

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ОВЧИННИКОВ ВЛАДИМИР ЮРЬЕВИЧ

МИКРОРНК ТРЕМАТОД СЕМЕЙСТВА OPISTHORCHIIDAE

Генетика – 03.02.07

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Мордвинов Вячеслав Алексеевич

Новосибирск – 2017

Оглавление

1 ВВЕДЕНИЕ.....	5
2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
2.1 ХАРАКТЕРИСТИКА ОПИСТОРХИД.....	10
2.1.1 Положение описторхид в систематике.....	10
2.1.2 Строение мариты	10
2.1.3 Жизненный цикл	14
2.1.4 Распространение	16
2.1.5 Описторхоз	17
2.2 ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОРНК И ГЕНОВ МИКРОРНК ЖИВОТНЫХ.....	18
2.2.1 Организация генов микроРНК.....	18
2.2.2 Эволюция микроРНК	20
2.2.3 Биогенез микроРНК.....	23
2.2.4 микроРНК вне клетки.....	28
2.2.5 Механизмы регуляции экспрессии белок-кодирующих генов с участием микроРНК	28
2.3 Методы выявления микроРНК и генов микроРНК.....	31
2.4 Методы поиска мРНК-мишеней для микроРНК	33
2.5 Данные о микроРНК плоских червей	37
3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
3.1 РАЗВЕДЕНИЕ ПЛОСКИХ ЧЕРВЕЙ	40
3.2 ВЫДЕЛЕНИЕ РНК	40
3.3 СЕКВЕНИРОВАНИЕ	40
3.4 БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ	42
3.4.1 Предсказание микроРНК	42
3.4.2 Анализ расположения микроРНК генов в геноме.....	43
3.4.3 Предсказание белок-кодирующих генов.....	44
3.4.4 Филогенетический анализ микроРНК плоских червей	44
3.4.5 Предсказание мРНК-мишеней.....	45
3.4.6 Анализ экспрессии микроРНК	45

3.5 РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ	45
3.6 ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ	46
3.7 СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЭНГЕРУ	47
3.8 ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ДЛЯ ЦИФРОВОЙ КАПЕЛЬНОЙ ПЦР	48
3.9 СИНТЕЗ КДНК	49
3.10 ЦИФРОВАЯ КАПЕЛЬНАЯ ПЦР	49
4 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	50
4.1 РЕЗУЛЬТАТЫ КОМПЬЮТЕРНОГО ПРЕДСКАЗАНИЯ МИКРОРНК ОПИСТОРХИД .	50
4.2 ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ МИКРОРНК-ГЕНОВ	51
4.2.1 МИКРОРНК КЛАСТЕРЫ	52
4.2.2 Определение микроРНК-генов в геномах описторхид с использованием ПЦР	56
4.2.2.1 Кластер miR-71a/miR-2a/miR-2b/miR-2e	56
4.2.2.2 Кластер miR-71b/ miR-2f/miR-2d/miR-2c	59
4.2.3 Организация генов miR-1 и miR-133	60
4.2.4 Отсутствующий кластер.....	63
4.2.5 Интронные микроРНК.....	63
4.3 СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОРНК РЕПЕРТУАРА ПЛОСКИХ ЧЕРВЕЙ	67
4.4 КОМПЬЮТЕРНОЕ ПРЕДСКАЗАНИЕ МРНК-МИШЕНЕЙ ДЛЯ МИКРОРНК.....	69
4.5 АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК	70
5 ОБСУЖДЕНИЕ	76
6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
7 ВЫВОДЫ	85
8 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	86
9 СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ.....	87
10 СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	88
11 ПРИЛОЖЕНИЯ	109
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	109
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	110
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	120

ПРИЛОЖЕНИЕ 4	121
ПРИЛОЖЕНИЕ 5	122
ПРИЛОЖЕНИЕ 6	124
ПРИЛОЖЕНИЕ 7	127
ПРИЛОЖЕНИЕ 8	128
ПРИЛОЖЕНИЕ 9	130
ПРИЛОЖЕНИЕ 10	134
ПРИЛОЖЕНИЕ 11	136
ПРИЛОЖЕНИЕ 12	137
ПРИЛОЖЕНИЕ 13	156
ПРИЛОЖЕНИЕ 14	205
ПРИЛОЖЕНИЕ 15	206
ПРИЛОЖЕНИЕ 16	221

1 Введение

1.1 Актуальность темы исследования

Opisthorchis felineus, *O. viverrini* и *Clonorchis sinensis* (класс Trematoda, отряд Plagiorchiida, семейство Opisthorchiidae) – паразитические плоские черви со сложным жизненным циклом. Развитие гельминтов проходит со сменой двух промежуточных хозяев: пресноводных брюхоногих моллюсков и карповых рыб. Конечным хозяином являются плотоядные животные, включая человека [1,2]. *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* вызывают заболевание гепатобилиарной системы – описторхоз/клонорхоз. У человека данное заболевание отличается длительностью, может протекать с частыми обострениями или асимптоматически, и может способствовать возникновению рака печени [3–5]. *O. viverrini* и *C. sinensis* отнесены к 1-ой группе канцерогенов [6]. Установлено, что на территории Таиланда *O. viverrini* является одним из основных факторов риска развития холангиокарциномы [7]. *O. felineus* в настоящее время относят к 3-й группе канцерогенов (потенциально опасные для человека) [6].

C. sinensis и *O. viverrini* распространены в восточной и юго-восточной Азии; и *O. felineus* – на территории бывшего Советского Союза (особенно в западной Сибири, в бассейне реки Обь) и в некоторых европейских странах [8,9]. По предварительным оценкам, по меньшей мере, 1,2 миллиона человек в мире заражены *O. felineus*, 10 миллионов инфицированы *O. viverrini* и 35 миллионов – *C. sinensis* [10].

Известно, что во многих биологических процессах существенную роль играют микроРНК. Данные молекулы являются малыми некодирующими РНК (длина 18-25 нуклеотида (н.)), которые подавляют экспрессию мРНК на посттранскрипционном уровне. МикроРНК очень важны для развития любого многоклеточного организма. Они являются важными участниками регуляторных событий, определяющих характер экспрессии множества

белок-кодирующих генов [11]. Недавно были получены данные о том, что микроРНК обнаружены вне клеток в составе экзосом или в виде циркулирующих комплексов с белками [12–19]. Эти внеклеточные микроРНК стабильны и, вероятно, вовлечены в межклеточные взаимодействия. Важно отметить что, микроРНК паразитов недавно были обнаружены в крови организмов, зараженных *Schistosoma japonicum* [20] и *S. mansoni* [21], а также в экзосомах экскреторно-секреторного продукта *Dicrocoelium dendriticum* [22] и *Fasciola hepatica* [23]. Не исключено, что данные микроРНК могут быть вовлечены во взаимодействие “паразит-хозяин”, играть определённую роль в механизмах патогенеза заболевания и модуляции иммунного ответа, а также принимать участие в развитии осложнений гельминтозов, включая формирование злокачественных опухолей.

Несмотря на высокую медицинскую значимость *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*, эти трематоды слабо изучены на молекулярном уровне, особенно плохо изучены микроРНК паразитов. Таким образом, исследования микроРНК описторхид являются многообещающими в установлении молекулярных механизмов заболеваний, развития трематодозов и болезней, ассоциированных с этими паразитами. Кроме того, результаты исследования микроРНК описторхид могут быть использованы в будущем для разработки более совершенных диагностических инструментов.

1.2 Цели и задачи

Целью представленной работы является идентификация и функциональная аннотация микроРНК *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Определить *in silico* микроРНК *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*;
- 2) Провести сравнительный анализ консервативных микроРНК плоских червей разных классов;

- 3) Определить мРНК-мишени в транскриптомах *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*;
- 4) Провести анализ экспрессии генов микроРНК на разных стадиях жизненного цикла *O. felineus*.

1.3 Научная новизна работы

В данной работе впервые установлены нуклеотидные последовательности фракции малых РНК для *O. felineus* и *O. viverrini*, идентифицированы 55 консервативных микроРНК и одна “новая” микроРНК для *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*. Обнаружены 4 кластера генов микроРНК и 3 интронных микроРНК. Также впервые выявлены стадия-специфические микроРНК описторхид.

1.4 Теоретическая и практическая значимость работы

МикроРНК двух организмов (*O. felineus* и *O. viverrini*) описаны впервые. Результаты секвенирования фракции малых РНК трех описторхид депонированы в базе данных NCBI (PRJNA270708). Результаты данной работы представляют основу для дальнейших исследований молекулярных механизмов жизнедеятельности описторхид, взаимодействий паразита и хозяина и патогенеза трематодозов и заболеваний, ассоциированных с этими паразитами.

1.5 Положения, выносимые на защиту

- 1) Практически все зрелые микроРНК *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* обладают идентичными последовательностями.
- 2) Большинство генов, кодирующих микроРНК, не образует кластеров у плоских червей в отличие от генов микроРНК других представителей Lophotrochozoa.
- 3) Эндопаразитические плоские черви, принадлежащие к классам Trematoda и Cestoda, в отличие от свободноживущих и эктопаразитических плоских

червей утратили микроРНК из четырёх и восьми консервативных семейств микроРНК, соответственно.

1.6 Апробация результатов

Основные результаты данного исследования были представлены и обсуждены: на международной конференции “High-Throughput Sequencing in Genomics” (Новосибирск, 2013); на международной конференции “MCCMB-2013” (Москва, 2013); на международной конференции молодых ученых, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Кольцово, 2014); на международной конференции “The Non-Coding Genome” (Гейдельберг, Германия, 2015); на международной конференции “Molecular Helminthology: An Integrated Approach” (Гианис, США, 2017).

Материалы диссертации представлены в следующих работах:

- 1) Ovchinnikov V.Y., Afonnikov D.A., Vasiliev G.V., Kashina E.V., Sripa B., Mordvinov V.A., Katokhin A.V. Identification of microRNA genes in three opisthorchiids // PLOS Neglected Tropical Diseases. 2015. Vol.9, №4. :e0003680;
- 2) Fromm B., Ovchinnikov V., Høyе E., Bernal D., Hackenberg M., Marcilla A. On the presence and immunoregulatory functions of extracellular microRNAs in the trematode *Fasciola hepatica* // Parasite immunology. 2017. Vol. 39, №2. doi: 10.1111/pim.12399.
- 3) Ovchinnikov V.Y., Mordvinov V.A., Fromm B. Extreme conservation of miRNA complements in Opisthorchiids // Parasitology International. doi: 10.1101/146654

1.7 Вклад автора

Основная часть работы, представленная в диссертации, была выполнена автором самостоятельно. Выделение фракции малых РНК проведено с участием Кашиной Е.В. Подготовка библиотек для секвенирования выполнена к.б.н. Васильевым Г.В. первичная обработка

результатов секвенирования осуществлена при участии к.б.н. Афонникова Д.А.

1.8 Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка литературы, включающего 233 ссылок, работа изложена на 222 страницах, содержит 6 таблиц, 30 рисунков и 16 приложений.

1.9 Благодарности

Автор признателен профессору Срипе Б., д.б.н. Беспрозванных В. В. и к.б.н. Катохину А. В. за образцы *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*. Автор также признателен к.б.н. Васильеву Г. В. за помощь в выполнении работы. Отдельно хотелось бы поблагодарить к.б.н. Катохина А.В., к.б.н. Афонникова Д.А., Кашину Е.В., Пирожкову Д.С., доктора Фромма Б. за помощь в освоении методов, примененных в данной работе. Автор выражает искреннюю признательность доктору Фромму Б., доктору Дэниелу Л., к.б.н. Березикову Е. за ценные замечания при чтении и обсуждении данной работы, а также всему коллективу лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов за помощь, советы и поддержку.

2 Обзор литературы

2.1 Характеристика описторхид

2.1.1 Положение описторхид в систематике

Opisthorchis felineus, *O. viverrini* и *Clonorchis (Opisthorchis) sinensis* относятся к паразитическим плоским червям. Их систематическое положение можно описать следующим образом: надцарство Eukaryota, царство Metazoa, надтип Lophotrochozoa, тип Platyhelminthes, класс Trematoda, подкласс Digenea, отряд Plagiorchiida, подотряд Opisthorchiata, надсемейство Opisthorchioidea, семейство Opisthorchiidae (Рисунок 1) [1,2].

O. felineus, *O. viverrini* и *C.sinensis* – близкородственные виды. Однако степень их родства варьирует в разных исследованиях. Согласно первому варианту, *O. felineus* и *C.sinensis* ближе друг к другу, чем к *O. viverrini* [24], согласно второму *O. viverrini* и *C.sinensis* ближе друг к другу чем *O. felineus* [25].

2.1.2 Строение мариты

Морфологически взрослые черви *O. felineus*, *O. viverrini* и *C.sinensis* различаются в основном по форме и расположению семенников и расположению желточников (Рисунок 2). *C. sinensis* можно отличить от *O. viverrini* и *O. felineus* наличием разветвленных семенников и равномерно распределенных желточников. *O. viverrini* и *O. felineus* имеют дольчатые семенники и кластерные желточники, но у *O. viverrini* в отличие от *O. felineus* семенники обладают более выраженной дольчатостью, а желточники не сжаты поперек [26].

В остальном *O. felineus*, *O. viverrini* и *C.sinensis* очень похожи как по внешнему, так и по строению внутренних органов. Форма тела у трёх описторхид листовидная. Присутствуют две присоски, от которых и пошло

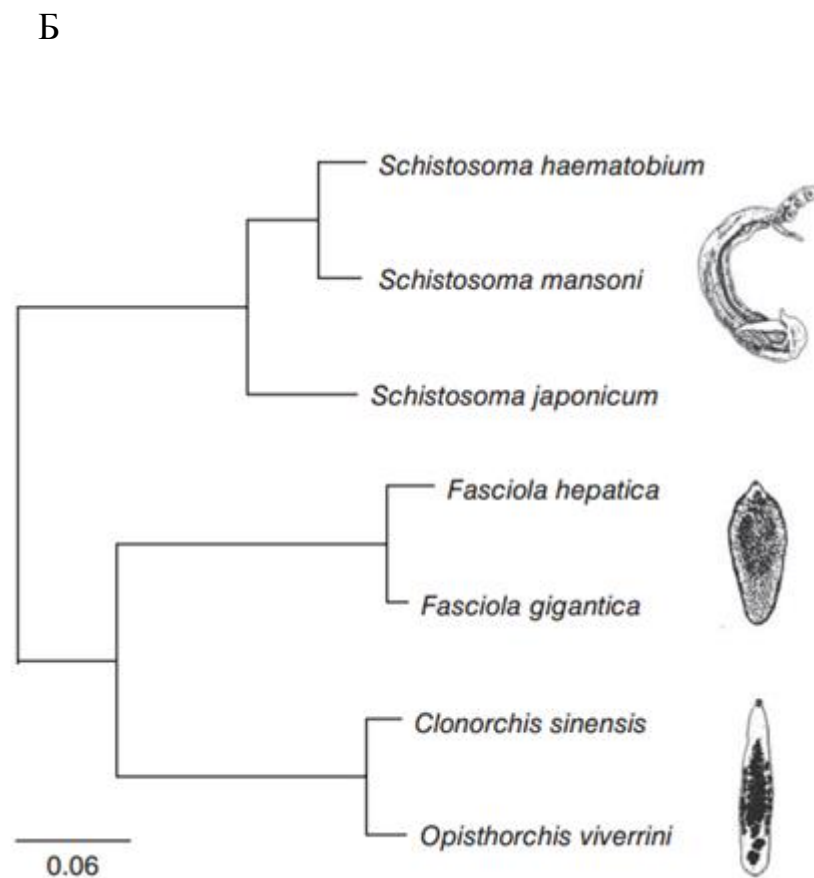
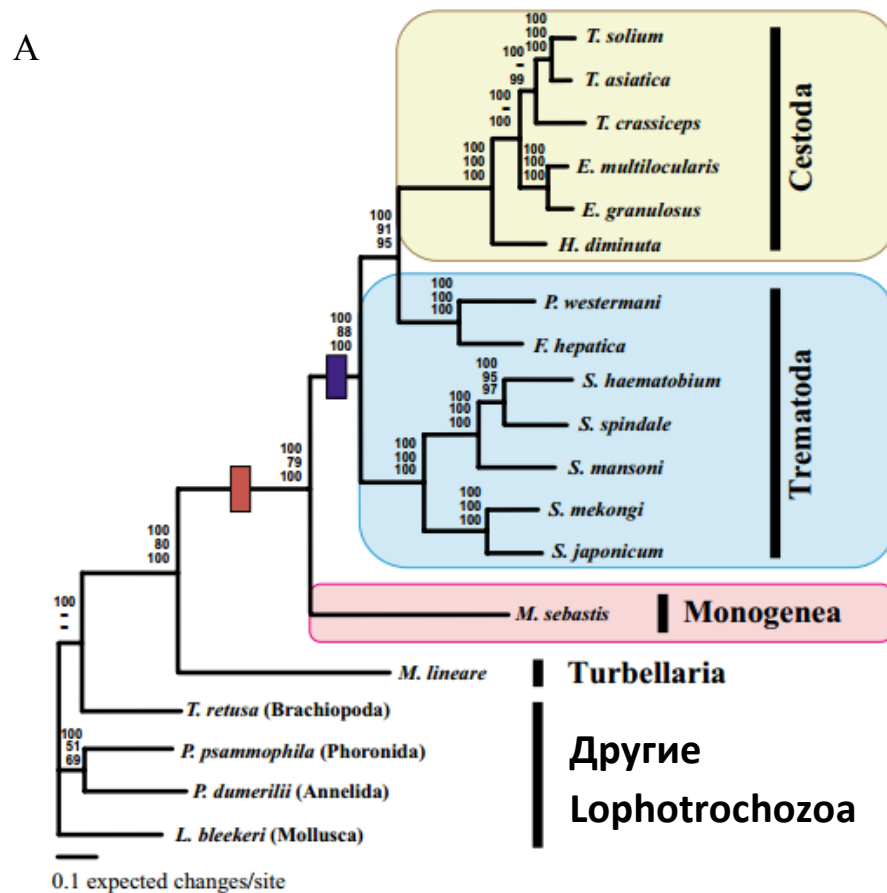


Рисунок 1. Филогенетические отношения описторхид к другим животным. А) Филогенетические отношения трематод к другим представителям Lophotrochozoa. Красный прямоугольник показывает переход от свободноживущего к эктопаразитическому образу жизни, синий – переход от эктопаразитизма к эндопаразитизму (модифицировано из [27]). Б) Филогенетические отношения описторхид (*C. sinensis* и *O. viverrini*) к остальным трематодам (взято из [28]).

название класса. Ротовая присоска субтерминальная, в то время как вентральная присоска расположена на одной пятой длины тела от ротовой. С помощью данных присосок описторхиды передвигаются по желчным протокам окончательного хозяина и закрепляются на стенках протоков.

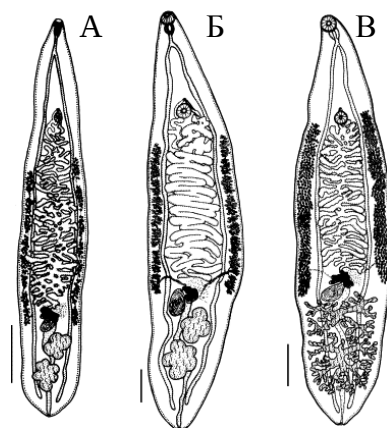


Рисунок 2. Мариты (взрослая особь) описторхид (взято из [26]): А) *O. viverrini*; Б) *O. felinus*; В) *C. sinensis*. (масштабная линейка = 1.0 мм).

Стоит отметить, что молодые (ювенильные) черви обладают шипиками. Шипики с зазубренным краем расположены на передней части и шипики с единственным острым краем – на средней части. Эти шипики в основном теряются у трематод в возрасте 1 недели и полностью исчезают у взрослых. Вероятно, эти шипики могут быть необходимы для передвижения молодых червей от двенадцатиперстной кишки до желчных протоков [26].

Внешний покров представляет собой тегумент (синцитиальный эпителий) (Рисунок 3). Тегумент трематод можно разделить на цитоплазматическую пластинку и на часть, содержащую ядра, которая залегает ниже слоя мышц. Тегумент содержит многочисленные шероховатые эндоплазматические сети, хорошо развитые комплексы Гольджи, рибосомы, митохондрии и тегументальные гранулы.

Пищеварительная система представлена следующим образом. На переднем конце тела описторхид расположено ротовое отверстие, ведущее в мускулистую глотку. Глотка продолжается в узкий пищевод, переходящий в

кишку, состоящую из двух ветвей, отходящих от пищевода и тянущихся по бокам тела кзади, где обе ветви заканчиваются слепо.

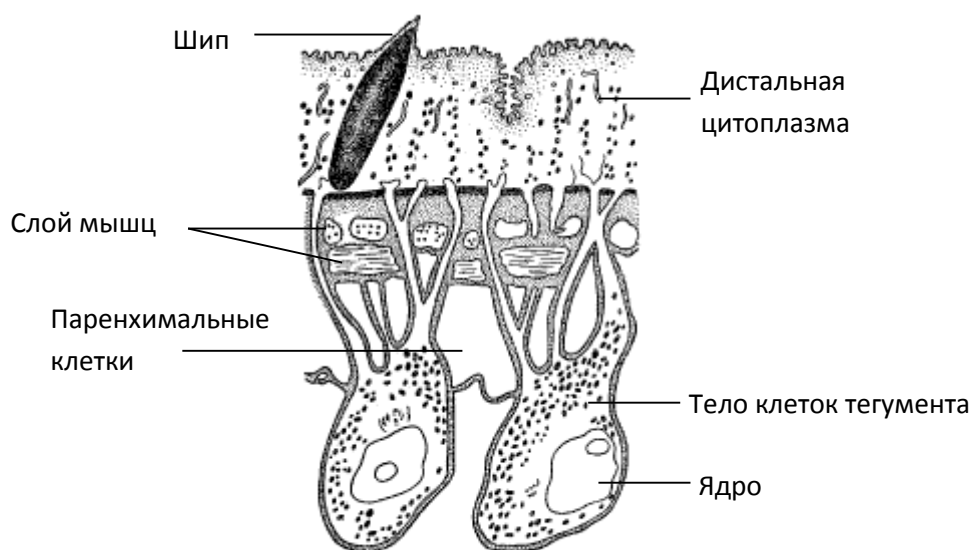


Рисунок 3. Строение внешних покровов трематод (взято из <http://bio.1september.ru/article.php?ID=200000705>).

Нервная система у трематод представлена нервными узлами, расположенными у глотки и отходящими от них нервными стволами.

Органы чувств развиты крайне слабо, что можно объяснить паразитическим образом жизни.

Выделительная система представлена двумя каналами, тянущимися вдоль тела, которые сливаются в непарный выделительный пузырь. В каждый канал впадает множество мелких боковых канальцев, оканчивающихся пламенными клетками.

Описторхиды являются гермафродитами, поэтому взрослая особь обладает как женскими, так и мужскими половыми органами. Два семенника расположены в задней части тела. От каждого отходят семявыносящие протоки, сливающиеся в общий семяпровод. Спиральный семенной пузырек впадает в эякуляторный проток, который открывается через половое отверстие непосредственно перед брюшной присоской. Совокупительные

органы (циррус и половая бурса) отсутствуют. Дольчатый яичник располагается впереди верхнего (переднего) семенника и рядом с семяприемником и Лауреровым каналом, функция которого – выведение из яйцевода избытков желточных клеток и сперматозоидов. Желточники состоят из многочисленных фолликул, расположенных группами в латеральных областях тела между вентральной присоской и семенниками. Все вышеперечисленные женские половые органы открываются в оотип, где происходит оформление оплодотворенных яиц. Оотип открывается в длинную извилистую матку, которая оканчивается половым отверстием у брюшной присоски [26,29].

2.1.3 Жизненный цикл

O. felineus, *O. viverrini* и *C. sinensis* обладают сложным жизненным циклом со сменой нескольких жизненных форм, как паразитических, так и свободно живущих (Рисунок 4).

Яйца описторхид вместе со сточными водами попадают в водоёмы. Первый промежуточный хозяин, брюхоногий моллюск из семейства *Bithyniidae*, поглощает яйца, и в теле моллюска паразит проходит несколько стадий развития. В кишечнике моллюска мирацидия выходит из яйца и внедряется в стенку кишечника и образует спороцисту. Трематода на стадии спороцисты содержит в себе большое количество созревающих редий (следующая стадия). Далее редии разрушают спороцисту и распространяются по телу улитки. При достижении высокой численности редии начинают отрождать церкарий, которые выходят из моллюска в воду. На данной стадии развития трематода имеет головку и длинный хвост, который помогает ей двигаться в воде. Церкария может активно проникать во второго промежуточного хозяина – рыбу из семейства *Cyprinidae*. После попадания церкарии в ткань второго промежуточного хозяина происходят её морфологические изменения, в результате которых возникает метацеркария. На данной стадии трематода окружена двустенной цистой и погружена в

подкожную клетчатку и мышцы рыбы. Метациркария – это единственная жизненная стадия *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*, которая является инфекционной для теплокровных животных.

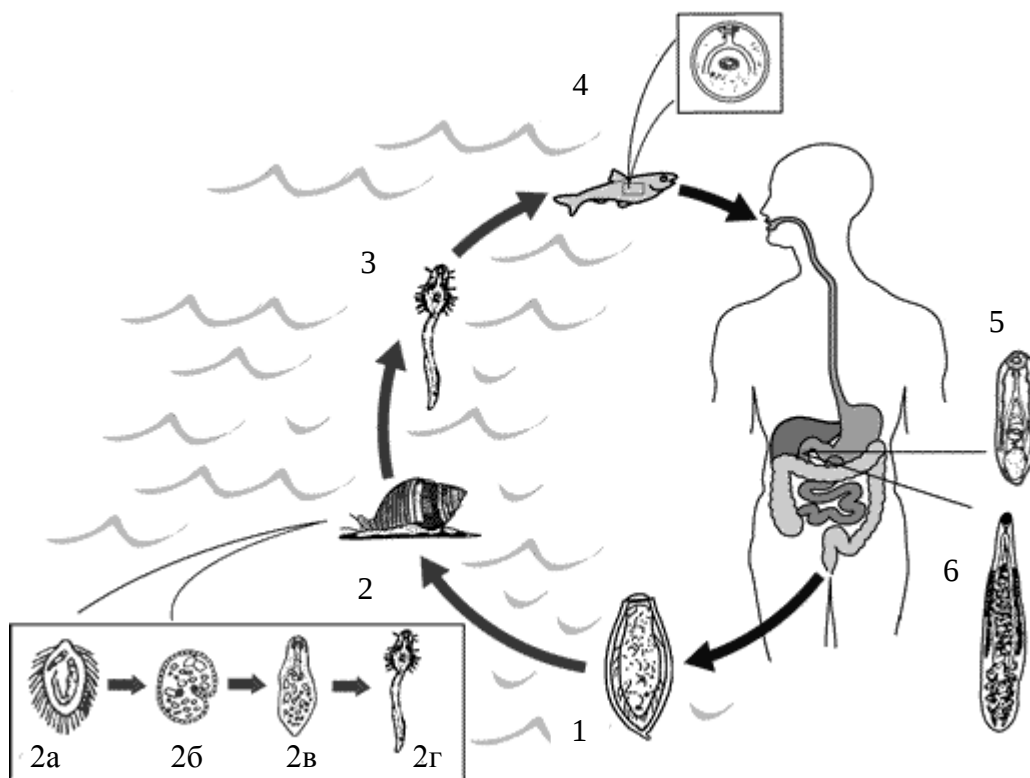


Рисунок 4. Жизненный цикл трематоды семейства Opisthorchiidae. (Модифицировано из: <http://www.dpd.cdc.gov/>) 1) яйца с мирацидием (поглощаются моллюсками); 2) развитие внутри моллюска: 2а) мирацидий, 2б) спороциста, 2в) редия, 2г) церкария (выходит из моллюска); 3) церкария внедряется в кожу и мышцы карповых рыб; 4) метациркария в мышцах рыб; 5) эксцисты в двенадцатиперстной кишке (ювенильная особь); 6) взрослая особь в печеночных ходах.

Заражение окончательного хозяина происходит при поедании сырой или термически плохо обработанной рыбы, в которой содержатся метациркарии. В организме окончательного хозяина (рыбоядного млекопитающего, в том числе и человека) в результате эксцестирования из метациркарии выходит ювенильная марита (взрослая особь). Марита добирается до желчных путей, где в дальнейшем обитает. Через 1,5-2 месяца

марита становится половозрелой и начинает продуцировать большое количество яиц, выходящих во внешнюю среду вместе с фекалиями [26,29].

2.1.4 Распространение

C. sinensis распространен в Китае, Тайване, Вьетнаме, Корее, Японии, Лаосской Народно-Демократической Республике и на Дальнем Востоке Российской Федерации; *O. viverrini* – в Камбодже, Лаосской Народно-Демократической Республике, Таиланде, и Вьетнаме; и *O. felineus* – на территории бывшего Советского Союза (Украине, Белоруссии, Казахстане, странах Прибалтики и Российской Федерации) и в некоторых европейских странах [8,9] (Рисунок 5).

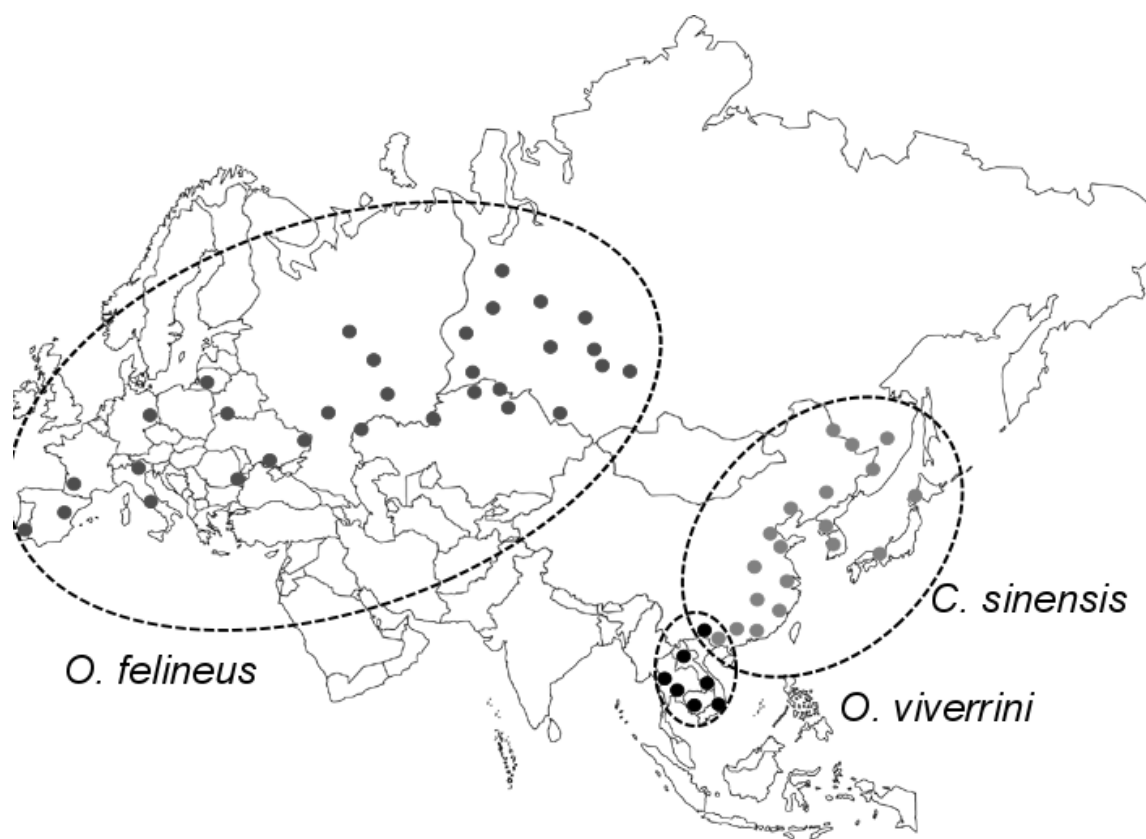


Рисунок 5. Распространение описторхид. Черными точками отмечены места, где был обнаружен *O. viverrini*, тёмно-серыми – *O. felineus*, светло-серыми – *C. sinensis*.

