миРНК – НОВЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ У ЭУКАРИОТ

А.В. Катохин, Т.Н. Кузнецова, Н.А. Омельянчук

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: katokhin@bionet.nsc.ru

МиРНК – это одноцепочечные РНК длиной около 22 нуклеотидов, которые комплементарно (или частично комплементарно) связываются с мРНК, что приводит к ее разрушению или к ингибированию трансляции с нее. Этот регуляторный механизм посттранскрипционного подавления экспрессии генов присутствует, по-видимому, у всех эукариот. МиРНК происходят в результате процесса созревания РНК-предшественников, имеющих структуру «шпильки» и являющихся, как правило, продуктом транскрипции РНК-полимеразой II особых генов. МиРНК играют важную роль в сложной пространственной и временной регуляции активности генов, поскольку определяют качественный и количественный состав транскриптов и, соответственно, белков, необходимых для развития отдельных тканей, органов и всего организма у животных и растений. Цель обзора – продемонстрировать недавние результаты экспериментальных исследований геномной организации миРНК-генов (в основном человека и животных) и закономерностей их экспрессии, биогенеза миРНК и молекулярных механизмов их взаимодействия с мРНК белоккодирующих генов, а также подчеркнуть роль компьютерных биоинформационных методов при выявлении миРНК-генов и распознавании их мРНК-мишеней.

Список сокращений:

дцРНК – двухцепочечная РНК;
киРНК – «короткие интерферирующие РНК», перевод английского термина «short (иногда small) intefering RNA» (сокращенно – siRNA);
киРНП – нуклеопротеиновый комплекс, содержащий киРНК и белки;
мРНК – матричная РНК
миРНК – микроРНК;
миРНП – нуклеопротеиновый комплекс, содержащий миРНК и белки;
прай-миРНК – (pri-miRNA), длинный первичный транскрипт, формирующий сложную вторичную структуру из шпилек различного размера и порядка;
пре-миРНК – (pre-miRNA), молекула-предшественник миРНК, имеет форму «шпильки»;
ТФ – транскрипционный фактор
EST – Expressed Sequence Tag (прочитанный фрагмент экспрессированной последовательности, т. е. кДНК)
MRE – (MiRNA Responsive Element), участок в мРНК-мишени, взаимодействующий с миРНК;
PTGS – Post-Transcriptional Gene Silencing (посттранскрипционный сайленсинг генов);
RISC – RNA-induced silencing complex (нуклеопротеиновый комплекс, содержащий миРНК или киРНК и белки;
RNAi – РНК-интерференция.

Введение

Регуляция активности генов эукариот осуществляется как на уровне мРНК, так и на уровне белка посредством модуляции целого ряда процессов, начиная с генерации продуктов транскрипции или трансляции соответственно и заканчивая деградацией этих продуктов. В последнее время в эту регуляторную систему был включен новый компонент: регуляция трансляционной эффективности мРНК или скорости их деградации, осуществляемая микроРНК. Первая микроРНК lin-4 была открыта в 1993 г. у нематоды *Caenorhabditis elegans*. Эта миРНК является продуктом одного из гетеро-

хроничных генов, контролирующих переход с первой личиночной стадии на вторую. Было показано, что этот ген не кодирует белок, а производит пару коротких одноцепочечных РНК длиной 22 и 61 нуклеотидов. Сопоставление структур этих РНК позволило заключить, что более длинная молекула способна складываться в шпилечную структуру и являться предшественником короткой. Обнаружение множественных участков, комплементарных зрелой РНК lin-4, в 3′-нетранслируемом районе мРНК другого гетерохроничного гена *lin-14*, находящегося в эпистатических отношениях с геном *lin-4* (Wightman *et al*., 1991), позволило предположить механизм регуляции экспрессии гена *lin-14* посредством ингибирования трансляции его белка короткой РНК, продуцируемой геном *lin-4* (Lee *et al*., 1993; Wightman *et al*., 1993; Olsen, Ambros, 1999). Семь лет спустя у *C. elegans* была открыта еще одна регуляторная малая РНК – let-7, продукт другого гетерохроничного гена, регулирующего переход с поздней личиночной стадии во взрослую (Reinhart *et al*., 2000). В 2001 г. было показано, что эти РНК принадлежат к большому классу малых белок-некодирующих РНК, названных микроРНК (миРНК). К настоящему времени миРНК выявлены у различных организмов и, как было продемонстрировано, имеют высокую степень эволюционного консерватизма структуры (Lau *et al*., 2001; Lee, Ambros, 2001; Lagos-Quintana *et al*., 2001).

МиРНК – это одноцепочечные РНК длиной около 22 нуклеотидов (Ambros *et al*., 2003a), которые комплементарно (или частично комплементарно) связываются с мРНК, что приводит к разрушению этой мРНК или к ингибированию трансляции с нее. Оба эти эффекта приводят в конечном счете к снижению содержания белкового продукта гена, т. е. к подавлению его экспрессии, и поэтому названы посттранскрипционным сайленсингом генов (PTGS от Post-Transcriptional Gene Silencing) (Fire, 1999). По историческим причинам термин PTGS чаще применяется для растений, а для животных кроме него используется также термин РНК-интерференция (RNAi от RNA interference) (Fire *et al*., 1998; Fire, 1999; Hammond *et al*., 2000; 2001a; Zamore, 2001; Аравин и др., 2002а, б; Agrawal *et al*., 2003; Dyrxhoorn *et al*., 2003; Yekta *et al*., 2004; Filipowicz *et al*., 2005).

PTGS является фундаментальным регуляторным механизмом, присутствующим, по-видимому, у всех эукариот (Hammond *et al*., 2001a; Cerutti, 2003; Dykxhoorn *et al*., 2003; Finnegan, Matzke, 2003; Bartel, 2004; Ding *et al*., 2004). Этот механизм основан на комплементарных взаимодействиях между мРНК и одноцепочечными РНК, процессируемыми из небольших молекул двухцепочечной РНК (дцРНК). ДцРНК могут происходить из нескольких эндогенных источников (рис. 1) – прежде всего экспрессироваться с генов миРНК (Bartel, 2004; Ambros, 2004), а также могут возникать в результате деятельности мобильных генетических элементов (Aravin *et al*., 2001; Аравин и др., 2002а, б; Aravin *et al*., 2003; Sijen *et al*., 2003; Smalheiser, Torvik, 2005) или репликации вирусов (Li *et al.*, 2002), или случайной транскрипции в разных направлениях геномных повторов (Mette *et al*., 2000; Djikeng *et al*., 2001; Reinhart, Bartel, 2002; Aravin *et al*., 2003). Во всех случаях, когда короткие дцРНК происходят не в результате транскрипции генов миРНК, а также в случае их экзогенного происхождения, т. е. при экспериментальном введении их в клетку, их принято называть короткими интерферирующими РНК, запускающими процесс RNAi (Elbashir *et al*., 2001a, b; Zamore, 2001; Bartel, 2004). Необходимо отметить, что область биологии, рассматривающая клеточные процессы с участием двухцепочечных РНК, настолько молода, что большинство терминов еще не имеют устоявшихся русских эквивалентов. Поэтому в нашем обзоре мы предлагаем для термина «короткие интерферирующие РНК», являющегося переводом английского термина «short (иногда small) interfering RNA» (сокращенно – siRNA), русское сокращенное обозначение – киРНК.

МиРНК и киРНК имеют общий центральный биогенез и могут выполнять взаимозаменяемые биохимические функции, однако эти два класса РНК, сайленсирующих экспрессию генов, имеют важные различия, относящиеся к их происхождению, степени их эволюционной консервативности и типу генов, подвергаемых сайленсингу (Shi, 2003; Bartel, 2004) (рис. 1).

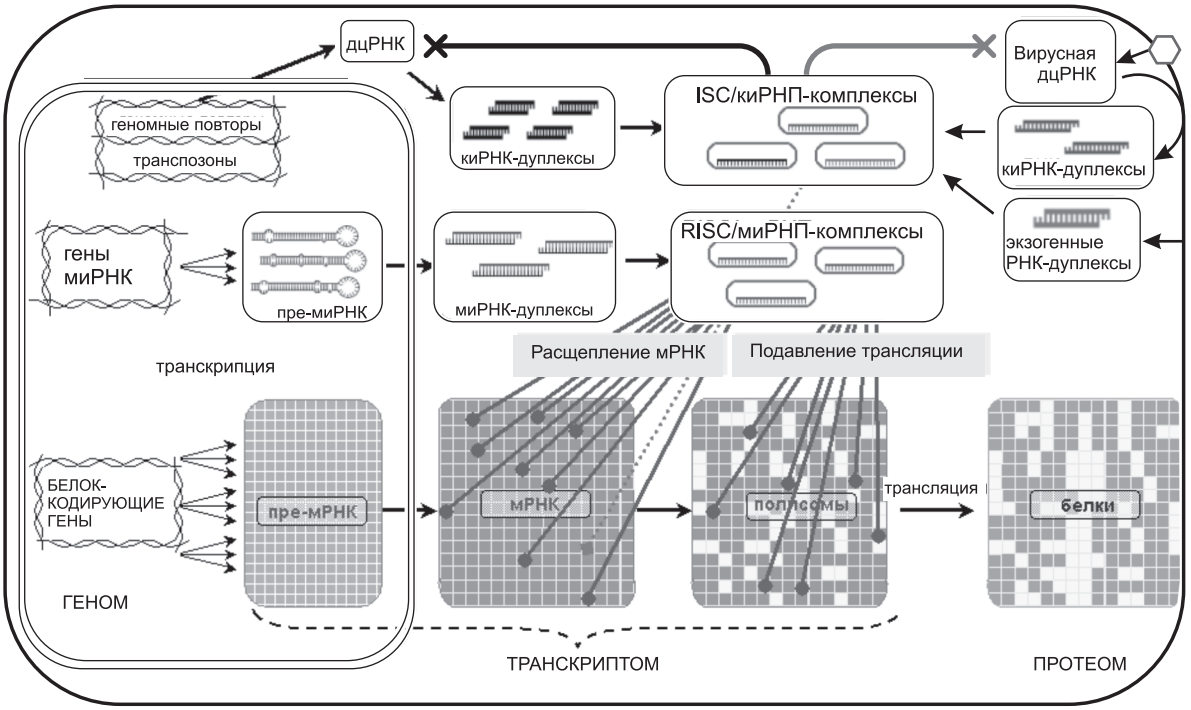

Рис. 1. Общая схема происхождения и функций малых двухцепочечных РНК (миРНК и киРНК) в эукариотической клетке (см. подробности в тексте).

Во-первых, миРНК происходят от геномных локусов, не имеющих никакого отношения к генам, с транскриптами которых эти миРНК взаимодействуют, тогда как киРНК могут образовываться непосредственно из тех же мРНК, а также РНК-интермедиатов транспозонов и вирусов, на которые они оказываются нацеленными в результате созревания. Во-вторых, миРНК созревают из транскриптов, имеющих структуру «шпильки», тогда как в созревание киРНК может быть вовлечен любой сегмент длинной дцРНК. В-третьих, с каждой «шпильки» молекулы-предшественника миРНК генерируется единственный дуплекс из миРНК и комплементарной ей цепи, тогда как длинная молекула дцРНК может дать начало множеству различных киРНК. В-четвертых, последовательности миРНК достаточно консервативны у родственных организмов, в то время как понятие консервативности даже для эндогенных киРНК вряд ли применимо (Bartel, 2004).

В отношении биогенеза и функций в процессе PTGS между миРНК и киРНК наблюдается значительное сходство. МиРНК в цитоплазме находятся в составе миРНП (рибонуклеопротеинового) комплекса (Mourelatos *et al*., 2002; Schwarz, Zamore, 2002), который сходен, если не идентичен, нуклеопротеиновому комплексу RISC (RNA-induced silencing complex), в котором расщепление мРНК-мишени направляется с помощью киРНК (Hutvagner, Zamore, 2002a; Mourelatos *et al*., 2002). Сходство между нуклеопротеиновыми комплексами, содержащими миРНК или киРНК, наблюдается также в их одинаковой чувствительности к ингибиторам – микрококковой нуклеазе и вирусному фактору P1/HC-Pro (Kasschau *et al*., 2003). В настоящее время название RISC стало общим для описания как миРНК-содержащего, так и киРНК-содержащего комплексов (Bartel, 2004; Murchison, Hannon, 2004). Если же необходимо подчеркнуть различия между RISC, связанными с миРНК или киРНК, то используются названия miRISC и siRISC соответственно (Lee *et al*., 2004b).

МиРНК играют важную роль в сложной пространственной и временной регуляции активности генов, поскольку определяют качественный и количественный состав транскриптов

и, соответственно, белков, необходимых для развития отдельных тканей, органов и всего организма у животных и растений (Bartel, 2004; Hwang, Mendell, 2006). Они участвуют также в ряде процессов функционирования взрослого организма. МиРНК осуществляют свою регуляторную функцию на уровне, предшествующем синтезу белка, тонко модулируя использование разных частей транскриптома многоклеточного организма для формирования необходимого для конкретной клетки спектра белков – протеома. Таким образом, миРНК являются новыми необходимыми компонентами генных сетей и молекулярно-генетических систем в целом (Finnegan, Matzke, 2003; Bartel, 2004; Bartel, Chen, 2004).

Целью нашего обзора является не просто изложить полученные в основном за последние три года результаты экспериментальных исследований геномной организации миРНК-генов человека и животных, закономерностей регуляции их экспрессии, биогенеза миРНК, молекулярных механизмов их взаимодействия с мРНК белок-кодирующих генов, но также показать вклад компьютерных биоинформационных методов, благодаря которым в значительной мере были достигнуты успехи в выявлении спектра орто- и паралогичных миРНК-генов и распознавании их мРНК-мишеней. Эффективное сочетание экспериментальных и компьютерных подходов позволило добыть ценнейшие данные о роли миРНК человека и животных в регуляции дифференциальной экспрессии генов.

1. ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ миРНК

1.1. Геномная организация

После открытия первых миРНК у нематоды были предприняты интенсивные усилия по экспериментальному выявлению миРНК у различных организмов с помощью клонирования молекул РНК размером около 22 нуклеотидов и их более длинных предшественников. Это позволило выявить множество миРНК-генов у нематоды (Lau *et al*., 2001; Lee, Ambros, 2001), а также у дрозофилы и человека (Lagos-Quintana *et al*., 2001).

В результате дальнейших экспериментов было идентифицировано множество новых миРНК в геномах человека (Mourelatos *et al*., 2002; Dostie *et al.*, 2003; Lagos-Quintana *et al*., 2003; Michael *et al*., 2003; Calin *et al*., 2004; Esau *et al*., 2004; Poy *et al*., 2004; Bentwich *et al*., 2005c; Cummins *et al*., 2006), макаки-резуса (Miska *et al*., 2004) и других приматов (Berezikov *et al*., 2005), у грызунов – мыши (Lagos-Quintana *et al*., 2002, 2003; Dostie *et al*., 2003; Houbaviy *et al*., 2003; Kim *et al*., 2004; Mansfield *et al*., 2004) и крысы (Kim *et al*., 2004; Miska *et al*., 2004), у рыбы *Danio rerio* (Lim *et al*., 2003b; Kloosterman *et al*., 2006), у беспозвоночных – нематоды (Ambros *et al*., 2003b; Johnston, Hobert, 2003; Lim *et al*., 2003a; Ohler *et al*., 2004) и дрозофилы (Aravin *et al*., 2003; Brennecke *et al*., 2003; Lai *et al*., 2003), в геномах растений (подробнее в Омельянчук и др., 2005). Гены для миРНК были найдены также в геномах вирусов Эпштейна-Барра (Pfeffer *et al*., 2004; Cai *et al*., 2006) и ВИЧ-1 (Omoto *et al*., 2004), герпес-вируса, ассоциированного с саркомой Капоши (Cai *et al*., 2005; Pfeffer *et al*., 2005), γ-герпес-вируса 68 (Pfeffer *et al*., 2005; Grundhoff *et al*., 2006) и цитомегаловируса (Dunn *et al*., 2005; Grey *et al*., 2005; Pfeffer *et al*., 2005).

