

Identification of *Caenorhabditis elegans* microRNA target using a neural network

신경망을 이용한 예쁜 꼬마 선충 microRNA target 예측

Wha-Jin Lee^{1,2,3}, Byoung-Tak Zhang^{1,2,3*}

¹ Graduate Program in Bioinformatics

² Center for Bioinformation Technology

³ Biointelligence Laboratory, School of Computer Science and Engineering ,
Seoul National University, Seoul 151 -742, Korea

*To whom correspondence should be addressed. E -mail: btzhang@bi.snu.ac.kr

Abstract

microRNA (miRNA)는 21-25 nucleotide (nt)의 single-stranded RNA 분자로서 mRNA의 3' untranslated region (3' UTR)에 상보적으로 결합하여 유전자 발현을 제어하는 새로운 조절물질이다. 지금까지 실험을 통해 수백 개의 miRNA가 알려져 있으나, miRNA에 의해 조절되는 target 유전자는 실험상의 어려움으로 아직까지 거의 알려지지 않았다. miRNA는 서열의 길이가 짧고 target과 느슨한 상보적 결합을 하기 때문에 기존의 서열 비교 방법으로 miRNA의 target을 찾는 것은 쉬운 일이 아니다. 본 논문은 신경망을 이용하여 *Caenorhabditis elegans* mRNA의 3' UTR에서 miRNA가 결합하는 영역을 예측하였다. 신경망은 복잡한 비 선형 데이터를 잘 분리해내고 불완전하고 잡음이 많은 입력에 강하기 때문에 miRNA target 예측에 적합하다. miRNA와 mRNA의 결합 영역을 다양하게 분석하였고 민감도 0.59, 특수도 0.99의 성능을 갖는 신경망을 구현하였다. 신경망 입력 값을 달리하여 각각의 특성이 결과에 미치는 영향을 분석하였고 기존 예측 방법에 의한 결과와 비교하여 성능을 평가하였다.

Introduction

microRNA (miRNA)는 21-25 nucleotide (nt)의 RNA 분자로서 mRNA의 번역을 억제하여 진핵 생물의 유전자 발현을 직접 제어하는 역할을 한다 [1][15]. 최초의 microRNA (primary miRNA/pri-miRNA)는 핵 안에서 Drosha라는 RNaseIII type 효소에 의해 70-

90nt 정도의 stem-loop 구조로 만들어지고, 이후 세포질로 이동하여 Dicer라는 효소에 의해 21-25 nt의 성숙한 miRNA (mature miRNA)로 만들어진다 [2]. 일부 miRNA의 염기 서열은 종간의 보존도가 매우 높아 중요한 생명 현상에 관여할 것으로 추측하고 있는데 [16][17] 최근 세포 분화와 사멸, 초파리의 지방 대사 [11][12], 식물에서 꽃과 잎의 발생 과정 등에 [13] 관여하는 것으로

본 연구는 과학기술부의 국가 지정 연구실 사업에 의해 지원되었음

밝혀지고 있다. 그러나 실험적인 어려움으로 인하여 대다수의 miRNA들의 기능은 아직 밝혀지지 않은 상태이다. 그러므로 miRNA가 조절하는 target mRNA를 계산학적인 방법을 통해 예측하는 것은 miRNA의 기능을 밝히는데 크게 기여할 수 있다.