2.1.5 Описторхоз

По предварительным оценкам, по меньшей мере 1,2 миллиона человек в мире инвазированы *O. felineus*, 10 миллионов – *O. viverrini*, и 35 миллионов – *C. sinensis*. Около 700 миллионов людей во всём мире подвержены риску заражения описторхидами [10].

В течении болезни выделяют острую и хроническую стадии. Острая стадия описторхоза проявляется через одну неделю после заражения. Симптомами острой фазы описторхоза являются жар, боль в животе, астения, артралгия, диарея и тошнота [3]. Иногда описторхоз может протекать асимптоматически [4].

Клинические проявления хронической стадии заболевания похожи на симптомы холецистита, дуоденита и панкреатита. В некоторых случаях хронический описторхоз может протекать бессимптомно [4]. Одним из возможных осложнений хронического описторхоза является холангиокарцинома. Международное агентство по изучению рака (МАИР) относит трематод *O. viverrini* и *C. sinensis* к 1-ой группе канцерогенов [6] и к основным факторам возникновения холангиокарциномы в эндемичных районах [5,7]. В отличие от *O. viverrini* и *C. sinensis*, *O. felineus* в настоящее время относят к 3-й группе канцерогенов (потенциально опасные для человека) [6]. Однако существуют данные, которые демонстрируют, что в эндемичных регионах Западной Сибири распространенность рака печени в несколько раз выше, чем в среднем по России [30–32]. Стоит отметить, что рак печени пациентов, зараженных *O. felineus*, чаще диагностируется как холангиокарцинома [32,33].

Основным методом диагностики описторхоза является овокопрологическое исследование [34]. Кроме этого применяется дуоденальное зондирование, при котором визуально исследуется содержимое желчи. У данных видов диагностикумов есть свои недостатки, связанные с высокой субъективностью. Также существуют иммунологические диагностикумы, основанные на тотальном белке паразита [35] или на

экскреторно-секреторном продукте трематод [36]. Одной из проблем иммунологической диагностики является длительное нахождение антител на трематод в крови пациента, что может привести к ложно положительным результатам [34].

На данный момент лечение описторхоза проводится в основном празиквантелом [37]. Не так давно было обнаружено, что существует популяционная гетерогенность *O. felineus* по ответу на лечение празиквантелом [37]. Наличие подобной популяционной гетерогенности и использование только одного препарата в лечение описторхоза может привести к образованию популяции с лекарственной устойчивостью.

2.2 Характеристика микроРНК и генов микроРНК животных

МикроРНК - это малые некодирующие РНК (длина 18-24 нуклеотида), которые подавляют экспрессию мРНК на посттранскрипционном уровне. Первые микроРНК были обнаружены у нематоды *C. elegans* в 1993 году [38,39]. В настоящее время микроРНК обнаружены у животных, растений, грибов (миксомицеты), некоторых одноклеточных организмов (диатомовые водоросли) и вирусов (<http://www.mirbase.org>).

МикроРНК очень важны для развития любого многоклеточного организма. Они являются важными участниками регуляторных событий, определяющих характер экспрессии множества белок-кодирующих генов [11].

2.2.1 Организация генов микроРНК

МикроРНК гены располагаются в некодирующих участках генома или в интронах белок-кодирующих генов (миРтрон и интронная микроРНК). Стоит добавить, что известны примеры, когда микроРНК гены были обнаружены в экзоне белок-кодирующего гена у *Drosophila melanogaster* [40]. Геномные исследования показали, что гены микроРНК имеют тенденцию к образованию кластеров [41,42]. Как правило, кластеры состоят

из двух или более микроРНК-генов, которые расположены рядом на хромосоме с расстоянием между ними не больше чем 10000 п.н. [43]. Обычно кластеры микроРНК-генов транскрибируются РНК-полимеразой II [44] единым первичным транскриптом [40]. На рисунке 7 изображен пример первичного транскрипта кластера микроРНК генов у нематоды *C. elegans*. Кластеры микроРНК-генов демонстрируют как последовательные уровни экспрессии, так и непоследовательные уровни экспрессии отдельных генов микроРНК, входящих в кластер [45].

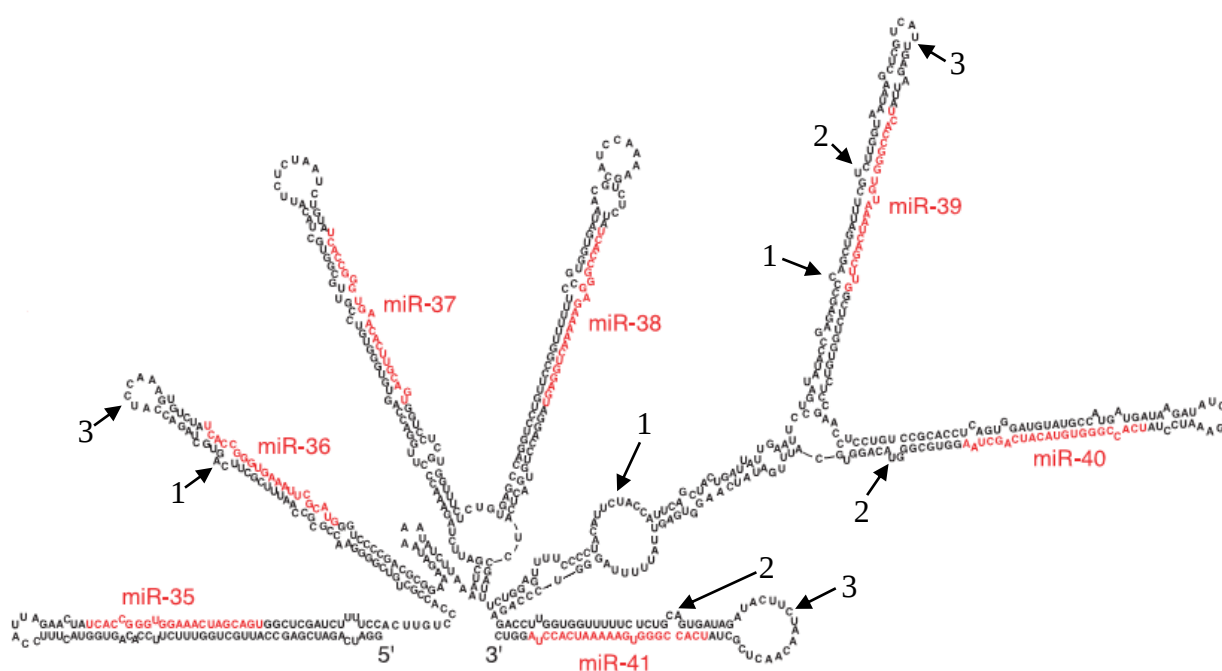


Рисунок 6. Вторичная структура транскрипта микроРНК-кластера miR-35-41 у *C. elegans*, являющегося сложной при-микроРНК, содержащей 7 шпичечных структур (модифицировано из [46]). Красным цветом выделены последовательности зрелых микроРНК, стрелки с номером 1 показывают на “пузыри” (структурные элементы, образованные неспаренными нуклеотидами двух спаренных цепей РНК), с номером 2 – на “выпячивания” (структурные элементы, образованные неспаренными нуклеотидами одной из двух спаренных цепей РНК), с номером 3 – на терминальную петлю.

МикроРНК-гены, кодирующие гомологичные микроРНК (микроРНК у которых точно совпадает участок со 2-го по 8-й нуклеотид на 5' конце зрелой микроРНК), относятся к одному семейству. Последовательности

большинства микроРНК-генов консервативны из-за функциональных ограничений не только в участках последовательности, содержащей зрелую микроРНК, но также и во фланкирующих районах, необходимых для формирования вторичной структуры и процессинга РНК [47]. Стоит отметить, что такая консервативность с фланкирующими участками наблюдается внутри семейства, а консервативность зрелых микроРНК отмечена только внутри царств – общие микроРНК для животных и растений не были выявлены [48].

2.2.2 Эволюция микроРНК

Новые микроРНК гены могут возникать из интронов, псевдогенов, малых ядрышковых РНК, тРНК и транспозонов в результате образования микроРНК подобной шпильки во вторичной структуре транскрипта. Кроме этого новые микроРНК могут возникнуть из комплементарной цепи уже существующего гена микроРНК, или в результате дупликации гена микроРНК [49].

Tanzer и Stadler на основе результатов исследования эволюции кластера miR-17 [50] и филогенетической оценки микроРНК-кластеров в геноме многоклеточных высказали предложение, что тандемная дупликация и сегментная дупликация были ключевыми механизмами стимулирования развития микроРНК-кластеров [51]. Также было установлено, что часть микроРНК-кластеров возникает из транспозиций мобильных элементов [52]. В нескольких исследованиях было выявлено, что транспозиции и ретранспозиции мобильных элементов могут образовывать и уничтожать кластеры [53–55] микроРНК. Таким образом, транспозиции или ретранспозиции, стимулирующие эволюцию микроРНК-кластеров, являются общим механизмом эволюции микроРНК-кластеров. Считается, что формирование микроРНК-кластеров невозможно объяснить результатом горизонтального переноса генов, потому что процессы интеграции

последовательности в регуляторную часть генома будут крайне маловероятно функциональными из-за естественного отбора [56].

МикроРНК являются очень консервативными регуляторными РНК. Образование точечных мутаций у данных РНК происходит с разной скоростью для разных частей микроРНК (рисунок 7). Так было показано, что наиболее консервативной последовательностью является зрелая микроРНК, менее консервативной – микроРНК стар (последовательность микроРНК, процессируемая из пассажирской цепи), и наименее консервативной – терминальная петля первичного транскрипта микроРНК [57]. Подобные различия в скорости образования точечных мутаций в разных частях первичного транскрипта микроРНК обусловлены различной функциональной нагрузкой. Меньше всех меняется последовательность зрелой микроРНК, так как именно данная последовательность участвует в РНК-интерференции. Последовательность микроРНК стар участвует лишь в образовании шпильчатой структуры первичного транскрипта и неидеально комплементарна последовательности зрелой микроРНК, поэтому микроРНК стар менее консервативна чем зрелая микроРНК. Последовательность терминальной петли наиболее вариабельная, так как не несёт функциональной нагрузки. Также стоит отметить, что наиболее консервативными участками зрелой микроРНК является затравочный участок (участок со 2-го по 8-й н. необходимый при распознавании мРНК-мишени) и компенсаторный участок (участок с 13 по 16 н., повышающий эффективность распознавания мРНК-мишени). При этом было обнаружено, что участки микроРНК стар комплементарные затравочному и компенсаторному участкам обладают меньшей вариацией по сравнению с остальными участками микроРНК стар [57].

Кроме точечных мутаций гены микроРНК могут изменяться другими способами. При смене плеча микроРНК стар становится зрелой микроРНК, что в свою очередь ведет к появлению нового набора мРНК-мишеней [49] (рисунок 8А). При смене шпильки образуется новая последовательность

предшественника микроРНК, зрелая микроРНК остаётся прежней, но плечо, в котором находилась зрелая микроРНК, меняется на противоположное [49] (рисунок 8Б).

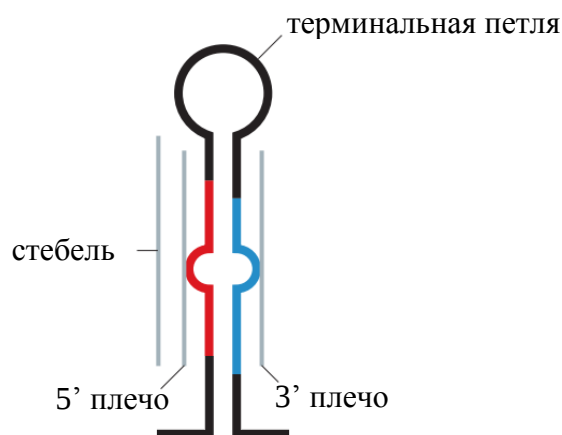


Рисунок 7. Вторичная структура первичного транскрипта микроРНК (модифицировано из [49]). Красным цветом обозначена зрелая микроРНК, синим – микроРНК стар. Зрелая микроРНК может находиться как в 5' плече, так и в 3' плече.

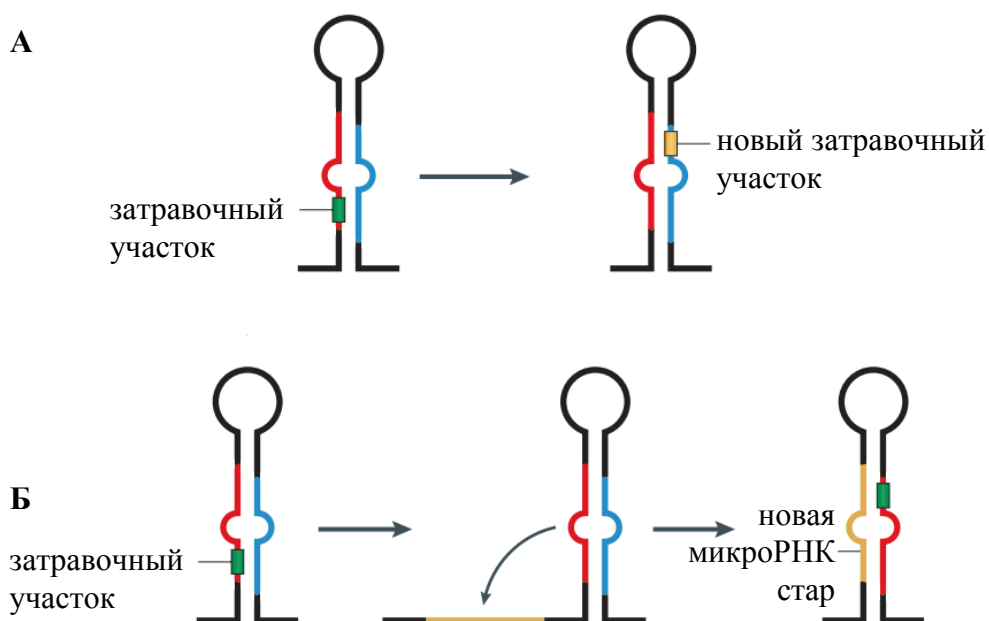


Рисунок 8. Пути эволюции микроРНК (модифицировано из [49]). А) Смена плеча. Б) Смена шпильки. Красным цветом обозначена зрелая микроРНК, синим – микроРНК стар. Зрелая микроРНК может находиться как в 5' плече, так и в 3' плече пре-микроРНК.

2.2.3 Биогенез микроРНК

В настоящий момент описано два пути биогенеза микроРНК: канонический и неканонический. В каноническом пути (Рисунок 9) с генов, кодирующих микроРНК, РНК-полимераза II [44] или РНК-полимераза III [58] транскрибирует при-микроРНК, шпилечную структуру с фланкирующими одноцепочечными РНК-сегментами и одноцепочечным-двухцепочечным переходом [59,60]. Именно этот переход распознается белком DGCR8 (у человека) или его ортологом белком Pasha (у *C. elegans* и *D. melanogaster* [61]). После этого белок Drosha (РНКазы III), который состоит в одном комплексе с DGCR8 [62–64], расщепляет при-микроРНК на дистанции около 11 пар оснований от одноцепочечного-двухцепочечного перехода [60]. После расщепления образуется пре-микроРНК, шпилечно-петлевая структура, которая имеет 2-х нуклеотидный 3'-одноцепочечный участок, признак продукта РНКазы III [65].

Шпилечно-петлевая структура пре-микроРНК, как правило, несовершенна. В шпилечной части встречаются такие образования, как “пузыри” (структурные элементы, образованные неспаренными нуклеотидами двух спаренных цепей РНК) (Рисунок 6, стрелки с номером 1) и “выпячивания” (структурные элементы, образованные неспаренными нуклеотидами одной из двух спаренных цепей РНК) (Рисунок 6, стрелки с номером 2). 3'-одноцепочечный участок и двойная цепь пре-микроРНК с минимальной длиной 16 пар оснований [66] распознаются экспортином-5 [67,68]. Вместе с ГТФазой, экспортин-5 выводит пре-микроРНК из ядра в цитоплазму. Дальше пре-микроРНК расщепляется белком Dicer (РНКазы III) в комплексе с другими белками. Dicer узнает 3'-одноцепочечный участок и расщепляет пре-микроРНК возле терминальной петли, образуя второй 2-х нуклеотидный 3'-одноцепочечный участок у микроРНК-дуплекса [69,70].

В дальнейшем в судьбе микроРНК очень важную роль играет образование РНК-индуцированного сайленсинг комплекса (RISC) с белками

семейства “Аргонавт”. Белки семейства “Аргонавт” очень консервативны и найдены почти во всех живых организмах [71–74]. У разных видов продуцируется разное количество вариантов белков семейства “Аргонавт”: у человека 8, у дрозофилы 5, у *C. elegans* 27 [75,76]. И все эти белки можно разделить на два подсемейства: AGO и PIWI. У человека одна половина белков семейства “Аргонавт” относится к подсемейству AGO, а другая к подсемейству PIWI [77,78].

AGO связываются с микроРНК и малыми интерферирующими РНК в то время как PIWI связываются с пивиРНК [77–79].

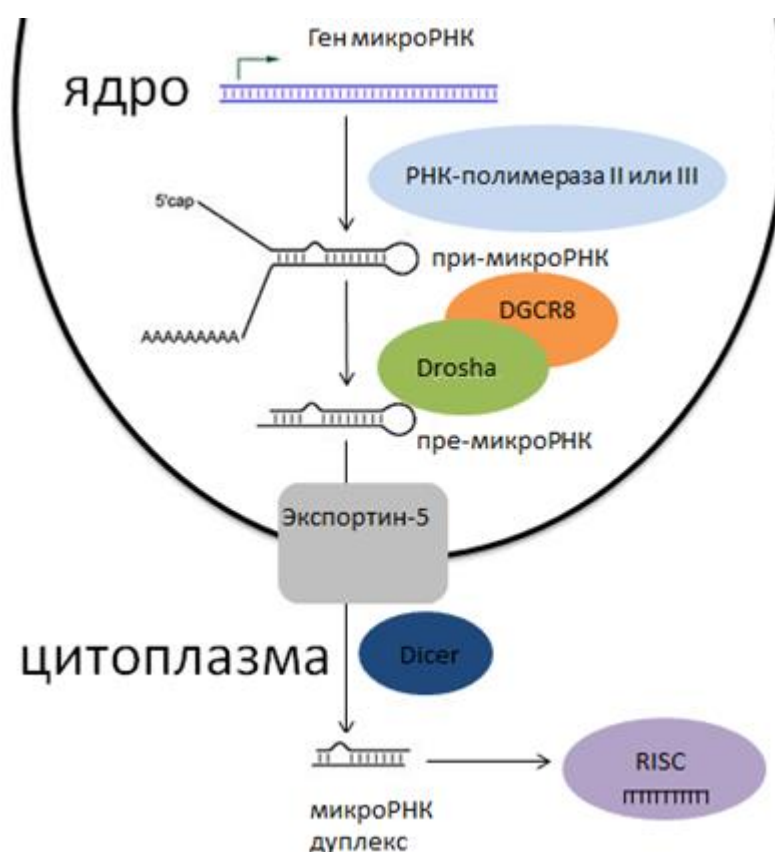


Рисунок 9. Схема биогенеза микроРНК животных. Пояснения в тексте.

Любая микроРНК из дуплекса может взаимодействовать с белками семейства “Аргонавт” и образовать RISC, т.е. обе РНК в дуплексе потенциально функциональны [80–82]. Но только одна микроРНК в конце

концов функционирует в RISC, а другая деградирует (микроРНК стар) [83–85].

Наряду с каноническим путем описан неканонический путь биогенеза микроРНК [86]. В неканоническом биогенезе участвуют микроРНК в составе митронов или интронных микроРНК. После транскрипции РНК-полимеразой II митроны сплайсируются из пре-мРНК [47,87,88]. После сплайсинга митрон образует лассо, и после гидролиза 2'-5' фосфодиэфирной связи в составе структуры лассо (“расплетения”) образуется пре-микроРНК. Оба конца такой пре-микроРНК генерируются ферментами сплайсинга. Тем не менее, были аннотированы некоторые локусы, похожие на митроны, в которых генерируемая шпилька пре-микроРНК находится только на одном конце интрона, т.е. один конец шпильки не генерируется в результате сплайсинга.

Были найдены две разновидности митронов с дополнительной последовательностью с 3'- или с 5'-конца пре-микроРНК (“хвостатые” митроны) (Рисунок 10) [88,89]. У 3'-“хвостатых” митронов после сплайсинга и “расплетения” дополнительная последовательность с 3'-конца пре-микроРНК подвергается процессингу экзосомальным комплексом, основным эукариотическим 3'/5' экзонуклеазным комплексом. Это происходит до перемещения экспортином-5 пре-микроРНК из ядра [90]. Биогенез 5'-“хвостатых” митронов до сих пор не изучался в подробностях. Можно предположить, что процессинг дополнительной последовательности с 5'-конца отличается по механизму от процессинга дополнительной последовательности с 3'-конца [91]. Так как оба конца пре-микроРНК генерируются ферментами сплайсинга, или в случае “хвостатых” митронов один конец пре-микроРНК генерируется сплайсингом, а другой образуется в результате обрезания одноцепочечного участка до шпильки, то микроРНК из митронов пропускают обработку белком Drosha [87,88,92].

В отличие от митронов интронные микроРНК проходят обработку белком Drosha до сплайсинга пре-мРНК [93]. Дальше пре-микроРНК

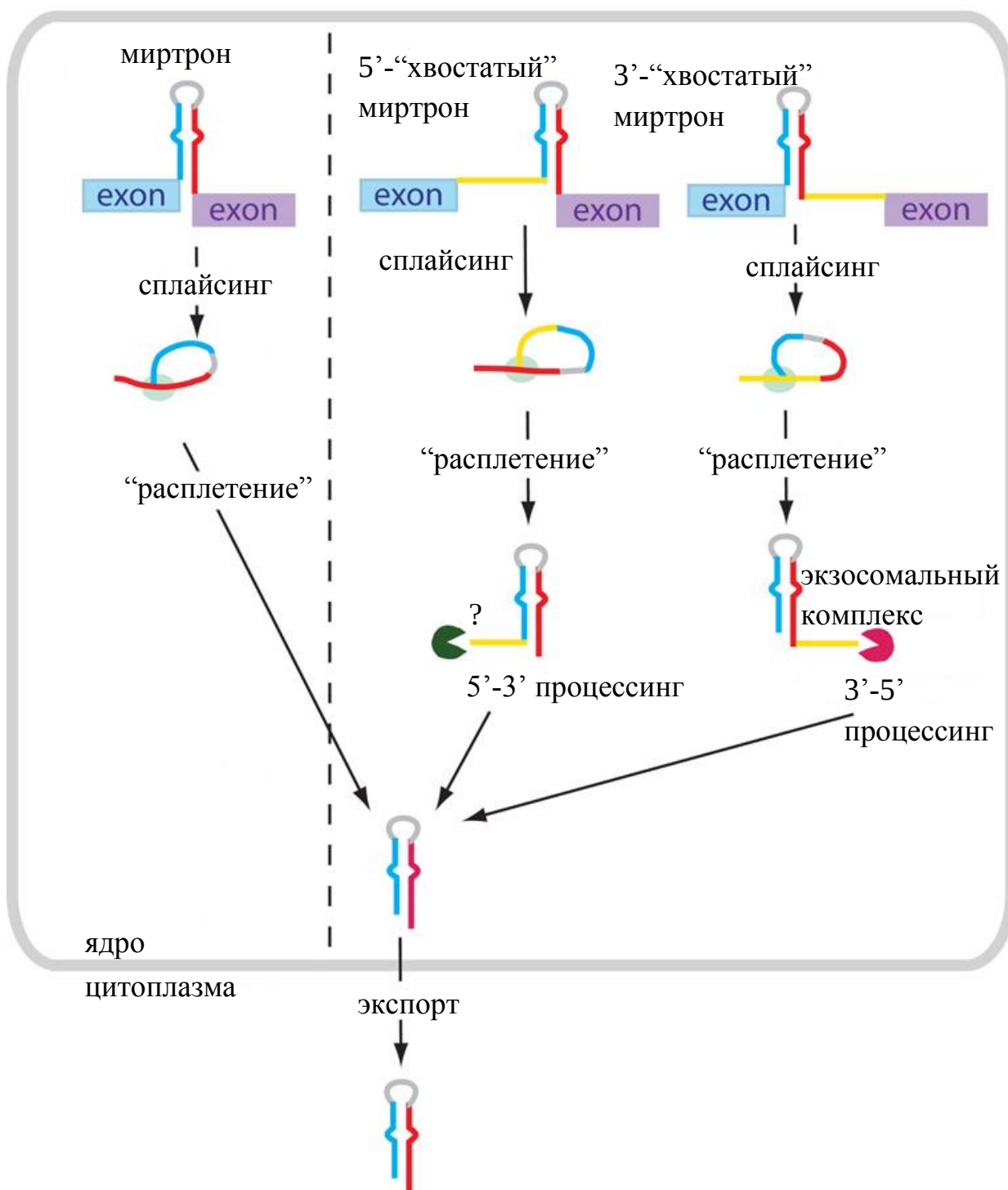


Рисунок 10. Схема альтернативного биогенеза микроРНК (модифицировано из [91]). Пояснения в тексте. “Хвостатый” митрон – митрон с дополнительной последовательностью с 3’- или с 5’-конца пре-микроРНК. “Расплетение” – гидролиз 2’-5’ фосфодиэфирной связи в составе структуры лассо.

миРтронов и интронных микроРНК, как и в каноничном пути, экспортируется из ядра с помощью экспортина-5, процессируется белком Dicer, после чего одна из цепей микроРНК-дуплекса связывается с белками семейства “Аргонавт”, образуя RISC.

Drosha и Dicer не всегда гидролизуют предшественник микроРНК точно. На основе результатов глубокого секвенирования было выявлено, что белок Drosha разрезает пре-микроРНК “аккуратнее”, чем Dicer [94] (Рисунок 11. А). Другие исследователи пришли к выводу, что при обработке белками Drosha и Dicer 5'-конец микроРНК меняется меньше, чем 3'-конец, и это не зависит от того, из какого плеча образуется зрелая микроРНК [95–97] (Рисунок 11. Б). Этот вывод согласуется с идеей, что эволюционное давление способствует образованию однообразных 5'-концов микроРНК, которые имеют большое значение для распознавания мРНК-мишени [98]. Другая модель возникновения ошибок разрезания - это параллельный сдвиг Drosha- и Dicer-разрезов, которые создают несколько вариантов микроРНК из одного предшественника [99] (Рисунок 11. В).

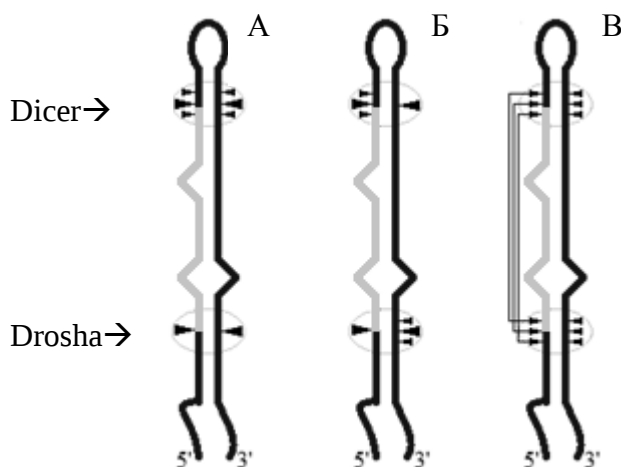


Рисунок 11. Разрезы Drosha и Dicer на пре-микроРНК (модифицировано из [100]). Чёрным обозначена последовательность при-микроРНК, серым – зрелой микроРНК в составе предшественника.

Помимо модификаций белками Drosha и Dicer у микроРНК может изменяться первичная структура после транскрипции. В частности, в результате дезаминирования аденина вместо него может появиться инозин. Обычно эта модификация осуществляется белками ADAR (Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase) с предшественником микроРНК, не затрагивая последовательность зрелой микроРНК, и приводит к остановке биогенеза микроРНК [101–103]. Но подобный переход из аденина в инозин может встречаться в зрелой микроРНК, и помимо этой модификации у зрелой микроРНК может встречаться добавление аденина или урацила к 3'-концу [104].

2.2.4 микроРНК вне клетки

МикроРНК могут быть стабильными, находясь за пределами клетки [12–15]. Это может означать, что микроРНК упакованы, возможно, в везикулы, или связаны с белком [16,17]. Механизм выхода микроРНК за пределы клетки плохо изучен. Однако были выявлены белки, которые связаны с микроРНК за пределами клеток [14], хотя вопрос о специфичности этих белков ещё остаётся открытым. Было также установлено, что микроРНК, как и мРНК, может транспортироваться за пределы клетки в различных везикулах, включая экзосомы [18,19] (Рисунок 12).

2.2.5 Механизмы регуляции экспрессии белок-кодирующих генов с участием микроРНК

После связывания микроРНК с белками семейства “Аргонавт”, RISC с микроРНК связываются с 3'-НТР-ом (3'-нетранслируемый регионом) мРНК-мишени и подавляет экспрессию мРНК. У животных эта функция микроРНК влияет на множество процессов: дифференцировка и развитие клеток, раннее эмбриональное развитие, апоптоз, канцерогенез, и многое другое [11].

