

文章编号: 1004-0374(2010)07-0608-08

RNA 沉默的结构生物学研究进展

张 炜^{1,2}, 叶克穷^{1*}

(1 北京生命科学研究所, 北京 102206; 2 中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要: RNA 沉默指由长度约为 21 nt 的小 RNA 介导的特异的基因沉默机制, 它控制着许多基本的生命过程, 已经成为重要的生物技术手段, 在医学上也有巨大的应用价值。近些年对 RNA 沉默通路中蛋白结构的分析揭示了小 RNA 加工、运输、修饰和发挥功能过程中大量的分子细节, 发现很多 RNA 沉默蛋白能识别小 RNA 及其前体分子的特殊分子结构而实现对它们的操作。

关键词: RNA 干扰; 三维结构; 核酸酶 III; Argonaute; RNA 运输; RNA 甲基化

中图分类号: Q522; Q754 **文献标识码:** A

Progress in structural biology of RNA silencing

ZHANG Wei^{1,2}, YE Ke-qiong^{1*}

(1 National Institute of Biological Sciences, Beijing 102206, China; 2 College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: RNA silencing is a conserved gene regulation mechanism with specificity determined by small RNAs of ~21 nt. RNA silencing underlies many fundamental biological processes and has become an important technique for research and therapeutic application. Structural studies of RNA silencing components have revealed molecular details in the processing, transportation, modification and functioning of small RNAs and many unique protein-RNA recognition modes.

Key words: RNA interference; three-dimensional structure; RNase III; Argonaute; RNA transport; RNA methylation

RNA 沉默是由长度约为 21 个核苷酸的小 RNA 介导的特异的基因沉默机制^[1-4]。在大部分真核生物中都发现有小 RNA 的存在, 它们在动植物发育、细胞生长、维护基因组稳定、抵御病毒, 以及异染色质形成等过程中发挥重要作用, 这些现象常统称为 RNA 沉默。小 RNA 能在 mRNA 转录、翻译和降解等三种水平上抑制基因的表达。多种 RNA 沉默通路虽然在发生途径、功能和作用范围上存在差别, 但都包括相似的核心生化过程。这个过程一般由双链 RNA 触发, 双链 RNA 被核酸酶 III (RNase III) 切割后形成约 21 nt 大小的短双链 RNA, 然后其中一条向导链和 Argonaute (AGO) 蛋白组装形成 RNA 沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)。向导链 RNA 利用所携带的序列信息识别互补的靶 RNA 分子, 根据下游效应分子的差别, 而引发不同水平的效应。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是目前

生化过程研究最清楚的 RNA 沉默通路, 其中小 RNA 和 AGO 结合后形成序列特异的 RNA 内切酶, 定点切割互补的靶 RNA。RNAi 已经成为重要的抑制特异基因表达的技术, 在医学上也有巨大的应用价值。

根据生物发生过程和功能上的差别, 小 RNA 可分为三类 siRNA (small interfering RNA)、miRNA (microRNA) 和 piRNA (Piwi-interacting RNA)。图 1 显示了 siRNA 和 miRNA 在哺乳动物中的发生过程。

siRNA 来源于长的双链 RNA, 经过 RNase III Dicer 切割而成。siRNA 是 ~21 nt 的双链结构, 每条链的 5' 端有一个磷酸根, 3' 端有双核苷酸的单链

收稿日期: 2010-04-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863” 计划) (2008AA022310)

