

文章编号: 1004-0374(2010)07-0628-06

基因表达调控多面手——microRNA 和 siRNA 的作用机制

赵 雅, 吴立刚*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,
分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要: miRNA (microRNA) 是一类广泛存在于高等真核细胞中的长度约为 21 个碱基的小分子非编码 RNA, 参与调控三分之一以上基因的表达, 并与多种人类疾病存在重要关联。而 siRNA (small interfering RNA) 是 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 中的效应分子, 其结构和作用机制与 miRNA 存在许多类似之处。由于 miRNA 和 siRNA 具有重要的生物学功能。因此, 对它们作用机制的理解具有非常重要的理论意义和应用指导价值。该综述将对它们作用机制的研究进展做一总结和回顾。

关键词: miRNA; siRNA; 非编码 RNA; 作用机制

中图分类号: Q52; Q95

文献标识码: A

Multiple mechanisms of gene expression regulation by microRNA and siRNA

ZHAO Ya, WU Li-gang*

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological
Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Most of the eukaryotic organisms encode numerous small non-coding RNAs (ncRNAs), which control the expression of thousands of genes and participate in almost every biology process. However, the mechanistic details of how these small oligonucleotides inhibit or stimulate their target gene production are still lacking. Recent studies have uncovered various mechanisms by which microRNA (miRNA) and small interfering RNA (siRNA) affect their target mRNA post-transcriptionally or transcriptionally. This review will focus on the current understanding of the regulatory mechanisms by miRNA and siRNA in animals.

Key words: miRNA; siRNA; non-coding RNA; mechanism

在很长一段时间里, RNA 被认为仅仅是 DNA 和蛋白质之间的“过渡”, 一如其在中心法则中的“位置”。随着对基因表达调控研究的深入, 越来越多的证据表明, RNA 在生命过程中扮演的角色远比我们早先设想的重要。除了负责编码蛋白质的 mRNA, 真核生物的基因组中还存在大量非编码序列, 并且这些非编码序列在基因组中所占的比例也随着物种的进化而急剧增加。近期的研究发现, 基因组中绝大多数的非编码序列都可以被转录, 产生大量的非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA), 对

基因的表达调控和功能执行起到举足轻重的作用。特别是包括 microRNA (miRNA) 和 siRNA (small interfering RNA) 在内的小分子非编码 RNA, 更是成为 RNA 家族新涌现的“明星分子”, 屡获科学界大奖的青睐, 使得 RNA 大有从中心法则的“中间”跃居“中心”之势。在此我们将对两类具有代表

收稿日期: 2010-05-05; 修回日期: 2010-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30970618)

*通讯作者 E-mail: lgwu@sibs.ac.cn

性的小分子非编码RNA——miRNA和siRNA在动物中的作用机制做一综述。

1 miRNA的作用机制

miRNA是一类长度约为21个碱基的小分子非编码RNA。包括人类和哺乳动物在内的大部分真核生物的基因组都编码数百种miRNA,并且在不同组织和发育阶段,miRNA的表达水平具有显著差异,呈现出明显的时空特异性。目前认为miRNA直接调控基因组中三分之一以上基因的表达,参与了细胞增殖、分化、凋亡和代谢等几乎所有的生命过程。同时,越来越多的证据表明,miRNA的表达异常与包括癌症、心血管疾病、病毒感染在内的多种疾病的发生发展密切相关^[1]。因此,对miRNA作用机制的理解具有非常重要的理论意义和应用指导价值。

大部分miRNA的产生首先是由细胞核内的RNA聚合酶II转录出一个包含茎环结构的初级前体(pri-miRNA),pri-miRNA的长度从数百到数万个碱基不等,并且具有帽子结构和多聚腺苷酸尾巴(poly(A) tail)。而少数种类的pri-miRNA则由RNA聚合酶III转录产生。pri-miRNA产生后,在核内被III型核酸内切酶Drosha及其辅助因子DGCR8(人类中为DGCR8蛋白、果蝇中为Pasha蛋白)所识别,并在距离pri-miRNA茎环结构中单/双链结构分界点约11个碱基处被剪切,形成长度约为70个碱基的miRNA前体(pre-miRNA)。pre-miRNA通常具有茎环结构,在切口的3'端留有2~3个核苷酸的悬垂,这种结构特征可以被核内的转运蛋白Exportin5识别,通过Ran-GTP依赖性的机制,pre-miRNA被转运到细胞质中,在另一种III型核酸内切酶Dicer及其辅助因子TRBP的共同作用下剪切加工成约21个碱基长度的miRNA:miRNA*双链^[1]。这种双链miRNA分子很快与包括Argonaute(Ago)蛋白在内的其他多种蛋白质结合,形成RNA诱导的沉默复合体RISC(RNA-induced silencing complex),又称为miRNP(microribonucleoprotein)。miRNA:miRNA*双链中5'端碱基配对稳定性较低的链被保留,成为成熟体miRNA;另一条链(miRNA*)则通常迅速被降解^[2]。最新的研究表明,miRNA的前体加工还存在不依赖于Dicer的其他途径,例如pre-miR-451可以形成特殊的二级结构,直接被Ago2所识别并切割加工形成成熟体miRNA^[3,4]。