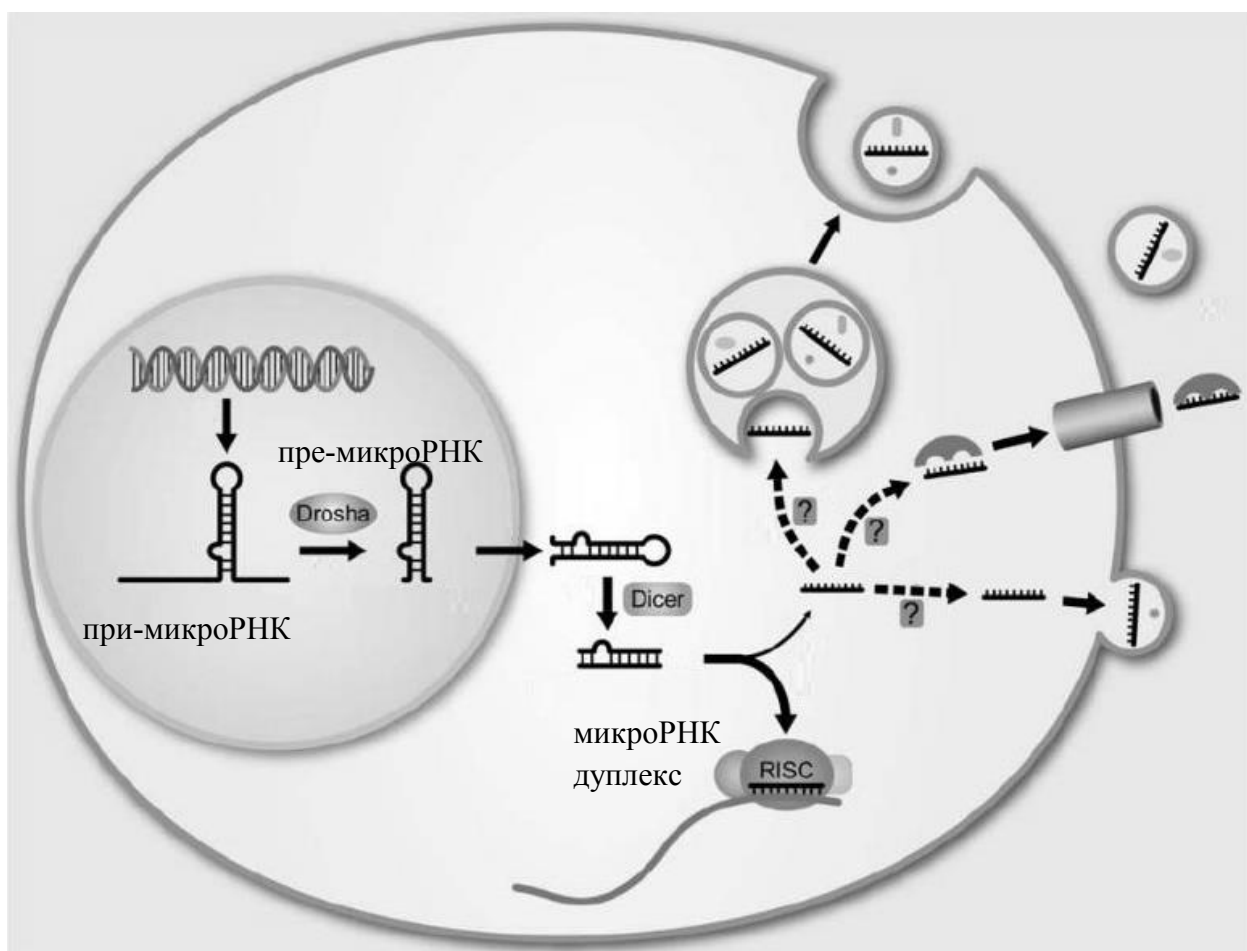


Рисунок 12. Пути транспортировки микроРНК за пределы клетки (модифицировано из [105]). На рисунке изображены различные варианты выхода микроРНК из клетки (в результате связывания с белком или в различных везикулах, включая экзосомы).

Сейчас известно 8 различных механизмов подавления трансляции, когда микроРНК связываются с 3'-НТР-ом мРНК (Рисунок 13) [106].

- 1) Кэп-ингибирование (ингибирование трансляции через связь между кэпом и 40s субъединицей рибосомы). Белки семейства GW182 (у дрозофилы и их гомологи в млекопитающих TNRC6A, TNRC6B, и TNRC6C) играют важную роль в репрессии связи между кэпом и 40s субъединицей рибосомы у многоклеточных, вызванной микроРНК. Они непосредственно взаимодействуют с белками семейства “Аргонавт” и действуют в качестве нижестоящих эффекторов в механизме кэп-ингибирования.

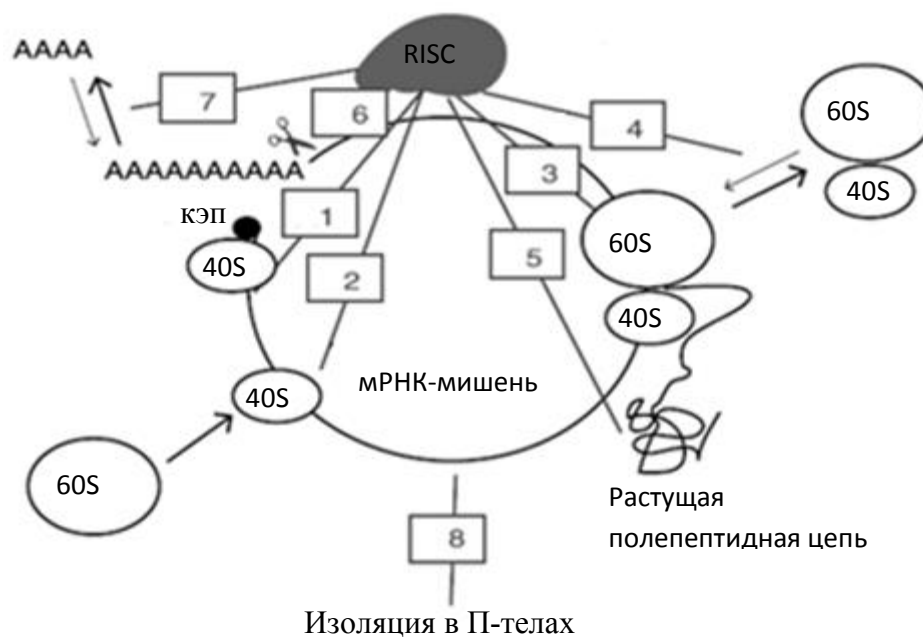


Рисунок 13. Схема механизмов микроРНК-подавления трансляции мРНК (модифицировано из [106]): 1) кЭП-ингибирование, 2) ингибирование присоединения большой субъединицы рибосомы, 3) ингибирование элонгации, 4) сброс рибосомы, 5) котрансляционная деградация протеина, 6) расщепление мРНК, 7) мРНК-распад, 8) изоляция в П-телах.

- 2) Ингибирование присоединения большой субъединицы рибосомы (ингибирование трансляции через нарушение связи между 40s и 60S субъединицами рибосомы и старт кодоном). При данном механизме микроРНК-подавления экспрессии в ингибирование вовлечен белок eIF6.
- 3) Ингибирование элонгации. МикроРНК подавляет трансляцию при элонгации, рибосомы “остаются” на мРНК.
- 4) “Сброс” рибосомы. МикроРНК подавляет трансляцию при элонгации, рибосомы не “остаются” на мРНК.
- 5) Котрансляционная деградация синтезированного белка. Данная деградация белка вне протеасом.
- 6) Расщепление мРНК. Происходит при полной или почти полной комплементарности микроРНК и мРНК. Это расщепление схоже с

расщеплением, вызванным малыми интерферирующими РНК. В расщеплении участвуют белки семейства “Аргонавт”, входящие в состав RISC. Этот механизм больше свойственен растениям, чем животным.

- 7) Распад мРНК (деградация, дестабилизация). При этом механизме происходит деаденилирование РНК CCR4–NOT или PAN2-PAN3, декэппинг и в конце 5'- или 3'-деградация.
- 8) Изоляция в П-телах. Подавление экспрессии мРНК происходит в П-телах (цитоплазматических структурах, в которых уровень деградации мРНК повышен).

Кроме 3'-НТР микроРНК способны подавлять экспрессию мРНК в результате связывания с кодирующей частью мРНК (это известно для мРНК DNMT3b, p16INK4a, Nanog, Oct4, и Sox2) [107–110]. Следует добавить, что описаны мРНК, у которых и 3'-НТР и ОРС содержат элементы распознающие микроРНК [109,110]. Кроме того, микроРНК способны связываться с 5'-НТР мРНК для модуляции экспрессии [111,112], и даже с промоторным участком на ДНК при этом усиливая или ингибируя транскрипцию [113–115].

Следует также упомянуть, что некоторые микроРНК способны “переключаться” с ингибирования на усиление экспрессии для некоторых мРНК, при определённых условиях. Механизм таких переключений, вероятно, заключается в модификациях белков семейства “Аргонавт”, входящих в RISC [116–118].

2.3 Методы выявления микроРНК и генов микроРНК

МикроРНК в основном выявляют и идентифицируют по следующему алгоритму:

- 1) Выделение фракций малых РНК;
- 2) Массовое параллельное секвенирование;

- 3) Фильтрация полученных данных от других некодирующих РНК (рРНК, тРНК, мяРНК, мякРНК и другие), от фрагментов мРНК, от транскрибируемых геномных повторов;
- 4) Реконструкция последовательности предшественника микроРНК (пре-микроРНК) с помощью картирования на референсный геном (геном организма, из которого выделяли фракцию малых РНК, или его ближайшего родственника, если у первого геном не известен);
- 5) Проверка последовательности пре-микроРНК с помощью программы предсказания вторичной структуры РНК (ProMiR2 [119], MiPred [120], mFold [121], UNAFold [122]);
- 6) Идентификация среди полученных последовательностей известных для других организмов микроРНК.

Часто последние три пункта выполняются программой для предсказания микроРНК (MiRDeep [123], MiRDeep2, miRCandRef [124]). Кроме вышеописанного способа для предсказания микроРНК в геноме используют программы miRNA Digger [125], miRNA-dis [126], miRNAfe [127], iMiRNA-PseDPC [128]. Но такой подход опасен большим количеством ложноположительных результатов.

После предсказания микроРНК и микроРНК-предшественников проводят экспериментальную проверку предсказанных микроРНК либо при помощи метода Нозерн-блот, либо при помощи ПЦР-РВ, если известна последовательность предшественника микроРНК. Если последовательность предшественника микроРНК не известна, используют stem-loop ПЦР-РВ (Рисунок 14) [129].

В случае исследования экспрессии отдельных микроРНК наиболее эффективным является stem-loop ПЦР-РВ. Stem-loop ПЦР-РВ – это ПЦР-РВ с использованием специальных праймеров для обратной транскрипции. В этом методе вначале выделяется тотальная РНК, к которой добавляют ОТ-праймер, после чего проводят обратную транскрипцию. После обратной транскрипции проходит обычный ПЦР-РВ, в котором один праймер

комплементарен ОТ-праймеру, а второй почти идентичен 5'-концу микроРНК. Taqman-зонд комплементарен ОТ-праймеру (или наполовину комплементарен ОТ-праймеру и наполовину идентичен 3'-концу микроРНК) [129].

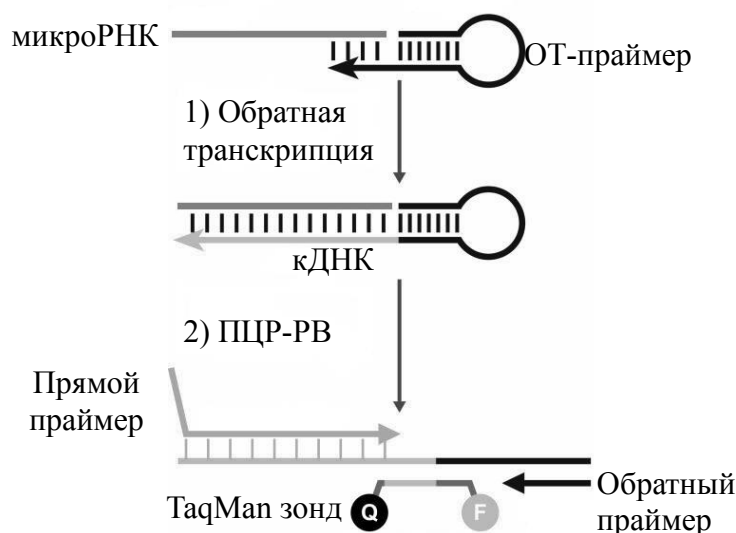


Рисунок 14. Схема Stem-loop ПЦР-РВ [129]. Выступающий 5'-участок у прямого праймера добавлен для повышения температуры плавления. Его наличие и длина зависят от последовательности микроРНК.

2.4 Методы поиска мРНК-мишеней для микроРНК

Функции микроРНК, в конечном счете, определяется её генами-мишенями и эффектами, которые проявляются в результате воздействия на их экспрессию. Отыскать ген-мишень для микроРНК животного сложнее, чем для микроРНК растения, т.к. у растительной микроРНК, как правило, наблюдается идеальная комплементарность с микроРНК-сайтом-мишени (микроРНК-СМ). Участок микроРНК животных, комплементарный мРНК-мишени, расположенный на 5'-конце и называемый затравочным участком, состоит из 8 нуклеотидов. RISC использует этот затравочный участок для распознавания мРНК-мишеней [98,130,131]. Существует три вида взаимодействий затравочного участка с микроРНК-СМ элементом в мРНК:

строгие, не строгие и с 3'-дополнительным спариванием. Они отличаются уровнем комплементарности микроРНК с мРНК.

Строгие микроРНК-мРНК взаимодействия могут быть разделены на 4 типа: 8mer, 7mer-m8, 7mer-A1 и 6mer в зависимости от комбинации нуклеотидной позиции 1 и спаренного нуклеотида в положении 8 [120](Рисунок 15А):

- 1) 8mer имеет как аденин в положении 1 в мРНК, так и спаривание оснований в положении 8;
- 2) 7mer-A1 имеет аденин в положении 1 в мРНК;
- 3) 7mer-m8 имеет спаривания оснований в положении 8;
- 4) 6mer не имеет ни аденина в положении 1, ни спаривания оснований в положении 8.

8mer А 87654321 ..NNNNNNNN-5' микроРНК ..NNNNNNNA-3' мРНК 7mer-A1 87654321 ..NNNNNNNN-5' микроРНК ..NNNNNNNA-3' мРНК 7mer-m8 87654321 ..NNNNNNNN-5' микроРНК ..NNNNNNNN-3' мРНК 6mer 87654321 ..NNNNNNNN-5' микроРНК ..NNNNNNNN-3' мРНК	GUM 87654321 ..NNNUNNNN-5' микроРНК : ..NNNGNNNA-3' мРНК GUT 87654321 ..NNNNNGNN-5' микроРНК : ..NNNNNUNA-3' мРНК LP 87654321 ..NNNNNNNN-5' микроРНК ..NNNNNNNA-3' мРНК BM 7654321 ..NNNNNNNN-5' микроРНК ..NNN-NNNA-3' мРНК	BT Б 76 54321 ..NN-NNNNN-5' микроРНК ..NNNNNNNA-3' мРНК В 3'-дополнительные 87654321 ..NNNNNNNNNNNNNNNN-5' микроРНК ..NNNNNNNNNNNNNNNN-3' мРНК 3'-компенсаторные 87654321 ..NNNNNNNNNNNNNNNN-5' микроРНК ..NNNNNNNNNNNNNNNN-3' мРНК
---	---	---

Рисунок 15. Классификация взаимодействий микроРНК и мРНК у животных. А – строгие, Б – нестрогие, В - с 3'-дополнительным спариванием.

Аденин в мРНК, соответствующей позиции 1 в микроРНК, как известно, повышает эффективность распознавания мишеней [132].

Не строгие микроРНК-мРНК взаимодействия являются также функциональными, потому что RISC может допускать небольшие несоответствия или G=U спаривания. Эти нестрогие взаимодействия делят на

пять типов: GUM, GUT, BM, BT и LP, которые различаются типом несоответствий [133] (Рисунок 15Б):

- 1) GUM имеет одну G=U пару и урацил в микроРНК;
- 2) GUT имеет одну G=U пару и урацил в мРНК-мишени;
- 3) BM имеет одно “выпячивание” на микроРНК;
- 4) BT имеет одно “выпячивание” на мРНК-мишени;
- 5) LP имеет только один “пузырь”.

Взаимодействия с дополнительными 3'-спариваниями называют 3'-дополнительными и 3'-компенсаторными (Рисунок 15В) [134]. Спаривания в 3'-части микроРНК присутствуют для повышения эффективности распознавания микроРНК-СМ [120]. Предпочтительное количество нуклеотидов, спаренных в 3'-части, отличается в зависимости от взаимодействия, которое может быть строгим или нестрогим. Строгие взаимодействия (3'-дополнительные) требуют 3-4 спаривания в позициях 13-16, в то время как нестрогие (3'-компенсаторные) требуют 4-5 спариваний в позициях 13-19.

Сильные мРНК-мишени микроРНК, как правило, имеют несколько микроРНК-СМ [135]. Взаимное расположение микроРНК на одной мРНК может обладать эффектом синергизма. Исследования показали, что два микроРНК-СМ на оптимальном расстоянии друг от друга повышают свою эффективность [136]. Оптимальная длина между сайтами составляет от 17 до 35 нуклеотидов, но длина от 14 до 46 нуклеотидов также повышает эффективность. Это взаимодействие является функциональным между микроРНК из одного семейства, а также между микроРНК из разных семейств [137]. Множественные микроРНК-СМ с участием более чем двух сайтов могут также способствовать повышению эффективности [138]. Точный механизм, лежащий в основе синергизма, остается неизвестным. Множественные RISC, связанные на близко расположенных участках мишени, могут стабилизироваться совместно друг с другом на мРНК или, возможно, могут ускорять процесс репрессии трансляции [134].

С учетом вышесказанного, понятно, что программы по поиску мишеней микроРНК у животных должны учитывать особенность связывания микроРНК и мРНК. МикроРНК, как правило, связывается с мишенью в 3'-НТР мРНК, поэтому программы по поиску мишеней микроРНК должны отслеживать доступность элемента распознавания микроРНК. Кроме того, программам следует учитывать консервативность микроРНК-СМ, и так как микроРНК образует с мРНК дуплекс с большой отрицательной свободной энергией, то все программы должны высчитывать свободную энергию дуплекса микроРНК-мРНК.

На данный момент программы по предсказанию целей для микроРНК можно разделить на два поколения [139].

Первое поколение программ по предсказанию мишеней для микроРНК основываются на комплементарности 5'-затравочного участка с сайтом связывания в 3'-НТР мРНК, высчитывании свободной энергии дуплекса микроРНК-мРНК и консервативности элементов распознавания. К первому поколению относятся такие программы, как miRanda [140], TargetScan [98], TargetScans [132], DIANA-microT [141], RNAhybrid [142], RNA22 [143].

Принцип работы второго поколения программ по предсказанию целей для микроРНК основан на машинном обучении или анализе дополнительных параметров, например, доступности микроРНК-СМ для микроРНК, которая вычисляется в результате предсказания вторичной структуры 3'-НТР. Ко второму поколению относятся такие программы, как TargetBoost [144], PicTar [145], TargetSpy [146], PITA [147], «A two-step SVM» [148].

Для верификации компьютерных предсказаний взаимодействий микроРНК с мРНК используют экспериментальные методы. Данные методы можно разделить на 3 класса: анализ протеома (SILAC [149]), анализ транскриптома (анализ транскриптома с помощью биочипов [150], мечение микроРНК биотином [151], крослинк-иммунопреципитация [152,153], обратная транскрипция мишени [154]) и ген-репортерный анализ [155].

2.5 Данные о микроРНК плоских червей

Ранее микроРНК были описаны для двадцати видов плоских червей, а именно:

- 1) Для двух турбеллярий (*Dugesia japonica* [156–159] и *Schmidtea mediterranea* [160–164]);
- 2) Двух моногеней (*Gyrodactylus salaris* [124,165] и *Gyrodactylus thymalli* [165]);
- 3) Десяти трематод (*Clonorchis sinensis* [166], *Dicrocoelium dendriticum* [22], *Eurytrema pancreaticum* [167], *Fasciola gigantica* [168], *Fasciola hepatica* [23,168,169], *Fasciolopsis buski* [170], *Orientobilharzia turkestanicum* [171], *Paragonimus westermani* [172], *Schistosoma japonicum* [20,173–182], *Schistosoma mansoni* [21,173,176,183–185]);
- 4) Восьми цестод (*Echinococcus Canadensis* [186,187], *Echinococcus granulosus* [187–190], *Echinococcus multilocularis* [187,188,190,191], *Hymenolepis microstoma* [190], *Taenia asiatica* [192], *Taenia multiceps* [193], *Taenia saginata* [194], *Taenia solium* [192]).

Стоит отметить, что для некоторых видов плоских червей были определены лишь зрелые микроРНК [22,156–159,166–168,170–172,186,192–194], т.к. их геном на момент анализа отсутствовал, а для *H. microstoma* были предсказаны лишь гены микроРНК в результате геномного анализа [190]. Для плоских червей, у которых отсутствовал геном на момент анализа микроРНК, в большинстве случаев референсным геномом выступал геном *S. japonicum*, несмотря на то, что *S. mansoni* обладает аннотированным геномом, собранным до уровня хромосом, в отличие от *S. japonicum*. Стоит также отметить, что шистосомы сильно отличаются строением тела, наличием двух полов и местом обитания взрослой стадии в окончательном хозяине от других трематод (*C. sinensis* [166], *E. pancreaticum* [167], *F. gigantica* [168], *F. hepatica* [168], *F. buski* [170], *O. turkestanicum* [171], *P. westermani* [172]) и от представителей класса цестода (*T. asiatica* [192], *T. saginata* [194], *T. solium*

[192]). Таким образом, использование генома *S. japonicum* уменьшало вероятность обнаружения некоторых микроРНК.

В настоящее время в базе данных miRBase (<http://www.mirbase.org>) [195] представлены микроРНК шести видов плоских червей:

- 1) *Echinococcus granulosus* – 23 шпилечных структур пре-микроРНК, 26 зрелых микроРНК [188];
- 2) *Echinococcus multilocularis* – 22 шпилечных структур пре-микроРНК, 22 зрелых микроРНК [188];
- 3) *Gyrodactylus salaris* – 60 шпилечных структур пре-микроРНК, 120 зрелых микроРНК [124];
- 4) *Schistosoma japonicum* – 56 шпилечных структур пре-микроРНК, 79 зрелых микроРНК [173,174];
- 5) *Schistosoma mansoni* – 115 шпилечных структур пре-микроРНК, 225 зрелых микроРНК [173,183,185];
- 6) *Schmidtea mediterranea* – 148 шпилечных структур пре-микроРНК, 257 зрелых микроРНК [160,162,164].

Для микроРНК некоторых видов плоских червей были предсказаны потенциальные мРНК-мишени [157,167,168,171,177,181,185,189,193]. Однако, отсутствие детальной аннотации мРНК плоских червей, мешает определить, в каких процессах данные микроРНК участвуют. Для нескольких видов червей была выявлена дифференциальная экспрессии микроРНК на разных стадиях развития, что косвенно отражает функции некоторых микроРНК [178,188]. Также для единственных разнополых плоских червей, шистосом, были выявлены микроРНК связанные с полом [179,183]. Таким образом, были выявлены микроРНК, которые могут играть важную роль в половом развитии и в развитии яиц, но лишь для некоторых червей были выявлены функции, регулируемые микроРНК:

- 1) Для *S. mediterranea* и *D. japonica* были выявлены микроРНК, которые участвуют в регенеративных процессах [158,161,163];

- 2) Для *D. japonica* были установлены микроРНК, которые способствуют выживанию организма, при длительном голодании [159];
- 3) Для *S. japonicum* были выявлены микроРНК, которые ответственны за развитие яиц [177].

Кроме того, для шистосом были выявлены микроРНК, которые выходят за пределы организма трематоды и циркулируют в крови хозяина в комплексе с белками [20,21]. Также микроРНК были определены в экзосома-подобных везикулах двух видов трематод *D. dendriticum* [22] и *F. hepatica* [23]. А открытие того, что экзосомы паразита, а именно *O. viverrini*, проникают в клетки хозяина [196], может свидетельствовать о возможности модуляции мРНК хозяина зрелыми микроРНК паразита.

В заключении хотелось бы отметить, что на момент начала данной работы микроРНК *O. viverrini* и *O. felineus* не исследовались, а для *C. sinensis* были доступны лишь фрагментарные данные о микроРНК, так как при исследовании микроРНК *C. sinensis* был использован геном *S. japonicum*. Таким образом, в настоящей работе впервые описаны и аннотированы гены микроРНК *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*.

3 Материалы и методы

3.1 Разведение плоских червей

Мариты *C. sinensis* (14 трематоды) были выращены в крысах (*Rattus norvegicus*) из метацеркарий, выделенных из естественно зараженных горчака обыкновенного (*Rhodeus sericeus*), выловленных в реке Большая Уссурка (Приморский край). Мариты *O. viverrini* (20 трематоды), были выращены в золотистых хомячках (*Mesocricetus auratus*) из метацеркарий, выделенных из естественно зараженных карповых рыб, выловленных в провинции Кхон Каен (Таиланд). Мариты *O. felineus* (20 трематоды), были выращены в золотистых хомячках из метацеркарий выделенных из естественно зараженных Язей (*Leuciscus idus*), выловленных в реки Обь (г. Новосибирск). Марит выделяли из печени крыс и хомячков, для которых эвтаназия была выполнена декапитацией. Марит *C. sinensis* выделяли на 298-ой, *O. viverrini* – на 180-й, и *O. felineus* – на 179-й день после заражения. Отдельно 5000 метацеркарий *O. felineus* выделили из естественно зараженных Язей, выловленных в реки Обь (г. Новосибирск).

3.2 Выделение РНК

Для обнаружения малых РНК трех описторхид, использовали технику обогащения, состоящий из селективного фракционирования РНК (18-200 н.) в растворах полиэтиленгликоля различных концентраций, как описано у Wang с соавторами [197]. Распределение молекул РНК по размеру анализировали с помощью Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США).

3.3 Секвенирование

Библиотеки микроРНК были созданы с использованием Ambion SOLiD Small RNA Expression Kit (Applied Biosystems, США). Для каждого образца

были секвенированы три библиотеки (технические повторы): два с адаптером Mix A (секвенирование смысловой цепи с 5'-конца) и один с адаптером Mix B (секвенирование комплементарной цепи). Библиотеки кДНК были получены с использованием 200 нг фракции малой РНК, в соответствии с протоколом, поставляемым в комплекте Ambion SOLiD Small RNA Expression Kit (Applied Biosystems, США), и амплифицированы с использованием баркодированных праймеров и 17 циклов ПЦР для библиотек Mix A и 15 циклов ПЦР для библиотек Mix B. Продукты амплификации концентрировали с использованием GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas Life Sciences, Литва) и очищали с использованием 6%-го акриламидного геля. Кусочки геля, содержащего ПЦР-продукты ~ 105-150 п.н. вырезали, библиотеки элюировали 5М ацетатом аммония и очищали осаждением этанолом. Каждая библиотека была разведена до концентрации 0,5 пМ и использована для проведения эмульсионной ПЦР в полноразмерном формате. Около 40 миллионов шариков для каждого образца были нанесены на $\frac{1}{4}$ часть специального предметного стекла SOLiD 3.5 System и секвенированы при длине чтения 35 п.н. Секвенирование проводили в ЦКП “Геномика” СО РАН. Обозначение библиотек с соответствующими номерами доступа базы данных GenBank указаны ниже:

- 1) *C. sinensis*—A1 (SRX817942), rA1 (SRX817990), B1 (SRX817989)
- 2) *O. viverrini*—A2 (SRX817991), rA2 (SRX817993), B2 (SRX817992)
- 3) *O. felineus*
 - а) участок мариты без матки с яйцами—A3 (SRX817994), rA3 (SRX817996), B3 (SRX817995)
 - б) метацеркария—A4 (SRX817997), rA4 (SRX817999), B4 (SRX817998)
 - в) участок мариты с маткой и яйцами —A5 (SRX818000), rA5 (SRX818002), B5 (SRX818001)

3.4 Биоинформатический анализ

3.4.1 Предсказание микроРНК

Для предсказания как консервативных, так и новых микроРНК, вначале было проведено SOLiD preprocess фильтрование чтений, используя программу HTS_SOLiD_Preprocessing [198] с следующими параметрами: минимальное количество для анализа поликлональных чтений – 1, минимальное значение QV для анализа поликлональных чтений – 25, максимальное количество разрешенных ошибок – 100, максимальное значение QV для ошибки – 10, Удаление чтений с негативным значением QV – у, и удаление концевых нуклеотидов – off. Последовательности адаптеров были удалены программой cutadapt v. 0.9.5 [199] с максимальной долей ошибки 12.0% и минимальной длиной чтения 18-нуклеотидов. Далее последовательности в формате collarspace были картированы с помощью программы BFAST [200] на геномы *C. sinensis* (C_sinensis-2.0) и *O. viverrini* (OpiViv1.0) с следующими параметрами: расстояние редактирования (editing distance - количество замен/вставок/делеций допускаемых при выравнивании чтения) ≤ 4 , множественное картирование чтений было разрешено, остальные параметры были по умолчанию. После картирования на геномы, были отобраны последовательности с длиной от 18 до 26 нуклеотидов (и переведены в формат fasta). Далее с помощью программы miRCandRef (<https://hyperbrowser.uio.no/mircandref/>) проводили предсказание консервативных и новых микроРНК для *C. sinensis* и *O. viverrini*. Часть консервативных микроРНК, не предсказанных программой miRCandRef, были определены в результате гомологического поиска известных микроРНК из базы данных miRBase [195] и из данных Fromm с соавторами [23], в геномах *C. sinensis* и *O. viverrini* с помощью программы BLAST [201]. Для выявления новых микроРНК в результатах программы miRCandRef использовали следующие критерии:

- 1) Кандидат в новые микроРНК встречается хотя-бы в двух библиотеках;

- 2) чтения длиной 20-26 нуклеотидов картируются на оба плеча предшественника;
- 3) Есть 2-х нуклеотидный сдвиг между зрелой микроРНК и микроРНК стар во вторичной структуре микроРНК-предшественника;
- 4) Гомогенность 5'-конца чтений, соответствующих зрелой микроРНК;
- 5) По крайней мере, присутствие 16 связей между нуклеотидами 5' и 3' плеча;
- 6) Длина терминальной петли должна составлять не менее чем 8 нуклеотидов.

Далее последовательности предсказанных неконсервативных микроРНК были картированы с помощью программы bowtie [202] на последовательности мРНК из базы данных Refseq (rel. 76) [203], на последовательности мРНК беспозвоночных из базы данных GenBank (rel. 213) [204], на последовательности РНК из базы данных Rfam (rel. 12.1) [205], и на геномы *C. sinensis* и *O. viverrini*, обработанные программой RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>), для удаления транскрибируемых геномных повторов, последовательностей мРНК и других некодирующих РНК.

После предсказания микроРНК для *C. sinensis* и *O. viverrini*, микроРНК для *O. felineus* предсказывали картированием чтений на последовательности пре-микроРНК *C. sinensis* и *O. viverrini* с помощью программы bowtie.

Все времязатратные вычисления проводили на кластерах Новосибирского Государственного Университета и Института вычислительных технологий СО РАН.

3.4.2 Анализ расположения микроРНК генов в геноме

Для анализа расположения микроРНК генов в геноме последовательности пре-микроРНК картировали на геномы *C. sinensis* и *O. viverrini*, используя программу BLAST. Далее проводили поиск микроРНК кластеров и интронных РНК. Группу микроРНК генов считали кластером,

если расстояние между генами не превышало 10000 п.н. Для поиска интронных микроРНК были взяты аннотации геномов из базы данных Wormbase Parasite (<http://parasite.wormbase.org>) [206]. микроРНК считали интронной, если ген микроРНК располагался в интроне белок-кодирующего гена.

