

V. ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ГЕНЕТИКО-СЕЛЕКЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

МикроРНК РАСТЕНИЙ

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

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

Регуляция активности генов растений осуществляется на уровне транскрипции, сплайсинга мРНК, трансляции и деградации белков. В последнее время в эту регуляторную сеть был включен новый компонент: регуляция, осуществляемая микроРНК (миРНК) (Bartel, 2004). миРНК – это одноцепочечные РНК длиной 20–24 нуклеотида (Ambros *et al.*, 2003), которые комплементарно или частично комплементарно связываются с мРНК и приводят к ее разрушению (Llave *et al.*, 2002) или ингибированию трансляции с этой мРНК (Chen, 2003). У растений миРНК играют важную роль в установлении сложной пространственной и временной регуляции активности генов, необходимой для развития организма, и наряду с этим участвуют в ряде процессов функционирования на взрослой стадии.

Первые миРНК у растений были открыты путем клонирования малых РНК у арабидопсиса, представленных большим числом разновидностей (Reinhart *et al.*, 2002). Среди этих малых РНК миРНК выделяются в отдельный класс в силу следующих характеристик (Bartel, 2004):

1. Они относятся к малым РНК эндогенного происхождения и кодируются генами, локализованными в участках генома, обособленных от ранее аннотированных генов.

2. В процессе биогенеза они образуются из РНК-предшественника, обладающего специфичной шпилечной структурой.
3. Последовательности миРНК и соответствующих сайтов взаимодействия с мРНК-мишенями, как правило, консервативны.

Данные о последовательностях зрелых миРНК, их предшественниках и локализации их генов аккумулируются в базе данных RFAM (Ambros *et al.*, 2003; Griffiths-Jones *et al.*, 2003) (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/search.shtml>). На настоящий момент описаны 116 миРНК у арабидопсиса, 173 у риса, 64 у сорго и 40 у кукурузы. У каждого из этих видов есть гены миРНК, кодирующие абсолютно идентичные или различающиеся по одной или двум заменам зрелые миРНК. Гомологичные миРНК-гены образуют семейство паралогичных миРНК-генов, кодирующих соответственно семейство гомологичных миРНК. Члены одного семейства различаются буквой, приписываемой к названию семейства, например, *ath-miR169a* и *ath-miR169b*.

Гены, кодирующие миРНК растений, расположены в межгенных промежутках и достаточно удалены от белок-кодирующих генов, что указывает на то, что они транскрибируются независимо (Bartel B., Bartel D.,

2003, Parizotto *et al.*, 2004). Для гена *miR171* арабидопсиса показано наличие промотора (Parizotto *et al.*, 2004). Высокая тканеспецифичность экспрессии этой миРНК и способность промотора гена *miR171* к экспрессии мРНК репортерного белка GFP говорит о том, что транскрипция с этого промотора осуществляется РНК полимеразой II. На то, что РНК полимеразы II является основной, если не единственной РНК полимеразой, транскрибирующей гены миРНК, указывает также кэпирование и полиаденилирование полноразмерных транскриптов ряда миРНК и их нахождение среди EST (Expressed Sequence Tags). Для ряда транскриптов миРНК выявлен альтернативный сплайсинг (Aukerman, Sakai 2003; Kurihara, Watanabe, 2004).

После транскрипции генов миРНК РНК-молекулы, называемые прай-миРНК (pri-miRNA), проходят несколько стадий созревания (биогенеза) до зрелой миРНК. Прай-миРНК дает начало следующему миРНК-предшественнику – пре-миРНК (pre-miRNA), обладающему характерной шпильчатой вторичной структурой (Reinhart *et al.*, 2002). Зрелые миРНК длиной 20–24 нуклеотида получают в результате процессинга пре-миРНК. Долгое время механизм биогенеза миРНК растений оставался неясным из-за того, что прай-миРНК и пре-миРНК практически не выявлялись нозерн-блот-гибридизацией из-за кратковременности этих стадий созревания (Reinhart *et al.*, 2002; Kurihara, Watanabe, 2004). Созревание миРНК происходит под действием РНКазы III типа DCL1 (DICER-LIKE1) (Kurihara, Watanabe, 2004). Сначала из прай-миРНК вырезается по основанию шпильчатой структуры длинная пре-

миРНК (рис.). Затем из длинной пре-миРНК вырезается короткая пре-миРНК и формируется будущий 3'-конец зрелой миРНК. На третьей, последней, стадии биогенеза короткая пре-миРНК расщепляется по 5'-концу зрелой миРНК. Образовавшиеся дуплексы миРНК : миРНК* имеют на 3'-конце одноцепочечный выступ в 2 или 3 нуклеотида, который является характерным признаком расщепления РНКазой III типа. Длина стеблевой части двухцепочечной РНК между сайтами расщепления составляет, как правило, 21 нуклеотид. Последняя стадия созревания миРНК заключается в разделении дуплекса и включении зрелой одноцепочечной миРНК в состав особых белковых комплексов, выполняющих с этого момента функцию или разрушения соответствующей мРНК, или ингибирования её трансляции.

