

PAPER

miRNA様siRNAによる遺伝子サイレンシング効果

Gene Silencing by miRNA-like siRNA

新貝 恭広¹⁾
Yasuhiro Shinkai

柏原 慎一¹⁾
Shinichi Koshihara

藤井 啓史¹⁾
Hirohumi Fujii

峰松 剛¹⁾
Go Minematsu

吉永 尚平²⁾
Shouhei Yoshinaga

苗村 円佳¹⁾
Madoka Naemura

神武 洋二郎³⁾
Yojiro Kotake

藤井 政幸^{*4)}
Masayuki Fujii

■Abstract

RNA interference (RNAi) is a genetic regulation system induced by small RNAs. There are two pathways in RNAi, one is induced by small interfering RNA (siRNA) and the other by micro RNA (miRNA). siRNA is a full matched 21-23nt dsRNA and thought to evolutionally develop as a biological defense mechanism against RNA viruses. On the other hand, miRNA is an endogenously transcribed 20-25nt dsRNA having two or three mismatches and is involved in various biological processes. Based on structural and mechanistic similarities and differences between siRNA and miRNA, RNAi efficiencies of siRNAs with 3 mismatches at 2, 10 and 14 positions and siRNAs with 2 mismatches at 2 and 14 positions were evaluated. As a result, siRNA bearing a mismatch at central position showed weaker RNAi effect than siRNAs with no mismatch at central position. It can be concluded that RNAi by Ago2-RISC is stronger than that by Ago1-RISC.

Key Words: RNA interference, siRNA, miRNA, mismatch, DICER, hAgo1, hAgo2, RISC

はじめに

RNA干渉 (RNA interference, RNAi) は小さな2本鎖RNAによって誘導され、相補的な塩基配列を持つmRNAからの翻訳を阻害する遺伝子発現抑制システムで、1998年Fireらによって線虫で発見され¹⁾、2001年には哺乳類細胞でも同様の機構が働くことが示された²⁾。その作用機序はsmall interfering RNA (siRNA) と呼ばれる両方の3'-末端に2塩基のオーバーハングを有する21-23ntのフルマッチ二本鎖RNAによるsiRNA経路と、ゲノム上にコードされ、転写1次産物から多段階的な生成過程を経て最終的に数か所のミスマッチと両方の3'-末端に2塩基のオーバーハングを有する20から25塩基長の二本鎖RNAによるmicroRNA (miRNA) 経路とに大別される³⁾。siRNAは外来性の長鎖二本鎖RNAまたはヘアピンループ構造を形成しているshRNAから細胞内でDICERと呼ばれるエンドリボヌクレアーゼによるプロセッシングを経由して生成したsiRNA、あるいは、直接細胞内に導入されたsiRNAがアルゴノート2タンパク (Ago2) を中核とするRNA誘導サイレンシング複合体 (RNA Induced Silencing Complex, RISC) を形成することでRNA干渉を引き起こす⁴⁾。siRNAは単一のmRNAの翻訳領域 (Open Reading Frame, ORF) に完全相補的に結合し、Ago2の働きによりmRNAを切断する

ことで遺伝子発現を強力に阻害する。自然界においては、RNAウイルスに対する防御機構として進化してきたと考えられている⁵⁾。一方、miRNAはアルゴノート1タンパク (Ago1) を中核とするRNA誘導サイレンシング複合体 (Ago1-RISC) を形成することで、標的mRNAの非翻訳領域 (Untranslated region, UTR) に部分相補的に結合して、物理的に翻訳を阻害することが分かっており⁶⁾、複数のmRNAをターゲットにすることが知られている⁷⁾。miRNAはゲノムにコードされており、細胞の発生⁸⁾、分化⁹⁾、増殖¹⁰⁾ および細胞死¹¹⁾ などの基本的な生命現象の調節やがん¹²⁾、心血管疾患¹³⁾、神経変性疾患¹⁴⁾、精神疾患¹⁵⁾、慢性炎症性疾患¹⁶⁾ などの病態にも関わっている¹⁷⁾。

siRNAにはないmiRNAの特徴である配列中のミスマッチの役割については詳細な研究がなされ、RNA二本鎖の9-11塩基目のミスマッチはアルゴノート1への取り込みを促進し、2-8番目 (seed領域) あるいは12-15番目 (3'-mid領域) のミスマッチが1本鎖への解離 (Unwinding) に必要であることが分かっている¹⁸⁾。