Основные критерии для помещения сведений о миРНК-кандидатах в общедоступных базах данных, выдвигающие определенные требования к описанию экспрессии и биогенеза этих кандидатов, были выработаны в результате специальной согласительной работы специалистов и оформлены в виде единой системы аннотации миРНК (Ambros *et al*., 2003a). Удовлетворяющие этим критериям последовательности миРНК разных организмов собраны в базе данных Rfam, что позволяет систематизировать обозначения и описания биологических характеристик вновь выявляемых миРНК (http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml) (Griffiths-Jones, 2004). В последствии данные из этого репозитория были перегруппированы в базу данных miRBase, содержащую теперь регистр миРНК, данные об их последовательностях и сведения об их мишенях, что позволило создать автоматизированную систему предсказания генов-мишеней для миРНК

во вновь секвенированных геномах животных (Griffiths-Jones *et al*., 2006). К моменту написания данная база содержала аннотацию для 3845 миРНК животных, среди которых присутствуют 114 миРНК *Caenorhabditis elegans*, 79 – *C. briggsae*, 78 – *Drosophila melanogaster*, 73 – *D. pseudoobscura*, 38 – *Anopheles gambiae*, 25 – *Apis mellifera*, 372 – *Danio rerio*, 130 – *Fugu rubripes*, 131 – *Tetraodon nigroviridis*, 7 – *Xenopus laevis*, 177 – *Xenopus tropicalis*, 144 – *Gallus gallus*, 340 – *Mus musculus*, 234 – *Rattus norvegicus*, 33 – *Bos taurus*, 4 – *Ovis aries*, 54 – *Sus scrofa*, 6 – *Canis familiaris*, 16 – *Lemur catta*, 48 – *Lagothrix lagotricha*, 42 – *Saguinus labiatus*, 71 – *Macaca mulatta*, 75 – *Macaca nemestrina*, 86 – *Gorilla gorilla*, 84 – *Pongo pygmaeus*, 89 – *Pan paniscus*, 83 – *Pan troglodytes*, 462 – *Homo sapiens* (http://microrna.sanger.ac.uk/cgi-bin/sequences/browse.pl).

Похожий тайванский проект, названный miRNAMap, также стремится интегрировать сведения о структуре экспериментально подтвержденных и предсказанных миРНК-генов, зрелых миРНК и их мРНК-мишеней (Hsu *et al*., 2006).

Изучение структуры и геномной организации этих генов позволило выявить несколько важных закономерностей. Во-первых, одна и та же последовательность миРНК может быть кодируема несколькими генами, образующими семейство паралогичных генов (Lagos-Quintana *et al*., 2001; Lau *et al*., 2001; Lee, Ambros, 2001). При этом последовательности паралогичных генов в районах, окружающих последовательности зрелых миРНК, могут значительно различаться (Griffiths-Jones, 2004). Гены, кодирующие идентичные миРНК (как и сами зрелые миРНК), называются одинаково и различаются только номером, идущим после дефиса, например, *miR-6-1* и *miR-6-2*. Различающиеся на один или два нуклеотида зрелые миРНК и гены, их кодирующие, обозначаются также одинаково, но после номера добавляется латинская буква, например *let-7a-1*, *let-7a-2*, *let-7a-3*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f-1*, *let-7f-2* у человека.

Во-вторых, миРНК-гены расположены в геноме, как правило, в районах между белок-кодирующими генами, т. е. представляют собой независимые транскрипционные единицы (Lagos-Quintana *et al*., 2001; Lau *et al*., 2001; Lee, Ambros, 2001). Иногда они могут быть расположены в интронах белок-кодирующих генов, и тогда их транскрипция происходит совместно с пре-мРНК этих генов (Aravin *et al*., 2003; Lagos-Quintana *et al*., 2003; Ying, Lin, 2004).

В-третьих, многие миРНК-гены организованы в кластеры и транскрибируются как мультицистронные первичные РНК-продукты (Lagos-Quintana *et al*., 2001; Lau *et al*., 2001; Lee *et al*., 2002; Mourelatos *et al*., 2002; Seitz *et al*., 2003; 2004b; Tanzer, Stadler, 2004). Особенно это характерно для миРНК-генов дрозофилы, причем кластеры могут быть локализованы как в межгенных промежутках, так и в интронах (Aravin *et al*., 2003). Кластеры могут состоять только из паралогичных миРНК-генов, но могут содержать и миРНК-гены из разных семейств (Lagos-Quintana *et al*., 2001; Lau *et al*., 2001).

В-четвертых, большинство последовательностей зрелых миРНК консервативно у близких видов (Lagos-Quintana *et al*., 2003; Lim *et al*., 2003a, 2003b). Многие консервативны даже у очень отдаленных видов, например, одна треть миРНК *C. elegans* имеет ортологи у дрозофилы и человека (Ambros *et al*., 2003b; Lim *et al*., 2003a) (рис. 2).

Число членов семейства миРНК-генов может быть разным у разных видов: так, у *C. elegans* для *let-7* есть 4 гена, у человека – 15, у дрозофилы – 1 (Pasquinelli *et al*., 2000; Aravin *et al*., 2003; Lai *et al*., 2003; Lim *et al*., 2003a). Консерватизм наблюдается иногда и в геномной организации кластеров ортологичных миРНК-генов (Aravin *et al*., 2003; Lagos-Quintana *et al*., 2003; Sempere *et al*., 2003).

Необходимо отметить, что к настоящему времени не известно ни одной общей миРНК у растений и животных. Этот факт ведет к предположению, что основные белковые компоненты биохимической машины для PTGS с участием миРНК возникли до расхождения этих групп многоклеточных организмов, а собственно миРНК-гены – уже после. Одним из механизмов возникновения миРНК-генов могла быть частичная дупликация последовательностей генов-мишеней, как это было пред-

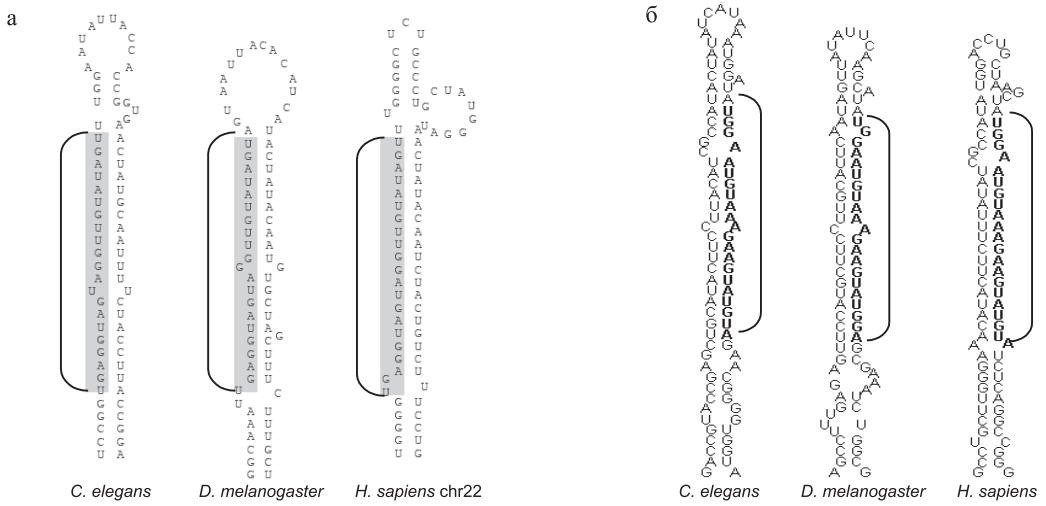

Рис. 2. Структура предшественников ортологичных миРНК.
а – *let-7* (модифицировано из Pasquinelli *et al*., 2000); б – MIR-1 (из Moss, 2002) у трех видов.

положено для миРНК-генов *miR161* и *miR163* у арабидопсиса (Allen *et al*., 2004). По-видимому, эволюция миРНК-генов протекала независимо у животных и растений. Однако механизм эволюции миРНК был одинаков: это последовательные дупликации/потери и функциональной дивергенции с адаптацией к клеточным процессам и регуляторным системам (Tanzer, Stadler, 2004). Например, выделяют три основных эволюционных «взрыва» возникновения миРНК-генов: первый предшествовал разделению первично- и вторичноротых, второй – в линии, ведущей к возникновению позвоночных, и третий совпадает с возникновением плацентарных млекопитающих (Hertel *et al*., 2006).

1.2. Компьютерные методы идентификации генов миРНК

После первых успехов в обнаружении и изучении большого разнообразия миРНК и множества кодирующих их паралогичных и ортологичных генов встал вопрос: сколько вообще имеется миРНК и их генов в отдельных геномах. Стало ясно, что возможности экспериментальных подходов для идентификации миРНК и их генов имеют естественные ограничения, так как разновидности миРНК с очень слабой экспрессией или экспрессией, приуроченной к особым условиям, редкому типу клеток или к очень короткой критической стадии, как правило, не поддаются выявлению (Ambros, 2004).

Поэтому следующий этап идентификации миРНК-генов в геномах связан с разработкой компьютерных подходов и комбинированием их с экспериментальными в интерактивном режиме взаимодействия (Kim, Nam, 2006). Прежде всего были применены методы поиска сходных нуклеотидных последовательностей по всему геному или в близких геномах для исчерпывающего выявления паралогичных и ортологичных миРНК-генов и их кластеров (Pasquinelli *et al*., 2000; Lagos-Quintana *et al*., 2001; Lau *et al*., 2001; Lee, Ambros, 2001). Другим критерием для выявления миРНК-генов была способность консервативных последовательностей, расположенных вне белок-кодирующих районов, формировать стабильные шпилечные структуры. На основе этого алгоритма был разработан компьютерный алгоритм MiRscan, с помощью которого были идентифицированы новые миРНК-гены в геномах *C. elegans* и *C. briggsae* (Lim *et al*., 2003a; Ohler *et al*., 2004). Успешные попытки предсказать в геноме *C. elegans* новые миРНК-гены биоинформатическими методами в сочетании с экспериментальной проверкой кандидатов были описаны еще в ряде работ (Ambros *et al*., 2003b; Grad *et al*., 2003). Для *D. melanogaster* и *D. pseudoobscura* также уда-

лось выявить 48 новых миРНК, консервативных у других насекомых, нематод и позвоночных, с помощью алгоритма MiRseeker, основанного на сходных принципах (Lai *et al.*, 2003).

Алгоритм MiRscan, первоначально разработанный для поиска миРНК-генов нематоды, показал свою эффективность и для геномов позвоночных (человека, мыши, рыбы *Danio rerio*), в частности, с его помощью были предсказаны 107 новых миРНК-генов в геноме человека, 52 из которых были затем экспериментально подтверждены (Lim *et al*., 2003b). В дальнейшем при использовании сходного алгоритма при более тщательном анализе соответствующих геномов были выявлены еще 15 потенциальных миРНК-генов у человека и 45 у мыши, для большинства которых были предсказаны ортологи у крысы (Weber, 2005).

Свойство пре-миРНК животных формировать шпилечные структуры определенного размера и типа, по-видимому, является самым универсальным. Применение только одного этого критерия позволило выявить 5 потенциальных миРНК-генов в геноме вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) (Bennasser *et al*., 2004), один из которых был независимо обнаружен экспериментально (Omoto *et al*., 2004).

Алгоритмы предсказания миРНК-генов, разработанные для одного таксона животных, оказываются пригодными при анализе геномов практически всех животных, однако не могут быть применены к растениям, поскольку шпилечные структуры их пре-миРНК более гетерогенны как по длине (от 64 до 303 нуклеотидов), так и по топологии (Bartel B., Bartel D., 2003). Подробнее об этом написано в обзоре (Омельянчук и др., 2005).

Как правило, авторы работ по компьютерной идентификации миРНК-генов пытаются также оценить общее число этих генов в том или ином геноме. Например, предполагается, что в геноме человека может присутствовать от 200–255 (Lim *et al*., 2003b) до 800 миРНК-генов (Bentwich *et al.*, 2005c), *C. elegans* – 103–120 (Ambros *et al.*, 2003b; Lim *et al*., 2003a; Ohler *et al*., 2004), *D. melanogaster* – 96–124 (Lai *et al*., 2003). Необходимо отметить, что оценки, полученные вышеописанными методами, в значительной мере зависят от способа их вычисления, в частности, от алгоритмов селекции кандидатов исходя из оценок степени филогенетического консерватизма, оценок нуклеотидного сходства или расчетов вторичной структуры предшественников. Действительно, применение более тонких и чувствительных алгоритмов при скрининге геномов животных позволяет выявлять все новые и новые миРНК-гены (Legendre *et al*., 2004; Berezikov *et al*., 2005; Bentwich *et al.*, 2005b; Nam *et al*., 2005; Xue *et al*., 2005).

Необходимо отметить, что большинство современных работ по идентификации миРНК-генов являются сочетанием компьютерного анализа в масштабах целых геномов с экспериментальной проверкой наиболее значимых кандидатов (Lai *et al*., 2003; Ohler *et al*., 2004; Berezikov *et al*., 2005, 2006). Например, в одной работе были применены комбинирование биоинформатического предсказательного метода и выявление экспрессии кандидатов с помощью ДНК-биочип-анализа и последовательность-направленного клонирования (Bentwich *et al*., 2005c).

Самый распространенный метод проверки – нозерн-блот-гибридизация, адаптированная для выявления малых молекул РНК. Однако в некоторых случаях не удается получить этим методом экспериментальные подтверждения для многих предсказанных миРНК и, соответственно, их генов. Эти неподтвержденные миРНК могут не выявляться как из-за того, что уровень их экспрессии не достигает порога чувствительности метода, так и из-за того, что они являются ложными предсказаниями недостаточно совершенного алгоритма. Чтобы разобраться в этом, исследователи применяют более чувствительные методики, такие, как приготовление из коротких РНК специальных кДНК-библиотек и их анализ с помощью полимеразной цепной реакции с применением специфичных праймеров (Kim, Nam, 2006). Таким образом удается получить более надежные оценки чувствительности и специфичности биоинформатических алгоритмов и оперативно совершенствовать эти алгоритмы (Grad *et al*., 2003; Lim *et al*., 2003a). Такое взаимодействие между экспериментальными и компьютерными

подходами позволяет значительно ускорить работы по идентификации миРНК-генов и предпринимать более глубокие исследования закономерностей их геномной организации в секвенированных и секвенируемых геномах.

2. БИОГЕНЕЗ миРНК

2.1. Транскрипция генов миРНК

Биогенез миРНК состоит из двух основных процессов – транскрипции длинного первичного транскрипта – прай-миРНК (pri-miRNA) и созревания. В процессе созревания прай-миРНК сначала преобразуется в пре-миРНК (pre-miRNA), и затем пре-миРНК – в зрелую миРНК длиной ~22 нуклеотида (Bartel, 2004).

Большинство генов, кодирующих миРНК, расположены в межгенных промежутках и достаточно удалены от белок-кодирующих генов, что указывает на то, что они транскрибируются независимо (Lagos-Quintana *et al*., 2001; Lau *et al*., 2001; Lee, Ambros, 2001; Mourelatos *et al*., 2002; Bartel B., Bartel D., 2003; Cullen, 2004; Rodriguez *et al*., 2004; Blow *et al*., 2006) (рис. 3а).

РНК-полимераза II является основной, если не единственной, РНК-полимеразой, транскрибирующей гены миРНК (Cai *et al*., 2004). Одним из доказательств этого является то, что обработка клеток человека альфа-аманитином в концентрации, ингибирующей активность РНК-полимеразы II, значительно снижала уровень прай-миРНК. Методом иммунопреципитации хроматина показана также физическая связь РНК-полимеразы II с промоторами генов миРНК (Lee *et al*., 2004a). Дополнительно анализ промоторов ряда генов миРНК млекопитающих показал, что часть проанализированных промоторов содержит ТАТА-бокс, характерный элемент промоторов генов, регулируемых РНК-полимеразой II (Houbaviy *et al*., 2005). РНК-полимераза II-зависимая транскрипция делает возможным временной и позиционный контроль экспрессии миРНК, приводя к тому, что специфический набор миРНК может экспрессироваться тканеспецифично и в определенные стадии развития организма.

Небольшое количество экспериментально исследованных прай-миРНК структурно похожи на мРНК, поскольку имеют кэп и поли(А)-тракт (Lee *et al.*, 2004a). Наличие кэпов и поли(А)-трактов было достоверно показано для целого ряда предшественников миРНК человека (MIR-23a~27a~24-2, MIR-30, MIR-30a, Let-7a-1, Let-7a-3, MIR-21, MIR-17~18~19a~20~19b-1, MIR-15a~16-1, MIR-22, MIR-92-1) (Cai *et al*., 2004; Lee *et al*., 2004a). Предшественники для миРНК часто встречаются среди EST (Expressed Sequence Tag) животных, что также свидетельствует о наличии поли(А)-тракта (Smalheiser, 2003; Hubbard *et al*., 2005; Mazzarelli *et al*., 2006). Однако при систематическом контекстном анализе геномных районов вокруг независимо транскрибируемых 43 миРНК-генов *C. elegans* и *C. briggsae* сигнал полиаденилирования обнаружен не был, что указывает на возможность РНК-полимераза II-зависимой транскрипции этих генов без полиаденилирования (Ohler *et al*., 2004).

