

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ микроРНК ЖИВОТНЫХ НА ИХ БИОГЕНЕЗ

© 2020 г. П. С. Ворожейкин^{1, *}, И. И. Титов^{1, 2}

¹Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, кафедра информатики ВКИ, Новосибирск, 630090 Россия

²Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: pavel.vorozheykin@gmail.com

Поступила в редакцию 06.02.2019 г.

После доработки 07.03.2019 г.

Принята к публикации 24.04.2019 г.

МикроРНК — это малые некодирующие РНК, которые участвуют в посттранскрипционном регулировании экспрессии большинства генов в разных организмах. Рассматриваются современные достижения в понимании роли первичной и вторичной структур микроРНК-предшественников животных для разных путей биогенеза и на разных стадиях созревания микроРНК. Описываются эффекты генетической изменчивости и вариаций границ микроРНК, которые представляют собой часть эпитранскриптомики, а также ошибки аннотации.

Ключевые слова: микроРНК, пре-миРНК, вторичная структура, биогенез, митроны, однонуклеотидный полиморфизм, мутации, эпигенетика.

DOI: 10.31857/S0016675820010130

В настоящее время у животных обнаружено большое количество малых РНК, направленных на подавление нежелательного генетического материала или транскриптов. Эти РНК характеризуются своей небольшой длиной (20–30 нуклеотидов) и связью с семейством белков Argonaute (AGO- и PIWI-белки). Выделяют три класса малых РНК — микроРНК (от англ. miRNA), киРНК (короткие интерферирующие РНК, от англ. siRNA) и пиРНК (от англ. piRNA) [1]. Наиболее изученный класс, микроРНК, характеризуется длиной последовательностей в ~22 нуклеотида, которые получают в результате разрезания первичного транскрипта РНКазой Dicer и Drosha [2]. Зрелые микроРНК связываются с одним из AGO-белков и мишенями в мРНК, таким образом способствуя расщеплению последней или блокируя трансляцию с нее [3]. Одна микроРНК может адресовать несколько разных мишеней, что дает возможность контролировать активность большого количества белков и биологических процессов организма. Неудивительно, что блокирование генов микроРНК в животных приводит к появлению фенотипических изменений, а также к возникновению разных болезней [4]. Благодаря этой вовлеченности во многие регуляторные процессы в клетке микроРНК стремительно набирают популярность в качестве объекта исследований (рис. 1).

В этом обзоре мы систематизируем наблюдения о влиянии первичной и вторичной структур предшественников микроРНК животных на их функции и биогенез. Также затрагиваются проблемы генетической и биохимической изменчивости микроРНК. Представленные данные будут полезны для понимания организации, регуляции и эпигенетики микроРНК.

ТРАНСКРИБИРОВАНИЕ прай-миРНК

Процесс созревания микроРНК животных начинается (рис. 2) с транскрибирования РНК-полимеразой II (или РНК-полимеразой III для некоторых микроРНК) длинного транскрипта (первичной микроРНК, прай-миРНК), который содержит одну или несколько шпилек предшественников микроРНК (пре-миРНК), m⁷G-кэп и поли(А)-хвост [5, 6]. Поли(А)-хвост может отсутствовать в случаях, когда обработка прай-миРНК микропроцессорным комплексом начинается раньше окончания транскрибирования [7].

Гены микроРНК находятся в различных геномных областях: в интронах некодирующих и белок-кодирующих транскриптов, экзонах или межгенных областях; гены транскрибируются независимо или как часть белок-кодирующих генов-хозяев [8]. Многие последовательности микроРНК обнаружены на небольшом расстоянии друг от друга (~3–50 тпн), некоторые из них формируют полици-

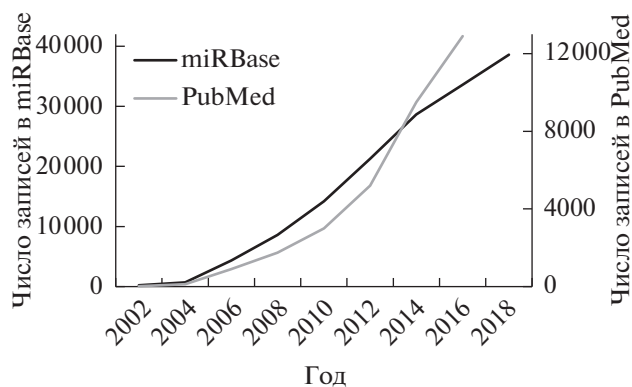


Рис. 1. Динамика числа записей в базе данных miR-Base и в базе данных PubMed, содержащих упоминания микроРНК в названии или аннотации.

сторонние транскрипционные единицы (например, miR-100/let-7/miR-125, кластер miR-17/92) [8, 9], а другие (например, miR-30a/miR-30c-2) – нет [10]. Некоторые микроРНК находятся в обеих цепях ДНК и комплементарны друг другу, например miR-3120 и miR-214 [11]. Те микроРНК, которые располагаются рядом, могут транскрибироваться вместе. Однако посттранскрипционно они могут функционировать и подвергаться регулированию как вместе, так и независимо через внешние механизмы, проявляя разную активность в разных тканях и стадиях созревания организма [12, 13]. Помимо внешнего регулирования изменения последовательности одной из микроРНК кластера могут приводить к изменению уровней экспрессии соседних микроРНК [14].

Как и белок-кодирующие гены, транскрипция микроРНК может регулироваться транскрипцион-

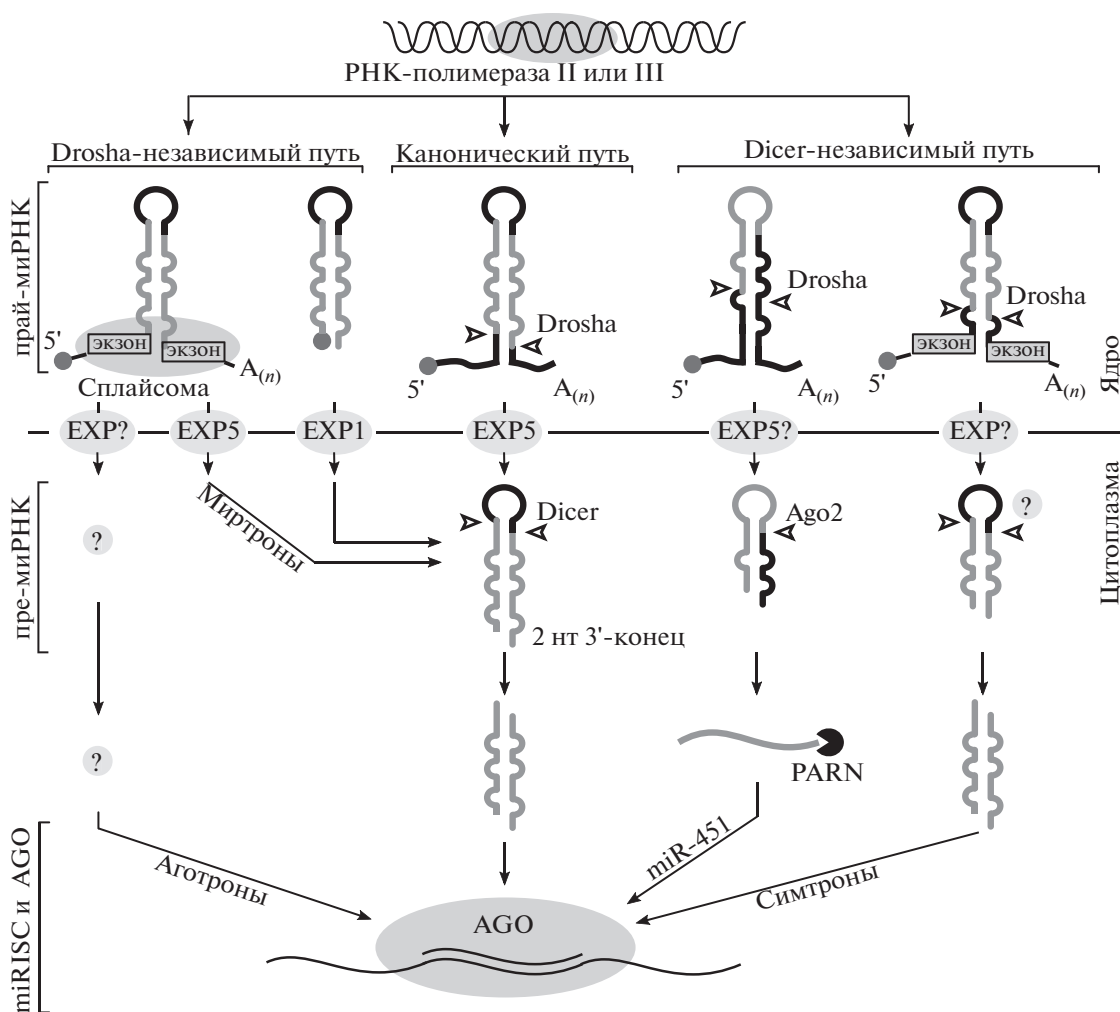


Рис. 2. Общая схема путей биогенеза микроРНК животных. Предшественники микроРНК (прай-миРНК) транскрибируются РНК-полимеразой II или III. Канонический путь биогенеза включает в себя процессинг первичных РНК комплексами Drosha и Dicer. Неканонические пути биогенеза включают в себя Dicer- и Drosha-независимые шаги созревания микроРНК.