成熟体miRNA与多种蛋白质因子结合组装形成RISC复合体后,通过碱基互补配对识别靶标

mRNA,并在更多蛋白质因子的参与下调控基因的表达。已知的miRNA的靶位点大多位于mRNA的3'非翻译区,但有一些报道表明,miRNA也可以与位于mRNA编码区的靶位点结合,如在肿瘤细胞中,miR-24可以作用于FAF1的编码区而调控细胞凋亡^[5]。目前已知绝大多数miRNA主要通过抑制翻译和引发mRNA降解这两种机制发挥调控功能。翻译抑制是最先被发现的miRNA作用机制,但一直缺乏明确和统一的模型。多个研究组的实验证据表明,miRNA主要在翻译的起始阶段发挥抑制作用,如通过与翻译起始复合物竞争mRNA的5'帽子结构^[6,7],或是影响核糖体大小亚基的聚合^[8]等。然而,也有实验证据表明,miRNA亦能在翻译的其他阶段起作用,如减缓核糖体在翻译中的移动速度^[9]、促进新生多肽链的共翻译降解^[10]或促进核糖体的提早解离等^[11]。研究结果的多样性提示我们,在不同的发育阶段和细胞类型中,或对于不同的靶标mRNA,miRNA可能通过不同的机制发挥作用。

虽然早期的报道认为miRNA仅在mRNA翻译水平上抑制基因的表达,但随后的研究证据表明,miRNA也可以直接影响mRNA的稳定性,该机制同样是miRNA调节基因表达的重要方式之一。miRNA可以加速脱去靶基因mRNA上3'末端的多聚腺苷酸尾巴(poly(A) tail),直接导致poly(A)结合蛋白PABPC1的逐步丢失,并促进脱帽酶DCP1和DCP2对mRNA 5'端帽子结构(m⁷GpppN)的切除,最终导致mRNA失去5'和3'端的保护而被核酸外切酶迅速降解。其中,脱腺苷酸化(deadenylation)是整个mRNA降解过程中关键性的第一步,也是其限速步骤。在果蝇和哺乳动物细胞中的研究都表明CCR4-NOT复合体中的CAF1是催化该过程的关键核酸酶^[12,13]。miRNA可能通过Ago蛋白直接招募CAF1^[14],也可能通过RISC结合在mRNA上改变mRNP的结构和功能^[13],从而促进mRNA的降解。

那么miRNA介导的翻译抑制和mRNA降解这两种作用机制之间的关系如何呢。目前大多数实验证据认为两者是相互独立的过程。在哺乳动物细胞中进行的体内实验显示,在mRNA的5'非翻译区引入一个稳定的茎环结构阻碍其翻译后,并不影响miRNA加速mRNA的脱腺苷酸化和降解;反之,以组蛋白mRNA 3'末端茎环结构替代poly(A)尾巴后,miRNA虽然不能加速mRNA的脱腺苷酸化,但仍然可以抑制翻译^[15]。在以果蝇胚胎和人类细胞胞浆提取物进行的体外实验中,使用人造帽子类似

