

microRNA 序列和表达模式的多样性 *

丁素萍¹⁾ 刘丽莉^{1, 2)} 黄 婷¹⁾ 王 营¹⁾ 严明理^{1, 2)**} 袁志栋^{1, 2)**}

(¹⁾ 湖南科技大学生命科学学院, 湘潭 411201; (²⁾ 重金属污染土壤生态修复与安全利用湖南省高校重点实验室, 湘潭 411201)

摘要 microRNA(miRNA)在后生动植物细胞分化、生长发育、正常生理功能的维持、疾病的发生发展和转归中发挥重要功能。通常认为, 已知 miRNA 对应的序列就是存储于 miRBase 数据库中相应的成熟 miRNA 序列。然而, 人们忽视了 miRNA 序列长度和碱基的可变性, 低估了来源于同一 miRNA 基因、非主要表达的 miRNA 的多样性及其功能的重要性。由于测序技术的快速发展和广泛使用, 人们利用二代测序技术数据发现了 miRNA 序列和 miRNA 表达水平的多样性。基于 miRNA 序列和表达的多样性, 本文介绍了 miRNA 序列 5' 端、3' 端和内部的变异体、miRNA 变异体的时空差异性表达和 miRNA 优势表达臂转换等方面近年来的研究进展。

关键词 miRNA, 多样性, isomiR, miRNA 编辑, 臂转换

学科分类号 Q522, Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0096

microRNA(miRNA)是一类长度约 22 nt 的单链小分子 RNA, 通过作用靶标基因转录本直接或间接参与了机体的几乎所有生命活动。miRNA 基因的初始转录本(pri-miRNA)折叠成发卡结构并经过核酶 Drosha 的剪切, 形成一个 60~70 核苷酸的前体 miRNA(pre-miRNA)。pre-miRNA 由 Exportin-5 从核内运出并被胞质酶 Dicer 加工成 19~25nt 的双链 RNA(5p 臂/3p 臂)^[1]。双链 RNA 解螺旋, 5p 臂和 3p 臂中的 1 条或 2 条链可以作为功能性的成熟 miRNA 选择性地被载入 RNA 诱导沉默复合物(RISC)^[2-3]。miRNA 5' 端的第 2~8 位碱基(种子区)被认为是靶标识别的关键^[4]。通过种子区序列与 mRNA 3' 非翻译区的靶位点碱基互补配对识别, miRNA 阻断靶标 mRNA 翻译或指导靶标 mRNA 的降解。通过调控靶基因的表达, miRNA 参与了生命体的多种病理和生理过程。

miRNA 序列的可变性在越来越多的物种中被发现^[4-10], 这揭示了 miRNA 序列多样性的普遍存在。来自 pre-miRNA 发卡丰度最高的 miRNA 序列通常被指定为相应的 miRNA, 从相同的 pre-miRNA 衍生的、更低丰度的变异体序列在早期的克隆研究中可能已被确定, 但往往被丢弃不予考

虑^[9, 19]。由于深度测序的发展我们能够全面鉴定机体、不同组织或细胞内 miRNA 序列及其表达水平的变化。研究表明, 同一 miRNA 的序列与表达模式可能在不同发育阶段^[4]、不同组织^[9]以及不同物种(直系同源 miRNA)中存在多样性或保守性^[7]。而目前认为, miRNA 序列的多样性主要来源于 Drosha 和 Dicer 在剪切位点的偏移、3' 端的核苷酸添加^[15, 20]和核苷酸多态性(单核苷酸多态性与 RNA 编辑)。miRNA 末端位置与内部的序列变异被认为是 miRNA 的异质性。Drosha 和 Dicer 剪切位点的序列和结构特征可能影响了 miRNA 的异质性^[21]。随着更多的 miRNA 异质性被深度测序检测, 术语 isomiR 被引入用来识别来源于同一 miRNA 的变异体^[5]。isomiR 通常是指由同一 miRNA 基因产生的、存在长度或序列变化的 miRNA 序列变异体。而

* 国家自然科学基金(31100914), 国家留学基金委(201308430387), 中国博士后科学基金(2013M540642), 湖南省科技厅(2013RS4032)和湖南科技大学研究生创新基金(S130026)资助项目。

** 通讯联系人。Tel: 0731-58291416

严明理。E-mail: mlyan@hnust.edu.cn

袁志栋。E-mail: zdyuan@hnust.edu.cn

收稿日期: 2015-04-09, 接受日期: 2015-06-25

miRNA 表达水平的多样性主要源于 miRNA 表达的组织特异性、阶段特异性的调控元件和表观遗传修饰的影响, 以及目前原因尚不是很明确的 miRNA 序列加工、降解机制(影响 miRNA 优势表达臂的转换). 本文将从 miRNA 序列变异性(5'-isomiR、3'-isomiR 和 miRNA 编辑)和表达模式多样性(miRNA 表达的时空特异性、miRNA 优势表达臂的转换)两方面来作介绍.