ными факторами (ТФ), усиливающими или блокирующими процессинг прай-миРНК [15]. При этом, когда экспрессия самих транскрипционных факторов находится под контролем микроРНК, образуются регуляторные контуры [16, 17]. Эти контуры являются частью общей сети регуляции экспрессии генов [18].

Помимо ТФ процессинг прай-миРНК может зависеть от статуса метилирования промоторов генов, модификаций гистонов или модификаций концов РНК [19–21]. Изменения нуклеотидной последовательности мРНК, такие как замены А>I, мутации или варианты однонуклеотидного полиморфизма, оказывают влияние на процессинг прай-/пре-/микроРНК через трансформацию структуры предшественника и стабильности связывания с мишенями [21, 22].

ПРОЦЕССИНГ прай-миРНК В ЯДРЕ

После транскрибирования в каноническом пути биогенеза (рис. 2) прай-миРНК животных разрезается микропроцессорным комплексом из РНКазы III Droscha и РНК-связывающего белка DGCR8 (Pasha у *D. melanogaster* и *C. elegans*) [3]. Комплекс связывается с шпильчатой структурой и вырезает шпильку пре-миРНК длиной ~65–70 нуклеотидов (нт) на расстоянии ~11 нт от однонитевых хвостов РНК и на расстоянии ~22 нт от терминальной петли [23]. Границы между одно- и двунитевыми фрагментами РНК выступают сигналами для процессинга Droscha. Каждый из доменов РНКазы III (RIPDa и RIPDb), входящих в Droscha, разрезает одну из двух ветвей шпильки таким образом, что получается пре-миРНК с 3'-выступающим концом [24]. Каждое разрезание определяет один из двух концевых нуклеотидов будущих микроРНК.

Превращение прай-миРНК в пре-миРНК может регулироваться, во-первых, взаимодействием белков с компонентами микропроцессорного комплекса. Например, белок p53 в кооперации с другими белками (p68, p72 и др.) регулирует вырезание пре-миРНК mir-16, mir-143, mir-145 и других [25, 26]. Во-вторых, регуляторами могут выступать структура прай-миРНК, а также другие РНК [22, 27]. В самой прай-миРНК присутствуют следующие регуляторные элементы: терминальная петля, олигонуклеотидные мотивы в основании шпильки, в стебле и в однонитевых концах РНК (рис. 3). Одним из наиболее изученных элементов является терминальная петля. 14% прай-миРНК человека содержат консервативные нуклеотиды в терминальной петле [28]. Связываясь с терминальной петлей, белок hnRNP A1 может как облегчать процессинг прай-миРНК (увеличивая размер внутренней петли, pri-mir-18a), так и блокировать (pri-let-7) [29, 30]. Белок KSRP связывается с G-богатым участком в терминаль-

ной петле и способствует вырезанию pre-let-7, pre-mir-196a, pre-mir-21 и других пре-миРНК из транскрипта [31]. Конкуренция разнонаправленно действующих факторов KSRP и hnRNP A1 за связывание с терминальной петлей pre-let-7 определяет уровень экспрессии микроРНК [30]. Белок TDP-43 связывается с UG-богатыми терминальными петлями (но не с областью последовательности двунитевой РНК у pre-mir-143 и pre-mir-574) и помогает позиционированию микропроцессорного комплекса на пре-миРНК [32]. Белок YB-1 предпочитает связываться с мотивом UYAUС в терминальной петле pri/pre-mir-29b-2 человека, блокируя соединение микропроцессора и Dicer с предшественником [33]. Часть микропроцессорного комплекса, DGCR8, связывается с UGUG-мотивом в терминальной петле и способствует позиционированию всего комплекса на шпильке предшественника и ее разрезанию [34, 35]. Связывание белков с терминальной петлей прай-миРНК может быть частью регуляторных контуров: например, белок LIN28 и микроРНК let-7 регулируют друг друга, образуя отрицательную обратную связь [36].

Кроме терминальной петли прай-миРНК содержат и другие сигналы для белков. Белки R-SMAD содействуют функции Droscha через мотив R-SBE (CAGAC) в двунитевом участке шпильки пре-миРНК [37]. Белок BRCA1 связывается с основанием шпильки пре-миРНК и подавляет созревание микроРНК miR-155; с другой стороны, подобное связывание ускоряет процессинг let-7a-1, miR-16-1, miR-145 и miR-34 [38].

Факторы сплайсинга SF2/ASF связываются со стеблем прай-миРНК и помогают обрабатывать pri-mir-7; в свою очередь, miR-7 блокирует экспрессию этих факторов [39]. Другой фактор сплайсинга SRp20 (также известный как SRSF3) связывается с CNNC-мотивом (где N – любой нуклеотид из A, U, G, C). Мотив расположен на расстоянии 16–18 нт от сайта разрезания Droscha (рис. 3) и увеличивает уровень экспрессии пре-миРНК [35]. Этот мотив также требуется для РНК-хеликазы p72, которая соединяет микропроцессор с другими белками и тем самым способствует процессингу [40]. Еще два регуляторных мотива, способствующих процессингу, обнаружены в прай-миРНК (рис. 3): UG (~13–14 нт от 5'-конца 5'-микроРНК) и GHG (где H – это A, или C, или U; в двунитевом участке ~11 нт до сайта разрезания Droscha) [41, 42].

Перечисленные выше мотивы (UG и CNNC, GHG и UGUG) в прай-миРНК помогают ориентировать микропроцессорный комплекс относительно прай-миРНК с тем, чтобы резать возле основания шпильки, а не терминальной петли, а также могут компенсировать небольшие структурные дефекты пре-миРНК (маленькие петли и от-

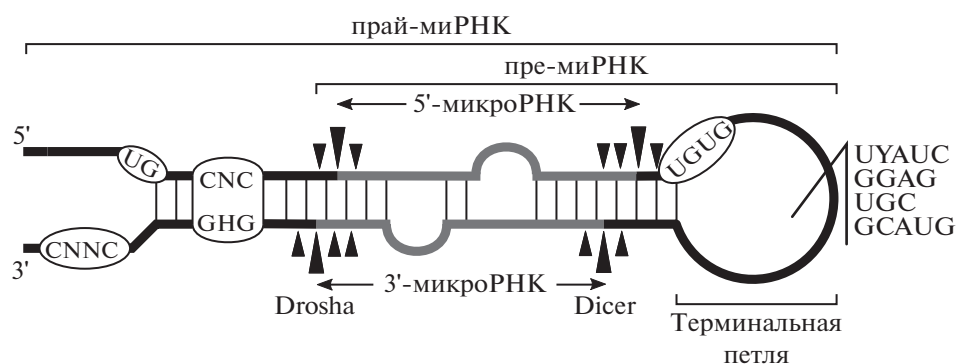


Рис. 3. Структурные особенности канонического предшественника микроРНК. Обычно прай-миРНК содержит два одноцепочечных конца, стебель с небольшими петлями и терминальную петлю. МикроРНК формируют дуплекс с двунауклеотидными 3'-выступающими концами (выделен серым). Также показаны олигонуклеотидные мотивы, которые могут регулировать процессинг и повышать точность разрезания Dicer или Drosha. Стрелками условно показан разрыв в позициях разрезания.

клонение стебля от оптимальной длины) [34, 42]. Эти мотивы широко распространены: CNC/UG во фланкирующих однонитевых РНК-сегментах или UGUG в терминальной петле встречаются в 79% прай-миРНК человека [41]. При этом у млекопитающих достаточно присутствия не всех, а только некоторых мотивов [43].

