

## ROLA mikroRNA W ROZWOJU SERCA

### microRNAs ROLE IN HEART DEVELOPMENT

Agnieszka ZAJKOWSKA, Maciej MAŁECKI

Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Farmacji Stosowanej i Bioinżynierii,  
Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny

*Streszczenie:* MikroRNA (miRNA) są klasą jednoniciowych, niekodujących, endogennych, krótkich cząsteczek RNA, które uczestniczą w regulacji ekspresji genów poprzez hamowanie translacji docelowego mRNA. Cząsteczki te, uczestniczą w licznych procesach fizjologicznych w tym w rozwoju serca. Zaburzenia ekspresji miRNA podczas kardiogenezy, mogą prowadzić do występowania wad wrodzonych serca lub upośledzenia czynności serca. Odkrycia mikroRNA i ich ogromnego potencjału regulacyjnego, zwiększają wiedzę na temat rozwoju serca oraz chorób naczyniowo-sercowych. Ponadto, istnieje realna możliwość wykorzystania mikroRNA zarówno w terapii, jak i jako biomarkerów diagnostycznych.

*Słowa kluczowe:* mikroRNA, rozwój serca, serce, wady serca wrodzone

*Summary:* MicroRNAs (miRNAs) are a class of single-stranded, noncoding, endogenous, short RNAs which play a role in the regulation of gene expression by inhibiting translation of target mRNA. MicroRNAs are involved in many physiological processes including heart development. Abnormal expression of miRNAs during cardiogenesis may lead to congenital heart defects or impaired cardiac function. The discovery of miRNAs and their vast control potentiality increase the knowledge of heart development and the knowledge of cardiovascular diseases. Moreover, there is a real possibility of using microRNAs as therapeutic agents and diagnostic biomarkers.

*Key words:* microRNA, heart development, heart, heart defects, congenital

*Wykaz stosowanych skrótów:* **AGO2** – białko z rodziny Argonaute 2 (ang. *protein Argonaute 2*); **AKT2** – serynowo-treoninowa kinaza białkowa 2 (ang. *serine/threonine-protein kinase 2*); **ALDH1A2** – dehydrogenaza aldehydowa klasy 1, A2 (ang. *Aldehyde Dehydrogenase 1 family, member A2*); **ASD** – ubytek przegrody międzyprzedsionkowej (ang. *Artical Septal Defect*); **Bcl-2** – rodzina białek pro- i antyapoptotycznych (ang. *B cell lymphoma/leukemia-2*); **BMP-2, -7, -10** – białko morfogenetyczne kości -2, -7, -10 (ang. *Bone Morphogenetic Protein 2, 7, 10*); **BMPR2** – receptor typu 2 białka morfogenetycznego kości (ang. *Bone Morphogenetic Protein Receptor 2*); **CALD1** – kaldesmon 1 (ang. *Caldesmon 1*);

**CCNB** – cyklina B1 (ang. *Cyclin B1*); **CCND1** – cyklina D1, 2 (ang. *Cyclin D1, 2*); **Cdc42** – białko należące do rodziny białek Rho (ang. *Cell division cycle 42*); **CHD** – wrodzona wada serca (ang. *Congenital Heart Disease*); **CNN1** – kalponina 1 (ang. *Calponin 1*); **Cre** – rekombinaza Cre; **CSPG2** – białko rdzeniowe proteoglikanu siarczanu chondroityny 2 (ang. *Chondroitin Sulfate Proteoglycan core protein 2*); **Cx40, 43, 45** – koneksyna 40, 43, 45 (ang. *Connexin 40, 43, 45*); **DBR1/ LDBR** – enzym rozgałęziający pętle RNA (ang. *Debranching RNA lariats 1/Lariat-Debranching enzyme*); **DCM** – kardiomiopatia rozstrzeniowa (ang. *Dilated Cardiomyopathy*); **DGCR8** – składnik “mikroprocesora” Droszha/DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome Critical region gene 8 microprocessor complex subunit*); **DICER** – rybonukleaza typu III (ang. *Dicer, ribonuclease type III*); **DROSHA** – rybonukleaza typu III (ang. *Droszha, ribonuclease type III*); **EGFR** – receptor czynnika wzrostu naskórka (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*); **EYA1** – czynnik transkrypcyjny (ang. *Eyes Absent 1 homolog (Drosophila)*); **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast Growth Factor*); **FGFR** – receptor czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast Growth Factor Receptor*); **FOXP1** – czynnik transkrypcyjny (ang. *Forkhead box P1*); **FRS2** – substrat 2 receptora czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2*); **FZD7** – receptor rodziny “frizzled” szlaku sygnałowego WNT (ang. *Frizzled class receptor 7*); **GATA4, 6** – czynnik transkrypcyjny 4, 6, należący do rodziny GATA (ang. *GATA binding protein 4, 6*); **GDP** – guanozyna-5'-difosforan (ang. *Guanosine-5'-Diphosphate*); **GJA1** – białko połączeń typu GAP,  $\alpha 1$  (ang. *Gap Junction protein,  $\alpha 1$* ); **GTP** – guanozyna-5'-trifosforan (ang. *Guanosine-5'-Triphosphate*); **HAND1, 2** – białko pochodne sercowe i grzebieni neuronalnych 1, 2 (ang. *Heart and Neural crest Derivatives expressed 1, 2*); **HDAC4** – deacetylaza histonowa 4 (ang. *Histone Deacetylase 4*); **HMG2** – białko należące do rodziny niehistonowych białek hmg (ang. *High Mobility Group AT-hook 2*); **HOP** – czynnik transkrypcyjny (ang. *Homeodomain-Only Protein*); **HRT2** – czynnik transkrypcyjny (ang. *Hairy/enhancer-of-split Related with YRPW motif 2*); **IRX4** – czynnik transkrypcyjny (ang. *Iroquois homeobox 4, 5*); **JARID2** – białko należące do rodziny demetylaz histonowych Jmj (ang. *Jumonji, AT Rich Interactive Domain 2*); **KCND2** – kanał potasowy bramkowany napięciem (ang. *potassium voltage-gated Channel, shal-related family, member 2*); **KCNMB1** – kanał potasowy aktywowany jonami wapnia o dużym przewodnictwie (ang. *potassium large conductance calcium-activated Channel, subfamily M, beta member 1*); **MCK** – mięśniowa kinaza kreatynowa (ang. *Muscle Creatine Kinase*); **MEF2** – czynnik wzmacniający miocyty 2 (ang. *Myocyte-Enhancer Factor 2*); **miRCL/RCL** – kompleks ładujący mikroRNA/RISC; złożony z białek DICER, PACT, TRBP, AGO2 (ang. *Micro-RNA/RISC Loading Complex*); **miRNA** – mikroRNA (ang. *microRNA*); **MLC2V** – regulujący łańcuch lekki miozyny o silnej ekspresji w komorze serca (ang. *Myosin, Light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow*); **MSX1, 2** – czynnik transkrypcyjny (ang. *Muscle-Segment homeobox 1, 2*); **mt-COX1** – mitochondrialna cyklooksigenaza 1 (ang. *mitochondrial cytochrome c Oxidase subunit 1*); **MYH6, 7** – gen kodujący łańcuch ciężki  $\alpha$ -,  $\beta$ -miozyny mięśnia sercowego (ang. *Myosin, Heavy chain 6, 7, cardiac muscle,  $\alpha$ ,  $\beta$* ); **MYOCD** – miokardina (ang. *Myocardin*); **NKX2.5** – czynnik transkrypcyjny (ang. *NK2 homeobox 5*); **NOTCH, 1** – białko należące do rodziny receptorów błonowych Notch, 1 (ang. *Notch 1*); **PACT** – białkowy aktywator kinazy białkowej indukowanej interferonem (ang. *Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator*); **PDFG** – płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *Platelet Derived Growth Factor*); **PITX2C** – czynnik transkrypcyjny (ang. *Paired-like homeodomain Transcription factor 2*); **PPARGC1A** – czynnik transkrypcyjny (ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 alpha*); **Pre-miRNA** – prekursorowe miRNA (ang. *Precursor miRNA*); **Pri-miRNA** – pierwotny transkrypt miRNA (ang. *Primary miRNA*); **PTBP2** – białko wiążące traktu polipirymidowego (ang. *Polypyrimidine Tract Binding Protein 2*); **Ran** – białko wiążące GTP (ang. *Ras-related Nuclear protein*); **RISC** – kompleks wyciszający indukowany RNA (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*); **ROBO1** – homolog 1 receptora przewodnictwa aksonalnego ROBO (ang. *roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)*); **RV** – prawa komora serca (ang. *Right Ventricular*);