1 miRNA 序列多样性——isomiR

1.1 序列两端或一端存在变异的 isomiR

基于序列变异的位置, miRNA 变异体可以分为 5' 端、3' 端或内部的变异体. MiRNA 序列两端

或一端的多样性源自 Droscha 或 Dicer 的不精确剪切、5' 端核苷酸添加^[6, 22]、3' 端核苷酸添加^[15, 20]; 序列内部的变异则包括单核苷酸多样性(SNP), 以及 RNA 编辑^[23-24]. 来自同一 miRNA 的不同长度或/和多态性位点的 miRNA 变异体被称为 isomiR(图 1). miRNA 序列长度变异的 isomiR 有两种类型, 即 5'-isomiR 和 3'-isomiR(图 1, 图 2). 其中序列碱基组成基于模板的 5'-isomiR 或 3'-isomiR 为 miRNA 变异体的 5' 或 3' 端位置与主要 miRNA 或已知的标准 miRNA 存在几个核苷酸的偏移; 非基于模板的 5'-isomiR 或 3'-isomiR 是指不基于模板序列的 5' 或 3' 端的核苷酸添加(图 1).



Fig. 1 The variant types of isomiRs

图 1 不同类型的 isomiR

不基于模板序列的核苷酸添加或修饰比较常见, 其中 3' 端的变异比 5' 端变异更为常见^[5, 9, 25]. 一些 miRNA 变异体 3' 端包含 1~3 个不匹配基因组 DNA 序列的非模板核苷酸, 通过在 3' 端添加核苷酸改变 miRNA 序列产生的 isomiR 增加了 miRNA 功能的复杂性. miRNA 3' 端腺苷化或尿苷化从果蝇到哺乳动物都可以检测到^[20, 26-27]. 尿苷酰或腺嘌呤残基可被末端核苷酸基转移酶加入到 miRNA 的 3' 端并影响 miRNA 稳定性^[28-32]. 而尿苷酸化通常作为 miRNA 衰变的一个触发器, 腺苷酸化阻止 miRNA 的降解. 5' 端添加核苷酸的研究报道比较少, 但 Ebhardt 等^[22]发现近 20% 注释的 miRNA 存

在 5' 端核苷酸添加. 5'-isomiR 与主要 miRNA 有不同的种子区; miRNA 种子区跨越 miRNA 5' 端的第 2~7 个核苷酸, 是 miRNA 的特异性和与靶标结合的重要决定因素^[33-35]. 通常认为, 5'-isomiR 更可能对基因表达调控有直接作用, 而 3'-isomiR 影响 miRNA 的稳定性和靶标抑制的效率^[20, 32, 36]. miRNA 变异体可能影响到 miRNA 半衰期、亚细胞定位及 miRNA 靶标特异性等^[37]. 由于不精确加工机制而产生的多重 miRNA 变体, 可能是一种拓展生物体内复杂调控网络的途径^[5, 9, 12], 也可能是造成物种表型差异和多样性的原因之一.