РНК-РНК-взаимодействия также регулируют созревание микроРНК. Зрелая микроРНК мыши miR-709 связывается с однонитевым участком вблизи пре-миРНК pri-miR-15a/pri-miR-16-1, блокируя процессинг прай-миРНК [44]. Прай-миРНК let-7 и ее зрелая микроРНК связаны положительной обратной связью, когда let-7 связывается с консервативным комплементарным сайтом в 3'-конце транскрипта прай-миРНК [45].

Микропроцессорный комплекс может напрямую деградировать мРНК: Drosha блокирует экспрессию FSTL1-белка путем вырезания шпильки пре-миРНК pre-miR-198 в 3'-нетранслируемом регионе (НТР) мРНК белка [46]. В 5'-НТР мРНК DGCR8 (ко-фактора Drosha) находится шпилька предшественника pre-miR-1306, которая является частью обратной регуляторной петли между Drosha и DGCR8 [47]. Избыток микроРНК miR-128-3p приводит к уменьшению уровней присутствия Drosha и Dicer, тем самым подавляя процессинг всех микроРНК и приводя к развитию рака легких [48]. Таким образом, miR-1306/miR-198/miR-128 могут быть как функциональными микроРНК, так и дополнительными транс-регуляторными элементами.

В целом микропроцессорный комплекс создает богатый ассортимент шпилек, часть из которых отфильтровывается на следующих стадиях созревания микроРНК, в частности по их неподходящей длине при транспортировке из ядра в цитоплазму.

ТРАНСПОРТИРОВКА ИЗ ЯДРА В ЦИТОПЛАЗМУ

После процессинга в ядре полученная шпилька пре-миРНК (рис. 2) перемещается в цитоплазму с помощью белка Exportin-5 (XPO5) и его ко-фактора Ran-GTP [49]. В некоторых случаях в транспортировке могут участвовать и другие комплексы, например Exportin-1 (XPO1) для miR-320/miR-484 и других пре-миРНК с m⁷G-кэпом на 5'-конце, сформированном непосредственно транскрипцией [50, 51]. Эти комплексы не только перемещают шпильку пре-миРНК, но и защищают ее от деградации клеточными экзонуклеазами. Транспортный комплекс специфичен к форме предшественника и захватывает его как "бейсбольная перчатка", связываясь с двойной спиралью, терминальной петлей и выступающим 3'-концом [52, 53]. Таким образом транспортный комплекс может перемещать любые малые шпилечные РНК (включая вирусные или случайные), а эти шпилечные РНК – регулировать экспрессию микроРНК через конкуренцию с пре-миРНК за транспортный комплекс [54]. При генетических повреждениях элементов транспортного комплекса его структура не соответствует структуре предшественника, а сам он не способен захватывать и перемещать пре-миРНК, что, в свою очередь, приводит к накоплению пре-миРНК в ядре и уменьшению уровня экспрессии микроРНК [55]. Также вирусные микроРНК могут блокировать транспорт, как конкурируя с реальными микроРНК, так и адресуясь к мРНК элементов транспортного комплекса, например Ran-GTP [56].

ПРОЦЕССИНГ ПРЕ-МИРНК DICER И ЕГО КО-ФАКТОРАМИ

После перемещения в цитоплазму пре-миРНК связывается с белковым комплексом Dicer (рис. 2),

который разрезает шпильку предшественника возле терминальной петли и производит дуплекс микроРНК–микроРНК с выступающими 3'-концами [3]. Таким образом, на этом этапе формируется второй конец микроРНК. Обычно Dicer состоит из следующих доменов: хеликаза, PAZ, α -спираль и две РНКазы III [57, 58]. Хеликаза формирует жабомоноподобную структуру, которая прилегает к РНКазам, облегчает распознавание терминальной петли пре-миРНК, перемещает и фиксирует шпильку предшественника [58]. Домен PAZ содержит два кармана для связывания с концами пре-миРНК [57, 59]. Каждая из двух РНКаз III разрезает одну из двух ветвей пре-миРНК и освобождает дуплекс микроРНК от терминальной петли. PAZ и РНКазы III соединяются α -спиралью, длина которой устанавливает расстояние между этими доменами и, таким образом, размер производимого дуплекса микроРНК [57].

Существенно, что Dicer может процессировать короткие шпильчатые РНК независимо от их нуклеотидной последовательности [60]. Связывающие карманы в домене PAZ располагаются на расстоянии, которое соответствует длине двух нуклеотидов 3'-выступающего конца, как раз такого, который производит Droscha. Однако, задействовав только один карман, Dicer может обрабатывать шпильки без выступающего 3'-конца или с выступающим 5'-концом.

Строение Dicer определяет расположение сайта разрезания. Для большинства пре-миРНК этот сайт располагается на фиксированной дистанции от 3'-выступающего конца (так называемое “3'-counting rule”) [59]. Dicer может распознавать также фосфатную группу 5'-конца шпильки и разрезать пре-миРНК на расстоянии ~22 нт от этого конца [61]. Это так называемое “5'-counting rule” наблюдается в основном тогда, когда стебель у основания шпильки не замыкается сильной парой G-C [61]. Наблюдаемые отклонения от этих двух правил обусловлены модификациями пре-миРНК, такими как изменение длины концов пре-миРНК, которое сдвигает сайт разрезания Dicer и сид-регион микроРНК. Модификации 3'-концов происходят чаще, нежели 5'-концов, что делает “5'-counting rule” более важным для пре-миРНК с 3'-модифицированным концом.

Как и у Droscha, процессинг у Dicer регулируется разными способами. Важным цис-регуляторным элементом как активации, так и репрессии этапа разрезания Dicer является терминальная петля пре-миРНК. Например, белки KSRP и TDP-43 контролируют активность Dicer путем связывания с терминальной петлей [31, 32]. Белки LIN28A и LIN28B, распознавая мотив GGAG в терминальной петле (например, у let-7, miR-107, miR-143, miR-200c и других), притягивают к ней

белок из семейства терминальных уридилтрансфераз (например, TUT4 или TUT7) [62]. Трансфераза добавляет олигонуклеотидный U-хвост к 3'-концу пре-миРНК: это блокирует процессинг Dicer и приводит к деградации пре-миРНК, в частности, когда выступающий конец до своего наращивания имел каноническую длину два нуклеотида [63]. Подобный способ блокирования процесса созревания микроРНК через уридилрование 3'-конца шпильки присутствует и у *Drosophila* [64], при этом трансфераза Tailor распознает и уридилрует пре-миРНК с гуанином на 3'-конце, что может быть причиной избегания гуанина на этом конце в наблюдаемых микроРНК [65]. И наоборот, для однонуклеотидного конца TUT4 восстанавливает его каноническую длину (например, у let-7 и miR-105), что в дальнейшем способствует их каноническому процессингу [66].

Другой мотив внутри терминальной петли пре-миРНК, UGC, связывается с белком MBNL1, что помогает в разрезании предшественника [67]. MBNL1 конкурирует с LIN28 за связывание с терминальной петлей и таким образом защищает пре-миРНК от наращивания 3'-конца [67]. Мотив GCAUG (рис. 3) в терминальной петле связывается с белками Rbfox и подавляет процесс созревания микроРНК человека miR-20b, miR-107 и других [68].

Помимо белков на процессинг Dicer могут влиять и различные РНК: в *C. elegans* некодирующая РНК mcs-1 может заменять эндогенные двуниевые РНК для связывания с Dicer [69]. МикроРНК могут связываться с мРНК Dicer и таким образом регулировать свою собственную экспрессию через обратные связи (например, let-7, miR-BART6-5p для Dicer человека) [70].

Последовательность и структура пре-миРНК определяют не только скорость, но и качество разрезания предшественника. Точность разрезания Dicer подчиняется так называемому правилу “loop-counting rule”: разрезание 3'-ветви пре-миРНК точнее, когда на расстоянии два нуклеотида выше от сайта разрезания в 3'-5'-направлении располагается петля [71]. В других случаях Dicer производит продукты с переменными 5'-концами 3'-микроРНК [71].