物替代 mRNA 5' 端天然帽子或利用小分子化合物阻断 mRNA 翻译之后, miRNA 仍能有效促进 mRNA 的脱腺苷酸化和降解^[16, 17]。不仅如此, 这两种作用机制引起的后果也有本质区别: mRNA 降解是不可逆的调控方式, mRNA 一旦被降解就永远消失了; 而翻译抑制是可逆的调控方式, 翻译被抑制的 mRNA 在抑制作用被解除后可以重新进行翻译。例如, 在正常生理条件下, CAT-1 mRNA 的翻译被肝脏特异性表达的 miR-122 抑制, mRNA 被运输并储存在 P body 中。当外界生理条件发生改变时, CAT-1 mRNA 可以在 HuR 蛋白的作用下从 P body 中被释放出来并重新开始翻译^[18]。正是由于 miRNA 引发的翻译抑制和 mRNA 降解是相互独立、不为因果关系的两种作用机制, 因而它们产生的作用效果具有累加效应。通过可逆和不可逆的这两种不同作用机制的组合, miRNA 可以更为有效和灵活地完成真核生物中复杂的基因表达调控功能。

2 siRNA 的作用机制

siRNA 是随着 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)而成名的一类长约 21 个碱基的小分子 RNA。RNA 干扰最早是在线虫中发现的一种由双链 RNA 引发的基因沉默现象, Andrew Z. Fire 和 Craig C. Mello 因此于 2006 年被授予诺贝尔生理学或医学奖。后来的研究证实不论是长的双链 RNA(double-strand RNA, dsRNA) 或小发夹 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 最后都要被 Dicer 加工成 21 个碱基长度的功能性双链小 RNA——siRNA。siRNA 在细胞质内与包括 Ago 在内的相关蛋白质因子结合形成 RISC 复合体, 通过碱基配对识别靶标 RNA。在镁离子和 ATP 的参与下, Ago 蛋白利用其核酸内切酶活性切割与之完全互补配对的靶标 RNA, 产生具有 5' 磷酸基和 3' 羟基末端的 mRNA 片段, 使之更易受到 5' 或 3' 核酸外切酶的攻击而快速降解。这种机制即是通常所说的 RNA 干扰。

随着对 RNA 干扰现象认识的深入, 目前认为 siRNA 与 miRNA 的区别主要在于它们的来源不同: 通常 siRNA 由外源引入, 而 miRNA 由基因组编码并转录产生。在作用机制上 siRNA 与 miRNA 则非常类似, 同样存在多种作用方式, 具体采用哪种机制由其与靶标 mRNA 上识别位点的互补程度而决定^[19-21]。当 siRNA 与靶位点序列完全互补配对时, RISC 中的 Ago2 直接切割靶标 mRNA, 导致其被快速降解^[22]。而当 siRNA 与靶位点序列不完全互补配对时, 则与

miRNA 类似, 可以介导翻译抑制和加速 mRNA 脱腺苷酸化和降解^[23], 被称作 RNA 干扰的脱靶现象(off-target)^[24]。在运用 RNA 干扰技术沉默特定靶标基因时常会发生脱靶现象, 这是目前 RNA 干扰领域亟待解决的难题之一。

miRNA 与靶标 mRNA 完全互补配对的情况多见于植物中, 且靶位点常常位于转录因子 mRNA 的蛋白质编码区内。而在动物体内, 绝大多数 miRNA 只与靶位点部分互补配对, 因而不会介导靶标 mRNA 的直接切割。哺乳动物中 miRNA 通过类似 RNA 干扰机制发挥功能的, 目前仅在小鼠中发现 miR-196 对 HoxB8 基因的调控这一例^[25]。

3 miRNA 和 siRNA 的其他调控机制

绝大多数情况下, miRNA 在转录后水平对基因表达起负调控作用, 但也有少量研究报道显示, 在特定条件下, miRNA 可以采取其他方式调节基因的表达。例如, 在血清饥饿导致细胞分裂受阻的条件下, Ago2 与 FXR1 结合, 以某种未知的机制提高靶标 mRNA 的翻译效率^[26]。而 miR-10a 可以与核糖体 RNA 结合并增强它们的活性, 在全局水平上调 mRNA 的翻译效率^[27]。虽然绝大多数 miRNA 需要与 Ago 蛋白结合后才能发挥功能, 但最新的研究表明, miR-328 可以直接结合 hnRNP E2, 从而解除 hnRNP E2 对 C/EBP mRNA 的翻译抑制作用, 最终促进髓系祖细胞向粒细胞的分化^[28]。不仅如此, 有些病毒在进化过程中还产生了一些特殊的机制, 利用宿主细胞中的 miRNA 为病毒自身的复制和翻译服务。例如肝脏细胞特异性表达的 miR-122 与 HCV 基因组 RNA 5' 非翻译区的靶位点结合后, 可以促进 HCV RNA 的复制^[29]。而 Henke 等^[30]报道 miR-122 在翻译起始阶段促进核糖体与 HCV RNA 的结合, 显著增强 HCV RNA 的翻译。有趣的是, 如果 HCV 5' 非翻译区的靶位点被插入到报告基因 mRNA 的 3' 非翻译区, 那么该报告基因便如其他 mRNA 一样翻译被 miRNA 所抑制。