hsa-mir-151a	轮	长度	变异	位置	H9_ESC
CTAGACTGAAGCTCCTTGAGGt	r1-M3	22	A>T	47	7
CTAGACTGAAGCTCCTTGAG	r0-r0	20	no	47	134
CTAGACTGAAGCTCCTTGAGG	r0-r0	21	no	47	118
CTAGACTGAAGCTCCTTG	r0-r0	18	no	47	120
CTcGACTGAAGCTCCTTGAG	r1-MM	20	A>C	47	1
CTAGACTGAAGCTCCTTGAGGAtc	r2-M3	24	TC	45	16
CTAGACTGAAGCTCCTTcA	r1-MM	19	G>T	47	11
CTAGACTGAAGCTCCT	r0-r0	16	no	47	63
CTAGACTGAAGCTCCTTGcGG	r1-MM	21	A>C	47	18
CTAGACTGAAGCTCCTTGAtG	r1-MM	21	G>T	47	17
CTAGACTGAAGCTCCTTGAGGA	r0-r0	22	no	47	15
CTAGACTGAAGCTCCTTGcG	r1-MM	20	A>C	47	13
CTAGACTGAAGCTCCTT	r0-r0	17	no	47	119
CTAGACTGAAGCTCCTTGAGGAt	r1-M3	23	C>A	47	18
CTAGACTGAAGCTCCTTGAGGAa	r1-M3	23	C>A	47	17
CTAGACTGAAGCTCCTTGA	r0-r0	19	no	47	112
CTAGACTGAAGCTCCTTGAGGATCt	r4-M3	26	TCTC	43	21
CTAGACTGAAGCTCCTTtAG	r1-MM	20	G>T	47	7
CTAGACTGAAGCTCCTTGAGGATCt	r3-M3	25	TCT	44	23
ACTAGACTGAAGCTCCTTGAG	r0-r0	21	no	46	8
TACTAGACTGAAGCTCCTTG	r0-r0	20	no	45	7
TACTAGACTGAAGCTCCTTGAG	r0-r0	22	no	45	16
TACTAGACTGAAGCTCC	r0-r0	17	no	45	4
TACTAGACTGAAGCTCCTTGAGG	r0-r0	23	no	45	7
TACTAGACTGAAGCTCCTT	r0-r0	19	no	45	9
TACTAGACTGAAGCTC	r0-r0	16	no	45	2
TACTAGACTGAAGCTCCTTGA	r0-r0	21	no	45	12
TCGAGGAGCTCACAGTCTAGT	r0-r0	21	no	11	9
TCGAGGAGCTCACAGTCT	r0-r0	18	no	11	11
TCGAGGAGCTCACAGTCTAG	r0-r0	20	no	11	8
TCGAGGAGCTCACAGTCTAGT	hsa-miR-151a-5p	21			
CTAGACTGAAGCTCCTTGAGG	hsa-miR-151a-3p	21			
TTTCTGCGCTCGAGGAGCTCACAGTCTAGTATGTCTCATCCCTACTAGACTGAAGCTCCTTGAGGACAGGGATGGTCATACTCACCTC	hsa-mir-151a	90			

Fig. 2 The diversity of the sequences of miR-151a isomiRs

图2 miR-151a isomiRs 序列的多样性

1.2 非 SNP 序列内部碱基变异的 isomiR——miRNA 编辑

从线虫到人类, 腺苷变成次黄嘌呤核苷(adenosine-to-inosine, A-to-I)的编辑是一种包括 miRNA 前体在内的双链 RNA 的转录后修饰^[38-40]. 这个反应是由作用 RNA 的腺苷酸脱氨酶(ADAR)催化^[41]. 由于结构的相似性, 次黄嘌呤被细胞机器读成鸟苷酸(G). 这样, RNA 序列中的次黄嘌呤将出现 A-to-G 的转变(图 1). 然而仅一小部分 A-to-I 编辑导致蛋白的重编码, ADAR 的大多数靶标是转录组的非编码部分^[38, 42]. 由于在 miRNA 加工过程中存在发卡双链, 核苷酸编辑事件在 miRNA 生成过程中就有可能发生. ADAR 结合双链 RNA, 它们可以作用 pri-miRNA 的双链形成^[24]. pri-miRNA 的 A-to-I 编辑能影响 pri-miRNA 到 pre-miRNA 或 pre-miRNA 到成熟 miRNA 的加工过程^[24]. 当前有关 miRNA 编辑的大多数研究主要关注的是人和小

鼠组织, 特别是脑组织^[23, 43-47]. Warnefors 等^[48]认为, 相较于非神经组织, miRNA 编辑的发生更常见于脑中.

miRNA 编辑事件有可能增加了基因表达调控层次的复杂度. 一些编辑位点在脊椎动物中是保守的^[48], 并且大多数 miRNA 中的编辑位点是位于“种子(seed)”区^[26, 45-48], 因此 miRNA 编辑位点有潜力导致 miRNA 靶向新的靶基因. 一个突出的例子是小鼠 miR-376, 编辑位点位于种子区, 改变了 miRNA 的靶标特异性并极大地影响了细胞生物学过程^[43]. 改变 miRNA 靶标特异性的 A-to-I 编辑事件明显地增加了基因调控通路的复杂度.