ОБРАЗОВАНИЕ miRISC, AGO-ПРОЦЕССИНГ

После образования дуплекса микроРНК–микроРНК он вместе с одним из белков семейства аргонатов (AGO) и ко-факторами создает микроРНК-индуцируемый комплекс выключения гена (от англ. miRISC). Этот комплекс разворачивает дуплекс и выбирает ту из его ветвей, которая впоследствии свяжется с мРНК [72]. В процессе разворачивания дуплекса одна из его

ветвей (так называемая “направляющая”) чаще используется для формирования зрелого комплекса miRISC, в то время как другая, “пассажирская”, ветвь расщепляется или быстро деградирует. Соотношение фракций “направляющей” и “пассажирской” микроРНК определяется термодинамической стабильностью и концевым нуклеотидом или может варьироваться в зависимости от стадии развития организма, его пола, ткани (в которых происходит экспрессия) или ориентации дуплекса при загрузке в комплекс [60, 73]. Белки AGO предпочитают ветвь с нуклеотидами А или U на 5'-конце или ту ветвь дуплекса, у которой замыкающая пара на этом конце менее стабильна [74]. С другой стороны, смена ветви может вызываться дестабилизирующим [75] редактированием дуплекса, причем это редактирование чаще наблюдается в сид-регионе микроРНК (у человека и мыши, но не у *D. melanogaster*) [76]. Также ветвь может смениться из-за смещения пре-миРНК в мРНК, так называемого “сдвига шпильки” [77].

AGO-белки и выполняемые ими функции различаются в зависимости от организма [78]. У некоторых организмов есть специализация AGO-белков по виду малых РНК в зависимости от характеристик их дуплексов. Например, у *Drosophila* Ago1 предпочитает связываться с дуплексом, в котором на 5'-конце “направляющей” микроРНК находится урацил, в то время как Ago2 предпочитает дуплекс микроРНК с цитозином на этом же конце [79]. У человека связывание микроРНК с белками семейства Argonaute (Ago2 и Ago3) коррелирует с содержанием тетра-нуклеотидов YRNB вблизи их 3'-конца, а связывание микроРНК с белком Ago2 коррелирует с содержанием тетра-нуклеотидов RNNK в центре последовательности [80]. Петли в 9–10-й позициях “направляющей” микроРНК *Drosophila* направляют дуплекс микроРНК непосредственно в Ago1, но не позволяют ему обрабатываться Ago2 [81]. То есть при отсутствии петель “пассажирская” микроРНК разрезается, а “направляющая” включается в комплекс с Ago2. В обратном случае при наличии петель в центре дуплекса “пассажирская” ветвь деградирует, а “направляющая” – включается в Ago1. Однако у человека влияние петли в середине дуплекса микроРНК на выбор AGO-белка отсутствует [82]. Смена ветви может закрепиться эволюционно с новыми функциями микроРНК [77].

НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ПУТИ БИОГЕНЕЗА

Кроме описанного выше канонического пути биогенеза, микроРНК образуются и другими, Dicer- и Drosha-независимыми путями (рис. 2). Большинство из неканонических микроРНК составляют миртроны, которые пропускают шаг процессирования мРНК Drosha, а их предше-

ственники образуются через сплайсинг, расщепление петли интрона и перестройку в каноническую шпилечную структуру [83]. Некоторые из миртронов содержат дополнительные нуклеотиды на одном или обоих концах шпильки, которые отличают структуру от канонической. Впоследствии эти нуклеотиды удаляются экзонуклеазами, а созревание микроРНК продолжается по каноническому пути [83].

Хотя к настоящему моменту обнаружены сотни миртронов [84, 85], особенности их созревания изучены слабее, чем для канонических микроРНК. В среднем шпилька пре-миРНК миртронов немногим длиннее, чем канонические предшественники [85]. После сплайсинга большинство из предшественников миртронов содержат длинный выступающий конец (так называемые “tailed-миртроны”) из нуклеотидов между сайтом сплайсинга и основанием шпильки пре-миРНК [84]. Укорачивание экзонуклеазами хвостов этих миртронов может смещать границы микроРНК [86]. Во многих миртронах без выступающих концов и в миртронах с 3'-выступающим концом (так называемых “3'-tailed миртронах”) с 5'-конца дополнительно удаляется гуанин, который находится на границе интрона и экзона [85]. Это удаление гуанина может быть дополнительным механизмом повышения точности разрезания пре-миРНК РНКазой III Dicer [87].

Типичная структура предшественников миртронов несет отпечатки особенностей их биогенеза и отличается от структуры канонических пре-миРНК: выступающий конец в основании шпильки чаще состоит из одного, а не двух нуклеотидов [87]. По сравнению с каноническими микроРНК у миртронов выше плотность вариантов однонуклеотидного полиморфизма (ОНП), а сам ОНП обратно ассоциирован с болезнями. Вероятно, миртроны находятся под положительным (движущим) отбором, в то время как большинство из канонических микроРНК – под отрицательным (стабилизирующим); миртроны могут являться имманентным источником изменчивости, которая способствует возникновению болезней. Интересно, что участок точки ветвления при сплайсинге чаще располагается ровно на том месте, чтобы не быть экранированным структурой предшественников миртронов [87]. Таким образом миртроны могут легко возникать из случайных шпилек подходящего размера недалеко от 3'-сайта сплайсинга. В результате миртроны чаще появляются и быстрее исчезают, чем канонические микроРНК, даже если те и другие генерируют функционально идентичные регуляторные РНК [88].

Биогенез микроРНК млекопитающих miR-1225 и miR-1228, первоначально охарактеризованных как миртроны, на самом деле не зависит от сплайсинга [89]. Но их дальнейший биогенез не требует

канонических компонент DGCR8, Dicer, Exportin-5 или AGO, а только Drosha [90]. Этот класс микроРНК назван симтронами (от англ. simtron, сплайсинг-независимые митроно-подобные РНК). Некоторые интроны содержат одновременно митроны и симтроны, а получившиеся микроРНК — результат выбора одного из путей биогенеза [89].

Совсем недавно был обнаружен еще один сплайсинг-зависимый класс микроРНК — аготроны (от англ. agotron), чей биогенез включает интеграцию микроРНК в miRISC и взаимодействие с белками семества Argonaute, но не требует шага разрезания Dicer [91].

Другой Dicer-независимый путь наблюдается для семейства микроРНК miR-451, в котором каталитическую функцию Dicer берет на себя белок Ago2 [92, 93]. Drosha порождает предшественника микроРНК pre-miR-451 со слишком коротким для процессирования Dicer, ~18 нуклеотидным, стеблем. Белок Ago2 разрезает этот стебель в середине 3'-ветви и производится ~30-нуклеотидный РНК-продукт [92, 93]. Затем поли(А)-специфичная рибонуклеаза PARN отрезает 3'-конец у этого продукта и освобождает зрелую 5'-микроРНК, при этом разницы между уровнем активности этой микроРНК и изначального 30-нуклеотидного продукта не обнаружено [94]. Также в противовес другим пре-миРНК терминальная петля не влияет на созревание miR-451 [94]. Белок Ago2 может заменить Dicer не только для коротких шпилек, но и при его отсутствии; и наоборот, предшественник miR-451 с восстановленной канонической длиной стебля может процессироваться посредством Dicer [95]. Таким образом Ago2- и Dicer-пути оказываются для miR-451 взаимозаменяемыми.

МУТАЦИИ, ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ, РЕДАКТИРОВАНИЕ A>I

Изменения в последовательности прай-/пре-/микроРНК могут влиять на вторичную структуру предшественника и таким образом изменять уровень экспрессии и функции микроРНК. Нуклеотидные замены чаще наблюдаются в центре микроРНК и в окрестности ее границ в предшественнике, а районы, отвечающие за адресацию микроРНК, так называемый сид-регион (позиции 2–8 микроРНК) и дополнительный сид-регион (позиции 13–16), более консервативны [96]. Эти два района характеризуются также наименьшим присутствием петель [87, 96]: подобная связь интенсивности мутагенеза со вторичной структурой характерна для структурных РНК, например тРНК [97].

Однонуклеотидный полиморфизм — один из типов замен в ДНК, который влияет на процесс созревания и функцию микроРНК. ОНП в пре-миРНК человека может подавлять или повышать

экспрессию микроРНК на шаге разрезания Drosha (например, miR-30c, miR-125a, miR-146a, miR-510 и др.) или Dicer (например, miR-196a, miR-196a и др.) [22, 98]. Замена C>T в первой позиции мотива CNNC замедляет процессинг Drosha pri-mir-16-1 [41]. Кроме того, ОНП внутри микроРНК (особенно внутри сид-региона) или внутри мишени влияет на функцию микроРНК [99]. Замена в первом нуклеотиде miR-934-5p человека приводит к изменению сайтов разрезания Dicer и Drosha, а также к смене ветви дуплекса, задействованной в комплексе miRISC [100].

