

MICRO-RNA – MỘT DẤU CHỨNG SINH HỌC TIỀM NĂNG CHO BỆNH UNG THƯ

Ngày nhận bài: 01/07/2015

Ngày nhận lại: 17/07/2015

Ngày duyệt đăng: 04/09/2015

Lao Đức Thuận¹
Nguyễn Bảo Quốc²
Trần Kiến Đức³
Lê Huyền Ái Thúy⁴

TÓM TẮT

MicroRNA (miRNA), một họ các phân tử RNA không mã hóa (non-coding RNAs) có chiều dài khoảng 21 nucleotide, đóng vai trò điều hòa sau phiên mã sự biểu hiện gen ở tế bào eukaryote.

Với các tính chất biểu hiện đặc trưng, đặc biệt cho nhiều loại bệnh ung thư, cùng với hai tính chất nổi bật khác, đó là tính lưu thông trong nhiều loại dịch thể và tính bền, microRNA đã nhanh chóng được chú ý đến như là một dấu chứng sinh học rất tiềm năng, ứng dụng trong tiên lượng và chẩn đoán sớm ung thư.

Bài tổng quan này nhằm giới thiệu về loại phân tử này, các đặc trưng của quá trình sinh tổng hợp, cơ chế phân tử trong hoạt động của miRNA, phân tích khuynh hướng sử dụng chúng như một dấu chứng sinh học đối với bệnh ung thư, làm tiền đề cho việc phát triển nghiên cứu thực nghiệm này trên người bệnh Việt Nam.

Từ khóa: MicroRNA, bền, lưu thông, dấu chứng sinh học, ung thư.

ABSTRACT

MicroRNA (miRNA) is the class of short non-coding RNA, about 21 nucleotides in length. In general, miRNA functions as the post translational regulation in eukaryotic cells.

Regarding its typical characteristics, especially in several cancers, with two prominent properties, namely the circulating and the stability of miRNA in bio-fluid, the miRNA is noticed as the potential biomarker in prognosis and early diagnosis of cancer.

In the current review, we aim to introduce the molecular, the characteristics and molecular mechanism of miRNA bio-synthesis, and the activities of miRNA. Moreover, we tend to analyse and apply them as the potential biomarker for cancer. This will be the prerequisite to understanding and developing the miRNA study in Vietnamese patients.

Keywords: Biomarker, cancer, circulating, microRNA, stability.

1. Giới thiệu

MicroRNA (miRNA), một họ các phân tử RNA không mã hóa (non-coding RNAs) có chiều dài khoảng 21 nucleotide (nt), đóng vai trò điều hòa sau phiên mã sự biểu hiện gen ở

eukaryote (Filipowicz và cộng sự, 2008; Sun và cộng sự, 2013; Zen và cộng sự, 2012). Theo ước tính, gen mã hóa cho miRNA chiếm khoảng từ 1-5% bộ gen ở người và tham gia sự điều hòa ít nhất 30% tổng lượng miRNA

¹ ThS, Trường Đại học Mở TP.HCM.

² TS, Trường Đại học Nông Lâm, TP.HCM.

³ Trường Đại học Mở TP.HCM.

⁴ PGS.TS, Trường Đại học Mở TP.HCM.

(MacFarlane và cộng sự, 2010; Zen và cộng sự, 2012). Ngay sau khi phân tử miRNA đầu tiên được phát hiện vào năm 1993 bởi Vitor Ambros et al. có tên là miRNA lin-4 trên loài *Caenorhabditis elegans*, hơn 20,000 phân tử miRNA được phát hiện trên 193 loài khác nhau và toàn bộ thông tin về miRNA được lưu trữ trên trang thông tin miRBase (<http://www.mirbase.org/>).