2 miRNA 表达模式的多样性

2.1 miRNA 的表达差异性与物种间保守性

目前的研究结果表明: 一方面, 和经典的 miRNA 一样, isomiR 的表达存在时空表达的特异

性与多样性,甚至还发现存在环境响应、种群与性别等方面的表达差异性;另一方面,物种间的直系同源 miRNA 间存在保守性。

Fernandez-Valverde 等^[4]发现了 isomiR 在果蝇各发育阶段和组织中都存在差异性表达。miRNA 的非模板 3'端腺苷酸添加在发育的早期非常丰富,而非模板 3'端尿苷酸添加的部分 miRNA 在成年果蝇中中度富集表达,并且发现至少 8 个成熟 miRNA 的序列长度在不同的生命周期或组织间发生变化^[4]。我们发现,在干细胞分化为视网膜色素上皮细胞的四个阶段中有 107 个优势表达的、与 miRBase 中记录的标准 miRNA 序列不一致的 5'-isomiR 序列,而在所有阶段细胞都优势表达的 isomiR 共有 19 个^[49]。Siddle 和 Tailleux 等^[50]发现 isomiR 因树突细胞响应分支杆菌的感染而呈现多样性变化。有意思的是,最近 Loher 等^[51]不仅发现 isomiR 在不同人类种群间的淋巴母细胞中有表达差异,还发现了一些 isomiR 在不同性别来源的淋巴母细胞间也存在差异表达。

miRNA 编辑不仅在脊椎动物中被发现^[48],也在非脊椎动物如果蝇^[27]和线虫^[52]中发现。miR-455、miR-140* 和 miR-301a 中的 A-to-G 编辑位点在哺乳动物和鸟类中都保守^[48],其中 miR-455 中第 17 个核苷酸位点(A-to-G 编辑位点)已被过量表达 ADARB1 的人类细胞系所证实^[46],并且这三个编辑位点均位于非“seed”区。目前发现,保守的 miRNA 的 A-to-G 编辑位点大部分位于“seed”区:在有胎盘的哺乳动物和鸭嘴兽中发现了 miR-27a 相同的 A-to-G 编辑位点;而在有胎盘的哺乳动物和有袋类动物中发现了 miR-187*、miR-497 和 miR-1251 共同的位于“seed”区的 A-to-G 编辑位点;位于 miR-376a-1、miR-381 和 miR-411 的“seed”区的 A-to-G 编辑位点在人、恒河猴和小鼠中也均保守^[48]。

2.2 miRNA 优势表达臂的转换

早些时候,miR/miR* 被用来表示一个 miRNA 前体产生的数量上主要的和次要的成熟 miRNA。大多数经典的 miRNA 基因从 pre-miRNA 的 5'或 3'臂产生一个占主导地位或优势表达的成熟 miRNA 种类(简称优势表达 miRNA),整体倾向是从 5'臂衍生主导地位的成熟 miRNA^[26,53]。然而,从部分 pre-miRNA 的两臂也产生了相似数量的测序读段,这表明这两种类别的 miRNA 以同样的频率进入了沉默复合物^[26]。从 miRBase 数据库的 19 版

本(miRBase R19)开始,对于这些产生自 miRNA 前体 5'和 3'臂的成熟 miRNA 分别在 miRNA 名称后使用“-5p”和“-3p”后缀来注释,不再是 miR/miR*。一些研究报道了在不同部位组织^[26,54-55]、正常与病理组织间^[56-58]、不同时期^[26,59]和物种间直系同源 miRNA^[60-63]间,产生数量上主要的(即优势表达的)miRNA 臂(miRNA 优势表达臂)发生变化,这种变化主要是在同一 pre-miRNA 两条臂之间进行转换,因而被称之为“臂转换(arm switching)”(图 3)。因此,由同一前体产生的 miRNA 臂的优势表达 miRNA 在同一个体的不同组织、不同发育阶段、不同生理病理状态,甚至在不同物种中都存在差异^[56-57,60-61]。最优势表达的 isomiR 序列也可能和当前 miRBase 中记录的同一 miRNA 基因产生的标准 miRNA 序列不一致^[5]。