**RVOT** – droga odpływu prawej komory (ang. *Right Ventricular Outflow Tract*); **RVOTO** – zwężenie drogi odpływu prawej komory (ang. *Right Ventricular Outflow Tract Obstruction*); **RXR** – receptor retinoidowy X (ang. *Retinoid X Receptor*); **SIX1** – czynnik transkrypcyjny (ang. *Sine oculis-related homeobox 1*); **SM  $\alpha$ -ACTIN** –  $\alpha$ -aktyna mięśni gładkich (ang. *alpha Smooth Muscle Actin*); **SM22 $\alpha$ , - $\beta$**  – transgelina, -2 (ang. *transgelin, -2*); **SOX3, 9** – czynnik transkrypcyjny należący do rodziny SRY 3, 9 (ang. *SRY (Sex determining Region Y)-box 3, 9*); **SRF** – czynnik surowicy (ang. *Serum Response Factor*); **TBX1, 5, 18** – czynnik transkrypcyjny należący do rodziny T-box 1, 5, 18 (ang. *T-box 1, 5, 18*); **TGFBR2** – receptor 2 transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (ang. *Transforming Growth Factor B Receptor 2*); **ToF** – Tetralogia Fallota (ang. *Tetralogy of Fallot*); **TRBP** – białko wiążące struktury TAR RNA HIV-1 (ang. *the human immunodeficiency virus Transactivating Response RNA-Binding Protein*); **UTR** – region nie podlegający translacji (ang. *Untranslated Region*); **VEGF** – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*); **VSD** – ubytek przegrody międzykomorowej (ang. *Ventricular Septal Defect*); **WNT** – białko WNT (ang. *Wingless/MMTV integration site protein*);  **$\alpha$ ,  $\beta$ MHC** – łańcuch ciężki  $\alpha$ -,  $\beta$ -miozyny (ang. *A-, B-Myosin Heavy Chain*)

## WSTĘP

U kręgowców, pierwszym narządem, który rozwija się i podejmuje swoją funkcję jest serce [48]. Rozwój serca jest niezwykle dynamicznym i skomplikowanym procesem, który pozostaje pod kontrolą wielu genów i czynników transkrypcyjnych. Niezwykle istotnym jest fakt, że prawidłowa ekspresja genów gwarantuje powstanie narządu, który jest sprawny morfologicznie i czynnościowo. Wyniki wielu eksperymentów wskazują, że w mechanizm ekspresji genów zaangażowane są niekodujące cząsteczki RNA – mikroRNA (miRNA). Warto dodać, że miRNA regulują ekspresję niemal 60% genów odpowiedzialnych za syntezę białek [22].

## mikroRNA

MikroRNA jest to grupa endogennych cząsteczek RNA o długości ok. 21-25 nukleotydów. Pomimo, że nie są to cząsteczki kodujące, to pełnią bardzo ważną rolę w ekspresji genów. Cząsteczki te, przyłączają się do komplementarnego odcinka mRNA głównie w regionie 3'UTR (ang. *Untranslated Region*), uniemożliwiając tym samym proces translacji. Historia miRNA sięga 1993r, kiedy podczas badań nad nicieniem *Caenorhabditis elegans* odkryto nieznaną wówczas cząsteczkę krótkiego RNA (ang. *small RNA*) – *lin-4* [32, 65]. Przez 7 lat *lin-4* była jedyną znaną cząsteczką mikroRNA. Doświadczenia nad *Caenorhabditis elegans* dostarczyły kolejnego odkrycia, którym była druga poznana cząsteczka miRNA – *let-7*, podobnie jak *lin-4*, uczestnicząca w przekształcaniach larwalnych badanego nicienia [54]. Od momentu udokumentowania występowania *let-7* również u człowieka [50], rozpoczęto in-

tensywne badania w obszarze mikroRNA, a o ich istotności świadczy wciąż rosnąca liczba publikacji z tego zakresu [30]. Według bazy danych miRBase (wydanie 20 – czerwiec 2013) dotychczas zidentyfikowano 30 424 sekwencji dojrzałego miRNA u 206 gatunków [30], z czego u człowieka opisano aż 2578 sekwencji dojrzałego miRNA (<http://www.mirbase.org/>). Badania nad odkrywaniem nowych cząsteczek wciąż trwają. W ciągu ostatnich trzech lat opisano prawie 10 tysięcy nowych *loci* genów miRNA (miRBase, wydanie 16 – 15 172 *loci* u 142 gatunków; miRBase, wydanie 20 – 24 521 *loci* u 206 gatunków) [30]. Odkrycie krótkich, niekodujących cząsteczek RNA nadało nowe znaczenie regulacji ekspresji genów, z jednej strony przynosząc odpowiedzi na nurtujące pytania dotyczące między innymi patogenezy wielu schorzeń, u podstawy których leżą zaburzenia w rozwoju i funkcjonowaniu komórek, tkanek oraz narządów [39, 68], z drugiej zaś stanowią nowy, oryginalny środek w badaniach diagnostycznych [14, 26] i terapeutycznych [43].

### BIOSYNTENZA mikroRNA

Proces biosyntezy mikroRNA rozpoczyna się w jądrze komórkowym. Geny, na matrycy których powstają te niekodujące cząsteczki, można podzielić ze względu na ich lokalizację. Przeważająca część genów miRNA położona jest w intronach, natomiast nieliczna grupa genów miRNA znajduje się w egzonach. Niektóre geny miRNA mogą być umiejscowione także w obszarze 5'UTR i 3'UTR. Warto dodać, że położone w tych rejonach geny, ulegają transkrypcji razem z genami, których są częścią. Drugą dużą grupą genów miRNA stanowią te, które położone są w obszarach międzygenowych [63]. Ich transkrypcja zachodzi niezależnie i odbywa się z udziałem własnych promotorów i czynników transkrypcyjnych. Ostatnie badania sugerują, że geny miRNA, które umiejscowione są w intronach genów których są częścią np. miRNA-93, mogą również ulegać transkrypcji jako niezależna jednostka transkrypcyjna [51]. Proces alternatywnego składania transkryptu, umożliwia lokalizację genów niektórych cząsteczek miRNA w intronach lub egzonach [55]. Geny miRNA cechuje charakter mono- i policistronowy. Często *loci* genów miRNA położone jest bardzo blisko siebie, co powoduje jednoczesną transkrypcję kilku cząsteczek w postaci policistronowego pierwotnego transkryptu (pri-miRNA) [60, 68]. W powstanie pierwotnego transkryptu miRNA zaangażowana jest głównie polimeraza II RNA [34], jednakże niektóre doniesienia wskazują, że w tym procesie może uczestniczyć także polimeraza III RNA [6]. Przeciętny pri-miRNA posiada strukturę „spinki do włosów”, w której wyróżnia się ok. 33 nukleotyduowy dwuniciowy rdzeń, zawierający sekwencję dojrzałego miRNA, który zakończony jest jednoniciową pętlą z jednoniciowym regionem flankującym. Ponadto, jego koniec 5' zakończony jest 7-metyloguanozynową „czapeczką”, a koniec 3' ulega poliadenylacji [7]. Pri-miRNA jest pierwszym ogniwem w szlaku biosyntezy

miRNA. W jądrze komórkowym, pri-miRNA ulega pocięciu w swoistym „mikroprocesorze”, złożonym z rybonukleazy III Drosha oraz białka DGCR8 [23]. Białko DGCR8 jest częścią, która wiąże się z dwuniciową strukturą RNA. Co ciekawe, do swojego działania wymaga kofaktora w postaci żelaza hemowego [17]. Ostatnie doniesienia wskazują, że białko DGCR8 może wiązać się zarówno z fragmentami dwu- jak i jednoniciowymi, co sugeruje niespecyficzny charakter oddziaływania tej cząsteczki z pri-miRNA [56]. Cząsteczka DGCR-8, rozpoznając strukturę „spinki do włosów” stabilizuje połączenie pri-miRNA z „mikroprocesorem” i wymusza aktywność enzymatyczną Drosha, co skutkuje rozcięciem nici pierwotnego transkryptu. W następstwie, powstają ok. 70 nukleotydowe cząsteczki o strukturze „spinki do włosów” zwane prekursorowymi miRNA (pre-miRNA).

Dojrzewanie miRNA w jądrze kończy się na etapie powstania pre-miRNA. Pre-miRNA posiadają na końcu 3' dwa niesparowane nukleotydy, które są rozpoznawane przez Eksportynę-5 – cząsteczkę wymaganą do transportu pre-miRNA z jądra do cytoplazmy [62]. Eksportyna-5 nie tylko zapewnia transport cząsteczki, ale także zabezpiecza pre-miRNA przed strawieniem przez jądrowe nukleazy [72]. Ten specyficzny transporter mikroRNA wymaga obecności kofaktora Ran-GTP. W jądrze komórkowym, gdzie stężenie Ran-GTP jest wysokie, pre-miRNA łatwo oddzieliła się od Drosha i ulega związaniu z Eksportną-5. W cytoplazmie, w związku ze znacznym zmniejszeniem stężenia Ran-GTP na rzecz Ran-GDP, w wyniku zmian konformacyjnych w cząsteczce Eksportyny-5, pre-miRNA oddysocjowuje od transportera [41, 72].