Клонирование и секвенирование RT-PCR продуктов фрагментов расщепления прай-миРНК163 показало, что три сайта расщепления для DCL1 не являются идентичными по первичной последовательности (Kurihara, Watanabe, 2004). Белок DCL1 имеет несколько функционально значимых доменов: N-концевой геликазный домен, центральный РНК-связывающий PAZ-домен, два РНКазы III каталитических домена, один или два домена, связывающих двухцепочечную РНК, и домен с неизвестной функцией (Cerutti *et al.*, 2000; Carmell, Hannon, 2004; Zhang *et al.*, 2004). DCL1 функционирует как мономер и имеет лишь один центр, осуществляющий расщепление, образующийся путем внутримолекулярной димеризации двух его РНКазы III-доменов (Zhang *et al.*, 2004). Роль некоторых доменов DCL1 была исследована

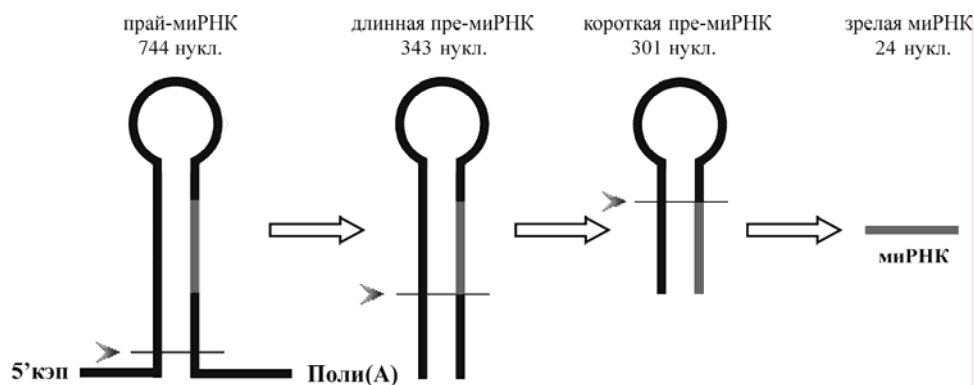


Рис. Биогенез миРНК растений на примере MIR163 (по: Kurihara, Watanabe, 2004).

дована при изучении биогенеза миРНК у мутантов по этому гену, кодирующему DCL1. Мутант *dcl1-7* имеет аминокислотную замену в РНК-геликазном домене (Schauer *et al.*, 2002), а мутант *dcl1-9* характеризуется инсерцией в районе, кодирующем один из доменов, связывающих двухцепочечную РНК (Jacobsen *et al.*, 1999; Schauer *et al.*, 2002). В обоих мутантах отсутствовал 5'-продукт расщепления прай-миРНК163 и содержалось меньшее количество по сравнению с диким типом короткой пре-миРНК163 и зрелой миРНК163 (Kurihara, Watanabe, 2004). Позиции всех трех сайтов расщепления прай-миРНК163 были одинаковыми в диком типе и *dcl1-7* мутанте, но были другими в *dcl1-9* мутанте. У *dcl1-9* позиции первых двух сайтов были смещены к петле, хотя размер интервала в 21 нуклеотид между ними сохранялся. Предполагается, что белок у мутантов *dcl1-9* неправильно распознает позицию сайта расщепления из-за того, что в нем в результате мутации нарушен домен связывания с двухцепочечной РНК. У мутантов *dcl1-9* также не удалось идентифицировать третий сайт расщепления, возможно, потому, что в отличие от дикого типа стеблевой отрезок, ведущий к этому сайту, короче, чем 21 нуклеотид (Kurihara, Watanabe, 2004).

Процессинг миРНК у растений в большей степени определяется фланкирующими последовательностями, нежели нуклеотидной последовательностью самой зрелой миРНК (Parizotto *et al.*, 2004). Последовательность зрелой MIR171 в прай-миРНК была заменена на 21-нуклеотидную последовательность, комплементарную фрагменту мРНК белка GFP. Такая прай-миРНК успешно процессировалась и ингибировала экспрессию своего гена-мишени. В геноме *Arabidopsis thaliana* было идентифицировано 4 паралогичных гена для DICER-подобных белков, три из которых вовлечены в процессинг двухцепочечных РНК, имеющих различное происхождение (Schauer *et al.*, 2002). DCL1 расщепляет предшественник миРНК (Park *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002). DCL2 участвует в формировании коротких интерференционных РНК из вирусов растений (Xie *et al.*, 2004), а DCL3 вовлечен в образование эндогенных коротких интерференционных РНК (Xie *et al.*, 2004).

Наряду с DCL1 биогенез зрелой миРНК растений требует активности еще двух локализованных в ядре белков HEN1 и HYL1, имеющих домены связывания с двухцепочечной РНК (Park *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002; Boutet *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004). Мутации в генах *DCL1*, *HEN1* или *HYL1* уменьшают количество зрелой миРНК и увеличивают количество пре-миРНК, что приводит к аномалиям развития растений. Причем фенотипические эффекты мутаций во всех трех генах очень похожи. Белок HYL1 преимущественно локализован в ядре, хотя в некоторых клетках он находится и в ядре, и в цитоплазме (Han *et al.*, 2004). В биогенезе миРНК растений задействован еще один белок, HASTY, который является ортологом EXPORTIN-5 животных и, по-видимому, вовлечен в экспорт зрелой миРНК из ядра в цитоплазму (Bollman *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2004).

миРНК в цитоплазме находятся в составе РНК-белкового комплекса, который был назван miRNP-комплексом (Mourelatos *et al.*, 2002). miRNP-комплекс сходен, если не идентичен с комплексом RISC (РНК-induced silencing complex), направляющим расщепление мРНК при РНК-интерференции (Hutvagner, Zamore, 2002; Mourelatos *et al.*, 2002). Когда миРНК направляют расщепление мРНК, они ведут себя как короткие интерференционные РНК (киРНК) в составе RISC, и это расщепление также ингибируется микроокковой нуклеазой, которая подавляет активность RISC и может ингибироваться репрессорами интерференции, такими, как вирусный фактор P1/HC-Pro (Kasschau *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2003). В настоящее время общеупотребительным является название RISC для миРНК-содержащего белкового комплекса (Bartel, 2004). В случае выявления различий между RISC, связанными с миРНК или киРНК, они называются соответственно miRISC и siRISC (Lee *et al.*, 2004).