Сведения о расположении промоторов и организации регуляторных элементов в настоящее время довольно скудны. Для двух миРНК-генов человека, *miR-21* и *miR-23a~27a~24-2*, например, было точно установлено положение старта транскрипции (Cai *et al*., 2004; Lee *et al*.,

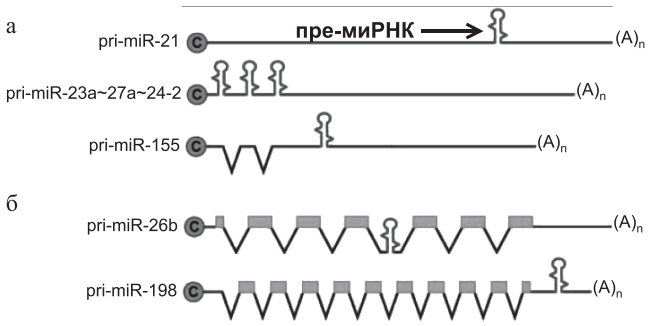

Рис. 3. Структура некоторых прай-миРНК человека.
а – транскрибируемых автономно (вверху – без сплайсинга, в середине – полицистронно, внизу – со сплайсингом); б – транскрибируемых в составе белок-кодирующих мРНК (вверху – расположенных в интронах, внизу – расположенных в экзонах). Положение пре-миРНК обозначено в виде шпилечной структуры, буква С в круге – кэп на 5′-конце, $(A)_n$ – поли(А)-тракт на 3′-конце прай-миРНК (модифицировано из Cullen, 2004).

2004а). Был также идентифицирован регуляторный элемент, необходимый для транскрипции гена *let-7* в определенные моменты развития *C. elegans* (Johnson *et al*., 2003). Также были выявлены и исследованы регуляторные элементы для связывания SRF, MyoD и Mef2 в проявляющих заметную консервативность регуляторных зонах генов *miR-1-1* и *miR-1-2* мыши и человека (Zhao *et al*., 2005).

В результате поиска мотивов, общих для 5′-районов независимо транскрибирующихся миРНК-генов, был выявлен с высокой значимостью мотив с консенсусом CTCCGCCC в районе ~200 нуклеотидов от 5′-конца шпилечных структур миРНК *C. elegans* и *C. briggsae*. Контекстный анализ 5′-районов независимо транскрибирующихся миРНК-генов человека и мыши также позволил обнаружить один сверхпредставленный мотив – CCCWCCC и один менее частый – ATGCAT. При этом оба мотива не были свойственны промоторам белок-кодирующих генов. Мотив ATGCAT присутствовал также и в 5′-районах независимо транскрибирующихся миРНК-генов дрозофилы. Еще одним результатом этого контекстного анализа было обнаружение факта отсутствия TATA-боксов в 5′-районах миРНК-генов у всех организмов (Ohler *et al*., 2004).

Часть генов миРНК (примерно пятая часть у *C. elegans* и до половины – у человека) расположена в интронах генов, кодирующих белки, и в большинстве этих случаев в той же ориентации и с использованием того же промотора (Lai, 2002; Lagos-Quintana *et al*., 2003; Lim *et al*., 2003a; Stark *et al*., 2003; Rodriguez *et al*., 2004; Weber, 2005) (рис. 3б). Доказательством этого служит обнаружение у мыши и человека EST, представляющих собой химерные транскрипты из последовательностей прай-миРНК и мРНК соседних (как с 5′-, так и с 3′-конца) генов в смысловой ориентации (Smalheiser, 2003). Такая интронная локализация генов, кодирующих миРНК, может быть очень консервативна, например, *miR-7* обнаружен в последнем интроне ортологичных генов *hnRNP-K* у таких организмов, как дрозофила, комар *Anopheles gambiae*, мышь и человек (Aravin *et al*., 2003). Недавно был выявлен еще один тип расположения миРНК-генов человека и мыши – в экзонах длинных белок-некодирующих РНК (Cullen, 2004; Rodriguez *et al*., 2004; Weber, 2005) (рис. 3б).

Интересно отметить, что у животных для некоторых первичных транскриптов миРНК обнаружен механизм сплайсинга, альтернативного сплайсинга, а также транс-сплайсинга (Tam, 2001; Bracht *et al*., 2004; Luciano *et al*., 2004;) (рис. 3а).

Также необходимо упомянуть, что благодаря свойству прай-миРНК формировать дцРНК-структуры, они могут быть субстратом для ферментов, осуществляющих редактирование РНК, а именно замещение аденозина на инозин в результате реакции дезаминирования (Даниленко, 2001; Bass, 2002; Knight, Bass, 2002; Morse *et al*., 2002). Действительно, было показано, что прай-миРНК MIR-22 у человека и мыши подвергаются *in vivo* в ядре редактированию «A→I» (Luciano *et al*., 2004). В результате направленного поиска признаков редактирования было выявлено, что 6 из 99 (6 %) транскриптов миРНК подвергаются такой модификации по крайней мере в одной из десяти исследованных тканей (Blow *et al*., 2006). По всей вероятности, редактирование «A→I» молекул предшественников миРНК, которое может влиять как на функцию ферментов созревания миРНК, так и на взаимодействие зрелых миРНК с мРНК-мишенями, может представлять собой еще один уровень регуляторного контроля экспрессии генов на уровне их РНК (Luciano *et al*., 2004).

К настоящему времени описано большое разнообразие паттернов экспрессии генов миРНК (Carrington, Ambros, 2003). Некоторые гены миРНК могут экспрессироваться повсеместно и конститутивно у нематоды (Lau *et al*., 2001), у млекопитающих (Rodriguez *et al*., 2004; Sempere *et al*., 2004). Экспрессия одних миРНК-генов может быть ограничена одной стадией развития организма. Таковы, например, гены *lin-4* и *let-7* у нематоды, связанные с переходом на следующую личиночную стадию (Ambros, 2000; Pasquinelli *et al*., 2000), *let-7*, *miR-100* и *miR-125* у дрозофилы, связанные с окукливанием (Pasquinelli *et al*., 2000; Sempere *et al*., 2002, 2003), миРНК-гены у млекопитающих,

специфичные для эмбриональных стволовых клеток (Houbaviy *et al*., 2003; Suh *et al*., 2004) или для мышиных эмбрионов (Mansfield *et al*., 2004), ген *miR-143*, экпрессирующийся в дифференцирующихся адипоцитах человека (Esau *et al.*, 2004). Для других миРНК-генов экспрессия может иметь органо- и тканеспецифический характер (рис. 4).

Для многих миРНК обнаружены устойчивые характерные тканеспецифические профили экспрессии, например, в лейкоцитах человека или макрофагах мыши (Liu C. *et al*., 2004), или органоспецифичные – в мозге мыши и человека (Krichevsky *et al*., 2003; Sempere *et al*., 2004), в простате, легких, сердце, почках, селезенке и скелетных мышцах человека (Sun *et al*., 2004). У млекопитающих MIR-124a и MIR-135 обнаруживаются преимущественно в мозге, MIR-1 – в сердце, MIR-122 – в печени, MIR-223 – в костном мозге (Lagos-Quintana *et al*., 2002; Babak *et al*., 2004; Chen *et al*., 2004; Rodriguez *et al*., 2004; Sempere *et al*., 2004), а MIR-375 – в инсулин-секретирующих клетках поджелудочной железы (Poy *et al*., 2004). Обнаружены также миРНК, экспрессия которых активируется, например, в ответ на воздействие веществами, вызывающими дифференцировку лейкемийных клеток HL-60 человека в моноцитно-макрофагальноподобные клетки (Kasashima *et al.*, 2004). Мышечноспецифичная экспрессия миРНК-генов *miR-1-1* и *miR-1-2*, как было показано, индуцируется транскрипционным фактором SRF и миогенными факторами MyoD и Mef2 (Zhao *et al*., 2005).

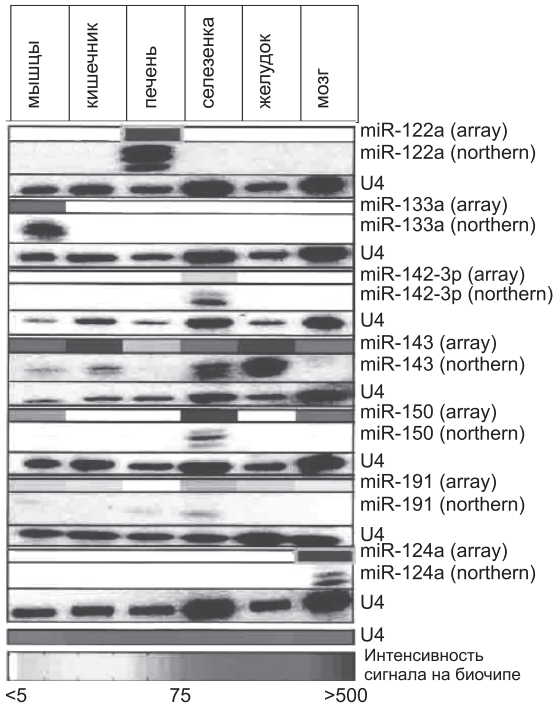

Рис. 4. Органо- и тканеспецифические спектры миРНК у мыши, выявленные методом ДНК-биочипов (array) и подтвержденные нозерн-блот-гибридизацией.
U4 – контрольная гибридизация с малой ядерной РНК U4 (модифицировано из Babak *et al*., 2004).

Изменения в профилях экспрессии миРНК отмечены в некоторых случаях опухолеобразования (Calin *et al*., 2002; Metzler *et al*., 2004; Schmittgen *et al*., 2004; Takamizawa *et al*., 2004; He *et al*., 2005; Kluiver *et al*., 2006). Такие изменения настолько характерны, что во многих случаях предлагается использовать профилирование экспрессии определенных миРНК для диагностики и терапии разновидностей рака (Chen, 2005; Lu J. *et al*., 2005; Esquela-Kerscher, Slack, 2006; Hammond, 2006).

Некоторые миРНК присутствуют в количестве до 50 тыс. молекул на клетку (MIR-2, MIR-52, MIR-58 у *C. elegans*), другие же экспрессируются на низком уровне – 800 молекул на клетку (MIR-124 у *C. elegans*) (Lim *et al*., 2003a). Определение количества отдельных представителей семейства миРНК, различающихся подчас при длине ~ в 22 нуклеотида только по одной позиции, само по себе является очень сложной экспериментальной задачей. Однако развитие специальных особо чувствительных методов позволяет провести такую оценку и выявить поразительную дифференциальную картину содержания той или иной миРНК в разных тканях человека (Allawi *et al*., 2004).

Факторы, определяющие временной и/или пространственный паттерн экспрессии миРНК-генов, а также степень их индуцибельности в ответ на внутренние и внешние сигналы, только начинают выявляться (Ambros, 2004; Zhao *et al*., 2005; Conaco *et al*., 2006; Kim, Nam, 2006). В последнее время развернуты широкомасштабные исследования профилей экспрессии миРНК-генов с помощью технологии ДНК-

биочипов, стимулируемые огромным интересом к миРНК как регуляторам различных клеточных процессов человека, животных и растений (Krichevsky *et al*., 2003; Babak *et al*., 2004; Barad *et al*., 2004; Liu C. *et al*., 2004; Miska *et al*., 2004; Sempere *et al*., 2004; Sun *et al*., 2004; Thomson *et al*., 2004; Baskerville, Bartel, 2005; Hackl *et al*., 2005; Liang *et al*., 2005; Lim *et al*., 2005; Monticelli *et al*., 2005; Shingara *et al*., 2005; Castoldi *et al*., 2006). Хотя биочипы являются мощным средством высокопродуктивного анализа экспрессии генов, малые размеры миРНК представляют серьезное затруднение для обычной биочип-технологии в виде угрозы кросс-гибридизации, поскольку очень трудно создать гибридизационные условия, одинаковые для всех миРНК-зондов. Поэтому часто используют в качестве зондов последовательности, комплементарные пре-миРНК. Однако допущение, что содержание зрелых миРНК всегда коррелирует с содержанием предшественников, пока не более чем рабочее предположение (Kim, Nam, 2006). Предлагаются и другие экспериментальные подходы для общегеномного профилирования экспрессии миРНК, например, miRAGE (miRNA serial Analysis of Gene Expression) (Cummins *et al*., 2006), метод ПЦР с реальновременной детекцией (Schmittgen *et al*., 2004; Jiang *et al*., 2005; Lu D. *et al*., 2005) или с удлинением праймера (Raymond *et al*., 2005), метод РНК-праймированного биочип-основанного анализа с помощью фрагмента Кленова (RAKE – RNA-primed array-based Klenow enzyme) (Nelson *et al*., 2004, 2006), основанный на микробусинах метод проточной цитометрии (Lu J. *et al*., 2005).

Подобные исследования, несомненно, скоро позволят пролить свет на многие аспекты регуляции транскрипции миРНК-генов.

2.2. Созревание миРНК у животных

Продукты транскрипции миРНК-генов с участием РНК-полимеразы II (рис. 5, 7 стадии 1) затем проходят созревание в виде ряда биохимических преобразований. У животных образовавшаяся прай-миРНК, формирующая сложную вторичную структуру из шпилек различного размера и порядка, подвергается в ядре процессингу с помощью фермента DROSHA. Образовавшаяся в результате молекула пре-миРНК длиной ~60–70 нуклеотидов имеет форму «шпильки» (hairpin) (рис. 5, стадия 2) (Lee *et al*., 2003; Shi, 2003; Gregory *et al*., 2004; Murchison, Hannon, 2004; Filipowicz *et al*., 2005).

DROSHA относится к классу II РНКаз III типа и имеет, кроме двух характерных доменов, также домен связывания с двухцепочечной РНК (Han *et al*., 2004; Carmell, Hannon, 2004). DROSHA человека является компонентом двух мультибелковых комплексов (Gregory *et al*., 2004). Малый белковый комплекс, названный Микропроцессором, состоит из DROSHA и дцРНК-связывающего белка DGCR8, и именно он осуществляет первый этап созревания миРНК из первичного транскрипта. DGCR8 ингибирует неспецифическую РНК-азную активность DROSHA и способствует правильному созреванию pre-миРНК (Gregory *et al*., 2004; Landthaler *et al*., 2004). Большой DROSHA-комплекс также проявляет *in vitro* слабую процессирующую прай-миРНК активность, но, скорее всего, данный комплекс вовлечен в пути процессинга других РНК, одним из таких путей может быть процессинг пре-рибосомальной РНК (Wu *et al*., 2000).

У дрозофилы и нематоды белку DROSHA в Микропроцессоре ассистирует дцРНК-связывающий белок PASHA (Filippov *et al*., 2000),

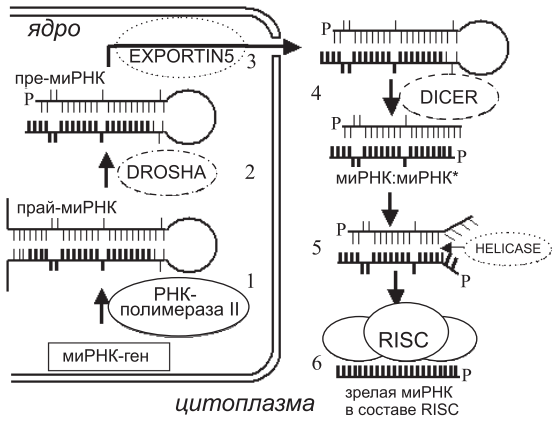

Рис. 5. Биогенез миРНК животных (модифицировано из Bartel, 2004).
Стадии: 1 – транскрипция; 2–6 – созревание (см детали в тексте).

который является ортологом DGCR8 млекопитающих. Подавление экспрессии белка PASHA ведет к накоплению прай-миРНК и уменьшению числа зрелых миРНК (Denli *et al*., 2004).

Районы действия РНКазы DROSHA в прай-миРНК не проявляют какого-либо сходства по контексту. Процессинг зависит от способности РНК образовывать двухцепочечные структуры около сайта расщепления. Показано, что DROSHA у человека селективно расщепляет РНК шпильки, несущие большую терминальную петлю длиной не менее 10 нуклеотидов. От соединения этой петли и стебля DROSHA отрезает примерно два оборота спирали дцРНК (~22нуклеотида) (рис. 6а) и, таким образом, формирует один из концов зрелой миРНК (Lee *et al*., 2004a; Zeng *et al*., 2005).

Для эффективного процессинга прай-миРНК необходимо, чтобы стебель после этого сайта разрезания продолжался еще на один оборот спирали (~10–11нуклеотидов). Таким образом, сайт разрезания для DROSHA определяется в основном расстоянием от терминальной петли. Тем не менее различия в структуре стебля и в последовательностях, окружающих сайт разрезания, также играют роль в выборе сайта (Zeng *et al*., 2005).

При анализе вторичной структуры 10 пре-миРНК человека биохимическими методами были выявлены некоторые характеристики организации пре-миРНК. Сравнение шпилечных вторичных структур пре-миРНК, выведенных из анализа результатов картирования двухцепочечных и одноцепочечных участков, с предсказанными с помощью программы Mfold (Zuker, 2003) вторичными структурами показало, что для 8 из 10 обнаруживаются некоторые отличия от предсказанных в организации терминальной петли и отдельных участков (Krol *et al*., 2004).