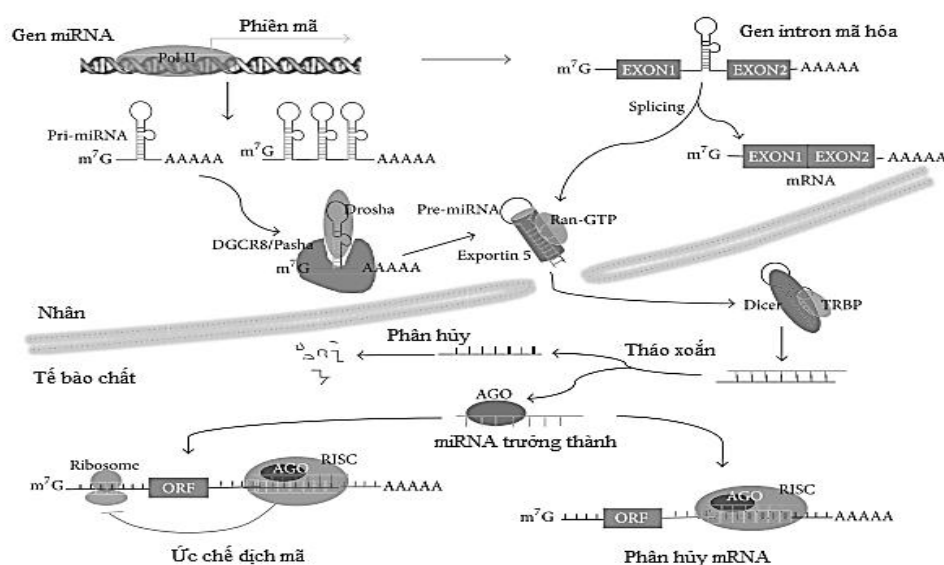
2. Quá trình sinh tổng hợp miRNA

Quá trình này bao gồm các sự kiện phân cắt xảy ra trong nhân và sau đó trong tế bào chất (Hình 1) được thực hiện bởi hai phân tử Drosha và Dicer thuộc nhóm RNase III có bản chất endonuclease (Denli và cộng sự, 2004; MacFarlane và cộng sự, 2010).

Ở giai đoạn trong nhân, các gen mã hóa cho miRNA hay các vùng intron mã hóa (coding-intron) được phiên mã bởi RNA polymerase II tạo thành phân tử miRNA sơ cấp (primary miRNA, pri-miRNA). Về cấu trúc, phân tử pri-miRNA chứa một đến hai cấu trúc kẹp tóc (Kim và cộng sự, 2009). Các phân tử pri-miRNA có đầu 5' được gắn mũ chụp và đầu 3' có cấu trúc dạng poly(A) (Cai và cộng sự, 2004). Sau đó các phân tử pri-miRNA được biến đổi thành phân tử pre-miRNA (precursor miRNA) với cấu trúc thứ cấp có chiều dài khoảng 70 nt với đầu 5' phosphate và 3' nhô ra 2 nucleotide (Denli, 2004; MacFarlane, 2010). Quá trình biến đổi này cần

thiết phải có sự hỗ trợ của phân tử Drosha (Denli, 2004; Lee, 2003). Drosha chỉ thể hiện hoạt tính phân cắt khi hình thành phức hợp với một phân tử protein dsRBD có tên là Pasha (trong *Drosophila*) hay DGCR8 (trong động vật có vú), để phân cắt pri-miRNA thành pre-miRNA (Denli và cộng sự, 2004; Filipowicz và cộng sự, 2008; Lee và cộng sự, 2003). Phân tử pre-miRNA được tạo thành, đầu 3' có 2 nt nhô ra, sẽ được phân tử exportin-5 nhận diện và vận chuyển ra khỏi nhân, vào trong tế bào chất để bước vào giai đoạn biến đổi tiếp theo thông qua con đường RAN-GTP (RAS-related Nuclear – GTP pathway) (Okada và cộng sự, 2009; Sun và cộng sự, 2013).