Все охарактеризованные RISC содержат по крайней мере один белок из семейства ARGONAUTE (Bartel, 2004; Meister *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2004). Белки семейства ARGONAUTE содержат домены PAZ и PIWI (Cerutti *et al.*, 2000). PAZ-домен способен связывать как одноцепочечную, так и двухцепочечную РНК (Lingel *et al.*, 2003;

Song *et al.*, 2003). Эта дуальная способность предполагает, что белок ARGONAUTE, по всей вероятности, взаимодействует с миРНК до и после момента связывания миРНК с мРНК-мишенью. У арабидопсиса из десяти белков семейства ARGONAUTE наиболее изученным является AGO1, компонент RISC. Показано, что у гипоморфных мутантов по гену *AGO1* отмечено увеличение количества мРНК-мишеней без существенных изменений в количестве миРНК, а у мутантов с нуль-аллелем *AGO1* наблюдается дестабилизация некоторых миРНК (Vaucheret *et al.*, 2004). AGO1 участвует также в сайленсинге (подавлении экспрессии) генов, опосредованном киРНК (Bohmert *et al.*, 1998; Fagard *et al.*, 2000; Kidner, Martienssen, 2004; Vaucheret *et al.*, 2004). Что касается функции других белков семейства ARGONAUTE у арабидопсиса, то появились отдельные работы, продемонстрировавшие участие AGO4 в транспозон-инициированном созревании киРНК, а также в направляемой ими модификации хроматина (Zilberman *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2004).

Функционирование RISC напрямую связано с характером комплементарного взаимодействия миРНК с мРНК-мишенью. При достаточно большой комплементарности RISC расщепляет мишень примерно в центре дуплекса миРНК–сайт связывания; если же миРНК только отдельными своими частями вступает в комплементарные взаимодействия с сайтом связывания в мРНК-мишени, то запускается механизм трансляционной репрессии (Hutvagner, Zamore, 2002; Doench *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2003; Bartel, 2004). К настоящему моменту у растений выявлены только случаи значительной комплементарности миРНК к сайту связывания и во всех этих случаях показано, что миРНК направляют специфическую эндонуклеазную активность RISC комплекса (Llave *et al.*, 2002; Kasschau *et al.*, 2003; Palatnik *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Floyd, Bowman, 2004; Jones-Rhoades, Bartel, 2004; Mallory *et al.*, 2004b; Vazquez *et al.*, 2004). Известен только один случай подавления трансляции у растений – это взаимодействие MIR172 и мРНК гена *APETALA2* (Aukerman, Sakai 2003; Chen, 2004). При этом MIR172 практически полностью комплементарна своему сайту связывания в мРНК гена *APETALA2*. Из 21

нуклеотида MIR172 только два не образуют комплементарную пару с сайтом связывания.

Мутации миРНК, при которых нарушается комплементарное спаривание нуклеотидов центральной или 5'-части миРНК с сайтом связывания, имеют гораздо более сильные последствия в виде ослабления функции миРНК *in vivo*, чем мутации в её 3'-районе (Mallory *et al.*, 2004b; Parizotto *et al.*, 2004). Сканирование точечными мутациями сайта связывания MIR165/166 с мРНК гена *PHV* выявило, что для его функционирования требуется комплементарность к участку с 3-го по 9-й нуклеотид миРНК. Исследование локализации некомплемментарных областей в других экспериментально проверенных дуплексах миРНК–мРНК показало, что реже всего встречается некомплемментарность по позициям, соответствующим нуклеотидам миРНК с 3-й по 10-ю позицию (Mallory *et al.*, 2004b).

С помощью программы RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/mahybrid/submission.html>) мы промоделировали вторичную структуру 49 экспериментально подтвержденных дуплексов миРНК–мРНК арабидопсиса (Llave *et al.*, 2002; Kasschau *et al.*, 2003; Palatnik *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2003; Achard *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Floyd, Bowman, 2004; Han *et al.*, 2004; Jones-Rhoades, Bartel, 2004; Mallory *et al.*, 2004a; Mallory *et al.*, 2004b; Vazquez *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Мы подсчитали число случаев некомплемментарности, G:U взаимодействий, ассиметричных петель, формируемых мРНК в сайте связывания, привязывая эти нарушения некомплемментарности к позициям нуклеотидов в миРНК (табл.). Моделирование вторичной структуры дуплексов миРНК–мРНК показало, что некомплемментарными к сайту могут быть концевые первый, второй, девятнадцатый, двадцатый и двадцать первый нуклеотиды миРНК и внутренние – пятый, седьмой, одиннадцатый, с тринадцатого по пятнадцатый, семнадцатый и восемнадцатый нуклеотиды, которые при неспаривании с соответствующими нуклеотидами мРНК формируют симметричные петли. Наиболее часто миРНК некомплемментарна к сайту на 3'-конце или в районе четырнадцатого нуклеотида. Причем петля может быть динуклеотидной, в ней участвуют вместе с 14-м нуклеотидом или

Таблица

Число случаев нарушения некомплементарности
в моделях вторичной структуры 49 экспериментально доказанных дуплексов
миРНК–мРНК арабидопсиса

Тип	Позиции в миРНК от 5'-конца																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
НК	7	2			1		2				1		1	12	3		2	2	5	24	26
G:U	6	1				2	4	4					2	1	7	1	6		2	4	
АСП*					2		1	6													

* Нуклеотид, перед которым формируется асимметричная петля со стороны мРНК в миРНК–мРНК дуплексе.
НК – некомплементарность, G:U – гуанин–урацил взаимодействия, АСП – асимметричные петли, формируемые мРНК в дуплексе.

