



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

**Memoria del Trabajo de Final de Grado**

# Papel de los microRNAs mitocondriales (mitomiRs) en patología humana

Marina Ortiz Ferrà

**Grado de Biología**

Año académico 2018-19

Trabajo tutelado por Cristòfol Vives Bauzà  
Departamento de Biología

Se autoriza a la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Palabras clave del trabajo:  
Mitocondria, microRNA, mitomiR,



## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer en primer lugar a mi tutor por darme un lugar en su agenda y por haberme guiado en la realización de este TFG. Un gran investigador y una gran persona.

Al equipo de Investigación de Son Espases por cederme las instalaciones y ayudarme en las dudas que surgieron durante la realización.

A mis padres por escucharme en los momentos de estrés. Ellos son los que muestran su apoyo incondicional.

A mi hermana apoyarme y confiar en mí en todo momento. Gracias, siempre has sido y serás mi ejemplo a seguir.

## Índice

Resumen.....	2
Introducción.....	2
Concepto mitomiR.....	2
Biogénesis de miRNA .....	3
Migración de miRNAs a mitocondria.....	6
Objetivos.....	7
O.1. mitomiRs identificados en la literatura .....	7
miRNAs reguladores del Sistema OXPHOS .....	9
miRNAs reguladores del Ciclo de Krebs .....	10
miRNAs reguladores de la vía intrínseca de la apoptosis .....	10
miRNAs reguladores del metabolismo lipídico .....	11
miR-1275.....	11
miR-1275 e hipoxia .....	12
miR-1275 mitocondria.....	13
O.2. ¿ Es miR-1275 un mitomiR que ejerce su función reguladora en la mitocondria? .....	14
Metodología .....	15
Cultivo celular.....	15
Subfraccionamiento celular .....	15
Extracción de ARN y cuantificación.....	16
Transcriptasa inversa o retrotranscripción .....	17
Cuantificación RT-PCR.....	17
Resultados.....	17
Discusión .....	20
Bibliografía.....	22

## Resumen

Los microRNAs son fragmentos de RNA no codificantes que regulan la expresión génica. Son capaces de modular la expresión post-transcripcional de proteínas mitocondriales sintetizadas tanto por el ADN nuclear como el ADN mitocondrial.

La mitocondria tiene un papel fundamental en el control de vías metabólicas, cascadas de señalización, reacciones redox,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, síntesis de aminoácidos, hormonas y esteroides, además de la modulación de la apoptosis.

Los microRNAs son elementos potenciales para el pronóstico y diagnóstico de patologías. En este trabajo hemos realizado una revisión exhaustiva de los miRNAs mitocondriales, los mitomiRs, descritos hasta la fecha y hemos explorado experimentalmente si el miR-1275, previamente identificado por el grupo receptor asociado a pronóstico funcional del ictus, ejerce su función reguladora en la mitocondria. Para ello realizamos un subfraccionamiento celular, aislando las fracciones nucleares, citosólicas, retículo endoplasmático (ER), membranas asociadas a mitocondria (MAM) y a ER (MEM) y mitocondrias. En cada fracción celular se analizó la expresión de miR-1275. Los resultados de expresión descartan que en normoxia miR-1275 se localice en la mitocondria. . Se propone por tanto un estudio complementario sometiendo las células a condiciones de hipoxia.

## Introducción

### Concepto mitomiR

Los microRNA (miRNA) son pequeños RNAs no codificantes. Son reguladores de la expresión génica, pueden unirse específicamente a zonas de origen de replicación, median la degradación, reprimen la translación y estabilizan sus mRNA diana. Los miRNAs tienen un papel importante en los mecanismos de regulación celular, por lo se han visto implicados en múltiples procesos patológicos.

Los miRNA son fragmentos de RNA que codifican los organismos eucariotas tanto animales como plantas. El mecanismo de los miRNAs es importante para los cambios específicos en la expresión de mRNA diana que influyen en los procesos biológicos específicos como la proliferación, la apoptosis y la diferenciación celular.

Los microRNAs que se encuentran en el interior de las mitocondrias se denominan mitomiRs. Pueden modular la expresión post-transcripcional de proteínas codificadas por el ADN mitocondrial (ADNmt), aunque también se han asociado a regulación post-traducciona.

La localización mitocondrial de miRNAs ha ganado relevancia ya que se ha observado que las poblaciones de mitomiR se ven modificadas a lo largo del ciclo celular. Se ha demostrado en células endoteliales humanas que mitomiR-181a , 34a y 146a se encuentran sobreexpresados y localizados en el interior de mitocondrias de células que presentan senescencia replicativa en comparación a células juveniles (Giuliani et al., 2018).

La mayoría de miRNAs se encuentran codificados por intrones, sin embargo se encuentran también en los exones. La secuencia del miRNA es complementaria al lugar diana del mRNA, regulando así la expresión génica.

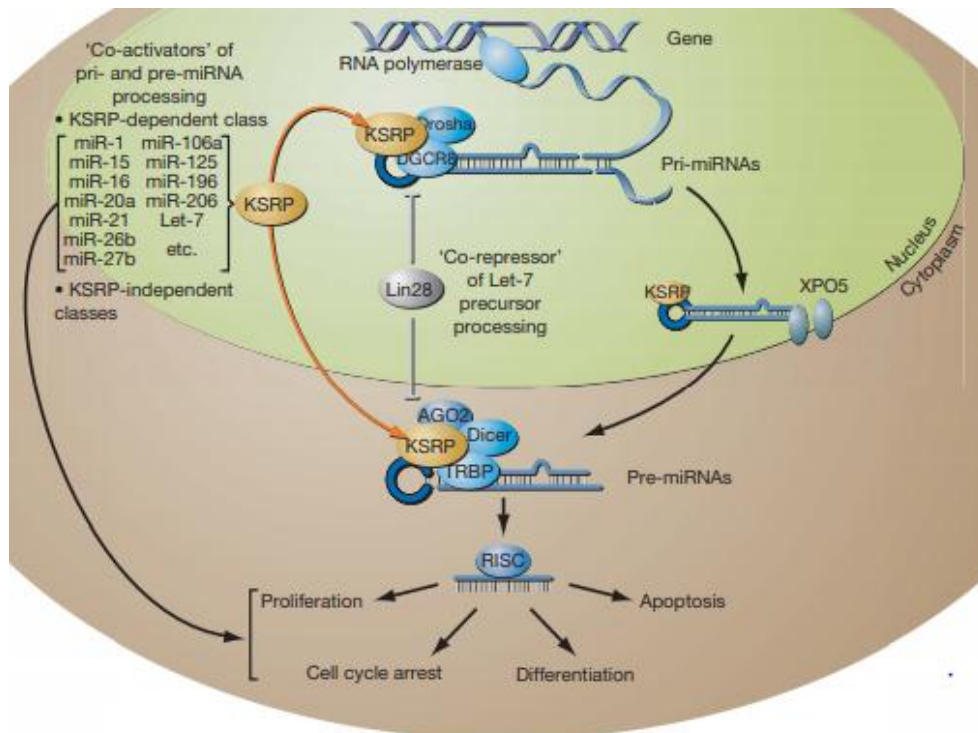
### Biogénesis de miRNA

La biogénesis de miRNA (Figura 1) se inicia en el núcleo con la transcripción del miRNA sobre su gen correspondiente, por la RNA polimerasa II, dando lugar a miRNA primario (pri-miRNA). Pri-miRNA tiene un bucle (stem-loop) en su estructura. Drosha, enzima RNAsa III, se adhiere a pri-miRNA para formar el miRNA precursor (pre-miRNA) cortando el stem-loop. DGCR8 o Pasha es un enzima que junto con Drosha participan en la maduración del pri-miRNA en el núcleo. El pre-miRNA de 61-65 nucleótidos de longitud será exportado al citosol por la carioferina exportina 5 (EXP5) dependiente de RanGTP. EXP5 además de permitir al miRNA atravesar el poro nuclear, lo protege de la degradación nucleolítica (Yi, Qin, Macara, & Cullen, 2010). Una vez en el citoplasma Dicer, una ribonucleasa multidominio, se une a pre-miRNA participando en la formación del dúplex de miRNA que posteriormente será separado dando lugar a un miRNA maduro de una sola cadena. La unión de Dicer a pre-miRNA se da específicamente a través de dos nucleótidos añadidos por Drosha (H. Zhang, Kolb, Jaskiewicz, Westhof, & Filipowicz, 2004). Dicer posee un dominio N-terminal con función helicasa que interacciona con el bucle terminal separándolo por el extremo 5'.