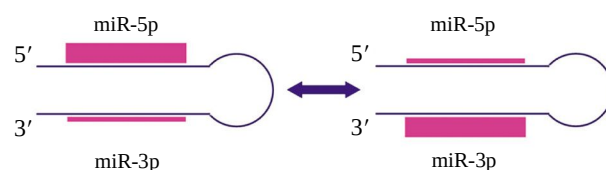


Fig. 3 A dominant-arm switching model occurs in the miRNA expression

图 3 miRNA 优势表达臂的转换

miRNA 优势表达臂的转换很可能是一种普遍的生物学现象。使用半定量 RT-PCR 技术发现 mir-30e-5p 和 mir-30e-3p 在小鼠大多数组织中呈现差异表达^[55]。而随着高通量测序技术的发展,可以产生足够多的测序读段数据,全面研究 miRNA 基因优势表达臂的转换现象已成为可能,因而在多种生物体中发现越来越多的优势表达臂转换 miRNA。Grimson 等^[59]发现 miR-2015 在海绵的胚胎期主要是 5'臂表达,而在成年期主要是 3'臂表达。Cloonan 等^[54]发现了一些 miRNA 的优势表达臂在不同的人体组织间发生变化。我们也在干细胞分化为视网膜色素上皮细胞的四个阶段中,发现有 14 个 miRNA 基因产生的 miRNA 存在明显的臂选择倾向性表达变化^[49]。Chiang 等^[26]发现在小鼠中的 21 个 miRNA 基因在不同发育阶段或不同组织中产生优势表达的 miRNA 发生了臂转换。例如 miR-142-5p 在卵巢、睾丸和大脑中更频繁出现,而 miR-142-3p 更常见于胚胎和新生小鼠中^[26]。目

前, 在正常和异常的组织(乳腺癌、胃癌、肝癌等)之间也发现了 miRNA 优势表达臂的选择变化^[56-58]. 这意味着随着个体发育的进行或在不同组织中, miRNA 优势表达臂的转换, 导致 miRNA 作用的靶标也发生变化, 其功能可能发生了变化. 而可能正因为这种变化影响了发育过程、造成了组织器官差异或机体病理生理状态的改变.

在不同物种中, 一些直系同源 miRNA 基因可选择不同的 miRNA 臂表达优势 miRNA. 比如, 在果蝇和赤拟谷盗中, 直系同源 miRNA 前体的 5' 和 3' 臂产生的成熟 miRNA 存在偏爱性^[60]: 果蝇中 mir-33 的 5' 臂产生了 mir-33 的优势表达的成熟 miRNA, 而赤拟谷盗的 mir-33 主要是 3' 臂产生了居主导地位的成熟 miRNA^[60]. 另外, miR-100/10 家族也被发现在不同物种间发生了 miRNA 优势表达臂的选择演化^[61].

3 结论与展望

miRNA 的表达多样性是广泛存在的. 最近的一些研究报道了动物(人、小鼠、果蝇和线虫)、植物(拟南芥、水稻、苜蓿、毛果杨和兴安落叶松)与病毒的 miRNA 展现出不同的 5' 和 3' 端, 以及转录后非模板 3' 端添加尿苷或腺苷^[5, 8-18], 并且腺苷转肌苷(A-to-I)的 RNA 编辑也发生在从 pri-miRNA 到 pre-miRNA 的加工过程或 pre-miRNA 加工成成熟 miRNA^[24]的过程中. 在不同发育过程、不同组织中^[26, 55, 59], 甚至在不同物种中的直系同源 miRNA^[60-63] 优势表达的 miRNA 可从 pre-miRNA 的一条臂转换到另一条臂. 而且, 成熟 miRNA 的 A-to-I 的编辑事件在哺乳动物中不是独有的^[23, 45, 48], 在其他物种(比如果蝇^[27]和线虫^[52])也存在. 在不同组织和不同发育阶段的这些事件和 miRNA 的不同表达水平与不同表达模式导致了 miRNA 的多样性. 同时, 这些研究结果也表明 miRNA 多样性的存在不是偶发的, 有些甚至在物种演化的过程中受到选择压力而承担了新的功能, 并在特定的条件下表达. 因而, miRNA 的多样性也可能是促成生物体的复杂和多样性的原因之一.

值得指出的是目前研究中实际优势表达的 miRNA 序列可能并非与标准 miRNA 序列一致. 在很多情况下研究者容易忽略用来预测靶标的 miRNA 是标准型的 miRNA, 还是实际上优势表达的非经典的 isomiR, 其实它们的功能很可能差别较大, 由此, 就有可能得出不准确的分析结果. 这

是由于很多情况下, 我们除了测序外没有简便的技术去确定当前样本中表达 isomiR 的情况. 最近 Honda 等^[64]开发的被称为哑铃 PCR (Dumbbell-PCR, Db-PCR) 技术将会使这种状况有所改观. Db-PCR 可以有效、方便地区分并定量 5'-isomiR 和 3'-isomiR^[64], 为研究小 RNA 末端序列的变异性提供了一个亟需的、简便的技术.

