

## STRESZCZENIE

Proces reprogramowania komórek, który prowadzi do przekształcenia komórek somatycznych w pluripotencjalne, wymaga wielu modyfikacji na poziomie ekspresji genów. Szczególnie ważną rolę w tych przemianach pełnią mikroRNA, będące krótkimi niekodującymi cząsteczkami RNA, które hamują translację rozpoznawanych sekwencji mRNA. Ze względu na plejotropizm działania mogą one wpływać na kolejne etapy reprogramowania, w tym na aktywację białka p53, przejście mezenchymalno-nabłonkowe oraz uzyskanie zarodkowego profilu ekspresji genów. Nadekspresja lub wyciszenie poszczególnych mikroRNA może dodatkowo modyfikować wydajność reprogramowania. Dalsze badania nad regulacją powstawania oraz funkcjonowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSCs, ang. *induced pluripotent stem cells*), przez cząsteczki mikroRNA pozwolą jeszcze lepiej wykorzystać możliwości reprogramowania komórkowego.

## WPROWADZENIE

Jednym z najważniejszych odkryć w dziedzinie badań nad plastycznością zróżnicowanych komórek somatycznych było opracowanie metody reprogramowania komórkowego za pomocą zdefiniowanych czynników transkrypcyjnych. Takahashi i Yamanka w swojej przełomowej pracy z 2006 roku, pokazali bowiem, że wprowadzenie do mysich zarodkowych fibroblastów cDNA kodujących jedynie cztery białka: Oct4, Sox2, Klf4 i c-Myc (OSKM), pozwala przekształcić je w komórki pluripotencjalne. Tak uzyskane komórki, ze względu na metodę ich otrzymania oraz zdolność do różnicowania *in vitro* oraz *in vivo* w komórki pochodzące ze wszystkich trzech listków zarodkowych, nazwano indukowanymi pluripotencjalnymi komórkami macierzystymi (iPSCs, ang. *induced pluripotent stem cells*) [1]. Yamanaka i współpracownicy pokazali następnie, że te same czynniki transkrypcyjne pozwalają na reprogramowanie ludzkich fibroblastów [2]. Ze względu na potencjał aplikacyjny komórek iPS, zastosowana metoda uzyskała niezwykle zainteresowanie. Badania nad mechanizmami reprogramowania komórek pokazały ponadto, że szczególnie istotną rolę pełnią w nim cząsteczki mikroRNA.


MikroRNA (miRNA) to krótkie sekwencje niekodującego RNA, zawierające około 22 nukleotydów, które biorą udział w regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. W trakcie biogenezy tych miRNA, które kodowane są przez odrębne geny, pierwotny transkrypt kodujący cząsteczkę miRNA (pri-miRNA) jest rozpoznawany i cięty w jądrze komórkowym. Reakcję tę katalizuje kompleks zawierający białko Drosha o aktywności RNazy typu III oraz białko DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*), wiążące RNA. Tak powstała sekwencja prekursorowa miRNA (pre-miRNA) jest transportowana do cytoplazmy, gdzie ulega dalszemu przekształceniu przez białko Dicer do dojrzalej formy dwuniciowego RNA, zawierającego 21-23 par zasad. Obróbce przez Dicer podlegają także miRNA kodowane w obrębie intronów i powstające w wyniku splicingu. Jedna z nici cząsteczki miRNA jest następnie włączana do kompleksu RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) i za pomocą sekwencji na końcu 5' rozpoznaje sekwencję mRNA, najczęściej w regionie 3'UTR (ang. *3' UnTranslated Region*). Powoduje to zahamowanie translacji bądź też indukuje degradację rozpoznanego mRNA (Ryc. 1) [3]. Nić wiodąca rozpoznaje 3'UTR innych mRNA aniżeli komplementarna, tzw. nić pasażerska (względnie nić \*), która wbrew wcześniejszym poglądom nie musi ulegać degradacji [4]. Z tego powodu obecnie wprowadza się nomenklaturę uwzględniającą lokalizację dojrzalej sekwencji pojedynczej nici w cząsteczce pre-miRNA, a więc -5p lub -3p. Ponieważ wiązanie między mikroRNA a mRNA nie musi być w pełni komplementarne, jedna cząsteczka mikroRNA może oddziaływać na ekspresję wielu genów. Szacuje się, że w ludzkich komórkach występuje więcej niż 2000 różnych mikroRNA, które mogą regulować co najmniej jedną trzecią wszystkich transkryptów, a przez to wpływać na niemal wszystkie procesy biologiczne [5,6].

Jacek Stępniewski

Alicja Józkowicz

Józef Dulak 

Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

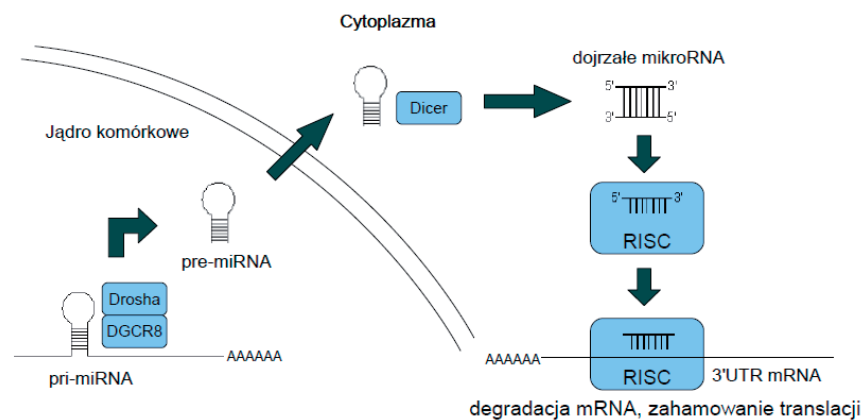
 Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; e-mail: jozef.dulak@uj.edu.pl

Artykuł otrzymano 20 marca 2013 r.  
Artykuł zaakceptowano 18 kwietnia 2013 r.