Uwolnione pre-miRNA podlega kolejnym zmianom, tym razem inicjowanych działaniem enzymu Dicer. Dicer, podobnie jak Drosha, należy do rybonukleaz typu III. Razem z białkami TRBP, PACT i AGO2 tworzą kompleks RLC (ang. *RISC Loading Complex*), znany także jako miRLC (ang. *micro-RNA Loading Complex*) [33, 42]. Dicer rozpoznaje koniec 5' oraz dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' w strukturze pre-miRNA i w konsekwencji ze struktury „spinki do włosów” wycina ok. 22 nukleotydowe dwuniciowe fragmenty RNA, w których strukturze wyróżnia się dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' [49]. W powstałym duplesie, jedną nić nukleotydową stanowi sekwencja miRNA (miRNA), która na etapie działania biologicznego uczestniczy w regulacji ekspresji genów, natomiast drugą nić (miRNA\*), określa się „nicią pasażerską”. Ostatnie doniesienia wskazują, że nić miRNA\* może odgrywać istotną rolę biologiczną w hamowaniu ekspresji genów [69]. Po rozdzieleniu duplesu miRNA/miRNA\* tylko jedna nić ulega włączeniu do kompleksu RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*). Wybór odpowiedniej nici jest uwarunkowany stabilnością termodynamiczną nukleotydów na końcu 5' [27]. Przyłączenie miRNA do cząsteczki AGO2 wymaga zaangażowania wszystkich składników kompleksu miRLC. RISC jest wielobiałkowym kompleksem, w skład którego wchodzi białka o aktywności enzymatycznej helikaz, nukleaz oraz białka wiążące RNA. RISC bezpośrednio



uczestniczy w procesie hamowania translacji [42]. Pełny kompleks RISC, zawierający odpowiednią jednoniciową sekwencję nukleotydową miRNA, przyłącza się do komplementarnych sekwencji głównie w rejonie 3'UTR docelowego mRNA. Co ciekawe, wykazano, że możliwe jest również przyłączenie miRNA w regionie 5'UTR i sekwencjach kodujących [31, 77]. Stwierdzono, iż do pełnego działania biologicznego miRNA wymagana jest całkowita komplementarność jedynie kilku nukleotydów w miejscu wiązania mRNA. Ten krótki fragment znajduje się pomiędzy 2-7 nukleotydem końca 5' w strukturze miRNA i zwany jest fragmentem „seed”. Cechą charakterystyczną regionów „seed” jest konserwatywność, co sprawia, że jedno miRNA, może oddziaływać na kilka różnych mRNA, natomiast jedno mRNA może być docelową cząsteczką dla wielu miRNA [1, 22].

### Alternatywne szlaki biosyntezy miRNA

Badania wykazały, że powstawanie pre-miRNA z udziałem „mikroprocesora” Drosha/DGCR8 nie jest jedynym sposobem biosyntezy tej cząsteczki bowiem niektóre miRNA rozpoczynają biosyntezę jako mirtrony. Mirtrony są to introny, które dzięki obecności komplementarnych sekwencji w domenie 5' i 3' mogą utworzyć strukturę „spinki do włosów” pre-miRNA. Mirtrony, korzystając z możliwości spliceosomu, generują charakterystyczne końce pre-miRNA, a następnie ulegają zmianom strukturalnym tak, aby przyjąć strukturę „spinki do włosów”. W rozpleceniu pętli intronu uczestniczy enzym Ldbr (u człowieka – DBR1) [24, 47]. Obecność mirtronów początkowo odnotowano u *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans* [57] jednak wraz z rozwojem wiedzy dotyczącej miRNA oraz metod biologii molekularnej, mirtrony opisano również u ssaków – w tym u człowieka [4]. Wśród tych cząsteczek wyróżnia się klasyczne mirtrony – których końce 5' i 3' determinowane są przez sam proces składania RNA, mirtrony z ogonem 5', które występują tylko u kręgowców oraz mirtrony z ogonem 3' charakterystyczne dla *Drosophila melanogaster*. Mirtrony z ogonami 5' i 3' wymagają ostatecznej modyfikacji strukturalnej [11, 21]. Dalsza droga „dojrzwania” miRNA pochodzących z mirtronów, przebiega zgodnie z klasycznym szlakiem biosyntezy miRNA.

W ostatnim czasie, wyróżniono także simtrony (ang. *splicing-independent mirtron-like miRNAs*), które ze względu na ich intronowe pochodzenie i strukturę „spinki do włosów” początkowo wyodrębniono jako mirtrony. Jednakże, biosynteza tych krótkich cząsteczek, do których zalicza się miR-1225 oraz miR-1228, przebiega bez procesu składania RNA. Co więcej, dojrzwianie simtronów wymaga jedynie udziału enzymu Drosha, bez działania cząsteczek DGCR8, Eksportyny-5, AGO2 i Dicer, co sugeruje istnienie nowego, nieznanego jeszcze alternatywnego szlaku biosyntezy miRNA [24].

## MECHANIZM DZIAŁANIA miRNA

Regulacja ekspresji genów z udziałem mikroRNA może odbywać się na dwa sposoby i uzależniona jest od komplementarności miRNA z regionem docelowym w mRNA. Wykazano, że do rozcięcia nici nukleotydydowej przez kompleks RISC, dochodzi w przypadku całkowitej komplementarności pomiędzy miRNA/mRNA. Taki mechanizm zachodzi przede wszystkim u roślin. U człowieka, w przeważającej większości działanie miRNA polega na różnym sposobie blokowaniu translacji [10, 44].

MikroRNA poprzez swoją biologiczną rolę regulacji ekspresji genów, zaangażowane jest w wiele procesów fizjologicznych i patologicznych, do których można zaliczyć rozwój serca i choroby układu sercowo-naczyniowego [19].

## KLUCZOWA ROLA BIOSYNTETY mikroRNA W ROZWOJU SERCA

Przedmiotem zainteresowań naukowców w zakresie udziału miRNA w rozwoju serca stały się nie tylko dojrzałe cząsteczki miRNA, ale również poszczególne białka, od których zależy biosynteza tych cząsteczek. Jak donoszą np. Saxena i wsp. [58] oraz Zhao i wsp. [74] brak enzymu Dicer na wczesnym etapie rozwoju zarodka myszy *Nkx2.5-Cre; Dicerflox/Dicerflox*, skutkuje prenatalną śmiercią zarodków w następstwie uszkodzenia serca. W badanych tkankach stwierdzono wystąpienie płynu w worku osierdziowym, niedorozwój komórek serca [74], a także wady morfologiczne w postaci dwuujściowej prawej komory (ang. *Double-Outlet Right Ventricle*, DORV) oraz ubytku w przegrodzie międzykomorowej (ang. *Ventricular Septal Defect*, VSD) [58]. U myszy pozbawionych enzymu Dicer nie zaobserwowano zmian czynników transkrypcyjnych *TBX5*, *HAND1*, *HAND2*, *MLC2V* [74], choć warto wspomnieć, że występował wzrost ekspresji czynnika transkrypcyjnego *PITX2C* w drodze odpływu i przylegającej ściany komory serca, który utrzymywał się do 12.5 – 13 dnia życia prenatalnego [58]. W badaniach Chen i wsp. [12] opartych na zablokowaniu ekspresji endonukleazy Dicer w późnym stadium rozwoju zarodka, myszy *α-MHC-Cre; Dicerflox/Dicerflox* umierały w ciągu 4 dni po urodzeniu. W badaniach tkanek serca stwierdzono znaczne upośledzenie kurczliwości serca oraz zmiany charakterystyczne dla kardiomiopatii rozstrzeniowej (ang. *dilated cardiomyopathy*, DCM) i niewydolności serca. Dodatkowo stwierdzono obniżenie ekspresji koneksyny 40 (*Cx40*) oraz wzrost poziomu koneksyny 45 (*Cx45*) – białek odpowiedzialnych za tworzenie połączeń szczelinowych, uczestniczących w prawidłowym przekazywaniu impulsów elektrycznych w sercu. Badania wykazały także obniżenie poziomu białek łańcuchów ciężkich miozyny związanych z mechanizmem kurczliwości serca [12].

Zablokowanie ekspresji składnika „mikroprocesora” Drosha/DGCR8 – czynnika DGCR8 – na etapie ekspresji mięśniowej kinazy kreatynowej (MCK), skutkowało zmniejszeniem przeżywalności zwierząt – mediana długości ich życia wynosiła 31 dni. U myszy MCK-Cre; 2lox/2lox zaobserwowano zmiany w morfologii serca charakterystyczne dla DCM. Co więcej, już dwa tygodnie po narodzinach myszy, wykazano obniżony poziom kardiospecyficznych miRNA – miRNA-1, miRNA-133, miRNA-208, który zmniejszał się wraz z upływającym czasem [53]. Dodatkowo, warto wspomnieć o badaniach wykorzystujących technologię Cre-lox, w zablokowaniu ekspresji enzymu Drosha w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Zmodyfikowane zarodki myszy SM22-Cre; Droshaloxp/Droshaloxp w 14.5 dniu życia prenatalnego wykazywały cechy kardiomiopatii. Warto dodać, że promotor SM22, który jest charakterystyczny dla komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych, występuje również w kardiomiocytach w czasie rozwoju zarodkowego oraz płodowego [18].