本研究ではAgo1依存的RNAi経路 (miRNA経路) とAgo2依存的RNAi経路 (siRNA経路) を比較して、より効率の高いRNA干渉誘導2本鎖RNA分子を設計することを目的とし、標的mRNAの翻訳領域に完全相補的に結

1) 近畿大学大学院産業理工学研究科産業理工学専攻

2) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科

3) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科准教授

4) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科教授 mfuji@fuk.kindai.ac.jp

合するRNA鎖（アンチセンス鎖）とミスマッチおよび塩基欠損を有する部分相補鎖（センス鎖）からなるmiRNA様siRNAを合成し、ミスマッチおよびバルジ構造がRNA干渉効果に及ぼす影響を評価した。

Figure 1に示す通り、この比較では、DICERおよびTRBP（Trans-activation response RNA binding Protein）からなるRISCローディング複合体の形成、Ago1またはAgo2への積み込み、一本鎖化（Unwinding）というプロセッシング過程をへての中で、miRNAとsiRNAのどちらが速やかに成熟RISCを形成するのか、Ago1依存RISCとAgo2依存RISCのどちらがより効率的に標的mRNAをサイレンシングするのか、などRNA干渉に与える様々な影響に関する知見が得られると期待できる。

結果と考察

21塩基長siRNA

HeLa細胞に組み込んだEGFP遺伝子mRNA (212-232)を標的とする21塩基長でセンス鎖にミスマッチやバルジを有するsiRNAやmiRNA、miRNA様siRNAを合成し、サイレンシング効率を蛍光強度により測定した。siRNAは(株)ジーンデザイン社製全自動DNA / RNAオリゴヌクレオチド合成装置 n S-8IIを用いて、標準的なシアノエチルホスホアミダイト法に基づいて合成した。遺伝子サイレンシング効率の評価は、10% FBS存在下、5% CO₂雰囲気、37℃でEGFP-HeLa 3 x 10⁵ cells/mlに対して [siRNA] = 200 nMをHiPerfFect™により導入し、24時間後のEGFP発現量をマイクロプレートリーダーにより測定することにより行った。その結果をFigure 2に示す。

control siRNA (random)

sense 5'-UCUCGCUUGGGCGAGAGUAAtt-3'
antisense 5'-UUACUCUCGCCCAAGCGAGAtt-3'

siRNA 1 (native)

sense 5'-UACGGCAAGCUGACCCUGAag-3'
antisense 5'-UCAGGGUCAGCUUGCCGUagg-3'

siRNA 2 (3 mismatches) (G-U, A-C)

sense 5'-UACGGUAAGUUGACCCUAAag-3'
antisense 5'-UCAGGGUCAGCUUGCCGUagg-3'

siRNA 3 (2 mismatches) (G-U, A-C)

sense 5'-UACGGUAAGCUGACCCUAAag-3'
antisense 5'-UCAGGGUCAGCUUGCCGUagg-3'

siRNA 4 (3 bulges)

sense 5'-UACGG-AAG-UGACCCU-Aag-3'
antisense 5'-UCAGGGUCAGCUUGCCGUagg-3'

siRNA 5 (2 bulges)

sense 5'-UACGG-AAGCUGACCCU-Aag-3'
antisense 5'-UCAGGGUCAGCUUGCCGUagg-3'

*小文字はDNA、大文字はRNAを表す。

いずれのケースでもそれぞれ濃度依存的なRNA干渉効果が観測された。ネイティブなsiRNA 1と2つのミスマッチを有するsiRNA 3を比較するとsiRNA 3の方が強いサイレンシング効果を示した。この結果は、両端の2つのミスマッチによりunwindingが速やかに進み、より効率よく標的mRNAをサイレンシングした結果と解釈することができる。