*通讯作者: E-mail: yekeqiong@nibs.ac.cn

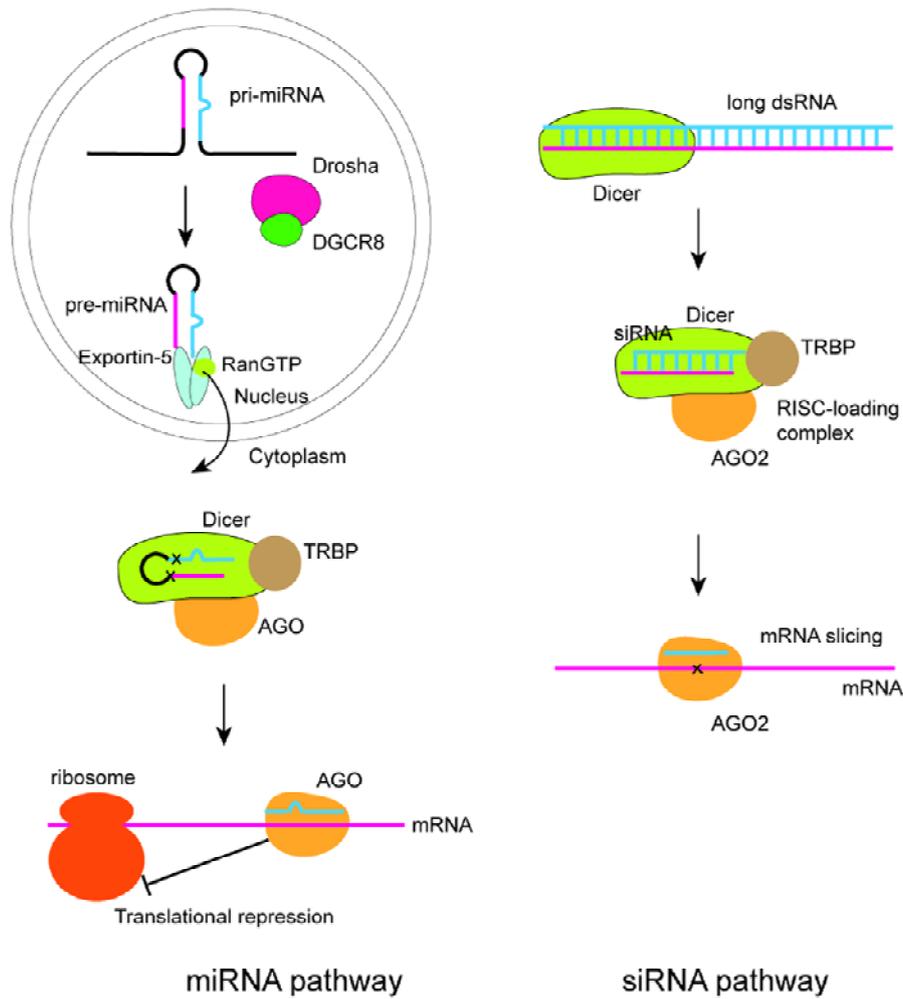


图1 哺乳动物miRNA和siRNA的发生过程

突出, 这样的末端结构是RNase III切割产物的标志特征。长双链RNA可以由正反方向的转录产物退火形成, 以及来源于病毒的双链RNA或在实验条件下人为引入。siRNA的一条链和AGO结合后行使向导功能, 这条链称为向导链 (guide strand), 而另一条链称为乘客链 (passenger strand)。siRNA通常作用于最初产生siRNA的源RNA, 引发其降解。

miRNA指由内源基因编码的长度在21 nt左右的单链RNA。miRNA的基因通过RNA聚合酶Pol II转录成miRNA前体(primary-miRNA, pri-miRNA), pri-miRNA形成的发夹结构在细胞核内被包含Drosha和DGCR8的microprocessor复合物切割成~70 nt的miRNA前体^[5-8] (precursor-miRNA, pre-miRNA)。pre-miRNA通过exportin-5运输到细胞质, 被Dicer进一步切割成短的双链结构miRNA-miRNA*。其中miRNA*指在发夹结构上和miRNA配对的反义链, miRNA*通常在胞内含量很低。

miRNA和AGO结合后, 以反式方式作用于其他基因的RNA。动物miRNA和靶分子mRNA的3'非翻译区(un-translated region, UTR)结合, 这种结合通常只局限于miRNA第2~8位的种子区(seed), 不能引发mRNA的切割, 仅抑制mRNA的翻译, 但目前还不清楚miRNA抑制翻译的分子机理。植物miRNA的作用方式和动物miRNA有较大差异, 植物miRNA通常和靶分子完全匹配, 引起mRNA的降解。植物中各种小RNA的3'端核糖被2'-O-甲基化, 该修饰起到稳定小RNA的作用。在miRBase最近的第15版数据库中收录940条人源miRNA(包括来源于重复基因的miRNA)。每个miRNA可以调节多个目的基因的表达, 据估计人体有超过30%的基因受miRNA的调控, 很多生物发育过程以及癌症等疾病的发生与miRNA的调节过程相关。

piRNA是长度为24~30 nt的单链RNA, 它和Argonaute的Piwi亚家族成员结合, 只存在于动物

的生殖细胞中。piRNA的生成不依赖Dicer, 而由Piwi蛋白相互切割产生。piRNA对生成配子细胞和维持生殖干细胞稳定性起着重要作用。piRNA功能可能是抑制转座子活性, 维护基因组稳定, 但目前还不清楚具体的机理。

在siRNA的成熟过程中, 由Dicer切割产生的双链中间体的一条链需要被转移到AGO中, 这个过程由RISC装载复合物(RISC-loading complex, RLC)完成。选择哪条链作为向导链并不是随机的, 而是由siRNA双链两端的热力学稳定性决定的(比如G-C比A-T碱基对更加稳定), 向导链5'端的热稳定性通常比乘客链的5'端的热稳定性低。另外miRNA-miRNA*中间体两端通常呈现不对称的热稳定性, miRNA具有更不稳定的5'端。在哺乳动物中发现Dicer、AGO2和TRBP三个蛋白形成复合物^[9-11], 这个复合物是目前发现的成分最清楚、功能最完整的RISC装载复合物, 能完成整个的RNAi生化反应; 它能把长链dsRNA切割成siRNA, 然后选取siRNA双链中的向导链和AGO2结合, 最后形成的AGO2-RNA复合物能催化靶RNA的降解。