DROSHA расщепляет РНК-дуплекс с образованием ступенчатого разреза, типичного для продуктов расщепления РНКазами III. Таким образом, пре-миРНК животных в основании стебля имеют фосфат на 5′-конце и 1÷2 выступающих нуклеотидов на 3′-конце (рис. 6б).

Шпилечные структуры, как правило, не являются совершенными, так как имеют в стеблевой части различное число неспаренных оснований в разных местах. Терминальная петля может быть образована последовательностью до 10 нуклеотидов. Зрелая миРНК может быть локализована как на 5′-, так и на 3′-плече шпилечной структуры (Bartel, 2004).

Образовавшиеся пре-миРНК активно транспортируются комплексом RanGPT/EXPORTIN5 из ядра в цитоплазму (рис. 5, стадия 3) (Lee *et al*., 2003; Yi *et al*., 2003; Bohnsack *et al*., 2004; Lund *et al*., 2004). На примере

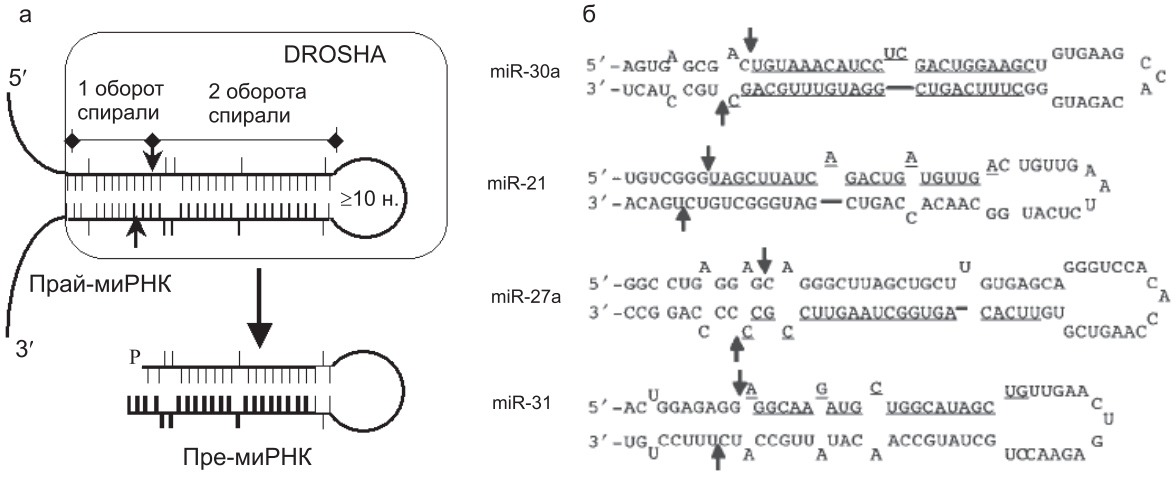

Рис. 6. Схема работы DROSHA-содержащего комплекса.
а – модель процессинга прай-миРНК; б – фрагменты вторичной структуры прай-миРНК для MIR-30a, MIR-21, MIR-31 и MIR-27a человека (модифицировано из Zeng *et al*., 2005). Стрелками показаны сайты расщепления ферментом DROSHA РНК-шпильки.

MIR-30 пре-миРНК человека показано, что два неспаренных нуклеотида на 3′-конце значительно усиливают связывание MIR-30 пре-миРНК с EXPORTIN-5 и Ran-GTP-кофактором, а два неспаренных нуклеотида на 5′-конце – ингибируют. Для связывания пре-миРНК с EXPORTIN5 необходима вся структура за исключением терминальной петли. Комплекс пре-миРНК–EXPORTIN-5 не только осуществляет транспортировку пре-миРНК из ядра в цитоплазму, но и защищает пре-миРНК от деградации в ядре (Zeng, Cullen, 2004).

Дальнейшее созревание миРНК из пре-миРНК происходит в цитоплазме с участием еще одной РНКазы III типа – DICER. Этот фермент узнает в пре-миРНК 3′-конец с выступающими двумя нуклеотидами и разрезает обе цепи пре-миРНК на расстоянии примерно 22 нуклеотидов (два оборота спирали двухцепочечной РНК) от основания стебля (Zhang *et al*., 2002, 2004; Murchison, Hannon, 2004). Таким образом, возникает миРНК-миРНК*-дуплекс длиной примерно 22 нуклеотида с двумя неспаренными нуклеотидами на 3′-концах каждой цепи (рис. 5, стадия 4) (Grishok *et al*., 2001; Hutvagner *et al*., 2001; Ketting *et al*., 2001, Khvorova *et al*., 2003; Schwarz *et al*., 2003). Следует отметить, что, подобно DROSHA, фермент DICER взаимодействует и функционирует в комплексе с кофакторами (Kim, Nam, 2006). В частности, у дрозофилы в последних стадиях созревания миРНК участвуют, наряду с DICER, также белки семейства ARGONAUTE, которые, как правило, вместе со зрелыми миРНК входят в состав белкового комплекса, реализующего PTGS (Okamura *et al*., 2004).

Предполагается, что миРНК-миРНК*-дуплекс расплетается геликазоподобным ферментом, и затем одна из цепей дуплекса входит в состав рибонуклеопротеиновых эффекторных комплексов RISC (Hammond *et al*., 2000, 2001a) или миРНП (Mourelatos *et al*., 2002). Согласно текущей модели, выбор цепи определяется стабильностью двух концов дуплекса: та цепь, чей 5′-конец легче раскручивается, будет инкорпорирована в RISC (Khvorova *et al*., 2003; Schwarz *et al*., 2003). Как правило, пре-миРНК дает начало только одной стабильной зрелой миРНК, а вторая цепь подвергается деградации (Bartel *et al*., 2004; Kim, Nam, 2006). Тем не менее экспериментально показано, что в клетках 293T, трансфицированных MIR-30-предшественником, образуются две зрелые миРНК: MIR-30 и anti-MIR-30 (соответственно с 3′- и с 5′-плечей MIR-30-предшественника) (Zeng *et al*., 2002). Возможно, в случае если оба конца миРНК-миРНК*-дуплекса одинаково стабильны, каждая из нитей может быть инкорпорирована в RISC (рис. 5, стадия 6).

В составе этих комплексов миРНК будет направлять последовательность – специфическое узнавание мРНК-мишеней с последующим ее разрушением или подавлением трансляции. Следует отметить, что с момента инкорпорации миРНК и киРНК в RISC механизмы действия этих комплексов на мРНК-мишени практически неразличимы (Bartel, 2004; Murchison, Hannon, 2004).

2.3. Созревание миРНК у растений

Биогенез миРНК растений требует, по крайней мере, три стадии разрезания с помощью фермента DCL1, представляющего собой DICER-подобную РНКазу III типа, и ряда кофакторов. Затем происходит экспорт миРНК-миРНК*-дуплексов из ядра в цитоплазму с помощью белка HASTY, который является ортологом EXPORTIN-5 животных (Омельянчук и др., 2005).

Здесь же мы только обозначим основные различия между механизмами биогенеза миРНК у растений и животных. Во-первых, у растений созревание миРНК полностью происходит в ядре (Schauer *et al*., 2002, Denti *et al*., 2004). Во-вторых, у них отсутствует ортолог фермента DROSHA (Wu *et al*., 2000). В-третьих, гомологи фермента DICER у растении имеют более широкие функции, катализируя биосинтез миРНК на всех этапах созревания (Kurihara, Watanabe, 2004). В-четвертых, пре-миРНК растений гораздо длиннее, нежели у животных, и имеют более сложную вторичную структуру (Bartel B., Bartel D., 2003; Jones-Rhoades, Bartel, 2004).

2.4. Семейство DICER – белки для созревания миРНК

Одним из ключевых ферментов процессинга у животных являются DICER-подобные РНКазы III типа, которые были найдены у всех исследованных эукариот (Bernstein *et al*., 2003; Carmell, Hannon, 2004; Filipowicz *et al*., 2005).

Количество генов *Dicer* в геномах варьирует от 4 у *A. thaliana* до 1 у позвоночных (Meister *et al*., 2004; Tijsterman, Plasterk, 2004). У такого гриба, как *Neurospora crassa*, описано 2 *Dicer*-подобных гена (Catalanotto *et al*., 2004), а у *Schizosaccharomyces pombe* – лишь один ген (Provost *et al*., 2002). У беспозвоночных *D. melanogaster* обнаружено 2 *Dicer*-подобных гена, а у *C. elegans* – один (Grishok *et al*., 2001; Hutvagner *et al*., 2001; Ketting *et al*., 2001; Knight, Bass, 2001; Wienholds *et al*., 2003; Lee *et al*., 2004b).

Если в геноме присутствуют два и более паралогичных генов *Dicer*, то в биогенез миРНК вовлечен, как правило, только один. Например, у *D. melanogaster Dcr-1* необходим для процессинга пре-миРНК, а *Dcr-2* вовлечен в процессинг других длинных двухцепочечных РНК (Lee *et al*., 2004b).

Семейство DICER-подобных белков характеризуется наличием нескольких предсказанных функциональных доменов: N-концевой DexH-бокс РНК-геликазный мотив, домен DUF283 (с неизвестной функцией), центральный РНК-связывающий PAZ домен, два РНКаза-III-мотива, один или два дцРНК-связывающих домена на С-конце (рис. 7) (Cerutti *et al*., 2000; Schauer *et al*., 2002; Carmell, Hannon, 2004; Zhang *et al*., 2004; Filipowicz *et al*., 2005).

Известно, что у человека DICER1 функционирует как мономер, каталитический центр которого, осуществляющий расщепление, образуется путем внутримолекулярной димеризации двух его РНКаза-III-доменов, RIIIDa и RIIIDb (Zhang *et al*., 2004). Эти домены различаются по последовательностям и функции: RIIIDa расщепляет 3′-цепь, тогда как RIIIDb – 5′-цепь в пре-миРНК. Предполагается, что RIIIDa вместе с N-концевым районом (предположительно, PAZ-доменом) взаимодействует с 3′-концом 3′-цепи. Хотя DICER ассоциируется с несколькими другими белками, они, вероятнее всего, не отвечают за расщепление, поскольку очищенные DICER1 человека и DICER-2 дрозофилы способны катализировать реакцию расщепления (Zhang *et al*., 2002, 2004; Liu *et al*., 2003).

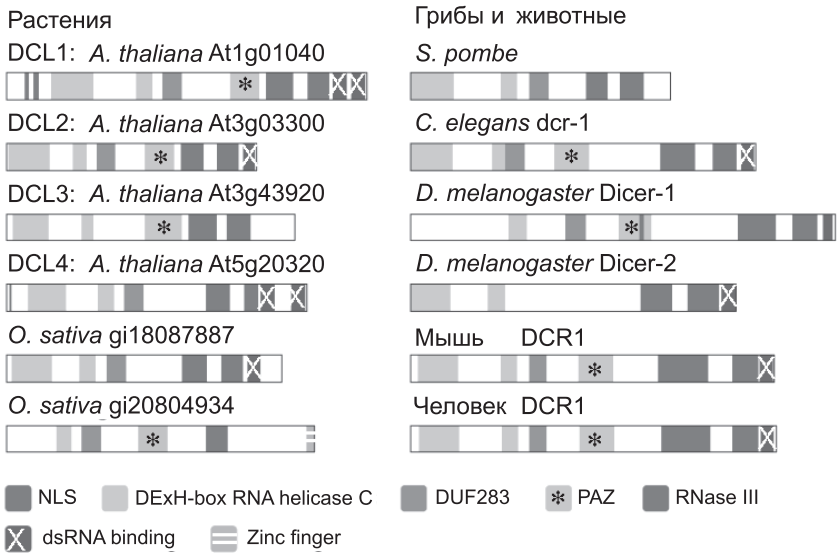

Рис. 7. Доменная структура DICER-подобных белков у разных эукариот.
NLS – сигнал ядерной локализации, DUF283 – домен с неизвестной функцией, PAZ – центральный РНК-связывающий домен, RNase III – РНКаза-III-мотив, dsRNA binding – дцРНК-связывающий домен, Zinc finger – домен типа «цинковый палец» (модифицировано из Schauer *et al*., 2002).

2.5. Сборка нуклеопротеинового комплекса RISC

Все охарактеризованные RISC содержат по крайней мере один белок из семейства ARGONAUTE (Hammond *et al*., 2001b; Nelson *et al*., 2003; Bartel, 2004; Meister *et al*., 2004; Hwang, Mendell, 2006). В наиболее хорошо охарактеризованном RISC-комплексе человека выявлены также геликазы GEMIN3 и GEMIN4, играющие роль при сборке рибонуклеопротеиновых комплексов (Mourelatos *et al*., 2002), и белок FMRP (fragile X mental retardation protein). Последний участвует в регуляции синтеза белка, он способен связываться с мРНК, а также взаимодействовать с AGO2 и миРНК (Brown *et al*., 2001; Ishizuka *et al*., 2002; Jin *et al*., 2004). У дрозофилы среди других RISC-ассоциированных белков выявлены РНК-связывающий белок VIG, белок Fragile X-related (dFXR) – ортолог FMRP человека, и эндонуклеаза TSN-1, однако их роль в составе комплекса неизвестна (Ishizuka *et al*., 2002; Caudy *et al*., 2003; Bartel, 2004). Сходный комплекс из гомологичных белков был обнаружен и у нематоды (Caudy *et al*., 2003).

Следует упомянуть также о RISC-ассоциированных белках с РНК-полимеразной активностью (RdRP – RNA-dependent RNA polymerase), которые, как предполагают, обеспечивают у грибов, растений и некоторых низших животных явление деградативной цепной реакции с генерацией киРНК, соответствующих последовательностям, окружающим первоначальную область действия киРНК:RISC (Hutvagner, Zamore, 2002a; Van Houdt *et al*., 2003). Однако участие этих белков в миРНК-опосредованных процессах пока не выявлено.

Есть данные, что белки семейства DICER также могут входить в RISC. Например, это было показано для DICER-1 и DICER-2 дрозофилы. Оба фермента необходимы для расщепления мишени с помощью киРНК. Кроме того, DICER-2 вовлечен в ингибирование трансляции с помощью миРНК (Lee *et al*., 2004b; Okamura *et al*., 2004).

Обязательные компоненты RISC, белки семейства ARGONAUTE, иногда называют PPD-белками, поскольку они содержат домены PAZ и PIWI (Cerutti *et al*., 2000; Hammond *et al*., 2001b). PAZ-домен способен узнавать характерный двухнуклеотидный выступ дуплекса миРНК-миРНК* и связывать как одноцепочечную, так и двухцепочечную РНК (Lingel *et al*., 2003; Song *et al*., 2003; Yan *et al*., 2003). Эта двоякая способность предполагает, что белок ARGONAUTE может быть связан с миРНК до и после взаимодействия миРНК с мРНК-мишенью (Bartel, 2004). Домен PIWI опосредует белок-белковые взаимодействия между белками ARGONAUTE и DICER, причем последний может способствовать инкорпорации ми/киРНК в RISC (Doi *et al*., 2003; Pham *et al*., 2004; Tahbaz *et al*., 2004).

Число паралогов *Argonaute* в разных геномах варьирует от одного у *S. pombe* (Motamedi *et al*., 2004) до более 20 у *C. elegans* (Carmell *et al*., 2002; Grishok *et al*., 2001). 10 генов, кодирующих белки семейства ARGONAUTE, были найдены у арабидопсиса (Morel *et al*., 2002), 5 – у дрозофилы (Williams, Rubin, 2002) и 8 – у человека (Sasaki *et al*., 2003). Белки ARGONAUTE составляют высококонсервативное семейство, все они имеют общий план строения с PAZ-доменом в середине и PIWI-доменом в С-терминальном районе. В результате анализа особенностей структуры этих доменов белки семейства были подразделены на два подсемейства: AGO – похожие на AGO1 арабидопсиса, и PIWI – похожие на PIWI дрозофилы (Carmell *et al*., 2002). Некоторые различия в структуре белков семейства ARGONAUTE, вероятно, лежат в основе функциональных различий, проявляемых ими в процессе дцРНК-направленного сайленсинга генов.

Для представителей человеческого семейства ARGONAUTE, состоящего из белков EIF2C1/hAGO1, EIF2C2/hAGO2, EIF2C3/hAGO3, EIF2C4/hAGO4 (подсемейство AGO) и PIWIL1/HIWI, PIWIL2/HILI, PIWIL3, PIWIL4/HIWI2 (подсемейство PIWI), с помощью биохимических методов была продемонстрирована их ассоциация с DICER1 и, таким образом, вовлеченность в процесс PTGS (Sasaki *et al*., 2003). Интересно отметить, что в то время как гены белков подсемейства AGO экспрессируются почти во всех тканях, причем уровень мРНК для

AGO2 и *AGO3* одинаков для многих клеточных линий, а для *AGO1* и *AGO4* – более вариабелен и заметно меньше (Meister *et al*., 2004), экспрессия генов белков подсемейства PIWI была выявлена только в семенниках (Sasaki *et al*., 2003) и почти не детектировалась во многих клеточных линиях (Meister *et al*., 2004). Как это отражается в специализации комплексов RISC, содержащих эти белки, предстоит выяснить. Наиболее известно на данный момент то, что белки AGO1/eIF2C1 и AGO2/eIF2C2 входят в состав комплексов RISC, ассоциированных как с киРНК, так и миРНК (Martinez *et al*., 2002; Hutvagner, Zamore, 2002a, b; Mourelatos *et al*., 2002). Для AGO2 человека и мыши было показано также, что он ответственен за эндонуклеазную активность в RISC-комплексе (Hutvagner, Zamore, 2002a, b; Liu J. *et al*., 2004; Meister *et al*., 2004;).