また、ネイティブなsiRNA 1と3つのミスマッチを有す

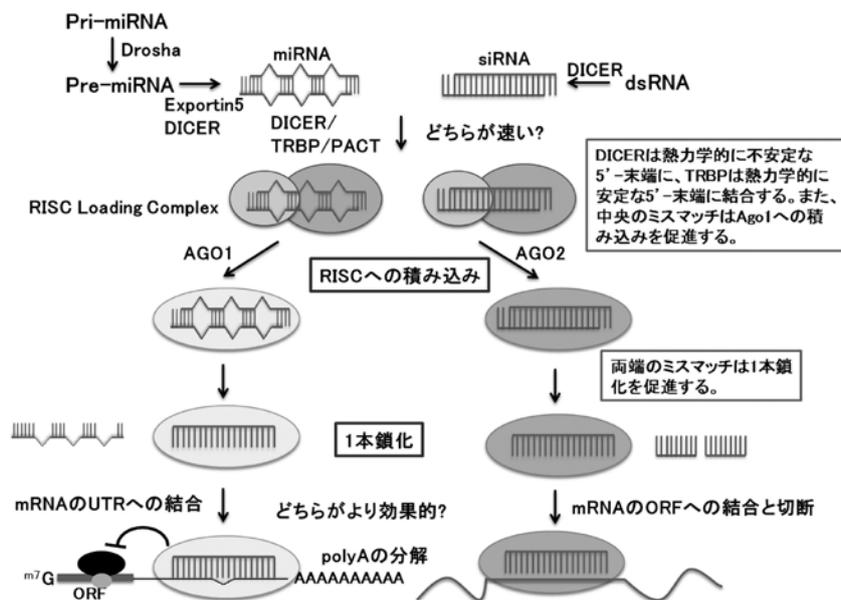
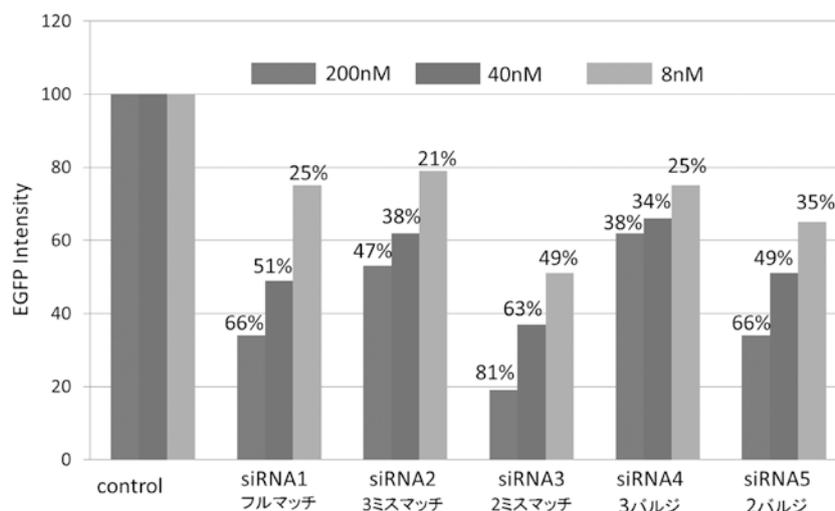


Figure 1. RNA干渉のsiRNA経路とmiRNA経路



EGFP-HeLa 3×10^5 cells/ml, [siRNA] = 200 nM, transfected by HiPerFect™, 10% FBS, 5% CO₂, 37 °C, 24 h.

Figure 2. ミスマッチやバルジを有する21塩基長siRNAによるRNA干渉効果

る **siRNA 2** を比較すると、**siRNA 1** の方がより強いサイレンシング効果を示した。さらには、3つのミスマッチを有する **siRNA 2** と2つのミスマッチを有する **siRNA 3** を比較すると、**siRNA 3** の方が強いサイレンシング効果を示した。**siRNA 2** は中央にミスマッチを有しており、Ago1への取り込みが促進されてmiRNA経路によりRNA干渉効果を示したと考えられる。一方、**siRNA 1** および **siRNA 3** では中央にミスマッチがなくAgo2への取り込みが促進されて、siRNA経路によりRNA干渉効果を示したと考えられる。したがって、Ago2によるmRNAの切断を伴うsiRNA経路のサイレンシング効果の方がAgo1依存RISCによる立体的な障害によるmiRNA経路のサイレンシング効果よりも強いことが示唆された。