小RNA的产生机制以及它们如何与蛋白质相互作用共同发挥功能是RNA沉默领域的核心生化问题。本文将讨论近些年针对小RNA通路组分的结构生物学研究成果, 以及三维结构信息对认识小RNA生成以及工作机理的意义。

1 核酸酶III的结构

核酸酶III是一类切割双链RNA的内切酶, 它可分三种类型: 最简单的细菌RNase III以及真核生物里更复杂的Dicer和Drosha。细菌RNase III包含一个R3结构域和一个C端的双链RNA结合结构域(dsRNA-binding domain, dsRBD)。Drosha和Dicer是siRNA和miRNA生成过程中的关键加工酶。Dicer能切割长链dsRNA, 生成~21 nt长度的siRNA。miRNA的生成过程需要Drosha和Dicer依次对miRNA基因转录产物进行加工。在高等真核生物中Dicer是个很长的蛋白, 由约2 000个氨基酸残基组成, 从N端至C端通常包含解旋酶结构域、DUF283结构域、2个R3结构域和1~2个dsRBD结构域。Drosha含有1个功能未知的N端结构域、2个R3结构域和1个dsRBD结构域。

对RNase III蛋白催化机理的认识主要来自于对细菌RNase III的研究(图2)。细菌RNase III通过R3结构域形成分子间同源二聚体^[12]。每个亚基含有

多个保守的酸性氨基酸, 它们和结合的二价镁离子构成催化中心, 两个催化中心分别对dsRNA的两条链进行切割, 产生具有3'端两核苷酸突出的末端结构^[13, 14]。dsRBD结构域在不结合底物时是活动的, 结合dsRNA后包裹在dsRNA两侧。

目前惟一的完整Dicer的结构是Doudna实验室解析的来源于低等真核生物*Giardia intestinalis*的Dicer晶体结构^[15]。*Giardia* Dicer较高等生物Dicer的序列要简单许多, 只含有PAZ结构域、两个R3结构域和N端的平台(platform)结构域。*Giardia* Dicer形成了“斧头状”的结构(图2), 两个连续的R3结构域形成分子内二聚体, 组成了“斧头面”; 剩下部分组成“斧柄”, 其中平台结构域和一个 α 螺旋连接着PAZ结构域与R3结构域。Dicer R3结构域分子内二聚体的结构和细菌RNase III分子间二聚体的结构类似, 说明它们切割底物的机理也是相同的。我们还构建了*Giardia* Dicer结合底物的结构模型以解释决定产物特定长度的机理。我们推测PAZ结构域和dsRNA底物一端的3'双核苷酸突出结合, PAZ结构域与R3催化中心之间的距离决定了产物的长度。在*Giardia* Dicer中这个距离大约可以容纳25个碱基对的dsRNA, 这与其切割的生化特性相符。PAZ和R3平台之间连接区域长度的变化可能导致不同Dicer的产物具有各自特征性的长度。

DUF283结构域曾被认为和*Giardia* Dicer中的平台结构域结构类似, 也连接PAZ和R3结构域^[15]。但是最近拟南芥DCR4 DUF283的结构显示这个结构域折叠成类似dsRBD的结构。相关生化实验还表明, DUF283介导与DRB4蛋白的相互作用^[16]。现在尚不清楚高等真核生物Dicer和*Giardia* Dicer在整体结构方面的相似程度有多大。

miRNA加工过程的第一步由Drosha执行, 它对pri-miRNA的发夹结构定点切割生成pre-miRNA^[5]。Drosha对底物的精确识别还需要和DGCR8形成microprocessor复合物^[6-8]。生化研究表明, microprocessor能识别pri-miRNA发夹结构和两端的单链区, 使切割发生在距离pre-miRNA单链和双链结合部上方第11个碱基对的位置^[17]。目前对Drosha和DGCR8复合物的结构还了解很少, 只有最近解析的部分DGCR8的晶体结构, 结构说明DGCR8 C端包含两个相互堆积的dsRBD结构域^[18]。