**Słowa kluczowe:** mikroRNA, reprogramowanie, indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste

**Wykaz skrótów:** BMP – (ang. *bone morphogenetic proteins*); DGCR8 – (ang. *DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*); EMT (ang. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*) – przejście nabłonkowo-mezenchymalne; ESC (ang. *Embryonic Stem Cells*) – macierzyste komórki zarodkowe; iPSCs (ang. *induced Pluripotent Stem Cells*) – indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste; LIF (ang. *leukemia inhibitory factor*) – czynnik hamujący białaczkę; MEF (ang. *Mouse Embryonic Fibroblasts*) – mysie fibroblasty zarodkowe; MET (ang. *Mesenchymal-to-Epithelial transition*) – przejście mezenchymalno-nabłonkowe; miRNA – mikroRNA; OSKM – Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc; PCR2 – (ang. *polycomb repressive complex 2*); RISC – (ang. *RNA-induced silencing complex*); UTR (ang. *UnTranslated Region*) – region nieulegający translacji

**Podziękowanie:** Praca została sfinansowana z projektu VENTURES 2011-8/8 Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej.



Rycina 1. Biogeneza mikroRNA.

Wśród tych procesów są również takie, które zachodzą w trakcie reprogramowania komórkowego.

### MikroRNA A BARIERY REPROGRAMOWANIA

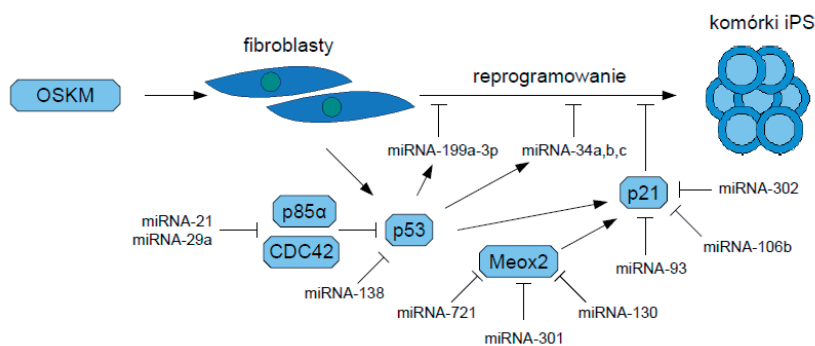
Reprogramowanie komórek somatycznych za pomocą czynników transkrypcyjnych OSKM zachodzi z niewielką wydajnością [7]. Świadczy to o istnieniu mechanizmów, które stanowią barierę dla efektywnego powstawania komórek iPS. Jednym z głównych białek biorących udział w zablokowaniu procesu reprogramowania jest p53 [8]. Co ciekawe, produkcja tego białka, jak również innych czynników hamujących podziały komórkowe – p21<sup>Cip1</sup> i p16<sup>Ink4a</sup>, wzrasta w odpowiedzi na wzrost poziomu czynników reprogramujących, ograniczając możliwość powstania komórek iPS [9,10]. Hong i wsp. pokazali, że w procesie tym ważną rolę odgrywa p21<sup>Cip1</sup>, którego synteza jest bezpośrednio regulowana przez p53. Jest on inhibitorem kompleksu cyklinaE/Cdk2, kontrolującego przejście z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego [11]. Dodatkowo, praca Banito i wsp. uwiarydociła, że zahamowanie syntezy któregośkolwiek z wyżej wymienionych białek w mysich i ludzkich fibroblastach zwiększa wydajność reprogramowania. W komórkach zarodkowych mRNA dla p21<sup>Cip1</sup> jest rozpoznawane m.in. przez miRNA-302. Wprowadzenie czynników transkrypcyjnych OSKM razem z miRNA-302 obniża poziom p21<sup>Cip1</sup> i zwiększa proliferację komórek, a przez to może pozytywnie wpływać na ilość powstających komórek iPS [10].

Innymi czynnikami bezpośrednio regulowanymi przez p53, które biorą udział w zahamowaniu podziałów komórkowych oraz w indukowaniu apoptozy są cząsteczki z rodziny mikroRNA-34: miRNA-34a, -34b oraz -34c. Pośredniczą one w procesach wywołanych aktywacją p53 hamując ekspresję m.in. cykliny D1, cykliny D2, Cdk4, Cdk6, Bcl2 oraz c-Met. Podobnie jak w przypadku p21<sup>Cip1</sup>, synteza miRNA-34a, b i c jest indukowana w odpowiedzi na wprowadzenie do komórek czynników reprogramujących. Natomiast komórki pozbawione tych mikroRNA reprogramują z większą wydajnością [12]. Analiza genów, których ekspresja może być regulowana przez miRNA-34a wykazała, że są wśród nich geny kodujące czynniki silnie promujące proces reprogramowania i biorące udział w prawidłowym funkcjonowaniu komórek zarodkowych: Nanog, Sox2 i N-Myc. Dalsze badania potwierdziły, że miRNA-34a bezpośrednio

wiąże się do mRNA kodujących te białka, a przez to hamuje ich translację. Dlatego brak takiej regulacji w komórkach pozbawionych miRNA-34a pozwala na uzyskanie zwiększonej wydajności procesu reprogramowania. Co ciekawe, komórki iPS pozbawione białka p53 wykazują zaburzone funkcjonowanie i ograniczone możliwości różnicowania, natomiast podobnych zaburzeń nie zaobserwowano w komórkach iPS, w których nie dochodziło do ekspresji miRNA-34a [12].

