراج RNA از سلول و cDNA سازی، بوسیله آزمایش Real Time PCR اندازه‌گیری شد و نشان داده شد که *miR-1* به صورت معنی داری در سلول‌ها افزایش بیان داشته است (افزایش ۳۰ برابر) (نمودار ۱ الف). در ادامه تاثیر افزایش بیان *miR-1* بر روی ژن *Cdk9* که یکی از ژنهای هدف آن می‌باشد مطالعه شد. در این راستا آزمایش Real time PCR نشان داد که بیان ژن *Cdk9* در سلول‌های ترنسفکت شده کاهش یافته است (نمودار ۱ ب).

انتقال *miR-1* دو رشته‌ای به داخل سلول باعث کاهش بیان ژن *Cdk9* می‌شود

به منظور مقایسه تاثیر *microRNA* دورشته‌ای بالغ با حالت کلون شده در کاهش بیان ژن هدف، در این مرحله *miR-1* دو رشته‌ای بالغ ۲۲ نوکلئوتیدی سنتز و به داخل سلول‌های فیبروبلاست منتقل شد. بعد از ۴۸



نمودار ۳ miR-1 تک رشته باعث افزایش بیان ژن *Cdk9* می شود. الف) بیان ژن *Cdk9* در سلول های ترانسفکت شده با miR-1 تک رشته و سلول های کنترل بوسیله آزمایش Real time PCR اندازه گیری شد. ب) افزایش بیان *Cdk9* در سطح پروتئین را نشان می دهد. *** سطح معنا داری $p < 0.001$ و * سطح معناداری $p < 0.05$ را نشان می دهد.

علاوه بر تحقیقات با دید درمانی، مطالعات کاربردی با هدف کشف نقش تنظیمی microRNA از طریق افزایش یا کاهش بیان آنها انجام می دهند. برای مثال افزایش بیان miRNA های سرکوبگر تومور، مانند let-7g، میزان تومور را در مدل موشی K-RAS سرطان ریه کاهش می دهد (۲۹). یا افزایش بیان کلاستر آنکوژن mir-17-92 منجر به اختلال لنفوپرولیفراتیو می شود و افزایش بیان این کلاستر در لنفوم سلول B به طور چشمگیری موجب افزایش تومورزایی خواهد شد (۹، ۳۰). بنابراین محققان راهکارهایی را پیشنهاد داده اند که بتوان با تنظیم بیان microRNA ها از روند و پیشرفت بیماری جلوگیری نمود. در شرایط افزایش بیان microRNA از RNA های سنتزی آنتی سنس یا آنتاگومیر جهت مهار و کاهش فعالیت microRNA استفاده می کنند و برعکس در مواردی که کاهش بیان آن باعث بیماری شود تلاش می کنند تا بیان miR مد نظر را افزایش دهند. بدین منظور معمولاً microRNA ها را یا به شکل RNA بالغ دو رشته ای و یا با استفاده از وکتور های بیان کننده microRNA به داخل سلول یا بدن موجودات هدایت می کنند. در مطالعه حاضر، جهت مقایسه این دو روش مذکور، ابتدا پیشساز miR-1 به صورت کلون شده به داخل سلول های فیبروبلاست ترانسفکت شد.

نتیجه گیری:

نتایج حاصل قابل پیش بینی بود و نشان داده شد که افزایش بیان miR-1 در حالت کلون شده باعث کاهش بیان ژن *Cdk9* می شود. در ادامه miR-1 بالغ ۲۲ نوکلئوتید دو رشته ای به داخل سلول های فیبروبلاست منتقل شد. نتایج حاصل از این روش نیز به مانند روش قبلی منجر به کاهش بیان ژن *Cdk9* می شود. جالب اینکه انتقال miR-1 بالغ تک رشته به داخل سلول، برخلاف دو مورد قبلی، باعث افزایش معنی دار بیان ژن *Cdk9* می شود. با اینکه مکانیسم افزایش بیان مشخص نیست، اما این نوع روش افزایش بیان که نیازی به استفاده از ویروس و ژن بیگانه ندارد، می تواند در افزایش بیان ژنهای کلیدی با اهداف مختلف بسیار ارزشمند باشد.

انجام آزمایش Western Blot نشان داده شد. علاوه بر این جهت بررسی بیشتر، ناحیه ۵' تک رشته از miR-1 (miR-1-5p) هم به صورت تک رشته ای ۲۲ نوکلئوتید سنتز و به سلول های فیبروبلاست منتقل شد. در این مورد افزایش یا کاهش بیانی در ژن *Cdk9* مشاهده نگردید.