## **EKSPRESJA mikroRNA W SERCU**

Rzeczywisty rozwój metod biologii molekularnej umożliwił badanie ekspresji mikroRNA. Określono, że w postnatalnym sercu myszy, charakterystyczne jest występowanie m. in. miRNA-1, miRNA-133, miRNA-208, miRNA-126, let-7, miRNA-143, miRNA-26a, miRNA-29a, miRNA-126 [9, 53]. Badania prowadzone na postnatalnej ludzkiej tkance serca dowiodły, że na tym etapie najwyższa ekspresja dotyczyła miRNA-423-5p, miRNA-483-5p, miRNA-196, miRNA-92b, let-7b, miRNA-23a, miRNA-183, miRNA-122, miRNA-211, miRNA-192 [59]. Profil ekspresji miRNA w postnatalnej tkance serca umożliwia poznanie zmian ekspresji tych cząsteczek podczas chorób układu sercowo-naczyniowego, co bezpośrednio przekłada się na możliwość wykorzystania ich jako potencjalnych biomarkerów i czynników terapeutycznych [14, 25, 43].

## **EKSPRESJA mikroRNA W PRENATALNEJ TKANCE SERCA**

Wykorzystując metodę sekwencjonowania nowej generacji, wykonano badania ekspresji miRNA w prenatalnym sercu myszy. Porównując tkanki serca z wcześniejszych (12.5 i 14.5 dzień życia płodowego) oraz późniejszych etapów embriogenezy (16.5 i 18 dzień życia płodowego) stwierdzono, że miRNA ulegają różnej dynamice ekspresji. Wśród analizowanych cząsteczek, zaobserwowano obniżenie ekspresji 3 miRNA oraz zwiększenie ekspresji 13 miRNA wraz z rozwojem ciąży [9]. Analiza mysich tkanek serca wykazała, że w okresie od 12.5 do 18.5 dnia ciąży



ży, najwyższą ekspresją charakteryzowały się miRNA: miRNA-23b, miRNA-24, miRNA-23a, miRNA-375, miRNA-29a, miRNA-93, miRNA-21, miRNA-25, let-7b oraz miRNA-27b. Oprócz miRNA-27b, miRNA-23a i miRNA-24, większości z tych cząsteczek nie opisano dotychczas jako dominujących w dojrzałym narządzie [9]. Zmienną dynamikę ekspresji miRNA w sercu, zaobserwowano także podczas rozwoju człowieka. Badania dotyczące obecności miRNA w tkance serca płodów ludzkich pochodzących z 5, 7, 9 i 23 tygodnia ciąży (t.c.), pozwoliły na wyodrębnienie 288 cząsteczek miRNA, które zgrupowano w 5 grup o charakterystycznym, zmieniającym się profilu ekspresji w analizowanych tkankach. Co więcej, w każdej grupie wyróżniono miRNA należące do konkretnej rodziny np. miRNA-17, let-7, miRNA-30 oraz cechujące się podobną lokalizacją genetyczną, co wskazuje na możliwość wzajemnej regulacji ekspresji miRNA. Jednocześnie, autorzy pracy wskazali miRNA o największej ekspresji w badanych okresach ciąży. Określono, że najwyższa ekspresja w badanych tkankach dotyczyła miRNA-103 (5 t.c.) i miRNA-26a (7, 9, 23 t.c.). Analizowane tkanki cechowała również obecność w dużej ilości m.in. miRNA-145, let-7, miRNA-24, miRNA-143 [76]. Ciekawym jest fakt, że w badaniu na modelu zwierzęcym, ekspresja cząsteczek let-7 (let-7a/7d/7e/7f), regulujących ekspresję czynników FOXP1, TBX5, HAND1, AKT2, PPARGC1A – zaangażowanych w proces tworzenia się serca – podlega wzrostowi wraz z rozwojem zarodka [9]. Powyższy wynik modulacji ekspresji let-7 podczas rozwoju mysiego zarodka, został zweryfikowany podczas profilowania miRNA w tkankach serca płodów ludzkich. W 23 t.c. u człowieka cząsteczka let-7 obok miRNA-26a, miRNA-23a/23b, miRNA-24, miRNA-145 charakteryzowała się największą ekspresją [76]. Co więcej, badanie miRNA w 30 t.c. również wskazało cząsteczkę let-7 (let-7a/7f/7c/7d/7b), obok miRNA-1, miRNA-26a/26b, miRNA-21 oraz miRNA-23a, jako mikroRNA o najwyższej ekspresji w sercu na tym etapie rozwoju ludzkiego płodu [59].

## **ZNACZENIE mikroRNA W ROZWOJU SERCA**

Ustalenie profilu ekspresji mikroRNA podczas rozwoju serca jest pierwszym krokiem do pełnego zrozumienia udziału tych cząsteczek w prawidłowym procesie jego morfogenezy i funkcjonowania. Szczegółowe badania na zwierzęcym i ludzkim modelu eksperymentalnym prowadzone zarówno *in vitro* jak i *in vivo* przynoszą odpowiedzi na pytania, dotyczące działania dojrzałych miRNA w zakresie ekspresji genów zaangażowanych w procesy fizjologiczne i patofizjologiczne serca. Prowadzone badania sugerują istotną rolę miRNA w regulacji ekspresji genów biorących udział nie tylko w prawidłowym procesie morfogenezy jam serca i drogi odpływu, ale również w procesie angiogenezy, cyklu komórkowym, wrażliwości komórek na czynniki

wzrostu i hipoksje czy utrzymywaniu „macierzystości” komórek i rozwoju komórek mezenchymalnych [37, 76]. Określono, że podczas kardiogenezy, miRNA może regulować ekspresję czynnika VEGF, BMPR2, TGFBR2, EGFR, HMGA2 oraz Bcl-2, limitujących prawidłowy proces tworzenia serca [76]. Niezmiernie ważny jest fakt, że mikroRNA uczestniczą również w wielu molekularnych szlakach sygnałowych takich jak WNT, FGF, NOTCH, PDFG, FGFR, RXR [40, 52, 76].

Jedną z dominujących cząsteczek miRNA w rozwiniętym sercu jest miRNA-1. Analiza tkanek serca zarodków mysich wykazała, że policistronowy gen miR-1-2/133a-1 ulega ekspresji już w 8,5 dniu ciąży i pozostaje aktywny przez okres rozwoju komór i przedsionków serca [38]. W ludzkiej tkance serca płodu do 23 t.c., miRNA-1 nie należy do cząsteczek o znaczącej ekspresji, jednakże zaliczono ją do grupy miRNA, których ekspresja odgrywa ważną rolę w późniejszych etapach rozwoju tego narządu [76]. Wykazano, że ekspresja miRNA-1 i miRNA-133 pozostaje pod kontrolą czynników transkrypcyjnych: SRF, który uczestniczy w różnicowaniu miocytów i wzroście komórek [75] oraz MEF2 [38]. Czynniki MEF2 poprzez przyłączenie się do regionów wzmacniających, aktywuje transkrypcję obu cząsteczek w bicistronowym transkrypcie miR-1-2/133a-1 co tłumaczy fakt, że pozbawienie organizmu możliwości transkrypcji czynnika MEF2, skutkuje znacznym obniżeniem ekspresji miRNA-1 i miRNA-133 [38]. Interesującym jest, że poziom białka MEF2C w komórkach hESC (ang. *human Endothelial Stem Cells*) rośnie w przypadku nadekspresji miRNA-499 [66]. Warto dodać, że w przypadku delekcji miRNA-133a, naukowcy stwierdzili wzrost ekspresji białka czynnika SRF [37]. Badania wykazały, że nadekspresja miRNA-1 w 9 dniu życia zarodkowego myszy, w następstwie zahamowania proliferacji i ekspansji kardiomiocytów prowadzi do zaburzonego rozwoju komór serca [75]. Pozbawienie zarodków mysich cząsteczki mikroRNA-1-2 skutkuje śmiercią w ciągu kilku godzin po urodzeniu. U badanych zwierząt stwierdzono wadę morfologiczną serca w postaci VSD. Co więcej, w okresie prenatalnym u niektórych zarodków wykazano także obecność płynu w worku osierdziowym. U dorosłych osobników zaobserwowano cechy kardiomiopatii rozstrzeniowej oraz zaburzenia rytmu serca, często prowadzące do nagłej śmierci zwierząt [74]. MikroRNA-1 poprzez hamowanie translacji mRNA genów *FZD7* i *FRS2*, biorących udział w molekularnych szlakach sygnałowych białek WNT i FGF, aktywuje różnicowanie kardiomiocytów [40]. W badaniach *in vivo*, delekcja zgrupowanych genów miR-1-1/133a-2 oraz miR-1-2/133a-1 prowadziła do zaburzenia dojrzewania i różnicowania kardiomiocytów podczas tworzenia się zbitej warstwy ściany miokardium. U badanych zwierząt, w 10.5 i 11.5 dniu ciąży zaobserwowano zmniejszenie grubości ściany komory serca. Zwierzęta nie przeżywały powyżej 11.5 dnia życia prenatalnego. Warto dodać, że delekcja tylko jednego zgrupowania genu miRNA-1 miRNA-133 nie prowadziła do powstania wad rozwojowych w sercu [68]. Jednym z regulowanych przez miRNA-1 czynników kontrolujących proliferację kardiomiocytów jest HAND2 [68, 74, 75]. Ekspresja HAND2 jest dominująca