Dicer puede asociarse a proteínas (TRBP o PACT) que poseen dominios dsRBD (dominio de unión de doble cadena) por los cuales se unen a los sustratos de pre-miRNA y al dominio helicasa N-terminal de Dicer. En función a los desajustes en el apareamiento de bases entre proteínas asociadas y pre-miRNA se crean unas isoformas u otras (Zhu, Kandasamy, & Fukunaga, 2018). Los miRNA maduros obtenidos dependen de la proteína asociada que se une a Dicer.

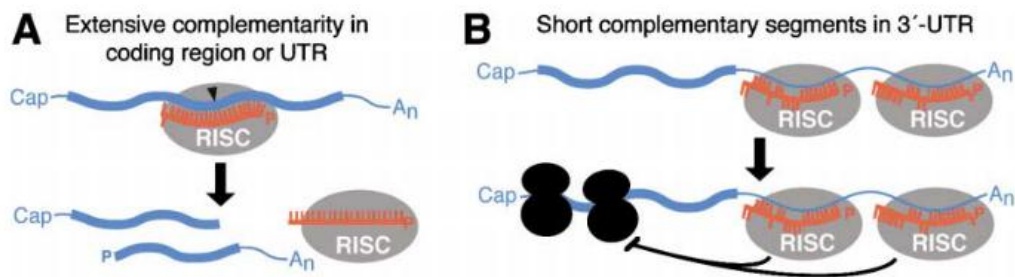
TRBP tiene un papel importante en el proceso de maduración de pre-miRNA, puesto que su pérdida está asociada a patologías como cáncer y enfermedades cardíacas. (Ding et al., 2015)

Argonata se une al dúplex de RNA creado por Dicer, formando con múltiples proteínas un complejo llamado pre-RISC. La supresión mediada por endonucleasa C3PO de una cadena “pasajera” de miRNA forma el RISC maduro. La secuencia de miRNA es reordenada por chaperonas (HSC70-HSP90) en forma de  $\alpha$ -hélice para facilitar la búsqueda de la secuencia complementaria objetivo. El complejo RISC reconoce el mRNA por la similitud en la región 3' no codificante (3'UTR, por sus siglas en inglés untranslated region). Esta unión da lugar a la degradación del mRNA diana o la inhibición de su traducción.



**Figura 1.** Esquema biogénesis y funciones de miRNA.

La complementariedad entre el complejo RISC y el gen diana causa el silenciamiento de genes de dos posibles formas (Figura 2). Cuando la complementariedad de bases entre la secuencia del miRNA y el ARNm diana es del 100% provoca la degradación del ARNm, es más específica; en cambio si dicha complementariedad no es del 100% provoca la represión reversible de la traducción (Bartel, 2004). Este proceso hace aumentar los potenciales genes diana, así un mismo miRNA puede regular la expresión de diferentes genes.

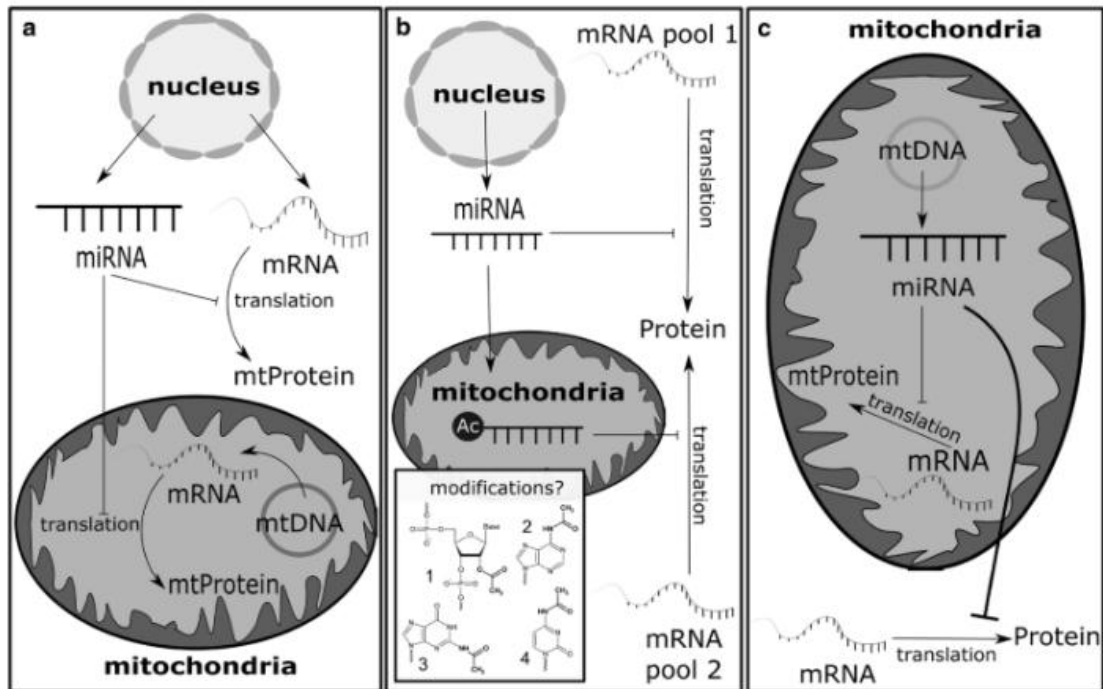


**Figura 2.** Posibles mecanismos de unión complementaria entre RISC y mRNA.

La biogénesis de miRNA debe ser regulada por mecanismos específicos para realizar una función eficiente que cubra las necesidades celulares. La proteína KSRP interviene en los procesos de maduración del pri-miRNA y pre-miRNA junto con Drosha y Dicer, de un grupo de miRNA humano (Trabucchi et al., 2009). KSRP se une al bucle terminal del pre-miRNA y promueve su maduración.

Los miRNAs que regulan la expresión de proteínas mitocondriales se les denomina mitomiRs. Se diferencian tres tipos de mitomiRs (Figura 3) según el lugar de acción y su origen (Geiger & Dalgaard, 2017). Así distinguimos: 1. miRNA que silencian la transcripción de un mRNA citosólico que transcribe para alguna proteína mitocondrial; 2. Los mitomiRs propiamente dichos son aquellos que ejercen su función en la matriz mitocondrial. En el mecanismo de importe mitocondrial interviene Ago2 que es la proteína transportadora, a través de los canales de membrana mitocondrial TOM (outer mitochondrial membrane) y TIM (inner mitochondrial membrane). La presencia de Ago2 en mitocondrias de células hepáticas está mostrado científicamente (Bian et al., 2010). 3. Y el tercer tipo de miRNA relacionado con mitocondria es aquel que está codificado por el DNA mitocondrial y puede ejercer su función en el interior de la mitocondria o se trasloca al citosol dónde modulará la traducción de un gen nuclear.