Podobne wyniki uzyskali Wang i wsp., pokazując, że aktywacja białka p53 prowadzi do zwiększenia poziomu miRNA-199a-3p. Nadekspresja tego mikroRNA hamuje proliferację, zatrzymując komórki w fazie G1. Dodatkowo, autorzy

zademonstrowali, że indukcja miRNA-199a-3p zmniejsza, a wyciszenie znacząco zwiększa wydajność reprogramowania komórek somatycznych [13]. Kolejna praca pokazująca powiązanie między cząsteczkami mikroRNA i p53 w trakcie powstawania komórek iPS została opublikowana przez Yanga i wsp. W celu odnalezienia mikroRNA, które mogą regulować reprogramowanie, autorzy porównali profil ekspresji tych cząsteczek w mysich zarodkowych fibroblastach (MEF, ang. *Mouse Embryonic Fibroblasts*) oraz macierzystych komórkach zarodkowych (ESC, ang. *Embryonic Stem Cells*). Przeprowadzona analiza pozwoliła wytypować miRNA-21, -29a oraz let-7 jako potencjalnie hamujące reprogramowanie komórkowe. Wprowadzenie do mysich zarodkowych fibroblastów cDNA kodującego czynniki transkrypcyjne OSKM, razem z antagomirami blokującymi funkcjonowanie miRNA-21 oraz -29a, powodowało wzrost wydajności powstawania komórek iPS. Ponieważ w trakcie reprogramowania dochodzi do spadku ekspresji cząsteczek mikroRNA specyficznych dla fibroblastów, autorzy zbadali, które białko indukujące reprogramowanie jest odpowiedzialne za ten spadek. Uzyskane wyniki pokazały, że c-Myc hamuje ekspresję miRNA-21 i 29a. Dalsza analiza ścieżek sygnałowych, na które oddziałują te dwa mikroRNA pokazała, że modulują one aktywność kinazy ERK1/2 oraz hamują syntezę białek p85α oraz CDC42, będących represorami białka p53. Oznacza to, że miRNA-21 i -29a pozytywnie regulują funkcjonowanie p53 i stąd obniżenie ich ekspresji wspomaga proces reprogramowania [14]. Podobny efekt można uzyskać wprowadzając do komórek miRNA-138, który obniża poziom p53 i przez to zwiększa wydajność powstawania komórek iPS [15]. Co ciekawe, Melton i wsp. pokazali, że zahamowanie funkcji cząsteczek z rodziny let-7 również wspomaga proces reprogramowania [16]. Pośrednio o roli tych mikroRNA świadczyły wyniki Yu i wsp., dowodzące, że komórki iPS można uzyskać wykorzystując inny zestaw czynników transkrypcyjnych: Oct4, Sox2, Nanog i Lin28 [17]. Ten ostatni czynnik hamuje dojrzewanie cząsteczek z rodziny let-7 w macierzystych komórkach zarodkowych, co umożliwia utrzymanie ich pluripotencji [18,19]. Spadek poziomu Lin28 w trakcie różnicowania zapewnia pełną aktywność sekwencji let-7, które hamują ekspresję Lin28, c-Myc oraz białek aktywowanych m.in. przez Oct4, Sox2, Nanog i Tcf3. W efekcie zróżnicowany fenotyp komórek somatycznych zostaje „utrwalony” [20].



Rycina 2. Rola niektórych cząsteczek mikroRNA w regulacji odpowiedzi komórek na wprowadzenie czynników reprogramujących.

Cząsteczki mikroRNA mogą również kontrolować ekspresję  $p21^{Cip1}$ , wpływając w ten sposób na reprogramowanie komórkowe. Przykładem są mikroRNA-93 oraz -106b, które hamując produkcję  $p21^{Cip1}$ , zwiększają wydajność powstawania komórek iPS [21]. Podobne funkcje pełnią miR-130, -301 oraz -721, zmniejszające poziom czynnika transkrypcyjnego Meox2, który aktywuje ekspresję  $p21^{Cip1}$  [22-24]. Jak widać, wyciszenie bądź nadekspresja specyficznych cząsteczek mikroRNA pozwala regulować ścieżkę sygnałową aktywowaną przez p53 (Ryc. 2), umożliwiając wydajny przebieg kolejnych etapów procesu reprogramowania.

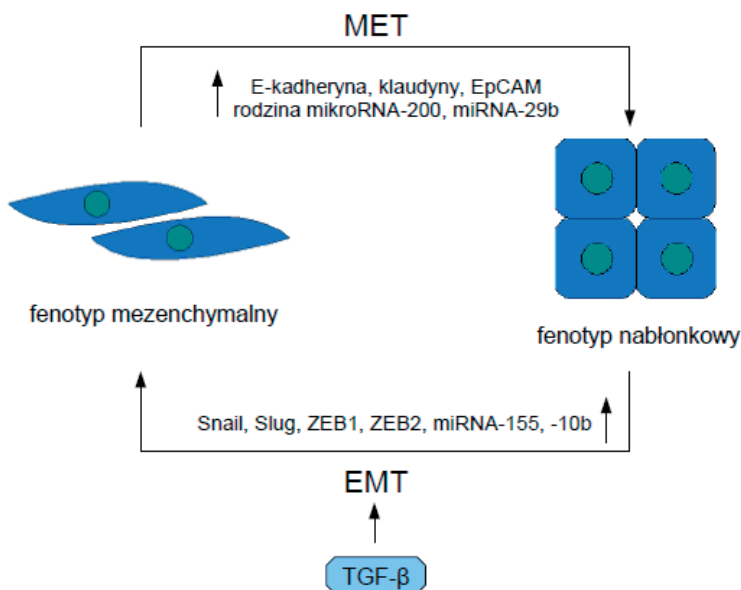
#### MikroRNA A PROCESY ZACHODZĄCE W TRAKCIE REPROGRAMOWANIA KOMÓREK