성숙한 miRNA는 mRNA 3' UTR에 불완전 결합하여 한 개 이상의 염기가 불일치 (mismatch)하거나 루프 구조를 형성한다. miRNA는 target과 상보 결합 하는 서열의 길이가 짧기 때문에 기존의 서열 비교 방법으로 miRNA의 target을 찾는 것은 쉬운 일이 아니다. 그래서 miRNA의 기능을 밝히기 위해 최근 생물 정보학 적인 (bioinformatics) 관점에서 접근한 miRNA target 예측 방법들이 발표되었다 [6][7][8]. 그러나 이러한 방법들은 단순히 miRNA와 mRNA간의 자유 에너지 (free energy)와 결합 빈도만을 통계적으로 비교하는데 그쳤기 때문에 false positive의 비율이 높다. Stark et al.의 논문의 경우 최초로 자유 에너지와 종간의 보존도를 토대로 miRNA target 후보를 (candidate) 계산하여 컴퓨터상에서 target 예측의 가능성을 제시하였으나 성능을 어떻게 평가할지에 대해서 의문점을 남겨두었다. Lewis et al.의 논문 역시 종간의 보존도를 중요한 척도로 사용했기 때문에 아직 다른 종에서 발견되지 않은 miRNA는 데이터로 사용되기 힘들고 miRNA와 mRNA 3' UTR이 결합할 때 자유 에너지를 보지 않고 결합 염기 쌍의 개수를 기반으로 검색해간다는 단점이 있다.

본 논문에서는 자유 에너지를 기준으로 서열을 검색하고 G/U wobble pair정보와 seed의 자유 에너지 정보를 이용함으로써 이러한 단점들을 극복하고 정확하고 효율적으로

miRNA와 mRNA 3' UTR의 특성(features) 분석하여 예쁜 꼬마 선충 (Caenorhabditis elegans) mRNA의 3' UTR에서 miRNA가 결합하는 영역을 예측하였다. 신경망은 복잡한 비 선형의 데이터를 잘 분리해낼 뿐만 아니라 불완전하고 잡음이 많은 입력에 강하고 특정 분야의 지식이나 휴리스틱 데이터를 네트워크 구조에 쉽게 반영할 수 있어 miRNA target 예측에 적합하다.

그림 1은 miRNA target 서열을 예측하는 신경망의 구조를 나타낸다. 양성 데이터 (positive data)와 음성 데이터 (negative data) 1199쌍을 miRNA target이 갖는 특성에 따라 weka3.4라는 프로그램을 통해 학습하고 target 서열 인지 아닌지를 예측하였다. 5-fold cross validation 결과, 민감도 0.59,는 특수도는 0.99, 결과에 대한 신뢰도인 VPP는 0.61으로 평가되었다.

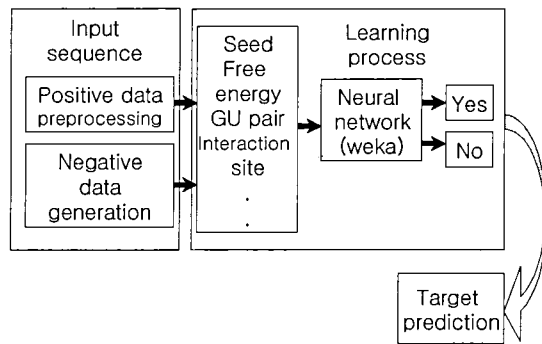


그림 1. 프로그램 흐름도

Materials and Methods

Training and Test Data

학습 데이터 (training data)중 양성 데이터(positive data)는 실험적으로 증명된 34개의 예쁜 꼬마 선충 miRNA:target site 쌍을 사용하였다 (lin-14/ cel-let-7, lin-14/ cel-lin-4, lin-28/ cel-lin-4, lin-28/ cel-let-7, lin-41/ cel-lin-4,

lin-41/ cel-let-7, daf-12/ cel-let-7, hbl/ cel-lin-4, hbl/ cel-let-7, hbl/cel-miR-69) [9][14].

랜덤 하게 생성한 miRNA 18~25mer와 3' UTR (ftp://bigghost.ba.itb.cnr.it/pub/Embnet/Database/UTR/data/)사이 에 결합하는 pair를 1165쌍 추출하여 음성 데이터 (negative data) 로 사용하였다. 음성 데이터의 추출 기준은 랜덤 서열의 5' 영역과 5개 이상 상보적으로 결합하고 그 영역을 포함하여 열역학적으로 가장 안정적인(thermodynamic) 서열을 찾아 그것의 자유 에너지가 일정 임계점인 -8.5kcal/mole 이하인 서열이다. Rfam 데이터 베이스의 예쁜 꼬마 선충의 miRNA 117개와 그것과 결합하는 mRNA 3' UTR pair 데이터로 결과를 검증하였다.