У *D. melanogaster* два белка семейства ARGONAUTE, AGO1 и AGO2, были выделены вместе с миРНК, и дальнейшие эксперименты подтвердили их роль в процессе RNAi (Caudy *et al*., 2003; Hammond *et al*., 2001b; Ishizuka *et al*., 2002; Williams, Rubin, 2002). Особенность белков AGO1 и AGO2 дрозофилы заключается в том, что они необходимы как для последних стадий созревания ми/киРНК, так и для последующего функционирования в составе RISC. Для AGO1 показано связывание с DICER-1 и пре-миРНК, а для AGO2 – участие в расплетании киРНК-дуплекса и обеспечение включения одной из нитей этого дуплекса в RISC (Okamura *et al*., 2004). Другие белки семейства ARGONAUTE у дрозофилы – продукты генов *aubergine* (*aub*) и *piwi* – также участвуют в RNAi (Aravin *et al*., 2001; Аравин и др., 2002a; Kennerdell *et al*., 2002; Pal-Bhadra *et al*., 2002; Tomari *et al*., 2004).

У *C. elegans* два белка семейства ARGONAUTE, RDE-1 и PPW-1, вовлечены в киРНК-опосредованный сайленсинг генов, поскольку мутанты по кодирующим их генам проявляют дефектность по этому процессу (Tabara *et al*., 1999; Grishok *et al*., 2001; Tijsterman *et al*., 2002). Роль двух других представителей семейства ARGONAUTE, ALG- 1 и ALG-2, как было исследовано на примере lin-4 и let-7, заключается в созревании и обеспечении активности миРНК (Grishok *et al*., 2001; Hutvagner *et al*., 2004).

3. миРНК И мРНК-МИШЕНИ

3.1. Механизм действия комплекса миРНК-RISC

После включения миРНК в состав RISC запускается процесс негативной регуляции экспрессии (сайленсинг) гена-мишени по одному из двух посттранскрипционных механизмов: расщепление мРНК-мишени с последующей ее деградацией или трансляционная репрессия (рис. 1).

Следует упомянуть об еще одном дцРНК-зависимом механизме сайленсинга генов, состоящем в модификации гистонов в районе промоторов генов или Cyt^5-метилировании ДНК генов (Finnegan, Matzke, 2003; Bartel, 2004; Matzke *et al*., 2004). В ряде работ продемонстрировано, что киРНК, порождаемые тандемными трансгенами и деятельностью транспозонов, способны запускать этот эпигенетический механизм (Aufsatz *et al*., 2002; Pal-Bhadra *et al*., 2002, 2004; Matzke *et al*., 2004; Morris *et al*., 2004). Относительно участия миРНК в этих процессах убедительных доказательств еще не получено. В этой связи можно упомянуть только работу, в которой предполагается участие MIR165/166 в регуляции уровня мРНК генов *PHB* и *PHV* арабидопсиса с помощью метилирования ДНК этих генов (Bao *et al*., 2004).

В соответствии с принятой в настоящее время моделью выбор посттранскрипционного механизма при миРНК-опосредованном сайленсинге генов определяется степенью и характером комплементарного взаимодействия миРНК с участком в мРНК-мишени – MRE (MiRNA Responsive Element). В самом общем виде правило, выведенное из экспериментальных данных, постулирует: если миРНК почти полностью комплементарна MRE, то включается механизм расщепления мишени, если же миРНК только отдельными своими частями вступает в комплементарные взаимодействия с мРНК-мишенью, то запускается механизм трансляционной репрессии мишени (Hutvagner, Zamore, 2002a, b; Doench *et al*., 2003; Zeng *et al*., 2003; Bartel, 2004).

Рассмотрим подробнее полученные на настоящий момент экспериментальные данные о механизмах миРНК-направленного посттранскрипционного сайленсинга генов.

3.1.1. Расщепление мРНК-мишеней

К настоящему времени специфическая эндонуклеазная активность RISC, направленная зрелыми миРНК, продемонстрирована в большом количестве работ, посвященных PTGS у растений, это подробнее описано в обзоре (Омельянчук и др., 2005).

В отличие от растений случаев расщепления мРНК-мишеней комплексом миРНК-RISC у животных описано пока немного. Например, были получены прямые биохимические доказательства, что у человека именно AGO2-содержащие миРНК-RISC комплексы ответственны за расщепление (Meister *et al*., 2004). Такой путь сайленсинга генов наиболее убедительно показан для мыши в работе по исследованию регуляции экспрессии гена *Hoxb8* в эмбрионах с помощью MIR-196, кодируемой генами, расположенными в HOX-кластерах (Shen, Goodman, 2004; Yekta *et al.*, 2004), а также для человеческих клеток HeLa, трансфицированных конструкциями с фрагментом мышиного гена *Hoxb8*, несущим сайт связывания для MIR-196 мыши, одновременно с самой этой миРНК (Yekta *et al*., 2004). Путь расщепления мРНК описан также для клеток человека, пораженных вирусом EBV, который экспрессирует несколько миРНК, одна из которых нацелена на вирусный транскрипт гена ДНК-полимеразы (Pfeffer *et al*., 2004). Как косвенный признак реализации механизма миРНК-направляемого расщепления мРНК у *D. rerio* с помощью ДНК-биочипов было обнаружено заметное ускорение разрушения мРНК, содержащих MRE для miR-430 (Giraldez *et al*., 2006). Похожие результаты были получены для MIR-125b и Let-7 человека: эти миРНК вызывали ускоренное деаденилирование и снижение концентрации своих мРНК-мишеней даже при неполной комплементарности между миРНК и MRE (Gupta, Brewer, 2006; Wu *et al*., 2006). А для MIR-16 человека удалось показать, что процесс деаденилирования протекает с участием AU-богатых элементов в 3′-НТР, известных раннее по их свойству ускорять расщепление мРНК с этими элементами (Jing *et al*., 2005; Gupta, Brewer, 2006).

В случае реализации механизма расщепления мРНК-мишеней у мыши к 5′-продукту расщепления по его 3′-концу присоединяются от 1 до 9 уридинов, а в случае с миРНК, генерированных EBV, к 5′-фрагменту транскрипта по его 3′-концу присоединяется от 5 до 24 разных нуклеотидов, преимущественно аденины и уридины (Shen, Goodman, 2004).

3.1.2. Ингибирование трансляции мРНК-мишеней

В случае если в мРНК-мишенях имеются MRE, проявляющие частичную комплементарность к миРНК, сайленсинг генов идет по механизму ингибирования трансляции без влияния на стабильность мРНК (Lee *et al*., 1993; Wightman *et al*., 1993; Olsen, Ambros 1999; Reinhart *et al*., 2000; Bartel 2004; Hwang, Mendell, 2006). Как правило, такое развитие событий наблюдается у животных.

Механизм сайленсинга генов путем ингибирования трансляции до конца не ясен, но для двух мишеней миРНК lin-4 *C. elegans* показано, что ингибирование наступает после инициации трансляции (Olsen, Ambros, 1999; Seggerson *et al*., 2002). Есть данные что миРНК-RISC ассоциирует с мРНК-мишенью в полирибосоме: показано, что eIF2C2, GEMIN3, GEMIN4, миРНК let-7b и ее потенциальная мишень – мРНК гена *LIN-28* (ортолога *lin-28 C. elegans*) – осаждались совместно с полирибосомной фракцией в человеческой нейрональной линии клеток (Nelson *et al*., 2004).

Какие свойства дуплексов миРНК:мРНК необходимы для распознавания белковыми комплексами, осуществляющими ингибирование трансляции, до сих пор надежно не определено. Например, у *C. elegans* выявлено, что в мРНК *lin-41* только два из шести предсказанных MRE для let-7 являются функциональными, причем функциональным оказался и промежуток в 27 нуклеотидов между этими двумя MRE (Vella *et al*., 2004). В человеческих клетках, однако,

трансляция репортерных мРНК, содержащих последовательности, способные образовывать несовершенные дуплексы с почти любыми миРНК-подобными последовательностями, эффективно подавлялась природными и искусственными миРНК (Zeng *et al.*, 2002, 2003; Doench *et al*., 2003; Doench, Sharp 2004), что свидетельствует об отсутствии каких-либо специфических структурных требований (Pillai *et al*., 2004).

Основной функцией миРНК при RISC-ингибировании трансляции белка является нацеливание (targeting) RISC к MRE и удержание его там. Это следует из эксперимента, в котором ингибирование трансляции в клетках HeLa шло без участия миРНК за счет простого удержания белков AGO около 3′-нетранслируемого района мРНК репортера. Удержание белков AGO достигалось за счет 5 B-box-шпилек, введенных в 3′-нетранслируемый район репортерной мРНК (Gehring *et al*., 2003), и введенного в последовательность белка N-пептида длиной 22 а.о., специфически связывающего эти шпильки. Эффективность ингибирования синтеза белка зависела от числа, а не от расположения набора шпилек, «привязывающих» AGO2 к 3′-нетранслируемому району (Pillai *et al*., 2004). Это совпадает с результатами других экспериментов, показавших, что присутствие множественных MRE в 3′-нетранслируемых районах усиливает подавление трансляции (Doench *et al*., 2003; Bartel 2004; Doench, Sharp, 2004; Kloosterman *et al*., 2004; Vella *et al*., 2004).

3.1.3. Регуляторная роль миРНК

миРНК были открыты сравнительно недавно, но эти регуляторные молекулы, как было показано при обзоре литературы, играют незаменимую роль в регуляции экспрессии генов, необходимых для развития отдельных тканей, органов и всего организма у беспозвоночных (Wightman *et al*., 1991, 1993; Reinhart *et al*., 2000; Brennecke *et al*., 2003; Johnston, Hobert, 2003; Chang *et al*., 2004), позвоночных (Chen *et al*., 2004; Esau *et al*., 2004; Miska *et al*., 2004; Suh *et al*., 2004; Yekta *et al*., 2004) и растений (Dugas, Bartel, 2004).

Важная роль миРНК в различных процессах развития животных была показана с применением нескольких подходов (Kiefer, 2006). Один из подходов – удаление всех миРНК в результате нокаута DICER. У мышей и рыб такие эксперименты приводят к остановке развития или серьезным нарушениям (Giraldez *et al*., 2005; Wienholds *et al*., 2003; Bernstein *et al*., 2003; Giraldez *et al*., 2006). Есть работы и по нокауту отдельных миРНК: например, удаление MIR-1 у дрозофилы приводит к нарушениям в развитии мышечных клеток (Sokol *et al*., 2005). Недавно был предложен метод нокдауна отдельных миРНК с помощью так называемых «антагомиров» (antagomirs), ДНК-олигонуклеотидов, комплементарных последовательности зрелых миРНК (Krutzfeldt *et a*l., 2005; Davis *et al*., 2006).

В результате последних исследований было показано, что миРНК участвуют также и в ряде процессов функционирования взрослого организма, например, у дрозофилы MIR-2 – в регуляции клеточного цикла, пролиферативных и апоптических процессов у дрозофилы MIR-14 – в жировом метаболизме (Xu et al., 2003; Hwang, Mendell, 2006), у человека MIR-17-5p – в процессах пролиферации (O'Donnell *et al*., 2005), у мыши MIR-345 – негативной регуляции секреции инсулина (Poy *et al*., 2004). Факты о роли миРНК в функционировании эндокринной системы позвоночных обобщены в обзоре (Cuellar, McManus, 2005). Примеры миРНК генов и их биологических мишеней приведены в табл. 1.

Исследователи приходят к выводу, что до 15–30 % кодирующих генов находится под непосредственной регуляцией миРНК (Carthew, 2006; Kim, Nam, 2006), но в настоящее время только для небольшого количества миРНК определены их гены-мишени.

3.2. Компьютерное предсказание мишеней миРНК

Как было описано выше, подавляющее большинство миРНК растений направляют процесс расщепления мРНК-мишеней, образуя почти совершенные дуплексы с ними. Это свойство миРНК растений позволяет с высокой эффективностью предсказывать их мРНК-мишени с помощью традиционных методов компьютерного выявления участков нуклеотидной

Таблица 1

Функции миРНК: примеры генов-мишеней и фенотипических последствий

миРНК	Гены-мишени	Фенотипические последствия	Ссылки
C. elegans			
lin-4	*lin-14* *lin-28*	переход от первой личиночной стадии ко второй	Olsen, Ambros, 1999 Esquela-Kerscher *et al.*, 2005
let-7	*lin-41*	переход к поздней личиночной стадии	Grosshans *et al*., 2005 Esquela-Kerscher *et al*., 2005
MIR-48	*hbl-1*	переход от второй к третьей личиночной стадии	Abbott *et al*., 2005 Li *et al*., 2005
MIR-241			
MIR-84			
Isy-6	*cog-1*	контроль латеральности хеморецептора	Johnston *et al*., 2003 Chang *et al*., 2004
MIR-273	*die-1*		
MIR-61	*vav-1*	процессы развития и клеточной детерминации	Yoo, Greenwald, 2005
MIR-84	*let-60*		Johnson *et al*., 2005
D. melanogaster			
Bantam	*hid*	контроль апоптоза и клеточного роста	Brennecke *et al*., 2003
MIR-14	неизвестно	апоптоз и жировой метаболизм	Xu *et al*., 2003
MIR-2	*hid, grim, rpr, skl*	клеточный цикл, апоптоз	Leaman *et al.*, 2005
MIR-6			
MIR-11			
MIR-308			
MIR-1	неизвестно	рост миоцитов	Sokol, Ambros *et al*., 2005
MIR-31	неизвестно	сегментация эмбрионов	Leaman *et al*., 2005
MIR-iab-4-5p	Ubx	детерминация развития крыльев	Chopra, Mishra, 2006
Млекопитающие			
MIR-181	неизвестно	гематопоэтическая дифференцировка	Chen *et al*., 2004 Chen, Lodish, 2005
MIR-143	*ERK5?*	дифференцировка адипоцитов	Esau *et al*., 2004
MIR-345	*Myotrophin (Mtpn)*	негативная регуляция секреции инсулина	Poy *et al*., 2004
MIR-196a	*HOXB8*	контроль развития	Yekta *et al*., 2004
Let-7b	*LIN-28*	?	Nelson *et al*., 2004
MIR-125a/b	*LIN-28*	нейрональная дифференцировка	Wu, Belasco, 2005
Let-7	*Ras*	контроль пролиферации	Johnson *et al*., 2005
MIR-17-5p, MIR-20a	*E2F1*	контроль пролиферации	O'Donnell *et al*., 2005
MIR-1	*Hand2*	сердечный морфогенез,пролиферация скелетных миоцитов	Zhao *et al*., 2005 Chen *et al*., 2006
MIR-133		пролиферация скелетных миоцитов	Chen *et al*., 2006
MIR-15a, MIR-16-1	*Bcl-2*	контроль апоптоза	Cimmino *et al*., 2005
MIR-155	*AT1R*	ренин-ангиотензинная система	Martin *et al*., 2006

гомологии (подробнее см. в обзоре Омельянчук и др., 2005).

У животных, в отличие от растений, взаимодействие миРНК-RISC-комплекса происходит, как правило, при низкой степени комплементарности в дуплексе миРНК:мРНК и приводит к подавлению трансляции. Известно всего несколько экспериментально подтвержденных природных мРНК-мишеней, подавление трансляции которых направляется миРНК: у *C. elegans* – это мРНК генов *lin-14* и *lin-28* для миРНК *lin-4* (Wightman *et al.*, 1991, 1993; Moss *et al*., 1997; Olsen, Ambros, 1999; Seggerson *et al*., 2002) и мРНК генов *lin-41* и *lin-57/hbl-1* для миРНК let-7 (Reinhart *et al*., 2000; Slack *et al*., 2000; Abrahante *et al*., 2003), у *D. melanogaster* – мРНК гена *hid* для миРНК bantam (Brennecke *et al*., 2003). На основании анализа структуры MRE этих мРНК-мишеней было выведено заключение, что наиболее общим свойством взаимодействия между миРНК и MRE является наличие непрерывной комплементарности для нуклеотидов 5′-района миРНК (с 2-го по 8-й). Еще одно свойство вышеперечисленных MRE заключается в том, что они расположены исключительно в 3′-нетранслируемых районах мРНК, проявляя при этом эволюционную консервативность, и часто в одном транскрипте присутствуют два и более MRE (Bartel, 2004).