Wprowadzenie do komórek czynników transkrypcyjnych umożliwiających ich reprogramowanie zapoczątkowuje liczne modyfikacje struktury chromatyny, ekspresji genów, a także metabolizmu komórki. Stadfeld i wsp. wykorzystując MEFy, w których możliwa była indukowalna ekspresja białek OKSM, pokazali, że proces ten zachodzi stopniowo i można w nim wyróżnić etapy pośrednie. I tak, we wczesnej fazie reprogramowania dochodzi do wyciszenia ekspresji markerów specyficznych dla fibroblastów (np. Thy1 i Col5a2), następnie pojawia się specyficzny dla komórek zarodkowych antygen SSEA-1, a w końcowym etapie aktywacji ulegają geny odpowiedzialne za utrzymanie pluripotencji komórek iPS, takie jak Oct4, Nanog czy mTert [25]. Dokładniejsze badania pokazały, że w trakcie reprogramowania dochodzi do dwóch fal aktywności transkrypcyjnych, na początku oraz pod koniec procesu. W pierwszej z nich aktywacja ulegają czynniki odpowiedzialne za takie procesy jak przejście mezenchymalno-nabłonkowe (MET, ang. *Mesenchymal-to-Epithelial Transition*), proliferację, organizację cytoszkieletu i metabolizm. Natomiast w drugiej fazie dochodzi do zmian w ekspresji genów biorących udział w rozwoju zarodkowym i utrzymaniu niezróżnicowanego charakteru komórek macierzystych. Co ciekawe, w procesie reprogramowania synteza cząsteczek mikroRNA również podlega dwóm falom aktywacji, a zmiany ekspresji poszczególnych mikroRNA wykazują odwrotną korelację z ekspresją czynników rozpoznawanych przez te miRNA [26]. Doskonałym przykładem takich oddziaływań jest zachodzące na pierwszym etapie reprogramowania fibroblastów MET.

Przejście mezenchymalno-nabłonkowe to proces, w trakcie którego komórki pochodzenia mezenchymalnego nabierają fenotypu komórek epitelialnych (nabłonkowych), a więc tracą ruchliwość, tworzą złącza szczelinowe i aktywują syntezę białek adhezji międzykomórkowej. Równocześnie dochodzi w nich do wyciszenia ekspresji genów markerów mezenchymalnych takich jak wimentyna, N-kadheryna oraz czynnik transkrypcyjny Snail [27]. Podczas rozwoju zarodkowego proces ten zachodzi w warunkach fizjologicznych, na przykład w trakcie nefrogenyzy i kardiogenyzy. Zjawisko to jest również istotne dla zasiedlania przez komórki nowotworowe nowych miejsc podczas przerzutowania [28,29]. Jednym z najważniejszych czynników, którego synteza ulega aktywacji w trakcie MET jest E-kadheryna, która pełni również istotną rolę w funkcjonowaniu mysich i ludzkich macierzystych komórek zarodkowych. Białko to razem z czynnikiem LIF (ang. *leukemia inhibitory factor*) przez ścieżkę sygnałową Jak/Stat3 reguluje pluripotencję mysich ESC [30]. Także w przypadku ludzkich ESC gen kodujący to białko ulega ekspresji wraz z innymi markerami pluripotencji [31]. Chen i wsp. pokazali, że E-kadheryna pełni ważną rolę w procesie reprogramowania fibroblastów. Do jej ekspresji dochodzi na wczesnych etapach tego procesu, a dalszy wzrost poziomu tego białka, wywołany stymulacją związkami drobnocząsteczkowymi bądź wprowadzeniem odpowiedniego transgeny, powoduje zwiększenie wydajności powstawania komórek iPS. Odwrotny efekt uzyskano natomiast po zahamowaniu jej syntezy [32]. Pokazuje to, jak istotną rolę dla prawidłowego przebiegu reprogramowania ma uzyskanie przez komórki fenotypu nabłonkowego (Ryc. 3).

Ponieważ przejście mezenchymalno-nabłonkowe jest procesem odwrotnym do przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT, ang. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*), czynniki stymulujące jeden proces uniemożliwiają równocześnie zajście drugiego. Jednym z głównych czynników indukujących EMT jest TGF- $\beta$ . Aktywuje on szlaki przekazywania sygnału prowadzące do ekspresji czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za przebieg EMT, takich jak Snail, Slug, Twist i ZEB1/2 (Ryc. 3) [29]. Ichida i wsp. zdemontowali, że związki drobnocząsteczkowe hamujące receptor Tgfr1, a przez to ścieżkę sygnałową aktywowaną przez TGF- $\beta$  mogą zastąpić czynnik transkrypcyjny Sox2 w trakcie reprogramowania. Taki sam efekt osiągnięto wykorzystując przeciwciała rozpoznające TGF- $\beta$  [33]. Podobne wyniki uzyskali Maherali i Hochedlinger pokazując dodatkowo, że inhibitory receptora Tgfr1 działają na wczesnym etapie reprogramowania [34]. Indukcja ekspresji czynników OKSM powoduje również spadek ekspresji genów kodujących czynniki Snail i Slug [8]. Mimo, że autorzy tych badań nie powiązali obserwowanych efektów z aktywacją przejścia mezenchymalno-nabłonkowego, ukazały one, że modulacja ścieżek sygnałowych hamujących ten proces wpływa na reprogramowanie komórkowe. Bezpośrednich dowodów na rolę MET i zaangażowanych w ten proces mikroRNA w powstawaniu komórek iPS dostar-





Rycina 3. Czynniki zaangażowane w przejście MET oraz EMT.