w prawej komorze serca i drodze odpływu, a jego delecja skutkuje występowaniem wad morfologicznych [61]. Badania wykazały, że także mRNA genów *MYOCD*, *BMP10*, *HDAC4*, *KCND2* stanowi docelową cząsteczkę dla miRNA-1, natomiast *KCNMB1*, *SRF*, *CCND2* są docelowymi genami regulowanymi przez miRNA-133 [68]. W badaniu zwierząt z delecją miRNA-1-2 wykazano wzrost ekspresji genów czynników transkrypcyjnych specyficznych dla rozwoju serca takich jak *HAND1*, *GATA6*, *IRX4*, *HRT2* [74]. MiRNA-1 i miRNA-133 hamują ekspresję genów zaangażowanych w różnicowanie mięśni. Brak tych cząsteczek związany jest ze wzrostem ekspresji genów *MYOCD* i *KCNMB1*. Co więcej, zaobserwowano także wzrost ekspresji genów bezpośrednio zaangażowanych w proces rozwoju serca – *BMP-2*, *GATA4*, *TBX18*, *BMP-7*. Dodatkowo, u badanych myszy stwierdzono zmniejszenie ekspresji *MSX1* i *MSX2*, które odgrywają rolę w tworzeniu zastawek serca oraz genów zaangażowanych w tworzenie drogi odpływu serca (*TBX1*, *SIX1*, *EYAI*) [68]. Warto wspomnieć, że miRNA-1 uczestniczy w prawidłowym przewodzeniu bodźców elektrycznych w sercu, poprzez oddziaływanie na czynnik transkrypcyjny *IRX5*, regulujący okresy repolaryzacji [68, 74]. O istotności miRNA-1-1 w rozwoju serca świadczą badania prowadzone na tkankach serca uzyskanych od pacjentów, u których stwierdzono VSD. Analiza cząsteczek miRNA wykazała znaczne obniżenie miRNA-1-1 w porównaniu do osób zdrowych. Co więcej, stwierdzono, że w przypadku wady VSD, obniżenie poziomu miRNA-1-1 skutkuje wzrostem ekspresji białek *SOX9* oraz *GJA1*, co wskazuje na mRNA genów *SOX9* oraz *GJA1* – kodującego białko Cx43 – jako docelowych dla miRNA-1-1. Zarówno *SOX9* jak i Cx43 zaangażowane są w prawidłowe funkcjonowanie serca. *SOX9* uczestniczy w tworzeniu się przegród i zastawek serca, natomiast Cx43 zaangażowana jest w działanie układu przewodzącego serca [35]. Warto dodać, że analiza 30 próbek tkanek serca u pacjentów ze stwierdzoną tetralogią Fallota wykazała znaczące obniżenie poziomu miRNA-1 w porównaniu do grupy kontrolnej, a spadek ekspresji tej cząsteczki związany był równocześnie z nadekspresją genu *Cx43* [67]. Badania dotyczące mikroRNA-133 wykazały, że pozbawienie myszy jednej cząsteczki miRNA-133 (miRNA-133a-1 lub miRNA-133a-2) nie prowadzi do wystąpienia wad morfologicznych serca. W przypadku jednoczesnej delecji obu cząsteczek, badanie prenatalnych tkanek serca nie wykazało znaczących wad rozwojowych. W tym czasie, zanotowano poszerzenie prawej komory oraz zmniejszenie grubości wolnej ściany prawej komory serca (ang. *RV-free wall*). Jednakże, już w pierwszej dobie po urodzeniu, zaobserwowano śmierć około 50% myszy. W badanych sercach stwierdzono VSD, poszerzenie przedsionków oraz prawdopodobne zaburzenia kurczliwości serca. W obrębie wierzchołka i podstawy przegrody międzykomorowej oraz w pobliżu zastawki przedsionkowo-komorowej, komórki wykazywały zwiększoną apoptozę. Warto dodać, że w badanych sercach, kardiomiocyty komór i przedsionków charakteryzowały się zwiększoną proliferacją. W 2 miesiącu życia, w sercach zmodyfikowanych zwierząt stwierdzono fibrozę oraz zaburzenia kurcz-

liwości. U 5-6 miesięcznych zwierząt, występowały cechy DCM, obserwowano zmniejszenie grubości ścian komór serca, poszerzenie przedsionków i rozległą fibrozę. Ponadto, na poziomie komórkowym stwierdzono nieprawidłowości w budowie mitochondriów, a także fragmentację i dezorganizację sarkomerów oraz zaburzenia prążków Z. MiRNA-133 uczestniczy również w regulacji genów związanych z cyklem komórkowym. Wykazano, że miRNA-133a bezpośrednio reguluje mRNA genu *CCND2*, chociaż brak miRNA-133a skutkuje wzrostem ekspresji *CCND1*, *CCND2* i *CCNB*, *PTBP2* oraz *Cdc42*. Dodatkowo, u myszy pozbawionych miRNA-133a, wykazano wzrost ekspresji genów kodujących białka charakterystyczne dla komórek mięśni gładkich (*SM  $\alpha$ -actin*, *SM22 $\alpha$* , *SM22 $\beta$* , *CNN1*, *CALD1*). Ciekawym jest fakt, że nadekspresja miRNA-133 powoduje śmierć myszy przed 15.5 dniem życia prenatalnego. W badaniu serca zwierząt w 13.5 dniu ciąży wykazano wady przegrody międzykomorowej oraz powiększenie przedsionków. Co więcej, zaobserwowano obniżenie poziomu proliferacji kardiomiocytów, co w efekcie prowadzi do zmniejszenia grubości ścian komór serca. Stwierdzone nieprawidłowości ogółem wskazują na rozwinięcie niewydolności serca [37].

Wśród mikroRNA obecnych w tkance serca można wyróżnić miRNA-208. Część ta jest całkowicie specyficzna dla serca [26]. Występowanie miRNA-208 jedynie w kardiomiocytach, pozwala na podjęcie prób wykorzystania tej cząsteczki jako biomarkera uszkodzenia serca [14, 26, 70, 71]. Choć ekspresja miRNA-208 charakterystyczna jest przede wszystkim dla dojrzałego narządu, detekcja cząsteczki miRNA-208a w sercu myszy jest możliwa już w 13.5 dniu po zapłodnieniu [8], natomiast u człowieka obecność miRNA-208a stwierdzono w 5 t.c. [76]. Ekspresja miRNA-208 wiąże się z występowaniem łańcuchów ciężkich miozyny ( $\alpha$ MHC i  $\beta$ MHC), występujących w cytoplazmie kardiomiocytów, ponieważ geny odpowiadające za ekspresję miRNA-208a i miRNA-208b znajdują się odpowiednio w intronie 29 genu *MYH6* kodującego  $\alpha$ -MHC i intronie 31 genu *MYH7* kodującego  $\beta$ -MHC. Zarodki mysie charakteryzują się występowaniem formy  $\beta$ -MHC, która po urodzeniu jest wypierana przez  $\alpha$ -MHC. Wykazano, że miRNA-208a nie jest czynnikiem limitującym rozwój serca, jednakże pełni ważną rolę w prawidłowym działaniu układu przewodzącego serca. U myszy pozbawionych ekspresji miRNA-208a, do 16 tygodnia życia postnatalnego nie zaobserwowano w sercu wad morfologicznych, chociaż występowało migotanie przedsionków. Warto dodać, że nadekspresja miRNA-208a nie powoduje także śmierci badanych zwierząt w okresie prenatalnym, pomimo, że obserwowano przerost serca i zaburzenia rytmu [8]. MiRNA-208 reguluje poziom Cx40, GATA4, HOP. Natomiast, u myszy pozbawionych miRNA-208a wykazano wzrost poziomu czynnika transkrypcyjnego GATA4, oraz spadek poziomu Cx40 i HOP [8].

W badaniu profilu miRNA w ludzkich tkankach serca, miRNA-218 zaliczono do grupy, której ekspresja jest na najwyższym poziomie w 7 t.c. [76]. Nadekspresja miRNA-218 w zarodkach ryby *Danio rerio* skutkowałą wystąpieniem wad mor-

fologicznych serca, m.in. zaburzony proces zapętlania serca oraz nieprawidłową budowę ścian serca. Co ciekawe, zaburzenie morfologii serca nie było skorelowane z obniżeniem ekspresji tej cząsteczki [13]. Warto dodać, że miRNA-218 reguluje mechanizm translacji genu *ROBO1*, uczestniczącego w prawidłowym rozwoju serca *Danio rerio* poprzez regulację migracji komórek tworzących pierwotną cewę serca – śródbłonna wsierdza i kardiomiocytów [20]. Nadekspresja czynnika transkrypcyjnego *TBX5* indukuje występowanie wad rozwojowych serca, a zmodyfikowane zarodki *Danio rerio*, wykazywały również zwiększony poziom miRNA-218. Niezwykle ważne jest, że obniżenie poziomu miRNA-218 niweluje powstawanie defektów rozwojowych wywołanych nadekspresją *TBX5*, co sugeruje istotną rolę tej cząsteczki w procesie kardiogenezy [13].