Мутации в генах белков комплексов процессинга микроРНК (например, Dicer, Drosha или Exportin-5) могут нарушать функции этих комплексов [55, 101].

Еще один способ регулировать созревание микроРНК — это редактирование РНК [102]. Фермент ADAR заменяет аденозин (A) на инозин (I), что может как блокировать разрезание Drosha или Dicer, так и способствовать ему [103]. Модификации последовательности прай-/пре-миРНК (например, в pri-mir-151 и в кластере miR-376 человека и мыши) приводят к изменению стабильности структуры прай-миРНК, мишеней микроРНК и могут блокировать шаги разрезания Dicer [76, 104, 105]. Кроме того, такое редактирование одной ветви дуплекса микроРНК может приводить к выбору второй в качестве функциональной [76].

Замечательно, что, хотя некоторые из записей в базах данных ОНП являются на самом деле событиями редактирования РНК [106], плотность редактирования A>I ведет себя антибатно относительно плотности ОНП и чаще наблюдается в сид-регионе для микроРНК человека и мыши (но не *D. melanogaster*) [76].

НЕОДНОРОДНОСТЬ ГРАНИЦ И ОШИБКИ АННОТАЦИИ микроРНК

В каноническом биогенезе Drosha и Dicer часто режут одну и ту же шпильку предшественников в нескольких соседних позициях (рис. 3) и производят таким образом микроРНК с разными границами, так называемые изомиры (от англ. isoMiRs) [107]. Точность разрезания Drosha чувствительна к мотивам последовательности прай-миРНК и контролируется DGCR8 [35]. Домен RIIIDa Dicer режет более точно, и он более чувствителен как ко вторичной структуре, так и к нуклеотидной последовательности своего субстрата, чем домен RIIIDb [65, 71]. В результате 5'-граница микроРНК (та граница, что прилегает к сид-региону) оказывается более однородной, а неоднородность разрезания проявляется в основном в вариативности длин выступающих 3'-концов [65, 108]. Сходство строения Dicer и Drosha

		Число ридов
dme-mir-4	...CCGGUCA <u>AUAAAGCUAGACAACCAUUGAA</u> AGUUCGUUG...	17584
dme-mir-79	...UACUUCA <u>UAAAGCUAGAUUACCAAAGCAU</u> UGGCUUC...	48925 164672 23775
dme-mir-9c	...UAUCAUC <u>UAAAGCUUUUAUACCAAAGCUC</u> CAGCUUA...	57225

Рис. 4. Пример смены главной формы изомиров и сдвига сид-региона в *D. melanogaster*. Данные получены из базы miR-Base. В последовательности пре-миРНК серым цветом выделена аннотированная микроРНК. Последовательности ридов подчеркнуты, приведены только фракции с минимальным количеством наблюдений 10000. В dme-mir-79 наблюдаются фракции ридов с разными начальными позициями. Каждая из этих позиций эволюционно зафиксирована в предшественниках dme-mir-9c и dme-mir-4 в виде микроРНК с соответствующим сдвигом сид-региона на один нуклеотид. Заметим, что в miRBase главная фракция ридов не всегда идентична аннотированной микроРНК (например, dme-mir-9c-3p и dme-mir-4-3p), что может быть ошибками базы miRBase.

[109], а также распределение длин выступающих концов дуплекса микроРНК [87] позволяют предположить, что ровно то же самое верно и для Drosha. Длины выступающих концов взаимозависимы, что послужило основанием для двухрычажной модели динамики режущего комплекса Dicer [87].

Смещение границ микроРНК в предшественнике может приводить к изменению мишеней, тем самым расширяя функциональный репертуар микроРНК [110, 111]. Выступающие концы дополнительно могут изменяться в обе стороны аденилированием, уридилированием и активностью экзонуклеаз, что приводит к дополнительной неоднородности (в большинстве случаев 3') границ микроРНК [112–114]. Таким образом, 5'-граница микроРНК, которая отвечает за выбор мишени, оказывается более однородной. Однако для некоторых микроРНК, например miR-79, miR-193, miR-210 у *D. melanogaster* и miR-124, miR-133a, miR-223 у *M. musculus* [77], два и более фрагмента микроРНК (изомира) наблюдаются на уровнях, сравнимых с главной формой. Смена главной формы, вызванная смещением 5'-границы (рис. 4), так называемый сдвиг сид-региона, приводит к смене мишеней и иногда наблюдается в эволюции [115]. Стоит отметить, что только около трети аннотированных микроРНК из базы miRBase (релиз 21.0) идентичны главной форме своих изомиров, при этом около 37% микроРНК из базы (рис. 4) никогда не были самыми наблюдаемыми из изомиров [116].

В отличие от канонических микроРНК граница митронов более вариабельна и служит дополнительным фактором гетерогенности зрелого продукта. В результате сплайсинга у митронов могут образовываться дополнительные выступа-

ющие концы, которые в дальнейшем активно укорачиваются 3'–5'- и 5'–3'-экзонуклеазами [84]. В большинстве митронов шпилька пре-миРНК находится у 3'-сайта сплайсинга и потому имеет длинный выступающий 5'-конец, отрезание которого определяет 5'-границу 5'-микроРНК и выбор ее мишени. У остальных митронов 5'-граница их 5'-микроРНК часто определяется сплайсингом и последующей потерей концевой гуанина [85]. На противоположной ветви пре-миРНК терминальная уридилтрансфераза Tailor распознает гуанин на 3'-конце сайта сплайсинга (3'-AG) и уридилирует этот конец предшественника, что блокирует дальнейшее созревание микроРНК в *Drosophila* [64]. Таким образом, хотя в биогенезе митронов отсутствует Drosha, они, так же как и канонические пре-миРНК [65], избегают гуанина на 5' (3')-конце своих 5' (3')-микроРНК, соответственно. Это позволяет предположить, что гуанин на конце пре-миРНК оказывает влияние на обработку предшественника Dicer.

Изучение уровня экспрессии микроРНК и уровня деградации РНК в разных тканях показывает, что микроРНК, добавленные в последних релизах базы miRBase, демонстрируют повышенную экспрессию при высокой степени деградации РНК и поэтому могут быть артефактами [117]. Такие ложноположительные последовательности, а также неоднородность границ микроРНК приводят к появлению ошибок аннотации в базах данных. Определение и верификация микроРНК осложнены их малым размером и некодирующим происхождением. Развитие методов глубокого секвенирования и биоинформатических алгоритмов для обработки их результатов привело к быстрому росту числа кандидатов микроРНК, в том числе и ложных. Для отсече-

ния ложноположительных микроРНК применяются следующие критерии: эволюционная консервативность, экспериментальная подтвержденность дуплекса микроРНК с выступающими двухнуклеотидными 3'-концами, структурное подобие последовательностей, однородность 5'-края микроРНК [118]. Этим критериям удовлетворяет только одна треть микроРНК человека и около одной шестой части микроРНК животных из базы miRBase: из них была сформирована база MiR-GeneDB с условно-достоверными микроРНК [118]. Описанным выше критериям не удовлетворяют почти все неканонические микроРНК.

Ложноположительные микроРНК могут порождаться шумом транскрипции, другими видами малых РНК, тРНК и транспозонами. Еще одной причиной ошибки является загрязнение данных при эксперименте, в том числе присутствие микроРНК из другого организма (так называемые экзогенные микроРНК, или “ксеномиры”, от англ. xenomiR), например растений у мыши и человека [119]. До сих пор ксеномиры не наблюдались в воспроизводимых экспериментах, а результаты тех экспериментов, в которых они наблюдались, отсутствуют в свободном доступе, что не дает возможности независимо контролировать их чистоту [120].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему моменту стало известно многое о микроРНК, их биогенезе и функциях, однако некоторые вопросы остаются открытыми. Вхождение микроРНК в различные регуляторные контуры, а также влияние их первичной и вторичной структур на биогенез и функции дают богатый репертуар способов контроля над клеточными процессами и, очевидно, мы знаем только малую их часть. Требуется дальнейшее изучение редкие биогенезы микроРНК, структурные изменения прай-/пре-/микроРНК и их последствия, а также ксеномиры и изомиры. Неизвестно значение избыточного количества последовательностей микроРНК при том, что каждая из микроРНК может присутствовать в нескольких слабо различающихся формах. Имманентная биохимическая вариабельность микроРНК расширяет их функциональный репертуар и может приводить к генетической изменчивости самих микроРНК и систем контроля над ними, в частности механизмов редактирования. Благодаря своим свойствам микроРНК занимают важное, возможно центральное, место в эпигенетике РНК, иначе известной как эпитранскриптомика.