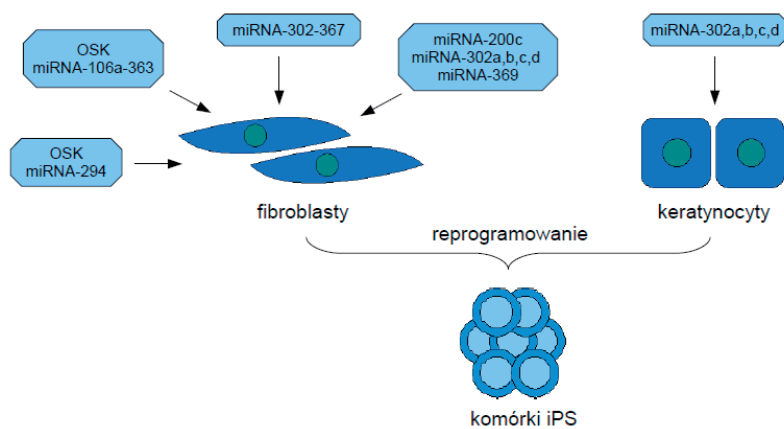
czyły prace Li i wsp. oraz Samavarchi-Tehrani i wsp. [35,36]. Pierwsza z tych grup pokazała między innymi, że czynniki reprogramujące indukują w mysich zarodkowych fibroblastach obniżenie zawartości markerów mezenchymalnych, takich jak fibronektyna i N-kadheryna, białek adhezji z macierzą zewnątrzkomórkową oraz czynników Snail i Slug. Powodują one również bardzo szybko zahamowanie syntezy miRNA-155 oraz -10b, które są związane z przejściem EMT [35,37,38]. Po obniżeniu syntezy cząsteczek mikroRNA biorących udział w EMT, w trakcie reprogramowania dochodzi do zwiększania poziomu mikroRNA odpowiedzialnych za hamowanie tego procesu. Należą do nich miRNA-205 i miRNA-429 (z rodziny mikroRNA-200), które oddziałują na białka ZEB1 i ZEB2, będące represorami transkrypcji genu kodującego E-kadherynę [35]. Samavarchi-Tehrani i wsp pokazali również, że w pierwszym etapie po indukcji syntezy czynników OSKM dochodzi do syntezy białek charakterystycznych dla komórek nabłonkowych, takich jak E-kadheryny, kładyny-3, -4, -7, -11, okładyny oraz EpCAM. Dodatkowo, wykorzystanie cząsteczek siRNA rozpoznających transkrypty ponad 4000 genów umożliwiło wykazanie, że ważnymi czynnikami regulującymi wczesne fazy reprogramowania są białka z grupy BMP (ang. *bone morphogenetic proteins*). Na przykład stymulacja mysich zarodkowych fibroblastów BMP7 zwiększała liczbę uzyskiwanych kolonii komórek iPS. Okazało się również, że białka z grupy BMP wpływają na ekspresję cząsteczek z rodziny mikroRNA-200, regulujących MET, które ulegają syntezie w wczesnej fazie reprogramowania. Niemniej synteza ta jest znacząco obniżona w wyniku zahamowania ścieżki sygnałowej indukowanej przez BMP. Dalsze badania pokazały, że mimetyki miRNA-200b oraz -200c aktywują w mysich fibroblastach ekspresję nabłonkowych białek E-kadheryny, okładyny oraz EpCAM, hamują natomiast ZEB, ZEB2, Snail i Slug, a w trakcie reprogramowania zwiększają liczbę komórek syntetyzujących SSEA-1. Mimetyki te pozwoliły również na uzyskanie wcześniejszej oraz silniejszej ekspresji genów kodujących czynniki

transkrypcyjne Nanog i Sall4, będące markerami komórek pluripotencjalnych [36].

Kolejnym mikroRNA, którego ekspresja wzrasta we wczesnej fazie reprogramowania komórek somatycznych i które reguluje przejście mezenchymalno-nabłonkowe jest miRNA-29b. Jego ekspresja jest aktywowana przez czynnik transkrypcyjny Sox2 i hamuje syntezę białek Dnmt3a i Dnmt3b będących DNA-metylotransferazami odpowiedzialnymi m.in. za wprowadzanie prawidłowego wzoru metylacji genomowego DNA w trakcie rozwoju zarodkowego [39]. Wprowadzenie do komórek czynników reprogramujących razem z mikroRNA-29b powoduje zwiększenie ekspresji E-kadheryny, EpCAM i kładyny-3 oraz znaczące zmniejszenie poziomu białek charakterystycznych dla komórek pochodzenia mezenchymalnego, takich jak N-kadheryny, Snail i ZEB1. Podobne efekty uzyskano wyciszając ekspresję genów Dnmt3a i Dnmt3b, co pokazuje, że przejście MET związane jest z odpowiednią zmianą metylacji promotorów genów odpowiedzialnych za jego regulację [40]. Ponieważ Dnmt3a jest również zaangażowana w ustalanie prawidłowego wzoru imprintingu rodzicielskiego [41], mikroRNA-29b może także aktywować ekspresję genów zlokalizowanych w regionie *Dlk1-Dio3*, kodujących m.in. 47 cząsteczek mikroRNA. Region ten podlega właśnie imprintingowi rodzicielskiemu. Co ciekawe, Liu i wsp. oraz Stadtfeld i wsp. powiązali prawidłowy wzór ekspresji zlokalizowanych w nim genów z uzyskaniem pełnej pluripotencji komórek iPS [42,43].

### MikroRNA A UZYSKANIE PLURIPOTENCJALNEGO FENOTYPU KOMÓREK iPS

Rolę mikroRNA w funkcjonowaniu komórek zarodkowych można badać wykorzystując komórki pozbawione czynników zaangażowanych w dojrzewanie cząsteczek mikroRNA. Murchison i wsp. wykorzystując mysie macierzyste komórki zarodkowe z wyciszoną syntezą białka Dicer, zaobserwowali zaburzenia tempa ich proliferacji [44]. Podobny efekt widoczny jest w komórkach pozbawionych białka DGCR8 [45]. Wang i wsp. wykorzystał je by zbadać, które mikroRNA są odpowiedzialne za prawidłową proliferację mysich macierzystych komórek zarodkowych. Wprowadzenie 266 różnych cząsteczek pozwoliło wytypować 14, które przywracały prawidłowy przebieg podziałów komórkowych. Wśród nich szczególną uwagę zwrócono na cząsteczki z rodziny mikroRNA-290: miRNA-291a, 291b, 294 oraz 295, ze względu na ich bardzo wysoką ekspresję w macierzystych komórkach zarodkowych i jej silny spadek po zainicjowaniu procesu różnicowania. Dalsze badania pokazały, że hamują one syntezę białka p21<sup>Cip1</sup> [45]. Co ciekawe, ekspresja wymienionych mikroRNA jest indukowana przez czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za utrzymanie pluripotencji komórek ESC oraz umożliwiających reprogramowanie komórek somatycznych, takich jak Oct4, Sox2, c-Myc oraz Nanog. Ponadto, synteza tych czynników transkrypcyjnych jest pozytywnie regulowana właśnie przez te mikroRNA [46]. Judson i wsp. pokazali dodatkowo, że cząsteczki z rodziny mikroRNA-290 zwiększają wydajność po-



**Rycina 4.** MikroRNA jako cząsteczki zastępujące czynniki transkrypcyjnej w procesie reprogramowania komórek.

wstawania komórek iPS. Co ciekawe, wykorzystanie mikroRNA-294 zamiast czynnika transkrypcyjnego c-Myc pozwoliło uzyskać wysoką endogenną syntezę białka Oct4, a tym samym zwiększyć wydajność reprogramowania (Ryc. 4) [47].