W prawidłową morfogenezę serca zaangażowana jest również cząsteczka miRNA-138. U ryby *Danio rerio*, zablokowano miRNA-138 z użyciem technologii antagomiR, co w następstwie prowadziło do śmierci zarodków w 72-96 h po zapłodnieniu. W badanych tkankach, u 60-80% zarodków obserwowano zaburzenia zapętlania serca oraz obecność płynu w worku osierdziowym. Warto dodać, że miRNA-138 uczestniczy również w różnicowaniu kardiomiocytów, bowiem u 60% zarodków, kardiomiocyty wykazywały mniejszą dojrzałość. Autorzy zanotowali również zaburzenie ekspresji genów uczestniczących w rozwoju zastawek serca – *CSPG2* i *NOTCH1B*. Geny te, które są charakterystyczne dla regionu kanału przedsionkowo-komorowego (ang. *Atrioventricular Canal*, AVC), ulegały ekspresji także w komorze serca. Warto dodać, że miRNA-138 reguluje mRNA genów *ALDH1A2* oraz *CSPG2* [45]. Produkt białkowy genu *ALDH1A2* – dehydrogenaza 2 kwasu retinowego, którego ekspresja występuje w mezodermie gardłowej, reguluje poziom kwasu retinowego, uczestniczącego w wielu procesach rozwoju serca, w tym w procesie zapętlania serca [52]. Podczas rozwoju ludzkiego płodu, najwyższą ekspresję miRNA-138 zanotowano w 23 t.c. [76].

W prawidłowym rozwoju serca uczestniczy również cząsteczka miRNA-181c. Obecność miRNA-181c zanotowano w ludzkich tkankach serca płodu od 5 t.c. do 23 t.c. [76]. W badaniu tkanek serca pacjentów cierpiących na VSD, stwierdzono znacznie większą ekspresję miRNA-181c w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto określono, że docelową cząsteczką mRNA dla miRNA-181c jest *BMPR2*. Ten fakt potwierdza obserwacje, że zwiększonemu poziomowi miRNA-181c towarzyszy spadek ekspresji genu *BMPR2* w badanych tkankach. Warto dodać, że receptor *BMPR2* uczestniczy w tworzeniu przegród i zastawek serca [35]. Ostatnie badania sugerują, że miRNA-181c uczestnicząc w regulacji genów mitochondrialnych, może również wpływać na wydolność serca. Wykazano, że choć biosynteza miRNA-181c przebiega drogą konwencjonalną, sama cząsteczka mikroRNA może ulec translokacji do mitochondrium [16]. Używając szczerzego modelu eksperymentalnego zademonstrowano *in vivo*, że ciągła nadekspresja miRNA-181c poprzez obniżenie ekspresji mt-COX1 przyczynia się do spadku zdolności wysiłko-



wej serca i wystąpienia objawów niewydolności tego narządu. Obniżenie ekspresji mt-COX1 w skutek nadekspresji miRNA-181c prowadzi do zaburzenia działania łańcucha oddechowego, nadmiernego generowania wolnych rodników oraz zmiany metabolizmu mitochondrium [15, 16].

## ZNACZENIE mikroRNA WE WRODZONYCH WADACH SERCA

Wrodzone wady serca (ang. *Congenital Heart Disease*, CHD) stwierdza się u około 1% noworodków. Etiologia CHD w większości pozostaje nieznaną. Badania epidemiologiczne wykazały, że najczęściej występującymi wadami serca u dzieci są m. in. ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej (ang. *Artical Septal Defect*, ASD), ubytek w przegrodzie międzykomorowej (VSD) oraz tetralogia Fallota (ang. *Tetralogy of Fallot*, ToF) [29]. U pacjentów ze stwierdzoną wadą VSD, w analizowanych tkankach serca obserwowano wzrost ekspresji miRNA-181c i obniżenie ekspresji miRNA-1-1 w porównaniu do zdrowej tkanki [35]. Przyczyną tetralogii Fallota jest przednio-dogłowe przemieszczenie przegrody drogi odpływu, w wyniku czego obserwuje się nierestrykcyjny VSD, aortę jeździec, zwężenie drogi odpływu prawej komory (ang. *Right Ventricular Outflow Tract Obstruction*, RVOTO) oraz następczy przerost prawej komory serca. Co więcej, zwężenie drogi odpływu prawej komory może mieć miejsce na poziomie stożkowym, zastawkowym oraz może być obserwowane połączenie obu typów RVOTO bez lub z nadzastawkowym zwężeniem tętnicy płucnej albo jej gałęzi [3]. Analiza 799 cząsteczek mikroRNA w próbkach drogi odpływu prawej komory (RVOT ang. *right ventricular outflow tract*) uzyskanych od 10 pacjentów, u których stwierdzono ToF, wykazała zmieniony profil tych cząsteczek w porównaniu do grupy kontrolnej. Stwierdzono obniżenie ekspresji 27 różnych miRNA, z których najbardziej istotną zmianę zaobserwowano dla miRNA-940. Warto dodać, że równocześnie zanotowano wzrost ekspresji 48 cząsteczek, gdzie największą zmianą charakteryzowała się cząsteczka miRNA-204. Ponadto wykazano, że wśród popularnych kardiospecyficznych miRNA, ekspresja miRNA-940 jest najbardziej charakterystyczna dla drogi odpływu (n=26). Istotnym jest fakt, że spadek ekspresji miRNA-940 skutkuje znaczącym wzrostem poziomu białka JARID2 w badanych tkankach [36]. Warto dodać, że gen *JARID2*, pozostający pod kontrolą NKX2.5 w komórkach wtórnego pola sercowego i regulując *NOTCH1* podczas rozwoju serca, pełni istotną rolę w prawidłowej morfogenezie narządu w tym rozwoju drogi odpływu i komór [2, 46]. W badaniach *in vitro*, wykorzystując linię komórek hCMPC (ang. *human Cardiomyocyte Progenitor Cells*) stwierdzono, że obniżenie ekspresji miRNA-940 skutkuje zahamowaniem migracji i aktywacją proliferacji badanych komórek [36]. W innym eksperymencie, wykorzystującym



próbki RVOT uzyskane od 5 pacjentów, u których stwierdzono ToF, profilowanie miRNA z użyciem mikromacierzy wykazało różnice ekspresji pomiędzy tkanką badaną a kontrolną w przypadku 41 cząsteczek miRNA. Wzrost ekspresji w tkance uzyskanej od pacjentów ToF (n=21) potwierdzono dla 15 cząsteczek, natomiast spadek ekspresji stwierdzono u 3 miRNA w porównaniu do zdrowej tkanki. Co więcej, regulowane przez nie mRNA, dotyczy genów zaangażowanych w rozwój serca. Warto dodać, że największe różnice ekspresji w badanych tkankach dotyczyły miRNA-19a, miRNA-222, miRNA-424 i miRNA-130b. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że na skutek nadekspresji miRNA-222 i miRNA-424/424\* dochodzi do wzrostu proliferacji zarodkowych kardiomiocytów, natomiast zwiększony poziom miRNA-424/424\* hamuje migrację tych komórek. Ponadto, uzyskanie nadekspresji miRNA-222 w komórkach linii P19 hamuje różnicowanie ich w kierunku kardiomiocytów [73]. Z kolei badania 16 tkanek serca noworodków, oraz 3 tkanek serca płodów ze stwierdzoną tetralogią Fallota wykazały różnorodność ekspresji 61 miRNA, z czego największą zmianą charakteryzowały się miRNA-421, miRNA-1275, miRNA-27b, miRNA-1201 oraz miRNA-122. Co ciekawe, deregulacja niemal połowy miRNA, związana jest z zaburzoną ekspresją genów biorących udział w procesie rozwoju serca [28]. Udowodniono, że nadekspresja miRNA-421, obserwowana w tkankach prawej komory serca (ang. *Right Ventricular*; RV) pobranych od pacjentów ToF, skutkuje zaburzeniem ekspresji genów uczestniczących w rozwoju serca, z czego najbardziej interesujący wydaje się być *SOX3*. Gen *SOX3*, pełniący rolę regulującą w istotnych w rozwoju serca szlakach sygnałowych białek WNT i NOTCH, w badanych próbach RV serca był znacznie obniżony [5]. Niezwykle ciekawym wydaje się fakt, że pomimo udowodnionego wpływu miRNA-1 na powstawanie wad morfologicznych serca na modelu zwierzęcym [74], jedynie w badaniach Wu i wsp. [67] stwierdzono obniżenie kardiospecyficznej cząsteczki miRNA-1 w próbkach RVOT pacjentów z ToF. Warto wspomnieć, w badaniu tym wykazano również obniżenie ekspresji miRNA-206 w badanych próbach [67].