بحث:

miR-1 بالغ تک رشته، بر خلاف miR-1 دو رشته ای و وکتور بیان کننده miR-1 که مهار کننده بیان ژن *Cdk9* هستند، باعث افزایش بیان این ژن می گردد. این حالت می تواند نقش مهمی در تنظیم بیان ژن *Cdk9* و microRNA-1 در شرایط پاتولوژیک داشته باشد. علاوه بر نقش تنظیمی microRNA ها در شرایط فیزیولوژیک بدن، تغییر بیان غیر طبیعی آنها در بسیاری از بیماریها مشاهده شده است. به عنوان مثال تغییر بیان نایجی microRNA های miR-10b، miR-9، miR-31 و miR-335 در سرطان سینه مشاهده شده است (۲۵). دلیل تغییر بیان miR ها در سرطان را علاوه بر تنظیم ژنهای کلیدی مرتبط با سرطان به قرار گیری miRNA ها در مناطق بی ثبات کروموزومی (افزایش تعداد کپی، جابجایی، یا حذف ژن) هم نسبت می دهند (۲۶). بطوریکه بر اساس نقش microRNA ها در سرکوب یا ایجاد سرطان، آنها را به دو دسته ایجاد کننده یا مهار کننده سرطان تقسیم بندی می کنند (۲۷). به عنوان مثال miR-15 و miR-16 توسط ژن p53 القا شده و فعالیت سرکوبگری تومور دارند و کاهش بیان آنها در سرطان گزارش شده است (۲۸). بنابراین با توجه به نقش حیاتی miRNA ها در فرایند تومورزایی و بیان اختصاصی آن ها در بیماری های مختلف، این مولکول ها بالقوه اهداف درمانی و بیومارکری جدیدی می باشند. به نظر می رسد که مولکول های ضد miRNA ها، که به عنوان "antagomir" شناخته می شوند، می توانند خواص آنکوژنی miRNA ها را مسدود کنند. برعکس با کاهش بیان microRNA های سرکوب کننده سرطان، راهکارهای افزایش بیان آنها را پیشنهاد می کنند (۲۹). بنابراین miRNA ها را می توان به عنوان اهداف درمانی امیدبخشی در درمان نوسانات سلول های بنیادی سرطانی در نظر گرفت.

منابع:

1. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843-854.
2. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research* 2008; 36(suppl 1): D154-D158.
3. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294(5543): 862-864.
4. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome biology* 2004; 5(3): R13.
5. Wagner KD, Wagner N, Ghanbarian H, Grandjean V, Gounon P, Cuzin F. RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. *Developmental cell* 2008; 14 (6): 962-969.
6. Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, et al. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 2005; 309(5732): 310-311.
7. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the *let-7* microRNA family. *Cell* 2005; 120(5): 635-647.
8. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *nature* 2005; 435(7043): 834-838.
9. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435(7043): 828-833.
10. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews cancer* 2006; 6(11): 857-866.
11. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between *let-7* and *Hmga2* enhances oncogenic transformation. *Science* 2007; 315(5818): 1576-1579.
12. He L, He X, Lim LP, De Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007; 447(7148): 1130-1134.
13. Gregory RI, Yan K-p, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432(7014): 235-240.
14. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425(6956): 415-419.
15. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409(6818): 363-366.
16. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001; 106(1): 23-34.
17. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint É, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science*. 2001 293(5531): 834-838.
18. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development* 2001; 15(20): 2654-2659.
19. Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 293(5538): 2269-2271.
20. Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes & development* 2003; 17(4): 438-442.
21. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & development* 2004; 18(5): 504-511.
22. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly (A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102(47): 16961-16966.
23. Ghanbarian H, Wagner N, Polo B, Baudouy D, Kiani J, Michiels J-F, et al. Dnmt2/Trdm1 as Mediator of RNA Polymerase II Transcriptional Activity in Cardiac Growth. *PloS one* 2016; 11(6): e0156953.
24. Ghanbarian H, Wagner N, Michiels J-F, Cuzin F, Wagner K-D, Rassoulzadegan M. Small RNA-directed epigenetic programming of embryonic stem cell cardiac differentiation. *Scientific Reports* 2017; 7.
25. Hurst DR, Edmonds MD, Welch DR. Metastamir: the field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. *Cancer research* 2009; 69(19): 7495-7498.
26. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101(9): 2999-3004.
27. Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* 2009; 136(4): 586-591.
28. Domen J, Cheshier SH, Weissman IL. The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells. *Journal of Experimental Medicine* 2000; 191(2): 253-264.

29. Zhu S, Si M-L, Wu H, Mo Y-Y. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(19): 14328-14336.

30. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nature immunology* 2008; 9(4): 405-414.