尽管由于高通量测序技术的发展, miRNA 序列和表达模式的多样性有了大量的实验数据支持: 但是, 关于与标准 miRNA 序列不一致的绝大部分 isomiR 的功能, 还不能完全确定, 还不能回答 isomiR 存在的具体生物学意义是什么, 也不知道 miRNA 为什么和什么时候会发生 miRNA 优势表达臂的转换. 这些问题只能从功能实验中得到答案, 而探讨回答这些问题的实验研究屈指可数^[65-67]. 因此, 关于优势表达的非经典 miRNA 以及优势表达臂转换的 miRNA 的功能是对更深入对实验研究具有重要意义.

参 考 文 献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297
- [2] Newman M A, Hammond S M. Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes Dev*, 2010, **24**(11): 1086-1092
- [3] Slezak-Prochazka I, Durmus S, Kroesen B J, *et al.* MicroRNAs, macrocontrol: regulation of miRNA processing. *RNA*, 2010, **16**(6): 1087-1095
- [4] Fernandez-Valverde S L, Taft R J, Mattick J S. Dynamic isomiR regulation in *Drosophila* development. *RNA*, 2010, **16** (10): 1881-1888
- [5] Morin R D, O'Connor M D, Griffith M, *et al.* Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res*, 2008, **18** (4): 610-621
- [6] Bizuayehu T T, Lanes C F, Furmanek T, *et al.* Differential expression patterns of conserved miRNAs and isomiRs during Atlantic halibut development. *BMC Genomics*, 2012, **13**: 11
- [7] Xia J, Zhang W. A meta-analysis revealed insights into the sources, conservation and impact of microRNA 5'-isoforms in four model species. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(3): 1427-1441
- [8] 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): 1501-1507
- [9] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, *et al.* A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 2007, **129**(7): 1401-1414
- [10] Ruby J G, Stark A, Johnston W K, *et al.* Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res.*, 2007, **17**(12): 1850-1864