검증된 miRNA target 서열의 특징(Features)

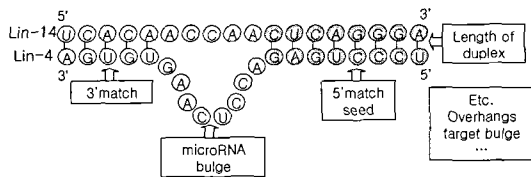


그림 2. miRNA:target 서열의 작용 구조

그림 2는 miRNA와 해당하는 target이 작용하는 구조를 나타낸다. miRNA 약 22nt가 mRNA 3' UTR 영역 중 화학적으로 친화력을(affinity)를 갖는 영역에 결합하여 mRNA의 번역을 억제한다. 실험으로 검증된 miRNA target의 서열을 살펴보면 miRNA 3' 영역의 일치(match), miRNA의 bulge, mRNA 3'-UTR의 bulge, miRNA 5' 영역의 일치, miRNA 5' flanking 영역 등의 구조를 공통적으로 갖는다.

miRNA target을 인식하는데 miRNA seed라 불리는 miRNA의 5' 쪽 여덟 개의 염기

가 가장 중요한 것으로 보인다 [8]. miRNA가 작용하는 target 서열의 패턴을 분석한 결과 miRNA 5' 영역의 보존도가 매우 높아 miRNA와 작용하는데 핵심 요소라고 판단하였다. miRNA seed의 서열에 돌연변이를 (mutation) 생성하여 서열 구조와 자유 에너지의 변화에 따른 miRNA target 서열의 발현량을 보면 자유 에너지가 약 -6kcal/mole 이상일 때 활성화 되는 것으로 나타나 이를 뒷받침 하였다 [10]. 이에 반해 miRNA 3' 영역의 경우 miRNA seed 영역 보다 영향을 덜 받는 것으로 나타났다. 그러나 miRNA seed 부분이 완벽한 상보적 결합을 한 경우에는 miRNA의 3' 영역에 불일치가(mismatch) 많아도 발현량이 일정하지만 miRNA의 5' 영역이 불일치를 허용한 상보적 결합일 경우 miRNA 3' 영역의 자유 에너지가 발현량에 큰 영향을 주는 것으로 나타났다. 즉 miRNA seed의 자유 에너지가 mRNA의 발현 저해 여부를 결정 짓는 가장 큰 요인이지만 miRNA 3' 영역도 발현량에 영향을 미친다 [10]. 또한 적절한 자유 에너지를 갖는 경우라도 miRNA 5' 영역의 G:U 염기 쌍은 발현량을 저해 시키는 것으로 나타났다 [10].



그림 3. lin-14 mRNA의 3'UTR과 let7, lin-4의 예측 결합 빈도 예

그림 3은 lin-14 mRNA 3' UTR이 let-7, lin-4과 결합하는 위치를 보여준다. Lin-14와 결합하는 miRNA는 let-7, lin-4의 2개로 알려져 있으며 let-7은 7개, lin-4는 3개의 작용점을 갖고 있다 [9]. 이처럼 miRNA와 작용하는 mRNA는 한가지 이상의 miRNA에 의해

발현이 억제되고, 한 개 이상의 작용점을 갖는다. 억제의 정도는 mRNA와 miRNA 양과도 관련이 있고 한 개의 miRNA는 한 개 이상의 mRNA와 작용 하는 것으로 보인다. 실제로 let-7과 lin-4는 lin-28, lin-41과 같은 mRNA의 3' UTR과도 결합하는 것으로 알려져 있다.