3.4.3 Предсказание белок-кодирующих генов

Для предсказания потенциальных белок-кодирующих генов была использована программа Fgenesh [207] с использованием *S. mansoni*-специфического параметра поиска генов.

3.4.4 Филогенетический анализ микроРНК плоских червей

Филогенетический анализ был проведен с использованием программы Mega7 [208] с применением различных алгоритмов (Maximum Likelihood, Neighbor-joining и Maximum Parsimony). Оценку надежности филогенетического дерева проводили с помощью бутстрэп-анализа с 500 репликами. В качестве модели эволюции ДНК использовали Tamura-Nei model.

Для анализа были взяты последовательности пре-микроРНК *S. midterinea* [160,162,164], *G. salaris* [124], *F. hepatica* [23], *C. sinensis*, *O. viverrini*, *S. japonicum* [173,174], *S. mansoni* [173,183,185], *H. microstoma*[190], *E. granulosus*[188,190] и *E. multilocularis*[188,190,191]. Кроме этого были использованы микроРНК, выявленные при поиске непредсказанных консервативных микроРНК картированием известных микроРНК плоских червей на геномы *F. hepatica* (Fhep_Liv_v1), *S. japonicum* (ASM15177v1), *S. mansoni* (ASM23792v2), *H. microstoma* (HMIC002), *E. granulosus* (EGRAN001 и ASM52419v1) и *E. multilocularis* (EMULTI002) с помощью программы BLAST. Результаты предсказания ранее неописанных консервативных микроРНК проверяли картированием с помощью программы bowtie последовательностей, полученных в результате секвенирования малых РНК

F. hepatica (SRP055786) [23,168,169], *S. japonicum* (SRP019769) [178], *S. mansoni* (SRP028328) [183], *E. granulosus* (SRP034671) [189].

3.4.5 Предсказание мРНК-мишеней

Для предсказания мРНК мишеней последовательности 3'-НТР-ов для *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* были выделены из последовательностей мРНК, скаченных из GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) [209,210]. Далее мишени предсказывали, используя программы RNAhybrid [142] (параметры $dG \leq -20$ kcal/mol, P-value ≤ 0.01 .), PITA [147] ($ddG \leq -10$ kcal/mol), и TargetScan [132]. После был проведён поиск результатов, предсказанных всеми тремя программами (модель затравочного участка должна совпадать у результатов программы PITA и программы TargetScan).

3.4.6 Анализ экспрессии микроРНК

Количество чтений, картированных на последовательность зрелой микроРНК, подсчитывали и нормировали, используя формулу rpm (reads per million – количество чтений на миллион картированных чтений). После нормализации проводили сравнение экспрессии между стадиями у *O. felineus*, вычисляя значение foldchange.

3.5 Разработка праймеров

Дизайн праймеров для выбранных генов осуществляли с помощью программ PrimerExpress®Softwarev2.0 (Applied Biosystems, США) и Primer Premier 5.0 (Premierbiosoft, США). В таблице 1 представлены все использованные олигонуклеотиды.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, разработанные для экспериментальной проверки кластеров и экспрессии микроРНК.

Название	Последовательность (5'-3')	Длина н.	Tm °C
clust1-for1	cacagccagttatgatgaac	20	51
clust1-for2	acagccctgcttgggacac	19	61
clust1-rev	ccaaagcttggactgtgat	19	53
clust2-for	aaagacttgagtagtgagacgct	23	56

Продолжение Таблицы 1.

Название	Последовательность (5'-3')	Длина н.	Tm °C
clust2-rev	tcgtcacctaagcaggact	19	55
Cl1-F	cgcaagtgatcaatgttttcctc	23	55
Cl1-R	gcgcaccaacggcctaa	17	59
cel-lin-4-5p	ctacctgagacctcaagtgtga	22	51
miR-71a-F	ccttgaaagacgatggtagtgaga	24	56
miR-2a-F	ctcacagccagtattgatgaacg	23	56
miR-2b-F	tatagccctgcttgggacaca	21	58
UniMirRef	cgagcaggggtccgaggt	17	60
lin-4-sl	ggtcgtatgcaaagcaggggtccgaggtatccatcgacgcacgcactgcata cgacctcacac	64	73
miR-71a-sl	ggtcgtatgcaaagcaggggtccgaggtatccatcgacgcacgcactgcata cgacctctcactacc	68	73
miR-2a-sl	ggtcgtatgcaaagcaggggtccgaggtatccatcgacgcacgcactgcata cgacccgttcat	65	74
miR-2b-sl	ggtcgtatgcaaagcaggggtccgaggtatccatcgacgcacgcactgcata cgacctgtgtc	64	73
uniTAQ	5'-(FAM)-catcgacgcacgcactgcata-(BHQ-1)-3'	21	69

3.6 Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили в реакционной смеси (20 мкл.), содержащей 0,2 мМ dATP, 0,2 мМ dGTP, 0,2 мМ dCTP, 0,1 мМ dTTP, 0,1 мМ dUTP (Helicon, Россия), 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (SibEnzyme, Россия), 1 ед. Урацил ДНК-гликозилазы (SibEnzyme, Россия), 0,5 мкМ прямого праймера, 0,5 мкМ обратного праймера и 1x буфер Taq с (NH₄)₂SO₄ (Fermentas Life Sciences, Литва). Условия ПЦР для реакционных смесей, содержащих праймеры clust1-rev, clust1-for1, clust1-for2, были следующие: 37°C 30 мин, 95°C 2 мин, 35 циклов по программе 95°C 25 с, 56°C 30 с, 72°C 30 с. Для реакционных смесей, содержащих праймеры clust2-for и clust2-rev, были следующие: 37°C 30 мин, 95°C 2 мин, 35 циклов по программе 95°C 25 с, 53°C 30 с, 72°C 30 с. Для реакционных смесей, содержащих праймеры Cl1-F и Cl2-R (реакционная смесь не содержала UDG), были следующие: 95°C 2 мин, 35 циклов по

программе 95°C 25 с, 56°C 30 с, 72°C 30 с. ПЦР проводили на приборе Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия).

Анализ продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем 0,1% (v/v) бромистого этидия (SERVA Electrophoresis GmbH, Германия) в 1х ТАЕ. Образцы наносили с использованием Orange Loading Dye Solution (Fermentas Life Sciences, Литва).

3.7 Секвенирование по Сэнгеру

Очистку ПЦР-продуктов проводили по методу Exo-SAP. В 20 мкл ПЦР-продукта добавляли 1 мкл Exonuclease I (*E. coli*, 20 ед/мкл, Fermentas Life Sciences, Литва) и 1 мкл Shrimp Alkaline Phosphatase (1 ед/мкл, Fermentas Life Sciences, Литва), dATP (100 мМ, Helicon, Россия). Далее инкубировали 15 мин при 37°C, а затем 15 мин при 80°C Thermomixer comfort (Eppendorf, Германия).

Реакция секвенирования проводили с помощью набора "BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Life technologies, США) по рекомендации производителя.

Очистку продуктов реакции секвенирования проводили с помощью суспензии Sephadex. Готовили суспензию из расчета 2г порошка Sephadex G-50 (SIGMA-ALDRICH®, США) на 15 проб, добавляя ddH₂O (вода покрывает порошок на 1/3). После чего ставили в термошейкер Thermomixer comfort (Eppendorf, Германия) на 1 – 1,5 часа при 56-60°C. Срезав кончик у носика пипетки, 700-1000 мкл суспензии переносили в колонку. Инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали 10 мин на центрифуге Centrifuge 5424 (Eppendorf, Германия) при 10 тыс. оборотах в минуту. Переносили колонку в чистую пробирку и наносили продукты реакции секвенирования (20 мкл). Затем центрифугировали 1 мин на центрифуге Centrifuge 5424 при 5 тыс. оборотах в минуту. После этого продукты реакции секвенирования высушивали в вакуумной центрифуге 1 час при 60°C.

Анализ продуктов секвенирования производили с помощью оборудования ЦКП "Геномика" СО РАН.

3.8 Выделение РНК для цифровой капельной ПЦР

Мариты и метацеркарии перед выделением РНК хранили при -20 °С в РНК стабилизирующем реагенте (RNAlater® Solution (Ambion, США)). Образцы перетирали пестиком в микроцентрифужной пробирке и заливали 1 мл TRIzol reagent (Invitrogen™ Life Technologies, США). Образцы затем гомогенизировали, пропуская суспензию 10 раз через иглу шприца (22G*1,25). Гомогенизированные образцы инкубировали 5 минут при комнатной температуре, и затем добавляли 0,2 мл хлороформа. Затем пробирку встряхивали в течение 15 секунд, инкубировали 2-3 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 12000 g в течение 15 минут при 4°С, используя MIKRO 22 R (Hettich zentrifugen, Германия). Верхнюю водную фазу, содержащую РНК, переносили в новую пробирку. Добавили 0,5 мл 100% изопропанола, охлажденного до -20°С. Инкубировали при 4°С 10 мин, центрифугировали при 12 000 g 10 мин при 4°С, используя MIKRO 22 R. Супернатант удаляли. Осадок промывали 75 % этанолом. Центрифугировали при 7500 g 5 мин при 4°С, используя MIKRO 22 R. РНК растворяли при 55-60 °С 2 минуты в 50 мкл раствора elution solution из Aurum™ total RNA Mini Kit (Bio-Rad, Германия), предварительно подогретого до +70°С, после чего препараты РНК хранили при -80°С.

Качество и количество выделенной РНК оценивали на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer, а также электрофорезом РНК в 2% агарозном геле. Электрофорез проводили в буфере TAE, напряжение 5 В/см, в течение 45 мин.

Препараты РНК очищали от примесей ДНК. Для приготовления реакционной смеси использовали следующие компоненты: 1 мкг РНК, 1 мкл 10х реакционного буфера (набор DNase I RNase-free (Fermentas, Литва)), 1 мкл (1 ед.) ДНказы I (RNase-free, Fermentas Life Sciences, Литва), DEPC-

обработанная вода до итогового объема 10 мкл. Препараты инкубировали 30 мин при 37°C. Затем добавляли 1 мкл 50 мМ ЭДТА и инкубировали при 65°C 10 мин.

3.9 Синтез кДНК

Для синтеза кДНК смешивали 1,5 мкл stem-loop праймера (50 нМ), 2 мкл РНК, и 7 мкл воды. Смесь инкубировали 10 мин при 65°C, после чего держали при +4°C. Далее добавляли 2 мкл 10-кратного буфера для обратной транскрипции, 2 мкл DTT(10 мМ) (Fermentas, Литва), 2 мкл dNTP(10 мМ) (Helicon, Россия), 10 единиц ингибитора РНКазы (Fermentas, Литва), 50 единиц обратной транскриптазы (Fermentas, Литва). Реакционную смесь доводили водой до объема 20 мкл. Обратную транскрипцию проводили в следующих условиях: 15 мин при 25 °C, 15 мин при 37 °C, 40 мин при 42°C, 2 мин при 95°C (ингибирование обратной транскрипции), используя Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия). В качестве положительного контроля использовали обратную транскрипцию, запускаемую с синтетического олигонуклеотида, соответствующего микроРНК cel-lin-4-5p.

3.10 Цифровая капельная ПЦР

Цифровую капельной ПЦР проводили в реакционной смеси (20 мкл.), содержащей 1x ddPCR Super Mix (Bio-Rad, Германия), 0,25 мкМ Taqman зонда, 0,875 мкМ прямого праймера, 0,875 мкМ обратного праймера. Из реакционной смеси делали эмульсию с добавлением 70 мкл минерального масла QX100™ Droplet Generator Oil (Bio-Rad, Германия), используя генератора суспензии QX100™ Droplet Generator (Bio-Rad, Германия). 40 мкл полученной суспензии переносили в планшет для проведения ПЦР в амплификаторе QX100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Германия). Условия ПЦР были следующие: 95°C 10мин; 30 циклов по программе 94°C 30с, 60°C 1мин; 98°C 10мин. Результат цифровой капельной ПЦР анализировали на QX100™ Droplet Reader (Bio-Rad, Германия).

4 Результаты исследования

Известно, что предсказание микроРНК можно выполнить на базе результатов высокопроизводительного секвенирования. Для предсказания микроРНК описторхид были созданы библиотеки из фракции малых РНК *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*. В результате секвенирования этих библиотек по технологии SOLiD были получены следующие результаты:

- 1) 126 млн. чтений для *C. sinensis*;
- 2) 150 млн. – для *O. viverrini*;
- 3) 152 млн. – для участка мариты *O. felineus* без матки с яйцами;
- 4) 131 млн. – для участка мариты *O. felineus* с маткой и яйцами;
- 5) 162 млн. – для метацеркарий *O. felineus*.

После удаления адаптера и фильтрации по качеству и длине чтений осталось следующее количество чтений:

- 1) 9 млн. чтений для *C. sinensis*;
- 2) 11 млн. – для *O. viverrini*;
- 3) 12 млн. – для участка мариты *O. felineus* без матки с яйцами;
- 4) 12 млн. – для участка мариты *O. felineus* с маткой и яйцами;
- 5) 8 млн. – для метацеркарии *O. felineus*.

4.1 Результаты компьютерного предсказания микроРНК

описторхид

В итоге биоинформатического анализа результатов секвенирования фракции малых РНК *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*, а также компьютерного анализа геномов *O. viverrini* и *C. sinensis* были выявлены 55 консервативных микроРНК, принадлежащих к 34 семействам (bantam, let-7, miR-1, miR-2, miR-7, miR-8, miR-9, miR-10, miR-12, miR-22, miR-31, miR-36, miR-46, miR-67, miR-71, miR-76, miR-87, miR-92, miR-96, miR-124, miR-133, miR-184, miR-190, miR-210, miR-219, miR-277, miR-278, miR-279, miR-750, miR-1175, miR-1989, miR-1992, miR-1993, miR-2160) (Таблица 2) и один

кандидат в микроРНК (“новая” микроРНК) (Приложение 1). Большинство семейств представлено одним геном микроРНК, но семейства miR-1, miR-7, miR-71, miR-92, miR-190, miR-190, miR-210, miR-277 и miR-2160 представлены двумя генами микроРНК, семейства miR-36 и let-7 – тремя генами микроРНК, miR-10 – пятью генами микроРНК, miR-2 – шестью генами микроРНК.

Таблица 2. Распределение найденных консервативных семейств микроРНК среди билатеральных животных. Серый цвет означает наличие микроРНК семейств у представителей определённого таксона.

Семейства микроРНК	Protostomia			Deuterostomia				
	Lophotrochozoa					Chordata		
	Platyhelminthes	Остальные Lophotrochozoa				Cephalochordata	Urochordata	Vertebrata
miR-2160								
miR-1989, miR-1992								
bantam, miR-2,								
miR-12, miR-36, miR-67, miR-76, miR-87, miR-277, miR-279, miR-750, miR-755, miR-1993								
miR-278								
miR-46, miR-71								
miR-210								
let-7, miR-1, miR-7, miR-8, miR-9, miR-10, miR-22, miR-31, miR-92, miR-96, miR-124, miR-133, miR-184, miR-190, miR-219								

4.2 Особенности организации микроРНК-генов

В результате анализа расположения микроРНК генов в геноме *C. sinensis* и *O. viverrini* было обнаружено 4 кластера генов микроРНК, участок, похожий на кластер, и три интронные микроРНК.

4.2.1 микроРНК кластеры

Согласно последним исследованиям микроРНК, из семейства miR-277 обнаружены только у первичноротых. микроРНК из семейства miR-277 описаны в составе кластеров miR-317/miR-277a/miR-277b/miR-34 (у *Capitella teleta* [211]), miR-317/miR-277/miR-34 (у различных дрозофил [42,212], *Acyrtosiphon pisum* [213] и *Tribolium castaneum* [214]), miR-277/miR-34 (у некоторых дрозофил [212], *Aedes aegypti* [215], *Anopheles gambiae* [216], *Bombyx mori* [217], *Manduca sexta* [218], *Nasonia vitripennis* [219] и *Panagrellus redivivus* [220]), miR-4989/miR-277 (у плоских червей, а именно цестод [188,190]) и miR-277b/miR-277a (у *S. mediterranea* [160,162,164]). Стоит отметить, что miR-4989 принадлежит к семейству miR-277. Относящиеся к этому семейству микроРНК обнаружены у *G. salaris*, *F. hepatica* и *S. japonicum*.

Путём выравнивания последовательностей, окружающих miR-277 плоских червей, удалось выявить, что *C. sinensis*, *O. viverrini*, *F. hepatica*, *S. mansoni*, *S. japonicum* обладают кластером miR-277b/miR-277a. Также удалось установить, что два кластера miR-277b/miR-277a лишились одной микроРНК у *G. salaris* (Рисунок 16).

Кластер miR-750(miR-1174)/miR-755(miR-1175) также обнаружен только у первичноротых, а именно у комаров *Aedes aegypti* [215,221], *Anopheles gambiae* [216], *Culex quinquefasciatus* [221]), пчелы *Apis mellifera* [222], бабочки *Bombyx mori* [217,223], жука *Tribolium castaneum* [214], нематоды *Brugia malayi* [224], кольчатого червя *Capitella teleta* [225], моллюска *Lottia gigantea* [225], и плоского червя *S. mediterranea* [160,162,164] (<http://mirbase.org/>). Стоит отметить, что часть микроРНК входящих в этот кластер описана для *F. hepatica* (miR-1175) [23], *G. salaris* (miR-1175) [124], и *S. mansoni* (miR-755) [183]. Нам удалось найти последовательности, похожие на недостающие микроРНК из кластера miR-750/miR-755, в геноме трематод (а именно miR-750 у *F. hepatica* и *S. mansoni*) и последовательность,

гомологичную кластеру miR-750/miR-755, в геноме *S. japonicum*. У цестод последовательности, гомологичные данным микроРНК, найти не удалось.

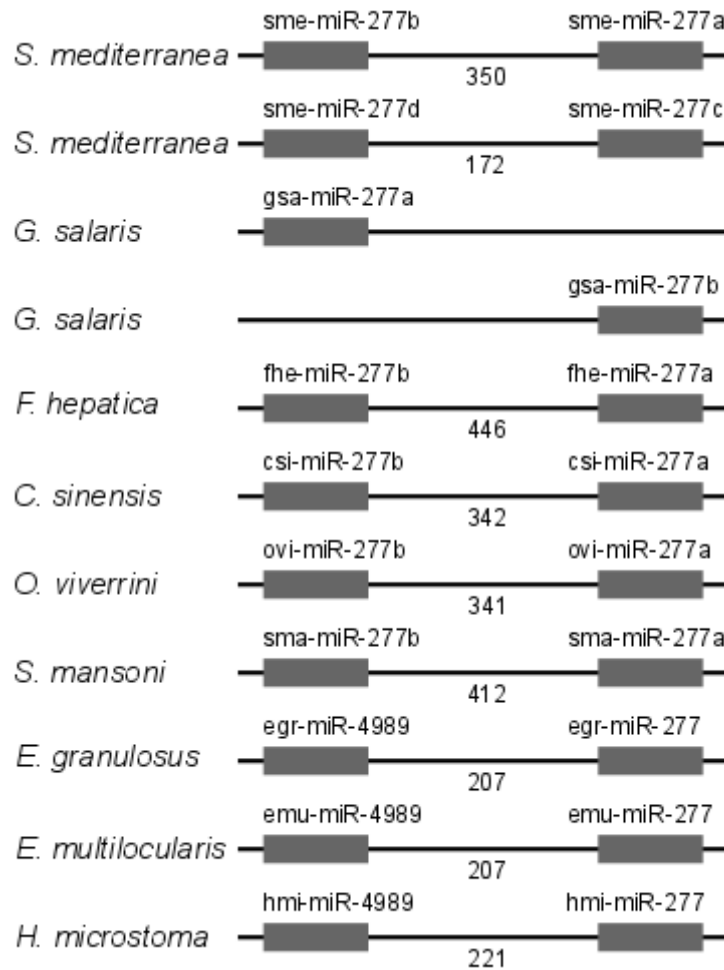


Рисунок 16. Схема кластера miR-277b/miR-277a плоских червей. Внизу каждого кластера приведена его длина в п.н.

Среди плоских червей самая короткая версия кластера была обнаружена у свободно живущей планарии *S. mediterranea*. У трематод кластер минимум в 1,7 раза больше чем *S. mediterranea* (Рисунок 17).

Кластеры miR-71/miR-2 тоже обнаружены только у первичноротых, хотя miR-71 встречается и у вторичноротых, за исключением позвоночных (<http://mirbase.org/>).

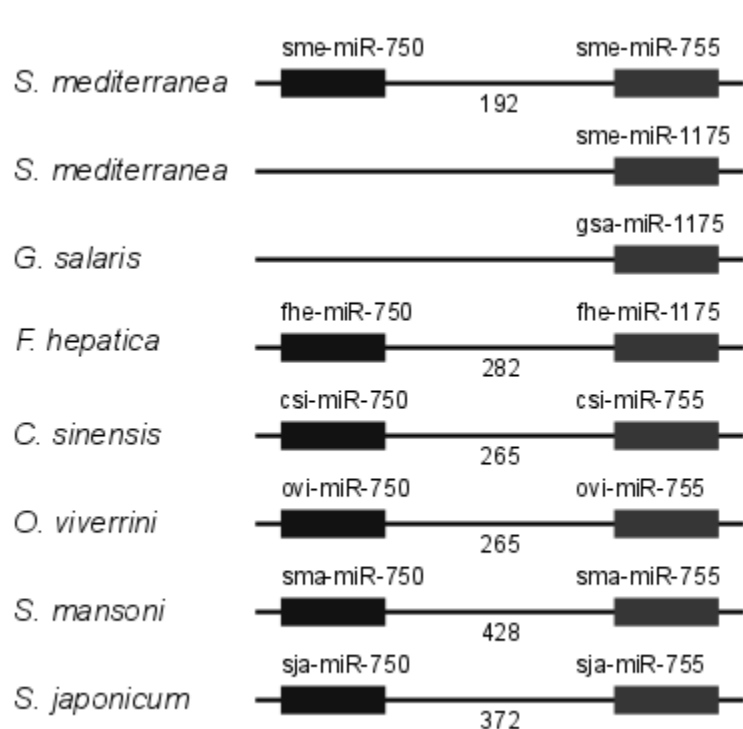


Рисунок 17. Схема кластера miR-750/miR-755 плоских червей. Внизу каждого кластера приведена его длина в п.н.

Филогенетический анализ miR-71/miR-2 кластеров среди плоских червей позволил выявить три крупных группы этих кластеров (Рисунок 18). Первая группа представлена у турбеллярии (miR-71c/miR-2c), трематод (miR-71a/miR-2a/miR-2b/miR-2e) и цестод (miR-71a/miR-2c/miR-2b) (Рисунок 18А). Вторая группа обнаружена у турбеллярии (miR-71b/miR-2d/miR-752/miR-13 и распавшийся кластер, представленный miR-2b без miR-71), моногенеи (miR-71b/miR-2c/miR-2a/miR-2d) и трематод (miR-71b/miR-2f/miR-2d/miR-2c) (Рисунок 18Б). Третья группа выявлена у турбеллярии (miR-2167/miR-2f/miR-2e и три копии кластера, состоящего из одной последовательности miR-71 и miR-2), моногенеи (miR-71a/miR-2b), *F. hepatica* (miR-71a/miR-2a) и цестод (распавшийся кластер, представленный miR-2a без miR-71) (Рисунок 18В).

Кластеры miR-71a/2 miR-71b/2 *C. sinensis* и *O. viverrini* структурно схожи с подобными кластерами двух видов шистосом и *F. hepatica*. Стоит отметить, что изначально miR-2f не была определена у шистосом, а была

определена лишь позднее при сравнительном анализе кластеров [176]. Также следует отметить, что *sme-miR-752* формально не отнесена к семейству *miR-2*, а *miR-2167* к семейству *miR-71*, но есть данные о том, что *miR-752* эволюционировала из *miR-2* [124], а предсказанная последовательность микроРНК стар для *miR-2167* принадлежит к семейству *miR-71* (Рисунок 19).

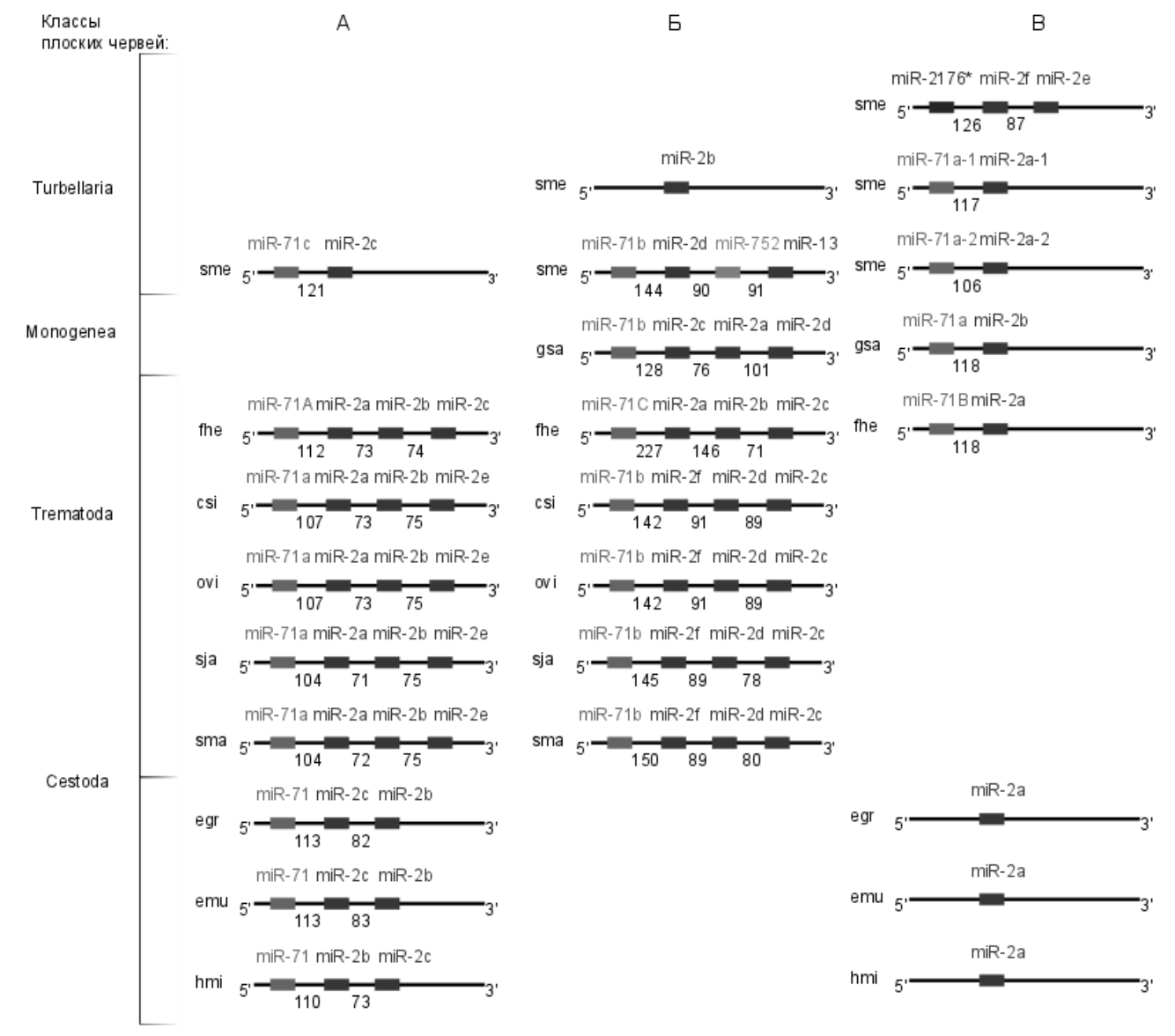


Рисунок 18. Схема кластера *miR-71a/miR-2* плоских червей. Обозначение видов: *sme* – *S. mediterranea*, *gsa* – *G. salaris*, *fhe* – *F. hepatica*, *csi* – *C. sinensis*, *ovi* – *O. viverrini*, *sja* – *S. japonicum*, *sma* – *S. mansoni*, *egr* – *E. granulosus*, *emu* – *E. multilocularis*, *hmi* – *H. microstoma*. Внизу каждого кластера приведены расстояния между последовательностями зрелых микроРНК в п.н.

sme-miR-2167*	T GAAAGAC AAGTCTTATACATTCT
fhe-miR-71A	T GAAAGAC GATGGTAGTGAGAT--
csi-miR-71a	T GAAAGAC GATGGTAGTGAGA---
sma-miR-71a	T GAAAGAC GATGGTAGTGAGA---
hmi-miR-71	T GAAAGAC GATGGTAGTGAGA---
egr-miR-71	T GAAAGAC GATGGTAGTGAGA---
	***** * * *

Рисунок 19. Выравнивание sme-miR-2167* и miR-71a плоских червей. Серым выделен затравочный участок микроРНК. Обозначение видов: sme—*S. mediterranea*, fhe—*F. hepatica*, csi—*C. sinensis*, sma—*S. mansoni*, hmi—*H. microstoma*, egr—*E. granulosus*.

4.2.2 Определение микроРНК-генов в геномах описторхид с использованием ПЦР

При анализе результатов картирования консервативных микроРНК на геномы *C. sinensis* и *O. viverrini* было выдвинуто предположение, что у всех описторхид сохранилась геномная организация 2-х кластеров микроРНК генов miR-71a/2 и miR-71b/2. Для того чтобы подтвердить это предположение были разработаны праймеры для амплификации геномных районов, содержащих эти кластеры. Для разработки праймеров с помощью программы Primer Premier были использованы данные нуклеотидных последовательностей соответствующего геномного района у *C. sinensis* и *O. viverrini* и предсказанных нами микроРНК-кандидатов.

4.2.2.1 Кластер miR-71a/miR-2a/miR-2b/miR-2e

Для амплификации фрагмента геномов *O. felinus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*, содержащих последовательности кластера miR-71a/miR-2a/miR-2b/miR-2e, были сконструированы две пары праймеров clust1-for1, clust1-rev и clust1-for2, clust1-rev, соответствующие участкам, кодирующим зрелые микроРНК (Рисунок 20). Далее проводили ПЦР с использованием этих праймеров и ДНК трех описторхид. Размер продуктов ПЦР соответствовал расчетному размеру (215 и 115 п.н.) (Рисунок 21).

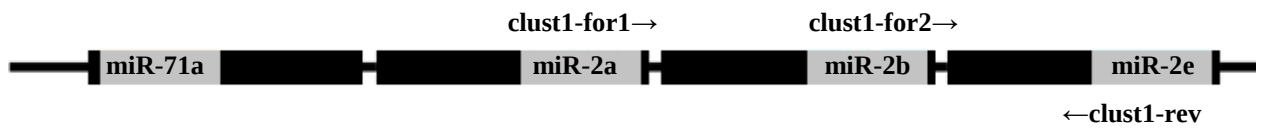


Рисунок 20. Расположение праймеров clust1-for1, clust1-for2 и clust1-rev на геномном участке, соответствующем кластеру микроРНК-генов miR-71a/miR-2a/miR-2b/miR-2e описторхид. Чёрные прямоугольники обозначают последовательность предшественника микроРНК, серые прямоугольники обозначают последовательность зрелой микроРНК.