## PODSUMOWANIE

Niezwykły potencjał regulacyjny mikroRNA w zakresie ekspresji genów sprawia, że uczestniczą one m. in. w rozwoju narządów, w tym serca. Niezwykle ważne jest, że do prawidłowego formowania się narządu serca istotna jest funkcja wszystkich intermedatorów szlaku biosyntezy i działania miRNA. Badania eksperymentalne w dziedzinie miRNA, prowadzone *in vitro* i *in vivo* oraz obecnie coraz częściej również *in silico*, stanowią swoisty klucz do zrozumienia występowania wad wrodzonych serca. Obiecujące wyniki badań wskazują, że mikroRNA

mogą stać się oryginalnym narzędziem terapeutycznym w zakresie leczenia chorób związanych z nieprawidłowym działaniem układu sercowo-naczyniowego [43]. Jak donoszą Montgomery i wsp. [43] przezskórne podanie LNA-antymiR-208a szczurom z niewydolnością serca indukowaną nadciśnieniem zapobiega patologicznej przebudowie serca, pogorszeniu czynności serca oraz zwiększa długość i komfort życia zwierząt. Duże zainteresowanie naukowców dotyczy również możliwości wykorzystania mikroRNA jako biomarkerów diagnostycznych, których obecność można (nieinwazyjnie) stwierdzić m. in. w osoczu i moczu [64]. MikroRNA mogą odzwierciedlać uszkodzenie serca np. w sytuacji zawału serca czy ostrej niewydolności serca [14], ale też co ciekawe mogą być użyteczne w prenatalnej diagnostyce wad wrodzonych serca [78]. W badaniu krwi kobiet ciężarnych z płodami obciążonymi CHD (ASD, VSD, ToF), stwierdzono wzrost ekspresji miRNA-19b, miRNA-22, miRNA-29c, miRNA-375 w surowicy w porównaniu do grupy kontrolnej, z czego miRNA-22 podwyższone było tylko w przypadku ToF [78]. W związku z ogromnym potencjałem poznawczym, diagnostycznym i terapeutycznym cząsteczek mikroRNA, liczba badań z zakresu biologii i funkcji miRNA dokumentowana licznymi pracami naukowymi wciąż rośnie.

## LITERATURA

- [1] BARTEL DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; **136**: 215-233.
- [2] BARTH JL, CLARK CD, FRESCO VM, KNOLL EP, LEE B, ARGRAVES WS, LEE KH. Jarid2 is among a set of genes differentially regulated by Nkx2.5 during outflow tract morphogenesis. *Dev Dyn* 2010; **239**: 2024-2033.
- [3] BAUMGARTNER H, BONHOEFFER P, DE GROOT NM, DE HAAN F, DEANFIELD JE, GALIE N, GATZOULIS MA, GOHLKE-BAERWOLF C, KAEMMERERH, KILNER P, MELBOOM F, MULDER BJ, OECHSLIN E, OLIVER JM, SERAF A, SZATMARI A, THAULOW E, VOUHE PR, WALMA E. Wytyczne dotyczące leczenia dorosłych pacjentów z wrodzonymi wadami serca (nowa wersja – 2010). *Kardiologia Polska* 2010; **68**: 639-696.
- [4] BEREZIKOV E, CHUNG WJ, WILLIS J, CUPPEN E, LAI EC. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 2007; **28**: 328-336.
- [5] BITTEL DC, KIBIRYEVA N, MARSHALL JA, O'BRIEN JE Jr. MicroRNA-421 Dysregulation is Associated with Tetralogy of Fallot. *Cells* 2014; **3**: 713-723.
- [6] BORCHERT GM, LANIER W, DAVIDSON BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Cell Biol* 2006; **13**: 1097-1101.
- [7] CAI X, HAGEDORN CH, CULLEN BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004; **10**: 1957-1966.
- [8] CALLIS TE, PANDYA K, SEOK HY, TANG RH, TATSUGUCHI M, HUANG ZP, CHEN JF, DENG Z, GUNN B, SHUMATE J, WILLIS MS, SELZMAN CH, WANG DZ. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* 2009; **119**: 2772-2786.
- [9] CAO L, KONG LP, YU ZB, HAN SP, BAI YF, ZHU J, HU X, ZHU C, ZHU S, GUO XR. microRNA expression profiling of the developing mouse heart. *Int J Mol Med* 2012; **30**: 1095-1104.
- [10] CARTHEW RW, SONTHEIMER EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; **136**: 642-655.

- [11] CASTELLANO L, STEBBING J. Deep sequencing of small RNAs identifies canonical and non-canonical miRNA and endogenous siRNAs in mammalian somatic tissues. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: 3339-3351.
- [12] CHEN JF, MURCHISON EP, TANG R, CALLIS TE, TATSUGUCHI M, DENG Z, ROJAS M, HAMMOND SM, SCHNEIDER MD, SELZMAN CH, MEISSNER G, PATTERSON C, HANNON GJ, WANG DZ. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 2111-2116.
- [13] CHIAVACCI E, DOLFI L, VERDUCI L, MEGHINI F, GESTRI G, MERCATANTI A, EVANGELISTA M, WILSON SW, CREMISI F, PITTO L. MicroRNA 218 mediates the effects of Tbx5a over-expression on zebrafish heart development. *PLoS One* 2012; **7**: e50536.
- [14] CORSTEN MF, DENNERT R, JOCHEMS S, KUZNETSOVA T, DEVAUX Y, HOFSTRA L, WAGNER DR, TAESSEN JA, HEYMANS S, SCHROEN B. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; **3**: 499-506.
- [15] DAS S, BEDJA D, CABELL N, DUNKERLY B, CHENNA V, MAITRA A, STEENBERGEN C. miR-181c Regulates the Mitochondrial Genome, Bioenergetics, and Propensity for Heart Failure In Vivo. *PLoS One* 2014; **9**: e96820.
- [16] DAS S, FERLITO M, KENT OA, FOX-TALBOT K, WANG R, LIU D, RAGHAVACHARI N, YANG Y, WHEELAN SJ, MURPHY E, STEENBERGEN C. Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart. *Circ Res* 2012; **110**: 1596-1603.
- [17] FALLER M, MATSUNAGA M, YIN S, LOO JA, GUO F. Heme is involved in microRNA processing. *Nat Struct Mol Biol* 2007; **14**: 23-29.
- [18] FAN P, CHEN Z, TIAN P, LIU W, JIAO Y, XUE Y, BHATTACHARYA A, WU J, LU M, GUO Y, CUI Y, GU W, GU W, YUE J. miRNA biogenesis enzyme Drosha is required for vascular smooth muscle cell survival. *PLoS One* 2013; **8**: e60888.
- [19] FERNÁNDEZ-HERNANDO C, BALDÁN A. MicroRNAs and Cardiovascular Disease. *Curr Genet Med Rep* 2013; **1**: 30-38.
- [20] FISH JE, WYTHE JD, XIAO T, BRUNEAU BG, STAINIER DY, SRIVASTAVA D, WOO S. A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish. *Development* 2011; **138**: 1409-1419.
- [21] FLYNT AS, CHUNG WJ, GREIMANN JC, LIMA CD, LAI EC. MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in *Drosophila*. *Mol Cell* 2010; **38**: 900-907.
- [22] FRIEDMAN RC, FARH KK, BURGE CB, BARTEL DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; **19**: 92-105.
- [23] HAN J, LEE Y, YEOM KH, KIM YK, JIN H, KIM VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004; **18**: 3016-3027.
- [24] HAVENS MA, REICH AA, DUELLI DM, HASTINGS ML. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: 4626-4640.
- [25] IKEDA S, KONG SW, LU J, BISPING E, ZHANG H, ALLEN PD, GOLUB TR, PIESKE B, PU WT. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics* 2007; **31**: 367-373.
- [26] JI X, TAKAHASHI R, HIURA Y, HIROKAWA G, FUKUSHIMA Y, IWAI N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 2009; **55**: 1944-1949.
- [27] KHOROVA A, REYNOLDS A, JAYASENA SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; **115**: 209-216.
- [28] KIBIRIYEVA N, ZHOU XG, MARSHALL JA, LOFLAND GK, ARTMAN M, CHEN J, BITTEL DC. Noncoding RNA expression in myocardium from infants with tetralogy of Fallot. *Circ Cardiovasc Genet* 2012; **5**: 279-286.
- [29] KOWALSKA M, KOWAL M, WÓJTOWICZ-CHOMICZ K, LIPIEC M, BORZĘCKI A. Wrodzone wady serca występujące u dzieci hospitalizowanych w Oddziale Kardiologicznym Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie. *Probl Hig Epidemiol* 2009; **90**: 116-119.