2 Argonaute 的结构

AGO蛋白是RISC复合体中的核心组分, 所有

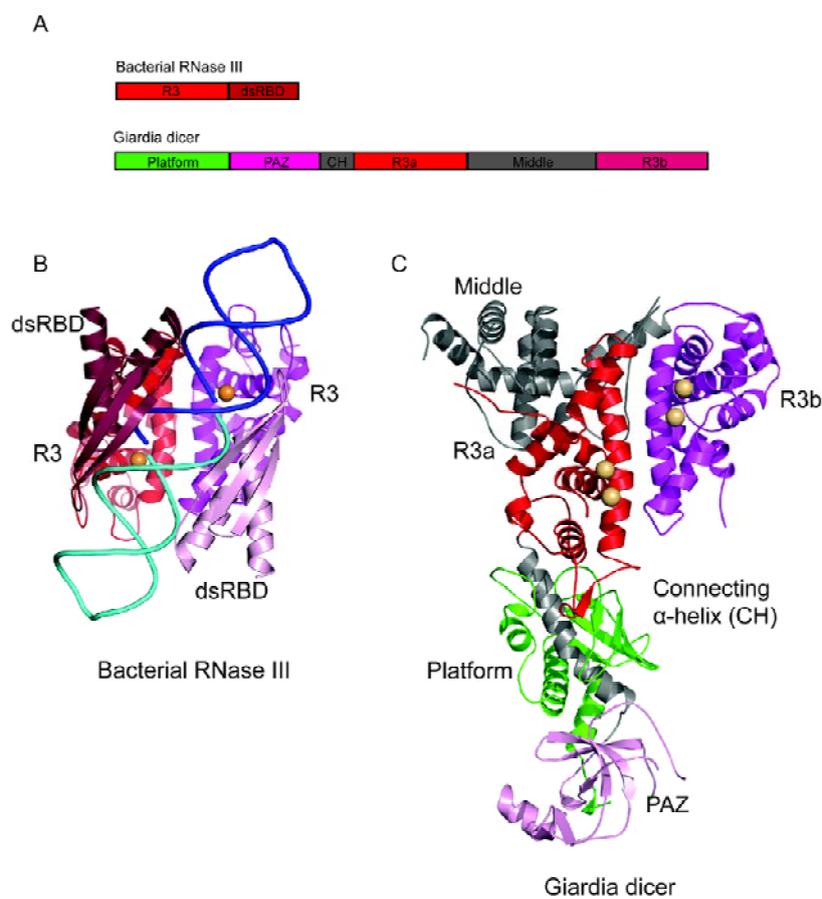


图2 细菌 RNase III 和 Giardia Dicer 的结构

A: 细菌 RNase III 和 Dicer 结构域组成; B: 细菌 RNase III 二聚体和 RNA 复合物的晶体结构 (PDB: 2EZ6), 小球表示位于活性中心的二价离子; C: Giardia Dicer 的晶体结构 (PDB: 2FFL)

小 RNA 都和它结合进而和互补的靶 RNA 配对, 引发下游效应。在 siRNA 介导的 RNAi 过程中, AGO 是剪切靶 mRNA 的内切核酸酶, 剪切需要向导链与底物 RNA 完全配对。AGO 对底物进行位置特异的切割, 以向导链 5' 端为起始点计算, 切割位点在和向导链第 10 和 11 碱基配对的底物 RNA 两个碱基之间 (图 3A)。

在少数几个嗜热细菌 (如 *Aquifex aeolicus*, *Thermus thermophilus*) 和古细菌 (如 *Pyrococcus furiosus*, *Archaeoglobus fulgidus*) 中也发现有 AGO 的类似蛋白, 虽然我们还不了解它们的功能和在进化上的起源, 但是因为这些蛋白有良好的表达能力和生化性质, 我们对 AGO 三维结构的了解大部分来源于对这些原核生物 AGO 的研究。

第一个完整 AGO 的结构来源于 *P. furiosus*, 该结构揭示了 AGO 由 N、PAZ、MID 和 PIWI 四个结构域组成^[19]。其中 MID 和 PIWI 结构域紧密联系,

构成独立的一半, 而 N 和 PAZ 结构域构成另外一半。随后的多个 AGO 结构表明, 这两半在不同功能态下可以相对活动, 另外 PAZ 和 N 结构域之间相对位置也不固定。PIWI 和 RNase H 有相似的结构和保守的天冬氨酸和谷氨酸, 这些残基在 RNase H 中和镁离子结合, 催化 RNA 的剪切, 这些相似点提示 PIWI 有类似 RNase H 核酸酶的活性。这个完整 AGO 的结构和针对哺乳动物 AGO2 的相关实验确立了 AGO 是 RNAi 过程的切割中心^[19,20]。RNase H 切割 DNA: RNA 杂交分子中的 RNA 链, 而真核 AGO 的底物是小 RNA 和靶 RNA 形成的 RNA 双链。

PAZ 是 AGO 和 Dicer 特有的结构域, PAZ 和 siRNA 类似物复合物的结构显示 PAZ 结构域结合向导链 RNA 的 3' 末端^[21]。在 *A. fulgidus* 中有个只包含 MID 和 PIWI 结构域的蛋白叫 afPiwi, afPiwi 和双链 RNA 复合物的结构揭示了 AGO 识别向导链 5' 端以及定点切割底物的机理^[22,23]。向导链的 5' 端磷酸