тринадцатый или пятнадцатый нуклеотид. В менее устойчивые гуанин–урацил взаимодействия могут вступать первый, второй, шестой, седьмой, восьмой, с тринадцатого по семнадцатый, девятнадцатый и двадцатый нуклеотиды. мРНК в дуплексе формируют асимметричные петли на позициях между четвертым и пятым, шестым и седьмым, седьмым и восьмым нуклеотидами миРНК.

Таким образом, исследуемые модели вторичной структуры дуплексов показали, что третий, четвертый, девятый, десятый и двенадцатый нуклеотиды миРНК являются позициями обязательного комплементарного связывания с мРНК. Для шестого и шестнадцатого нуклеотидов комплементарность может быть заменена G:U спариванием. Свободная энергия экспериментально подтвержденных дуплексов миРНК–мРНК равна или ниже – 32,2 ккал/мол.

миРНК после расщепления одной молекулы мРНК-мишени остается интактной и способной направлять узнавание и расщепление других молекул (Tang *et al.*, 2003). Показано, что после расщепления мРНК-мишени с помощью миРНК у арабидопсиса к 5'-фрагменту со стороны его 3'-конца присоединяется от одного до девяти уридинов (Shen, Goodman, 2004), таким образом, присутствие на 3'-конце олигоуридинов есть признак миРНК-направленного расщепления. Известно, что 5'-фрагмент мРНК после расщепления разрушается быстрее, чем 3'-фрагмент (Llave *et al.*, 2002; Souret *et al.*, 2004), и его распад более интенсивно идет с 5'-конца (Shen, Goodman, 2004).

Первые миРНК растений были экспериментально выявлены и охарактеризованы в 2002 г. в результате целенаправленного поиска РНКазы-III-расщепленных продуктов размером 20–24 нуклеотида у *A. thaliana* (Reinhart *et al.*, 2002). В дальнейшем эффективность поиска новых миРНК была значительно повышена применением компьютерных методов (Bartel, 2004; Bonnet *et al.*, 2004; Jones-Rhoades, Wang *et al.*, 2004). 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 надежностью предсказывать их мРНК-мишени с помощью традиционных методов компьютерного выявления участков нуклеотидной гомологии (Rhoades *et al.*, 2002; Bartel B., Bartel D., 2003; Dugas, Bartel, 2004). В первой работе по предсказанию мишеней для миРНК растений было сформулировано, что обнаружение в мРНК участка с непрерывной и почти полной комплементарностью (не более 3 неспаренных нуклеотидов) к какой-либо миРНК указывает на то, что эта мРНК представляет собой потенциальную мишень для этой миРНК. В качестве дополнительного свидетельства использовалось обнаружение в ортологах у риса последовательностей, идентичных предсказанным сайтам связывания (Rhoades *et al.*, 2002). Допущение прерывности комплементарности сайта связывания к какой-либо миРНК (наличия до 5 неспаренных нуклеотидов) наряду с обязательным требованием эволю-

ционной консервативности сайта связывания повышает чувствительность этого алгоритма с целью предсказания мишеней миРНК растений (Jones-Rhoades, Bartel, 2004). Похожий подход был реализован для предсказания новых консервативных мРНК-мишеней для вновь выявленных миРНК арабидопсиса (Bonnet *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Прямые эксперименты, показавшие расщепление большинства предсказанных мРНК-мишеней (Llave *et al.*, 2002; Bonnet *et al.*, 2004; Jones-Rhoades, Bartel, 2004; Wang *et al.*, 2004), в целом подтверждают продуктивность описанного подхода для растений (Bartel, 2004; Dugas, Bartel, 2004).

Экспрессия миРНК может контролироваться гормонами. Было показано, что абсцизовая кислота регулирует экспрессию MIR393 (Sunkar, Zhu, 2004), гиббереллин – экспрессию MIR159 (Achari *et al.*, 2004), а ауксин – экспрессию MIR164 (Guo *et al.*, 2005). С другой стороны, миРНК могут контролировать ответ на гормоны. Мишенью MIR164 является мРНК для белка NAC1, одного из белков, осуществляющих путь передачи ауксинового сигнала, необходимого для развития латеральных корней (Xie *et al.*, 2000, 2002). Через 6 часов после обработки ауксином незначительно (всего в 1,5 раза) увеличивается уровень MIR164, но это приводит к значительному снижению уровня мРНК для NAC1 и, соответственно, ослаблению ауксинового сигнала (Guo *et al.*, 2005). NAC1 действует в цепи передачи ауксинового сигнала после белка TIR1, экспрессия которого, в свою очередь, находится под контролем –MIR393 (Jones-Rhoades, Bartel, 2004). мРНК других факторов ответа на ауксин являются мишенями MIR160 и MIR167 (Rhoades *et al.*, 2002; Kasschau *et al.*, 2003).