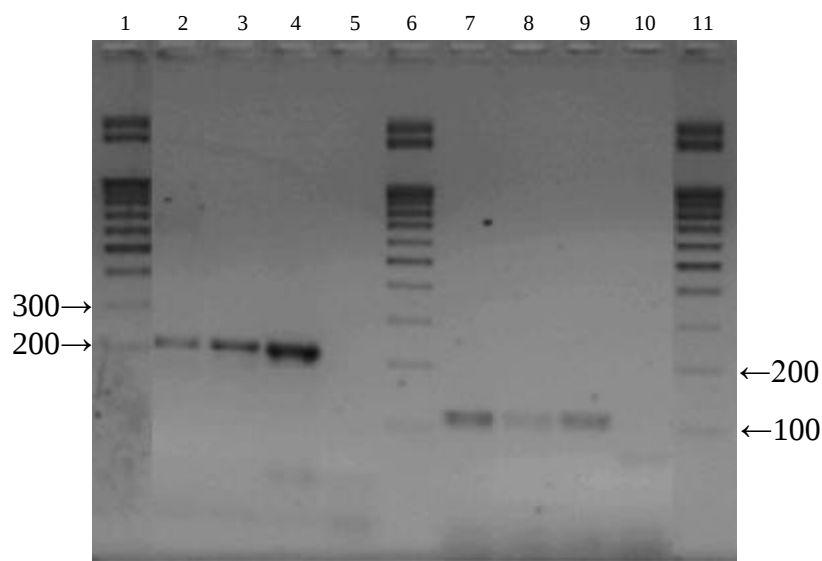


Рисунок 21. Электрофореграмма продуктов ПЦР в агарозном геле с бромистым этидием, в которой использовались праймеры clust1-for1 и clust1-rev (дорожки: 2 – *C. sinensis*, 3 – *O. felinus*, 4 – *O. viverrini*, 5 – отрицательный контроль (реакция без матрицы)) и праймерами clust1-for2 и clust1-rev (дорожки: 7 – *C. sinensis*, 8 – *O. felinus*, 9 – *O. viverrini*, 10 – отрицательный контроль (реакция без матрицы)). Дорожки 1, 6 и 11 – маркер.

После секвенирования ПЦР-продуктов *C. sinensis*, *O. felinus* и *O. viverrini* соответствующие последовательности были проанализированы, и было выявлено высокое сходство последовательностей кластеров у трех видов (Приложение 2). Основываясь на гомологичности последовательностей кластеров, были разработаны праймеры C11-F и C11-R,

для амплификации участка кластера со всеми 4-мя предшественниками микроРНК-кандидатов в геномах трёх описторхид (Рисунок 22). Размер ампликонов, соответствующих микроРНК-кластеру у всех трех видов, совпал с расчетным (526 п.н.) (Рисунок 23).

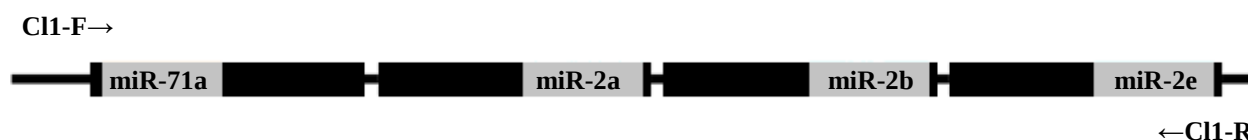


Рисунок 22 Расположение праймеров Cl1-F и Cl1-R на геномном участке, соответствующему кластеру микроРНК-генов *mir-71a/mir-2a/mir-2b/mir-2e* описторхид. Чёрные прямоугольники обозначают последовательность предшественника микроРНК, серые прямоугольники обозначают последовательность зрелой микроРНК.

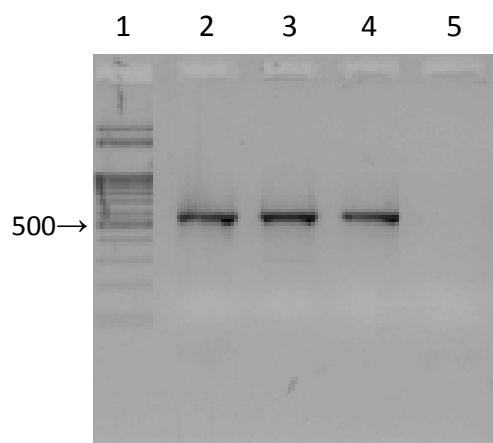


Рисунок 23. Электрофореграмма продуктов ПЦР в агарозном геле с бромистым этидием, в которой использовались праймеры Cl1-F и Cl2-r. Дорожки: 1 – маркер, 2 – *S. sinensis*, 3 – *O. felineus*, 4 – *O. viverrini*, 5 – отрицательный контроль (реакция без матрицы)

ПЦР-продукты были секвенированы, в результате чего были получены 4 последовательности пре-микроРНК для каждой из 3-х описторхид. С помощью программы UNAFold были построены вторичные структуры предшественников и рассчитаны их свободные энергии (Приложение 3).

4.2.2.2 Кластер miR-71b/ miR-2f/miR-2d/miR-2c

Для амплификации фрагмента геномов *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*, содержащих последовательности кластера miR-71b/miR-2f/miR-2d/miR-2c, была сконструирована пара праймеров clust2-for, clust2-rev., соответствующая участкам, кодирующие зрелые микроРНК (Рисунок 24). Далее проводилась ПЦР с использованием этих праймеров и ДНК трех описторхид. Размер продуктов, полученных в результате ПЦР соответствовал расчётному размеру (299 п.н.) (Рисунок 25).

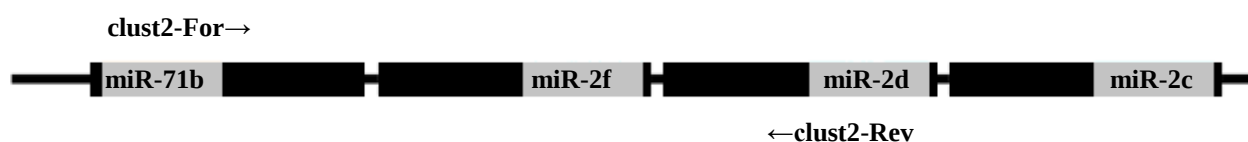


Рисунок 24 Расположение праймеров Clust2-For и Clust2-Rev на геномном участке, соответствующему кластеру микроРНК-генов miR-71b/miR-2f/miR-2d/miR-2c описторхид. Чёрные прямоугольники обозначают последовательность предшественника микроРНК, серые прямоугольники обозначают последовательность зрелой микроРНК.

После секвенирования ПЦР-продуктов *C. sinensis*, *O. felineus* и *O. viverrini* соответствующие последовательности были проанализированы, и было выявлено высокое сходство последовательностей кластеров у трех видов (Приложение 4). Однако, несмотря на высокое сходство, у *O. felineus*, вероятно, фланкирующие участки кластера miR-71b/miR-2f/miR-2d/miR-2c значительно отличаются от фланкирующих участков этого кластера у *O. viverrini* и *C. sinensis*. По этой причине не удалось создать пару праймеров для амплификации геномного района, содержащего все четыре последовательности предшественников микроРНК из кластера miR-71b/miR-2f/miR-2d/miR-2c, у трех описторхид.

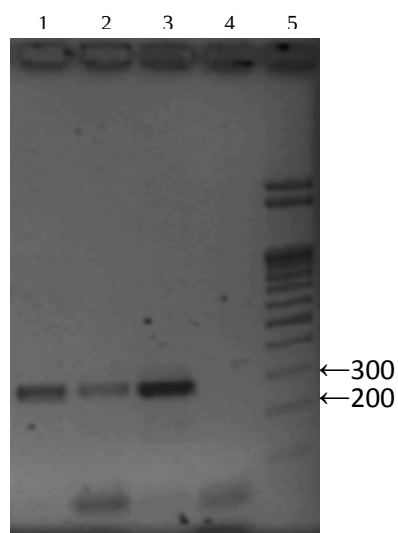


Рисунок 25. Электрофореграмма продуктов ПЦР в агарозном геле с бромистым этидием, в которой использовались праймеры clust2-for и clust2-rev. Дорожки 1 – *C. sinensis*, 2 – *O. felineus*, 3 – *O. viverrini*, 4 – отрицательный контроль (реакция без матрицы), 5 – маркер.

4.2.3 Организация генов miR-1 и miR-133

В работе Jin с соавторами участки генома с генами микроРНК miR-1 и miR-133 были обозначены как кластер генов микроРНК у трех плоских червей, а именно цестод *E. granulosus*, *E. multilocularis* и *H. microstoma* [190]. Мы расширили этот список видов плоских червей, так как выяснили, что *C. sinensis*, *O. viverrini* и *S. mansoni* также имеют аналогичные участки в геноме. Следует отметить, что miR-133 не была аннотирована для *S. mansoni* в предыдущих исследованиях [21,173,176,183–185]. Тем не менее, мы обнаружили последовательности, гомологичной этой микроРНК в архивах чтений SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) (ERR278825, ERR278826, ERR278827, ERR278828) с помощью программы BLAST. Последовательность предшественника miR-133 у двух видов шистосом *S. mansoni* и *S. japonicum* намного длиннее ортологичных последовательностей других видов, что могло бы объяснить отсутствие аннотации sma-miR-133 и неправильную аннотацию sja-miR-133 (MI0015293) (Таблица 3).

Таблица 3. Пре-микроРНК miR-133 плоских червей.

микроРНК	Пре-микроРНК	Длина н.
sme-miR-133a	cagcuguugacgaaguaucaaaauaguuaaauaugauuaaaauuuuugguccccg ucaaccagcugu	69
sme-miR-133b	ugcugcuagauggugaaucaaaaccguuuugggucuugguccccaucaaccagca	54
csi-miR-133	cgcuguuugaguggaaccgaaauggggucaguccuuggaccagucaagugcagcaggga acugugcuuugauucaguugaccuaacugccuugcacuaauccaauuuggucccuauca accagcuau	126
ovi-miR-133	cgcuguuugaguggaaccgaaauggggucaguccuuggaccagucaagugcagcaggga acugugcuuugauucaguugaccuaacugccuugcacuaauccaauuuggucccuauca accagcuau	126
sja-miR-133	ugcuguuuguuaggguaacaaaaucaugcacaauuucaaaaauucuuuuucauguuaa acguacacauaacuaaaagauaaauuacacauuuuuuuucaugaacauuaaccuuua acgguaagaccaugcuuuuuuuguguaauuuuuuguguaucguuaugaaaugaauuu aaauugcgcaugcuguucuuuagagauuuuuggucccuaucaaccagcugu	221
sma-miR-133	ugcuguuuguuaggguaacgaaaaucauacacaaauuguaaaugaucuuuuucauuuacc agcacacauauguacagaacuaauacuaaaagauaaauuacacauuuuuuuucauga aagcuuaccguaaacgguaaaucagauuuuuuuuuuuguguaagauuguguucuguua ugaaaugaauuuuuuuuuguguauguuacuguuacaagaauuuuggucccuaucaacca gcuau	234
egr-miR-133	ggcugauuuugggggcucagaaaagcuguuaaauugaaaacuuuugguccccaauuaacca gccgc	63
emu-miR-133	ggcugauuuugggggcucagaaaagcuguuaaauugaaaacuuuugguccccaauuaacca gccgc	63
hmi-miR-133	ggcugauuuuuggggucagaaaagacggugcaagaucuuugaccuuuuggucccca uuuaccagccgc	70

При выравнивание этих “кластеров” выявить консерватизм этих регионов у шести геномов не удалось. Примечательно, что участки между последовательностями, которые соответствуют генам микроРНК, обладают значительной длиной, начиная от 11705 п.н. у *E. multilocularis* и заканчивая 34008 п.н. в *S. sinensis* (Рисунок 26, Приложение 5). Таким образом, расстояние между генами микроРНК miR-1 и miR-133, превышающее 10000 п.н., указывает на то, что рассматриваемые гены микроРНК не соответствуют определению кластера генов микроРНК [43]. Следовательно, корректно данные участки называть "участок, похожий на кластер miR-1 / miR-133".

Для выявления (предсказания) белок-кодирующих генов в участке между микроРНК генами miR-1 и miR-133 в геномах шести видов плоских червей, мы применили программу предсказания генов Fgenesh [207] с использованием *S. mansoni*-специфического параметра поиска генов. В

результате были обнаружены несколько неаннотированных ОРС, без существенного сходства среди видов (Приложение 6).

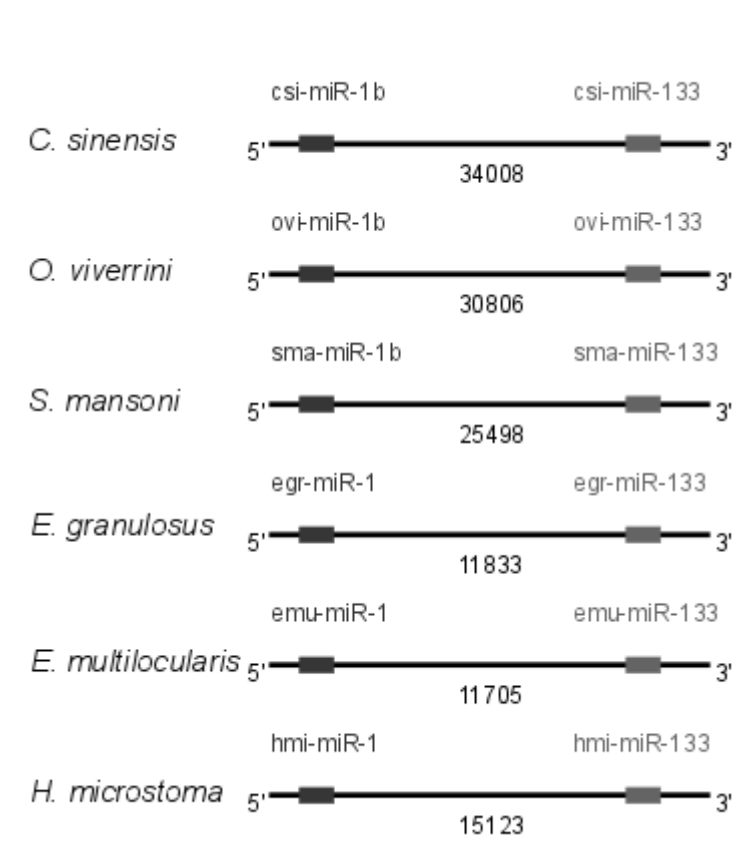


Рисунок 26 Схема геномной организации "участка, похожего на кластер miR-1/miR-133", у пяти видов плоских червей.

Затем мы исследовали геномный контекст вне участка, похожего на кластер miR-1/miR-133 у шести видов плоских червей с использованием информации (gff файлы) из базы данных WormBase ParaSite (<http://parasite.wormbase.org>). Мы обнаружили, что miR-133 находится рядом с геном, кодирующим один из нескольких белков семейства “Mind bomb protein” (Mib белки) во всех шести геномах. Мы также обнаружили, что miR-1 располагается рядом с геном, кодирующим другой Mib белок в геномах *S. mansoni*, *E. granulosus* и *E. multilocularis* (Приложение 7).

4.2.4 Отсутствующий кластер

Во многих таксонах вторичноротых существует кластер let-7/miR-100/miR-125. В геномах первичноротых были обнаружены многие вариации структуры этого кластера с отсутствием одного из генов микроРНК, и только у представителей Annelida, Trichinella, Arthropoda был обнаружен кластер, содержащий let-7, miR-100 и miR-125. Ранее было показано, что данный кластер не существует у плоских червей. Более того, у плоских червей не был обнаружен ген микроРНК miR-100 [226].

У описторхид не были обнаружены miR-100-подобные последовательности. Другие составляющие этого кластера были обнаружены в геномах плоских червей, но сочетание генов let-7 и miR-125 с расстоянием меньше чем 10000 п.н. не было обнаружено у всех плоских червей (Таблица 4).

4.2.5 Интронные микроРНК

Картирование miR-190a, miR-190b, miR-92b, miR-36b на доступные геномы плоских червей показало, что эти микроРНК расположены в интронах (Рисунок 27). В отличие от остальных, miR-36b картировалась на интрон предсказанного белок-кодирующего гена, который не обладает консервативностью между *C. sinensis* и *O. viverrini*. Так как последовательности зрелых микроРНК и микроРНК стар не пересекаются с сайтом сплайсинга, мы можем классифицировать miR-190a, miR-190b, miR-92b как интронные [49].

Два гена miR-190 были описаны только у *S. mediterranea*. У остальных плоских червей описан только один ген miR-190. Нам удалось найти последовательность гомологичную miR-190b в геноме *F. hepatica*. В геномах других трематод (шистосом) последовательность miR-190b найти не удалось.

Таблица 4. Расположение пре-микроРНК let-7 и miR-125 в геномах плоских червей.

микроРНК	вид	Версия генома	Контиг, скаффолд, или хромосома	начало	конец	цепь
let-7	<i>E. granulosus</i>	ASM52419v1	EG_S00098	276833	276889	+
miR-125	<i>E. granulosus</i>	ASM52419v1	EG_S00012	1320792	1320866	+
let-7a	<i>S. mansoni</i>	ASM23792v2	Chr_7	5118793	5118862	+
let-7b	<i>S. mansoni</i>	ASM23792v2	supercontig 0201	294868	295092	+
let-7c	<i>S. mansoni</i>	ASM23792v2	chromosome 1 unplaced supercontig 0071	1184426	1184632	+
miR-125a	<i>S. mansoni</i>	ASM23792v2	Chr_1	38691268	38691342	-
miR-125b	<i>S. mansoni</i>	ASM23792v2	chromosome 1 unplaced supercontig 0071	1248572	1248645	+
miR-125c	<i>S. mansoni</i>	ASM23792v2	Chr_1	34097093	34097176	-
let-7a	<i>S. mediterranea</i>	WUSTL3.1	Contig20276	1039	1119	+
let-7b	<i>S. mediterranea</i>	WUSTL3.1	Contig3897	40577	40657	-
let-7c	<i>S. mediterranea</i>	WUSTL3.1	Contig10988	10654	10748	-
let-7d	<i>S. mediterranea</i>	WUSTL3.1	Contig605	55692	55790	+
miR-125a	<i>S. mediterranea</i>	WUSTL3.1	Contig13184	12140	12234	-
miR-125a	<i>S. mediterranea</i>	WUSTL3.1	Contig3725	34188	34282	-
miR-125b	<i>S. mediterranea</i>	WUSTL3.1	Contig20519	5873	5963	+
let-7a	<i>C. sinensis</i>	C_sinensis-2.0	scf00555	111050	111118	+
let-7b	<i>C. sinensis</i>	C_sinensis-2.0	scf00408	383994	384088	+
let-7c	<i>C. sinensis</i>	C_sinensis-2.0	scf02193	15830	15978	-
miR-125a	<i>C. sinensis</i>	C_sinensis-2.0	scf01080	137115	137188	+
miR-125b	<i>C. sinensis</i>	C_sinensis-2.0	scf00066	690904	690976	+
miR-125c	<i>C. sinensis</i>	C_sinensis-2.0	scf00541	299995	300057	-

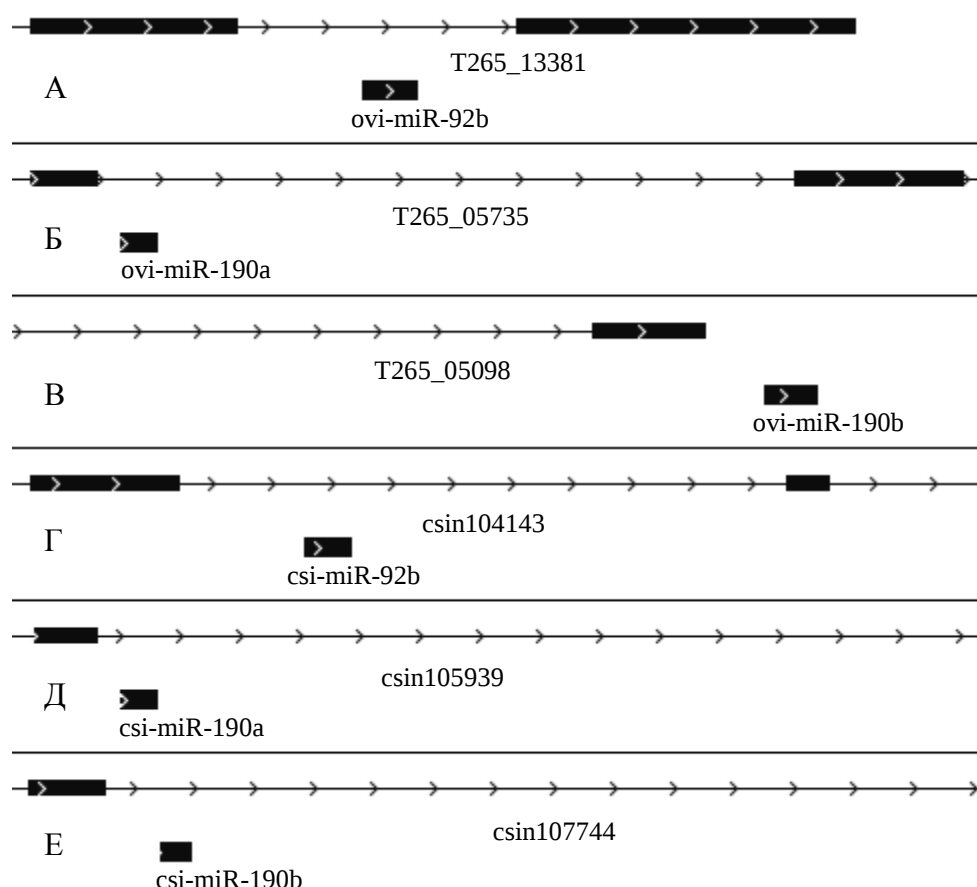


Рисунок 27. Интронные микроРНК описторхид. А) интронная микроРНК *ovi-miR-92b*; Б) интронная микроРНК *ovi-miR-190a*; В) микроРНК *ovi-miR-190b*; Г) интронная микроРНК *csi-miR-92b*; Д) интронная микроРНК *csi-miR-190b*; Е) интронная микроРНК *csi-miR-190a*. Идентификаторы белок-кодирующих генов (взяты из WormBase ParaSite) и микроРНК генов приведены под схемой гена. Прямоугольниками обозначены экзоны и микроРНК гены. Прямыми линиями со стрелочками обозначены интроны.

Сравнивая результаты анализа геномного окружения *miR-190* в геномах пяти трематод *C. sinensis*, *O. viverrini*, *F. hepatica*, *S. mansoni* и *S. japonicum*, удалось выяснить, что *miR-190a* располагается в интроне гена, кодирующего белок талин (*talin*). Интересно, что согласно нашим данным только в геноме *C. sinensis* *miR-190b* располагается в интроне гена, вероятно, кодирующего талин. Однако, в связи с несовершенством аннотации геномов паразитических плоских червей этот результат нуждается в дополнительной проверке. Следует отметить, что, несмотря на некоторую изменчивость в

экзонах талина, окружающих интронные микроРНК (Приложение 8), общая структура белка достаточно консервативна (Приложение 9) для обеспечения надежного сравнительного анализа структуры гена (Таблица 5).

Таблица 5. Структура гена талина с интронной микроРНК miR-190a у трематод и цестод.

вид	Ген ID	Длина гена в п.н.	Количество экзонов	Номер интрона с микроРНК	Длина интрона в п.н.
<i>C. sinensis</i>	csin105939	70200	37	32	2574
<i>S. japonicum</i>	Sjp_0006570	139915	43	40	685
<i>S. mansoni</i>	Smp_037860	12434	10	7	1237
<i>E. granulosus</i>	EgrG_000736000	26856	48	44	225
<i>E. multilocularis</i>	EmuJ_000736000	26634	43	39	224
<i>H. microstoma</i>	HmN_000220000	43376	41	37	356

В отличие от miR-190 только один паралог miR-92 является интронным у описторхид. Предположительно, miR-92b располагается в интроне гена, вероятно, кодирующего фактор лицензирования репликации ДНК MCM2 (DNA replication licensing factor MCM2). Среди плоских червей два гена miR-92 описаны только для *F. hepatica*. Нам удалось найти последовательности, гомологичные второму гену miR-92 у шистосом и у эхинококков. По доступным данным аннотации геномов удалось установить, что в геноме *F. hepatica* оба гена находятся в интронах генов, кодирующих фактор лицензирования репликации ДНК MCM2 (Приложение 10). У *S. mansoni* оба гена miR-92 не являются интронными, а у *S. japonicum* так же, как и у описторхид, miR-92b (ранее не описанная микроРНК) располагается в интроне гена, кодирующего фактор лицензирования репликации ДНК MCM2 (Приложение 10).

Среди эхинококков только у *E. granulosus* последовательность, гомологичная miR-92b, расположена в интроне гена (вероятно, кодирующего фактор лицензирования репликации ДНК MCM2) (Приложение 10). Также стоит отметить, что разметка белок кодирующего гена, предположительно кодирующего фактор лицензирования репликации ДНК MCM2, не точна для

O. viverrini (ген T265_13381) и *F. hepatica* (ген BN1106_s1921B000125), так как в экзонах, окружающих miR-92b, выявлены стоп кодоны (Приложение 10).

4.3 Сравнительный анализ микроРНК репертуара плоских червей

Для сравнительного анализа репертуаров консервативных микроРНК плоских червей использовали последовательности зрелых микроРНК и пре-микроРНК свободноживущей планарии *S. midterinea* [160,162,164], моногенеи *G. salaris* [124], пяти видов трематод: фасциолиды *F. hepatica* [23], описторхид *C. sinensis* и *O. viverrini*, шистосомотид *S. japonicum* [173,174] и *S. mansoni* [173,183,185], а также цестод *H. microstoma* [190], *E. granulosus* [188,190] и *E. multilocularis* [188,190,191]. Для выше перечисленных видов было проведено предсказание ранее неописанных консервативных микроРНК. В результате были выявлены 10 ранее неописанных консервативных микроРНК *F. hepatica*, 1 – *G. salaris*, 13 – *S. japonicum*, 13 – *S. mansoni*, 10 – *H. microstoma*, 5 – *E. granulosus* и 5 – *E. multilocularis* (Приложение 11).

В результате проведенного исследования установлено, что трематоды утратили микроРНК из следующих семейств – miR-153 (микроРНК из этого семейства найдены во всех классах плоских червей, кроме трематод), miR-2001 (микроРНК из этого семейства обнаружены только у *G. salaris*), miR-216 и miR-315 (микроРНК из этих семейства выявлены только у *S. midterinea*). Помимо этого, один из двух генов микроРНК из семейств miR-124 отсутствует у всех видов трематод, взятых в исследование, кроме шистосом. Кроме того, у описторхид произошла редукция одного из трех кластеров miR-71/miR-2.

Также было установлено, что микроРНК, принадлежащие к семействам miR-76, miR-278, miR-750, miR-1175 и miR-1989, присутствуют у всех плоских червей, кроме цестод. Отсутствие этих микроРНК у цестод может свидетельствовать о том, что данные микроРНК регулируют процессы и

участвуют в развитии органов, которые были редуцированы у цестод, например, пищеварительной системы.

Семейство miR-10 у плоских червей можно разделить на три подсемейства miR-10, miR-125 и miR-993. Интересно, что микроРНК из подсемейства miR-993 не удалось найти у шистосом и цестод. Также стоит отметить, что у подсемейства miR-993 (в отличие от подсемейств miR-10 и miR-125) зрелая микроРНК находится в 3' плече и является гомологом микроРНК стар подсемейств miR-10 и miR-125. Ген микроРНК из подсемейства miR-125 (также известного как *lin-4*) у трематод представлен в трёх копиях (кроме *F. hepatica* и *S. japonicum*).

В результаты филогенетического анализа указывают на то, что:

- 1) Вероятно, у общего предка моногеней, цестод и трематод был один ген miR-7, и у трематод произошла дупликация гена miR-7 (Приложение 12);
- 2) У всех трематод кроме шистосом произошла дупликация гена микроРНК, принадлежащего к miR-210 (Приложение 12);
- 3) У всех трематод произошли дупликация генов микроРНК, принадлежащих к семействам miR-2160 и miR-36 (Приложение 12);
- 4) Редукция второго кластера miR-277/miR-277 у паразитических плоских червей не происходила. У *S. midterinea* и *G. salaris* произошли независимые дупликации кластера (Приложение 12);
- 5) Возможно, не все miR-190 описаны для *G. salaris*, так как gsa-miR-1 группировалась с miR-1a, которая определена на данный момент только у трематод. При этом, часть генов miR-1 *S. midterinea* группировались с miR-1b трематод и miR-1 цестод, а другая часть с miR-1a трематод и miR-1 *G. salaris*. (Приложение 12);
- 6) Подсемейство miR-993 ближе к подсемейству miR-10, чем к подсемейству miR-125 (Приложение 12);
- 7) Вероятно, у исследуемых трематод произошла редукция одного из двух паралогов miR-124, а затем у шистосом произошла дупликация гена miR-124 с последующим сдвигом затравочного участка (Приложение 12);

- 8) Вероятно, у свободно живущих плоских червей было два паралога *let-7*, у цестод произошла редукция одного из паралогов, у трематод удвоение другого паралога (при этом не удалось обнаружить третий паралог у фасциолы), а у планарии произошли независимые удвоения каждого паралога (Приложение 12);
- 9) У свободно живущей планарии *S. midterinea* произошли независимые дубликации множества генов микроРНК (Приложение 12).

4.4 Компьютерное предсказание мРНК-мишеней для микроРНК

Одним из продолжений исследования микроРНК является их функциональная аннотация, а именно, выявление для них мРНК-мишеней. Для того чтобы провести компьютерное предсказание мишеней, из базы данных NCBI были взяты последовательности мРНК *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* [209,210]. Далее из последовательностей мРНК были выделены последовательности 3'-НТР-ов для *C. sinensis* (187), *O. felineus*(11737), и *O. viverrini* (5656). В результате компьютерного предсказания с помощью программ RNAhybrid, PITA и TargetScan были получены следующие результаты (Приложение 13):

- 1) одна мРНК-мишень для одной микроРНК *C. sinensis*;
- 2) 289 мРНК-мишеней для 45 микроРНК *O. felineus*;
- 3) 164 мРНК-мишеней для 41 микроРНК *O. viverrini*.

Для каждой мРНК *O. viverrini*, которая была предсказана как мРНК-мишень, проводили функциональную аннотацию. С помощью программы InterProScan 111 мРНК были аннотированы в терминах GO. С помощью программы koba 94 мРНК – в терминах KEGG (Приложение 13). Аннотации для мРНК *O. felineus* были взяты из статьи [210]. В результате аннотаций в терминах GO и KEGG удалось установить возможные биологические процессы, в которые вовлечены микроРНК описторхид (Приложение 14). При сравнении результатов для *O. felineus* и *O. viverrini* было обнаружено, что десять микроРНК обладают гомологичными мРНК-мишенями со

схожими аннотациями (таблица 6). Так let-7a, вероятно, регулирует кальций-зависимый экзоцитоз, miR-31 – SMAD связывание, miR-2160a – деубиквинилирование, miR-2d – эндоцитоз, биосинтез гликозилфосфатидилинозитол (ГФИ)-якоря и FoxO сигнальный путь, miR-71a – аутофагию, miR-307 подавляет экспрессию ацетил-КоА синтетазы, miR-755 – субъединицы 1 протеазы внутренней мембраны митохондрии.