Работа поддержана государственным бюджетным проектом 0324-2019-0040.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kutter C., Svoboda P. miRNA, siRNA, piRNA: Knowns of the unknown // *RNA Biology*. 2008. V. 5. № 4. P. 181–188. <https://doi.org/10.4161/rna.7227>
2. Lee Y., Jeon K., Lee J.-T. et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization // *EMBO J*. 2002. V. 21. № 17. P. 4663–4670.
3. O'Brien J., Hayder H., Zayed Y. et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation // *Frontiers in Endocrinology*. 2018. V. 9. № 402. P. 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
4. Vidigal J.A., Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from *in vivo* studies // *Trends in Cell Biology*. 2015. V. 25. № 3. P. 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.11.004>
5. Borchert G.M., Lanier W., Davidson B.L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2006. V. 13. № 12. P. 1097–1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>
6. 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. № 12. P. 1957–1966. <https://doi.org/10.1261/rna.7135204>
7. Ballarino M., Pagano F., Girardi E. et al. Coupled RNA processing and transcription of intergenic primary microRNAs // *Mol. Cell. Biol*. 2009. V. 29. № 20. P. 5632–5638. <https://doi.org/10.1128/MCB.00664-09>
8. Marco A., Ninova M., Griffiths-Jones S. Multiple products from microRNA transcripts // *Biochem. Soc. Trans*. 2013. V. 41. № 4. P. 850–854. <https://doi.org/10.1042/BST20130035>
9. Titov I.I., Vorozheykin P.S. Analysis of miRNA duplication in the human genome and the role of transposon evolution in this process // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2011. V. 1. № 4. P. 308–314. <https://doi.org/10.1134/S2079059711040083>
10. Chang T.-C., Perteza M., Lee S. et al. Genome-wide annotation of microRNA primary transcript structures reveals novel regulatory mechanisms // *Genome Res*. 2015. V. 25. № 9. P. 1401–1409. <https://doi.org/10.1101/gr.193607.115>
11. Scott H., Howarth J., Lee Y.B. et al. MiR-3120 is a mirror microRNA that targets heat shock cognate protein 70 and auxilin messenger RNAs and regulates clathrin vesicle uncoating // *J. Biol. Chem*. 2012. V. 287. № 18. P. 14726–14733. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.326041>

12. *Abasi M., Kohram F., Fallah P. et al.* Differential maturation of miR-17~92 cluster members in human cancer cell lines // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017. V. 182. № 4. P. 1540–1547. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2416-5>
13. *Wang Y., Luo J., Zhang H. et al.* MicroRNAs in the same clusters evolve to coordinately regulate functionally related genes // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. № 9. P. 2232–2247. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw089>
14. *Lataniotis L., Albrecht A., Kok F.O. et al.* CRISPR/Cas9 editing reveals novel mechanisms of clustered microRNA regulation and function // *Scientific Reports.* 2017. V. 7. № 8585. P. 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09268-0>
15. *Tong Z., Cui Q., Wang J. et al.* TransmiR v2.0: an updated transcription factor-microRNA regulation database // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № D1. P. D253–D258. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1023>
16. *Ben-Ami O., Pencovich N., Lotem J. et al.* A regulatory interplay between miR-27a and Runx1 during megakaryopoiesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 1. P. 238–243. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811466106>
17. *Wang Y., Liang H., Zhou G. et al.* HIC1 and miR-23~27~24 clusters form a double-negative feedback loop in breast cancer // *Cell Death & Differentiation.* 2017. V. 24. № 3. P. 421–432. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.136>
18. *Shalgi R., Lieber D., Oren M. et al.* Global and local architecture of the mammalian microRNA–transcription factor regulatory network // *PLoS Computat. Biol.* 2007. V. 3. № 7. P. 1291–1304. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030131>
19. *Barros-Silva D., Costa-Pinheiro P., Duarte H. et al.* MicroRNA-27a-5p regulation by promoter methylation and MYC signaling in prostate carcinogenesis // *Cell Death & Disease.* 2018. V. 9. № 167. P. 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0241-y>
20. *Munoz-Tello P., Rajappa L., Coquille S. et al.* Polyuridylation in eukaryotes: a 3'-end modification regulating RNA life // *BioMed Res. Intern.* 2015. V. 2015. P. 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/968127>
21. *Zhao B.S., Roundtree I.A., He C.* Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. V. 18. № 1. P. 31–42. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.132>
22. *Fernandez N., Cordiner R.A., Young R.S. et al.* Genetic variation and RNA structure regulate microRNA biogenesis // *Nat. Communicat.* 2017. V. 8. № 15114. P. 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms15114>
23. *Nguyen T.A., Jo M.H., Choi Y.-G. et al.* Functional anatomy of the human microprocessor // *Cell.* 2015. V. 161. № 6. P. 1374–1387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.010>
24. *Kwon S.C., Nguyen T.A., Choi Y.-G. et al.* Structure of Human DROSHA // *Cell.* 2016. V. 164. № 1–2. P. 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.019>
25. *Suzuki H.I., Yamagata K., Sugimoto K. et al.* Modulation of microRNA processing by p53 // *Nature.* 2009. V. 460. № 7254. P. 529–533. <https://doi.org/10.1038/nature08199>
26. *Connerty P., Ahadi A., Hutvagner G.* RNA binding proteins in the miRNA pathway // *Intern. J. Mol. Sci.* 2015. V. 17. № 31. P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms17010031>
27. *Treiber T., Treiber N., Plessmann U. et al.* A compendium of RNA-binding proteins that regulate microRNA biogenesis // *Mol. Cell.* 2017. V. 66. № 2. P. 270–284. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.014>
28. *Michlewski G., Guil S., Semple C.A. et al.* Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops // *Mol. Cell.* 2008. V. 32. № 3. P. 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.013>
29. *Jean-Philippe J., Paz S., Caputi M.* hnRNP A1: The swiss army knife of gene expression // *Intern. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 9. P. 18999–19024. <https://doi.org/10.3390/ijms140918999>
30. *Michlewski G., Cáceres J.F.* Antagonistic role of hn-RNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis // *Nat. Structural & Mol. Biol.* 2010. V. 17. № 8. P. 1011–1018. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1874>
31. *Trabucchi M., Briata P., Garcia-Mayoral M. et al.* The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs // *Nature.* 2009. V. 459. № 7249. P. 1010–1014. <https://doi.org/10.1038/nature08025>
32. *Kawahara Y., Mieda-Sato A.* TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 9. P. 3347–3352. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112427109>
33. *Wu S.-L., Fu X., Huang J. et al.* Genome-wide analysis of YB-1-RNA interactions reveals a novel role of YB-1 in miRNA processing in glioblastoma multiforme // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 17. P. 8516–8528. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv779>
34. *Nguyen T.A., Park J., Dang T.L. et al.* Microprocessor depends on hemin to recognize the apical loop of primary microRNA // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. № 11. P. 5726–5736. <https://doi.org/10.1093/nar/gky248>
35. *Kim K., Nguyen T.D., Li S. et al.* SRSF3 recruits DROSHA to the basal junction of primary microRNAs // *RNA.* 2018. V. 24. № 7. P. 892–898. <https://doi.org/10.1261/rna.065862.118>
36. *Viswanathan S.R., Daley G.Q.* Lin28: A microRNA regulator with a macro role // *Cell.* 2010. V. 140. № 4. P. 445–449. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.007>
37. *Davis B.N., Hilyard A.C., Nguyen P.H. et al.* Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha // *Mol. Cell.* 2010. V. 39. № 3. P. 373–384. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.011>
38. *Kawai S., Amano A.* BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex // *The J. Cell Biol.* 2012. V. 197. № 2. P. 201–208. <https://doi.org/10.1083/jcb.201110008>