Мишенями для миРНК являются гены, контролирующие протеолиз, процессы передачи сигналов, метаболизм, транспорт ионов, стрессовый ответ и другие важные процессы в растении (Dugas, Bartel, 2004; Sunkar, Zhu, 2004). Значительной частью мишеней являются мРНК, кодирующие транскрипционные факторы (Rhoades *et al.*, 2002). Экспериментальные данные, накопленные к настоящему времени, позволяют утверждать, что в большинстве случаев миРНК осуществляют постраскрипцион-

ную регуляцию активности генов при образовании новых типов клеток в ходе развития организма, ингибируя активность негативных регуляторов, препятствовавших преждевременной дифференцировке родительской клетки. Таким образом, мутации по миРНК или по генам, контролирующим их созревание, приводят к задержке дифференцировки новых типов клеток в ходе онтогенеза. Мутации в сайтах связывания миРНК в генах-мишенях, ведущие к конститутивной экспрессии их мРНК, или конститутивная экспрессия самих миРНК-генов приводят к ускоренному появлению этих типов клеток.

Для описания функций миРНК необходимо ввести два термина: мутации ПФ и мутации УФ. ПФ-мутации – это мутации, приводящие к потере или снижению функции гена. В литературе на английском языке им соответствует термин «loss-of-function mutations». УФ-мутации – это мутации, приводящие к увеличению функции гена. В литературе на английском языке им соответствует термин «gain-of-function mutations». Конститутивная экспрессия миРНК-генов приводит к снижению уровня мРНК-мишени, и такие растения являются фенкопиями ПФ-мутантов по гену-мишени. Растения с мутацией в сайте связывания миРНК являются УФ-мутантами гена-мишени. Приведем несколько примеров установленных случаев регуляции экспрессии генов с помощью миРНК у растений.

MIR164 регулирует образование границы между дифференцирующимися и недифференцирующимися клетками в меристеме побега и цветка (Laufs *et al.*, 2004). Установление такой границы контролируется транскрипционными факторами семейства NAC, белками CUC1 и CUC2. мРНК этих генов являются мишенями для MIR164. Растения с повышенной экспрессией MIR164 являются фенкопиями двойных ПФ-мутантов *cus1 cus2*, т. е. имеют неотделенные (полностью или частично) семядоли и органы в цветке (Aida *et al.*, 1997; Laufs *et al.*, 2004; Mallory *et al.*, 2004a). Растения с мутациями в сайте связывания MIR164 в гене CUC2 или с уменьшенной экспрессией MIR164 имеют увеличенную пролиферацию клеток на границах органов. Таким образом, MIR164 разрушает транскрипты CUC1 и CUC2 в дочерних клетках при их дифференцировке, огра-

ничивая тем самым пространственный паттерн экспрессии этих генов и пролиферацию клеток. Растения с мутациями в сайте связывания MIR164 в гене *CUC1* (Mallory *et al.*, 2004a) имеют аномалии развития зародыша, вегетативного побега и цветка, включая аномальную ориентацию семядолей, уменьшение длины черешков розеточных листьев и изменение формы этих листьев, увеличение числа лепестков и уменьшение числа чашелистиков. О сложной тканеспецифичной регуляции миРНК-генов говорят эксперименты с *miR164*. Конститутивная экспрессия *miR164b*, увеличивающая уровень зрелой MIR164 в 9 раз, приводит к фенотипу, сходному с фенотипом двойных ПФ-мутантов *cuc1 cuc2* (Aida *et al.*, 1997; Mallory *et al.*, 2004a). У растений наблюдается частичное сращение черешков семядолей и тычинок и частичное или полное сращение чашелистиков. 10-кратное увеличение экспрессии MIR164b в корнях имеет следствием снижение уровня мРНК для NAC1 и уменьшение числа латеральных корней. Снижение же уровня MIR164 в растении в 15 раз у нулевых мутантов по *miR164b-1* не сказывалось на уровне CUC1 и CUC2 и не меняло фенотип надземной части растения. Однако у этих мутантов был повышен уровень мРНК для NAC1 в корнях и увеличено число латеральных корней.

Две гомологичные миРНК, MIR165 и MIR166, контролируют развитие листа у арабидопсиса путем негативной регуляции активности HD-ZIP-генов *PHB*, *PHV* и *REV* (Tang *et al.*, 2003; Floyd, Bowman, 2004). Некоторые доминантные мутации разрушают сайты связывания этих миРНК (Emery *et al.*, 2003; Mallory *et al.*, 2004b). В результате мутации в сайте связывания миРНК транскрипт *PHB* накапливается в молодых зачатках листа, в то время как в нормальном растении мРНК *PHB* в зачатках листа представлена на низком уровне, который повышается по мере развития листа на адаксиальной его части и в клетках сосудистой системы (McConnell *et al.*, 2001). Важной особенностью сайтов связывания в мРНК HD-ZIP-генов является то, что они найдены лишь в сплайсированной мРНК генов *PHB*, *PHV* или *REV*, но не в геномной ДНК (Emery *et al.*, 2003; Mallory *et al.*, 2004b). Это связано с тем, что сайт связывания миРНК формиру-

ется в этих мРНК в результате сплайсинга: одна половина предсказанного сайта связывания находится на 3'-конце 4-го экзона, а другая – на 5'-конце 5-го экзона.