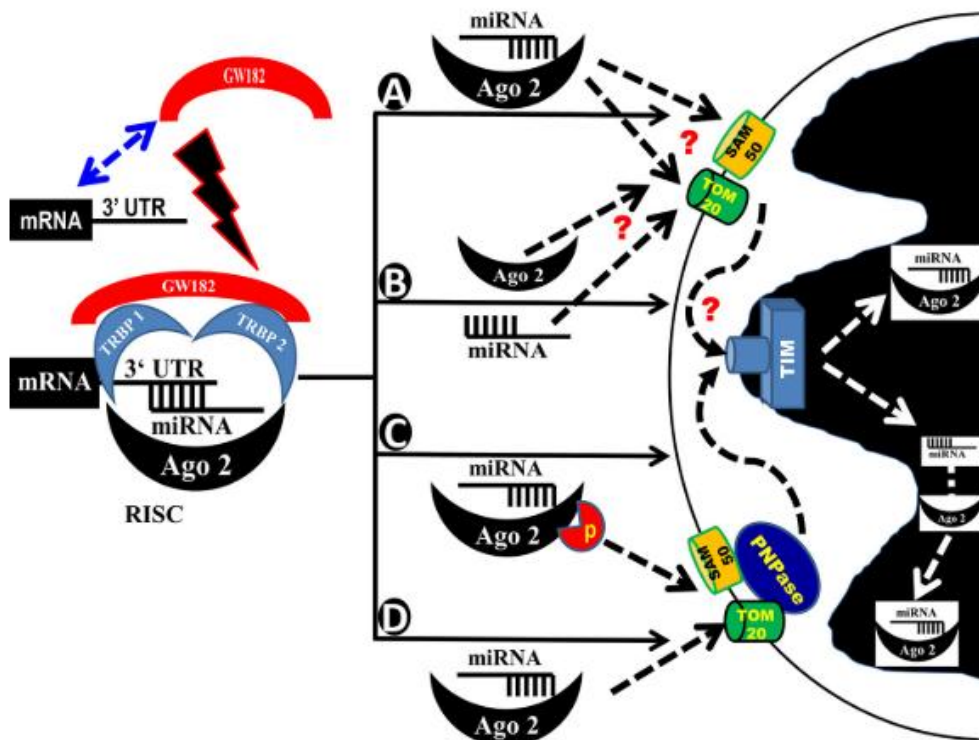




**Figura 3.** Posibles formas de actuar de mitomiRs (Geiger & Dalgaard, 2017).

### Migración de miRNAs a mitocondria

Los miRNAs codificados por DNA nuclear deben ser translocados a la mitocondria. El mecanismo de migración hacia la matriz mitocondrial no está completamente descifrado. Un estudio propone cuatro posibles formas de trasladar los mitomiRs (Figura 4). A: la argotina libre 2 (Ago2) y el miRNA del RISC ingresan a través de los poros SAM50 o TOM20 en la membrana mitocondrial externa. El puerto de entrada de la membrana mitocondrial interna, como TIM, puede permitir que Ago2 y miRNA entren en la matriz mitocondrial. La entrada a través de SAM50, TOM20 o TIM no se ha descrito completamente. B: sigue existiendo cierta controversia sobre si Ago2 y miRNA entran por separado o en una formación compleja. C: las modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, pueden movilizar el complejo Ago2-miRNA. Esto puede ayudar a que un miRNA se traslade a la mitocondria. Alternativamente, la fosforilación de Ago2 en el sitio Y529 puede liberar miRNA de RISC en el citoplasma, lo que da como resultado la vía descrita en B. D: estudios recientes también han destacado que el complejo Ago2:miRNA puede ingresar a través de la membrana mitocondrial externa con ayuda de polinucleótido fosforilasa (PNPasa). PNPase también puede ayudar al complejo Ago2:miRNA a través de la membrana mitocondrial interna.



**Figura 4.** Posibles mecanismos de importe de miRNA a la mitocondria (Macgregor-Das & Das, 2018). 3'UTR= región 3' no-traducida.

## Objetivos

El grupo receptor identificó un potencial mitomiR asociado a pronóstico funcional del ictus, miR-1275. Debido a este hallazgo se ha plantearon los siguientes objetivos:

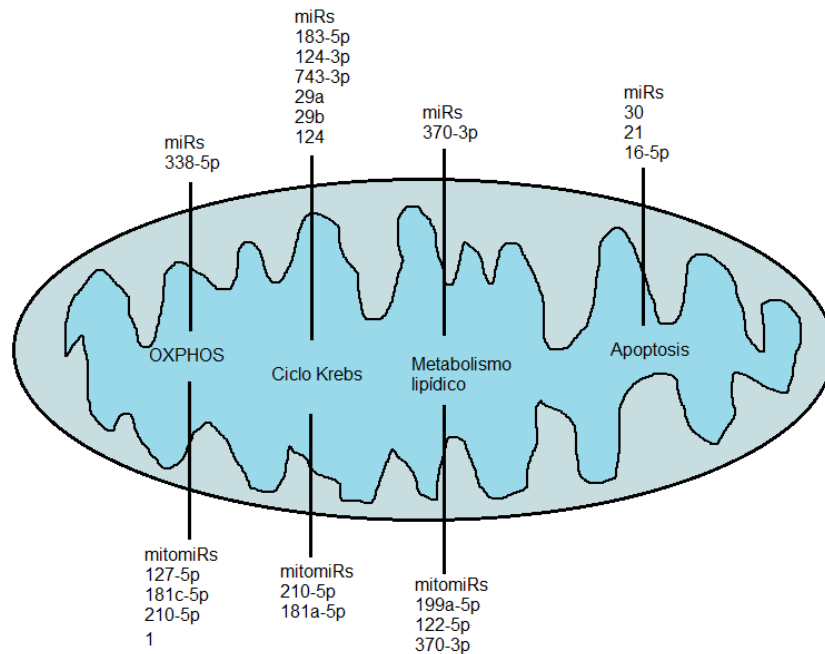
O.1. El principal objetivo de este trabajo ha sido revisar la literatura acerca de los miRNAs que regulan función mitocondrial, poniendo especial énfasis en aquellos que ejercen su función dentro de la mitocondria, los conocidos específicamente como mitomiRs.

O.2. Mediante un procedimiento experimental basado en subfraccionamiento celular seguido de análisis de expresión génica por RT-PCR pretendemos demostrar que miR-1275 es un mitomiR.

### O.1. mitomiRs identificados en la literatura

La mitocondria tiene un papel fundamental en el control de vías metabólicas, cascadas de señalización, reacciones redox,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, síntesis de aminoácidos, hormonas y esteroides, además de la modulación de la apoptosis (Figura 5). La mitocondria

es la mayor productora de energía en forma de ATP gracias al sistema de fosforilación oxidativa, (OXPHOS). Otra función vital que desarrolla la mitocondria, en conjunción con el retículo endoplasmático es la homeóstasis del calcio.



**Figura 5.** Esquema de los miRNAs mitocondriales clasificados según los procesos que regulan.

El estudio de miRNAs de otras especies es útil para poder aplicar posteriormente posibles terapias con miRNAs. Se han descrito numerosos miRNAs en hígado de rata y ratón, además de miRNAs en la especie humana en células musculares y línea celular HeLa usada en investigación (Figura 6).

Adult rat liver	Mouse liver	Human myotubes	HeLa cell line
miR-130a	miR-122	miR-720	miR-1973
miR-130b	miR-805	miR-133b	miR-1275
miR-140*	miR-690	miR-1974	miR-494
miR-320	miR-689	miR-24	miR-513a-5p
miR-494	miR-494	miR-133a	miR-1246
miR-671	miR-705	miR-125a-5p	miR-328-5p
miR-202	miR-721	miR-1979	miR-1908
miR-705	miR-720	miR-103	miR-1972
miR-709	miR-188-5p	miR-125b	miR-1977
miR-721	miR-101	miR-103	miR-638
miR-761	let-7f	miR-221	miR-1974
miR-763	miR-711	miR-23a	miR-1978
miR-198	miR-432	let-7b	miR-1201
miR-765	miR-181b	miR-423-3p	
	miR-361-5p	miR-106a	
	miR-680	miR-23b	
	miR-181d	miR-92a	
	miR-29c	miR-193b	
	miR-29a	miR-365	
	miR-762	miR-93	

**Figura 6.** miRNAs identificados en mitocondrias de diferentes tipos celulares (P. Li, Jiao, Gao, & Prabhakar, 2012).

Los miRNAs asociados a patología se estudian en los diferentes tipos celulares y tejidos. Un estudio describió los miRNAs mitocondriales que aumentan o disminuyen en diferentes patologías humanas (Figura 7).

miRNA	Tissue/organ	Disease/condition	Regulation
miR-181c	Heart Pancreas	Heart failure Type 2 diabetes Aging	Up-regulation
miR-1	Skeletal muscle Heart	Hypertrophy Myocardial infarction/arrhythmias	Down-regulation
miR-338	Brain	—	Up-regulation
miR-743a	Brain, hippocampal cells	Alzheimer's disease	Down-regulation
miR-210	Placenta	Hypoxia	Up-regulation
miR-23 a/b	B-Lymphoma, prostate	Cancer	Up-regulation
miR-15a	Pancreas	Type 2 diabetes	Up-regulation
miR-126	Breast	Cancer	Down-regulation
miR-696	Skeletal muscle	Metabolic disorders	Down-regulation
miR-101	Breast	Cancer	Down-regulation
miR-204	Heart	Ischemic heart disease	Down-regulation
miR-30a	Brain Breast, lung	Cerebral ischemia Cancer	Down-regulation
miR-137	Brain	Hypoxia/mitophagy	Down-regulation

**Figura 7.** miRNAs identificados en mitocondrias de diferentes tipos celulares y patologías asociadas (Srinivasan & Das, 2015).

### miRNAs reguladores del Sistema OXPHOS

Entre los miRNAs que modulan la traducción de proteínas que intervienen en la cadena de transporte de electrones destaca miR-338. En células de rata se demostró que miR-338 participa en la regulación de la respiración axonal mediante la modulación de los niveles de COXIV, proteína que desempeña un papel clave en el ensamblaje del citocromo c oxidasa mitocondrial, complejo IV (A. Aschrafi et al., 2008). El miR-388 también modula la expresión de ATP5G1, que codifica para la subunidad c de la ATPasa. A través de este control dual de OXPHOS sobre COXIV y subunidad c, miR-338 controla los niveles de ROS axonales y el crecimiento axonal (Armaz Aschrafi et al., 2012).