Khi đi vào trong tế bào chất, pre-miRNA tiếp tục bị cắt bởi phân tử Dicer tạo thành thể miRNA nhị phân dạng mạch đôi có chiều dài khoảng 20 nt (Filipowicz và cộng sự, 2005). Tiếp theo, phân tử miRNA mạch đôi được tháo xoắn, một trong hai mạch sẽ bị phân hủy nhanh chóng, mạch còn lại chính là miRNA trưởng thành, gắn kết với protein Ago (là nhân tố khởi đầu dịch mã 2C2 – eIF2C2 ở eukaryote) và phức hợp RISC (RNA-induced silencing complex) để tham gia vào quá trình điều hòa sự biểu hiện gen thông qua hai cách: phân hủy mRNA hay ức chế sự dịch mã (Cifuentes và cộng sự, 2010; Filipowicz và cộng sự, 2005; Kim và cộng sự, 2012; MacFarlane và cộng sự, 2010).



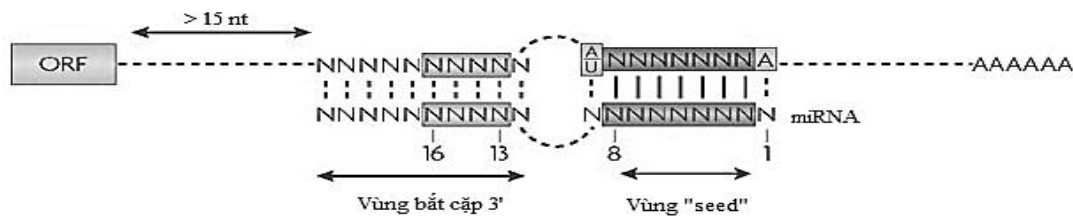
Hình 1. Quá trình sinh tổng hợp miRNA trưởng thành

3. Cơ chế phân tử hoạt động của miRNA

Các phân tử miRNA tham gia vào quá trình điều hòa âm sự biểu hiện gen bằng cách gắn vào vùng 3' không dịch mã (3'UTR) của mRNA, làm cho mRNA bị phân hủy hoặc sự dịch mã xảy ra trên phân tử mRNA này bị khóa (Bartel, 2004; Esquela và cộng sự; Filipowicz và cộng sự, 2008). Một vài nghiên cứu gần đây còn cho thấy miRNA có khả năng gắn lên vùng 5' không dịch mã (5'UTR), chẳng hạn như miR-10a tương tác với vùng 5'UTR của mRNA tăng cường dịch mã tạo protein ribosome (Ørom và cộng sự, 2008).

Giai đoạn đầu tiên khi hình thành phức hợp miRNA-RISC, là sự nhận diện mRNA

(MacFarlane và cộng sự, 2010). Phức hợp miRNA-RISC gắn lên vùng 3'UTR của mRNA thông qua sự bắt cặp bổ sung của các base giữa mRNA với trình tự trên mạch dẫn (guide strand) của phân tử miRNA theo nguyên tắc bổ sung (Hydbring và cộng sự, 2013). Sự nhận diện này phụ thuộc rất nhiều vào sự bắt cặp bổ sung của base giữa vùng “trung tâm” (seed) trên phân tử miRNA với mRNA (Filipowicz và cộng sự, 2008; Macfarlane và cộng sự, 2010). Vùng “trung tâm” là vùng trình tự nằm ở đầu 5' của phân tử miRNA có kích thước từ 2-7 nt (Hình 2) (Filipowicz và cộng sự, 2008; Hydbring và cộng sự, 2013; Macfarlane và cộng sự, 2010).