Следует отметить, что закономерности взаимодействия миРНК и MRE принято считать универсальными от нематоды до человека, хотя они основаны на очень ограниченном наборе примеров и явно смещены в сторону беспозвоночных. Такое положение дел, конечно же, не устраивает специалистов в области биологии миРНК животных и особенно человека. Однако методов экспериментального выявления миРНК-направляемого подавления трансляции в высокопродуктивном и масштабном формате, соответствующем требованиям современной постгеномной молекулярной биологии, до сих пор не разработано. Теоретические исследования также затруднены, поскольку отсутствие полной комплементарности при миРНК-MRE взаимодействиях у животных явилось серьезным препятствием для традиционных методов компьютерного выявления сайтов связывания. Эта ситуация явилась стимулом для развития комбинированных структурно-контекстных методов компьютерного предсказания мишеней для миРНК при тесном и интенсивном взаимодействии компьютерного и экспериментального подходов.

В 2003 г. появились первые компьютерные работы по предсказанию мишеней для миРНК двукрылых. В этих работах алгоритмы заключались в: 1) создании выборки 3′-нетранслируемых районов ортологичных генов двух и более организмов; 2) в поиске в последовательностях выборки гептамеров, полностью комплементарных 2÷8 нуклеотидам какой-либо миРНК; 3) последующем расчете термодинамической стабильности предполагаемых дуплексов с учетом всей длины миРНК (Gesellchen, Boutros, 2004). Таким образом, при анализе 3′-нетранслируемых районов мРНК *D. melanogaster* и *D. pseudoobscura* и *A. gambiae* было предсказано, наряду с выявлением уже известных мишеней для lin-4, let-7 и bantam, несколько сотен мишеней *D. melanogaster*, потенциально регулируемых одной или более известных миРНК (Enright *et al.*, 2003; Stark *et al*., 2003), причем шесть мишеней для двух миРНК были подтверждены экспериментально (Stark *et al*., 2003). Сходные принципы были положены в основу алгоритма TargetScan, разработанного для предсказания мишеней для миРНК позвоночных. После применения жестких тестов с вычислением статистической значимости результатов были предсказаны 442 мишени при анализе 3′-нетранслируемых районов мРНК человека, мыши, крысы и рыбы фугу (*Takifugu rubripes*). Одиннадцать предсказанных мишеней для семи миРНК человека получили экспериментальное подтверждение (Lewis *et a*l., 2003).

Опыт первых работ по компьютерному выявлению MRE и предсказанию мишеней для миРНК у животных показал необходимость разрабатывать фильтры для снижения доли ложных позитивных предсказаний. Поэтому были предприняты интенсивные исследования деталей миРНК-MRE взаимодействий в экспериментах с использованием искусственных репортерных конструкций, содержащих интактные и искусст-

венно мутированные MRE. Эти эксперименты позволили уточнить эмпирические правила структуры дуплекса миРНК:MRE.

Во-первых, эффективное подавление трансляции обеспечивается почти полной комплементарностью (допускаются наличие только одного неспаренного нуклеотида в этом районе) между 5′-концом миРНК (особенно нуклеотиды 2÷8) и MRE (Boutla *et al*., 2003; Johnston, Hobert 2003; Doench, Sharp, 2004; Kiriakidou *et al*., 2004; Vella *et al*., 2004).

Во-вторых, центральная часть дуплекса может иметь неспаренные основания, выпячивающиеся в виде петли размером 2–5 нуклеотидов в случае асимметричного выпячивания мРНК или размером петли 6–9 нуклеотидов в случае асимметричного выпячивания со стороны миРНК (Kiriakidou *et al.*, 2004; Vella *et al.*, 2004).

В-третьих, G:U пары в дуплексе, особенно с 5′-конца миРНК, негативно сказывались на эффективности подавления трансляции (Doench, Sharp, 2004).

В-четвертых, наличие нескольких MRE в мРНК-мишени увеличивает эффективность подавления трансляции мишени, даже если структура некоторых MRE может несколько не соответствовать сформулированным выше правилам (Doench, Sharp, 2004; Kiriakidou *et al.*, 2004). Размер промежутка между сайтами имеет значение и составляет не менее 9–12 нуклеотидов для эффективного связывания RISC (Doench, Sharp, 2004).

Использование этих уточненных закономерностей взаимодействия миРНК с MRE позволило повысить качество распознавания компьютерных методов. Например, программа «DIANA-microT» распознавала в среднем 9,4 MRE для каждой реальной миРНК человека против 3,7 «MRE» для каждой миРНК с перетасованной последовательностью и в целом предсказала 5031 мишеней для 94 миРНК человека, 222 из которых были консервативны и у мыши (Kiriakidou *et al*., 2004). С помощью другой программы, miRanda, было предсказано около 2000 мРНК-мишеней человека, содержащих MRE для 218 известных на настоящее время миРНК, причем 250 мишеней оказались консервативными у млекопитающих и рыб (John *et al*., 2004).

Было предложено несколько способов снижения доли ложных позитивных предсказаний MRE при использовании вышеизложенных алгоритмических принципов. Например, оценка нуклеотидного состава гептамера из 5′-области миРНК. Наиболее оптимальный состав, как было вычислено, соответствовал 5 C или G и 2 A или U, причем образование пары G:U при взаимодействии миРНК и MRE не допускалось. В процессе поиска MRE для 74 миРНК *D. melanogaster* авторы использовали ограниченную выборку 3′-нетранслируемых районов порядка 30 хорошо охарактеризованных генов и для 27 миРНК предсказали в 17 мРНК 39 MRE, консервативных у *D. pseudoobscura* (Rajewsky, Socci, 2004).

Тщательный анализ ряда работ по предсказанию MRE в мРНК-мишенях животных выявил в алгоритмах несколько слабых со статистической точки зрения моментов (Rehmsmeier *et al*., 2004). Во-первых, это недостатки программ, использованных для расчета термодинамической стабильности дуплексов миРНК:MRE. Во-вторых, неправильная классификация распределения значений свободных энергий как нормального, в то время как оно является скорее распределением экстремальных значений и требует особых расчетов статистической значимости предсказаний. В-третьих, в некоторых работах для генерации негативной контрольной выборки производили перемешивание последовательностей миРНК без учета динуклеотидного состава, хотя считается, что этот состав важен при расчете свободной энергии РНК:РНК дуплексов. В-четвертых, ни в одной работе не было представлено статистического анализа в случае множественности MRE в одной мРНК-мишени. Наконец, ни в одной работе не была затронута проблема статистической зависимости между ортологичными мРНК-мишенями при межвидовом анализе. Авторы разработали оригинальный пакет программ (RNAhybrid, RNAcalibrate и RNAeffective) и применили для предсказания новых и ревизии раннее предсказанных MRE в мРНК-мишенях *D. melanogaster* и *D. pseudoobscura* и *A. gambiae*. Проведенный в качестве дополнительного теста

на специфичность поиск потенциальных MRE в кодирующих районах мРНК этих организмов не выявил статистически значимых MRE (Rehmsmeier *et al*., 2004).

По мере поступления в базы данных новых полностью секвенированных геномов курицы и собаки и повышения качества аннотирования ранее секвенированных геномов человека, мыши и крысы становится возможным дальнейшее развитие методов по предсказанию MRE. Например, предпринимаются попытки выявить специфичные для позвоночных характеристики MRE (Smalheiser, Torvik, 2004). Другой пример – разработка программы TargetScanS, учитывающей уточненные правила комплементарности между миРНК и MRE, расположенных в 3′-нетранслируемом районе у пяти видов организмов. Эта программа при соблюдении требования эволюционной консервативности MRE-кандидатов оказалась способна заметно повысить качество распознавания при отношении сигнала к фону как 3.8:1 даже без расчета термодинамической стабильности потенциальных дуплексов и, таким способом, предсказать 5300 уникальных мРНК-мишеней человека. При этом анализ 5′-нетранслируемых и кодирующих районов той же выборки мРНК не дал значимых результатов (Lewis *et al*., 2005).

Особенный интерес представляют работы, посвященные выявлению корреляций между уровнями содержания миРНК и альтернативных изоформ мРНК, для которых компьютерными методами распознаются соответствующие MRE (Legendre *et al*., 2006), или оценка корреляций между присутствием потенциальных MRE в каком либо транскрипте, и изменениями в его содержании после экспериментов по нокдауну или сверхэкспрессии соответствующей миРНК (Sood *et al.*, 2006; Wang X., Wang X., 2006), поскольку именно такой комбинированный подход требуется для получения точных предсказаний об эффективности синтеза белка с той или иной изоформы мРНК.

Заключение

Представленный анализ данных литературы показывает, какую важную роль играют миРНК в регуляции активности генов. Несмотря на молодость области молекулярной биологии, посвященной миРНК и, вероятно, пока еще незначительный объем наших знаний о разнообразии функций миРНК, все же некоторые обобщения уже сформулированы (Bartel, 2004; Bentwich, 2005a; Carthew, 2006). Прежде всего, это заметное сходство в функционировании транскрипционных факторов (ТФ) и миРНК в качестве регуляторов экспрессии генов (Hobert, 2004):

1) работают наподобие «выключателей»;
2) способны давать плейотропные эффекты, т. е. одна миРНК или ТФ может регулировать много мишеней;
3) способны давать комбинаторные и даже кооперативные эффекты, т.е. несколько миРНК или ТФ могут регулировать одну мишень;
4) являются участниками авторегуляторных контуров с негативными обратными связями;
5) специфичность, по-видимому, часто зависит от кофакторов.

Однако наблюдаются и некоторые различия в функционировании ТФ и миРНК (Hobert, 2004):

1) ТФ могут быть активаторами, т. е. «переключателями» экспрессии генов-мишеней, в то время как миРНК действуют только как «выключатели», репрессоры;
2) ТФ могут непосредственно вступать в многочисленные контакты с другими ТФ с важными конформационными и функциональными последствиями, в то время как про способность миРНК взаимодействовать друг с другом ничего не известно;
3) активность ТФ может быть модулирована различными модификациями, а про модификации зрелых миРНК также ничего не известно;
4) ТФ действуют в ограниченном пространстве ядра, в то время как миРНК – в сложно организованном, компартментализованном пространстве цитоплазмы и способны осуществлять, по-видимому, субклеточный контроль генной экспрессии, который особенно проявляется в нейробиологии;
5) цис-элементы для ТФ могут быть распределены на отрезках ДНК длиной тысячи и миллионы пар оснований, в то время как

цис-элементы для миРНК сосредоточены, как правило, в 3′-нетранслируемых районах мРНК в пределах нескольких тысяч оснований, что, по-видимому, ведет к их ограниченной способности к эволюционированию.

Необходимо отметить также важные различия в процессе миРНК-опосредованной регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне между животными и растениями: у растений миРНК действуют преимущественно как «выключатели» экспрессии генов-мишеней, разрушая транскрипты, а у животных – преимущественно как «ограничители», более тонко настраивая соотношение между транскриптами и соответствующими полипептидными продуктами (Bartel, Chen, 2004).

Эти два типа регуляторных трансфакторов, оперирующих на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, тесно взаимодействуют, регулируя друг друга, поскольку транскрипция миРНК-генов контролируется ТФ, а содержание последних контролируется качественным и количественным составом миРНК-пула. В целом наличие этих двух типов тесно взаимодействующих регуляторных трансфакторов, оперирующих на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, делает систему регуляции дифференциальной экспрессии генов более модулярной, позволяя каждому индивидуальному компоненту быть проще за счет того, что, во-первых, регуляция транскрипции оказывается распределенной между промоторами белоккодирующих генов и миРНК-генов; во-вторых, снижается функциональная ответственность за сам процесс транскрипции, довольно инерционный и неповоротливый, за реализацию быстрой регуляции с помощью негативных обратных связей (Bartel, Chen, 2004).

Таким образом, миРНК, являясь необходимыми компонентами генных сетей и молекулярно-генетических систем в целом, предоставляют одновременно механизм для контроля унифицированности генной экспрессии и состава транскриптома и протеома в клетке определенного типа и простой способ их подстройки в соответствие с внешними и внутренними клеточными сигналами (Finnegan, Matzke, 2003; Bartel, Chen, 2004). В большинстве случаев мРНК-мишени и, соответственно, молекулярные процессы, запускаемые взаимодействием миРНК с ними, еще предстоит определить, и успех в этом в значительной мере зависит от эффективного взаимодействия компьютерных и экспериментальных подходов.

Литература

Аравин А.А., Кленов М.С., Вагин В.В. и др. Роль двухцепочечной РНК в подавлении экспрессии генов эукариот // Мол. биология. 2002а. Т. 36. С. 240–251.

Аравин А.А., Вагин В.В., Наумова Н.М. и др. Явление РНК-интерференции и развитие организма // Онтогенез. 2002б. Т. 33. С. 349–360.

Даниленко Н.Г. РНК-редактирование: генетическая информация корректируется после транскрипции // Генетика. 2001. Т. 37. С. 294–316.

Омельянчук Н.А., Кузнецова Т.Н., Катохин А.В. МикроРНК растений // Информ. вестник ВОГиС. 2005. Т. 9. № 3. С. 440–450.

Abbott A.L., Alvarez-Saavedra E. *et al*. The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans* // Dev Cell. 2005. V. 9. P. 403–414.

Abrahante J.E., Daul A.L., Li M. *et al*. The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene lin-57/hbl-1 controls developmental time and is regulated by microRNAs // Dev. Cell. 2003. V. 4. P. 625–637.

Agrawal N., Dasaradhi P.V., Mohmmed A. *et al*. RNA interference: biology, mechanism, and applications // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. P. 657–685.

Allawi H.T., Dahlberg J.E., Olson S. *et al*. Quantitation of microRNAs using a modified Invader assay // RNA. 2004. 10. P. 1153–1161.

Allen E., Xie Z, Gustafson A. *et al*. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana* // Nat. Genet. 2004. V. 36. P. 1282–90.

Ambros V. Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans* // Curr. Opin. Genet. Dev. 2000. V. 10. P. 428–433.

Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing // Cell. 2003. V. 113. P. 673–676.

Ambros V., Bartel B., Bartel D. *et al*. A uniform system for microRNA annotation // RNA. 2003a. V. 9. P. 277–279.

Ambros V., Lee R., Lavanway A. *et al*. MicroRNAs and

other tiny endogenous RNAs in *C. elegans* // Curr. Biol. 2003b. V. 13. P. 807–818.

Ambros V. The functions of animal microRNAs // Nature. 2004. V. 431. P. 350–355.

Aravin A., Lagos-Quintana M., Yalcin A. *et al*. The small RNA profile during *D. melanogaster* development // Dev. Cell. 2003. V. 5. P. 337–350.

Aravin A., Naumova N., Tulin A. *et al*. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline // Curr. Biol. 2001. V. 11. P. 1017–1027.

Aufsatz W., Mette M., van der Winden J. *et al*. RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 16499–16506.

Babak T., Zhang W., Morris Q. *et al*. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference // RNA. 2004. V. 10. P. 1813–1819.

Bao N., Lye K., Barton M. MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome // Dev. Cell. 2004 V. 5. P.653–662.

Barad O., Meiri E., Avniel A. *et al*. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: System establishment and expression profiling in human tissues // Genome Res. 2004. V. 14. P. 2486–2494.

Bartel D. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function // Cell. 2004. V. 116. P. 281–297.

Bartel B., Bartel D. MicroRNAs: at the root of plant development? // Plant Physiol. 2003. V. 32. P. 709–717.

Bartel D., Chen C. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs // Nat. Rev. Genet. 2004. V. 5. P. 396–400.

Baskerville S., Bartel D.P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes // RNA. 2005. V. 11. P. 241–247.

Bass B. RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA // Ann. Rev. Biochem. 2002. V. 7. P. 817–846.

Bennasser Y., Le S., Yeung M., Jeang K. HIV-1 encoded candidate micro-RNAs and their cellular targets // Retrovirology. 2004. V. 1. P. 43–48.

Bentwich I. A postulated role for microRNA in cellular differentiation // FASEB J. 2005a. V. 19. P. 875–879.

Bentwich I. Prediction and validation of microRNAs and their targets // FEBS Lett. 2005b. V. 579. P. 5904–5910.

Bentwich I., Avniel A., Karov Y. *et al*. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs // Nature Genet. 2005c. V. 37. P. 766–770.

Berezikov E., Guryev V., van de Belt J. *et al*. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes // Cell. 2005. V. 120. P. 21–24.

Berezikov E., Cuppen E., Plasterk R.H. Approaches to microRNA discovery // Nat. Genet. 2006. V. 38. Suppl 1. S2–7.

Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A. *et al*. Dicer is essential for mouse development // Nat. Genet. 2003. V. 35. P. 215–217.