同様に、3つのバルジを有する **siRNA 4** と2つのバルジを有する **siRNA 5** を比較すると、**siRNA 5** の方が強いサイレンシング効果を示した。**siRNA 4** は中央にバルジを有しており、Ago1への取り込みが促進されてmiRNA経路によりRNA干渉効果を示したと考えられる。一方、**siRNA 5** では中央にバルジがなくAgo2への取り込みが促進されて、siRNA経路によりRNA干渉効果を示したと考えられる。これらの結果は、上記と同様にsiRNA経路のサイレンシング効果の方がmiRNA経路のサイレンシング効果よりも強いことを支持している。(Figure 3)

また、3つのミスマッチを有する **siRNA 2** と3つのバルジを有する **siRNA 4**、2つのミスマッチを有する **siRNA 3** と2つのバルジを有する **siRNA 5** をそれぞれ比較すると、**siRNA 2** と **siRNA 3** の方がより大きなサイレンシング効果を示した。この結果よりバルジよりもミスマッチの方が成熟RISC形成に有利に働いたと考えられる。

これらの結果より、siRNAの中央付近に存在するミスマッチはAgo1への取り込みが促進されてmiRNA経路へと誘導し、中央付近にミスマッチがない場合はAgo2への取り込みが促進されてsiRNA経路へと誘導されること、そして、miRNA経路におけるAgo1-RISCによるRNA干渉効果よりもsiRNA経路におけるAgo2-RISCによるRNA干渉効果の方が強力であることが強く示唆された。さらには、両端に2つのミスマッチを有するsiRNAではunwindingが速やかに進行するためにより効率的なサイレンシング効果を示したと考えられる。

27塩基長siRNA

長鎖2本鎖RNAから21塩基長siRNAまたはpre-miRNAからmiRNAへの過程ではDICERによるプロセシングが不可欠である。ヒトDICERはsiRNAの両末端のうち熱力学的に不安定な末端に結合し、反対側の熱力学的に安定な末端にはTRBPまたはPACT (protein activator of RNA-dependent protein kinase) が結合することが報告されている¹⁹⁾。また、ヒトDICERはsiRNA前駆体のプロセシングよりもpre-miRNAのプロセシングを100倍速く触媒するという報告もある²⁰⁾。また、siRNA前駆体のプロセシングによりRISCローディング複合体の形成が促進され、RNA干渉の効率が向上することも観測されている²¹⁾。さらには、Ago2による鎖選択活性はDICERおよびTRBPまたはPACTと複合体を形成することにより向上するとの結果も得られている²²⁾。

これらの知見に基づいて、本研究では27塩基長で3'-末端または5'-末端に平滑末端を、その反対の末端に3'-末端2塩基オーバーハングを有し、さらに2か所または3か

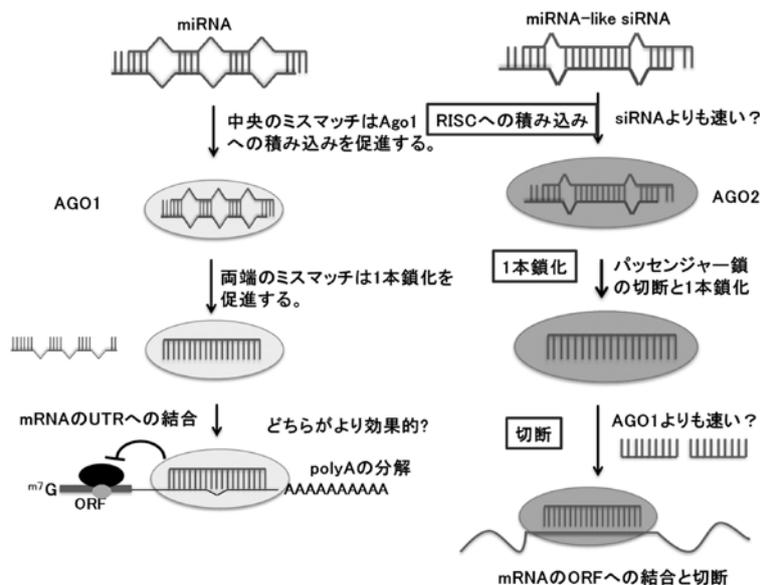


Figure 3. 中央のミスマッチのRNA干渉効果への影響

所のミスマッチを有する特殊な構造のsiRNA前駆体を合成し、それらのRNA干渉効果を評価した。作業仮説として、27塩基長であることによりDICERによるプロセッシングを受けるため、DICERが結合するであろう熱力学的により不安定な側に5'-末端を有するRNA鎖がガイド鎖として選択されやすくなり、ミスマッチを導入することによりDICERによるプロセッシングが加速されると予測される。その上で、21塩基長siRNAを用いた上記の研究結果より明らかのように、中央付近のミスマッチの有無により意図的にsiRNA経路とmiRNA経路を制御し、seed領域と3'-末端付近へのミスマッチ導入によりunwindingを加速できれば、より効率の高いsiRNA分子がデザインできるものと期待できる。