Hình 2. Sự bắt cặp giữa mạch “guide” của miRNA với mạch mRNA mục tiêu

Sự bắt cặp giữa các cặp base giữa vùng “trung tâm” với vùng trình tự trên mRNA có thể trùng khớp hoàn toàn hoặc không hoàn toàn, và quyết định tính ổn định tương tác giữa miRNA với mRNA (Doench và cộng sự, 2004; MacFarlane và cộng sự, 2010). Một phân tử miRNA có khả năng điều hòa nhiều trình tự mRNA đích. Hiện có hai cơ chế để giải thích: phụ thuộc hay không phụ thuộc vào phân tử cắt “slicer” (Coller và cộng sự, 2005; Lujambio và cộng sự, 2012), tức là khi có sự bắt cặp hoàn toàn giữa vùng “trung tâm” với trình tự trên mRNA và sự bắt cặp này mở rộng sang hai bên vùng “trung tâm” khoảng 10-11 nt, được xúc tác bởi Ago2. Các sản phẩm của quá trình phân cắt được phân hủy bắt đầu bằng sự deadenyl hóa phân tử mRNA để loại bỏ đuôi polyA. Tiếp theo, quá trình phân hủy mRNA được thực hiện bởi exosome – một phức hợp protein với hoạt tính 3’-5’ exonuclease. Ngoài ra, phân tử mRNA có thể bị tháo mũ chụp ở đầu 5’ bởi enzyme Dcp1 và Dcp2, mRNA bị phân hủy bởi Xrnp1 có hoạt

tính 5’-3’ exonuclease.

Sự im lặng không phụ thuộc vào phân tử cắt “slicer” là sự bắt cặp không hoàn toàn giữa vùng “trung tâm” với phân tử đích mRNA dẫn đến sự ức chế hoạt tính phân cắt của Ago2. Nhiều bằng chứng thực nghiệm cho thấy, theo cách này, miRNA cũng thúc đẩy quá trình deadenyl hóa phân tử mRNA, tháo mũ chụp không phụ thuộc vào hoạt tính slicer, cuối cùng dẫn đến ức chế sự khởi đầu dịch mã hay ức chế sự phiên mã. Cuối cùng phân tử mRNA phân hủy theo con đường exosome và Xrnp1p.

4. Khuynh hướng sử dụng miRNA như một dấu chứng sinh học trong tiên lượng và chẩn đoán sớm ung thư

Từ khi được phát hiện, các phân tử miRNA đã được chứng minh rằng có vai trò quan trọng trong điều hòa nhiều quá trình sinh học, bệnh học khác nhau ở người, chẳng hạn: ung thư, tiểu đường hay sự tổn thương ở mô,... Các công ty cũng nhanh chóng đưa phân tử miRNA này vào ứng dụng trong lâm

sàng mà điển hình là tại hội nghị TEDGlobal 2014, công ty Miroculus cho ra mắt sản phẩm với tên gọi Miriam. Sản phẩm được giới thiệu là “Cho phép xác định hàng chục loại bệnh ung thư khác nhau một cách nhanh chóng, dễ dàng và rẻ tiền dựa trên microRNA”. Bài viết này không nhằm đánh giá về sản phẩm vừa đề cập, mà chỉ cung cấp thông tin nhằm nhấn mạnh một khuynh hướng nổi trội trên thế giới trong việc sử dụng miRNA trong chẩn đoán ung thư.

Phải nói rằng, các dữ liệu công bố cho đến nay phần lớn đều tập trung việc sử dụng phân tử miRNA như một dấu chứng sinh học hết sức tiềm năng trong tiên lượng và chẩn đoán sớm ung thư. Sự giảm biểu hiện hay mất đi các phân tử miRNA đóng vai trò là các gen ức chế khối u dẫn đến tăng cường sự phân chia tế bào, xâm lấn hay sự tạo thành mạch máu, kết quả là dẫn đến sự tăng sinh của khối u thông qua sự biểu hiện các oncoprotein. Chẳng hạn, trên các bệnh nhân bạch cầu mạn tính dòng lympho B, phần lớn có sự mất đi hay giảm biểu hiện của hai miRNA là miR-15a và miR-16-1. Sự giảm này dẫn đến sự tăng biểu hiện của gen *BCL2* (gen ức chế quá trình apoptosis của tế bào và biểu hiện cao ở các tế bào khối u) (Calin và cộng sự, 2002; Cimmino và cộng sự, 2005). Một nghiên cứu khác cho thấy miR-21 liên quan đến u nguyên bào đệm như một oncogen, biểu hiện vượt mức cao gấp 5-100 lần so với mô bình thường và ức chế quá trình apoptosis (Chan và cộng sự, 2005).