Blow M.J., Grocock R.J., van Dongen S. *et al*. RNA editing of human microRNAs // Genome Biol. 2006. V. 7. P. R27.

Bohnsack M., Czaplinski K., Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs // RNA. 2004. V. 10. P. 185–191.

Boutla A., Delidakis C., Tabler M. Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in Drosophila and the identification of putative target genes // Nucl. Acids Res. 2003. V. 31. P. 4973–4980.

Bracht J., Hunter S., Eachus R. *et al*. Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts // RNA. 2004. V. 10. P. 1586–1594.

Brennecke J., Hipfner D., Stark A. *et al*. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila // Cell. 2003. V. 113. P. 25–36.

Brown V., Jin P., Ceman S. *et al*. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome // Cell. 2001. V. 107. P. 477–487.

Cai X., Hagedorn C.H., Cullen B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs // RNA. 2004. V. 10. P. 1957–1966.

Cai X., Lu S., Zhang Z. *et al*. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 5570–5575.

Cai X., Schafer A., Lu S. *et al*. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed // PLoS Pathog. 2006. V. 2. P. e23.

Calin G., Dumitru C., Shimizu M. *et al*. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 15524–15529.

Calin G., Sevignani C., Dumitru C. *et al*. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 2999–3004.

Carmell M., Hannon G. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. P. 214–218.

Carmell M., Xuan Z., Zhang M., Hannon G. The

Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis // Genes Dev. 2002. V. 16. P. 2733–2742.

Carrington J., Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development // Science. 2003. V. 301. P. 336–338.

Carthew R.W. Gene regulation by microRNAs // Curr. Opin. Genet. Dev. 2006. V. 16. P. 203–208.

Castoldi M., Schmidt S., Benes V. *et al*. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA) // RNA. 2006. V. 12. P. 913–920.

Catalanotto C., Pallotta M., ReFalo P. *et al*. Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa* // Mol. Cell Biol. 2004. V. 24. P. 2536–2545.

Caudy A.A., Ketting R.F., Hammond S.M. *et al*. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes // Nature. 2003. V. 425. P. 411–414.

Cerutti L., Mian N., Bateman A. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain // Trends Biochem. Sci. 2000. V. 25. P. 481–482.

Cerutti H. RNA interference: travelling in the cell and gaining functions? // Trends Genet. 2003. V. 19. P. 39–46.

Chang S., Johnston R., Frekjaer-Jensen C. *et al*. MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode // Nature. 2004. V. 430. P. 785–789.

Chen C., Li L., Lodish H., Bartel D. MicroRNAs modulate hematopoietic lineange differentiation // Science. 2004. V. 303. P. 83–86.

Chen C.Z. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors // N. Engl. J. Med. 2005. V. 353. P. 1768–1771.

Chen C.Z., Lodish H.F. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis // Semin. Immunol. 2005. V. 17. P. 155–165.

Chen J.F., Mandel E.M., Thomson J.M. *et al*. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation // Nat. Genet. 2006. V. 38. P. 228–233.

Chopra V.S., Mishra R.K. «Mir» acles in hox gene regulation // BioEssays. 2006. 28. P. 445–448.

Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M. *et al*. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 13944–13949.

Conaco C., Otto S., Han J.J., Mandel G. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 2422–2427.

Cuellar T.L., McManus M.T. MicroRNAs and endocrine biology // J. Endocrinol. 2005. V. 187. P. 327–332.

Cullen B.R. Transcription and processing of human microRNA precursors // Mol. Cell. 2004. V. 16. P. 861–865.

Cummins J.M., He Y., Leary R.J. *et al*. The colorectal microRNAome // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 3687–3692.

Davis S., Lollo B., Freier S., Esau C. Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. P. 2294–2304.

Denli A., Tops B., Plasterk R. *et al*. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex // Nature. 2004. V. 432. P. 231–235.

Denti M., Boutla A., Tsagris M., Tabler M. Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus // Plant J. 2004. V. 37. P. 762–769.

Djikeng A., Shi H., Tschudi C., Ullu E. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24–26-nucleotide RNAs // RNA. 2001. V. 7. P. 1522–1530.

Ding S., Li H., Lu R. *et al*. RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals // Virus Res. 2004. V. 102. P. 109–115.

Doench J., Petersen C., Sharp P. si RNAs can function as miRNAs // Genes Dev. 2003. V. 17. P. 438–442.

Doench J., Sharp P. Specificity of microRNA target selection in translational repression // Genes Dev. 2004. V. 18. P. 504–511.

Doi N., Zenno S., Ueda R. *et al*. Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors // Curr. Biol. 2003. V. 13. P. 41–46.

Dostie J., Mourelatos Z., Yang M. *et al*. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs // RNA. 2003. V. 9. P. 180–186.

Dugas D.V., Bartel B. MicroRNA regulation of gene expression in plants // Curr. Opin. Plant. Biol. 2004. V. 7. P. 512–520.

Dunn W., Trang P., Zhong Q. *et al*. Human cytomegalovirus expresses novel microRNAs during productive viral infection // Cell Microbiol. 2005. V. 7. P. 1684–1695.

Dykxhoorn D., Novina C., Sharp P. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003. V. 4. P. 457–467.

Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs // Genes Dev. 2001a. V. 15. P. 188–200.

Elbashir S., Harborth J., Lendeckel W. *et al*. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells // Nature. 2001b. V. 411. P. 494–498.

Enright A.J., John B., Gaul U. *et al*. MicroRNA targets in Drosophila // Genome Biol. 2003. V. 5. P. R1.

Esau C., Kang X., Peralta E. *et al*. MicroRNA-143

regulates adipocyte differentiation // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 52361–52365.

Esquela-Kerscher A., Johnson S.M., Bai L. *et al*. Post-embryonic expression of *C. elegans* microRNAs belonging to the lin-4 and let-7 families in the hypodermis and the reproductive system // Dev. Dyn. 2005. V. 234. P. 868–877.

Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer // Nat. Rev. Cancer. 2006. V. 6. P. 259–269.

Filippov V., Solovyev V., Filippova M., Gill S.S. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes // Gene. 2000. V. 245. P. 213–221.

Filipowicz W., Jaskiewicz L., Kolb F.A., Pillai R.S. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs // Curr. Opin. Struct. Biol. 2005. V. 15. P. 331–341.

Finnegan E., Matzke M. The small RNA world // J. Cell. Sci. 2003. V. 116. P. 4689–4693.

Fire A., Xu S., Montgomery M. *et al*. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature. 1998. V. 391. P. 806–811.

Fire A. RNA-triggered gene silencing // Trends Genet. 1999. V. 15. P. 358–363.

Gehring N.H., Neu-Yilik G., Schell T. *et al*. Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex // Mol. Cell. 2003. V. 11. P. 939–949.

Gesellchen V., Boutros M. Managing the genome: microRNAs in Drosophila // Differentiation. 2004. V. 72. P. 74–80.

Giraldez A.J., Cinalli R.M., Glasner M.E. *et al*. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish // Science, 2005. V. 308. P. 833–838.

Giraldez A.J., Mishima Y., Rihel J. *et al*. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs // Science. 2006. V. 312. P. 75–9.

Grad Y., Aach J., Hayes G. *et al*. Computational and experimental identification of *C. elegans* microRNAs // Mol. Cell. 2003. V. 11. P. 1253–1263.

Gregory R., Yan K., Amuthan G. *et al*. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs // Nature. 2004. V. 432. P. 235–240.

Grey F., Antoniewicz A., Allen E. *et al*. Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs // J. Virol. 2005. V. 79. P. 12095–12099.

Griffiths-Jones S., Bateman A., Marshall M. *et al*. Rfam: an RNA family database // Nucl. Acids Res. 2004. V. 31. P. 439–441.

Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S. *et al*. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. Database Issue. P. D140–D144.

Grishok A., Pasquinelli A., Conte D. *et al*. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing // Cell. 2001. V. 106. P. 23–34.

Grosshans H., Johnson T., Reinert K.L. *et al*. The temporal patterning microRNA let-7 regulates several transcription factors at the larval to adult transition in *C. elegans* // Dev. Cell. 2005. V. 8. P. 321–330.

Grundhoff A., Sullivan C.S., Ganem D. A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses // RNA. 2006. V. 12. P. 733–750.

Gupta M., Brewer G. MicroRNAs: new players in an old game // Proc. Natl. Acad. Sci. US . 2006. V. 103. P. 3951–3952.

Hackl H., Burkard T.R., Sturn A. *et al*. Molecular processes during fat cell development revealed by gene expression profiling and functional annotation // Genome Biol. 2005. V. 6. P. R108.

Hammond S., Bernstein E., Beach D., Hannon G. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells // Nature. 2000. V. 404. P. 293–296.

Hammond S., Caudy A., Hannon G. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA // Nat. Rev. Genet. 2001a. V. 2. P. 110–119.

Hammond S., Boettcher S., Caudy A. *et al*. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi // Science. 2001b. V. 293. P. 1146–1150.

Hammond S.M. MicroRNA therapeutics: a new niche for antisense nucleic acids // Trends Mol. Med. 2006. V. 12. P. 99–101.

Han J., Lee Y., Yeom K. *et al*. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing // Genes Dev. 2004. V. 18. P. 3016–3027.

He L., Thomson J.M., Hemann M.T. *et al*. A microRNA polycistron as a potential human oncogene // Nature. 2005. V. 435. P. 828–833.

Hertel J., Lindemeyer M., Missal K. *et al*. The expansion of the metazoan microRNA repertoire // BMC Genomics. 2006. V. 7. P. 25.

Hobert O. Common logic of transcription factor and microRNA action // Trends Biochem. Sci. 2004. V. 29. P. 462–468.

Houbaviy H., Murray M., Sharp P. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs // Dev. Cell. 2003. V. 5. P. 351–358.

Houbaviy H.B., Dennis L., Jaenisch R., Sharp P.A. Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene // RNA. 2005. V. 11. P. 1245–1257.

Hsu P.W., Huang H.D., Hsu S.D. *et al*. miRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes // Nucl. Acids Res.

2006. V. 34 (Database issue). P. D135–139.
Hubbard S.J., Grafham D.V., Beattie K.J. *et al*. Transcriptome analysis for the chicken based on 19,626 finished cDNA sequences and 485,337 expressed sequence tags // Genome Res. 2005. V. 15. P. 174–183.
Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A. *et al*. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA // Science. 2001. V. 293. P. 834–838.
Hutvagner G., Zamore P. RNAi: nature abhors a double-strand // Curr. Opin. Genet. Dev. 2002a. V. 12. P. 225–232.
Hutvagner G., Zamore P. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex // Science. 2002b. V. 297. P. 2056–2060.
Hutvagner G., Simard M., Mello C., Zamore P. Sequence-specific inhibition of small RNA function // PloS Biol. 2004. V. 2. P. 465–475.
Hwang H.W., Mendell J.T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis // Br. J. Cancer. 2006. V. 94. P. 776–780.
Ishizuka A., Siomi M., Siomi H. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins // Genes Dev. 2002. V. 16. P. 2497–2508.
Jiang J., Lee E.J., Gusev Y., Schmittgen T.D. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. P. 5394–5403.
Jin P., Alisch R.S., Warren S.T. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation // Nat. Cell Biol. 2004. V. 6. P. 1048–1053.
Jing Q., Huang S., Guth S. *et al*. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability // Cell. 2005. V. 120. P. 623–634.
John B., Enright A., Aravin A.T. *et al*. Human microRNA targets // PloS Biol. 2004. V. 2. P. 1862–1869.
Johnson S., Lin S., Slack F. The time of appearance of the *C. elegans* let-7 microRNA is transcriptionally controlled utilizing a temporal regulatory element in its promoter // Dev. Biol. 2003. V. 259. P. 364–379.
Johnson S.M., Grosshans H., Shingara J. *et al*. RAS is regulated by the let-7 microRNA family // Cell. 2005. V. 120. P. 635–647.
Johnston R., Hobert O. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *C. elegans* // Nature. 2003. V. 426. P. 845–849.
Jones-Rhoades M., Bartel D. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA // Mol. Cell. 2004. V. 14. P. 787–799.
Kasashima K., Nakamura Y., Kozu T. Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 322. P. 403–410.
Kasschau K., Xie Z., Allen E. *et al*.P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function // Dev. Cell. 2003. V. 4. P. 205–217.
Kennerdell J.R., Yamaguchi S., Carthew R.W. RNAi is activated during Drosophila oocyte maturation in a manner dependent on aubergine and spindle-E // Genes Dev. 2002. V. 16. P. 1884–1889.
Ketting R., Fischer S., Bernstein E. *et al*. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans* // Genes Dev. 2001. V. 15. P. 2654–2659.
Khvorova A., Reynolds A., Jayaseva S. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias // Cell. 2003. V. 115. P. 209–216.
Kiefer J.C. microRNAs under the microscope // Dev Dyn. 2006. V. 235. P. 846–853.
Kim J., Krichevsky A., Grad Y. *et al*. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 360–365.
Kim V.N., Nam J.W. Genomics of microRNA // Trends Genet. 2006. V. 22. P. 165–173.
Kiriakidou M., Nelson P., Kouranov A. *et al*. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets // Genes Dev. 2004. V. 18. P. 1165–1178.
Kloosterman W.P., Wienholds E., Ketting R.F., Plasterk R.H. Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. 6284–6291.
Kloosterman W.P., Steiner F.A., Berezikov E. *et al*. Cloning and expression of new miRNAs from zebrafish // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. P. 2558–2569.
Kluiver J., Haralambieva E., de Jong D. *et al*. Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma // Genes Chromosomes Cancer. 2006. V. 45. P. 147–153.
Knight S., Bass B. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans* // Science. 2001. V. 293. P. 2269–2271.
Knight S.W., Bass B.L. The role of RNA editing by ADARs in RNAi // Mol. Cell. 2002. V. 10. P. 809–817.
Krichevsky A., King K., Donahue C. *et al*. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development // RNA. 2003. V. 9. P. 1274–1281.
Krol J., Sobczak K., Wilczynska U. *et al*. Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design // J. Biol Chem.

2004. V. 279. P. 42230–42239.
Krutzfeldt J., Rajewsky N., Braich R. *et al*. Silencing of microRNAs *in vivo* with «antagomirs» // Nature. 2005. V. 438. P. 685–689.
Kurihara Y., Watanabe Y. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 12753–12758.
Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs // Science. 2001. V. 294. P. 853–858.
Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A. *et al*. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse // Curr. Biol. 2002. V. 12. P. 735–739.
Lagos-Quintana M., Rauhut R., Meyer J. *et al*. New microRNAs from mouse and human // RNA. 2003. V. 9. P. 175–179.
Lai E. MicroRNAs are complementary to 3′UTR motifs that mediate negative post-transcriptional regulation // Nat. Genet. 2002. V. 30. P. 363–364.
Lai E.C., Tomancak P., Williams R.W., Rubin G.M. Computational identification of Drosophila microRNA genes // Genome Biol. 2003. V. 4. P. R42.
Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The Human DiGeorge Syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for миРНК biogenesis // Curr. Biol. 2004. V. 14. P. 2162–2167.
Lau N., Lim L., Weinstein E., Bartel D. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *C. elegans* // Science. 2001. V. 294. P. 858–862.
Leaman D., Chen P.Y., Fak J. *et al*. Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in Drosophila development // Cell. 2005. V. 121. P. 1097–1108.
Lee R., Feinbaum R., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 // Cell. 1993. V. 75. P. 843–854.
Lee R., Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans* // Science. 2001. V. 294. P. 862–864.
Lee Y., Jeon K., Lee J. *et al*. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization // The EMBO J. 2002. V. 21. P. 4663–4670.
Lee Y., Ahn C., Han J. *et al*. The nuclear RNAase III Drosha initiates microRNA processing // Nature. 2003. V. 425. P. 415–419.
Lee Y., Kim M., Han J. *et al*. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II // The EMBO J. 2004a. V. 23. P. 4051–4060.
Lee Y., Nakahara K., Pham J. *et al*. Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways // Cell. 2004b. V. 117. P. 69–81.
Legendre M., Lambert A., Gautheret D. Profile-based detection of microRNA precursors in animal genomes // Bioinformatics. 2004. V. 21. № 7. P. 841–845.
Legendre M., Ritchie W., Lopez F., Gautheret D. Differential repression of alternative transcripts: a screen for miRNA targets // PLoS Comput. Biol. 2006. V. 2. P. e43.
Lewis B., Shih I., Jones-Rhoades M. *et al*. Prediction of mammalian microRNA targets // Cell. 2003. V. 115. P. 787–798.
Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets // Cell. 2005. V. 120. P. 15–20.
Li H., Li W., Ding S. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus // Science. 2002. V. 296. P. 1319–1321.
Li M., Jones-Rhoades M.W., Lau N.C. *et al*. Regulatory mutations of mir-48, a *C. elegans* let-7 family MicroRNA, cause developmental timing defects // Dev. Cell. 2005. V. 9. P. 415–422.
Liang R.Q., Li W., Li Y. *et al*. An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. P. e17.
Lim L., Lau N., Weinstein E. *et al*. The microRNAs of *C. elegans* // Genes Dev. 2003a. V. 17. P. 991–1008.
Lim L., Glasner M., Yekta S. *et al*. Vertebrate microRNA genes // Science. 2003b. V. 299. P. 1540.
Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engele P. *et al*. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs // Nature. 2005. V. 433. № 7027. P. 769–773.
Lingel A., Simon B., Izaurralde E., Sattler M. Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain // Nature. 2003. V. 426. P. 465–469.
Liu Q., Rand T., Kalidas S. *et al*. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway // Science. 2003. V. 301. P. 1921–1925.
Liu C., Calin G., Meloon B. *et al*. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 9740–9744.
Liu J., Carmell M., Rivas F. *et al*. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi // Science. 2004. V. 305. P. 1437–1441.
Lu D.P., Read R.L., Humphreys D.T. *et al*. PCR-based expression analysis and identification of microRNAs // J. of RNAi and Gene Silencing. 2005. V. 1. P. 44–49.
Lu J., Getz G., Miska E.A. *et al*. MicroRNA expression profiles classify human cancers // Nature. 2005. V. 435. P. 834–838.
Luciano D., Mirsky H., Vendetti N., Maas S. RNA

editing of a miRNA precursor // RNA. 2004. V. 10. P. 1174–1177.