MIR159 регулирует переход к цветению при коротком дне и развитие пыльников (Achard *et al.*, 2004). Мишенями для MIR159 являются мРНК транскрипционных факторов семейства GAMYB. Эти транскрипционные факторы участвуют в активации гиббереллинами гена *LEAFY* и в регуляции развития пыльников. Увеличение уровня MIR159 вызывает уменьшение количества транскрипта гена *LEAFY*, задержку цветения при коротком дне и нарушает развитие пыльников. Уровень MIR159 регулируется гиббереллинами через подавление функционирования белков DELLA. Последовательность MIR159 и такой способ регуляции ее активности гиббереллинами эволюционно консервативны. Другие миРНК арабидопсиса также регулируют развитие различных органов растения (Aukerman, Sakai, 2003; Palatnik *et al.*, 2003; Chen, 2004). Многие миРНК участвуют в реакции растения на стрессовые изменения в окружающей среде (Jones-Rhoades, Bartel, 2004; Sunkar, Zhu, 2004).

О роли миРНК в развитии растений говорит то, что нулевые *dcl1*-мутанты являются эмбриональными летальными (Schauer *et al.*, 2002). Ненулевые *dcl1*-мутанты и мутанты по генам *HEN1*, *HYL1* и *AGO1*, также контролирующим созревание миРНК, имеют сходные аномалии развития листьев и цветков (Robinson-Beers *et al.*, 1992; Jacobsen *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004; Kidner, Martienssen, 2004; Vaucheret *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004). Среди миРНК арабидопсиса есть такие, которые регулируют активность генов в генной сети созревания миРНК, т. е. формируют в ней отрицательные обратные связи. MIR162 имеет сайт связывания в мРНК *DCL1* (Xie *et al.*, 2003), а MIR168 расщепляет мРНК *AGO1* (Vaucheret *et al.*, 2004). Трансгенные растения с мутацией в сайте связывания MIR168 в мРНК *AGO1* имеют значительно повышенный уровень этой мРНК, низкий уровень зрелых миРНК и аномалии развития, сходные с таковыми у мутантов по генам *DCL1*, *HEN1*, и *HYL1*.

Последовательности многих зрелых миРНК арабидопсиса, как и сайты их связывания, консервативны у риса и других расте-

ний (Park *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002; Bartel B., Bartel D., 2003; Palatnik *et al.*, 2003). Из исследованных 23 семейств миРНК арабидопсиса экспрессия 11 семейств была выявлена у голосеменных, и 8 семейств экспрессировались у папортников (Axtell, Bartel, 2005). мРНК ортологов HD-ZIP-генов у различных наземных растений, включая мхи, папортники и лишайники, расщепляются своими миРНК по тому же сайту связывания, по которому MIR165 и MIR166 расщепляют мРНК этих генов у арабидопсиса (Floyd, Bowman 2004). Таким образом, регуляция активности некоторых ортологических белковых семейств с помощью ортологических миРНК одинакова у нецветковых и цветковых растений, т. е. имеет древнее происхождение и осталась неизменной за счет консервативности самих миРНК и их сайтов связывания в течение более чем 400 миллионов лет (Floyd, Bowman, 2004; Axtell, Bartel, 2005). Консервативность некоторых миРНК и их сайтов связывания у риса и арабидопсиса указывает на то, что образование генов этих миРНК произошло до разделения однодольных и двудольных растений, т. е. около 150 млн лет назад.

До настоящего момента не найдены ортологи миРНК между растениями и животными (Poethig, 2001; Meyerowitz, 2002; Bartel, 2004). миРНК растений отличаются от таковых у животных. Главное отличие заключается в размере и структуре пре-миРНК. Их размер у растений более вариабельный и сами пре-миРНК длиннее. Максимальная длина пре-миРНК у арабидопсиса – 377 нуклеотидов (Jones-Rhoades, Bartel, 2004). Вторичная структура пре-миРНК растений может быть сложнее, чем таковая у животных (Reinhart *et al.*, 2002; Bartel B., Bartel D., 2003). Длина терминальной петли в пре-миРНК варьирует от 20 до 75 нуклеотидов (Wang *et al.*, 2004). Растительные пре-миРНК в отличие от таковых у животных консервативны только на участке последовательности зрелой миРНК (Rhoades *et al.*, 2002). Кроме того, мРНК-мишени у растений, как правило, имеют один сайт связывания миРНК, комплементарный одному семейству миРНК, расположенный, как правило, в белок-кодирующей области мРНК. У растений, в отличие от животных, биогенез зрелой миРНК полностью происходит в ядре

(Schauer *et al.*, 2002; Papp *et al.*, 2003; Denti *et al.*, 2004). Эти различия наряду с отсутствием данных о консервативности миРНК между растениями и животными позволяют предполагать независимое возникновение миРНК-генов в каждой из этих многоклеточных линий.

Недавно было высказано предположение, что гены миРНК образуются в результате инвертированных дубликаций последовательностей их генов-мишеней (Allen *et al.*, 2004). На это указывает комплементарность 5'- и 3'-концов пре-миРНК, создающих основной скелет её шпилечной структуры. Участок гена, способный к формированию в транскрипте шпилечной структуры, может образовываться в результате инвертированной дубликации. Тогда транскрипты из области дубликации становятся субстратом для DICER с последующим их включением в RISC. В результате этого RISC будет содержать смысловую и антисмысловую киРНК. Этот ген будет подвергаться усиленной негативной регуляции. Негативной регуляции будут подвергаться также гены, ему гомологичные. Если это окажется эволюционно выгодно, то дальнейшее развитие пойдет по пути сохранения шпилечной структуры в транскрипте и большей адаптации последнего к процессам биогенеза миРНК. Таким образом, появившиеся ранее в эволюции миРНК-гены и зрелые миРНК должны быть консервативны у многих видов, иметь несколько паралогов в геноме, а в последовательностях, фланкирующих зрелые миРНК в пре-миРНК, должны отсутствовать протяженные области гомологии к другим генам в геноме. Более поздние миРНК, наоборот, не имеют ортологов у родственных видов и паралогов в геноме и имеют протяженные области гомологии к своему гену-мишени. Большинство пре-миРНК арабидопсиса имеют ортологи у риса и паралоги в своем геноме и не имеют протяженных областей гомологии к другим генам в геноме. Тем не менее две миРНК, MIR161 и MIR163, не имеют ортологов и паралогов, а их пре-миРНК имеют области гомологии к генам, кодирующим белки с пентатрикопептидными повторами (MIR161) и S-аденозилметионинзависимыми метилтрансферазами (MIR163), т. е. имеют признаки инвертированных дубликаций. Это позволяет предполагать, что гены, кодирующие миРНК у растений, про-