4.5 Анализ экспрессии микроРНК

Для анализа экспрессии микроРНК были использованы результаты секвенирования, которые картировались на последовательности предшественников микроРНК, полученные из геномов *C. sinensis* и *O. viverrini*. В результате было обнаружено, что профили экспрессии предсказанных микроРНК взрослых червей трех видов описторхид очень похожи. Три микроРНК miR-125a, miR-71a и miR-281 (Приложение 15) демонстрируют наибольший уровень экспрессии у трех видов описторхид. Кроме этого было установлено, что miR-12 не экспрессируются у *O. viverrini* и *O. felineus*, а miR-1992 не экспрессируются у *C. sinensis*. При сравнении результатов картирования чтений из разных библиотек *O. felineus* были обнаружены различия уровней экспрессии микроРНК между двумя стадиями (марита и метацеркария) и между двумя участками тела мариты (участок с маткой, содержащей яйца, и участок без матки с яйцами) (Приложение 16). Также было установлено, что miR-76, miR-993 и miR-2160a экспрессируются только на стадии мариты.

Кроме этого, было установлено для всех кластеров генов микроРНК трех исследуемых видов, что микроРНК, принадлежащие одному кластеру, обладают разным уровнем экспрессии, в частности, экспрессия микроРНК семейства miR-71 значительно превышает экспрессию последующих микроРНК семейства miR-2 (Рисунок 28).

Таблица 6. Общие результаты по предсказанию мРНК-мишеней для *O. felineus* и *O. viverrini*.

микроРНК	ID мишени у <i>O. felineus</i>	ID мишени у <i>O. viverrini</i>	Общая аннотация в терминах GO	Общая аннотация в терминах Kegg
let-7a	GBJA01011148	T265_04273	protein binding (GO:0005515)	protein piccolo (Calcium ion-dependent exocytosis) (K16882)
miR-31	GBJA01000514	T265_09904	SMAD binding (GO:0046332)	
miR-307	GBJA01004241	T265_00281	catalytic activity (GO:0003824), metabolic process (GO:0008152)	acetyl-CoA synthetase (Pathway: Carbon metabolism) (K01895)
miR-87	GBJA01011604	T265_08371	dephosphorylation (GO:0016311), protein tyrosine phosphatase activity (GO:0004725), phosphatase activity (GO:0016791)	
miR-755	GBJA01006590	T265_03139	proteolysis (GO:0006508), serine-type peptidase activity (GO:0008236), membrane (GO:0016020)	mitochondrial inner membrane protease subunit 1 (Pathway: Protein export) (K09647)
miR-2160a	GBJA01005799	T265_07590	protein binding (GO:0005515)	COP9 signalosome complex subunit 7 (Deubiquitinating enzyme) (K12180)
miR-2a	GBJA01002433	T265_04290		coiled-coil domain-containing protein 77 (centriole associated proteins) (K16757)

Продолжение Талицы 6.

микроРНК	ID мишени у <i>O. felineus</i>	ID мишени у <i>O. viverrini</i>	Общая аннотация в терминах GO	Общая аннотация в терминах Kegg
miR-2d	GBJA01001532	T265_07542	kinase activity (GO:0004672), ATP binding (GO:0005524), protein phosphorylation (GO:0006468), protein binding (GO:0005515)	polo-like kinase 4 (Pathway: FoxO signaling pathway) (K08863)
miR-2d	GBJA01006591	T265_14166		stromal membrane-associated protein (Pathway: Endocytosis) (K12486)
miR-2d	GBJA01006741	T265_00844	integral component of membrane (GO:0016021)	
miR-2d	GBJA01002330	T265_00303	catalytic activity (GO:0003824), metabolic process (GO:0008152)	phosphatidylinositol glycan, class O (Pathway: Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis) (K05288)
miR-2e	GBJA01004727	T265_05319	protein binding (GO:0005515)	
miR-71a	GBJA01010043	T265_07624		cysteine protease ATG4 (Pathway: Autophagy) (K08342)

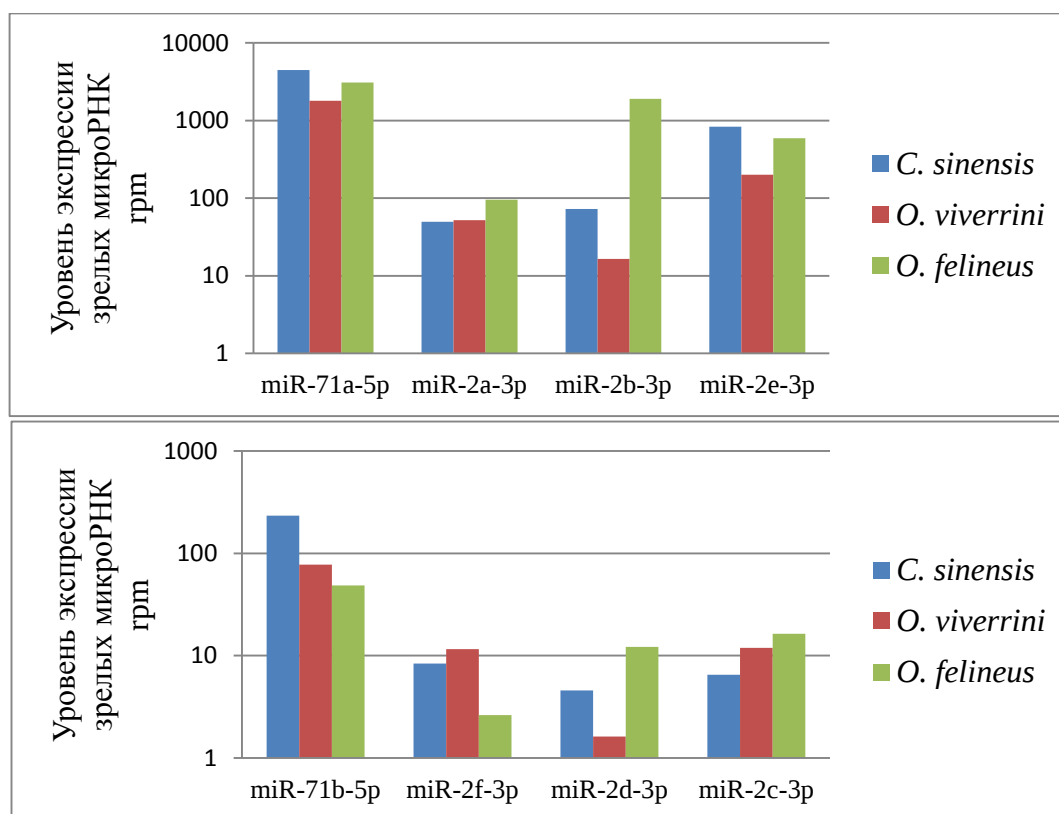


Рисунок 28. Уровни экспрессии зрелых микроРНК, входящих в кластеры. Данные получены при обработке результатов высокопроизводительного секвенирования. Rpm (reads per million) – количество чтений на миллион картированных чтений.

Для того чтобы подтвердить независимым методом различия в уровнях экспрессии микроРНК генов, расположенных в одном кластере, была выделена суммарная РНК из *O. felineus* и проведена цифровая капельная ПЦР. Были сконструированы праймеры cel-lin-4-5p, miR-71a-F, miR-2a-F, miR-2b-F, UniMirRef, lin-4-sl, miR-71a-sl, miR-2a-sl, miR-2b-sl для ПЦР-ПВ по методу, предложенному в статье [227]. В качестве положительного контроля был использован синтетический олигонуклеотид, соответствующий микроРНК cel-lin-4, которая достоверно отсутствует у исследованных трематод.

Экспериментальная проверка экспрессии выбранных микроРНК генов была проведена для трёх групп (86, 41 и 40 червей) вида *O. felineus*. Качество

препаратов РНК (стадии метацеркария и марита) анализировали с помощью электрофореза и по технологии Agilent 2100 Bioanalyzer (рисунок 29).

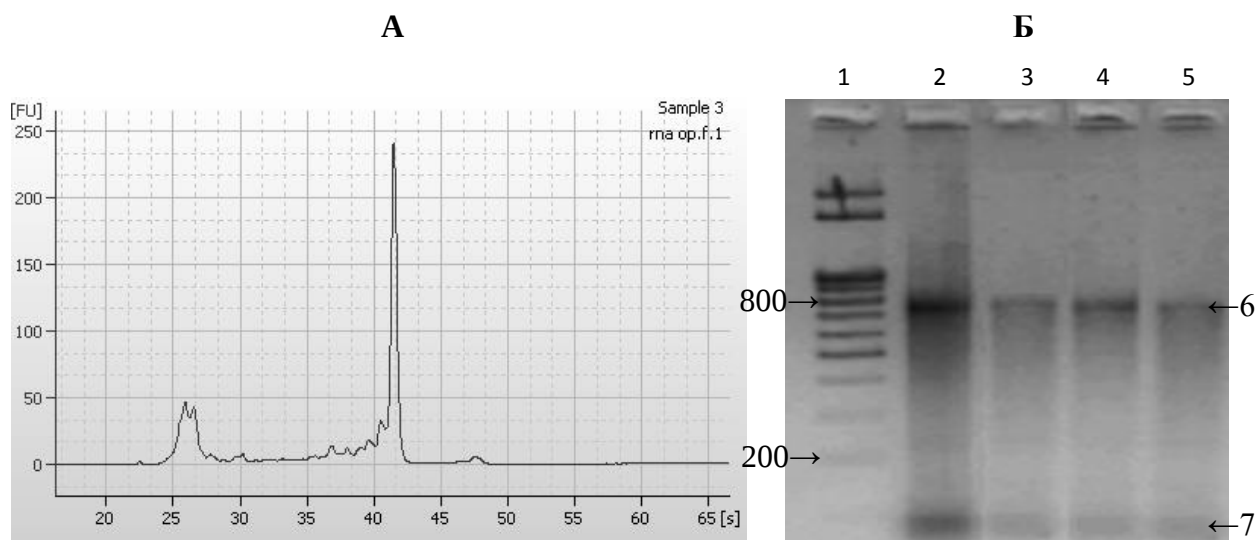


Рисунок 29. Оценка качества препаратов РНК. А) Спектрограмма оценки качества препарата РНК на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer. Пики соответствуют сигналам на электрофореграмме. Высокий пик соответствует 18S-19S. Малый пик соответствует фракции малых РНК. Б) Электрофореграмма препаратов РНК в агарозном геле с бромистым этидием. Дорожки: 1 – маркер, 2 – РНК, выделенная из мариты, 3 – РНК мариты после ДНКазной обработки, 4 – РНК, выделенная из метацеркарии, 5 – РНК метацеркарии после обработки ДНКазой, 6 – 18S-19S, 7 – фракция малых РНК.

При проверке качества было обнаружено отсутствие на электрофореграмме сигнала, соответствующего 28S рРНК. На электрофореграмме присутствует один мажорный сигнал, предположительно соответствующий 18S-19S. Для *O. viverrini* и для *F. gigantica* было описано наличие замаскированного разрыва (hidden break)[228], по которому происходит ограниченный гидролиз 28S рРНК, в результате чего 28S рРНК образует две одинаковых по длине цепи и даёт сигнал на электрофореграмме, соответствующий 19S.

После обратной транскрипции с использованием steem-loop праймеров, проводили цифровую капельную ПЦР, в результате которой были вычислены концентрации миРНК miR-71a, miR-2a, miR-2b и cel-lin-4 (искусственной

микроРНК) у всех трёх групп *O. felineus*. При создании кДНК для cel-lin-4 в образце РНК из первой группы было 1,25 мкМ синтетического олигонуклеотида, а в образцах из второй и третьей группы 0,5 мкМ. В результате чего концентрация cel-lin-4 в реакционной смеси из первой группы в 2,5 раза превышала концентрацию cel-lin-4 в реакционной смеси второй и третьей группы. Данные, полученные в результате цифровой капельной ПЦР для cel-lin-4, показали, что отношение концентрации cel-lin-4 из группы 1 к концентрации lin-4 из групп 2 и 3 составляет 2,57 и 2,74 соответственно, что соотносится с данными о концентрации cel-lin-4 в трёх группах, описанными выше.

В результате анализа с использованием цифровой капельной ПЦР были обнаружены различия в уровнях экспрессии микроРНК, входящих в один кластер (рисунок 30). Паттерн экспрессии микроРНК, полученный в результате цифровой капельной ПЦР, отличается от результатов, полученных при анализе результатов секвенирования. При этом в результатах секвенирования и цифровой капельной ПЦР уровень экспрессии микроРНК из семейства miR-71 значительно превышает уровни экспрессий микроРНК из семейства miR-2.

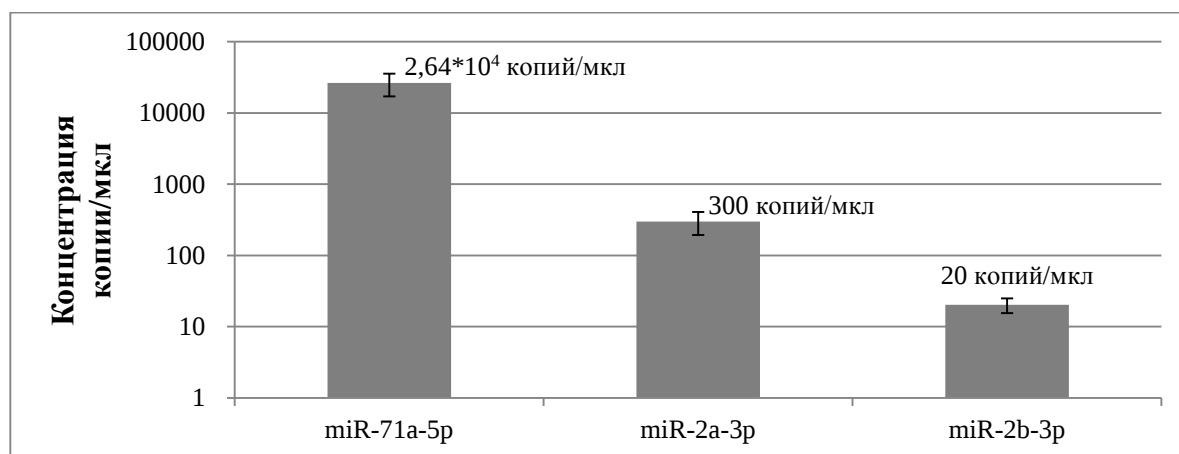


Рисунок 30. Уровни экспрессии зрелых микроРНК, входящих в кластер miR-71a/miR-2a/miR-2b/miR-2e. Данные получены цифровой капельной ПЦР. Справа приведено увеличенное изображение для miR-2a и miR-2b. На диаграмме изображено среднее значение ($\pm$ стандартное отклонение).

5 Обсуждение

Для достижения поставленной цели, идентификации и функциональной аннотации микроРНК *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*, в работе был использован комбинированный подход, включающий высокопроизводительное секвенирование по технологии SOLiD, компьютерный анализ результатов секвенирования, предсказание микроРНК, компьютерный анализ геномов, предсказание мРНК-мишеней, сравнительный анализ последовательностей микроРНК плоских червей, секвенирование по Сэнгеру отдельных участков генома трёх описторхид, обратную транскрипцию с использованием праймеров steem-loop и цифровую капельную ПЦР. В данной работе мы определили 55 консервативных микроРНК и одну “новую” (ранее не описанную для других видов) микроРНК у трех трематод семейства Opisthorchiidae – *C. sinensis*, *O. felineus* и *O. viverrini*. Открытие новой микроРНК представляет интерес, так как данная микроРНК обнаружена только у семейства Opisthorchiidae. Количество неконсервативных (“специфичных”) микроРНК, определенных у описторхид намного меньше, чем консервативных, хотя у других трематод “специфичные” микроРНК преобладают над консервативными. Согласно miRBase release 21 соотношение “специфичных” к консервативным выглядит следующим образом 29/27 для *S. japonicum* и 83/32 для *S. mansoni*. Необходимо отметить, что не все описанные в miRBase микроРНК удовлетворяют одному или более критериям микроРНК. Fromm и соавторы показали, что 1358 микроРНК человека, которые опубликованы в базе данных miRBase, не удовлетворяют всем критериям микроРНК [57]. Возможно, часть “специфичных” микроРНК плоских червей также не удовлетворяют всем критериям микроРНК и принадлежит к другим классам РНК или является артефактами предсказания микроРНК. Таким образом можно предполагать, что большинство “специфичных” микроРНК определены ошибочно.

Идентификация 55 консервативных микроРНК у трех видов трематод семейства Opisthorchiidae дополняет результаты предыдущих исследований микроРНК трематод. Следует отметить, что в предыдущем исследовании микроРНК *C. sinensis* многочисленные микроРНК-подобные последовательности были найдены среди чтений, полученных секвенированием по технологии Solexa / Illumina [166]. Авторы не картировали чтения на геном *C. sinensis* для выявления микроРНК генов и их аннотирования. В место генома *C. sinensis* они использовали геном *S. japonicum*. В нашей работе представлены результаты картирования чтений (вероятных последовательностей зрелых микроРНК) на геномы *C. sinensis* и *O. viverrini*, что повышает надежность идентификации микроРНК для представителей Opisthorchiidae. Кроме того, в настоящей работе представлены результаты классификации микроРНК по семействам. Представленность 55 консервативных микроРНК в организмах различных таксонов (в том числе 18 семейств микроРНК из 34, возникших после “билатеральной экспансии” [49]) представлена в таблице 6.

Следует обратить внимание на 14 микроРНК *C. sinensis*, найденных в нашем исследовании. Эти микроРНК – let-7b, miR-7b, miR-125b, miR-993, miR-36b, miR-210, miR-1989, miR-1992, miR-2162, miR-2160a, miR-2160b, miR-2161, miR-3479 и miR-new1 не были найдены Ху с соавторами [166]. Возможно, что Ху с соавторами использовали для своего анализа только те чтения, что картировались на геном *S. japonicum*.

С помощью сравнительного анализа микроРНК репертуара плоских червей было установлено, что свободно живущие предки трематод при переходе на паразитический образ жизни (эндопаразитизм) утратили гены микроРНК из семейств miR-153, miR-2001, miR-216, miR-315. А предки Цестоды – из семейств miR-1175, miR-76, miR-184, miR-750, miR-278, miR-1989, miR-2001, miR-216, miR-315. Данные результаты указывают на то, что микроРНК из семейств miR-1175, miR-76, miR-184, miR-750, miR-278, miR-1989, вероятно, участвуют в процессах, которые протекают у всех плоских

червей, кроме цестод, например, развитии пищеварительной системы. Выявление функций микроРНК из семейств miR-2001, miR-216, miR-315 и особенно miR-153 (не присутствуют у трематод) требует дальнейших исследований. Вероятно, часть микроРНК из этих семейств участвуют в развитии органов чувств и в регуляции процессов, связанных с дыханием. Эта гипотеза базируется на том, что паразитические плоские черви утратили органы чувств и находятся в среде с недостатком кислорода (внутри организма хозяина).

Наш анализ геномной организации генов микроРНК описторхид выявил наличие четырёх кластеров генов микроРНК и трёх интронных микроРНК в геномах исследуемых описторхид. Известно, что кластер miR-71/miR-2 присутствует в двух копиях (которые были верифицированы с помощью секвенирования по Сэнгеру) у описторхид (как и в других изученных трематодах, кроме фасциол, у которых присутствует три копии кластера), в виде одной копии у цестод, и шести у планарии *S. mediterranea* [190]. Это изменение числа кластеров miR-71/miR-2 в геномах представителей плоских червей разных классов не могут быть объяснены паразитическим образом жизни или уменьшением мишеней для этих микроРНК. Паразитические нематода *Ascaris suum* и *Brugia malayi* содержат один кластер miR-71/miR-2, в то время как свободноживущие виды *Caenorhabditis* имеют один или ни одного кластера (miRBase Release 21). Выяснение деталей эволюции этого кластера требует дальнейших исследований.

Оба кластера miR-71a/miR-2a/miR-2b/miR-2e и miR-71b/miR-2f/miR-2d/miR-2c консервативны, что свидетельствует об их функциональной значимости у всех трех исследуемых видов описторхид (Рисунки 17). На сегодняшний день некоторые микроРНК принадлежащие к семействам miR-71 и miR-2, как известно, обладают повышенным уровнем экспрессии в самках *S. mansoni* [183] а также играют важную роль в регенеративных процессах у планарии [163]. Кроме того, микроРНК семейства miR-2,

вероятно, участвуют в развитии и поддержании нервной системы у дрозофилы и *C. elegans* [229]. Обнаружение микроРНК из этих семейств (которые не встречаются у позвоночных) в экзосома-подобных везикулах в ЭСП трематоды *D. dendriticum* позволяет предполагать возможное участие этих трематодных микроРНК в модуляции взаимодействия “паразит-хозяин” и регуляции экспрессии генов хозяина [22].

Кластер miR-750/ miR-755 описан для 10 видов первичноротых. В данной работе подобные кластеры впервые были обнаружены для 6 видов трематод. Тот факт, что гены микроРНК, входящие в кластер, отсутствуют у цестод и присутствует у трематод, турбеллярии, и других первичноротых ставит вопрос о функциональности данного кластера и требует дальнейших исследований. Вероятно, данный кластер участвует в развитии пищеварительной системы у первичноротых.

Кластер miR-277a/miR-277b обнаружен только у плоских червей. Однако микроРНК из семейства miR-277 обнаружены в других кластерах первичноротых, при этом два паралога miR-277 обнаружены только у Lophotrochozoa. Кроме этого, miR-317 и miR-34, входящие в кластер с miR-277 у других первичноротых, полностью отсутствуют у плоских червей, как у паразитических, так и у свободноживущих. Это позволяет предположить, что микроРНК, принадлежащие к семействам miR-317 и miR-34, могут регулировать процессы, которые отсутствуют у плоских червей, а miR-277, вероятно, регулирует жизненно важные процессы, не связанные с развитием органов чувств или пищеварительных органов.

Ранее сочетание генов miR-1 и miR-133 было описано как кластер микроРНК генов для многих видов животных (см. данные в miRBase) [230] в том числе плоских червей [190]. Тем не менее, было показано, что эта комбинация в геноме дрозофилы не удовлетворяет критериям из определения кластера микроРНК генов [43]. Следовательно, из-за дистанции между генами микроРНК у плоских червей, а также возможность присутствия белок-кодирующих генов между этими генами микроРНК, мы предлагаем

ссылаться на данные комбинации генов микроРНК, как на "участки, похожие на кластеры miR-1/ miR-133", которые образуют предположительную группу синтении.

Кластер let-7/miR-100/miR-125 в той или иной форме присутствует у вторичноротых и первичноротых. Для плоских червей было показано, что данный кластер распался с полной утратой гена miR-100 [226]. В данной работе мы показали, что и у трёх видов описторхид отсутствуют miR-100-подобные последовательности и сочетания let-7/miR-125 генов с расстоянием в 10000 п.н. между генами микроРНК (Таблица 4). Стоит отметить, что у плоских червей преобладающее большинство микроРНК не образует кластеры в отличие от других представителей Lophotrochozoa. Так, согласно данным miRBase, 65 из 129 микроРНК *Capitella teleta* образуют 26 кластеров генов микроРНК, а 26 из 57 микроРНК *Lottia gigantea* – 12 кластеров.

Результаты нашего анализа подтверждают интронную локализацию генов микроРНК miR-190a, miR-190b (только у *C. sinensis*), и miR-92b. Интронная локализация микроРНК из семейства miR-190 была описана для многих видов животных [185,190,231]. Высокая консервативность структурной (и, возможно, функциональной) связи между miR-190 и белком талином у плоских червей представляет интерес и требует дальнейшего исследования. У дрозофилы, как интронные, описаны микроРНК из семейства miR-92. Кластер dme-miR-92a/dme-miR-92b находится в интроне гена кодирующего белок jigr1 [232]. В основном miR-92 описаны как межгенные микроРНК. Также микроРНК из семейства miR-92 обычно образуют кластеры, которые мы не обнаружили у плоских червей.

В данной работе были предсказаны мишени для микроРНК трёх видов описторхид. Вероятно, при предсказании мРНК-мишеней для микроРНК описторхид программами RNAhybrid, PITA и TargetScan часть мишеней не была выявлена. Это может быть связано с несовершенством программ по предсказанию (и комбинацией их результатов), отсутствием детальной аннотации 3'-НТР-ов у части мРНК описторхид, и неполным описанием

мРНК описторхид. Несмотря на это, в результате аннотации в терминах GO и Kegg нам удалось предсказать часть процессов, которые могут регулировать некоторые микроРНК описторхид (Приложение 14).

При анализе экспрессии были обнаружены микроРНК (miR-76, miR-993, и miR-2160), которые экспрессируются только на стадии мариты. Вероятно, данные микроРНК регулируют процессы, которые протекают только во взрослой стадии. Кроме того, было обнаружено, что микроРНК, входящие в один кластер, обладают разными уровнями экспрессии. Различия в уровнях экспрессии микроРНК из одного кластера не противоречат данным литературы и могут свидетельствовать о функционировании системы регуляции экспрессии микроРНК у описторхид.

При анализе экспрессии микроРНК также было обнаружено, что ген, кодирующий miR-12, не экспрессируется у *O. felineus* и *O. viverrini*, а ген, кодирующий miR-1992, не экспрессируется у *C. sinensis*. Вероятно, данные микроРНК низким уровнем экспрессии на взрослой стадии развития описторхид или их уровень экспрессии меняется с возрастом. Мариты *C. sinensis*, взятые для данной работы, были выделены на 298-ой день после заражения, а мариты *O. viverrini* и *O. felineus* – на 180-й и 179-й соответственно.

Таким образом, в данном исследовании представлены результаты идентификации и характеристики множества микроРНК *O. felineus*, *O. viverrini* and *C. sinensis*. Это первый сравнительный анализ генов микроРНК данных видов, который позволил выявить консервативные и “новую” микроРНК. Для некоторых консервативных микроРНК описторхид был проведен анализ геномной организации. Структуры двух кластеров генов микроРНК были подтверждены с помощью секвенирования по Сэнгеру для трех видов описторхид. Были предсказаны предполагаемые гены-мишени для микроРНК. Для некоторых консервативных микроРНК были найдены различия в уровне экспрессии между стадиями жизненного цикла *O. felineus*.

Таким образом, имеющиеся данные обеспечивают прочную основу для дальнейших исследований молекулярной биологии описторхид и изучения молекулярных механизмов взаимодействий паразита и хозяина в контексте потенциального участия микроРНК паразита в процессах жизнедеятельности клеток хозяина. Кроме того, полученные данные могут быть использованы для поиска потенциальных фармакологических мишеней и для разработки новых методов диагностики паразитарных заболеваний.

6 Заключение

Данная работа посвящена исследованию микроРНК трёх представителей паразитических плоских червей семейства Opisthorchiidae. В настоящей работе впервые были предсказаны консервативные и новые микроРНК для *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* с использованием массового параллельного секвенирования с дальнейшим биоинформатическим анализом, был проведен анализ геномной локализации генов микроРНК, осуществлён анализ экспрессии микроРНК и предсказаны мишени для микроРНК описторхид.

В соответствии с поставленными задачами, были достигнуты следующие результаты:

- 1) Обнаружено 55 консервативных микроРНК, принадлежащих к 34 семействам, и одна “новая” микроРНК, ранее не описанная;
 - a) Двенадцать консервативных микроРНК образуют четыре кластера;
 - b) Три консервативных микроРНК являются интронными;
 - c) Две консервативные микроРНК образуют участок, похожий на кластер;
 - d) микроРНК, принадлежащие к семействам let-7 и miR-10 (подсемейства miR-125), не образуют кластер let-7/miR-100/miR-125;
- 2) Проведён сравнительный анализ микроРНК репертуаров плоских червей, в результате которого;
 - a) Были предсказаны консервативные микроРНК, которые ранее не были выявлены у *G. salaris*, *F. hepatica*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *H. microstoma*, *E. granulosus* и *E. multilocularis*;
 - b) У трематод не выявлены микроРНК принадлежащие к 4 консервативным семействам miR-153, miR-2001, miR-216 и miR-315, которые описаны у свободноживущих и эктопаразитических плоских червей;

- с) Обнаружены микроРНК принадлежащие к 5 консервативным семействам miR-76, miR-278, miR-750, miR-1175 и miR-1989, присутствующие у трематод и отсутствующие у цестод;
- 3) Предсказаны мРНК-мишени;
- а) 289 мРНК-мишеней для 45 микроРНК *O. felineus*;
 - б) 164 мРНК-мишеней для 41 микроРНК *O. viverrini*;
 - с) одна мРНК-мишень для микроРНК *C. sinensis*;
- 4) В результате анализа экспрессии микроРНК-генов *O. felineus* были выявлены;
- а) три стадия специфические микроРНК;
 - б) наличие разного уровня экспрессии зрелых микроРНК, входящих в один кластер.

Полученные результаты являются базисом для дальнейших исследований эволюции микроРНК, молекулярных механизмов онтогенеза плоских червей и взаимодействия “паразит-хозяин”, а также могут быть использованы для разработок новых систем диагностики заболеваний, вызываемых паразитическими плоскими червями.

7 Выводы

- 1) Результаты комплексного анализа микроРНК трематод *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* указывают на то, что данные виды обладают схожим репертуаром микроРНК.
- 2) Репертуары консервативных микроРНК *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* отличается от репертуаров консервативных микроРНК свободноживущих и эктопаразитических плоских червей. В частности у данных описторхид отсутствуют микроРНК из четырех консервативных семейств микроРНК miR-153, miR-2001, miR-216 и miR-315.
- 3) Большинство генов микроРНК описторхид располагаются в некодирующих участках генома и не образуют кластеры, что соответствует локализации генов микроРНК в геномах других плоских червей.
- 4) Обнаружены стадия-специфические микроРНК *O. felineus* miR-76, miR-993 и miR-2160a. Экспрессия данных микроРНК не обнаружена на стадии метацеркарии, но хорошо выражена у половозрелых особей *O. felineus*.
- 5) Проведено предсказание мишеней микроРНК для исследуемых видов описторхид. Согласно аннотациям Kegg, микроРНК описторхид в основном вовлечены в регуляцию метаболических процессов.