除了在转录后水平上调基因的表达, 一些研究报道显示, siRNA 和 miRNA 还可以在转录水平上发挥作用。裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中惟一的 Ago 蛋白可以结合来自着丝粒重复序列的 siRNA, 形成 RITS (RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing) 复合体。RITS 招募甲基转移酶到染色体的特定区域, 造成组蛋白 H3K9 的甲基化, 从而促进异染色质的形成, 引起基因沉默^[31]。

随后, 在包括植物、真菌、果蝇和线虫等多种生物体中均发现RISC能在细胞核中发挥功能, 表明RISC的转录调控活性在真核生物中广泛存在^[32]。然而, 对于哺乳动物细胞中siRNA和miRNA在转录过程中是否具有直接的调控功能仍有较多争议。有报道显示一部分Ago蛋白和miRNA可以定位在哺乳动物细胞核内, 并且siRNA能够有效降解核内的靶标RNA, 说明核内可能存在具有核酸内切酶活性的Ago2^[33, 34]。另外的研究发现, 针对报告基因启动子区的siRNA可以显著下调基因表达, 为siRNA参与转录调控提供了更为直接的证据, 其作用机制可能是Ago蛋白通过与RNA聚合酶II以及组蛋白赖氨酸甲基转移酶结合, 造成组蛋白H3K9和H3K27的甲基化, 促进异染色质的形成而导致基因沉默^[35-37]。此后发现针对内源基因, 如孕酮受体基因转录起始位点的siRNA也能起到抑制转录的作用, 染色质免疫沉淀实验显示孕酮受体基因的启动子区结合有Ago蛋白^[38]。出乎意料的是, 另一些研究却发现针对启动子区的外源siRNA能激活转录。这一激活效应同样需要Ago2蛋白的参与, 并且导致siRNA靶位点附近的组蛋白H3K9去甲基化^[39]。目前关于siRNA在哺乳动物细胞中参与转录调控的报道很有限, 还缺乏可信的作用机制支持, 有待于更多的后续研究进一步确认。

4 与miRNA和siRNA功能相关的重要蛋白质因子

尽管miRNA和siRNA的调控角色如此重要且多样, 但它们自身的作用主要是充当向导帮助识别并结合mRNA上的靶序列, 真正发挥调节功效的是与miRNA和siRNA直接或间接结合的各种蛋白质因子。这些蛋白质因子同miRNA或siRNA一起被称为RISC复合体。其中一些蛋白直接参与miRNA和siRNA的调节作用, 是RISC的核心组分, 而另一些则可能主要帮助维持复合体的结构或起辅助性的作用。

Ago蛋白是最早发现的, 也是最重要的RISC核心成员之一, 其功能已经在包括酵母、线虫、果蝇和哺乳动物等多种生物中得到广泛的验证。它直接与miRNA结合, 对miRNA的成熟及靶序列识别均至关重要。Ago蛋白相对分子质量约为100 k, 含有PAZ、MID和PIWI三个特征结构域。其中, PAZ结构域识别Dicer切割形成的RNA 3'悬垂碱基;

MID结构域可以特异结合小RNA 5'端的磷酸基团, 从而将小RNA锚定在Ago蛋白上; PIWI结构域包含类似核酸酶RNase H的催化核心结构, 但在进化过程中, 部分Ago家族成员的PIWI结构域中氨基酸序列发生改变而丧失了原有的核酸内切酶活性。Ago蛋白的结构特征在进化中高度保守, 但在不同的物种中, Ago家族成员的数目有显著差异: 裂殖酵母中仅有1种, 而线虫中多达27种^[40]; 包括人类在内的哺乳动物表达4种Ago蛋白, 它们均可结合miRNA和siRNA^[34, 41], 并都能介导翻译抑制和mRNA降解^[13, 42]。但其中只有Ago2具有核酸内切酶活性, 是RNA干扰中的重要功能分子^[34, 41]。果蝇中Ago蛋白包括Ago1和Ago2, 其中Ago1参与miRNA介导的基因调控, 而Ago2执行RNA干扰的功能^[40]。Ago蛋白在生物体各组织中广泛表达, 但各个成员间的相对表达量在各个组织中有较大差异, 对RNA干扰的脱靶效应造成不同程度的影响。通常情况下, Ago1、3、4相对Ago2的表达量越高, RNA干扰的脱靶现象越严重^[23]。Ago蛋白的另一亚家族是Piwi家族, 与另一种小RNA——piRNA结合, 主要在生殖细胞中表达, 对生殖细胞的生成具有重要功能, 它的功能和机制将在本刊的另一综述中详述。