39. Wu H., Sun S., Tu K. et al. A splicing-independent function of SF2/ASF in microRNA processing // *Mol. Cell*. 2010. V. 38. № 1. P. 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.021>
40. Ha M., Kim V.N. Regulation of microRNA biogenesis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. V. 15. № 8. P. 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
41. Auyeung V.C., Ulitsky I., McGeary S.E. et al. Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing // *Cell*. 2013. V. 152. № 4. P. 844–858. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.031>
42. Bartel D.P. Metazoan microRNAs // *Cell*. 2018. V. 173. № 1. P. 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
43. Fromm B., Domanska D., Hackenberg M. et al. MirGeneDB2.0: the curated microRNA Gene Database. 2018. <https://doi.org/10.1101/258749>
44. Tang R., Li L., Zhu D. et al. Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system // *Cell Res.* 2012. V. 22. № 3. P. 504–515. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.137>
45. Zisoulis D.G., Kai Z.S., Chang R.K. et al. Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute // *Nature*. 2012. V. 486. № 7404. P. 541–544. <https://doi.org/10.1038/nature11134>
46. Sundaram G.M., Common J.E.A., Gopal F.E. et al. ‘See-saw’ expression of microRNA-198 and FSTL1 from a single transcript in wound healing // *Nature*. 2013. V. 495. № 7439. P. 103–106. <https://doi.org/10.1038/nature11890>
47. Han J., Pedersen J.S., Kwon S.C. et al. Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8 // *Cell*. 2009. V. 136. № 1. P. 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.053>
48. Frixa T., Sacconi A., Ciocce M. et al. MicroRNA-128-3p-mediated depletion of Drosha promotes lung cancer cell migration // *Carcinogenesis*. 2018. V. 39. № 2. P. 293–304. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx134>
49. Yi R., Qin Y., Macara I.G. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 24. P. 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>
50. Büssing I., Yang J.-S., Lai E.C. et al. The nuclear export receptor XPO-1 supports primary miRNA processing in *C. elegans* and *Drosophila* // *The EMBO J.* 2010. V. 29. № 11. P. 1830–1839. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.82>
51. Xie M., Li M., Vilborg A. et al. Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA // *Cell*. 2013. V. 155. № 7. P. 1568–1580. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.027>
52. Zeng Y. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5 // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 16. P. 4776–4785. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh824>
53. Okada C., Yamashita E., Lee S.J. et al. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery // *Science*. 2009. V. 326. № 5957. P. 1275–1279. <https://doi.org/10.1126/science.1178705>
54. Bennasser Y., Chable-Bessia C., Triboulet R. et al. Competition for XPO5 binding between Dicer mRNA, pre-miRNA and viral RNA regulates human Dicer levels // *Nat. Structural & Mol. Biol.* 2011. V. 18. № 3. P. 323–327. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1987>
55. Melo S.A., Moutinho C., Ropero S. et al. A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells // *Cancer Cell*. 2010. V. 18. № 4. P. 303–315. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.09.007>
56. Singh C.P., Singh J., Nagaraju J. A baculovirus-encoded microRNA (miRNA) suppresses its host miRNA biogenesis by regulating the Exportin-5 cofactor Ran // *J. Virology*. 2012. V. 86. № 15. P. 7867–7879. <https://doi.org/10.1128/JVI.00064-12>
57. MacRae I.J., Zhou K., Doudna J.A. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer // *Nat. Structural & Mol. Biol.* 2007. V. 14. № 10. P. 934–940. <https://doi.org/10.1038/nsmb1293>
58. Lau P.-W., Guiley K.Z., De N. et al. The molecular architecture of human Dicer // *Nat. Structural & Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 4. P. 436–440. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2268>
59. MacRae I.J. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer // *Science*. 2006. V. 311. № 5758. P. 195–198. <https://doi.org/10.1126/science.1121638>
60. MacRae I.J., Li F., Zhou K. et al. Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi // *Cold Spring Harbor Symp. Quantitative Biol.* 2006. V. 71. P. 73–80. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.042>
61. Park J.-E., Heo I., Tian Y. et al. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing // *Nature*. 2011. V. 475. № 7355. P. 201–205. <https://doi.org/10.1038/nature10198>
62. Thornton J.E., Chang H.-M., Piskounova E. et al. Lin28-mediated control of let-7 microRNA expression by alternative TUTases Zcchc11 (TUT4) and Zcchc6 (TUT7) // *RNA*. 2012. V. 18. № 10. P. 1875–1885. <https://doi.org/10.1261/rna.034538.112>
63. Newman M.A., Thomson J.M., Hammond S.M. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing // *RNA*. 2008. V. 14. № 8. P. 1539–1549. <https://doi.org/10.1261/rna.1155108>
64. Bortolamiol-Becet D., Hu F., Jee D. et al. Selective suppression of the splicing-mediated microRNA pathway by the terminal uridylyltransferase Tailor // *Mol. Cell*. 2015. V. 59. № 2. P. 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.034>
65. Starega-Roslan J., Witkos T., Galka-Marciniak P. et al. Sequence features of Drosha and Dicer cleavage sites affect the complexity of isomiRs // *Intern. J. Mol. Sci.*

2015. V. 16. № 12. P. 8110–8127.
<https://doi.org/10.3390/ijms16048110>
66. Heo I., Ha M., Lim J. et al. Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs // *Cell*. 2012. V. 151. № 3. P. 521–532.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.022>
 67. Rau F., Freyermuth F., Fugier C. et al. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy // *Nat. Structural & Mol. Biol.* 2011. V. 18. № 7. P. 840–845.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2067>
 68. Chen Y., Zubovic L., Yang F. et al. Rbfox proteins regulate microRNA biogenesis by sequence-specific binding to their precursors and target downstream Dicer // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 9. P. 4381–4395.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw177>
 69. Hellwig S., Bass B.L. A starvation-induced noncoding RNA modulates expression of Dicer-regulated genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 35. P. 12897–12902.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0805118105>
 70. Iizasa H., Wulff B.-E., Alla N.R. et al. Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 43. P. 33358–33370.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.138362>
 71. Gu S., Jin L., Zhang Y. et al. The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of Dicer processing *in vivo* // *Cell*. 2012. V. 151. № 4. P. 900–911.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.042>
 72. Okamura K., Nakanishi K. *Argonaute Proteins*. N.Y.: Springer, 2018. 260 p.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7339-2>
 73. Pinhal D., Bovolenta L.A., Moxon S. et al. Genome-wide microRNA screening in Nile tilapia reveals pervasive isomiRs' transcription, sex-biased arm switching and increasing complexity of expression throughout development // *Sci. Reports*. 2018. V. 8. № 8248. P. 1–18.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-26607-x>
 74. Suzuki H.I., Katsura A., Yasuda T. et al. Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes // *Nat. Structural & Mol. Biol.* 2015. V. 22. № 7. P. 512–521.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.3050>
 75. Wright D.J., Rice J.L., Yanker D.M. et al. Nearest neighbor parameters for inosine-uridine pairs in RNA duplexes // *Biochemistry*. 2007. V. 46. № 15. P. 4625–4634.
<https://doi.org/10.1021/bi0616910>
 76. Li L., Song Y., Shi X. et al. The landscape of miRNA editing in animals and its impact on miRNA biogenesis and targeting // *Genome Res.* 2018. V. 28. № 1. P. 132–143.
<https://doi.org/10.1101/gr.224386.117>
 77. Berezikov E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals // *Nat. Rev. Genet.* 2011. V. 12. № 12. P. 846–860.
<https://doi.org/10.1038/nrg3079>
 78. Hutvagner G., Simard M.J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. V. 9. № 1. P. 22–32.
<https://doi.org/10.1038/nrm2321>
 79. Ghildiyal M., Xu J., Seitz H. et al. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway // *RNA*. 2010. V. 16. № 1. P. 43–56.
<https://doi.org/10.1261/rna.1972910>
 80. Ponomarenko M.P., Suslov V.V., Ponomarenko P.M. et al. Abundances of microRNAs in human cells can be estimated as a function of the abundances of YRHB and RHHK tetranucleotides in these microRNAs as an ill-posed inverse problem solution // *Frontiers in Genet.* 2013. V. 4. P. 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00122>
 81. Okamura K., Liu N., Lai E.C. Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes // *Mol. Cell*. 2009. V. 36. № 3. P. 431–444.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.027>
 82. Shin C. Cleavage of the star strand facilitates assembly of some microRNAs into Ago2-containing silencing complexes in mammals // *Cell*. 2008. № 26. P. 308–313.
 83. Curtis H.J., Sibley C.R., Wood M.J.A. Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA // *Wiley Interdisciplinary Rev.: RNA*. 2012. V. 3. № 5. P. 617–632.
<https://doi.org/10.1002/wrna.1122>
 84. Ladewig E., Okamura K., Flynt A.S. et al. Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data // *Genome Res.* 2012. V. 22. № 9. P. 1634–1645.
<https://doi.org/10.1101/gr.133553.111>
 85. Wen J., Ladewig E., Shenker S. et al. Analysis of nearly one thousand mammalian mirtrons reveals novel features of Dicer substrates // *PLoS Computational Biol.* / Ed. Rigoutsos I. 2015. V. 11. № 9. P. 1–29.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004441>
 86. Yang L. Splicing noncoding RNAs from the inside out: splicing noncoding RNAs from the inside out // *Wiley Interdisciplinary Rev.: RNA*. 2015. V. 6. № 6. P. 651–660.
<https://doi.org/10.1002/wrna.1307>
 87. Titov I.I., Vorozheykin P.S. Comparing miRNA structure of mirtrons and non-mirtrons // *BMC Genomics*. 2018. V. 19. № S3. P. 92–102.
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4473-8>
 88. Berezikov E., Liu N., Flynt A.S. et al. Evolutionary flux of canonical microRNAs and mirtrons in *Drosophila* // *Nat. Genet.* 2010. V. 42. № 1. P. 6–9.
<https://doi.org/10.1038/ng0110-6>
 89. Havens M.A., Reich A.A., Duelli D.M. et al. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 10. P. 4626–4640.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks026>
 90. Abdelfattah A.M., Park C., Choi M.Y. Update on non-canonical microRNAs // *Biomolecular Concepts*. 2014. V. 5. № 4. P. 275–287.
<https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0012>
 91. Stagsted L.V.W., Daugaard I., Hansen T.B. The ago-trons: Gene regulators or Argonaute protectors? //