Một số miRNA khác có vai trò như một gen ức chế khối u như miR-143, miR-145, thể

hiện trong ung thư trực tràng, ung thư tiền liệt tuyến...; miR-1, miR-101, miR-122...: thể hiện trong ung thư biểu mô tế bào gan (Sun và cộng sự, 2013). Khảo sát từ 217 miRNAs trên hàng trăm loại mẫu khác nhau bao gồm các mẫu ung thư ở người và chuột, cho thấy phần lớn (129/217) miRNA có vai trò như gen ức chế khối u (Lu và cộng sự, 2005).

Bên cạnh đó, ứng dụng miRNA trong tiên lượng hay chẩn đoán sớm ung thư còn dựa trên tính đặc trưng và chuyên biệt của từng loại phân tử miRNA cho từng loại ung thư khác nhau (Esther và cộng sự, 2012): chẳng hạn miR-15a, miR-16-1 được cho là dấu chứng sinh học tiềm năng cho tiên lượng bệnh bạch cầu mạn tính dòng lympho hay let-7a là dấu chứng tiềm năng cho ung thư phổi (Calin và cộng sự, 2005; Takamizawa và cộng sự, 2004). Một số miRNA khác trong vai trò oncogene có tính chất đặc trưng cho từng loại ung thư, chẳng hạn BIC/miR-155 đặc trưng cho khối u ở vú (Iorio và cộng sự, 2005); miR-210, miR-216a, miR-221 đặc trưng cho ung thư biểu mô tế bào gan (Sun và cộng sự, 2013). Bên cạnh đó, sự hiện diện của từng loại phân tử miRNA đặc trưng trong từng loại khối u cho phép ứng dụng chúng trong việc xác định các subtype (subtyping – xác định kiểu) ung thư. Chẳng hạn, Sempere et al., phân tích miRNA liên quan đến ba kiểu ung thư vú $ER^+PR^+HER2^+$, $ER^+PR^-HER2^+$, $ER^-PR^-HER2^-$, miR-205 biểu hiện ở mức độ cao ở kiểu hình $ER^+PR^+HER2^+$ và miR-145 biểu hiện cao ở các kiểu hình còn lại (Hydbring và cộng sự, 2013; Sempere và cộng sự, 2007).

Bảng 1. Sự biểu hiện của một số phân tử miRNA ở một số các loại ung thư khác nhau

miRNAs	Dịch cơ thể	Bệnh lý	Đặc điểm điều hòa
miR-155, miR-210, miR-21	Huyết thanh	DLBCL	Tăng
miR-141	Huyết tương	UT tuyến tiền liệt	Tăng
miR-25, miR-223	Huyết thanh	NSCLC	Tăng
miR-155	Huyết thanh	UT vú	Tăng
miR-155, miR-21	Huyết tương	UT phổi	Tăng
miR-21, miR-141, miR-200	Huyết tương	UT buồng trứng	Tăng

miRNAs	Dịch cơ thể	Bệnh lý	Đặc điểm điều hòa
miR-17-3p, miR-92, ...	Huyết thanh	UT đại trực tràng	Tăng
Let-7, miR-101, miR-122, miR-125a, miR-130, ...	Huyết thanh	UT biểu mô tế bào gan	Giảm
miR-21, miR-210, miR-221, ...	Huyết thanh	UT biểu mô tế bào gan	Tăng
miR-125a, miR-200a, ...	Nước bọt	UT tế bào biểu mô vòng họng	Tăng

Ghi chú: DLBCL (Diffuse large B-cell lymphoma): bệnh tế bào B lan tỏa; NSCLC (non-small cell lung cancer): ung thư phổi tế bào nhỏ; UT: ung thư