前述の実験と同様に、HeLa細胞に組み込んだEGFP遺伝子mRNA (212-232) を標的とする27塩基長でセンス鎖にミスマッチや塩基欠損(バルジ)を有するsiRNA前駆体を合成し、それらのサイレンシング効率を蛍光強度により測定した。10% FBS存在下、5% CO₂雰囲気、37℃でEGFP-HeLa 3 x 10⁵ cells/mlに対して [siRNA] = 200 nMをHiPerFect™により導入し、24時間後のEGFP発現量をマイクロプレートリーダーにより測定した。その結果をFigure 4に示す。

control siRNA (random)

sense 5'-UCUCGCUUGGGCGAGAGUAAtt-3'
antisense 5'-UUACUCUCGCCCAAGCGAGAtt-3'

siRNA 6 (native 21nt)

sense 5'-UACGGCAAGCUGACCCUGAag-3'

antisense 5'-UCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3'

siRNA 7 (27nt-3'-blunt end)

sense 5'-GCCACCUACGGCAAGCUGACCCUGAag-3'
antisense 5'-UCAGGGUCAGCUUGCCGUAGGUGGC-3'

siRNA 8 (27nt-3'-blunt end 3 mismatches)

sense 5'-GCCACCUACGGUAAGUUGACCCUAAag-3'
antisense 5'-UCAGGGUCAGCUUGCCGUAGGUGGC-3'

siRNA 9 (27nt-3'-blunt end 2 mismatches)

sense 5'-GCCACCUACGGUAAGCUGACCCUAAag-3'
antisense 5'-UCAGGGUCAGCUUGCCGUAGGUGGC-3'

siRNA 10 (27nt-5'-blunt end)

sense 5'-UACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUCA-3'
antisense 5'-UGAACUUCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3'

siRNA 11 (27nt-5'-blunt end 3 mismatches)

sense 5'-UACGGUAAGUUGACCCUAAA GUUCA-3'
antisense 5'-UGAACUUCAGGGUCAGCUU GCCGUAgg-3'

siRNA 12 (27nt-5'-blunt end 2 mismatches)

sense 5'-UACGGUAAGCUGACCCUAAAGUUCA-3'
antisense 5'-UGAACUUCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3'

*小文字はDNA、大文字はRNAを表す。

siRNA 7、siRNA 8、siRNA 9はアンチセンス鎖3'-末端が平滑末端となっており、siRNA 10、siRNA 11、siRNA 12はアンチセンス鎖5'-末端が平滑末端となっている。また、siRNA 7とsiRNA 10はフルマッチ、siRNA 8とsiRNA 11は2か所にミスマッチ、siRNA 9とsiRNA 12は3か所にミスマッチをそれぞれ有している。siRNA 7とsiRNA 10、siRNA 8とsiRNA 11、siRNA 9とsiRNA 12のRNA干渉効果

をそれぞれ比較すると、アンチセンス鎖5'-末端が平滑末端となっている **siRNA 10**、**siRNA 11**、**siRNA 12**の方がアンチセンス鎖3'-末端が平滑末端となっている **siRNA 7**、**siRNA 8**、**siRNA 9**よりも強いサイレンシング効果を示した。