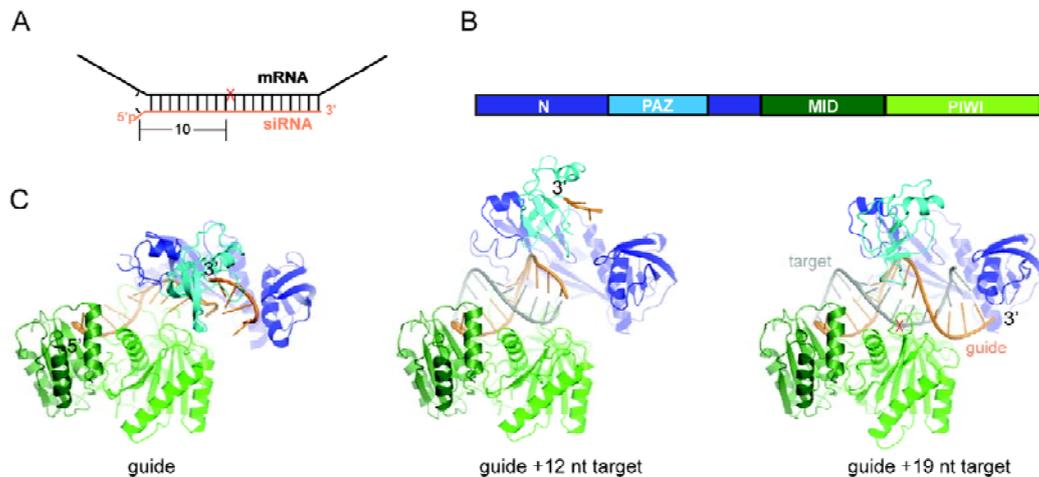


图3 Argonaute的结构

A: siRNA 识别目的 RNA 的示意图, X 表示切割位点; B: AGO 的结构域组成; C: *T. thermophilus* AGO 和向导链、靶链复合物的晶体结构。从左到右依次是 AGO 和向导链二元复合物结构 (PDB: 3DLH), AGO、向导链和 12 nt 底物形成的三元复合物的结构 (PDB: 3H01), AGO、向导链和 19 nt 底物形成的三元复合物的结构 (PDB: 3HK2)。这三个结构的 MID 和 PIWI 结构域经过叠合, 有一致的显示角度。在底物结合和延伸过程中, N 和 PAZ 结构域发生明显位移

根结合在 MID 和 PIWI 结构域的交接处, 一个螯和的镁离子介导了重要的相互作用。向导链的第一个碱基并不参与与靶链的配对, 而是翻转出来和 MID 结构域的一个口袋结合。靶链和向导链形成双螺旋向 PIWI 结构域延伸, 向导链 5' 端和催化中心之间的距离正好容纳 9 个碱基对, 这个距离决定了靶链上切割位点的位置。

在拟南芥中发现不同 AGO 蛋白所结合的 miRNA 的 5' 端碱基有明显的倾向性^[24, 25], 比如 AGO1 通常结合 U 起始的 miRNA, AGO2 喜欢 A 起始的 miRNA, 这种倾向性可能和某些 AGO 能识别向导链 5' 端第一个碱基有关。

Patel 实验室解析了一系列 *T. thermophilus* AGO 完整蛋白和核酸复合物的结构^[26-28]。这些结构中使用 DNA 作为向导链, 因为生化实验表明原核生物 AGO 利用 DNA 作为向导链切割匹配的 RNA^[23, 29]。在没有底物结合时, 向导链的 5' 端和 3' 端分别结合于 MID 和 PAZ 结构域^[26]。向导链的第 2~10 个碱基保持着类似螺旋的构象, 这种开放的构象可能有利于目的 RNA 结合。Patel 实验室随后解析了一个 AGO、向导链和底物三元复合物, 其中底物 RNA 在 10~11 位含有不配对的碱基以阻止 AGO 的切割^[27]。这个结构显示向导链的 5' 端和 3' 端还是分别结合于 MID 和 PAZ 结构域, 2~8 位种子区域和底物形成典型的 A 型双螺旋构象, 而靠近向导链 3' 端的大部分区域的向导链和底物在晶体中不可见。由于底物和向导链

在切割位点附近的双螺旋结构受到破坏, 这个结构无法反映 AGO 在切割时的活性构象, 可能模拟了动物 miRNA 和靶 RNA 在种子区结合时的情形。

2009 年, Patel 实验室利用 AGO 活性位点突变体解析了 AGO、向导 DNA 和不同长度 (12、15 和 19 nt) 完全匹配的底物 RNA 形成的三元复合体的晶体结构, 这些结构完美的捕捉到底物 RNA 和向导链形成的双螺旋在种子区成核、向末端延伸的动态过程^[28] (图 3C)。当长为 12 nt 的底物 RNA 与向导链结合后, 两者形成了 11 个碱基对的双螺旋, 这时向导链 3' 端仍结合于 PAZ 结构域, 和底物结合之前的构象类似。当底物 RNA 的长度增长到 15 nt, 双螺旋的长度增长到 14 bp (对应于向导 DNA 第 2~15 位), 这模拟了双螺旋结构继续向向导链 3' 端延伸的过程。此时向导链和底物形成的双螺旋结构覆盖在 PIWI 结构域的催化位点, 接近被切割时的构象。重要的是, 随着底物 RNA 和向导链进一步结合, PIWI 结构域上 RNA 结合区的构象发生了显著变化, 整个 PAZ 结构域发生翻转, 向导链的 3' 末端也脱离了 PAZ 结构域。当底物 RNA 的长度增长到 19 nt 时, 双螺旋的长度为 15 bp (对应于向导 DNA 第 2~16 位)。这个 19 nt 底物复合物的结构和 15 nt 底物复合物的结构十分相似, 双螺旋长度仅仅延长了 1 个碱基对, 这是因为在向导 DNA 的第 16 位, AGO 蛋白的 N- 端结构域与双螺旋的末端相互堆积, 抑制了双螺旋的进一步延伸。