- BioEssays. 2017. V. 39. № 4. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1002/bies.201600239>
92. *Cheloufi S., Dos Santos C.O., Chong M.M.W. et al.* A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis // *Nature*. 2010. V. 465. № 7298. P. 584–589.
<https://doi.org/10.1038/nature09092>
 93. *Cifuentes D., Xue H., Taylor D.W. et al.* A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity // *Science*. 2010. V. 328. № 5986. P. 1694–1698.
<https://doi.org/10.1126/science.1190809>
 94. *Yoda M., Cifuentes D., Izumi N. et al.* Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of Argonaute2-cleaved precursor microRNAs // *Cell Reports*. 2013. V. 5. № 3. P. 715–726.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.029>
 95. *Yang J.-S., Maurin T., Lai E.C.* Functional parameters of Dicer-independent microRNA biogenesis // *RNA*. 2012. V. 18. № 5. P. 945–957.
<https://doi.org/10.1261/rna.032938.112>
 96. *Wheeler B.M., Heimberg A.M., Moy V.N. et al.* The deep evolution of metazoan microRNAs // *Evolution & Development*. 2009. V. 11. № 1. P. 50–68.
<https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2008.00302.x>
 97. *Kolchanov N.A., Titov I.I., Vlassova I.E. et al.* Chemical and computer probing of RNA structure // *Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.* 1996. V. 53. P. 131–196.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60144-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60144-0)
 98. *Slezak-Prochazka I., Durmus S., Kroesen B.J. et al.* MicroRNAs, macrocontrol: Regulation of miRNA processing // *RNA*. 2010. V. 16. № 6. P. 1087–1095.
<https://doi.org/10.1261/rna.1804410>
 99. *Gong J., Tong Y., Zhang H.-M. et al.* Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis // *Hum Mutat*. 2012. V. 33. № 1. P. 254–263.
<https://doi.org/10.1002/humu.21641>
 100. *Sun G., Yan J., Noltner K. et al.* SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function // *RNA*. 2009. V. 15. № 9. P. 1640–1651.
<https://doi.org/10.1261/rna.1560209>
 101. *Hill D.A., Ivanovich J., Priest J.R. et al.* DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma // *Science*. 2009. V. 325. № 5943. P. 965–965.
<https://doi.org/10.1126/science.1174334>
 102. *Nishikura K.* A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016. V. 17. № 2. P. 83–96.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2015.4>
 103. *Tomaselli S., Bonamassa B., Alisi A. et al.* ADAR Enzyme and miRNA Story: A Nucleotide that Can Make the Difference // *Intern. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 11. P. 22796–22816.
<https://doi.org/10.3390/ijms141122796>
 104. *Kawahara Y., Zinshteyn B., Sethupathy P. et al.* Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs // *Science*. 2007. V. 315. № 5815. P. 1137–1140.
<https://doi.org/10.1126/science.1138050>
 105. *Kawahara Y., Zinshteyn B., Chendrimada T.P. et al.* RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex // *EMBO Reports*. 2007. V. 8. № 8. P. 763–769.
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401011>
 106. *Zhang F., Lu Y., Yan S. et al.* SPRINT: an SNP-free toolkit for identifying RNA editing sites // *Bioinformatics* / Ed. Hofacker I. 2017. V. 33. № 22. P. 3538–3548.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx473>
 107. *Neilsen C.T., Goodall G.J., Bracken C.P.* IsomiRs – the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome // *Trends in Genetics*. 2012. V. 28. № 11. P. 544–549.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.07.005>
 108. *Starega-Roslan J., Galka-Marciniak P., Krzyzosiak W.J.* Nucleotide sequence of miRNA precursor contributes to cleavage site selection by Dicer // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 22. P. 10939–10951.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv968>
 109. *Li S., Patel D.J.* Drosha and Dicer: Slicers cut from the same cloth // *Cell Res*. 2016. V. 26. № 5. P. 511–512.
<https://doi.org/10.1038/cr.2016.19>
 110. *Ma M., Yin Z., Zhong H. et al.* Analysis of the expression, function, and evolution of miR-27 isoforms and their responses in metabolic processes // *Genomics*. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.08.004>
 111. *Yu F., Pillman K.A., Neilsen C.T. et al.* Naturally existing isoforms of miR-222 have distinct functions // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 19. P. 11371–11385.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx788>
 112. *Han B.W., Hung J.-H., Weng Z. et al.* The 3'-to-5' Exoribonuclease Nibbler Shapes the 3' Ends of MicroRNAs Bound to Drosophila Argonaute1 // *Curr. Biol.* 2011. V. 21. № 22. P. 1878–1887.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.034>
 113. *Liu N., Abe M., Sabin L.R. et al.* The exoribonuclease nibbler controls 3' end processing of microRNAs in *Drosophila* // *Curr. Biol.* 2011. V. 21. № 22. P. 1888–1893.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.10.006>
 114. *Norbury C.J.* Cytoplasmic RNA: a case of the tail wagging the dog // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. V. 14. № 10. P. 643–653.
<https://doi.org/10.1038/nrm3645>
 115. *Tan G.C., Dibb N.* IsomiRs have functional importance // *Malays J Pathol.* 2015. V. 37. № 2. P. 73–81.
 116. *McCall M.N., Kim M.-S., Adil M. et al.* Toward the human cellular microRNAome // *Genome Res.* 2017. V. 27. № 10. P. 1769–1781.
<https://doi.org/10.1101/gr.222067.117>
 117. *Ludwig N., Becker M., Schumann T. et al.* Bias in recent miRBase annotations potentially associated with RNA quality issues // *Sci. Reports*. 2017. V. 7. № 5162. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-05070-0>
 118. *Fromm B., Billipp T., Peck L.E. et al.* A uniform system for the annotation of vertebrate microRNA genes and

- the evolution of the human microRNAome // *Annual Rev. Genet.* 2015. V. 49. № 1. P. 213–242.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092023>
119. *Hou D., He F., Ma L. et al.* The potential atheroprotective role of plant MIR156a as a repressor of monocyte recruitment on inflamed human endothelial cells // *The J. Nutritional Biochem.* 2018. V. 57. P. 197–205.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.026>
120. *Fromm B., Kang W., Rovira C. et al.* Plant microRNAs in human sera are likely contaminants // *The J. Nutritional Biochem.* 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.07.019>

How Animal MiRNAs Structure Influences Their Biogenesis

P. S. Vorozheykin^{a, *} and I. I. Titov^{a, b}

^a*Computer Sciences Department, Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

^b*Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: pavel.vorozheykin@gmail.com*

MicroRNAs are small non-coding RNAs that are involved in the post-transcriptional regulation of the gene expression in various organisms. This article reviews recent advances in understanding the role of the primary and secondary structures of animal miRNA precursors through the biogenesis stages and the miRNA maturation steps. Also, we describe the effects of genetic variability and heterogeneity of miRNA ends, which play an important role in epitranscriptomics, as well as annotation errors in the miRNA databases.

Keywords: miRNA, pre-miRNA, secondary structure, biogenesis, mirtron, single nucleotide polymorphism, mutation, epigenetics.