Podobny efekt można uzyskać wykorzystując inne mikroRNA, których ekspresja jest wysoka w komórkach ESC a niska w komórkach somatycznych. Przykładowo, nadekspresja miRNA-25 wspomaga powstawanie komórek iPS, ponieważ cząsteczka ta hamuje syntezę dwóch ligaz ubikwitynowych, Wwp2 oraz Fbxw7, zaangażowanych w degradację białek Oct4 i c-Myc [48]. Liao i wsp. zaobserwowali, że cząsteczki z rodziny mikroRNA-106a-363 (miRNA-106a, -18b, -20b, -19b-2, -92a-2, i -363) oraz mikroRNA 302-367 (miRNA-302a/b/c/d i -367) zwiększają wydajność reprogramowania mysich fibroblastów (Ryc. 4). Dalsze badania pozwoliły stwierdzić, że cząsteczki z rodziny mikroRNA-302-367 hamują syntezę Tgfb2 i zwiększają poziom E-kadheryny, przyspieszając przejście mezenchymalno-nabłonkowe [49]. Również w przypadku ludzkich fibroblastów zastosowanie mikroRNA-302b oraz -372, które zawierają taką samą sekwencję rozpoznającą 3'UTR regulowanych mRNA jak mysie cząsteczki z rodziny mikroRNA-290, zwiększają wydajność powstawania komórek iPS [50]. Subramanyam i wsp. pokazali, że regulują one syntezę białek zaangażowanych w cykl komórkowy, transport pęcherzykowy, modyfikacje epigenetyczne, przekazywanie sygnałów wewnątrzkomórkowych oraz EMT. Ten ostatni proces okazał się być silnie hamowany przez ludzkie miRNA-302b oraz -372 w trakcie reprogramowania, co umożliwiało wydajną ekspresję czynników zaangażowanych w przejście MET [50].

O tym jak silny wpływ na proces reprogramowania mogą mieć cząsteczki mikroRNA świadczą prace, w których udało się uzyskać komórki iPS z mysich i ludzkich komórek wprowadzając do nich kombinację odpowiednich cząsteczek mikroRNA, bez konieczności wykorzystywania czynników OSKM. Anokye-Danso i wsp. wprowadzili do ludzkich i mysich fibroblastów wektory lentiwirusowe kodujące całą rodzinę mikroRNA-302-367 (mikroRNA-302a, b, c, d oraz -367). Co ciekawe, reprogramowanie za pomocą mikroRNA okazało się być szybsze i bardziej wydajne niż za pomocą czynników OSKM. Wprowadzenie do mysich fibroblastów cząsteczek mikroRNA indukowało również wcześniejszą ekspresję czynników zaangażowanych w utrzymanie niezróżnicowanego

charakteru ESC, takich jak Nanog, Rex1, Fgf4 oraz Sox2 [51]. Co ważne, aktywacja endogenego Sox2 pozwala na zainicjowanie hierarchicznego procesu przechodzenia komórek z etapów pośrednich reprogramowania do w pełni odróżnicowanych komórek iPS [52]. Cząsteczki z rodziny mikroRNA-302 zostały również wykorzystane przez Lin i wsp., którzy wprowadzili je do ludzkich keratynocytów izolowanych z mieszków włosowych. Ich nadekspresja prowadziła do obniżenia poziomu białek regulujących strukturę chromatyny w komórkach, a także indukowała syntezę takich czynników transkrypcyjnych jak Oct4, Sox2, Nanog oraz Lin28. Kinetyka tych zmian była bardzo szybka, niemniej należy pamiętać, że reprogramowanie keratynocytów nie wymaga przejścia mezenchymalno-nabłonkowego stanowiącego pierwszy etap reprogramowania w przypadku fibroblastów [53]. Miyoshi i wsp. wybrali natomiast cząsteczki mikroRNA, których ekspresja była znacząco większa w mysich komórkach ES oraz iPS w porównaniu z komórkami tłuszczowymi podścieliska (ASC, ang. *adipose stromal cells*). Takie podejście pozwoliło wytypować mikroRNA-200c, oraz sekwencje z rodziny mikroRNA-302 (miRNA-302a, b, c, d) oraz mikroRNA-369 (miRNA-369-3p i -5p). Ich wprowadzenie do mysich oraz ludzkich komórek ASC pozwoliło na przeprowadzenie procesu reprogramowania, a powstałe komórki iPS okazały się być pluripotencjalne [54]. Uzyskane wyniki pokazują, że wykorzystanie cząsteczek mikroRNA, które są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania ESC, a także umożliwiających przejście mezenchymalno-nabłonkowe pozwala całkowicie pominąć konieczność wprowadzania do komórek egzogennych czynników transkrypcyjnych (Ryc. 4).

Porównanie profilu ekspresji mikroRNA w ESC oraz komórkach somatycznych pozwoliło wytypować cząsteczki, które wspomagają, a nawet „przeprowadzają” proces reprogramowania. Stadtfeld i wsp. odkryli natomiast, że mogą występować niewielkie różnice między syntezą określonych mikroRNA między ESC a komórkami iPS. Okazało się, że w niektórych komórkach iPS dochodzi do wyciszenia prawidłowej ekspresji cząsteczek mikroRNA zlokalizowanych w regionie *Dlk-1-Dio3*, który zawiera m.in. 5 genów kodujących białka, 3 geny długich niekodujących RNA oraz grupę 47 mikroRNA [41]. Co więcej, Liu i wsp. pokazali, że aktywacja tego regionu jeszcze bardziej upodabnia komórki iPS do komórek ESC pod względem profilu ekspresji genów. Co więcej, zawarte w tym regionie sekwencje mikroRNA mogą hamować syntezę białek tworzących kompleks PCR2 (ang. *polycomb repressive complex 2*), który może być zaangażowany w regulację ekspresji regionu *Dlk-1-Dio3* [42]. Pokazuje to, jak ważne jest uzyskanie przez komórki iPS odpowiedniego profilu ekspresji mikroRNA i umożliwia dokładniejszą ich weryfikację pod kątem podobieństwa do zarodkowych komórek macierzystych, a więc ESC.