对于向导链如何结合底物RNA的问题存在过两种观点^[29-31]。一种观点认为向导链和底物RNA结合过程中, 向导链5'和3'两端始终与MID和PAZ结构域结合(末端固定模型); 另一种观点认为随着向导DNA和底物RNA配对向3'末端延伸, 向导链的3'端需要脱离PAZ结构域, 以释放双螺旋形成所造成的阻力(二态模型); AGO和15/19 nt底物形成的复合物的结构为二态模型提供了充分的证据。

由于活性位点的突变会影响二价离子的结合, Patel实验室还解析了野生型AGO、向导链和19 nt底物形成的复合物的结构^[28]。虽然此时AGO有完整的活性位点, 底物RNA在晶体里却没有被切割。结构显示在50 mmol/L Mg^{2+} 条件下活性位点结合一个镁离子, 在更高的80 mmol/L Mg^{2+} 条件下活性位点结合两个镁离子。AGO活性位点镁离子的构型说明AGO和其他RNase H催化机制是一致的^[32]。

3 miRNA 前体出核运输的结构机制

miRNA的加工分为细胞核和细胞质两个阶段, 中间产物pre-miRNA需要通过exportin-5转运到细胞质, 然后继续加工成为成熟的miRNA^[33]。exportin-5通过小GTPase酶Ran来调节pre-miRNA的结合和解聚。在细胞核内, Ran结合GTP形成RanGTP,

然后在RanGTP存在的情况下, pre-miRNA、exportin-5和RanGTP形成三元复合物, 穿过核孔复合体。在细胞质中, GTP的水解触发pre-miRNA的释放。

最近Okada等^[34]解析了exportin-5、RanGTP和pre-miR-30a形成的三元复合物的晶体结构, 详细地解释了pre-miRNA被转运复合物识别的机理(图4)。exportin-5由20个连续的HEAT重复序列构成, 每个HEAT重复序列含约40个残基, 折叠成含两个 α -螺旋的发夹结构。exportin-5和RanGTP形成了一个类似于“棒球手套”的结构把pre-miRNA茎部包裹在内部。pre-miRNA在晶体中的可见部分包含由22个碱基对形成的茎部双螺旋和3'末端双核苷酸单链突出, 茎环顶端的结构和蛋白质没有接触, 在晶体里也不可见。“棒球手套”结构的内表面分布着大量带正电的碱性氨基酸, 它们和RNA磷酸骨架相互作用。RanGTP只有两个赖氨酸和RNA有作用, 但RanGTP和exportin-5有广泛接触, 这种接触可能帮助exportin-5形成能结合RNA的构象。这个结构还显示了exportin-5对RNA 3'末端单链突出的识别方式: exportin-5的第12~15 HEAT重复序列形成了一个凹槽, 和pre-miRNA 3'端双核苷酸突出形成大量的氢键、盐键及碱基堆积等作用。exportin-5