5. Các tính chất của microRNA khiến nó trở thành một lựa chọn tối ưu cho khuynh hướng sử dụng như là một Biomarker

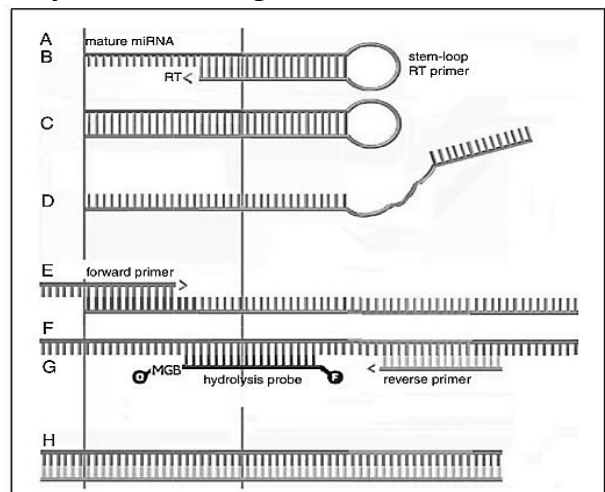
Các tính chất quan trọng để miRNA trở thành một lựa chọn tối ưu cho khuynh hướng sử dụng như là một biomarker trong tiên lượng và chẩn đoán sớm bệnh, ngoài tính đặc trưng (chẳng hạn đối với ung thư như vừa đề cập ở trên), hai tính chất nổi bật khác nữa của miRNA, đó là: tính lưu thông (circulating) trong nhiều loại mẫu dịch thể như huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, nước bọt và các thành phần dịch khác trong cơ thể, và tính bền.

Các miRNA lưu thông được phát hiện lần đầu trong huyết thanh bởi Lawrie et al., vào năm 2008 như miR-155, miR-120, miR-21. Chúng hiện diện trong huyết thanh ở người bệnh DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma, Lymphom tế bào B lớn lan tỏa) ở nồng độ rất cao (trong so sánh với đối chứng là máu người lành) (Lawrie và cộng sự, 2008). Hank et al., phân tích trên 157 miRNAs thu nhận từ nước tiểu, trong đó hai phân tử miR-126 và miR-182 biểu hiện cao và được ứng dụng để xác định ung thư bóng đá (Hanke và cộng sự, 2010). Sự biểu hiện của miRNA-125a và miR-200 được ghi nhận trong nước bọt của các bệnh nhân ung thư tế bào vảy vòm họng (Bartel, 2004; Ørom và cộng sự, 2008).

Mặt khác, các phân tích về hóa và sinh học cho thấy miRNA có khả năng kháng lại hoạt động của RNase, điều kiện pH và nhiệt độ cực đoan, lưu giữ tại nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian dài hay trong giai đoạn đông lạnh lưu giữ mẫu, ... Nói cách khác, các phân tử miRNA là khá bền.

6. Kỹ thuật tiếp cận nghiên cứu phân tử miRNA

Phát hiện miRNA có thể được thực hiện bởi nhiều kỹ thuật khác nhau. Trong giới hạn bài viết này, chúng tôi giới thiệu một kỹ thuật đặc hiệu, dễ áp dụng cho thực tế lâm sàng, đó là RT-PCR định lượng sử dụng môi thân cuộn (stem-loop), rất chuyên biệt với từng phân tử miRNA (Hình 3). Đầu tiên, phiên mã ngược phân tử miRNA được thực hiện với một môi gắn đặc hiệu 6 nt tại đầu 3' của trình tự đích. Sản phẩm cDNA sau đó được định lượng bằng PCR với môi xuôi chuyên biệt miRNA (loại trừ 6 nt ở đầu 3' của miRNA) và môi ngược (một phần của trình tự môi stem loop) (Varkonyi và cộng sự, 2007). Mẫu dò Taqman hay thủy giải có thể được sử dụng với chiều dài cỡ 12 – 17nt cùng với thử nghiệm cách làm tăng nhiệt độ T_m của mẫu dò với việc gắn MGB (minor groove binder) cũng được khuyến khích thử nghiệm.