Otro miRNA que se ha descrito como regulador de la actividad ATPasa mitocondrial es miR-127-5p, controlando la expresión de la subunidad catalítica de la ATPasa, la subunidad  $\beta$  (Willers, Martínez-Reyes, Martínez-Diez, & Cuezva, 2012). Dicha subunidad  $\beta$  se encuentra altamente expresada en etapas de desarrollo de hígado humano y muy reducida en etapas adultas. Por lo tanto miR-127-5p tiene un papel importante en la regulación de la diferenciación bioenergética de las mitocondrias del hígado humano.

En miocitos cardíacos se demostró que miR-181c modula OXPHOS silenciando el ARNm de mt-COX1. La sobreexpresión de miR-181c reduce los niveles de mt-COX1 y aumenta mt-

COX2 y mt-COX3. Estos niveles diferenciales de la familia de COX provocan una conformación remodelada del complejo IV. Este desequilibrio del complejo IV provoca producción de ROS excesiva, que daña el miocardio (Das et al., 2012). Otro miRNA que modula la expresión de DNA mitocondrial es miR-1. Sus genes diana son COX-1 y ND1, ambos dependen de la proteína Ago2 para su transporte al interior de la mitocondria (X. Zhang et al., 2014).

En situaciones de hipoxia, OXPHOS necesita ser inhibido ya que el oxígeno es el sustrato final de la cadena de transporte de electrones. Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) activa la expresión de miR-210 en respuesta a hipoxia. La sobreexpresión de miR-210-5p disminuye los niveles de ISCU1 e ISCU2. ISCU1/2 son proteínas mitocondriales de andamiaje para la síntesis de novo de grupos de hierro-azufre (Fe-S) requeridos para la maduración de proteínas mitocondriales. Los grupos Fe-S están involucrados en la actividad de la aconitasa y en el complejo IV de OXPHOS, controlando por tanto la cadena de transporte de electrones y el Ciclo de Krebs (S. Y. Chan & Loscalzo, 2010)

### **miRNAs reguladores del Ciclo de Krebs**

El ciclo de Krebs se da en la matriz mitocondrial. Los miR-183 y miR-743a regulan la glicolisis mediante la unión a la región 3'UTR de la isocitrato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa, respectivamente (Novák, Kružliak, Bienertová-Vaškú, Slabý, & Novák, 2014)

En células- $\beta$  pancreáticas se encontró que miR-29a, miR-29b y miR-124 regulan la expresión del transportador monocarboxilato 1(MCT1), de membrana plasmática (Pullen, da Silva Xavier, Kelsey, & Rutter, 2011). El transportador MCT1 junto con la lactato deshidrogenasa aseguran que el piruvato de la lactosa se metabolice de forma eficaz en la mitocondria.

### **miRNAs reguladores de la vía intrínseca de la apoptosis**

La apoptosis celular o muerte programada es un proceso donde la mitocondria tiene un papel clave. Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan la liberación de otras proteínas como citocromo c que activan la vía intrínseca de la apoptosis. Procesos como la fisión mitocondrial también son importantes para la activación de la apoptosis (J. Li et al., 2010). miR-30, regula la expresión de p53, proteína que responde a daño genotóxico y a otros estímulos pro-apoptóticos. p53, a su vez modula la expresión de la proteína de fisión mitocondrial dynamin-related protein-1 (Drp1), promoviendo así la fisión mitocondrial para la apoptosis (Bian et al., 2010). Otra proteína implicada en fisión mitocondrial, Fis1, se ha

encontrado modulada por miR-499 en cardiomiocitos, y su sobre-expresión se ha asociado a gravedad del infarto de miocardio y a disfunción cardíaca inducida por isquemia (Wang et al., 2011). miR-16 también se ha descrito asociado a la inducción de apoptosis regulando la expresión de p53 (Tian et al., 2016).

Otro miRNA que modula la vía intrínseca de la apoptosis es miR-21. miR-21 inhibe la expresión de diferentes proteínas diana como la proteína de muerte celular 4, p53 y las caspasas 3 y 7 (J. A. Chan, Krichevsky, & Kosik, 2005; Frankel et al., 2008) evitando que se inicie la apoptosis.

### **miRNAs reguladores del metabolismo lipídico**

Otra función conocida de mitomiRs es su participación en el metabolismo de lípidos. Se demostró que miR-199a-5p silencia la expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos mitocondriales, inhibiendo la expresión de caveolina (CAV1) y con ello la vía de señalización PPAR $\alpha$  (proliferador peroxisoma- receptor activado  $\alpha$ ) (B. Li et al., 2014).

El control del metabolismo del colesterol es un objetivo actual debido a su implicación en patologías vasculares. En este contexto se ha identificado miR-33a/b, como modulador del transportador de colesterol ABCA1 (Rayner et al., 2011). . El miR-122-5p está relacionado con la síntesis de colesterol. Se demostró en roedores la reducción de colesterol plasmático, el aumento de la actividad de la oxidación hepática y la tasa de síntesis de colesterol con la inhibición de miR-122 (Esau et al., 2006). Los miRNAs son fragmentos de RNA presentes desde el desarrollo embrionario. Estudios sugieren que el consumo materno de una dieta rica en ácidos grasos tiene consecuencias en el metabolismo temprano de los lípidos de la descendencia. Se modula además la expresión de los genes relacionados con la  $\beta$ -oxidación hepática y el miRNA que puede contribuir a las alteraciones metabólicas en la vida adulta. Un miRNA conocido es miR-370, que regula directamente los niveles de Carnitina Palmitoyltransferasa 1A (CPT1a), que controla el paso limitante de la velocidad en la oxidación de ácidos grasos (Benatti et al., 2014).

### **miR-1275**

La metilación de DNA, modificaciones de histonas y la estructura de eucromatina y heterocromatina son procesos importantes para la regulación de la expresión de genes. Las proteínas Polycomb (Pc) desempeñan un papel en el silenciamiento de genes, actúan en complejos y gobiernan los perfiles de metilación de histonas de una gran cantidad de genes que regulan varias vías celulares (Golbabapour, 2013). Un estudio demostró que la ganancia de histona H3 lisina 27 trimetilada en el promotor primario del microRNA-1275

estaba estrechamente asociada con la expresión de miR-1275. El mecanismo de silenciamiento mediado por Pc regula por tanto la expresión de miR-1275. Este miR-1275 se ha identificado como regulador de la proteína oligodendroglial Claudina 11 en células madre cancerígenas. La inhibición de miR-1275 en células cancerígenas incrementó la expresión de claudina 11 acompañado de la supresión de crecimiento (Katsushima et al., 2012).

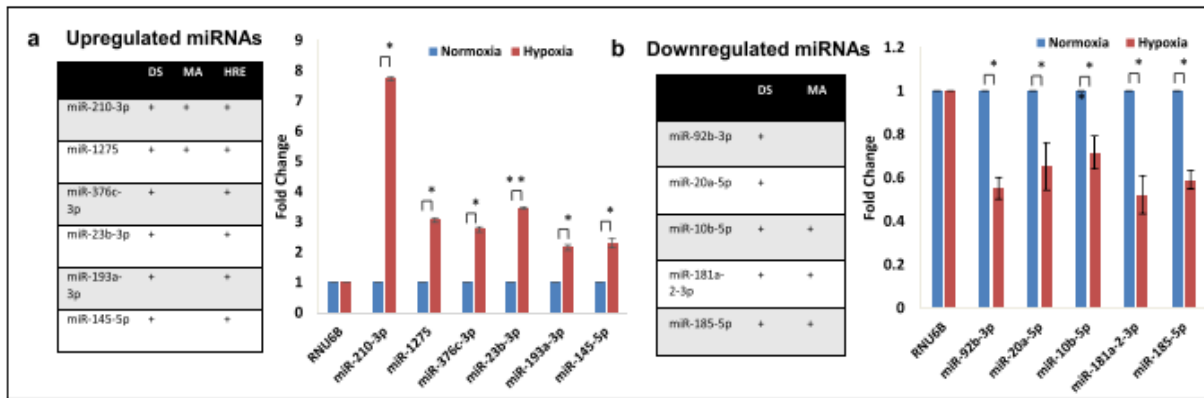
Los procesos cancerosos alteran las vías de señalización, provocando desequilibrios en el metabolismo y proliferación celular. La proteína IGF-1 promueve el crecimiento y metástasis del carcinoma hepatocelular inhibiendo la degradación de cathepsina b (Lei & Ling, 2015). La cathepsina b interviene en el crecimiento y proliferación de células cancerígenas, la angiogénesis, la invasión y metástasis (Aggarwal & Bonnie, 2014). El carcinoma hepatocelular cursa con la vía del factor de crecimiento de insulina (IGF) alterada. miR1275 tiene la capacidad de reducir la proliferación de células tumorales, ya que controla parcialmente el crecimiento celular regulando las proteínas de unión al factor de crecimiento de insulina (IGF2BPs) y al receptor de IGF1, IGF1R (Fawzy et al., 2015).