신경망의 입력 데이터

표 1은 신경망 입력에 사용된 여덟 가지의 특징(feature)을 보여준다. RNA 2차 구조와 자유 에너지의 측정은 mfold 3.1을 사용하였다. mfold의 입력은 그림 4와같이 mRNA 바인딩 서열과 miRNA 사이에 “LLL”을 삽입하여 사용하였는데 “LLL”은 mfold에서 두 개의 분리된 RNA의 구조 예측을 위해 쓸 수 있다.

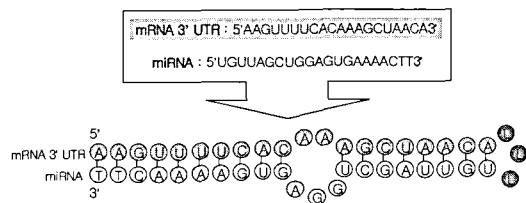


그림 4. mfold의 입력

- (1) miRNA seed에서 mRNA 3' UTR과 상보적으로 결합하는 염기의 개수
- (2) miRNA seed과 mRNA 3' UTR의 자유 에너지 (free energy)
- (3) miRNA:mRNA 3' UTR 결합 구조의 자유 에너지(initial free energy)
- (4) miRNA seed 영역의 G/U wobble pair 개수
- (5) 결합하는 전체 RNA 분자 중 G/U wobble pair 개수
- (6) miRNA:mRNA 3' UTR 결합 구조에서 상보적 결합을 하지 않은(mismatch) 염기

의 수

- (7) miRNA/mRNA 3' UTR 결합 구조에서 상보적으로 결합하는(match) 염기의 수
- (8) 한 개의 mRNA 3' UTR에 miRNA가 결합하는 작용점의 개수

표 1. 신경망의 입력

신경망 학습에는 Weka 3.4를 사용하였으며 miRNA target인지 아닌지를 판별하는 분류기로는 다층 퍼셉트론 (MLP: multi-layer perceptron)을 사용하였다. 양성 학습 데이터 34쌍, 음성 학습 데이터 1165쌍, 총 1199개의 샘플을 입력으로 사용하였으며 입력 노드는 8개, 출력 노드는 ‘예/아니오’의 2개이다. 은닉층은 한 개 층에 5개의 노드를 갖게 하였으며 학습율, 모멘텀, Decay는 각각 0.3, 0.2, False를 선택하였다. 속성 정규화(normalizeAttributes)는 True, Reset은 True, 학습회수는 700회(epoch) 확인 데이터(validationSetSize)는 0 확인 임계값(validationThreshold) 20회로 설정하였다. 위와 같은 설정 하에 5-fold cross validation으로 결과를 평가하였다.

Experiment Results

알고리즘의 성능

각 노드 사이의 가중치 초기화에 사용되는 랜덤 시드 값을 변경하여 5-fold cross validation 방법으로 평가한 결과를 표 2에서 보여준다. 민감도는 59%로 비교적 낮은 것으로 보이는데 그 이유는 training data의 개수가 워낙 적기 때문인 것으로 보인다. 비록 특이도가 높기는 하지만 결과에 대한 신뢰도인 PPV가 61%로 나타났다. 어떤 요인이 가장 성능에 영향을 미치는지 알아보기 위해 한가지 이상 특성을 제외하고 신경망

Random seed	TP	FN	FP	TN	민감도	특이도	PPV
0	17	17	10	1157	0.50	0.99	0.63
10	17	17	10	1157	0.50	0.99	0.63
100	17	17	11	1156	0.50	0.99	0.61
1000	20	14	13	1154	0.59	0.99	0.61
10000	14	20	12	1155	0.41	0.99	0.54
Mean	17.00	17.00	11.20	1155.80	0.50	0.99	0.60
s.d.	2.12	2.12	1.30	1.30	0.06	0.00	0.04