изошли с помощью инвертированных дупликаций генных последовательностей их мишеней (Allen *et al.*, 2004).

Таким образом, миРНК представляют собой малого размера молекулы одноцепочечных РНК, выполняющие значимые функции у растений. миРНК на основе комплементарного спаривания с матричной РНК осуществляют негативную регуляцию активности генов, необходимую для формирования пространственно-временного паттерна их экспрессии.

Авторы приносят благодарность Ю.А. Куреевой и В.В. Мироновой за помощь в подготовке текста. Обзор был подготовлен в соответствии с исследованиями, проводимыми по Госконтракту с Федеральным агентством по науке и инновациям «Идентификация перспективных мишеней действия новых лекарственных препаратов на основе реконструкции генных сетей» приоритетно направления «Живые системы».

Литература

- Achard P., Herr A., Baulcombe D., Harberd N. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA // *Development*. 2004. V. 131. P. 3357–3365.
- Aida M., Ishida T., Fukaki H., Fujisawa H., Tasaka M. Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant // *Plant Cell*. 1997. V. 9. P. 841–857.
- Allen E., Xie Z., Gustafson A., Sung G., Spatafora J., Carrington J. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in Arabidopsis thaliana // *Nat. Genet*. 2004. V. 36. P. 1282–1290.
- Ambros V., Bartel B., Bartel D., Burge C., Carrington J., Chen X., Dreyfuss G., Eddy S., Griffiths-Jones S., Marshall M., Matzke M., Ruvkun G., Tuschl T. A uniform system for microRNA annotation // *RNA*. 2003. V. 9. P. 277–279.
- Aukerman M., Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes // *Plant Cell*. 2003. V. 15. P. 2730–2741.
- Axtell M., Bartel D. Antiquity of microRNAs and their targets in land plants // *Plant Cell*. 2005. V. 17. [Epub ahead of print].
- Bartel B., Bartel D. MicroRNAs: at the root of plant development? // *Plant Physiol*. 2003. V. 132. P. 709–717.
- Bartel D. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell*. 2004. V. 116. P. 281–297.
- Bohmert K., Camus I., Bellini C., Bouchez D., Caboche M., Benning C. AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development // *EMBO J*. 1998. V. 17. P. 170–180.
- Bollman K., Aukerman M., Park M., Hunter C., Berardini T., Poethig R. HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis // *Development*. 2003. V. 130. P. 1493–1504.
- Bonnet E., Wuyts J., Rouze P., Peer Y van de. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in Arabidopsis thaliana and Oryza sativa identifies important target genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 11511–11516.
- Boutet S., Vazquez F., Liu J., Beclin C., Fagard M., Gratias A., Morel J., Crete P., Chen X., Vaucheret H. Arabidopsis HEN1: A genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance // *Curr. Biol*. 2003. V. 13. P. 843–848.
- Carmel M., Hannon G. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2004. V. 11. P. 214–218.
- 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.
- Chan S., Zilberman D., Xie Z., Johansen L., Carrington J., Jacobsen S. RNA silencing genes control de novo DNA methylation // *Science*. 2004. V. 303. P. 1336.
- Chen X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development // *Science*. 2004. V. 303. P. 2022–2025.
- Chen X., Liu J., Cheng Y., Jia D. HEN1 functions pleiotropically in Arabidopsis development and acts in C function in the flower // *Development*. 2002. V. 129. P. 1085–1094.
- 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.
- Doench J., Petersen C. Sharp P. siRNAs can function as mi RNAs // *Genes Dev*. 2003. V. 17. P. 438–442.
- Dugas D., Bartel B. MicroRNA regulation of gene expression in plants // *Curr. Opin. Plant Biol*. 2004. V. 7. P. 512–520.
- Emery J., Floyd S., Alvarez J., Eshed Y., Hawker N., Izhaki A., Baum S., Bowman J. Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes // *Curr. Biol*. 2003. V. 13. P. 1768–1774.