### **miR-1275 e hipoxia**

Estudios recientes del grupo receptor han identificado miR-1275 diferencialmente expresado en pacientes que han sufrido un ictus isquémico. Pacientes con buen pronóstico funcional a los tres meses del ictus tienen niveles plasmáticos de miR-1275 significativamente más elevados que aquellos pacientes que evidencian marcada discapacidad (resultados sin publicar).

En respuesta a hipoxia los miRNAs se expresan de forma diferente. Agrawal (2014) demostró que miR-210-3p, miR-1274, miR-376c-3p, miR-21b-3p, miR-193a-3p y miR-145-5p aumentan la expresión en respuesta a hipoxia. Además miR-92b-3p, miR-20a-5p, miR-10b-5p, miR-181a-2-3p y miR-165-5p se expresan en menor cantidad en respuesta a hipoxia (Figura 8). Se encontró que estos miRNAs poseen elementos de respuesta a HIF1A en sus promotores estando regulados así por HIF1A.

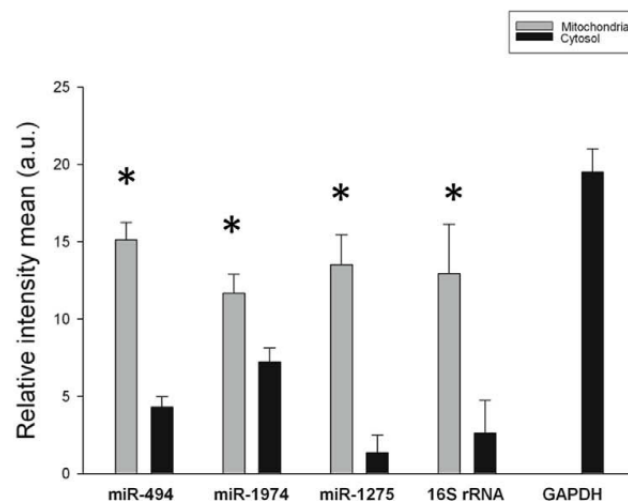




**Figura 8.** Datos cuantitativos de RT-PCR muestran los niveles de miRNAs en respuesta a hipoxia o HIF1A. Gráfico que muestra los miRNAs regulados al alza (a) o a la baja (b) en respuesta a hipoxia. Los puntos de datos gráficos representan la media  $\pm$  desviación estándar (SD) de al menos tres experimentos independientes. (\*  $P > 0.01$  y  $< 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ). Las barras de error denotan  $\pm$  SD. relacionadas con la hipoxia (Agrawal et al., 2014).

### miR-1275 mitocondria

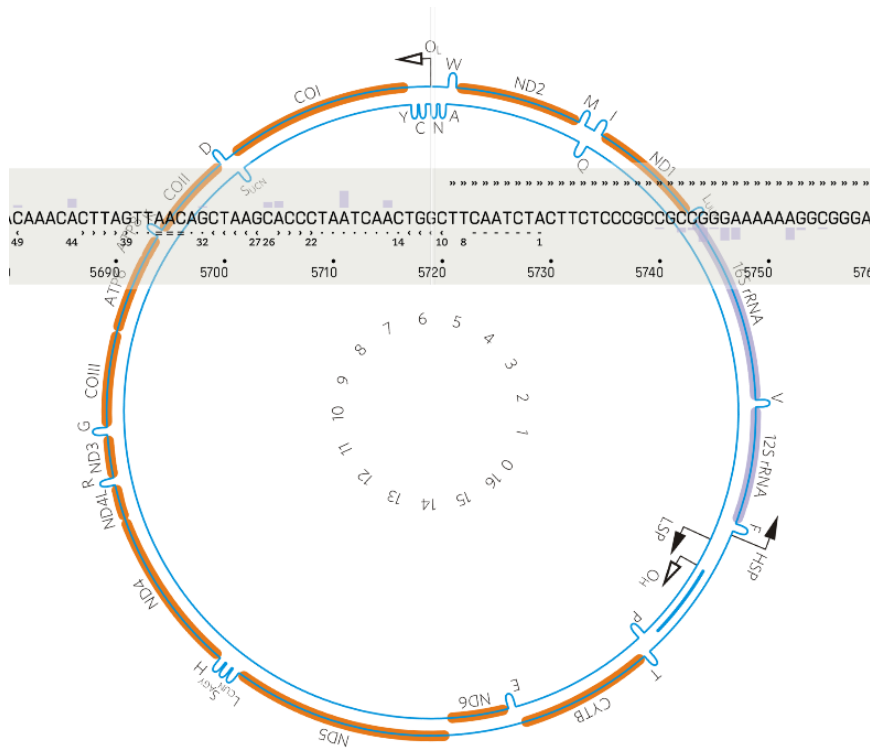
La secuencia de miR-1275 maduro (GUGGGGGAGAGGCUGUC) es de 17bp, tamaño compatible con el de mitomiRs, y en estudios de genotipado masivo de RNAs ha sido encontrado enriquecido en mitocondria. Estudios demuestran que miR-1275, miR-1974 y miR-494 se expresan de forma significativamente diferente en mitocondria y en citosol (Bandiera et al., 2011) (Figura 9).



**Figura 9.** Validación con microarray mediante PCR-RT. Expresión diferencial en citosol y mitocondria. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre citosol y mitocondria (Bandiera et al., 2011)



El DNA mitocondrial es circular y codifica para 13 polipéptidos componentes del sistema OXPHOS (Figura 10). El equipo de investigación realizó análisis bioinformáticos con el programa mitoWheel (mitowheel.org), los cuales predicen que miR-1275 tiene 24 regiones de homología de secuencia en el mtDNA, sugestivos de ser secuencias reguladoras para este miRNA.



**Figura 10.** Base de datos y plataforma de estudios bioinformáticos de DNA mitocondrial (mitoWheel).

## O.2. ¿ Es miR-1275 un mitomiR que ejerce su función reguladora en la mitocondria?

Los hallazgos anteriormente expuestos plantean la posibilidad de que miR-1275 regule la expresión génica mitocondrial. Para confirmar dicha pregunta se realizó un subfraccionamiento celular y se analizó la expresión génica de miR-1275 en los diferentes subcompartimentos celulares.

## Metodología

### Cultivo celular

Se cultivaron células SH-SY5Y, derivadas de neuroblastoma humano en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 4,5g/l Glucosa y L-Glutamina (Biowest) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (GIBCO), 1% de piruvato sódico (GIBCO), 1% de antibióticos penicilina/estreptomina (GIBCO) y 1% de antimetabólico Fungizone (GIBCO). Se hicieron subcultivos cuando la confluencia celular era superior al 80%. El procedimiento se inició con la retirada del medio y posterior lavado con 3 ml de tampón fosfato salino (PBS). Se retiró el PBS y se añadieron 3 ml de tripsina-EDTA (0,25%). Se incubaron 3 min para disociar las células del soporte. Para la inactivación de la actividad proteasa se añadieron 3 ml de medio DMEM y se recogió el volumen en un tubo falcon.

Se centrifugó el tubo con las células recogidas a 1800 rpm durante 3 min obteniendo el pellet de nuestras células. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio de cultivo DMEM. La suspensión de células se dividió en las nuevas botellas de cultivo y se incubaron a 37°C.

### Subfraccionamiento celular

60 millones de células se recogieron por tripsinización. Una vez centrifugadas a 1000 g para obtener el pellet, se resuspendieron en 2 ml de mitoBuffer (10mM Tris (hidroximetil aminometano); 0,2mM EDTA; 0,25M sacarosa; pH 7.8.). La suspensión se transfirió a un homogeneizador de vidrio-teflón Potter Elvehjem pre-enfriado. Se realizaron 25-30 movimientos ascendentes y descendentes para romper las membranas celulares. A continuación se realizaron sucesivas centrifugaciones a 4°C de temperatura. Con la primera centrifugación a 1000 g durante 10 min se obtuvo un pellet compuesto de núcleo y restos celulares. Se separó el sobrenadante (S1) y se volvió a resuspender el pellet (P1) sometiendo a centrifugación idéntica, guardando el sobrenadante. El sobrenadante (S2) obtenido de las sucesivas centrifugaciones del pellet inicial se sometió a la segunda centrifugación a 1000 g durante 15 min. El sobrenadante (S3) obtenido se centrifugó a 100000 g durante 60 min obteniendo un nuevo pellet (P2) compuesto por fragmentos grandes de retículo endoplasmático, mitocondrias y otros pequeños organelos y vesículas.