- [11] Zhang J, Zhang S, Li S, *et al.* A genome-wide survey of microRNA truncation and 3' nucleotide addition events in larch (*Larix leptolepis*). *Planta*, 2013, **237**(4): 1047–1056
- [12] Azuma-Mukai A, Oguri H, Mituyama T, *et al.* Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(23): 7964–7969
- [13] Reid J G, Nagaraja A K, Lynn F C, *et al.* Mouse let-7 miRNA populations exhibit RNA editing that is constrained in the 5'-seed/cleavage/anchor regions and stabilize predicted mmu-let-7a:miRNA duplexes. *Genome Res*, 2008, **18**(10): 1571–1581
- [14] Seitz H, Ghildiyal M, Zamore P D. Argonaute loading improves the 5' precision of both MicroRNAs and their miRNA* strands in flies. *Curr Biol*, 2008, **18**(2): 147–151
- [15] Lu S, Sun Y H, Chiang V L. Adenylation of plant miRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(6): 1878–1885
- [16] Ebhardt H A, Tsang H H, Dai D C, *et al.* Meta-analysis of small RNA-sequencing errors reveals ubiquitous post-transcriptional RNA modifications. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(8): 2461–2470
- [17] Reese T A, Xia J, Johnson L S, *et al.* Identification of novel microRNA-like molecules generated from herpesvirus and host tRNA transcripts. *J Virol*, 2010, **84**(19): 10344–10353
- [18] Xia J, Zhang W. Noncanonical microRNAs and endogenous siRNAs in lytic infection of murine gammaherpesvirus. *PLoS ONE*, 2012, **7**(10): e47863
- [19] Ruby J G, Jan C, Player C, *et al.* Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell*, 2006, **127**(6): 1193–1207
- [20] Burroughs A M, Ando Y, de Hoon M J, *et al.* A comprehensive survey of 3' animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness. *Genome Res*, 2010, **20**(10): 1398–1410
- [21] Starega-Roslan J, Witkos T M, Galka-Marciniak P, *et al.* Sequence features of drosha and dicer cleavage sites affect the complexity of isomiRs. *Int J Mol Sci*, 2015, **16**(4): 8110–8127
- [22] Ebhardt H A, Fedynak A, Fahlman R P. Naturally occurring variations in sequence length creates microRNA isoforms that differ in argonaute effector complex specificity. *Silence*, 2010, **1**(1): 12
- [23] Luciano D J, Mirsky H, Vendetti N J, *et al.* RNA editing of a miRNA precursor. *RNA*, 2004, **10**(8): 1174–1177
- [24] Yang W, Chendrimada T P, Wang Q, *et al.* Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, **13**(1): 13–21
- [25] Kuchenbauer F, Morin R D, Argiropoulos B, *et al.* In-depth characterization of the microRNA transcriptome in a leukemia progression model. *Genome Res*, 2008, **18**(11): 1787–1797
- [26] Chiang H R, Schoenfeld L W, Ruby J G, *et al.* Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev*, 2010, **24**(10): 992–1009
- [27] Berezikov E, Robine N, Samsonova A, *et al.* Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence. *Genome Res*, 2011, **21**(2): 203–215
- [28] Ren G, Chen X, Yu B. Uridylation of miRNAs by hen1 suppressor1 in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2012, **22**(8): 695–700
- [29] Zhao Y, Yu Y, Zhai J, *et al.* The *Arabidopsis* nucleotidyl transferase HESO1 uridylates unmethylated small RNAs to trigger their degradation. *Curr Biol*, 2012, **22**(8): 689–694
- [30] Ibrahim F, Rymarquis L A, Kim E J, *et al.* Uridylation of mature miRNAs and siRNAs by the MUT68 nucleotidyltransferase promotes their degradation in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(8): 3906–3911
- [31] Katoh T, Sakaguchi Y, Miyauchi K, *et al.* Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev*, 2009, **23**(4): 433–438
- [32] Wyman S K, Knouf E C, Parkin R K, *et al.* Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. *Genome Res*, 2011, **21**(9): 1450–1461
- [33] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, **136**(2): 215–233
- [34] Guo H, Ingolia N T, Weissman J S, *et al.* Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 2010, **466**(7308): 835–840
- [35] Baek D, Villen J, Shin C, *et al.* The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 2008, **455**(7209): 64–71
- [36] Guo L, Yang Q, Lu J, *et al.* A comprehensive survey of miRNA repertoire and 3' addition events in the placentas of patients with pre-eclampsia from high-throughput sequencing. *PLoS One*, 2011, **6**(6): e21072
- [37] Borel C & Antonarakis S E. Functional genetic variation of human miRNAs and phenotypic consequences. *Mamm Genome*, 2008, **19**(7–8): 503–509
- [38] Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem*, 2010, **79**: 321–349
- [39] Bass B L. RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu Rev Biochem*, 2002, **71**: 817–846
- [40] Keegan L P, Leroy A, Sproul D, *et al.* Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs): RNA-editing enzymes. *Genome Biol*, 2004, **5**(2): 209
- [41] Bass B L, Nishikura K, Keller W, *et al.* A standardized nomenclature for adenosine deaminases that act on RNA. *RNA*, 1997, **3**(9): 947–949
- [42] Li J B, Levanon E Y, Yoon J K, *et al.* Genome-wide identification of human RNA editing sites by parallel DNA capturing and sequencing. *Science*, 2009, **324**(5931): 1210–1213
- [43] Kawahara Y, Zinshteyn B, Sethupathy P, *et al.* Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science*, 2007, **315**(5815): 1137–1140
- [44] Kawahara Y, Megraw M, Kreider E, *et al.* Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(16): 5270–5280
- [45] Ekdahl Y, Farahani H S, Behm M, *et al.* A-to-I editing of