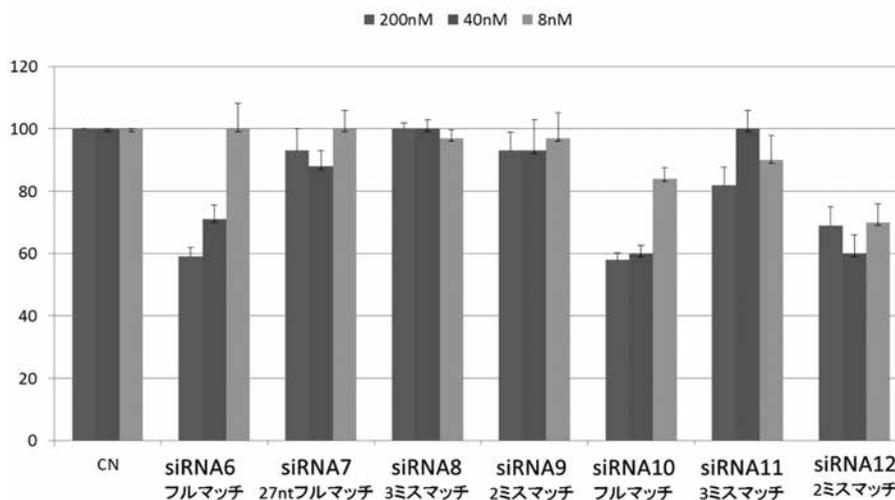
これらの結果より、平滑末端となっている5'-末端にDICERが結合してプロセシングすることにより、アンチセンス鎖がガイド鎖として選択される確率を向上させたことが示唆された。中央付近にミスマッチを有する **siRNA 12**はフルマッチの **siRNA 10**および両端に2か所のミスマッチを有する **siRNA 11**よりもRNA干渉効果が劣る結果となった。このことは、中央にあるミスマッチを有する **siRNA 12**はAgo1への結合が優先し、miRNA経路へと誘導されたために、Ago2への結合が優先し、siRNA経路へと誘導された **siRNA 10**および **siRNA 11**よりもRNA干渉効果が弱かったと解釈することができる。また、ミスマッチを有する **siRNA 8**および **siRNA 9**はフルマッチの **siRNA 7**よりもRNA干渉効果が弱く、ミスマッチを有する **siRNA 11**および **siRNA 12**はフルマッチの **siRNA 10**のRNA干渉効果を上回ることはなかった。したがって、当初予測したミスマッチ構造を有するmiRNAの方がsiRNAよりもDICERによるプロセシングが早く、それによってRNA干渉効果が向上するとの予測は今回の実験結果からは観察できなかった。

結論

以上の結果より、中央のミスマッチ、バルジはサイレンシング効果を低下させることが判明した。中央のミスマッチ、バルジによりAgo1への積み込みが促進され、Ago1を含むRISCはmRNAのORFへの結合、サイレンシング効果が弱い可能性が示唆された。シード領域、3'-末端領域のミスマッチはunwindingを促進し、サイレンシング効果を向上させた。21塩基長、27塩基長ともに、miRNA経路とsiRNA経路を比較すると、siRNA経路の方がサイレンシング効果は大きくなった。ゲノムにコードされたmiRNAは常に遺伝子発現調節に関与しているが、標的遺伝子の働きを徹底的に抑制するのではなく、程よく調節していると考えられる。一方、siRNA経路は、外部から侵入したウイルスなどのdsRNAを分解するための免疫機構のようなもので、切断活性により標的RNAを徹底的に排除しようとするために、siRNA経路はmiRNA経路よりも強力に標的遺伝子を抑制するものと考えられる。

ミスマッチとバルジを比較すると、天然のmiRNAはミスマッチを有しているため、miRNAの構造により近いミスマッチの方がよりプロセシングに関与する一連のタンパク質に感度よく認識されるため、ミスマッチ構造を有するsiRNAの方が高いRNA干渉効果を示したと考えられる。

本研究により、ミスマッチ、バルジの位置によりDICER-TRBP/PACTによる認識、RISCへの積み込み、unwinding、Ago2-RISCとAgo1-RISCとの機構のなどに差が表れ、siRNAの最適構造のデザインに有効な示唆が得られた。



EGFP-HeLa 3×10^5 cells/ml, [siRNA] = 200 nM, transfected by HiPerfect™, 10% FBS, 5% CO₂, 37 °C, 24 h.