Ago蛋白直接与miRNA和siRNA结合, 但其基因表达调控功能的发挥还依赖于与之相互作用的其他蛋白因子。例如与小RNA加工相关的Dicer、PACT; 在miRNA介导的mRNA降解中起重要作用的CCR4-NOT复合体; 与AU-Rich元件(ARE)介导的mRNA降解相关的TTP; 以及与miRNA介导的mRNA降解和翻译抑制相关的MOV10、RCK和TNRC6蛋白家族。除以上在miRNA介导的基因调控中起作用的Ago结合蛋白之外, 还鉴定出一些在miRNA作用途径中功能不明的Ago结合蛋白。如甲基转移酶PRMT5; mRNA 5'端脱帽酶DCP1与DCP2; 翻译起始因子eIF4E; Gemin小体成员Gemin3和Gemin4; 以及与mRNA的核质运输有关的FMR1、FXR1和FXR2^[40]。后续的研究发现其中一些蛋白只在特定条件下或以特殊的方式对miRNA介导的基因表达起调控作用, 可能不是大部分miRNA发挥功能都必需的通用因子。在这些被鉴定出的蛋白质因子中, TNRC6蛋白家族的功能得到了广泛的认可。多个实验室的研究显示TNRC6与Ago蛋白具有相互作用, 且该相互作用对miRNA介导的基因表达调控是必需的, 因而目前认为TNRC6

是另一个重要的RISC核心成员。TNRC6蛋白家族在果蝇中只有Gawky1个成员,线虫中有AIN-1和AIN-2两个成员,人类则有TNRC6 A、B、C三个成员。其中最早发现的是TNRC6 A,因其相对分子质量为182 k且富含甘氨酸(G)和色氨酸(W),又被命名为GW182。在哺乳动物细胞中,由于功能冗余的缘故,通过RNA干扰的方法单独下调任何一种TNRC6蛋白,都只部分影响miRNA的抑制作用^[43-45]。线虫中的遗传分析发现AIN-1(线虫中的TNRC6同源蛋白)和ALG-1(线虫中的Ago同源蛋白)都参与了发育时序调控,且一者的突变能加强另一者突变的表型,表明AIN-1和ALG-1可能是同一途径的重要组分^[46]。由于果蝇中TNRC6家族只有一个成员Gawky,利用RNA干扰的方法发现受Gawky与Ago1(果蝇中参与miRNA作用途径的Ago蛋白)调控的mRNA种类极为相似,并且Gawky的基因抑制功能不依赖于Ago蛋白,充分说明,TNRC6蛋白是Ago下游的RISC重要功能组分^[12]。TNRC6A蛋白最初是由自身免疫病患者的血清筛HeLa细胞cDNA库而发现的^[47]。使用这种患者的血清进行免疫染色,可以在细胞质中发现一种离散的点状结构,这一结构不与任何已知的细胞器重叠,被称为P body。随后发现miRNA和一些mRNA降解相关的因子,如DCP1和XRN1等共定位在P body中^[48]。但近期的实验结果表明,TNRC6蛋白具有P body定位这一现象与miRNA的调控功能可能并无直接联系^[49]。以上的研究结果提示我们,由于miRNA和siRNA作用机制的多样性与复杂性,与小RNA或Ago蛋白间是否存在相互作用不应该成为判断该蛋白因子在小RNA的调控作用中是否具有重要功能的标准。一些具有重要功能的蛋白因子可能由于与小RNA间的相互作用非常短暂或不稳定,而无法用常规的生化方法(如免疫共沉淀等)检测到。

5 结语

miRNA自身的表达受到严格的时空调控,而每种miRNA可以调节多个基因的表达,同一基因亦可同时接受多种miRNA的调控。不仅如此,miRNA和siRNA调节基因表达的方式和作用机制也是多种多样,在不同的蛋白因子的参与下,miRNA可以在翻译、mRNA稳定性和转录等多种水平发挥负调控或正调控功能。正是通过这种复杂的组合关系,miRNA可以更为精确和高效地调控一系列基因的表达,从而构成真核生物复杂的基因表达调控网络。