- microRNAs in the mammalian brain increases during development. *Genome Res*, 2012, **22**(8): 1477–1487
- [46] Alon S, Mor E, Vigneault F, *et al.* Systematic identification of edited microRNAs in the human brain. *Genome Res*, 2012, **22**(8): 1533–1540
- [47] Vesely C, Tauber S, Sedlazeck F J, *et al.* ADAR2 induces reproducible changes in sequence and abundance of mature microRNAs in the mouse brain. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(19): 12155–12168
- [48] Warnefors M, Liechti A, Halbert J, *et al.* Conserved microRNA editing in mammalian evolution, development and disease. *Genome Biol*, 2014, **15**(6): R83
- [49] Yuan Z, Ding S, Yan M, *et al.* Variability of miRNA expression during the differentiation of human embryonic stem cells into retinal pigment epithelial cells. *Gene*, 2015, **569**(2): 239–249
- [50] Siddle K J, Tailleur L, Deschamps M, *et al.* Bacterial infection drives the expression dynamics of microRNAs and their isomiRs. *PLoS Genet*, 2015, **11**(3): e1005064.
- [51] Loher P, Londin E R & Rigoutsos I. IsomiR expression profiles in human lymphoblastoid cell lines exhibit population and gender dependencies. *Oncotarget*, 2014, **5**(18): 8790–8802
- [52] Warf M B, Shepherd B A, Johnson W E, *et al.* Effects of ADARs on small RNA processing pathways in *C. elegans*. *Genome Res*, 2012, **22**(8): 1488–1498
- [53] Hu H Y, Yan Z, Xu Y, *et al.* Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics*, 2009, **10**: 413
- [54] Cloonan N, Wani S, Xu Q, *et al.* MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. *Genome Biol*, 2011, **12**(12): R126
- [55] Ro S, Park C, Young D, *et al.* Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(17): 5944–5953
- [56] Li S C, Liao Y L, Ho M R, *et al.* miRNA arm selection and isomiR distribution in gastric cancer. *BMC Genomics*, 2012, **13**(Suppl 1): S13
- [57] Li S C, Tsai K W, Pan H W, *et al.* MicroRNA 3' end nucleotide modification patterns and arm selection preference in liver tissues. *BMC Syst Biol*, 2012, **6**(Suppl 2): S14
- [58] Chang H T, Li S C, Ho M R, *et al.* Comprehensive analysis of microRNAs in breast cancer. *BMC Genomics*, 2012, **13**(Suppl 7): S18
- [59] Grimson A, Srivastava M, Fahey B, *et al.* Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*, 2008, **455**(7217): 1193–1197
- [60] Marco A, Hui J H, Ronshaugen M, *et al.* Functional shifts in insect microRNA evolution. *Genome Biol Evol*, 2010, **2**: 686–696
- [61] Griffiths-Jones S, Hui J H, Marco A, *et al.* MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO Rep*, 2011, **12**(2): 172–177
- [62] Li S C, Liao Y L, Chan W C, *et al.* Interrogation of rabbit miRNAs and their isomiRs. *Genomics*, 2011, **98**(6): 453–459
- [63] Li S C, Chan W C, Ho M R, *et al.* Discovery and characterization of medaka miRNA genes by next generation sequencing platform. *BMC Genomics*, 2010, **11**(Suppl 4): S8
- [64] Honda S, Kirino Y. Dumbbell-PCR: a method to quantify specific small RNA variants with a single nucleotide resolution at terminal sequences. *Nucleic Acids Res*, 2015, **43**(12): e77
- [65] Humphreys D T, Hynes C J, Patel H R, *et al.* Complexity of murine cardiomyocyte miRNA biogenesis, sequence variant expression and function. *PLoS ONE*, 2012, **7**(2): e30933
- [66] Tan G C, Chan E, Molnar A, *et al.* 5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(14): 9424–9435
- [67] Babapoor S, Fleming E, Wu R, *et al.* A novel miR-451a isomiR, associated with amelanotypic phenotype, acts as a tumor suppressor in melanoma by retarding cell migration and invasion. *PLoS ONE*, 2014, **9**(9): e107502

The Diversity of MicroRNAs in Sequences and Expression Patterns*

DING Su-Ping¹⁾, LIU Li-Li^{1,2)}, HUANG Ting¹⁾, WANG Ying¹⁾, YAN Ming-Li^{1,2)**}, YUAN Zhi-Dong^{1,2)**}

¹⁾ School of Life Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China;

²⁾ Key Laboratory of Ecological Remediation and Safe Utilization of Heavy Metal-Polluted Soils, College of Hunan Province, Xiangtan 411201, China)

Abstract MicroRNAs (miRNAs) play important roles in cell division, development, maintenance of normal physiological function, occurrence, development and outcome of the diseases in metazoan animals, plants. The miRNA sequences stored in miRBase are usually taken as the only known miRNA sequences. In fact, people often ignore the varieties of the miRNA sequences and underestimate the diversities and importance of the functions of miRNA expressed in non-primary forms. Due to the rapid development and a wideranged application of sequencing technology, the variations in sequences and expression levels of mature miRNAs could be easily detected from the data obtained by the use of second-generation sequencing technology. This review intends to summarize the progress on 5' -end, 3' -end, or internal variants of miRNAs, the expression differences of miRNA variants in different developmental stages and different tissues, and dominant arm switch of miRNAs in recent years.

Key words miRNA, diversity, isomiR, miRNA editing, arm switch

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0096

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31100914), The China Scholarship Council (201308430387), China Postdoctoral Science Foundation (2013M540642), The Hunan Provincial Department of Science and Technology Project (2013RS4032) and The Innovation Foundation for Graduate Student of Hunan University of Science and Technology (S130026).

**Corresponding author. Tel: 86-731-58291416

YAN Ming-Li. E-mail: mlyan@hnust.edu.cn

YUAN Zhi-Dong. E-mail: zdyuan@hnust.edu.cn

Received: April 9, 2015 Accepted: June 25, 2015