Hình 3. Nguyên tắc của kỹ thuật stem-loop RT-PCR

Ghi chú: trình tự miRNA, mỗi thân cuộn có trình tự gắn đặc hiệu với 6 nt với đầu 3' của miRNA, RT: Reverse Transcriptase PCR; forward primer: mỗi xuôi; reverse primer: mỗi ngược.

7. Kết luận

Rõ ràng, miRNA là rất tiềm năng để trở thành một dấu chứng sinh học sử dụng trong tiên lượng, chẩn đoán sớm và kể cả điều trị ung thư bởi các đặc tính về sinh tổng hợp, chức năng và đặc biệt là tính bền và tính lưu thông của phân tử này trong máu.

Mặc dù vậy, việc tiếp tục nghiên cứu về microRNA là rất cần thiết bởi chỉ mới 1/3 tổng số gen ở người được dự đoán là đích can thiệp trực tiếp của microRNA. Hơn nữa, còn rất nhiều thứ cần được tiếp tục khám phá; đặc biệt là sự điều hòa biểu hiện của microRNA

đến bộ gen người, tập trung vào nhóm các gen ức chế khối u hay oncogen, thông qua việc làm rõ tính tương tác phức tạp, liên hoàn giữa microRNA, một tính chất đặc thù của epigenetics – tức là sự thay đổi biểu hiện của các gen bởi một trong các cơ chế như của miRNA: chịu ảnh hưởng lớn từ các thay đổi của điều kiện môi trường, và đáp ứng với các thay đổi mang tính đặc trưng đó. Đây cũng là nhiệm vụ cấp thiết đối với các nghiên cứu trong nước về ung thư, bởi chưa có một xuất bản nào về thực nghiệm miRNA liên quan đến ung thư từ người bệnh Việt Nam được công bố, nhằm thúc đẩy nhanh chóng khả năng ứng dụng vào tiên lượng hay chẩn đoán sớm bệnh, và kể cả điều trị bệnh ung thư bằng công nghệ microRNA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, 136(2), 215-233.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 116, 281-297.
- Bauer, K. M. & Hummon, A. B. (2012). Effects of the miR-143/-145 microRNA Cluster on the Colon Cancer Proteome and Transcriptome, *J Proteome Res*, 11(9), 4744-4754.
- Bregues, M., Teixeira, D. & Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies, *Science*, 310(5747), 486-489.
- Cai, X., Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12), 1957-1966.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E.,... Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci*, 99(24), 15524-9.
- Calin, G. A., Ferracin, M. & Cimmino, A. (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med*, 353(17), 1793-801.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K.,... Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases, *Cell Res*, 18(10), 997-1006.
- Chan, J. A., Krichevsky, A. M. & Kosik, K. S. (2005). MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells, *Cancer Res*, 65, 6029-6033.

- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M.,... Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2, *Proc Natl Acad Sci*, 102(39), 13944-13949.
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D. W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S.,... Giraldez, A. J. (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity, *Science*, 328(5986), 1694-1698.
- Coller, J. & Parker, R. (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping, *Cell*, 122(6), 875-886.
- Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F. & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231-235.
- Doench, J. G & Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression, *Genes Dev*, 18(5), 504-511.
- Elyakim, E., Sitbon, E., Faerman, A., Tabak, S., Montia, E., Belanis, L.,... Yerushalmi, N. (2010). Hsa-miR-191 is a candidate oncogene target for hepatocellular carcinoma therapy, *Cancer Research*, 70(20), 8077-8087.
- Esquela, K. A. & Slack, F. J. (2009). Oncomirs: microRNAs with a role in cancer, *Nat Rev Cancer*, 6, 259-269.
- Esther, C., Anke, J. T. & Yigal, M. P. (2012). Circulating MicroRNAs: Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease, *Circulation Research*, 110, 483-495.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of posttranscriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 102-114.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Fabrice, A. K. & Pilla, R. S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs, *Current Opinion in Structural Biology*, 15, 331-341.
- Fornari, F., Milazzo, M., Chieco, P., Negrini, M., Marasco, E., Capranico, G.,... Gramantieri, L. (2012). In hepatocellular carcinoma miR-519d is up-regulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2, *J Pathol*, 227(3), 275-285.
- Gramantieri, L., Fornari, F., Callegari, E., Sabbioni, S., Lanza, G., Croce, C. M.,... Negrini, M. (2008). MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma, *J Cell Mol Med*, 12(6A), 2189-2120.
- Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A. C., Kausch, I., Jocham, D.,... Sczakiel, G. (2010). A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer, *Urol Oncol*, 28(6), 655-61.
- Hydbring, P. & Badalian, V. G. (2013). Clinical applications of microRNAs, *F1000Res*, 2, 136-151.
- Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S.,... Croce, C. M. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer, *Cancer Res*, 65(16), 7065-7070.