A partir de esta fracción se procedió al subfraccionamiento celular aislando citosol, retículo endoplasmático (RE), MER (Mitochondrial ER Membrane), mitocondrias, MAM (Mitochondrial Associated Membranes) y núcleo de las células cultivadas.

El contenido de pellet (P2) se resuspendió encima de un gradiente de Percoll al 30%, se centrifugó a 95000 g durante 30 min en una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima LE-80K utilizando el rotor oscilante SW 41 Ti, y obteniendo dos bandas. La banda inferior está compuesta de mitocondrias libres de RE. La banda superior está compuesta de MAM y mitocondrias adjuntas.

Se recogieron las bandas con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio, se eliminó el percoll con limpiados sucesivos y se diluyó el contenido de la banda en buffer de homogeneización. Se centrifugaron las dos partes a 8000 g durante 10 min.

De la banda inferior se obtuvo un nuevo pellet (P3) por centrifugación a 8000 g, que se resuspendió y se eliminó el exceso de percoll. Se centrifugó de nuevo y se obtuvieron un pellet (P4) que contiene mitocondrias libres de RE.

De la banda superior se obtuvo un nuevo pellet (P4) por centrifugación a 8000 g durante 10 min, se resuspendió y se sometió a centrifugación a 8000 g durante 10 min obteniendo un pellet (P5) que contiene la fracción de mitocondrias asociadas a retículo endoplasmático (MER). El sobrenadante de la primera centrifugación de la banda superior (S4) se centrifugó a 100000 g durante 60 min obteniendo un pellet (P6) compuesto por mitocondrias asociadas a membrana retículo endoplasmático (MAM).

### **Extracción de ARN y cuantificación**

El ARN total se extrajo a partir de las diferentes subfracciones con el kit E.Z.N.A Total RNA kit I (OMEGA), siguiendo el protocolo comercial. El pellet de cada subfracción se resuspendió en 350  $\mu$ l de TRK Lysis Buffer para destruir los orgánulos y liberar el material genético. Se utilizó un vórtex para homogeneizar la muestra. Se añadió 350  $\mu$ l de etanol 70% y se volvió a vortear. A continuación, se insertó una HiBind RNA Mini Column en un tubo colector de 2 ml, ambos proporcionados por el kit. La muestra (700  $\mu$ l) se transfirió a la columna y se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto, seguidamente se descartó el filtrado y se reusó el tubo colector. Se añadieron 500  $\mu$ l de RNA Wash Buffer I y se volvió a centrifugar a 10.000 g durante 30 segundos. Se descartó el filtrado y se reutilizó el tubo colector de nuevo. Se repitió dos veces el mismo procedimiento con el RNA Wash Buffer II diluido con etanol 100%, pero centrifugando durante 1 minuto. Después se centrifugó la mini columna a velocidad máxima durante 2 minutos para secar la columna y eliminar los restos de etanol. Por último, se transfirió la mini columna a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml, se añadieron 50  $\mu$ l de agua libre de DNAsas y RNAsas (DEPC) y se volvió a centrifugar a velocidad máxima durante 2 minutos, así se pasó el ARN contenido en el filtro al tubo eppendorf. Se cuantificó la concentración de ARN ( $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) mediante el nanodrop (NanoVue

Plus), midiendo la absorbancia (Abs) a 260nm, y la pureza del RNA con el cociente Abs260nm/Abs280nm. Para conservar el ARN se guardó en un ultracongelador a -80 °C.

### **Transcriptasa inversa o retrotranscripción**

El ARN total se pasó a DNA complementario (cDNA) por transcripción inversa mediante el kit SensiFast™ cDNA Synthesis Kit (Bioline). Se realizó una master mix en hielo para evitar la degradación del ARN. 1000 ng de ARN se mezclaron con 4 µl de TransAmp Buffer, 1 µl de enzima transcriptasa inversa y los µl de agua DEPC restantes para llegar a 20 µl totales de mix. La mix se hizo en un tubo eppendorf de microcentrífuga de 100 µl. Se introdujeron los tubos de microcentrífuga en un termociclador (T Professional Thermocycler, Biometra). El programa para la reacción de la transcriptasa inversa incluía: 10 min a 25 °C, 15 min a 42 °C, 15 min a 48 °C, 5 min a 85 °C y se mantiene a 4 °C. Una vez completada la reacción puede conservarse el cDNA en un congelador a -20 °C.

### **Cuantificación RT-PCR**

Los niveles de expresión de miR-1275 se determinaron por RT-PCR en cada una de las fracciones aisladas, utilizando el termociclador BioRad CFX96 Real-time System C1000 Touch™ Thermal Cycles. Se usó el kit miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit de QIAGEN, con el fluoróforo SYBR 2x. Para amplificar miR-1275 se utilizó el cebador 5'GUGGGGGAGAGGCUGUC , y la temperatura de hibridación fue de 52,7°C. Como miRNA normalizador se utilizó miR-16-5p. La cuantificación se basó en el método de normalización de microRNA RT-PCR data (Qureshi & Sacan, 2013).

### **Resultados**

Los resultados de la cuantificación de miR-1275 y el control miR-16-5p se muestran en la Tabla 1. Se realizaron dos muestras por fracción celular. Se realizó una repetición del proceso de subfraccionamiento y cuantificación para confirmar los datos obtenidos (Tabla 2).

El número de ciclos requeridos para detectar la presencia de miR-1275 son superiores a miR-16-5p. El miR-1275 presenta un número de ciclos poco variable en las diferentes fracciones celulares. El citosol es la fracción donde miR-1275 se encuentra mayor cantidad, en la mitocondria es la fracción donde miR-1275 tiene menor presencia. El control con miR-16-5p muestra la presencia similar en las diferentes fracciones celulares, y una ligera elevación del número de ciclos en la fracción mitocondrial.

**Tabla 1.** Resultados de RT-PCR. Logaritmo del número de ciclos que se requieren para detectar el mi-RNA en cada una de las fracciones celulares analizadas.

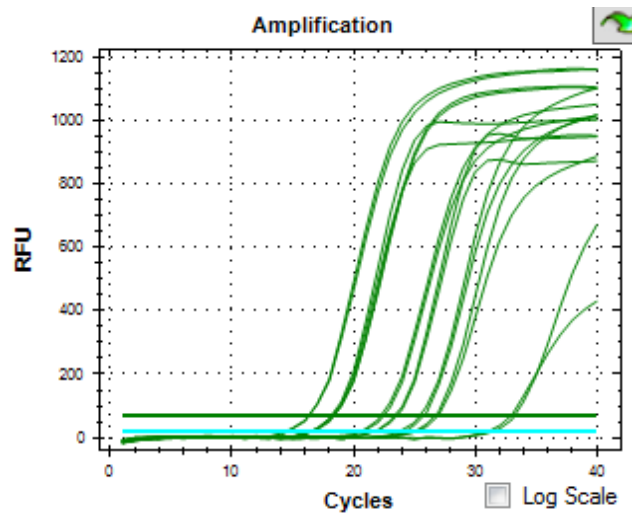
Target	Sample	Cq	Cq Mean	Target	Cq	Cq Mean
miR-1275	CITOSOL	30,58	30,51	miR-16-5p	19,46	19,50
miR-1275	CITOSOL	30,44		miR-16-5p	19,54	
miR-1275	ER	33,22	33,30	miR-16-5p	19,11	19,17
miR-1275	ER	33,38		miR-16-5p	19,23	
miR-1275	MER	33,24	33,21	miR-16-5p	19,09	19,11
miR-1275	MER	33,18		miR-16-5p	19,14	
miR-1275	MITOS	41,36	40,23	miR-16-5p	22,35	22,21
miR-1275	MITOS	39,10		miR-16-5p	22,06	
miR-1275	NUCLEO	29,72	30,20	miR-16-5p	19,67	19,57
miR-1275	NUCLEO	30,69		miR-16-5p	19,47	