표 2. seed가 다를 때 민감도와 특이도 변화

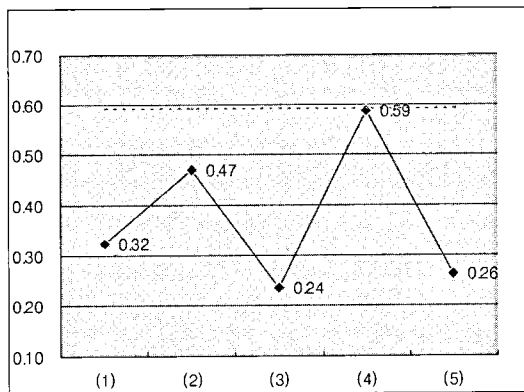


그림 5. 표 2에 나열된 각각의 요인이 신경망의 성능에 미치는 영향. 점선은 원래 실험의 민감도를 나타내고 실선은 표 2 각각에 해당하는 민감도이다.

을 실행시켜 보았다. 랜덤 시드를 1000으로 설정한 다섯 가지 실험 결과를 그림5에서 보여준다. 특이도는 99%를 유지하는 상황에서 표 3의 (1)부터 (5)의 조건에 따라 민감도의 변화를 보여주었다. 점선은 원래 신경망 결과의 민감도이고 실선은 각 다섯 가지 경우의 실험 결과이다. 각 경우가 갖는 값이 낮을수록 결과에 큰 영향을 미치는 요인이라고 할 수 있다.

가장 큰 변화를 보인 (3)번 실험에 의하면 seed 부분의 결합 구조와 작용점의

- (1) miRNA/mRNA 3' UTR 결합 구조에서 상보적으로 결합하는 염기의 수와 결합을 하지 않은 염기의 수를 제외
- (2) miRNA 결합 구조에서 G/U wobble pair의 개수를 제외
- (3) miRNA seed와 mRNA 3'UTR의 자유 에너지와 상보적으로 결합하는 염기의 개수를 제외
- (4) miRNA: mRNA 3'UTR 결합 구조의 자유 에너지를 제외
- (5) 작용점의 개수를 제외

표 3. 한가지 이상의 특성을 제외하고 신경망의 입력으로 넣은 다섯 가지 실험

수가 miRNA target을 결정 짓는 데 큰 영향을 미친다고 할 수 있다. (4)번 실험을 보면 miRNA:mRNA 3' UTR 결합 자유 에너지는 전혀 영향을 미치지 않는 것처럼 보인다. 하지만 음성 데이터를 만들 때 miRNA target 만큼의 안정적인 자유 에너지를 갖는 것만 추출한 것을 고려하면 위 결과만 가지고 영향을 미치지 않는다고 결론 내릴 수 없다. 위 결과를 통해 자유 에너지가 낮을 때 seed 부분의 결합 구조가 결과에 가장 큰 영향을 미치고 G:U wobble pair, miRNA: target의 작용점 개수, miRNA: target의 결합하는

miRNA	seed ΔG	ΔG	Vienna package 형식의 구조	embl	product
cel-miR-56*/gsa-1	-8.7	-16	..(((..(((.....(((.....))))..))))..)	AB003486	G PROTEIN ALPHA SUBUNIT
cel-miR-264/cePIF1	-7	-9.8((((.....)))).....	AB015041	unknown
cel-let-7/Unknown	-4.5	-13((((.....(((.....))))..))))..	AB017106	unknown
cel-miR-264/emk-1	-14.3	-28.7	..((((.....((((.....))))..))))..	AB021864	calcium/calmodulin-dependent protein kinase
cel-miR-90/Unknown	-3.4	-13.6	..(((.....(((.....))))..))..	AB023496	unknown
cel-miR-264/sek-1	-10.7	-15.9((((.....)))).....	AB024087	MAP KINASE KINASE SEK-1
cel-miR-264/eat-20a	-9.4	-15.2	..(((.....(((.....))))..))..	AB032748	unknown
cel-miR-38/msi-1	-7.1	-18.6	..((((.....((((.....))))..))))..	AB036738	fly neural family, RNA-binding protein involved in male mating behaviour