Lund E., Guttinger S., Calado A. *et al*. Nuclear export of microRNA precursors // Science. 2004. V. 303. P. 95–98.

Mansfield J., Harfe B., Nissen R. *et al*. MicroRNA-responsive «sensor» transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression // Nature Genet. 2004. V. 36. P. 1079–1083.

Martin M.M., Lee E.J., Buckenberger J.A. *et al*. MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts // J. Biol. Chem. 2006. [Epub ahead of print].

Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub A. *et al*. Single-stranded antisense siRNA guide target RNA cleavage in RNAi // Cell. 2002. V. 110. P. 563–574.

Matzke M., Aufsatz W., Kanno T. *et al*. Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1677. P. 129–141.

Mazzarelli J.M., White P., Gorski R. *et al*. Novel genes identified by manual annotation and microarray expression analysis in the pancreas // Genomics. 2006. (Epub ahead of print).

Meister G., Landthaler M., Patraniowska A. *et al*. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs // Mol. Cell. 2004. V. 15. P. 185–197.

Metzler M., Wilda M., Busch K. *et al*. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma // Genes Chromosomes Cancer. 2004. V. 39. P. 167–169.

Mette M.F., Aufsatz W., van der Winden J. *et al*. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA // The EMBO J. 2000. V. 19. P. 5194–5201.

Michael M.Z., O'Connor S.M., van Holst Pellekaan N.G. *et al*. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia // Mol. Cancer Res. 2003. V. 1. P. 882–891.

Miska E., Alvarez-Saavedra E., Townsend M. *et al*. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain // Genome Biol. 2004. V. 5. P. R68.

Monticelli S., Ansel K.M., Xiao C. *et al*. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system // Genome Biol. 2005. V. 6. P. R71.

Morel J.B., Godon C., Mourrain P. *et al*. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 629–639.

Morris K., Chan S., Jacobsen S., Looney D. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells // Science. 2004. V. 305. P. 1289–1292.

Morse D., Aruscavage P., Bass B. RNA hairpins in noncoding regions of human brain and *C. elegans* mRNA are edited by adenosine deaminases that act on RNA // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 7906–7911.

Moss E., Lee R., Ambros V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the lin-4 RNA // Cell. 1997. V. 88. P. 637–646.

Moss E.G. MicroRNAs: hidden in the genome // Curr. Biol. 2002. V. 12. P. R138–140.

Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S. *et al*. MiRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs // Genes Dev. 2002. V. 16. P. 720–728. PMID: 1191–4277.

Motamedi M.R., Verdel A., Colmenares S.U. *et al*. Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs // Cell. 2004. V. 119. P. 789–802.

Murchison E., Hannon J. MiRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery // Curr. Opin. Cell Biol. 2004. V. 16. P. 223–229.

Nam J.W., Shin K.R, Han J. *et al*. Human microRNA prediction through a probabilistic co-learning model of sequence and structure // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. P. 3570–3581.

Nelson P., Kiriakidou M., Sharma A. *et al*. The microRNA world: small is mighty // Trends Biochem. Sci. 2003. V. 28. P. 534–540.

Nelson P.T., Baldwin D.A., Scearce L.M. *et al*. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs // Nat. Methods. 2004. V. 1. P. 155–161.

Nelson P.T., Baldwin D.A., Kloosterman W.P. *et al*. RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain // RNA. 2006. V. 12. P. 187–191.

Nelson P., Hatzigeorgiou A., Mourelatos Z. MiRNP: mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line // RNA. 2004. V. 10. P. 387–394.

O'Donnell K.A., Wentzel E.A., Zeller K.I. *et al*. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression // Nature. 2005. V. 435. P. 839–843.

Ohler U., Yekta S., Lim L. *et al*. Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification // RNA. 2004. V. 10. P. 1309–1322.

Okamura K., Ishizuka A., Siomi H., Siomi M. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways // Genes Dev. 2004. V. 18. P. 1655–1666.

Olsen P., Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *C. elegans* by blocking

LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation // Dev. Biol. 1999. V. 216. P. 671–680.

Omoto S., Ito M., Tsutsumi Y. *et al*. HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA // Retrovirology. 2004. V. 1. P. 44–56.

Pal-Bhadra M., Bhadra U., Birchler J.A. RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in Drosophila // Mol. Cell. 2002. V. 9. P. 315–327.

Pal-Bhadra M., Leibovitch B.A., Gandhi S.G. *et al*. Heterochromatic silencing and HP1 localization in Drosophila are dependent on the RNAi machinery // Science. 2004. V. 303. P. 669–672.

Pasquinelli A., Reinhart B., Slack F. *et al*. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA // Nature. 2000. V. 408. P. 86–89.

Pham J.W., Pellino J.L., Lee Y.S. *et al*. A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in Drosophila // Cell. 2004. V. 117. P. 83–94.

Pfeffer S., Zavolan M., Grasser F. *et al*. Identification of virus-encoded microRNAs // Science. 2004. V. 304. P. 734–736.

Pfeffer S., Sewer A., Lagos-Quintana M. *et al*. Identification of microRNAs of the herpesvirus family // Nat. Methods. 2005. V. 2. P. 269–276.

Pillai R., Artus C., Filipowicz W. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis // RNA. 2004. V. 10. P. 1518–1525.

Provost P., Silverstein R.A., Dishart D. *et al*. Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 16648–16653.

Poy M., Eliasson L., Krutzfeldt J. *et al*. A pancreatic islet-specific microRNA regulares insulin secretion // Nature. 2004. V. 432. P. 226–230.

Rajewsky N., Socci N. Computational identification of microRNA targets // Dev. Biol. 2004. V. 267. P. 529–535.

Raymond C.K., Roberts B.S., Garrett-Engele P. *et al*. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs // RNA. 2005. V. 11. P. 1737–1744.

Rehmsmeier M., Steffen P., Hochsmann M., Giegerich R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes // RNA. 2004. V. 10. P. 1507–1517.

Reinhart B., Bartel D. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats // Science. 2002. V. 297. P. 1831.

Reinhart B., Slack F., Basson M. *et al*. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* // Nature. 2000. V. 403. P. 901–906.

Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J., Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units // Genome Res. 2004. V. 14. P. 1902–1910.

Sasaki T., Shiohama A., Minoshima S., Shimizu N. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome // Genomics. 2003. V. 82. P. 323–330.

Schauer S., Jacobsen S., Meinke D., Ray A. DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development // Trends Plant Sci. 2002. V. 7. P. 487–491.

Schmittgen T., Jiang J., Liu Q., Yang L. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32: P. e43.

Schwarz D., Zamore P. Why do miRNAs live in the miRNP? // Genes and Dev. 2002. V. 16. P. 1025–1031.

Schwarz D., Hutvagner G., Du T. *et al*. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex // Cell. 2003. V. 115. P. 199–208.

Seggerson K., Tang L., Moss E. Two genetic circuits repress the *C. elegans* heterochronic gene lin-28 after translation initiation // Dev. Biol. 2002. V. 243. P. 215–225.

Seitz H., Youngson N., Lin S.P. *et al*. Imprinted microRNA genes transcribed antisense to a reciprocally imprinted retrotransposon-like gene // Nat. Genet. 2003. V. 34. P. 261–262.

Seitz H., Royo H., Lin S. *et al*. Imprinted small RNA genes // Biol. Chem. 2004a. V. 385. P. 905–911.

Seitz H., Royo H., Bortolin M. *et al*. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain // Genome Res. 2004b. V. 14. P. 1741–1748.

Sempere L.F., Dubrovsky E.B., Dubrovskaya V.A. *et al*. The expression of the let-7 small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster* // Dev. Biol. 2002. V. 244. P. 170–179.

Sempere L.F., Sokol N.S., Dubrovsky E.B. *et al*. Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-complex gene activity // Dev. Biol. 2003. V. 259. P. 9–18.

Sempere L., Freemantle S., Pitha-Rowe I. *et al*. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation // Genome Biol. 2004. V. 5. P. R13.

Shen B., Goodman H. Uridine addition after microRNA-directed cleavage // Science. 2004. V. 306. P. 997.

Shi Y. Mammalian RNAi for the masses // Trends Genet. 2003. V. 19. P. 9–12.

Shingara J., Keiger K., Shelton J. *et al*. An optimized

isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling // RNA. 2005. V. 11. P. 1461–1470.

Sijen T., Plasterk R. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi // Nature. 2003. V. 426. P. 310–314.

Slack F., Basson M., Liu Z. *et al*. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor // Mol. Cell. 2000. V. 5. P. 659–669.

Smalheiser N.R. EST analyses predict the existence of a population of chimeric microRNA precursor-mRNA transcripts expressed in normal human and mouse tissues // Genome Biol. 2003. V. 4. P. 403.

Smalheiser N., Torvik V. A population-based statistical approach identifies parameters characteristic of human microRNA-mRNA interactions // BMC Bioinformatics. 2004. V. 5. P. 139–146.

Smalheiser N.R., Torvik V.I. Mammalian microRNAs derived from genomic repeats // Trends Genet. 2005. V. 21. P. 322–326.

Sokol N.S., Ambros V. Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth // Genes Dev. 2005. V. 19. P. 2343–2354.

Song J., Liu J., Tolia N. *et al*. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes // Nat. Struct. Biol. 2003. V. 10. P. 1026–1032.

Sood P., Krek A., Zavolan M. *et al*. Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 2746–2751.

Stark A., Brennecke J., Russel R., Cohen S. Identification of Drosophila microRNA targets // PLOS Biol. 2003. V. 1. P. 397–409.

Suh M., Lee Y., Kim J. *et al*. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs // Dev. Biol. 2004. V. 270. P. 488–498.

Sun Y., Koo S., White N. *et al*. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. e188.

Tabara H., Sarkissian M., Kelly W. *et al*. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans* // Cell. 1999. V. 99. P. 123–132.

Tahbaz N., Kolb F.A., Zhang H. *et al*. Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer // The EMBO Rep. 2004. V. 5. P. 189–194.

Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K. *et al*. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival // Cancer Res. 2004. V. 64. P. 3753–3756.

Tam W. Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA // Gene. 2001. V. 274. № 1/2. P. 157–167.

Tanzer A., Stadler P. Molecular evolution of a microRNA cluster // J. Mol. Biol. 2004. V. 339. P. 327–335.

Tijsterman M., Okihara K.L., Thijssen K., Plasterk R.H. PPW-1, a PAZ/PIWI protein required for efficient germline RNAi, is defective in a natural isolate of *C. elegans* // Curr. Biol. 2002. V. 12. P. 1535–1540.

Tijsterman M., Plasterk R. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi // Cell. 2004. V. 117. P. 1–3.

Thomson J.M., Parker J., Perou C.M., Hammond S.M. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression // Nat. Methods. 2004. V. 1. P. 47–53.

Tomari Y., Du T., Haley B. *et al*. RISC assembly defects in the Drosophila RNAi mutant armitage // Cell. 2004. V. 116. P. 831–841.

Van Houdt H., Bleys A., Depicker A. RNA target sequences promote spreading of RNA silencing // Plant Physiol. 2003. V. 131. P. 245–253.

Vella M., Choi E., Lin S. *et al*. The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3′UTR // Genes Dev. 2004. V. 18. P. 132–137.

Vella M.C., Reinert K., Slack F.J. Architecture of a validated microRNA::target interaction // Chem. Biol. 2004. V. 11. P. 1619–1623.

Wang X., Wang X. Systematic identification of microRNA functions by combining target prediction and expression profiling // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. P. 1646–1652.

Weber M.J. New human and mouse microRNA genes found by homology search // FEBS J. 2005. V. 272. P. 59–73.

Wienholds E., Koudijs M., Van Eeden F. *et al*. The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development // Nat. Genet. 2003. V. 35. P. 217–218.

Wightman B., Burglin T., Gatto J. *et al*. Negative regulatory sequences in the lin-14 3′-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development // Genes Dev. 1991. V. 5. P. 1813–1824.

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. V. 75. P. 855–862.

Williams R.W., Rubin G.M. ARGONAUTE1 is required for efficient RNA interference in Drosophila embryos // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 6889–6894.

Wu L., Belasco J.G. Micro-RNA regulation of the mammalian lin-28 gene during neuronal differentiation

of embryonal carcinoma cells // Mol. Cell Biol. 2005. V. 25. P. 9198–9208.
Wu L., Fan J., Belasco J.G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 4034–4039.
Wu H., Xu H., Miraglia L., Crooke S. Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 36957–36965.
Xu P., Vernooy S., Guo M., Hay B. The Drosophila microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism // Curr. Biol. 2003. V. 13. P. 790–795.
Xue C., Li F., He T. *et al*. Classification of real and pseudo microRNA precursors using local structure-sequence features and support vector machine // BMC Bioinformatics. 2005. V. 6. P. 310.
Yan K., Yan S., Farooq A. *et al*. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain // Nature. 2003. V. 426. P. 468–474.
Yekta S., Shih I., Bartel D. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA // Science. 2004. V. 304. P. 594–596.
Yi R., Qin Y., Macara I., Cullen B. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs // Genes Dev. 2003. V. 17. P. 3011–3016.
Ying S., Lin S. Intron-derived microRNAs-fine tuning of gene functions // Gene. 2004. V. 342. P. 25–28.
Yoo A.S., Greenwald I. LIN-12/Notch activation leads to microRNA-mediated down-regulation of Vav in *C. elegans* // Science. 2005. V. 310. P. 1330–1333.
Zamore P. RNA interference: listening to the sound of silence // Nat. Struct. Biol. 2001. V. 8. P. 746–750.
Zeng Y., Wagner E., Cullen B. Both natural and designed microRNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells // Mol. Cell. 2002. V. 9. P. 1327–1333.
Zeng Y., Yi R., Cullen B. Micro RNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 9779–9784.
Zeng Y., Cullen B.R. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5 // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. 4776–4785.
Zeng Y., Yi R., Cullen B. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha // The EMBO J. 2005. V. 24. P. 138–48.
Zhang H., Kolb F., Brondani V. *et al*. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP // The EMBO J. 2002. V. 21. P. 5875–5885.
Zhang H., Kolb F., Jaskiewicz L. *et al*. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III // Cell. 2004. V. 118. P. 57–68.
Zhao Y., Samal E., Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis // Nature. 2005. V. 436. P. 181–182.
Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // Nucl. Acids Res. 2003. V. 31. P. 3406–3415.

miRNA – NEW REGULATORS OF GENES ACTIVITY IN EUKARYOTES

A.V. Katokhin, T.N. Kuznetsova, N.A. Omelianchuk

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: katokhin@bionet.nsc.ru

Summary

miRNAs are single stranded ~22 nucleotides in length RNAs which bind mRNAs complementary or partially complementary to initiate the mRNAs degradation or their translation inhibition. This regulatory mechanism of posttranscriptional gene silencing is present obviously in all eukaryotes. MiRNAs are generated upon processing of hairpin shaped precursor RNA molecules, produced as a rule by RNA pol II transcription from specific genes. MiRNAs play important role in complex spatial and temporal regulation of gene activity as determine qualitative and quantitative content of transcripts pools and respective protein pools necessary for development of animal and plant tissues, organs and whole organisms. The aim of review is to show the recent results of experimental studies of miRNA genes (mainly of human and animals) genomic organization and their expression patterns, of miRNAs biogenesis and molecular mechanisms of their interaction with protein coding mRNAs, to accentuate the role of computational bioinformatics methods for miRNA genes and mRNA-targets recognition.