**Tabla 2.** Repetición del experimento anterior

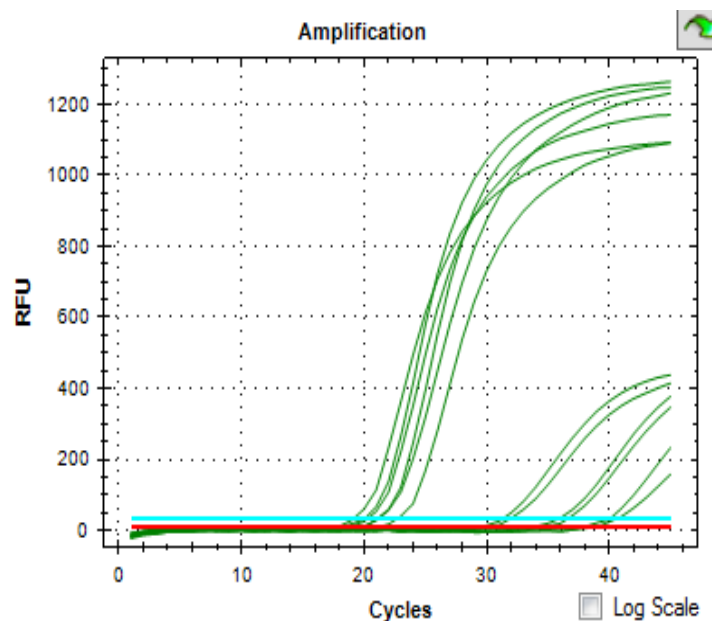
Target	Sample	Cq	Target	Cq
miR-1275	CITOSOL	30,40	miR-16-5p	20,32
miR-1275	ER	34,11	miR-16-5p	19,17
miR-1275	MER	34,86	miR-16-5p	21,21
miR-1275	MITOS	39,15	miR-16-5p	22,74
miR-1275	NUCLEO	29,65	miR-16-5p	20,09

Las RFU (unidades relativas de fluorescencia) se midieron a tiempo real durante PCR para detectar la presencia de los diferentes miRNAs. En las figuras 11 y 12 se muestran los ciclos donde comienza a detectarse la presencia de miRNA. En la Figura 11 se ve que hay dos muestras que requieren mayor número de ciclos para detectar fluorescencia. Las demás muestras presentan valores entre 20 y 35 ciclos. En la Figura 2 se ven dos grupos

diferenciados que se corresponden a la detección de miR-1275 y otro grupo que requiere menos ciclos miR-16-5p.



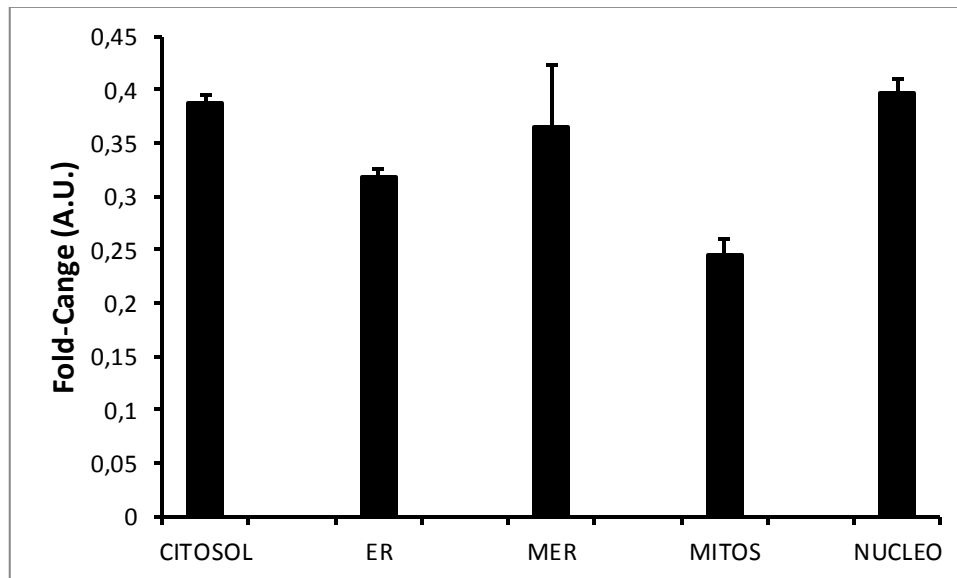
**Figura 11.** Representación de unidades de fluorescencia respecto a los ciclos de PCR.  
Primer análisis.



**Figura 12.** Representación de unidades de fluorescencia respecto a los ciclos de PCR.  
Repetición del análisis.

Los resultados mostraron cantidades similares de miR-1275 y miR-16-5p (control) en la mayoría de las subfracciones celulares, excepto en la fracción mitocondrial en donde miR-1275 empieza a amplificar pasado el ciclo 40, evidenciando que si está realmente presente en dicha fracción, lo está a muy baja cantidad. De hecho los valores de expresión relativa

sugieren que en esta fracción hay 40% menos de expresión de miR-1275 que en el núcleo o citosol. Tanto en ER como en MER hay 30% menos expresión de miR-1275 que en núcleo o citosol (Figura 13). Debido a la baja expresión generalizada de este miRNA en las células utilizadas para realizar este experimento, los resultados obtenidos cabe considerarlos con cautela. Este mismo experimento tendrá que repetirse en otra línea celular más fisiológica, como puede ser la línea celular derivada de microendotelio vascular cerebral humana hCMEMD3, y comparando condiciones de normoxia e hipoxia.



**Figura 13.** Expresión relativa de miR-1275 en las diferentes fracciones celulares analizadas.

Los resultados se muestran en cambio en la expresión comparada con el miRNA normalizador 16-5p. La cuantificación se realizó utilizando la fórmula  $FC = 2^{\log(Ct_{\text{muestra}} - Ct_{\text{normalizador}})}$ , propuesta por Qureshi & Sacan, 2013.

## Discusión

La revisión de la literatura de los miRNAs que regulan la función mitocondrial pone de manifiesto que los mitomiRs son una terapia potencial para tratamiento de patologías aun en estadios primarios de investigación. Existen incógnitas por descubrir, como el mecanismo de migración de los miRNAs a la mitocondria, además de todas las posibles dianas de un mismo miRNA. En este sentido, muy pocos genes diana se han comprobado por experimentación y entre los pocos descritos se ha observado que un mismo miRNA puede modular genes diferentes en función del tipo celular analizado.

Las bases de datos como TargetScan tratan de recoger todos los genes diana de los microRNAs y establecer una puntuación de fiabilidad.

Con el subfraccionamiento celular seguido de análisis de expresión génica por RT-PCR se pretendió demostrar que miR-1275 es un mitomiR, como se describe en algunos estudios (Bandiera et al., 2011). Los resultados obtenidos mostraron niveles de miR-1275 significativamente inferiores en mitocondria al compararlos con las demás fracciones celulares, y con valores de expresión en general muy bajos, amplificando muy tarde, hecho que sugiere que, si está presente en mitocondria, lo está a muy baja concentración. Estos resultados nos han llevado a replantear este mismo experimento cambiando la línea celular, apostando por una línea celular que en lugar de ser neuronal sea endotelial, como es el caso de hCMEM, derivada de microendotelio vascular cerebral, y a su vez comparar la expresión de miR-1275 en estado de normoxia y después de someter a estas células a hipoxia. De hecho se han descrito varios miRNAs que se expresan de forma diferencial en respuesta a hipoxia (Agrawal et al., 2014). El motivo de que miR-1275 no se haya encontrado enriquecido en la fracción mitocondrial podría deberse a que las células no se sometieron a hipoxia, y que en estas condiciones sea translocado a mitocondria para poder ejercer allí su función reguladora.

## Conclusiones

1. El papel de los mitomiRs en fisiología humana todavía está por descubrir. Actualmente no hay estudios concluyentes que demuestren cómo estos miRNAs entran en la mitocondria y menos aún cómo ejercen allí su función.
2. Lo que si se ha demostrado es que la expresión de los mitomiRs es modulable en función de ciertos estímulos ambientales como puede ser la hipoxia.
3. miR-1275 es un miRNA que se sobre-expresa en respuesta a hipoxia, tiene 24 secuencias de homología en el genoma mitocondrial, potenciales de ser dianas de modulación.
4. Nuestros estudios experimentales no han demostrado que miR-1275 este enriquecido en la fracción mitocondrial en células de neuroblastoma humano, SH-SY5Y.
5. Estudios futuros en modelos celulares fisiológicamente más relevantes en el contexto del ictus, como puede ser hCMEM/D3, y estudiando la expresión de miR-1275 en normoxia e hipoxia en las diferentes fracciones celulares pueden permitir esclarecer si realmente miR-1275 es un mitomiR.