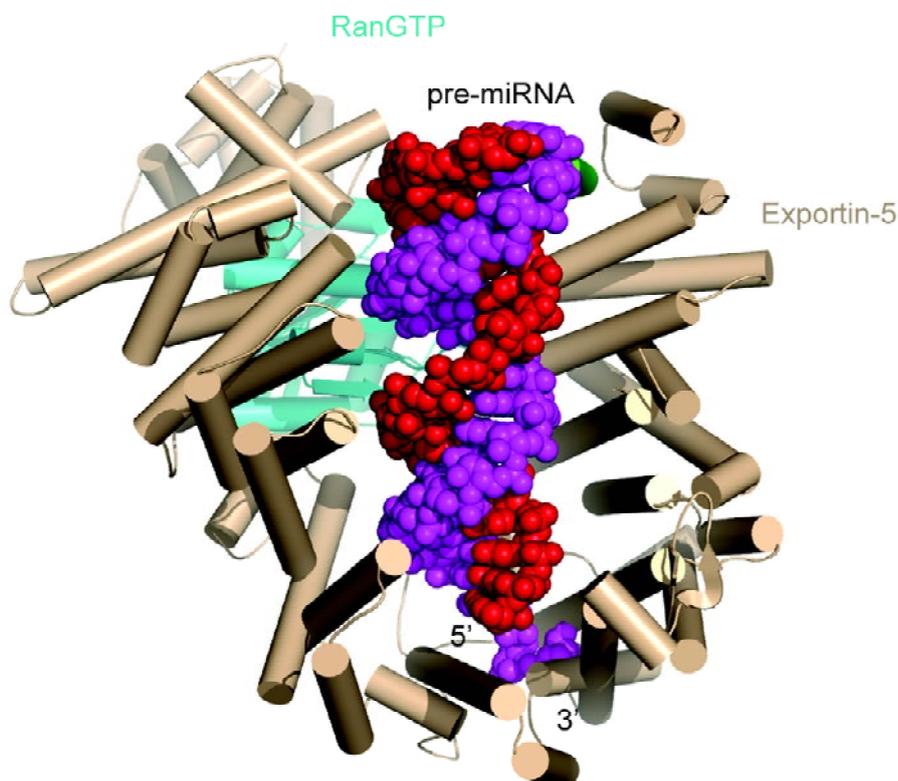


图4 Exportin-5、RanGTP和pre-miRNA形成的复合物的晶体结构(PDB: 3A6P)

还能转运 tRNA、人的 Y1 RNA 和腺病毒的 VA1 RNA 等其他有结构的 RNA，这些 RNA 都有一个 3' 单链区，这说明 3' 单链区是 RNA 被 exportin-5 识别的重要结构特征。exportin-5 和 pre-miRNA 的相互作用不涉及对碱基的特异识别，所以 exportin-5 可以转运序列各异但结构类似的 RNA。

4 小 RNA 末端甲基化的结构机制

HEN1 催化植物小 RNA 的 3' 末端核糖 2' 羟基的甲基化^[35,36]，这种修饰有利于维持植物小 RNA 的稳定性^[37]。拟南芥 HEN1 只能识别长度为 19~22 bp 含有 3' 双核苷酸突出的双链 RNA，对单链 RNA 没有催化活性^[36]。拟南芥 HEN1 和双链 RNA 复合物的晶体结构揭示了 HEN1 识别双链结构和催化甲基转移的机理^[38] (图 5)。HEN1 从 N 端到 C 端依次包括 dsRBD1 结构域、La-containing domain (LCD) 结构域、dsRBD2 结构域、PPIase-like domain (PLD) 结构域和甲基化酶结构域 (MTase)。两个 dsRBD 将 RNA 的双链区包裹，而甲基化酶结构域和 LCD 中的 La motif 分别封闭住 RNA 的两端，这种紧密的包裹限制了 HEN1 底物长度在 21~24 nt 之间。甲基化酶结构域催化位点只能容纳单链 RNA 的 3' 末端，解释了底物被甲基化末端单链结构的重要性^[36]。

和以往的依赖于 Ado-Met (腺苷甲硫氨酸) 的甲基

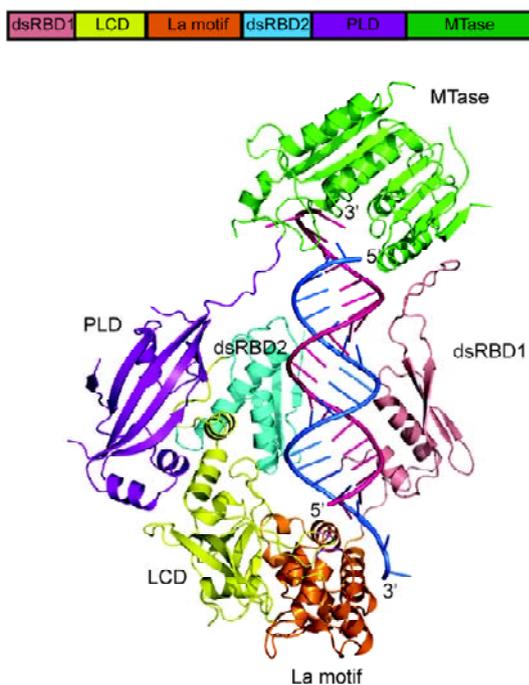


图 5 HEN1 的结构域组成、HEN1 和双链 siRNA 复合物的晶体结构 (PDB: 3HTX)

转移酶不同，HEN1 的活性中心还包含了 1 个镁离子，该镁离子和 RNA 3' 末端核糖的 2' 和 3' 羟基，以及其他 4 个保守残基 (Glu796、Glu799、His800 和 His860) 形成了 6 个螯合键。生化实验显示金属螯合剂和上述 4 个残基任何一个突变都使 HEN1 失去催化活性，这说明镁离子对甲基化反应的重要性。

细菌的 HEN1 同源蛋白能催化单链 RNA 的 3' 末端甲基化，最近晶体结构表明它们和植物 HEN1 有结构很相似的甲基化酶结构域^[39]。动物的 piRNA 也有类似的 3' 末端甲基化修饰^[40,41]。动物 HEN1 同源蛋白只包含 N-端甲基化酶结构域和另外一个未知功能的结构域，它的底物是和 Piwi 蛋白结合的 piRNA，而对双链 RNA 没有催化活性^[40,41]。阐明动物 HEN1 识别底物的机理有待于进一步的结构研究。不同类型 HEN1 的催化结构域序列相当保守，但是在其他区域存在巨大差别，这些差异可能源于它们需要识别不同结构的底物。