目前我们对以miRNA和siRNA为代表的非编码RNA作用机制的了解仅仅是冰山一角。非编码RNA的世界是一个崭新的世界,其多样性和复杂度远远超出我们先前的想象,令人浮想联翩。对新的非编码RNA类型、作用机制和功能的研究和发现,将为我们解读生命产生和进化的奥秘开启新的大门。

[参 考 文 献]

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281-97
- [2] Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 2003, 115(2): 199-208
- [3] Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, et al. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, 2010, 465(7298): 584-9
- [4] Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, et al. A novel miRNA processing pathway independent of dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science*, 2010, 328(5986): 1694-8
- [5] Qin W, Shi Y, Zhao B, et al. miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9429
- [6] Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, et al. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(47): 16961-6
- [7] Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 microRNA in human cells. *Science*, 2005, 309(5740): 1573-6
- [8] Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, 2007, 447(7146): 823-8
- [9] Maroney PA, Yu Y, Fisher J, et al. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(12): 1102-7
- [10] Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(12): 1108-14
- [11] Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, et al. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*, 2006, 21(4): 533-42
- [12] Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, et al. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev*, 2006, 20(14): 1885-98
- [13] Piao X, Zhang X, Wu L, et al. CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(6): 1486-94
- [14] Fabian MR, Mathonnet G, Sundermeier T, et al. Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell*, 2009, 35(6): 868-80
- [15] Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(11): 4034-9

- [16] Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, et al. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev*, 2007, 21(20): 2558-70
- [17] Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, et al. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev*, 2007, 21(15): 1857-62
- [18] Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, et al. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, 2006, 125(6): 1111-24
- [19] Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 2002, 297(5589): 2056-60
- [20] Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*, 2003, 17(4): 438-42
- [21] Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(17): 9779-84
- [22] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 2000, 101(1): 25-33
- [23] Wu L, Fan J, Belasco JG. Importance of translation and nonnucleolytic ago proteins for on-target RNA interference. *Curr Biol*, 2008, 18(17): 1327-32
- [24] Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(6): 635-7
- [25] Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 2004, 304(5670): 594-6
- [26] Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 2007, 318(5858): 1931-4
- [27] Orom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*, 2008, 30(4): 460-71
- [28] Eiring AM, Harb JG, Neviani P, et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*, 2010, 140(5): 652-65
- [29] Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science*, 2005, 309(5740): 1577-81
- [30] Henke JI, Goergen D, Zheng J, et al. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J*, 2008, 27(24): 3300-10
- [31] Lippman Z, Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*, 2004, 431(7006): 364-70
- [32] Matzke MA, Birchler JA. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(1): 24-35
- [33] Robb GB, Brown KM, Khurana J, et al. Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12(2): 133-7
- [34] Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, et al. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 2004, 15(2): 185-97
- [35] Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, et al. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*, 2004, 305(5688): 1289-92
- [36] Weinberg MS, Villeneuve LM, Ehsani A, et al. The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells. *RNA*, 2006, 12(2): 256-62
- [37] Kim DH, Villeneuve LM, Morris KV, et al. Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(9): 793-7
- [38] Janowski BA, Huffman KE, Schwartz JC, et al. Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(9): 787-92
- [39] Li LC, Okino ST, Zhao H, et al. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(46): 17337-42
- [40] Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell*, 2007, 26(5): 611-23
- [41] Liu J, Carmell MA, Rivas FV, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 2004, 305(5689): 1437-41
- [42] Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA*, 2004, 10(10): 1518-25
- [43] Meister G, Landthaler M, Peters L, et al. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol*, 2005, 15(23): 2149-55
- [44] Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, et al. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(12): 1261-6
- [45] Zipprich JT, Bhattacharyya S, Mathys H, et al. Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA*, 2009, 15(5): 781-93
- [46] Ding L, Spencer A, Morita K, et al. The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*. *Mol Cell*, 2005, 19(4): 437-47
- [47] Eystathiou T, Chan EK, Tenenbaum SA, et al. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(4): 1338-51
- [48] Eystathiou T, Jakymiw A, Chan EK, et al. The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSM4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA*, 2003, 9(10): 1171-3
- [49] Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, et al. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(11): 3970-81