## Bibliografía

- Aggarwal, N., & Bonnie, F. (2014). *Cathepsin B: Multiple roles in cancer*. 427–437. <https://doi.org/10.1002/prca.201300105>
- Agrawal, R., Pandey, P., Jha, P., Dwivedi, V., Sarkar, C., & Kulshreshtha, R. (2014). Hypoxic signature of microRNAs in glioblastoma: Insights from small RNA deep sequencing. *BMC Genomics*, 15(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-686>
- Aschrafi, A., Schwechter, A. D., Mameza, M. G., Natera-Naranjo, O., Gioio, A. E., & Kaplan, B. B. (2008). MicroRNA-338 Regulates Local Cytochrome c Oxidase IV mRNA Levels and Oxidative Phosphorylation in the Axons of Sympathetic Neurons. *Journal of Neuroscience*, 28(47), 12581–12590. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3338-08.2008>
- Aschrafi, Armaz, Kar, A. N., Natera-Naranjo, O., MacGibeny, M. A., Gioio, A. E., & Kaplan, B. B. (2012). MicroRNA-338 regulates the axonal expression of multiple nuclear-encoded mitochondrial mRNAs encoding subunits of the oxidative phosphorylation machinery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(23), 4017–4027. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1064-8>
- Bandiera, S., Rüberg, S., Girard, M., Cagnard, N., Hanein, S., Chrétien, D., ... Henrion-Caude, A. (2011). Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020746>
- Benatti, R. O., Melo, A. M., Borges, F. O., Ignacio-Souza, L. M., Simino, L. A. P., Milanski, M., ... Torsoni, A. S. (2014). Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and microRNA-122 ( miR-122 ) and microRNA-370 ( miR-370 ) expression in offspring . *British Journal of Nutrition*, 111(12), 2112–2122. <https://doi.org/10.1017/s0007114514000579>
- Bian, Z., Li, L.-M., Tang, R., Hou, D.-X., Chen, X., Zhang, C.-Y., & Zen, K. (2010). Identification of mouse liver mitochondria-associated miRNAs and their potential biological functions. *Cell Research*, 20(9), 1076–1078. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.119>
- Chan, J. A., Krichevsky, A. M., & Kosik, K. S. (2005). Supplementary Material 3 - MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Research*, 65(14), 6029–6033. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0137>
- Chan, S. Y., & Loscalzo, J. (2010). MicroRNA-210: A unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle*, 9(6), 1072–1083. <https://doi.org/10.4161/cc.9.6.11006>
- Das, S., Ferlito, M., Kent, O. A., Fox-Talbot, K., Wang, R., Liu, D., ... Steenbergen, C. (2012). Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart. *Circulation Research*, 110(12), 1596–1603. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.267732>
- Ding, J., Chen, J., Wang, Y., Kataoka, M., Ma, L., Zhou, P., ... Wang, D. Z. (2015). Trbp regulates heart function through microRNA-mediated Sox6 repression. *Nature Genetics*, 47(7), 776–783. <https://doi.org/10.1038/ng.3324>
- DP, B. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281–297. Retrieved from <http://www.wormbase.org/db/misc/paper?name=WBPaper00006373>
- Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., Pandey, S. K., Pear, M., ... Monia, B. P. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell*

*Metabolism*, 3(2), 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.005>

- Fawzy, I. O., Hamza, M. T., Hosny, K. A., Esmat, G., El Tayebi, H. M., & Abdelaziz, A. I. (2015). MiR-1275: A single microRNA that targets the three IGF2-mRNA-binding proteins hindering tumor growth in hepatocellular carcinoma. *FEBS Letters*, 589(17), 2257–2265. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.038>
- Frankel, L. B., Christoffersen, N. R., Jacobsen, A., Lindow, M., Krogh, A., & Lund, A. H. (2008). Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2), 1026–1033. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707224200>
- Geiger, J., & Dalgaard, L. T. (2017). Interplay of mitochondrial metabolism and microRNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(4), 631–646. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2342-7>
- Giuliani, A., Cirilli, I., Prattichizzo, F., Mensà, E., Fulgenzi, G., Sabbatinelli, J., ... Rippo, M. R. (2018). The mitomiR/Bcl-2 axis affects mitochondrial function and autophagic vacuole formation in senescent endothelial cells. *Aging*, 10(10), 2855–2873. <https://doi.org/10.18632/aging.101591>
- Golbabapour, S. (2013). *Gene Silencing and Polycomb Group Proteins : An Overview of their Structure , Mechanisms*. 17(6). <https://doi.org/10.1089/omi.2012.0105>
- Katsushima, K., Shinjo, K., Natsume, A., Ohka, F., Fujii, M., Osada, H., ... Kondo, Y. (2012). Contribution of microRNA-1275 to Claudin11 protein suppression via a polycomb-mediated silencing mechanism in human glioma stem-like cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 27396–27406. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.359109>
- Lei, T., & Ling, X. (2015). *IGF-1 promotes the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via the inhibition of proteasome-mediated cathepsin B degradation*. 21(35), 10137–10149. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i35.10137>
- Li, B., Zhang, Z., Zhang, H., Quan, K., Lu, Y., Cai, D., & Ning, G. (2014). Aberrant miR199a-5p/caveolin1/PPAR $\alpha$  axis in hepatic steatosis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 53(3), 393–403. <https://doi.org/10.1530/jme-14-0127>
- Li, J., Donath, S., Li, Y., Qin, D., Prabhakar, B. S., & Li, P. (2010). miR-30 regulates mitochondrial fission through targeting p53 and the dynamin-related protein-1 pathway. *PLoS Genetics*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000795>
- Li, P., Jiao, J., Gao, G., & Prabhakar, B. S. (2012). Control of mitochondrial activity by miRNAs. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(4), 1104–1110. <https://doi.org/10.1002/jcb.24004>
- Macgregor-Das, A. M., & Das, S. (2018). A microRNA's journey to the center of the mitochondria. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 315(2), H206–H215. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00714.2017>
- Novák, J., Kružliak, P., Bienertová-Vaškú, J., Slabý, O., & Novák, M. (2014). MicroRNA-206: A promising theranostic marker. *Theranostics*, 4(2), 119–133. <https://doi.org/10.7150/thno.7552>
- Pullen, T. J., da Silva Xavier, G., Kelsey, G., & Rutter, G. A. (2011). miR-29a and miR-29b Contribute to Pancreatic  $\beta$ -Cell-Specific Silencing of Monocarboxylate Transporter 1 (Mct1). *Molecular and Cellular Biology*, 31(15), 3182–3194. <https://doi.org/10.1128/MCB.01433-10>

- Qureshi, R., & Sacan, A. (2013). A novel method for the normalization of microRNA RT-PCR data. *BMC Medical Genomics*, 6(SUPPL.1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-6-S1-S14>
- Rayner, K. J., Esau, C. C., Hussain, F. N., McDaniel, A. L., Marshall, S. M., Van Gils, J. M., ... Moore, K. J. (2011). Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature*, 478(7369), 404–407. <https://doi.org/10.1038/nature10486>
- Srinivasan, H., & Das, S. (2015). Mitochondrial miRNA (MitomiR): a new player in cardiovascular health. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 93(10), 855–861. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0500>
- Tian, C., Li, Z., Yang, Z., Huang, Q., Liu, J., & Hong, B. (2016). Plasma MicroRNA-16 Is a Biomarker for Diagnosis, Stratification, and Prognosis of Hyperacute Cerebral Infarction. *PLoS ONE*, 11(11), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166688>
- Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A. D., Filipowicz, W., Ramos, A., ... Rosenfeld, M. G. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature*, 459(7249), 1010–1014. <https://doi.org/10.1038/nature08025>
- Wang, J. X., Jiao, J. Q., Li, Q., Long, B., Wang, K., Liu, J. P., ... Li, P. F. (2011). MiR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nature Medicine*, 17(1), 71–78. <https://doi.org/10.1038/nm.2282>
- Willers, I. M., Martínez-Reyes, I., Martínez-Diez, M., & Cuezva, J. M. (2012). MiR-127-5p targets the 3'UTR of human  $\beta$ -F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(5), 838–848. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.03.005>
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2010). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs — *Genes & Development*. 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803.miRNA>
- Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., & Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 118(1), 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.017>
- Zhang, X., Zuo, X., Yang, B., Li, Z., Xue, Y., Zhou, Y., ... Fu, X. D. (2014). MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation. *Cell*, 158(3), 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.047>
- Zhu, L., Kandasamy, S. K., & Fukunaga, R. (2018). Dicer partner protein tunes the length of miRNAs using base-mismatch in the pre-miRNA stem. *Nucleic Acids Research*, 46(7), 3726–3741. <https://doi.org/10.1093/nar/gky043>