5 展望

近些年对 RNA 沉默通路的结构生物学研究取得了重要进展，这些三维结构信息揭示了有关小 RNA 生物发生和行使功能的大量分子细节，这些知识有助于在生物研究和医学应用领域更好的利用 RNAi 技术。但是目前高等真核生物 AGO、Dicer 和 Drosha 的结构信息还很少，我们期待未来在这方面的研究会有所突破。哺乳动物的 RISC 装载复合物 (AGO2-Dicer-TRBP) 能完成完整的 RNAi 生化反应，对这个复合物深入的结构研究将有助于阐明 siRNA 合成、向导链选择、AGO 装载和行使功能各个过程之间的偶联机制。小 RNA 和 AGO 复合物在真核生物中介导多种生物效应，这是通过结合其他效应分子实现的，研究 AGO 和各种效应分子结合的结构将有助于我们理解 RNA 沉默的功能多样性。

[参 考 文 献]

- [1] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136(4): 642-55
- [2] Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 2009, 457(7228): 405-12
- [3] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(2): 126-39
- [4] Malone CD, Hannon GJ. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell*, 2009, 136(4): 656-68
- [5] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, 425(6956): 415-9

- [6] Han J, Lee Y, Yeom KH, et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, 2004, 18(24): 3016-27
- [7] Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, et al. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 2004, 432(7014): 235-40
- [8] Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, et al. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature*, 2004, 432(7014): 231-5
- [9] Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 2005, 436(7051): 740-4
- [10] Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 2005, 123(4): 631-40
- [11] MacRae IJ, Ma E, Zhou M, et al. *In vitro* reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(2): 512-7
- [12] Blaszczyk J, Tropea JE, Bubunenko M, et al. Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure*, 2001, 9(12): 1225-36
- [13] Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, et al. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 2004, 118(1): 57-68
- [14] Gan J, Tropea JE, Austin BP, et al. Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Cell*, 2006, 124(2): 355-66
- [15] Macrae IJ, Zhou K, Li F, et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*, 2006, 311(5758): 195-8
- [16] Qin H, Chen F, Huan X, et al. Structure of the *Arabidopsis thaliana* DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein-protein interaction. *RNA*, 2010, 16(3): 474-81
- [17] Han J, Lee Y, Yeom KH, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 2006, 125(5): 887-901
- [18] Sohn SY, Bae WJ, Kim JJ, et al. Crystal structure of human DGCR8 core. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(9): 847-53
- [19] Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 2004, 305(5689): 1434-7
- [20] Liu JD, Carmell MA, Rivas FV, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 2004, 305(5689): 1437-41
- [21] Ma JB, Ye K, Patel DJ. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 2004, 429(6989): 318-22
- [22] Parker JS, Roe SM, Barford D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*, 2005, 434(7033): 663-6
- [23] Ma JB, Yuan YR, Meister G, et al. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, 2005, 434(7033): 666-70
- [24] Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, et al. Specificity of ARGONAUTE7-mir390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell*, 2008, 133(1): 128-41
- [25] Mi S, Cai T, Hu Y, et al. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, 2008, 133(1): 116-27
- [26] Wang Y, Sheng G, Juranek S, et al. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature*, 2008, 456(7219): 209-13
- [27] Wang Y, Juranek S, Li H, et al. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature*, 2008, 456(7224): 921-6
- [28] Wang Y, Juranek S, Li H, et al. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature*, 2009, 461(7265): 754-61
- [29] Yuan YR, Pei Y, Ma JB, et al. Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell*, 2005, 19(3): 405-19
- [30] Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev*, 2005, 19(5): 517-29
- [31] Filipowicz W. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell*, 2005, 122(1): 17-20
- [32] Nowotny M, Gaidamakov SA, Crouch RJ, et al. Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: substrate specificity and metal-dependent catalysis. *Cell*, 2005, 121(7): 1005-16
- [33] Lund E, Guttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004, 303(5654): 95-8
- [34] Okada C, Yamashita E, Lee SJ, et al. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science*, 2009, 326(5957): 1275-9
- [35] Yu B, Yang Z, Li J, et al. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 2005, 307(5711): 932-5
- [36] Yang Z, Ebright YW, Yu B, et al. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(2): 667-75
- [37] Li J, Yang Z, Yu B, et al. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2005, 15(16): 1501-7
- [38] Huang Y, Ji L, Huang Q, et al. Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature*, 2009, 461(7265): 823-7
- [39] Mui Chan C, Zhou C, Brunnelle JS, et al. Structural and biochemical insights into 2'-O-methylation at the 3'-terminal nucleotide of RNA by Hen1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(42): 17699-704
- [40] Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, et al. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev*, 2007, 21(13): 1603-8
- [41] Horwich MD, Li C, Matranga C, et al. The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol*, 2007, 17(14): 1265-72