8 Список сокращений и условных обозначений

DGCR8 – DiGeorge syndrome critical region gene 8

GO – Gene Ontology

Kegg – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Mib белок – белок семейства “Mind bomb protein”

RISC – RNA-induced silencing complex (РНК-индуцированный сайленсинг комплекс)

3'-НТР – 3'-нетранслируемый регион

микроРНК-СМ – микроРНК-сайт-мишени (microRNA target site)

н. – нуклеотиды

ОРС – открытая рамка считывания

ОТ-праймер – праймер обратной транскрипции

п.н. – пара нуклеотидов

пре-микроРНК – (от pre-microRNA) предшественник микроРНК (precursor microRNA)

при-микроРНК – (от pri-microRNA) первичная микроРНК (primary microRNA)

П-тела – тельца процессинга (P-bodies - Processing bodies)

ПЦР-РВ – Полимеразная цепная реакция с детектированием в реальном времени (Real-time polymerase chain reaction)

“расплетение” – гидролиз 2'-5' фосфодиэфирной связи в составе структуры лассо

“хвостатый” миртрон – миртрон с дополнительной последовательностью с 3'- или с 5'-конца пре-микроРНК

9 Словарь терминов

Картирование – биоинформатический метод, состоящий в определении позиций нуклеотидных последовательностей в референсной нуклеотидной последовательности

микроРНК затравочный участок (microRNA seed) – первые 8 нуклеотидов последовательности зрелой микроРНК

микроРНК стар (microRNA star, microRNA*) – последовательность микроРНК, процессируемая из пассажирской цепи

10 Список используемой литературы

1. Olson P.D., Tkach V. V. Advances and trends in the molecular systematics of the parasitic Platyhelminthes. // Adv. Parasitol. 2005. Vol. 60, № 05. P. 165–243.
2. Scholz T. Family Opisthorchiidae Looss, 1899 // Keys to the Trematoda. Volum 3. 1st ed. / ed. Bray R.A., Gibson D.I., Jones A. London: CAB International and Natural History Museum, 2008. P. 9–51.
3. Traverso A. et al. A large outbreak of *Opisthorchis felineus* in Italy suggests that opisthorchiasis develops as a febrile eosinophilic syndrome with cholestasis rather than a hepatitis-like syndrome // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2012. Vol. 31, № 6. P. 1089–1093.
4. Armignacco O. et al. Cryptic and asymptomatic *Opisthorchis felineus* infections // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2013. Vol. 88, № 2. P. 364–366.
5. Sithithaworn P. et al. Roles of liver fluke infection as risk factor for cholangiocarcinoma // J. Hepatobiliary. Pancreat. Sci. 2014. Vol. 21, № 5. P. 301–308.
6. Cogliano V. et al. *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis* // Biological agents IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volum 100B / ed. Galichet L. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012. P. 341–370.
7. Sripa B. et al. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* –multiple pathways to cancer // Trends Parasitol. 2013. Vol. 28, № 10. P. 395–407.
8. King S., Scholz T. Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview. // Korean J. Parasitol. 2001. Vol. 39, № 3. P. 209–221.
9. Mordvinov V.A., Furman D.P. The Digenea parasite *Opisthorchis felineus*: a target for the discovery and development of novel drugs. // Infect. Disord. Drug Targets. 2010. Vol. 10, № 5. P. 385–401.
10. Keiser J., Utzinger J. Food-borne trematodiasis // Clin. Microbiol. Rev. 2009. Vol. 22, № 3. P. 466–483.

11. Huang Y. et al. Biological functions of microRNAs: a review. // J. Physiol. Biochem. 2011. Vol. 67, № 1. P. 129–139.
12. Weber J.A. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids // Clin. Chem. 2010. Vol. 56, № 11. P. 1733–1741.
13. Wang K. et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells // Nucleic Acids Res. 2010. Vol. 38, № 20. P. 7248–7259.
14. Zubakov D. et al. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation // Int. J. Legal Med. 2010. Vol. 124, № 3. P. 217–226.
15. Hanson E., Lubenow H., Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs // Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. Elsevier Inc., 2009. Vol. 2, № 1. P. 503–504.
16. Gibbings D.J. et al. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. TL - 11 // Nat. Cell Biol. 2009. Vol. 11 VN - r, № 9. P. 1143–1149.
17. Rodrigues M.L. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // Lipid Insights. 2008. Vol. 2 1, № 6. P. 27–40.
18. Zhang Y. et al. Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration // Mol. Cell. 2010. Vol. 39, № 1. P. 133–144.
19. Pegtel D.M. et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2010. Vol. 107, № 14. P. 6328–6333.
20. Cheng G. et al. Deep sequencing-based identification of pathogen-specific microRNAs in the plasma of rabbits infected with *Schistosoma japonicum*. // Parasitology. 2013. Vol. 140, № 14. P. 1751–1761.
21. Hoy A.M. et al. Parasite-derived microRNAs in host serum as novel biomarkers of helminth infection. // PLoS Negl. Trop. Dis. 2014. Vol. 8, № 2. P. e2701.
22. Bernal D. et al. Surface analysis of *Dicrocoelium dendriticum*. The molecular characterization of exosomes reveals the presence of miRNAs. // J.

- Proteomics. Elsevier B.V., 2014. Vol. 105. P. 232–241.
23. Fromm B. et al. The revised microRNA complement of *Fasciola hepatica* reveals a plethora of overlooked microRNAs and evidence for enrichment of immuno-regulatory microRNAs in extracellular vesicles // Int. J. Parasitol. Australian Society for Parasitology Inc., 2015. Vol. 45, № 11. P. 697–702.
 24. Cai X.Q. et al. Sequences and gene organization of the mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda) // Parasitol. Res. 2012. Vol. 110, № 1. P. 235–243.
 25. Shekhovtsov S. V. et al. A novel nuclear marker, Pm-int9, for phylogenetic studies of *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini*, and *Clonorchis sinensis* (Opisthorchiidae, Trematoda) // Parasitol. Res. 2009. Vol. 106, № 1. P. 293–297.
 26. Kaewkes S. Taxonomy and biology of liver flukes // Acta Trop. 2003. Vol. 88, № 3. P. 177–186.
 27. Park J.-K. et al. A common origin of complex life cycles in parasitic flatworms: evidence from the complete mitochondrial genome of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Platyhelminthes). // BMC Evol. Biol. 2007. Vol. 7, № 1. P. 11.
 28. Young N.D. et al. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium* // Nat. Genet. 2012. Vol. 44, № 2. P. 221–225.
 29. Догель В.А. Подкласс I. Дигенетические сосальщики, или двуустки (Digenea) // Зоология беспозвоночных. 7 изд. / ed. Полянский Ю.И. Москва: “Высшая Школа,” 1981. P. 175.
 30. Zubov N. et al. Opisthorchiasis in Tobolsk based on 1950-1987 autopsy data // Med Parazitol. 1989. Vol. 5. P. 10–13.
 31. Martynova N.A., Takhaуov R.M. Особенности онкологической заболеваемости населения Томской области (1990 — 2001 гг .). 2007.
 32. Shain A. Opisthorchiasis and hepatic cancer among the population of the hanty mansy national district // Vopr. Onkol. 1971. Vol. 17, № 6. P. 34–39.
 33. Iarc. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans.

- Biological agents. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori* // Iarc Monogr. Eval. Carcinog. Risks To Humans. 1994. Vol. 61. P. 121–162.
34. Johansen M.V. et al. Towards Improved Diagnosis of Zoonotic Trematode Infections in Southeast Asia // Adv. Parasitol. 2010. Vol. 73, № C. P. 171–195.
 35. Kim Y.J. et al. Performance of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clonorchis sinensis* infestation in high- and low-risk groups // J. Clin. Microbiol. 2010. Vol. 48, № 7. P. 2365–2367.
 36. Choi M.H. et al. Excretory-secretory antigen is better than crude antigen for the serodiagnosis of clonorchiasis by ELISA. // Korean J. Parasitol. 2003. Vol. 41, № 1. P. 35–39.
 37. Hotez P.J. et al. Control of Neglected Tropical Diseases. // N Engl J Med. 2007. Vol. 357, № 10. P. 1018–1027.
 38. Lee R.C. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. 1993. Vol. 75. P. 843–854.
 39. Wightman B., Ha I., Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans* // Cell. 1993. Vol. 75. P. 855–862.
 40. Rodriguez A. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units // Genome Res. 2004. Vol. 14, № 10a. P. 1902–1910.
 41. Lagos-quintana M. et al. New microRNAs from mouse and human. 2003. P. 175–179.
 42. Lai E.C. et al. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes // Genome Biol. 2003. Vol. 4, № 7. P. R42.
 43. Marco A. et al. Clusters of microRNAs emerge by new hairpins in existing transcripts. // Nucleic Acids Res. 2013. Vol. 41, № 16. P. 7745–7752.
 44. Lee Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II // Embo J. 2004. Vol. 23, № 20. P. 4051–4060.
 45. Guo L., Lu Z. Global expression analysis of miRNA gene cluster and family based on isomiRs from deep sequencing data. // Comput Biol Chem. 2010.

- Vol. 34, № 3. P. 165–171.
46. Ohler U. et al. Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. // *RNA*. 2004. Vol. 10, № 9. P. 1309–1322.
 47. Berezikov E. et al. Mammalian Mirtron Genes // October. 2007. Vol. 28, № 2. P. 328–336.
 48. Lau N.C. et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. // *Science*. 2001. Vol. 294, № 5543. P. 858–862.
 49. Berezikov E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. // *Nat. Rev. Genet.* Nature Publishing Group, 2011. Vol. 12, № 12. P. 846–860.
 50. Tanzer A., Stadler P.F. Molecular evolution of a microRNA cluster // *J. Mol. Biol.* 2004. Vol. 339, № 2. P. 327–335.
 51. Hertel J. et al. The expansion of the metazoan microRNA repertoire. // *BMC Genomics*. 2006. Vol. 7, № 1. P. 25.
 52. Piriyaopongsa J., Mariño-Ramírez L., Jordan I.K. Origin and evolution of human microRNAs from transposable elements // *Genetics*. 2007. Vol. 176, № 2. P. 1323–1337.
 53. Zhang R., Wang Y.Q., Su B. Molecular evolution of a primate-specific microRNA family // *Mol. Biol. Evol.* 2008. Vol. 25, № 7. P. 1493–1502.
 54. Lu J. et al. Adaptive evolution of newly emerged micro-RNA genes in *Drosophila* // *Mol. Biol. Evol.* 2008. Vol. 25, № 5. P. 929–938.
 55. Lu J. et al. The birth and death of microRNA genes in *Drosophila*. // *Nat. Genet.* 2008. Vol. 40, № 3. P. 351–355.
 56. Lercher M.J., P??l C. Integration of horizontally transferred genes into regulatory interaction networks takes many million years // *Mol. Biol. Evol.* 2008. Vol. 25, № 3. P. 559–567.
 57. Fromm B. et al. A Uniform System for the Annotation of Vertebrate microRNA Genes and the Evolution of the Human microRNAome. // *Annu. Rev. Genet.* 2015. Vol. 49, № 1. P. 213–242.

58. Borchert G.M., Lanier W., Davidson B.L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006. Vol. 13, № 12. P. 1097–1101.
59. Zeng Y., Cullen B.R. Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 30. P. 27595–27603.
60. Han J. et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. // *Cell.* 2006. Vol. 125, № 5. P. 887–901.
61. Landthaler M., Yalcin A., Tuschl T. The Human DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 and Its D. melanogaster Homolog Are Required for miRNA Biogenesis // *Curr Biol.* 2014. Vol. 128, № 2. P. 189–190.
62. Denli A.M. et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. // *Nature.* 2004. Vol. 432, № 7014. P. 231–235.
63. Gregory R.I. et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. // *Nature.* 2004. Vol. 432, № 7014. P. 235–240.
64. Lee Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. // *Nature.* 2003. Vol. 425, № 6956. P. 415–419.
65. Basyuk E. et al. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31, № 22. P. 6593–6597.
66. Zeng Y., Cullen B.R. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5 // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32, № 16. P. 4776–4785.
67. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE K.U. Nuclear Export of Microna Precursors // *Science (80-.).* 2004. Vol. 303, № 5654. P. 95–98.
68. Yi R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs // *Genes Dev.* 2003. Vol. 17, № 24. P. 3011–3016.
69. Bernstein E. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. // *Nature.* 2001. Vol. 409, № 6818. P. 363–366.
70. Hutvágner G. et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme

- Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. // *Science*. 2001. Vol. 293, № 5531. P. 834–838.
71. Bohmert K. et al. AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development // *EMBO J*. 1998. Vol. 17, № 1. P. 170–180.
 72. Fagard M. et al. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. Vol. 97, № 21. P. 11650–11654.
 73. Song J.-J. et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. // *Science*. 2004. Vol. 305, № 5689. P. 1434–1437.
 74. Tolia N.H., Joshua-Tor L. Slicer and the argonautes. // *Nat. Chem. Biol.* 2007. Vol. 3, № 1. P. 36–43.
 75. Hutvagner G., Simard M.J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. Vol. 9, № 1. P. 22–32.
 76. Vaucheret H. Plant ARGONAUTES // *Trends Plant Sci.* 2008. Vol. 13, № 7. P. 350–358.
 77. Carmell M.A. et al. The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis // *Genes Dev.* 2002. Vol. 16, № 21. P. 2733–2742.
 78. Sasaki T. et al. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome // *Genomics*. 2003. Vol. 82, № 3. P. 323–330.
 79. Thomson T., Lin H. The Biogenesis and Function PIWI Proteins and piRNAs Progress and Prospect // *Cell*. 2009. Vol. 2006. P. 355–376.
 80. Hu H.Y. et al. Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. // *BMC Genomics*. 2009. Vol. 10. P. 413.
 81. Ghildiyal M. et al. Sorting of Drosophila small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. // *RNA*. AAAS, 2010. Vol. 16, № 1. P. 43–56.
 82. Okamura K. et al. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. // *Nat. Struct.*

- Mol. Biol. 2008. Vol. 15, № 4. P. 354–363.
83. Chendrimada T.P. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. // *Nature*. 2005. Vol. 436, № 7051. P. 740–744.
 84. Mourelatos Z. et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. // *Genes Dev*. 2002. Vol. 16, № 6. P. 720–728.
 85. Kawamata T., Tomari Y. Making RISC. // *Trends Biochem. Sci.* Elsevier Ltd, 2010. Vol. 35, № 7. P. 368–376.
 86. Miyoshi K., Miyoshi T., Siomi H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: Non-canonical pathways for microRNA production // *Mol. Genet. Genomics*. 2010. Vol. 284, № 2. P. 95–103.
 87. Okamura K. et al. The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in *Drosophila* // *Cell*. 2007. Vol. 130, № 1. P. 89–100.
 88. Angelica M.D., Fong Y. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing // *October*. 2008. Vol. 141, № 4. P. 520–529.
 89. Babiarz J.E. et al. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other microprocessor-independent, dicer-dependent small RNAs // *Genes Dev*. 2008. Vol. 22, № 20. P. 2773–2785.
 90. Flynt A.S. et al. MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in *Drosophila*. // *Mol. Cell*. 2010. Vol. 38, № 6. P. 900–907.
 91. Westholm J.O., Lai E.C. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. // *Biochimie*. 2011. Vol. 93, № 11. P. 1897–1904.
 92. Chung W. et al. Computational and experimental identification of mirtrons in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. 2011. P. 286–300.
 93. Kim Y.-K., Kim V.N. Processing of intronic microRNAs. // *EMBO J*. 2007. Vol. 26, № 3. P. 775–783.
 94. Calabrese J.M. et al. RNA sequence analysis defines Dicer's role in mouse embryonic stem cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2007. Vol. 104, № 46. P. 18097–18102.
 95. Warf M.B., Johnson W.E., Bass B.L. Improved annotation of *C. elegans*

- microRNAs by deep sequencing reveals structures associated with processing by Drosha and Dicer. 2011. P. 563–577.
96. Angelica M.D., Fong Y. Argonaute loading contributes to the precision of the 5' ends of both microRNAs and their miRNA* strands in flies // October. 2008. Vol. 141, № 4. P. 520–529.
 97. Ruby J.G. et al. Large-Scale Sequencing Reveals 21U-RNAs and Additional MicroRNAs and Endogenous siRNAs in *C. elegans* // Cell. 2006. Vol. 127, № 6. P. 1193–1207.
 98. Lewis B.P. et al. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets that they could have many more regulatory functions than those uncovered to date (Lagos-Quintana et al // Cell. 2003. Vol. 115. P. 787–798.
 99. Tian G. et al. Sequencing bias: comparison of different protocols of microRNA library construction // BMC Biotechnol. 2010. Vol. 10. P. 64.
 100. Starega-Roslan J. et al. The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA // Cell. Mol. Life Sci. 2011. Vol. 68, № 17. P. 2859–2871.
 101. Yang W. et al. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases // October. 2010. Vol. 13, № 1. P. 13–21.
 102. Kawahara Y. et al. RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. // EMBO Rep. 2007. Vol. 8, № 8. P. 763–769.
 103. Kawahara Y. Redirection of Silencing Targets by Adenosine-to-Inosine Editing of miRNAs // October. 2010. Vol. 315, № 5815. P. 1137–1140.
 104. Landgraf P. et al. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing // Cell. 2007. Vol. 129, № 7. P. 1401–1414.
 105. Etheridge A. et al. Extracellular microRNA : a new source of biomarkers // Mutat Res. 2011. Vol. 717. P. 85–90.
 106. Morozova N. et al. Kinetic signatures of microRNA modes of action. // RNA. 2012. Vol. 18, № 9. P. 1635–1655.
 107. Duursma A.M. et al. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. 2008. P. 872–877.

108. Lal A. et al. p16INK4a translation suppressed by miR-24 // PLoS One. 2008. Vol. 3, № 3.
109. Tay Y. et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. // Nature. 2008. Vol. 455, № 7216. P. 1124–1128.
110. Ott C.E. et al. MicroRNAs differentially expressed in postnatal aortic development downregulate elastin via 39' UTR and coding-sequence binding sites // PLoS One. 2011. Vol. 6, № 1.
111. Lytle J.R., Yario T. a, Steitz J. a. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. Vol. 104, № 23. P. 9667–9672.
112. Ørom U.A., Nielsen F.C., Lund A.H. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation // Mol. Cell. 2008. Vol. 30, № 4. P. 460–471.
113. Place R.F. et al. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105, № 5. P. 1608–1613.
114. Kim D.H. et al. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105, № 42. P. 16230–16235.
115. Khraiwesh B. et al. Transcriptional Control of Gene Expression by MicroRNAs // Cell. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 140, № 1. P. 111–122.
116. Vasudevan S., Steitz J.A. AU-Rich-Element-Mediated Upregulation of Translation by FXR1 and Argonaute 2. 2012. Vol. 128, № 6. P. 1105–1118.
117. Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A. Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation // Science. 2007. № December. P. 1931–1934.
118. Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. // Cell Cycle. 2008. Vol. 7, № 11. P. 1545–1549.

119. Nam J.W. et al. ProMiR II: A web server for the probabilistic prediction of clustered, nonclustered, conserved and nonconserved microRNAs // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34, № WEB. SERV. ISS. P. 455–458.
120. Grimson A. et al. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants Beyond Seed Pairing // *Mol Cell.* 2013. Vol. 27, № 1. P. 91–105.
121. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31, № 13. P. 3406–3415.
122. Markham N.R., Zuker M. UNAFold // *Bioinformatics. Volume II* / ed. Keith J.M. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. Vol. 453, № 1. P. 3–31.
123. Friedländer M.R. et al. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. // *Nat. Biotechnol.* 2008. Vol. 26, № 4. P. 407–415.
124. Fromm B. et al. Substantial loss of conserved and gain of novel MicroRNA families in flatworms. // *Mol. Biol. Evol.* 2013. Vol. 30, № 12. P. 2619–2628.
125. Yu L. et al. miRNA Digger: a comprehensive pipeline for genome-wide novel miRNA mining // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2016. Vol. 6, № August 2015. P. 18901.
126. Liu B. et al. miRNA-dis: microRNA precursor identification based on distance structure status pairs // *Mol Biosyst.* 2015. Vol. 11, № 4. P. 1194–1204.
127. Yones C.A. et al. miRNAfe: A comprehensive tool for feature extraction in microRNA prediction. // *Biosystems. Elsevier Ireland Ltd*, 2015. Vol. 138. P. 1–5.
128. Liu B. et al. iMiRNA-PseDPC: microRNA precursor identification with a pseudo distance-pair composition approach // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2015. Vol. 1102, № February. P. 1–28.
129. Chen C. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № 20. P. e179.
130. Stark A. et al. Identification of Drosophila microRNA targets // *PLoS Biol.*

2003. Vol. 1, № 3.
131. Rajewsky N., Socci N.D. Computational identification of microRNA targets // *Dev. Biol.* 2004. Vol. 267, № 2. P. 529–535.
 132. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets // *Cell*. 2005. Vol. 120, № 1. P. 15–20.
 133. Gaidatzis D. et al. Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. // *BMC Bioinformatics*. 2007. Vol. 8. P. 69.
 134. Bartel D.P. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions // *Cell*. 2009. Vol. 136, № 2. P. 215–233.
 135. John B. et al. Human microRNA targets // *PLoS Biol.* 2004. Vol. 2, № 11.
 136. Saito T., Sætrom P. MicroRNAs - targeting and target prediction // *N. Biotechnol.* 2010. Vol. 27, № 3. P. 243–249.
 137. Sætrom P. et al. Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 35, № 7. P. 2333–2342.
 138. Doench J.G., Sharp P.A. Specificity of microRNA target selection in translational repression // *Genes (Basel)*. 2004. Vol. 504. P. 504–511.
 139. Li L. et al. Computational approaches for microRNA studies: A review // *Mamm. Genome*. 2010. Vol. 21, № 1-2. P. 1–12.
 140. Access O. MicroRNA targets in *Drosophila* // *Genome Biol.* 2003. Vol. 5, № 1. P. 1–14.
 141. Kiriakidou M. et al. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets // *Genes Dev.* 2004. Vol. 18, № 10. P. 1165–1178.
 142. Rehmsmeier M. et al. Fast and effective prediction of microRNA / target duplexes // *Spring*. 2004. № 2003. P. 1507–1517.
 143. Miranda K.C. et al. A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites and Their Corresponding Heteroduplexes // *Cell*.

2006. Vol. 126, № 6. P. 1203–1217.
144. Saetrom O., Snøve O., Saetrom P. Weighted sequence motifs as an improved seeding step in microRNA target prediction algorithms. // RNA. 2005. Vol. 11, № 2004. P. 995–1003.
 145. Krek A. et al. Combinatorial microRNA target predictions. // Nat. Genet. 2005. Vol. 37, № 5. P. 495–500.
 146. Sturm M. et al. TargetSpy: a supervised machine learning approach for microRNA target prediction. // BMC Bioinformatics. 2010. Vol. 11. P. 292.
 147. Kertesz M. et al. The role of site accessibility in microRNA target recognition. TL - 39 // Nat. Genet. 2007. Vol. 39 VN - r, № 10. P. 1278–1284.
 148. Saito T., Sætrom P. A two-step site and mRNA-level model for predicting microRNA targets. // BMC Bioinformatics. BioMed Central Ltd, 2010. Vol. 11, № 1. P. 612.
 149. Vinther J. et al. Identification of miRNA targets with stable isotope labeling by amino acids in cell culture // Nucleic Acids Res. 2006. Vol. 34, № 16. P. 2–7.
 150. Lim L.P. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. // Nature. 2005. Vol. 433, № 7027. P. 769–773.
 151. Ørom U.A., Lund A.H. Isolation of microRNA targets using biotinylated synthetic microRNAs // Methods. 2007. Vol. 43, № 2. P. 162–165.
 152. Beitzinger M. et al. Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. // RNA Biol. 2007. Vol. 4, № October. P. 76–84.
 153. Easow G., Teleman A.A., Cohen S.M. Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification. // RNA. 2007. Vol. 13, № 8. P. 1198–1204.
 154. Vatolin S., Navaratne K., Weil R.J. A Novel Method to Detect Functional MicroRNA Targets // J. Mol. Biol. 2006. Vol. 358, № 4. P. 983–996.
 155. Aravin A., Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs

- involved in RNA silencing // FEBS Lett. 2005. Vol. 579, № 26. P. 5830–5840.
156. Xu Z. et al. Deep sequencing identifies regulated small RNAs in *Dugesia japonica*. // Mol. Biol. Rep. 2013. Vol. 40, № 6. P. 4075–4081.
 157. Qin Y.-F. et al. Identification of small non-coding RNAs in the planarian *Dugesia japonica* via deep sequencing. // Genomics. 2012. Vol. 99, № 5. P. 315–321.
 158. Tian Q.N. et al. Differential expression of microRNA patterns in planarian normal and regenerative tissues // Mol. Biol. Rep. 2012. Vol. 39, № 3. P. 2653–2658.
 159. Wu Y.Y. et al. miR-71b regulation of insulin/IGF-1 signaling during starvation in planarians // Genet. Mol. Res. 2015. Vol. 14, № 4. P. 11905–11914.
 160. Lu Y.-C. et al. Deep sequencing identifies new and regulated microRNAs in *Schmidtea mediterranea*. // RNA. 2009. Vol. 15, № 8. P. 1483–1491.
 161. González-Estévez C. et al. Diverse miRNA spatial expression patterns suggest important roles in homeostasis and regeneration in planarians // Int. J. Dev. Biol. 2009. Vol. 53, № 4. P. 493–505.
 162. Friedländer M.R. et al. High-resolution profiling and discovery of planarian small RNAs. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. Vol. 106, № 28. P. 11546–11551.
 163. Sasidharan V. et al. Identification of neoblast- and regeneration-specific miRNAs in the planarian *Schmidtea mediterranea*. // RNA. 2013. Vol. 19, № 10. P. 1394–1404.
 164. Palakodeti D., Smielewska M., Graveley B.R. MicroRNAs from the Planarian *Schmidtea mediterranea*: a model system for stem cell biology. // RNA. 2006. Vol. 12, № 9. P. 1640–1649.
 165. Fromm B. et al. MicroRNA loci support conspecificity of *Gyrodactylus salaris* and *Gyrodactylus thymalli* (Platyhelminthes: Monogenea) // Int. J. Parasitol. Australian Society for Parasitology Inc., 2014. Vol. 44, № 11. P.

787–793.

166. Xu M.-J. et al. Identification and characterization of microRNAs in *Clonorchis sinensis* of human health significance. // BMC Genomics. 2010. Vol. 11. P. 521.
167. Xu M.-J. et al. Identification and characterization of microRNAs in the pancreatic fluke *Eurytrema pancreaticum*. // Parasit. Vectors. Parasites & Vectors, 2013. Vol. 6, № 1. P. 25.
168. Xu M.-J. et al. Comparative characterization of microRNAs from the liver flukes *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*. // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 12. P. e53387.
169. Fontenla S. et al. The miRnome of *Fasciola hepatica* juveniles endorses the existence of a reduced set of highly divergent micro RNAs in parasitic flatworms // Int. J. Parasitol. Australian Society for Parasitology Inc., 2015. Vol. 45. P. 901–913.
170. Chen M.-X. et al. Identification and characterization of microRNAs in the zoonotic fluke *Fasciolopsis buski* // Parasitol. Res. 2016.
171. Wang C.-R. et al. Characterization of microRNAs from *Orientobilharzia turkestanicum*, a neglected blood fluke of human and animal health significance. // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 10. P. e47001.
172. Ai L., Chen M.X. Characterization of microRNAs in *Paragonimus westermani* by Solexa deep sequencing and bioinformatics analysis // J. Anim. Vet. Adv. 2012. Vol. 11, № 18. P. 3469–3473.
173. Xue X. et al. Identification and characterization of novel microRNAs from *Schistosoma japonicum*. // PLoS One. 2008. Vol. 3, № 12. P. e4034.
174. Wang Z. et al. An “in-depth” description of the small non-coding RNA population of *Schistosoma japonicum* schistosomulum. // PLoS Negl. Trop. Dis. 2010. Vol. 4, № 2. P. e596.
175. Cai P. et al. A Deep Analysis of the Small Non-Coding RNA Population in *Schistosoma japonicum* Eggs // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 5.
176. de Souza Gomes M. et al. Computational identification and evolutionary

- relationships of the microRNA gene cluster miR-71/2 in protostomes. // J. Mol. Evol. 2013. Vol. 76, № 6. P. 353–358.
177. Zhu L. et al. MicroRNAs Are Involved in the Regulation of Ovary Development in the Pathogenic Blood Fluke *Schistosoma japonicum* // PLOS Pathog. 2016. Vol. 12, № 2. P. e1005423.
 178. Cai P. et al. Profiles of small non-coding RNAs in *Schistosoma japonicum* during development // PLoS Negl. Trop. Dis. 2011. Vol. 5, № 8. P. 11–13.
 179. Sun J. et al. Novel expression profiles of microRNAs suggest that specific miRNAs regulate gene expression for the sexual maturation of female *Schistosoma japonicum* after pairing. // Parasit. Vectors. Parasites & Vectors, 2014. Vol. 7, № 1. P. 177.
 180. Hao L. et al. Identification and characterization of microRNAs and endogenous siRNAs in *Schistosoma japonicum*. // BMC Genomics. 2010. Vol. 11. P. 55.
 181. Huang J. et al. Genome-wide identification of *Schistosoma japonicum* microRNAs using a deep-sequencing approach. // PLoS One. 2009. Vol. 4, № 12. P. e8206.
 182. Sun J., Wang S.W., Li C. ATP synthase: an identified target gene of bantam in paired female *Schistosoma japonicum* // Parasitol. Res. 2014. Vol. 114, № 2. P. 593–600.
 183. Marco A. et al. Sex-biased expression of microRNAs in *Schistosoma mansoni*. // PLoS Negl. Trop. Dis. 2013. Vol. 7, № 9. P. e2402.
 184. Simões M.C. et al. Identification of *Schistosoma mansoni* microRNAs. // BMC Genomics. BioMed Central Ltd, 2011. Vol. 12, № 1. P. 47.
 185. de Souza Gomes M. et al. Genome-wide identification of novel microRNAs and their target genes in the human parasite *Schistosoma mansoni*. // Genomics. Elsevier B.V., 2011. Vol. 98, № 2. P. 96–111.
 186. Macchiaroli N. et al. microRNA profiling in the zoonotic parasite *Echinococcus canadensis* using a high-throughput approach. // Parasit. Vectors. 2015. Vol. 8. P. 83.

187. Cucher M. et al. High-throughput characterization of *Echinococcus* spp. metacestode miRNomes // Int. J. Parasitol. Australian Society for Parasitology Inc., 2015. Vol. 45, № 4. P. 253–267.
188. Cucher M. et al. Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. // Int. J. Parasitol. Australian Society for Parasitology Inc., 2011. Vol. 41, № 3-4. P. 439–448.
189. Bai Y. et al. Genome-wide sequencing of small RNAs reveals a tissue-specific loss of conserved microRNA families in *Echinococcus granulosus* // BMC Genomics. 2014. Vol. 15. P. 736.
190. Jin X. et al. Comparative analysis of known miRNAs across platyhelminths. // FEBS J. 2013. Vol. 280, № 16. P. 3944–3951.
191. Kamenetzky L. et al. MicroRNA discovery in the human parasite *Echinococcus multilocularis* from genome-wide data // Genomics. Elsevier B.V., 2016.
192. Lin A. et al. Comparative analysis of the miRNA profiles from *Taenia solium* and *Taenia asiatica* adult // African J. Microbiol. Res. 2014. Vol. 8, № 9. P. 895–902.
193. Wu X. et al. Identification of neglected cestode *Taenia multiceps* microRNAs by illumina sequencing and bioinformatic analysis. // BMC Vet. Res. BMC Veterinary Research, 2013. Vol. 9, № 1. P. 162.
194. Ai L. et al. Characterization of microRNAs in *Taenia saginata* of zoonotic significance by Solexa deep sequencing and bioinformatics analysis. // Parasitol. Res. 2012. Vol. 110, № 6. P. 2373–2378.
195. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. // Nucleic Acids Res. 2011. Vol. 39, № Database issue. P. D152–D157.
196. Chaiyadet S. et al. Carcinogenic Liver Fluke Secretes Extracellular Vesicles That Promote Cholangiocytes to Adopt a Tumorigenic Phenotype. // J. Infect. Dis. 2015. Vol. 212, № 10. P. 1636–1645.