표 4. *C.elegans*에서 miRNA target 예측

miRNA-target Pair	seed ΔG	ΔG	Vienna package 형식의 구조	miRNA target 여부	신경망의 예측	References
Confirmed Pairs						
bantam/hid	-9.4	-11.9(((.....(((.....))))..)).....	yes	yes	Brennecke et al.(2003)
miR-7/E(spl)	-7.6	-16.1	..((((.....((((.....))))..))))..	yes	yes	Stark et al.(2003)
miR-7/Brd	-10.9	-22.2((((.....)))).....	yes	yes	Stark et al.(2003)
miR-2/reaper	-7.1	-25.7((((.....)))).....	yes	yes	Stark et al.(2003)
miR-2/grim				yes	-	Stark et al.(2003)
miR-26a/SMAD-1				yes	-	Lewis et al.(2003)
miR-23a/SDF-1	-6.9	-13.4	..(((.....(((.....))))..)).....	yes	yes	Lewis et al.(2003)
miR-23a/BRN-3b	-6.8	-13.4((((.....)))).....	yes	yes	Lewis et al.(2003)
miR-34/Delta1	-8.3	-13.5((((.....)))).....	yes	yes	Lewis et al.(2003)
miR-1/G6PD				yes	yes	Lewis et al.(2003)
miR-1/BDNF	-6.3	-8.6((((.....)))).....	yes	yes	Lewis et al.(2003)
miR-130/MCSF				yes	-	Lewis et al.(2003)
miR-19a/MECP-2				no	no	Lewis et al.(2003)
miR-34/VAMP-2				no	no	Lewis et al.(2003)
Predicted Pairs						
miR-4/hb				yes	-	Abrahante et al.(2003)
miR-3/hb	-11.7	-21.9(((.....(((.....))))..)).....	yes	yes	Abrahante et al.(2003)
miR-4/m4				yes	-	Lai(2002)
miR-7/HLHm3	-10.9	-25.1((((.....)))).....	yes	yes	Lai(2002)
miR-7/Tom	-10.9	-22.3((((.....)))).....	yes	yes	Lai(2002)

표 5. 다른 종에서의 miRNA target 예측

염기의 수는 false positive를 급격히 낮춘다는 것을 알 수 있다. 그래프에는 나타나지 않았지만 miRNA seed의 특성 중 miRNA seed에서 상보적으로 결합하는 염기 쌍의 개수보다 miRNA seed의 자유 에너지가 더 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

C.elegans miRNA target 예측

표 4는 *C.elegans*에서 miRNA target 서열을 찾은 결과이다. 이 표를 바탕으로 miRNA와 mRNA 발현 정도, GO 분석하면 더 정확한 예측을 할 수 있다.

성능을 검증하기 위하여 실험을 통해 증명된 miRNA:mRNA pair를 가지고 평가해보았다. 표 5는 다른 종에서의 miRNA를 예측해본 결과이다. Confirmed Pairs는 실험에 의해 증명된 데이터이고 Predicted Pairs는 miRNA target의 가능성이 높다고 논문에 언급된 데이터이다. miRNA는 종간에 보존도가 매우 높아서 비교적 좋은 결과를 보여준다.

Discussion

miRNA의 기능(function)을 연구하는데 있어서 한계점이 miRNA target을 찾는 데 어려움이 많다는 점이다. 본 논문은 miRNA와 그것과 결합하는 miRNA target 간의 특징을 분석하여 정확하고 효율적으로 target 유전자를 찾고자 하였다. 신경망의 입력을 다르게 주어 miRNA seed의 자유 에너지가 결합 여부를 결정 짓는 매우 중요한 요소라는 것을 실험을 통해 증명하였고, 결합 여부를 결정 짓는 것은 결합 염기 쌍의 수보다 결합 자유 에너지가 더 영향을 미치는 것을 알아냈다. 그러므로 G/C와 같은 단단한 결합이 많을수록 안정적이고 G/U wobble pair는 특히 miRNA seed영역에는 거의 나타나지

않는다. 또한 본 논문은 다른 종간의 보존도를 입력치로 사용하지 않았기 때문에 보존된 유전자가 밝혀지지 않은 경우에도 쓸 수 있는 장점이 있다.