## PODSUMOWANIE

Opracowanie metody reprogramowania komórek stanowiło przełom w dziedzinie badań nad plastycznością komórek somatycznych. Możliwości, jakie daje ta metoda budzą nato-

miast nadzieję na znaczący postęp w rozwoju medycyny regeneracyjnej oraz w procesie poszukiwania nowych związków terapeutycznych. Otrzymywanie komórek pluripotencjalnych, zdolnych do różnicowania w każdy typ komórek somatycznych, od pacjentów cierpiących na różne schorzenia, może bowiem pozwolić na dużo lepsze poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój danej choroby oraz dostarczyć dużej ilości komórek do testowania aktywności i toksyczności potencjalnych leków. Niemniej, aby w pełni wykorzystać potencjał reprogramowania komórek należy dokładnie poznać i scharakteryzować procesy oraz ścieżki sygnałowe, które są odpowiedzialne za jego przebieg. Dotychczasowe badania pokazały, że szczególną rolę w powstawaniu komórek iPS pełnią cząsteczki mikroRNA. Mogą one regulować każdy etap reprogramowania, modyfikować jego wydajność, jak również wpływać na funkcjonowanie otrzymywanych komórek iPS. Dalsza analiza szlaków sygnałowych, na które oddziałują mikroRNA w trakcie tego procesu pozwoli jeszcze lepiej wykorzystać ich funkcje w celu zwiększenia wydajności reprogramowania. Równie ciekawa w kontekście powstawania komórek iPS wydaje się być funkcja czynników regulujących syntezę mikroRNA. Jednym z nich jest oksygenaza hemowa-1, która może wpływać na ekspresję Lin28 oraz wielu cząsteczek mikroRNA [55]. Niemniej jej rola w reprogramowaniu wymaga dalszych badań. Jeśli natomiast uzyskiwanie komórek iPS za pomocą wprowadzenia wyłącznie cząsteczek mikroRNA okaże się być metodą powtarzalną, może stanowić ważną alternatywę dla reprogramowania czynnikami transkrypcyjnymi OSKM.

## PIŚMIENNICTWO

1. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676
2. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872
3. Mallanna SK, Rizzino A (2010) Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. *Dev Biol* 344: 16-25
4. Skrzypek K, Tertilt M, Golda M, Ciesla M, Węglarczyk K, Collet G, Guichard A, Kozakowska M, Boczkowski J, Was H, Gil T, Kuzdzal J, Muchova L, Vitek L, Loboda A, A Jozkowicz A, Kieda C, Dulak J (2013) Interplay between heme oxygenase-1 and miR-378 affects non-small cell lung carcinoma growth, vascularization and metastasis. *Antioxid Redox Signal*, w druku
5. Bao X, Zhu X, Liao B, Benda C, Zhuang Q, Pei D, Qin B, Esteban MA (2013) MicroRNAs in somatic cell reprogramming. *Curr Opin Cell Biol*, w druku
6. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15-20
7. Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G (2009) Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 27: 543-549
8. Marión RM, Strati K, Li H, Murga M, Blanco R, Ortega S, Fernandez-Capetillo O, Serrano M, Blasco MA (2009) A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460: 1149-1153
9. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE, Jaenisch R, Lander ES, Meissner A (2008) Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454: 49-55
10. Banito A, Rashid ST, Acosta JC, Li S, Pereira CF, Geti I, Pinho S, Silva JC, Azuara V, Walsh M, Vallier L, Gil J (2009) Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev* 23: 2134-2139
11. Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S (2009) Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 460: 1132-1135
12. Choi YJ, Lin CP, Ho JJ, He X, Okada N, Bu P, Zhong Y, Kim SY, Bennett MJ, Chen C, Ozturk A, Hicks GG, Hannon GJ, He L (2011) miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol* 13: 1353-1360
13. Wang J, He Q, Han C, Gu H, Jin L, Li Q, Mei Y, Wu M (2012) p53-Facilitated miR-199a-3p regulates somatic cell reprogramming. *Stem Cells* 30: 1405-1413
14. Yang CS, Li Z, Rana TM (2011) microRNAs modulate iPS cell generation. *RNA* 17: 1451-1460
15. Ye D, Wang G, Liu Y, Huang W, Wu M, Zhu S, Jia W, Deng A-M, Liu H, Kang J (2012) MiR-138 promotes induced pluripotent stem cell generation through the regulation of the p53 signaling. *Stem Cells* 30: 1645-1654
16. Melton C, Judson RL, Blelloch R (2010) Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 463: 621-626
17. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920
18. Newman MA, Thomson JM, Hammond SM (2008) Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA* 8: 1539-1549
19. Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI (2008) Selective Blockade of microRNA Processing by Lin28. *Science* 5872: 97-100
20. Melton C, Judson RL, Blelloch R (2010) Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 463: 621-626
21. Li Z, Yang CS, Nakashima K, Rana TM (2011) Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. *EMBO J* 30: 823-834
22. Pfaff N, Fiedler J, Holzmann A, Schambach A, Moritz T, Cantz T, Thum T (2011) miRNA screening reveals a new miRNA family stimulating iPS cell generation via regulation of Meox2. *EMBO Rep* 12: 1153-1159
23. Valcourt U, Thuault S, Pardali K, Heldin CH, Moustakas A (2007) Functional role of Meox2 during the epithelial cyostatic response to TGF-beta. *Mol Oncol* 1: 55-71
24. Chen Y, Leal AD, Patel S, Gorski DH (2007) The homeobox gene GAX activates p21WAF1/CIP1 expression in vascular endothelial cells through direct interaction with upstream AT-rich sequences. *J Biol Chem* 282: 507-517
25. Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K (2008) Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2: 230-240
26. Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, Schwarz BA, Nefzger CM, Lim SM, Borkent M, Apostolou E, Alaei S, Cloutier J, Bar-Nur O, Cheloufi S, Stadtfeld M, Figueroa ME, Robinton D, Natesan S, Melnick A, Zhu J, Ramaswamy S, Hochedlinger K (2012) A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* 151: 1617-1632
27. Baum B, Settleman J, Quinlan MP (2008) Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Semin Cell Dev Biol* 19: 294-308
28. Sipos F, Galamb O (2012) Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World J Gastroenterol* 18: 601-608
29. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871-890
30. Mohamet L, Hawkins K, Ward CM (2011) Loss of function of e-cadherin in embryonic stem cells and the relevance to models of tumorigenesis. *J Oncol* 2011: 352616