Figure 4. ミスマッチを有する27塩基長siRN前駆体によるRNA干渉効果

謝辞

この研究の一部は日本学術振興機構科学研究費補助金基盤研究 (C) 25410182により補助されています。

参考文献

- 1) Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, 391 (6669): 806-811.
- 2) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **2001**, 411 (6836): 494-498.
- 3) Richard W. Carthew, Erik J. Sontheimer, Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, **2009**, 136 (4), 642-655.
- 4) Gunter Meister & Thomas Tuschl, Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA, *Nature*, **2004**, 431, 343-349.
- 5) Carl D. Novina, Michael F. Murray, Derek M. Dykxhoorn, Paul J. Beresford, Jonathan Riess, Sang-Kyung Lee, Ronald G. Collman, Judy Lieberman, Premalata Shankar & Phillip A. Sharp. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nature Medicine*, **2002**, 8, 681-686.
- 6) Marco Antonio Valencia-Sanchez, Jidong Liu, Gregory J. Hannon, and Roy Parker, Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs, *Genes & Dev.* **2006**, 20: 515-524. Richard W. Carthew, Erik J. Sontheimer, Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs, *Cell*, **2009**, 136 (4), 642-655.
- 7) Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, **2005**, 433 (7027), 769-773.
- 8) La Torre A., Georgi S., Reh T.A. Conserved microRNA pathway regulates developmental timing of retinal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2013**, 110, E2362-E2370.
- 9) Le M.T.N., Xie H., Zhou B., Chia P.H., Rizk P., Um M., Udolph G., Yang H., Lim B., Lodish H.F. MicroRNA-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple targets. *Mol. Cell. Biol.*, **2009**, 29, 5290-5305.
- 10) Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, **2005**, 436 (7048), 214-220.
- 11) Körner C., Keklikoglou I., Bender C., Wörner A., Münstermann E., Wiemann S. MicroRNA-31 sensitizes human breast cells to apoptosis by direct targeting of protein kinase C epsilon (PKCepsilon). *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 8750-8761.
- 12) Michael T McManus, MicroRNAs and cancer, *Seminars in Cancer Biology*, **2003**, 13(4), 253-258. Bert Vogelstein, Nickolas Papadopoulos, Victor E. Velculescu, Shibin Zhou, Luis A. Diaz Jr., Kenneth W. Kinzler, Cancer Genome Landscapes, *Science*, **2013**, 339 (6127) 1546-1558.
- 13) Wisløff U, Najjar SM, Ellingsen O, Haram PM, Swoap S, Al-Share Q, Fernström M, Rezaei K, Lee SJ, Koch LG, Britton SL. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science*, **2005**, 307 (5708), 418-420.
- 14) Chisato Kinoshita, Koji Aoyama, Nobuko Matsumura, Kazue Kikuchi-Utsumi, Masahiko Watabe & Toshio Nakaki. Rhythmic oscillations of the microRNA miR-96-5p play a neuroprotective role by indirectly regulating glutathione levels. *Nature Communications*, **2014**, 5 (3823), 1-10.
- 15) Carrie Wright, Jessica A. Turner, Vince D. Calhoun and Nora Perrone-Bizzozero. Potential Impact of miR-137 and Its Targets in Schizophrenia. *Front Genet.* **2013**, 4, 58.
- 16) Jenny Buckland. Biomarkers: MicroRNAs under the spotlight in inflammatory arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, **2010**, 6, 436.
- 17) Qinghua Jiang, Yadong Wang, Yangyang Hao, Liran Juan, Mingxiang Teng, Xinjun Zhang, Meimei Li, Guohua Wang and Yunlong Liu, miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease, *Nucl. Acids Res.*, **2009**, 37 (suppl 1), D98-D104.
- 18) Kawamata, T., Seitz, H. & Tomari, Y.: Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2009**, 16, 953-960.
- 19) Noland CL, Ma E, Doudna JA., siRNA repositioning for guide strand selection by human Dicer complexes. *Mol Cell.* **2011**, 43(1), 110-121. Heyam A, Lagos D, Plevin M., Dissecting the roles of TRBP and PACT in double-stranded RNA recognition and processing of noncoding RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* **2015**, 6(3), 271-289.
- 20) Chakravarthy S1, Sternberg SH, Kellenberger CA, Doudna JA. Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing. *J Mol Biol.* **2010**, 404(3), 392-402.
- 21) Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R., Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* **2005**, 123(4), 631-640. Maniataki E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev.* **2005**, 19(24), 2979-2990.
- 22) Noland CL, Doudna JA., Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways. *RNA.* **2013**, 19(5), 639-648.