신경망의 입력으로는 본 논문이 제시한 여덟 가지 특성 외에도 mRNA 3' UTR의 결합 부위 근처의 프로파일, mRNA 3' UTR의 종간 보존도, miRNA/mRNA 결합 구조를 루프나 bluge의 크기와 위치, 이중 서열의 길이 같은 2차 구조를 더 자세히 수치화 하여 입력에 추가할 수 있고 siRNA 생성 프로그램을 miRNA target 예측에 이용될 수도 있다. 또한 miRNA target여부는 miRNA와 mRNA 발현 정도, 생화학적인 방법, 유전적인 분석 등을 종합적으로 고려해서 판단해야 한다. 또한 지금까지 제시된 다른 방법들의 실험 결과와 통계적인 비교를 더 자세히 하거나 실제 실험을 통해 성능 검증이 필요한 것으로 보인다.

miRNA가 target 유전자에 어떻게 작용하는지 기작에 관한 연구는 miRNA/target의 구조적인 지식을 더욱 풍부하게 하여 miRNA target의 기능을 밝히는데 더 정확한 예측을 가능하게 할 것으로 생각된다. 또한 다양한 케이스 스터디를 통해 환경이나 특정 상황의 지식을 학습하는 것도 좋은 성과가 있을 것으로 기대된다.

References

- [1] Bartel, D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, in press, 2004
- [2] Lee, Y., Jeon, K., Lee, J., Kim, S., and Kim, V., microRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization, *EMBO Journal* 21:4663-70, 2002

- [3] Lim L.P., Glasner M.E., Yekta S., Burge C.B., and Bartel D.P. Vertebrate microRNA genes, *Science*, 299:1540. 2003
- [4] Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., and Tuschl T., Identification of novel genes coding for small expressed RNAs *Science*, 294:853-858., 2001
- [5] Dostie J., Mourelatos Z., Yang M., Sharma A., and Dreyfuss G. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs., *RNA*, 9:180-186. 2003
- [6] Enright, A.J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D.S. MicroRNA targets in *Drosophila*, *Genome Biol.* 5:R1., 2003
- [7] Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. Prediction of mammalian microRNA targets., *Cell* 115:787-798, 2003
- [8] Stark, A., Brennecke, J., Russell, R.B., and Cohen, S.M. Identification of *Drosophila* MicroRNA Targets, *Plos Biology* 1:1-13. 2003
- [9] Banerjee, D., Slack, F., Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. *BioEssays* 24 (2), 119-129. 2002.
- [10] John G. Doench and Phillip A. Sharp, Specificity of microRNA target selection in translational repression, *Genes Dev.*, 18(5):504-11, 2004
- [11] Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M., *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 113, 25-36, 2003
- [12] Xu. P., Vemooy, S.Y., Guo, M., and Hay, B.A., The *Drosophila* MicroRNA *Mir-14* suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr. Biol.* 13, 790-795, 2003
- [13] Aukerman, M.J., and Sakai, H., Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell* 15, 2730-2741, 2003
- [14] Lin, S.-Y., Johnson, S.M., Abraham, M., Vella, M.C., Pasquinelli, A., Gamberi, C., Gottlieb, E., Slack, F.J., The *C. elegans* hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. *Dev. Cell* 4 (5), 639-650, 2003
- [15] Lai, E.C., MicroRNAs: runts of the genome assert themselves *Curr. Biol.* 13, R925-R936, 2003
- [16] Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M., Maller, B., Srinivassan, A., Fishman, M., Hayward, D., Ball, E., et al., Conservation across animal phylogeny of the sequence and temporal regulation of the 21 nucleotide *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89, 2000
- [17] Aravin, A.A., Naumova, N.M., Tulin, A.A., Rozovsky Y.M., and Gvozdev, V.A., Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in *Drosophila melanogaster* germline. *Curr. Biol.* 11, 1017-1027, 2001