31. Li L, Bennett SA, Wang L (2012) Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adh Migr* 6: 59-70
32. Chen T, Yuan D, Wei B, Jiang J, Kang J, Ling K, Gu Y, Li J, Xiao L, Pei G. (2010) E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells* 28: 1315-1325
33. Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K (2009) A small-molecule inhibitor of TGF- $\beta$  signaling replaces Sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* 5: 491-503
34. Maherali N, Hochedlinger K (2009) TGF $\beta$  signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 19: 1718-1723
35. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, He W, Chen J, Li F, Zhuang Q, Qin B, Xu J, Li W, Yang J, Gan Y, Qin D, Feng S, Song H, Yang D, Zhang B, Zeng L, Lai L, Esteban MA, Pei D (2010): A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7: 51-63
36. Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung HK, Beyer TA, Datti A, Woltjen K, Nagy A, Wrana JL (2010) Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 7: 64-77
37. Kong W, Yang H, He L, Zhao JJ, Coppola D, Dalton WS, Cheng JQ (2008) MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor  $\beta$ /Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* 28: 6773-6784
38. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449: 682-688
39. Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, Okano M, Li E, Nozaki M, Sasaki H (2007) Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet* 16: 2272-2280
40. Guo X, Liu Q, Wang G, Zhu S, Gao L, Hong W, Chen Y, Wu M, Liu H, Jiang C, Kang J (2013) microRNA-29b is a novel mediator of Sox2 function in the regulation of somatic cell reprogramming. *Cell Res* 23: 142-156
41. Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H (2004) Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429: 900-903
42. Liu L, Luo GZ, Yang W, Zhao X, Zheng Q, Lv Z, Li W, Wu HJ, Wang L, Wang XJ, Zhou Q (2010) Activation of the imprinted Dlk1-Dio3 region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells. *J Biol Chem* 285: 19483-19490
43. Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K (2010) Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 465: 175-181
44. Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ (2005) Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 34: 12135-12140
45. Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, Babiarz JE, Baehner L, Blalock R (2008) Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* 12: 1478-1483
46. Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, Johnstone S, Guenther MG, Johnston WK, Wernig M, Newman J, Calabrese JM, Dennis LM, Volkert TL, Gupta S, Love J, Hannett N, Sharp PA, Bartel DP, Jaenisch R, Young RA (2008) Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 3: 521-533
47. Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Blalock R (2009) Embryonic Stem Cell-Specific microRNAs Promote Induced Pluripotency. *Nat Biotechnol* 5: 459-461
48. Lu D, Davis MPA, Abreu-Goodger C, Wang W, Campos LS, Siede J, Vigorito E, Skarnes WC, Dunham I, Enright AJ, Liu P (2012) miR-25 regulates Wwp2 and Fbxw7 and promotes reprogramming of mouse fibroblast cells to iPSCs. *PLoS ONE* 7: e40938
49. Liao B, Bao X, Liu L, Feng S, Zovoilis A, Liu W, Xue Y, Cai J, Guo X, Qin B, Zhang R, Wu J, Lai L, Teng M, Niu L, Zhang B, Esteban MA, Pei D (2011) MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. *J Biol Chem* 286: 17359-17364
50. Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Derynck R, Blalock R (2011) Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29: 443-448
51. Anokye-Danso F, Trivedi Chinmay M, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, Zhang Y, Yang W, Gruber Peter J, Epstein JA, Morrisey EE (2011) Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8: 376-388
52. Buganim Y, Faddah DA, Cheng AW, Itskovich E, Markoulaki S, Ganz K, Klemm SL, van Oudenaarden A, Jaenisch R (2012) Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* 150: 1209-1222
53. Lin SL, Chang DC, Lin CH, Ying SY, Leu D, Wu DT (2011) Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res* 39: 1054-1065
54. Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi Dyah L, Kano Y, Nishikawa S, Tanemura M, Mimori K, Tanaka F, Saito T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M (2011) Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature MicroRNAs. *Cell Stem Cell* 8: 633-638
55. Kozakowska M, Ciesla M, Stefanska A, Skrzypek K, Was H, Jazwa A, Grochot-Przeczek A, Kotlinowski J, Szymula A, Bartelik A, Mazan M, Yagensky O, Florczyk U, Lemke K, Zebda A, Dyduch G, Nowak W, Szade K, Stepniewski J, Majka M, Derlacz R, Loboda A, Dulak J, Jozkowicz A (2012) Heme oxygenase-1 inhibits myoblast differentiation by targeting myomirs. *Antioxid Redox Signal*. 16: 113-127

## Roles of microRNA in cell reprogramming

Jacek Stepniewski, Alicja Józkowicz, Józef Dulak✉

Department of Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, 7 Gronostajowa St., 30-387 Cracow, Poland

✉e-mail: jozef.dulak@uj.edu.pl

**Key words:** microRNA, reprogramming, induced pluripotent stem cells

### ABSTRACT

Reprogramming of somatic cells with defined transcription factors which leads to the acquisition of pluripotent phenotype requires many modifications in gene expression profile, metabolism and chromatin structure. MicroRNAs, a short non-coding RNA that inhibit translation of recognized mRNA sequences play an important role in this process. Because of the pleiotropism of their action microRNAs regulate subsequent steps in cellular reprogramming, among others activation of p53, mesenchymal-to-epithelial transition and development of embryonic gene expression profile. Further studies on the function of microRNA in reprogramming can increase our understanding of generation, maintenance and differentiation of induced pluripotent stem cells.