- Jopling, C. (2012). Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function, *RNA Biol*, 9, 137-142.
- Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(2), 126-139.
- Kim, Y. & Kim, V. N. (2012). MicroRNA factory: RISC assembly from precursor microRNAs, *Mol Cell*, 46(4), 384-386.
- Kiriakidou, M., Nelson, P. T., Kouranov, A., Fitziev, P., Bouyioukos, C.,... Hatzigeorgiou, A. (2004). A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets, *Genes Dev*, 18(10), 1165-1178.
- Lawrie, C. H., Gal, S., Dunlop, H. M., Pushkaran, B., Liggins, A. P., Pulford, K.,... Harris, A. L. (2008). Detection of elevated levels of tumour associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma, *Br J Haematol*, 141, 672-675.
- Lanford, R. E., Hildebrandt, E. E. S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M. E.,... Ørum, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection, *Science*, 327(5962), 198-201.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J.,... Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, *Nature*, 425(6956), 415-419.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez, S. E., Lamb, J., Peck, D.,... Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers, *Nature*, 435(7043), 834-8.
- Lujambio, A. & Lowe, S. W. (2012). The microcosmos of cancer, *Nature*, 482, 347-355.
- MacFarlane, L. A. & Murphy, P. R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer, *Current Genomics*, 11, 537-561.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs, *Mol Cell*, 15(2), 185-197.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova, A. E. L.,... Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection, *Proc Natl Acad Sci*, 105(30), 10513-10518.
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S. J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A.,... Tsukihara, T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery, *Science*, 326(5957), 1275-1279.
- Ørom, U. A., Nielsen, F. C. & Lund, A. H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation, *Mol Cell*, 30(4), 460-471.
- Perron, M. P. & Provost, P. (2008). Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function, *Front Biosci*, 13, 2537-2547.
- Pillai, R. S. (2005). MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*, 11(12), 1753-1761.
- Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J. & Sharp, P. A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells, *Mol Cell*, 21(4), 533-542.

- Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Friendewey, D., Samuelsson, B. & Rådmark, O. (2002). Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer, *EMBO J*, 21(21), 5864-5874.
- Sempere, L. F., Christensen, M. & Silahtaroglu, A. (2007). Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer, *Cancer Res*, 67(24), 11612–20.
- Sun, J., Lu, H., Wang, X. & Jin, H. (2013). MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma: Regulation, Function, and Clinical Implications, *The Scientific World Journal*, 1-14.
- Takamizawa, J., Konishi, H. & Yanagisawa, K. (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival, *Cancer Res*, 64(11), 3753–6.
- Valencia, S. M. A., Liu, J., Hannon, G. J. & Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs, *Genes Dev*, 304(5670), 594-596.
- Varkonyi, G. E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F. & Hellens, R. P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs, *Plant Methods*, 12, 3-12.
- Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*, *Cell*, 75(5), 855-862.
- Yekta, S., Shih, I. H. & Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA, *Science*, 304(5670), 594-596.
- Zen, K. & Zhang, C. Y. (2012). Circulating microRNAs: A novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers, *Medicinal Research Reviews*, 32(2), 326-348.