- Fagard M., Boutet S., Morel J.B., Bellini C., Vaucheret H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 11650–11654.
- Floyd S., Bowman J. Ancient microRNA target sequences in plants // *Nature*. 2004. V. 428. P. 485–486.
- Griffiths-Jones S., Bateman A., Marshall M., Khanna A., Eddy S. Rfam: an RNA family database // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. P. 439–441.
- Guo H., Xie Q., Fei J., Chua N. MicroRNA164 directs NAC1 mRNA cleavage to downregulate auxin signals for lateral root development // *Plant Cell*. 2005. V. 17. [Epub ahead of print].
- Han M., Goud S., Song L., Fedoroff N. The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 1093–1098.
- Hutvagner G., Zamore P. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex // *Science*. 2002. V. 297. P. 2056–2060.
- Jacobsen S., Running M., Meyerowitz E. Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in Arabidopsis causes unregulated cell division in floral meristems // *Development*. 1999. V. 126. P. 5231–5243.
- 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.
- Kasschau K., Xie Z., Allen E., Llave C., Chapman E., Krizan K., Carrington J. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function // *Dev. Cell*. 2003. V. 4. P. 205–217.
- Kidner C., Martienssen R. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1 // *Nature*. 2004. V. 428. P. 81–84.
- 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.
- Laufs P., Peaucelle A., Morin H., Traas J. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems // *Development*. 2004. V. 131. P. 4311–4322.
- Lee Y., Nakahara K., Pham J., Kim K., He Z., Sontheimer E., Carthew R. Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways // *Cell*. 2004. V. 117. P. 69–81.
- 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.
- Llave C., Xie Z., Kasschau K., Carrington J. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA // *Science*. 2002. V. 297. P. 2053–2056.
- Lund E., Guttinger S., Calado A., Dahlberg J., Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors // *Science*. 2004. V. 303. P. 95–98.
- Mallory A., Dugas D., Bartel D., Bartel B. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs // *Curr. Biol*. 2004a. V. 14. P. 1035–1046.
- Mallory A., Reinhart B., Jones-Rhoades M., Tang G., Zamore P., Barton M., Bartel D. MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region // *EMBO J*. 2004b. V. 23. P. 3356–3364.
- McConnell J., Emery J., Eshed Y., Bao N., Bowman, J., Barton M. Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots // *Nature*. 2001. V. 411. P. 709–713.
- Meister G., Landthaler M., Patraniowska A., Dorsett Y., Teng G., Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs // *Mol. Cell*. 2004. V. 15. P. 185–197.
- Meyerowitz E. Plants compared to animals: the broadest comparative study of development // *Science*. 2002. V. 295. P. 1482–1485.
- Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S., Sharma A., Charroux B., Abel L., Rappsilber J., Mann M., Dreyfuss G. MiRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs // *Genes Dev*. 2002. V. 16. P. 720–728.
- Nelson P., Hatzigeorgiou A., Mourelatos Z. MiRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line // *RNA*. 2004. V. 10. P. 387–394.
- Palatnik J., Allen E., Wu X., Schommer C., Schwab R., Carrington J., Weigel D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs // *Nature*. 2003. V. 425. P. 257–263.
- Papp I., Mette M., Aufsatz W., Daxinger L., Schauer S., Ray A., van der Winden J., Matzke M., Matzke A. Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and shortinterfering RNA precursors // *Plant Physiol*. 2003. V. 132. P. 1382–1390.
- Parizotto E., Dunoyer P., Rahm N., Himber C., Voinnet O. *In vivo* investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA // *Genes Dev*. 2004. V. 18. P. 2237–2242.
- Park W., Li J., Song R., Messing J., Chen X. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana // *Curr. Biol*. 2002. V. 12. P. 1484–1495.

- Poethig R. Life with 25,000 genes // *Genome Res.* 2001. V. 11. P. 313–316.
- Reinhart B., Weinstein E., Rhoades M., Bartel B., Bartel D. Micro-RNAs in plants // *Genes Dev.* 2002. V. 16. P. 1616–1626.
- Rhoades M., Reinhart B., Lim L., Burge C., Bartel B., Bartel D. Prediction of plant microRNA targets // *Cell.* 2002. V. 110. P. 513–520.
- Robinson-Beers K., Pruitt R., Gasser C. Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female-sterile mutants // *Plant Cell.* 1992. V. 4. P. 1237–1249.
- 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.
- Shen B., Goodman H. Uridine addition after microRNA-directed cleavage // *Science.* 2004. V. 306. P. 997.
- Song J., Liu J., Tolia N., Schneiderman J., Smith S., Martienssen R., Hannon G., Joshua-Tor L. 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.
- Souret F., Kastenmayer J., Green P. AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets // *Mol. Cell.* 2004. V. 15. P. 173–183.
- Sunkar R., Zhu J. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 2001–2019.
- Tang G., Reinhart B., Bartel D., Zamore P. A biochemical framework for RNA silencing in plants // *Genes Dev.* 2003. V. 17. P. 49–63.
- Vaucheret H., Vazquez F., Crete P., Bartel D. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development // *Genes Dev.* 2004. V. 18. P. 1187–1197.
- Vazquez F., Gascioli V., Crete P., Vaucheret H. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. P. 346–351.
- Wang J., Zhou H., Chen Y., Luo Q., Qu L. Identification of 20 microRNAs from *Oryza sativa* // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 1688–1695.
- Xie Q., Frugis G., Colgan D., Chua N. Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development // *Genes Dev.* 2000. V. 14. P. 3024–3036.
- Xie Q., Guo H.S., Dallman G., Fang S., Weissman A., Chua N. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals // *Nature.* 2002. V. 419. P. 167–170.
- Xie Z., Johansen L., Gustafson A., Kasschau K., Lellis A., Zilberman D., Jacobsen S., Carrington J. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. P. 642–652.
- Xie Z., Kasschau K., Carrington J. Negative feedback regulation of Dicer-like1 in *Arabidopsis* by microRNA and guided mRNA degradation // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. P. 784–789.
- 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.
- 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.
- Zilberman D., Cao X., Jacobsen S. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation // *Science.* 2003. V. 299. P. 716–719.
- Zhang H., Kolb F., Jaskiewicz L., Westhof E., Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III // *Cell.* 2004. V. 118. P. 57–68.