- [30] KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**: D68-D73.
- [31] LEE I, AJAY SS, YOON JI, KIM HS, HONG SH, KIM NH, DHANASEKARAN SM, CHINNAIYAN AM, ATHEY BD. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res* 2009; **19**: 1175-1183.
- [32] 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**: 843-854.
- [33] LEE Y, HUR I, PARK SY, KIM YK, SUH MR, KIM VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 2006; **25**: 522-532.
- [34] LEE Y, KIM M, HAN J, YEOM KH, LEE S, BAEK SH, KIM VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; **23**: 4051-4060.
- [35] LI J, CAO Y, MA XJ, WANG HJ, ZHANG J, LUO X, CHEN W, WU Y, MENG Y, ZHANG J, YUAN Y, MA D, HUANG GY. Roles of miR-1-1 and miR-181c in ventricular septal defects. *Int J Cardiol* 2013; **168**: 1441-1446.
- [36] LIANG D, XU X, DENG F, FENG J, ZHANG H, LIU Y, ZHANG Y, PAN L, LIU Y, ZHANG D, LI J, LIANG X, SUN Y, XIAO J, CHEN YH. miRNA-940 reduction contributes to human Tetralogy of Fallot development. *J Cell Mol Med* 2014; **20**: 1-10.
- [37] LIU N, BEZPROZVANNAYA S, WILLIAMS AH, QI X, RICHARDSON JA, BASSEL-DUBY R, OLSON EN. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* 2008; **22**: 3242-3254.
- [38] LIU N, WILLIAMS AH, KIM Y, MCANALLY J, BEZPROZVANNAYA S, SUTHERLAND LB, RICHARDSON JA, BASSEL-DUBY R, OLSON EN. An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 20844-20849.
- [39] LU M, ZHANG Q, DENG M, MIAO J, GUO Y, GAO W, CUI Q. An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS One* 2008; **3**: e3420.
- [40] LU TY, LIN B, LI Y, ARORA A, HAN L, CUI C, CORONELLO C, SHENG Y, BENOS PV, YANG L. Overexpression of microRNA-1 promotes cardiomyocyte commitment from human cardiovascular progenitors via suppressing WNT and FGF signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2013; **63**: 146-154.
- [41] LUND E, GÜTTINGER S, CALADO A, DAHLBERG JE, KUTAY U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; **303**: 95-98.
- [42] MACRAE IJ, MA E, ZHOU M, ROBINSON CV, DOUDNA JA. In vitro reconstitution of the human RISC loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 512-517.
- [43] MONTGOMERY RL, HULLINGER TG, SEMUS HM, DICKINSON BA, SETO AG, LYNCH JM, STACK C, LATIMER PA, OLSON EN, VAN ROOIJ E. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation* 2011; **124**: 1537-1547.
- [44] MOROZOVA N, ZINOVYEV A, NONNE N, PRITCHARD LL, GORBAN AN, HAREL-BELLAN A. Kinetic signatures of microRNA modes of action. *RNA* 2012; **18**: 1635-1655.
- [45] MORTON SU, SCHERZ PJ, CORDES KR, IVEY KN, STAINIER DY, SRIVASTAVA D. microRNA-138 modulates cardiac patterning during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 17830-17835.
- [46] MYSLIWIENIC MR, CARLSON CD, TIETJEN J, HUNG H, ANSARI AZ, LEE Y. Jarid2 (Jumonji, AT rich interactive domain 2) regulates NOTCH1 expression via histone modification in the developing heart. *J Biol Chem* 2012; **287**: 1235-1241.
- [47] OKAMURA K, HAGEN JW, DUAN H, TYLER DM, LAI EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 2007; **130**: 89-100.
- [48] OLSON EN, SCHNEIDER MD. Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes Dev* 2003; **17**: 1937-1956.
- [49] PARK JE, HEO I, TIAN Y, SIMANSHU DK, CHANG H, JEE D, PATEL DJ, KIM VN. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* 2011; **475**: 201-205.
- [50] PASQUINELLI AE, REINHART BJ, SLACK F, MARTINDALE MQ, KURODA MI, MALLER B, HAYWARD DC, BALL EE, DEGNAN B, MULLER P, SPRING J, SRINIVASAN A, FISHMAN M, FINNERTY J, CORBO J, LEVINE M, LEAHY P, DAVIDSON E, RUVKUN G. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; **408**: 86-89.

- [51] RAMALINGAM P, PALANICHAMY JK, SINGH A, DAS P, BHAGAT M, KASSAB MA, SINHA S, CHATTOPADHYAY P. Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing. *RNA*. 2014; **20**: 76-87.
- [52] RANA MS, CHRISTOFFELS VM, MOORMAN AFM. A molecular and genetic outline of cardiac morphogenesis. *Acta Physiol* 2013; **207**: 588-615.
- [53] RAO PK, TOYAMA Y, CHIANG HR, GUPTA S, BAUER M, MEDVID R, REINHARD F, LIAO R, KRIEGER M, JAENISCH R, LODISH HF, BLELLOCH R. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 2009; **105**: 585-594.
- [54] REINHART BJ, SLACK FJ, BASSON M, PASQUINELLI AE, BETTINGER JC, ROUGVIE AE, HORVITZ HR, RUVKUN G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; **403**: 901-906.
- [55] RODRIGUEZ A, GRIFFITHS-JONES S, ASHURST JL, BRADLEY A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; **14**: 1902-1910.
- [56] ROTH BM, ISHIMARU D, HENNIG M. The core microprocessor component DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8) is a nonspecific RNA-binding protein. *J Biol Chem* 2013; **288**: 26785-26799.
- [57] RUBY JG, JAN CH, BARTEL DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007; **448**: 83-86.
- [58] SAXENA A, TABIN CJ. miRNA-processing enzyme Dicer is necessary for cardiac outflow tract alignment and chamber septation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 87-91.
- [59] TANG Y, LIU D, ZHANG L, INGVARSSON S, CHEN H. Quantitative analysis of miRNA expression in seven human fetal and adult organs. *PLoS One* 2011; **6**: e28730.
- [60] TANZER A, STADLER PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol* 2004; **339**: 327-335.
- [61] TSUCHIHASHI T, MAEDA J, SHIN CH, IVEY KN, BLACK BL, OLSON EN, YAMAGISHI H, SRIVASTAVA D. Hand2 function in second heart field progenitors is essential for cardiogenesis. *Dev Biol* 2011; **351**: 62-69.
- [62] WANG X, XU X, MA Z, HUO Y, XIAO Z, LI Y, WANG Y. Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5. *RNA* 2011; **17**: 1511-1528.
- [63] WANG Z. MicroRNA: A matter of life or death. *World J Biol Chem*. 2010; **1**: 41-54.
- [64] WEBER JA, BAXTER DH, ZHANG S, HUANG DY, HUANG KH, LEE MJ, GALAS DJ, WANG K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; **56**: 1733-1741.
- [65] WIGHTMAN B, HA I, RUVKUN G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; **75**: 855-862.
- [66] WILSON KD, HU S, VENKATASUBRAHMANYAM S, FU JD, SUN N, ABILEZ OJ, BAUGH JJ, JIA F, GHOSH Z, LI RA, BUTTE AJ, WU JC. Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: role for miR-499. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; **3**: 426-435.
- [67] WU Y, MA XJ, WANG HJ, LI WC, CHEN L, MA D, HUANG GY. Expression of Cx43-related microRNAs in patients with tetralogy of Fallot. *World J Pediatr* 2014; **10**: 138-144.
- [68] WYSTUB K, BESSER J, BACHMANN A, BOETTGER T, BRAUN T. miR-1/133a clusters cooperatively specify the cardiomyogenic lineage by adjustment of myocardin levels during embryonic heart development. *PLoS Genet* 2013; **9**: e1003793.
- [69] YANG X, DU WW, LI H, LIU F, KHORSHIDI A, RUTNAM ZJ, YANG BB. Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: 9688- 9704.
- [70] ZAJKOWSKA A, KOLSUT P, STACHURSKA A, SUNDERLAND P, PAJAK P, MALECKI M. Circulating miRNA-208a and miRNA-208b as biomarker of myocardial injury in CABG patients. *Acta Biochim Pol* 2012; **59**: 76.
- [71] ZAJKOWSKA A, STACHURSKA A, MALECKI M. MikroRNA-208 jako biomarker uszkodzenia mięśnia sercowego. *Czynniki Rzyzyka* 2011; **2**: 3-9.
- [72] ZENG Y, CULLEN BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: 4776-4785.
- [73] ZHANG J, CHANG JJ, XU F, MA XJ, WU Y, LI WC, WANG HJ, HUANG GY, MA D. MicroRNA deregulation in right ventricular outflow tract myocardium in nonsyndromic tetralogy of fallot. *Can J Cardiol* 2013; **29**: 1695-1703.

- [74] ZHAO Y, RANSOM JF, LI A, VEDANTHAM V, VON DREHLE M, MUTH AN, TSUCHIHASHI T, MCMANUS MT, SCHWARTZ RJ, SRIVASTAVA D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 2007; **129**: 303-317.
- [75] ZHAO Y, SAMAL E, SRIVASTAVA D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005; **436**: 214-220.
- [76] ZHOU J, DONG X, ZHOU Q, WANG H, QIAN Y, TIAN W, MA D, LI X. microRNA expression profiling of heart tissue during fetal development. *Int J Mol Med* 2014; **33**: 1250-1260.
- [77] ZHOU X, DUAN X, QIAN J, LI F. Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence. *Genetica* 2009; **137**: 159-164.
- [78] ZHU S, CAO L, ZHU J, KONG L, JIN J, QIAN L, ZHU C, HU X, LI M, GUO X, HAN S, YU Z. Identification of maternal serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects. *Clin Chim Acta* 2013; **424**: 66-72.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 11.08.14*

*Przyjęto: 08.01.15*

*Agnieszka Zajkowska*

*Ul. Banacha 1*

*02-097 Warszawa*

*tel. (0-22) 57 20 977*

*fax: (0-22) 57 20 978*

*e-mail: agnieszka.zajkowska@wum.edu.pl*