197. Wang X.-W. et al. Direct isolation of high-quality low molecular weight RNA of pear peel from the extraction mixture containing nucleic acid. // Mol. Biotechnol. 2010. Vol. 44, № 1. P. 61–65.
198. Sasson A., Michael T.P. Filtering error from SOLiD Output. // Bioinformatics. 2010. Vol. 26, № 6. P. 849–850.
199. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads // EMBnet J. 2012. Vol. 17, № 1. P. 10–12.
200. Homer N., Merriman B., Nelson S.F. BFAST: an alignment tool for large scale genome resequencing. // PLoS One. 2009. Vol. 4, № 11. P. e7767.
201. Camacho C. et al. BLAST+: architecture and applications. // BMC Bioinformatics. 2009. Vol. 10. P. 421.
202. Langmead B. Aligning short sequencing reads with Bowtie // Current protocols in bioinformatics / ed. Baxevanis A.D. et al. 2010. P. 1–24.
203. Pruitt K. et al. The Reference Sequence (RefSeq) Database // The NCBI Handbook. 2nd ed. 2002. P. 1–24.
204. Benson D.A. et al. GenBank // Nucleic Acids Res. 2013. Vol. 41, № D1. P. 36–42.
205. Nawrocki E.P. et al. Rfam 12.0: Updates to the RNA families database // Nucleic Acids Res. 2015. Vol. 43, № D1. P. D130–D137.
206. Howe K.L. et al. WormBase 2016: Expanding to enable helminth genomic research // Nucleic Acids Res. 2016. Vol. 44, № D1. P. D774–D780.
207. Solovyev V. et al. Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. // Genome Biol. 2006. Vol. 7 Suppl 1. P. S10.1–12.
208. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. // Mol. Biol. Evol. 2016. Vol. 33, № 7. P. msw054.
209. Young N.D. et al. The *Opisthorchis viverrini* genome provides insights into life in the bile duct. // Nat. Commun. Nature Publishing Group, 2014. Vol. 5. P. 4378.
210. Pomaznoy M.Y. et al. Whole transcriptome profiling of adult and infective

- stages of the trematode *Opisthorchis felineus* // Parasitol. Int. Elsevier Ireland Ltd, 2016. Vol. 65, № 1. P. 12–19.
211. Sperling E. a et al. MicroRNAs resolve an apparent conflict between annelid systematics and their fossil record. // Proc. Biol. Sci. 2009. Vol. 276, № September. P. 4315–4322.
 212. Clark A.G. et al. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. // Nature. 2007. Vol. 450, № 7167. P. 203–218.
 213. Legeai F. et al. Bioinformatic prediction, deep sequencing of microRNAs and expression analysis during phenotypic plasticity in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. // BMC Genomics. 2010. Vol. 11. P. 281.
 214. Marco A. et al. Functional shifts in insect microRNA evolution // Genome Biol. Evol. 2010. Vol. 2, № 1. P. 686–696.
 215. Li S. et al. Direct sequencing and expression analysis of a large number of miRNAs in *Aedes aegypti* and a multi-species survey of novel mosquito miRNAs. // BMC Genomics. 2009. Vol. 10. P. 581.
 216. Winter F. et al. *Anopheles gambiae* miRNAs as actors of defence reaction against *Plasmodium* invasion // Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35, № 20. P. 6953–6962.
 217. Liu S. et al. MicroRNAs of *Bombyx mori* identified by Solexa sequencing. // BMC Genomics. 2010. Vol. 11, № 152. P. 148.
 218. Manuscript A., Proximity I. Identification and developmental profiling of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta* // Insect Biochem Mol Biol. 2011. Vol. 4, № 164. P. 381–395.
 219. Werren J.H. et al. Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia species*. // Science. 2010. Vol. 327, № 5963. P. 343–348.
 220. Srinivasan J. et al. The draft genome and transcriptome of *Panagrellus redivivus* are shaped by the harsh demands of a free-living lifestyle // Genetics. 2013. Vol. 193, № 4. P. 1279–1295.
 221. Skalsky R.L. et al. Identification of microRNAs expressed in two mosquito

- vectors, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. // BMC Genomics. 2010. Vol. 11. P. 119.
222. Liu F. et al. Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in *Apis mellifera*: Comparison between nurses and foragers // Insect Mol. Biol. 2012. Vol. 21, № 3. P. 297–303.
 223. Cai Y. et al. Novel microRNAs in silkworm (*Bombyx mori*) // Funct. Integr. Genomics. 2010. Vol. 10, № 3. P. 405–415.
 224. Winter A. a. D.A.D. et al. Diversity in parasitic nematode genomes: the microRNAs of *Brugia pahangi* and *Haemonchus contortus* are largely novel // BMC Genomics. 2012. Vol. 13, № 1. P. 4.
 225. Wheeler B.M. et al. The deep evolution of metazoan microRNAs // Evol. Dev. 2009. Vol. 11, № 1. P. 50–68.
 226. Hertel J. et al. Evolution of the let-7 microRNA Family // RNA Biol. 2012. Vol. 9, № 3. P. 231–241.
 227. Mohammadi-Yeganeh S. et al. Development of a robust, low cost stem-loop real-time quantification PCR technique for miRNA expression analysis // Mol. Biol. Rep. 2013. Vol. 40, № 5. P. 3665–3674.
 228. Gerlach W.L., Bedbrook J. r. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from *Opisthorchis viverrini* // Nucleic Acid Res. 1979. Vol. 7. P. 1869–1885.
 229. Marco A., Hooks K.B., Griffiths-Jones S. Evolution and function of the extended miR-2 microRNA family // RNA Biol. 2012. Vol. 9, № March. P. 1–7.
 230. Wystub K. et al. miR-1/133a clusters cooperatively specify the cardiomyogenic lineage by adjustment of myocardin levels during embryonic heart development. // PLoS Genet. 2013. Vol. 9, № 9. P. e1003793.
 231. Campo-Paysaa F. et al. microRNA complements in deuterostomes: origin and evolution of microRNAs. // Evol. Dev. 2011. Vol. 13, № 1. P. 15–27.
 232. Yuva-Aydemir Y. et al. Downregulation of the Host Gene *jigr1* by miR-92 Is Essential for Neuroblast Self-Renewal in *Drosophila* // PLoS Genet. 2015.

11 Приложения

Приложение 1

Предсказанные микроРНК для *C.sinensis* и *O. viverrini*.

семейство	название	Зрелая микроРНК	микроРНК стар	пре-микроРНК
bantam	ovi-bantam	ugagaucgcgacuaaa gcuggu	cggcucuuuucgcg uucugaga	cggcucuuuucgcgucugagaaugaccaauuguuuucugagaucgcgacuaaaagcuggu
	csi-bantam	ugagaucgcgacuaaa gcuggu	cggcucuuuucgcg uucugaga	cggcucuuuucgcgucugagaaugaccaauuguuuucugagaucgcgacuaaaagcuggu
let-7	ovi-let7a	ggagguaguucguugu gugguu	cauacaaccgacua gcuuac	ggagguaguucguugugugguuugcacugcugaccgacuucggcaaaaccuacaaccgacu agcuuac
	csi-let7a	ggagguaguucguugu gugguu	cauacaaccgacua gcuuac	ggagguaguucguugugugguuugcacugcugaccgacuucggcaaaaccuacaaccgacu agcuuac
	ovi-let7b	agagguagugacucau augacu	ucauguguuucacu agcuucac	agagguagugacucauauagacugugccaguuacagaauuuugucaauggcacaaccgcgacuca acuguccaagucauguguuucacuagcuucac
	csi-let7b	agagguagugacucau augacu	ucauguguuucacu agcuucac	agagguagugacucauauagacugugccaguuacagaauuuugucaauggcacaaccgcgacuca acuguccaagucauguguuucacuagcuucac
	ovi-let7c	gagguagugaguugua ugaccg	gccauacguccac ugccuugc	gagguagugaguuguaugaccgcauuuacaaaucucggcucgguguguuugccgucgcuu uuucccagauccaacaagggugaugccugaauuguuucgacgggaaccgacugggacggcugaa gacaucucgagcuuuugggccauacguccacugccuugc
	csi-let7c	gagguagugaguugua ugaccg	gccauacguccac ugccuugc	gagguagugaguuguaugaccgcauuacaaaauaggcucgguguguuugcuguccgucuu ucccagauccgagcaaccaagaauagggaaccgacugggacggcugaaaacaucucgagcuuugg uggccauacguccacugccuugc
miR-1	ovi-miR-1a	uggaauguggcgaagu augg		nnnnnnnnnnngcauuucucauauucucggccuuccauuacugacucugcauucca aguguugaggaaacugcaccguuuggucggucguuauccaauccaauagacuggaucacauaaac ggacaguuuuucaaccaagaauccauuccacauucaguugcugcacagagucugucaucca ccuuuugugguccacuguguuuugacauugagucuucauuccaauccagguuggcuauaugg aauugggcgaaguaugg

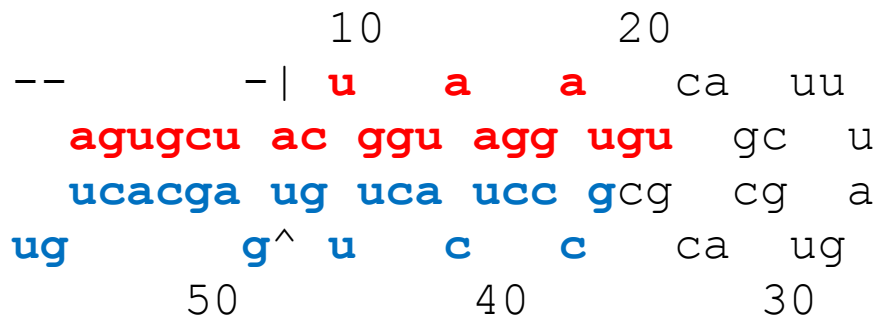
семейство	название	Зрелая микроРНК	микроРНК стар	пре-микроРНК
miR-10	ovi-miR-125b	ucccugagauugaaua ccgcu	cgguugucuuuucu cgggaacg	ucccugagauugaauuaccgucacuaacgсaaagcсaaagcсugagcсagcсugugucuuu cucgggaacg
	csi-miR-125b	ucccugagauugaaua ccgcu	uggguugucuuuucu cgggaacg	ucccugagauugaauuaccgucacuaacgсaaagcсugagcсagcсugugucuuu cucgggaacg
	ovi-miR-125c	accugagagaccuuug gcu	agucagcgggaccc aggacugc	accugagacccuuugggcugucgagacacgguuacacccugacagcсggacccсagcсugc
	csi-miR-125c	accugagagaccuuug gcu	agucagcgggaccc aggacugc	accugagacccuuugggcugucgagacacgguuacacccugacagcсggacccсagcсugc
	ovi-miR-993	acaagcucgagauuaca ggagc	cccuguuaccucga gcuuuugucg	cccuguuaccucgagcuuuuugugaaacugccucgcuuuacacaaagcucgaguuacagggagc
miR-12	csi-miR-993	acaagcucgagauuaca ggagc	cccuguuaccucga gcuuuugucg	cccuguuaccucgagcuuuuugugaaacugccucgcuuuacacaaagcucgaguuacagggagc
	ovi-miR-12	ugaguuuuuaucagc uaauga	auugccuguuugaa gcuucauaa	ugaguuuuuaucagguuaaagcaguuagcaguuacucuaucugcuguuugaaugcuuau aa
miR-22	csi-miR-12	ugaguuuuuaucagc uaauga	auugccuguuugaa acuucauaa	ugaguuuuuaucagguuaaagcaguuagcaguuacucuaucugcuguuugaaugcuuau aa
	ovi-miR-745	ugcugccugauaagag cugugau	ucaguuucuuuaacag gcauuu	ucaguuucuuuaacaggucauuuucagucgcccauuucugccacaaugcucgacaaagcucug au
miR-31	csi-miR-745	ugcugccugauaagag cugugau	ucaguuucuuuaacag gcauuu	ucaguuucuuuaacaggucauuuucagucgcccauuucugccacaaugcucgacaaagcucug au
	ovi-miR-31	uggcaagaauauggcg aagcuga	agcucgccguua uugccccc	uggcaagaauuauuggcсaaagcugauugagcсaaagguacucagcucccguaauuuugccccuc
miR-36	csi-miR-31	uggcaagaauauggcg aagcuga	agcucgccguua uugccccc	uggcaagaauuauuggcсaaagcugauugagcсaaagguacucagcucccguaauuuugccccuc
	ovi-miR-36a	ucaccggguagacauu cauucac	gaaugaugcccauc cgguacacu	gaaugaugcccauuccgguacccugauugagguuacccggguagacaaauuauuacac
miR-36	csi-miR-36a	ucaccggguagacauu cauucac	gaaugaugcccauc cgguacacu	gaaugaugcccauuccgguacccugguacuuugguuacccggguagacaaauuauuacac

Вторичная структура miR-new1 рассчитаны программой Mfold.

Зрелая микроРНК выделена красным, микроРНК стар – синим.

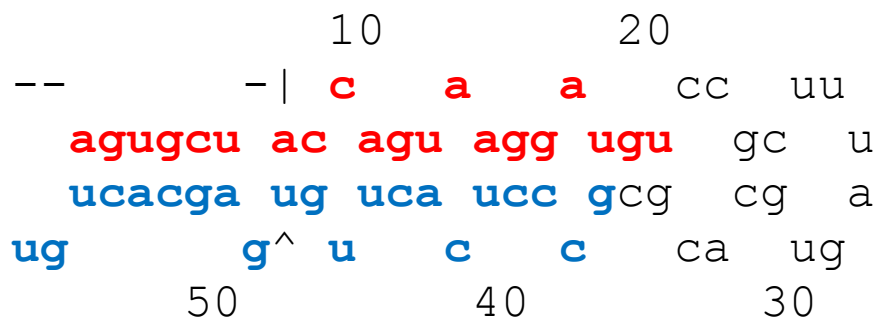
Вторичная структура ovi-miR-new1

Initial $\Delta G = -18.90$



Вторичная структура ovi-miR-new1

Initial $\Delta G = -19.10$



Приложение 2

Выравнивание фрагментов микроРНК кластеров miR-71a/2a/2b/2e

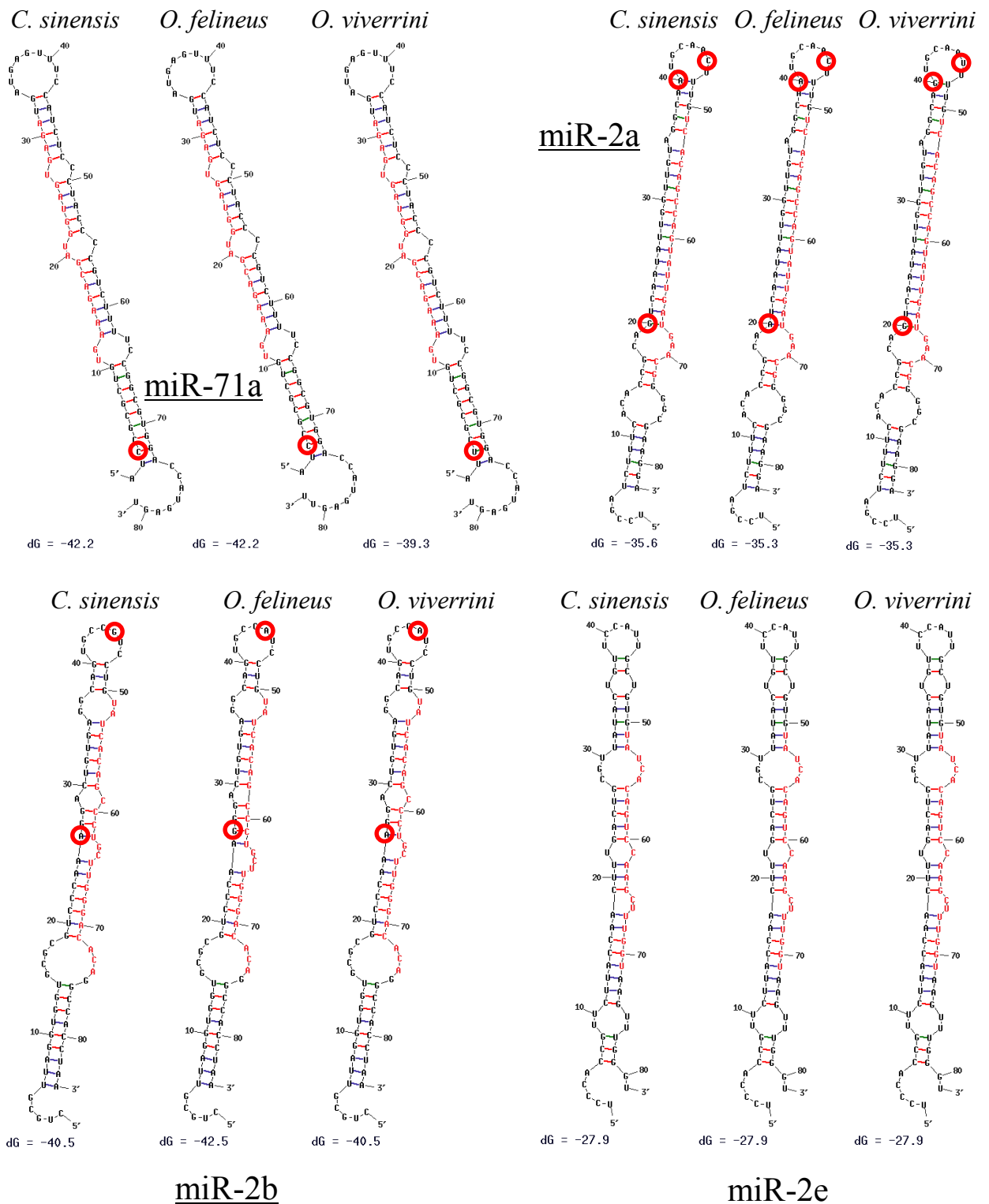
содержащих miR-2a, miR-2b и miR-2e. Выравнивание проводили, используя программу ClustalW2.

sec. struc. – вторичная структура. Последовательность зрелой микроРНК подчеркнута и выделена жирным.

miRNA name	miR-2a	
sec. struc.	)))))))))...))...)))))	((((((((((.
<i>C. sinensis</i>	TCACAGCCAGTATTGATGAACGGGGCGAAGGACGCACGTCCACCACTGCCTTAGGTGGTG	60
<i>O. felineus</i>	TCACAGCCAGTATTGATGAACGGGGCGAAGGACGCACGTCCACCACTGCCTTAGGTGGTG	60
<i>O. viverrini</i>	TCACAGCCAGTATTGATGAACGGGGCGAAGGACGCACGTCCACCACTGCCTTAGGTGGTG	60
<i>S. japonicum</i>	TCACAGCCAGTATTGATGAACGGGGTAAATAGGCGCACGTCCACCACTGC ---AGGTGGTG	57
<i>S. mansoni</i>	TCACAGCCAGTATTGATGAACGGTGTAAAAGGCGCACGTCCACCACTGC ---AGGTGGTG	57
	***** * * *	
miRNA name	miR-2b	
sec. struc.	...((((((((((.((((((.((((.....--.)))).)))).)))).))....	
<i>C. sinensis</i>	CGCGTCCCAAAGGACTGTGAGGCAGTGCCGT--CCTGTATCACAGCCCTGCTTGGGACAC	118
<i>O. felineus</i>	CGCGTCCCAAAGGACTGTGAGGCAGTGCCAT--CCTGTATCACAGCCCTGCTTGGGACAC	118
<i>O. viverrini</i>	CGCGTCCCAAAGGACTGTGAGGCAGTGCCAT--CCTGTATCACAGCCCTGCTTGGGACAC	118
<i>S. japonicum</i>	CGCGTCTCAAAGGACTGTGAGCCAAACGTAATTCT--GTATCACAGCCCTGCTTGGGACAC	116
<i>S. mansoni</i>	CGCGTCTCAAAGGACTGTGAAACATCGTAACCACTTTGTATCACAGCCCTGCTTGGGACAC	117
	***** * * *	
miRNA name		
sec. struc.	..)))))	((.((((((((((((((((.....((((
<i>C. sinensis</i>	AGGCCACCTAATTAAAGCGTCGAAACCTCCCACCGTTCTTACCAACTTTGACTGCGTTATA	178
<i>O. felineus</i>	AGGCCACCTAATTAAATCGTCGAAACCTCCCACCGTTCTTACCAACTTTGACTGCGTTATA	178
<i>O. viverrini</i>	AGGCCACCTAATTAAAGCGTCGAAACCTCCCACCGTTCTTACCAACTTTGACTGCGTTATA	178
<i>S. japonicum</i>	AGCCTACCTGCTTAGTCATCATCTGTCCCACCGCTCTTACCAACTTAGACTGAGTTATA	176
<i>S. mansoni</i>	AGCCTACCTGCTAAGACATCTCTTTGTCCCCTCGCTCTTACCAACTTTGACTGAGTTATA	177
	** * * * *	
miRNA name	miR-2e	
sec. struc.	(.((((.....)----).)))).)))).)))).))	
<i>C. sinensis</i>	CTGTTCCATTG----CTGTGTATCACAGTCCAAGCTTTGGT	215
<i>O. felineus</i>	CTGTTCCATTG----CTGTGTATCACAGTCCAAGCTTTGGT	215
<i>O. viverrini</i>	CTGTTCCATTG----CTGTGTATCACAGTCCAAGCTTTGGT	215
<i>S. japonicum</i>	CTGCTACTGTAAAGCTTTGTATATCACAGTCCAAGCTTTGGT	217
<i>S. mansoni</i>	CTGCTTTTGTAAAGCTTTGTATATCACAGTCCAAGCTTTGGT	218
	*** * *	

Приложение 3

Вторичная структура предшественников miR-71a, miR-2a, miR-2b, miR-2e *C. sinensis*, *O. felineus* и *O. viverrini*. Последовательности зрелых микроРНК выделены красным. Различия в последовательностях выделена красными окружностями. Вторичные структуры рассчитаны программой Mfold.



Приложение 5

Выравнивание кластеров микроРНК. Выравнивание проводили, используя программу ClustalW2.

csi – *C. sinensis*, sma – *S. mansoni*, hmi – *H. microstoma*, egr – *E. granulosus*, emu – *E. multilocularis*, sec. struc. – вторичная структура

Последовательность зрелой микроРНК подчеркнута и выделена жирным.

```

sec. struc.
csi_mir-1/133  ---GATATC-----ACAAAG-----GGTTCTCGCGCTAGGCGTACTCTCATATAGGCCATATATGTCAAAAGACGCTTTGTCGCCCGTTCAACCCGCGGAGCA  90
sma_mir-1/133  TCTGCTCTTTGCTTACTTCCCATAGGCGCATAGA-GTAAATTTATCTCTTCTA-----GTTTTTTCTTAGAAGAAAAA-----GAATCAAAAAATG-----GTCTGCG-AG--TAAC  91
egr_mir-1/133  ---ACTTTTTCGCGATTGGTCTGAC-----GCATCGCCGTATTTGAATTCGAGCTAAACGTGCTTCCCAATAGGCCATA-----GAGTAAGTCCCTA-----CACCTATGG--GGAT  97
emu_mir-1/133  ---ACTTTTTCGCGATTTCGCTGAC-----GCATCGCCGTAAATTTGAATTCGAGCTAAAGCGTGCTTCCCAATAGGCCATA-----GAGTAAGTCCCTA-----CACCTATGG--GGAT  97
hmi_mir-1/133  ---GGATATTTGAGGGGAAATGGAAGCTTATTGAC-TAAT-AAATTCGAGCCGACGCTGCTTCCCAATAGGCCATA-----GAGT-----TTGATA-----CCCTTTAG--GAAT  96
tso_mir-1/133  ---GACCCCGCTGATTCGCTGAA-----GCATCGCCGTCTTTAATTCGAGCTAGACGTGCTTCCCAATAGGCCATA-----GAGTAAGTCCCTA-----CTCTTAGG--GAAT  97

```

```

miR-1
sec. struc.  )))))))...)))))
csi miR-1/133  AGGTTTCATATGGAATGTTGTGAAGTATGTTCTGGGTCGAAATTGGACAGCTCTCGACTGGGACCACTCTGCAAAATGAGAAAAATCTGTGCAATTCCTTCTTCAAGACGATATTTTGGGAAATAAACAGTGAGGT 179
sma_miR-1/133 -----TTATGGAATGTTGTGAAGTATGTTCTCGACTGGGACCACTCTGCAAAATGAGAAAAATCTGTGCAATTCCTTCTTCAAGACGATATTTTGGGAAATAAACAGTGAGGT 206
egr_miR-1/133 -----CTATGGAATGTTGTGAAGTATGTAATTGTTCTGGGTCGAAACCA--CAA-AGCGCTTTTCTCTTTTAAAGATCCCTTTTATACAA-ATTTGAGTTACTTTAAACAGTTC--C 203
emu_miR-1/133 -----CTATGGAATGTTGTGAAGTATGTAATTGTTCTGGGTCGAAACCA--CGA-AGCGCTTTTCTCTTTTAAAGATCCCTTTTATACAA-ATTTGGGTACTTTAAACAGTTC--C 203
hmi_miR-1/133 -----CCTATGGAATGTTGTGAAGTATGTAATTGTTCTGGATGGAACCTTCAATTGATAGAACTATACCTACCACTTCCCTCTCATCTTTATTTGAA-ACATTTAT---GCCT--T 202
tso_miR-1/133 -----CTATGGAATGTTGTGAAGTATGTAATTGTTCTGGGTCGAAACCA--CAA-AGCGCTTTTCTCTTTTGGTATCCCTTTTATACAA-ACTTGGGATACTTTAAACAGCAC--C 203
*****
* * * * *
* * * * *
* * * * *
* * * * *
* * * * *
* * * * *
* * * * *
* * * * *

```

sec. struc. ((...(((...--...(((...(((...
csi_miR-1/133 GAT-----GAAAGTCTA---CGGCAAAATCAAAGACGGTAGAAATGTTGCAG ~ (33778 bp) ~ AAATTCCAAGCCAGCCACGAGTACCGCTGTTTGAGTGG-AA--CCGAAATGGGGT 34051
sma_miR-1/133 GGTTTTTTTTATATTTTTCGTGCGAGCATTAAGTAAGTGAATATTTTATA~ (25235 bp) ~ -----AAGATAATTATACACA---TTTCTAAATCATGAAGAGCTAAACCGTAAAA 25534
egr_miR-1/133 CAT-CCTTCACAATTTCAATGCACCCATTCAAA--TGCATGATGTTTACTCA ~ (11569 bp) ~ GAAA---GGGATGAAGGAAAGTGGATTTCGTGAAGTTA-GATTTTATGCTACAAG 11870
emu_miR-1/133 CAT-CCCACATAAATTCAATGCACATCTTCAA--TGCATGATGTTTACTCA ~ (11441 bp) ~ GAAA---GGGATGAAGGAAAGTGGATTTCGTGAAGTTA-GATTTTATGCCACAAG 11742
hmi_miR-1/133 GATGCTCTTTAAACCTCA---TGCTGTTTTAAAC-TGCCATACCTTAAATAA ~ (14863 bp) ~ -----GGTCTAAACGAAGATG-----AGTGA-CAATCGTTCATAATA 15148
tso_miR-1/133 CAT-CCTTCACATTCTTCATGTATC-CATTTAAA--CGTATTATGTTTCGCTCG ~ (11397 bp) ~ GAAA---AGGATGAAGAAACGTGGATTTCCGTAACTCG-GATTTTCATCTACAAG 11697
* * * * *

Приложение 6

Результаты предсказания генов между miR-1 и miR-133 программой Fgenesh.

Gene prediction in region between miR-1 and miR-133 in *C. sinensis* genome

Length of sequence: 34008

Number of predicted genes 1: in +chain 1, in -chain 0.

Number of predicted exons 1: in +chain 1, in -chain 0.

Positions of predicted genes and exons: Variant 1 from 1, Score:7.841427

G Str	Feature	Start	End	Score	ORF	Len
1 +	TSS	33256		-2.00		
1 +	1 CDS	33380 -	33631	9.10	33380 -	33631 252
1 +	PolA	33679		1.26		

Predicted protein(s):

```
>FGENESH:[mRNA] 1 1 exon (s) 33380 - 33631 252 bp, chain +
ATGCGTGCAGTTCACCTTCCAGCGAAACGTCTGAAACAAGATCAACGCAGAGAGATTCGGGTACATGGAATTTTGCG
ATGCAGCTCAGAATCCCATCTGAAACCGTATTATCCGGTGTAGTTAGAAAACCGGGGACCGCGGGCAGAACATCCG
GCGGTCGACTGAAGAAAGCGCCAGTTGAACAAGGTGCAGATAAACGGTATTTGTTCAACTTACACAAGTATGCACAG
GTATACTCAATAATATATTAG
>FGENESH: 1 1 exon (s) 33380 - 33631 83 aa, chain +
MRAVHFPAKRLKQDQRREIPVHGILRCSSESPSETVLSGVVRKPGTAGRTSGGRLKKAPVEQGADKRYLFNLHKYAQ
VYSIIY
```

Gene prediction in region between miR-1 and miR-133 in *S. mansoni* genome

Length of sequence: 25498

Number of predicted genes 2: in +chain 1, in -chain 1.

Number of predicted exons 8: in +chain 2, in -chain 6.

Positions of predicted genes and exons: Variant 1 from 1, Score:37.246964

G Str	Feature	Start	End	Score	ORF	Len
1 +	TSS	514		-1.92		
1 +	1 CDSf	1309 -	1354	3.36	1309 -	1353 45
1 +	2 CDSl	6721 -	6740	-5.03	6723 -	6740 18
1 +	PolA	6857		1.88		
2 -	PolA	7756		1.88		
2 -	1 CDSl	8114 -	8185	0.10	8114 -	8185 72
2 -	2 CDSi	12428 -	12464	-4.20	12428 -	12463 36
2 -	3 CDSi	17148 -	17205	-0.43	17150 -	17203 54
2 -	4 CDSi	20437 -	20483	-6.57	20438 -	20482 45
2 -	5 CDSi	23596 -	23619	3.37	23598 -	23618 21
2 -	6 CDSf	24831 -	24847	-0.73	24833 -	24847 15
2 -	TSS	25130		-4.81		

Predicted protein(s):

```
>FGENESH:[mRNA] 1 2 exon (s) 1309 - 6740 66 bp, chain +
ATGTTTACCATATTTGAAGATAATTCACAGCAGCCTAAGCAAACCTATTGGTGGAGAAGAT
TTATAG
>FGENESH: 1 2 exon (s) 1309 - 6740 21 aa, chain +
MFTIFEDNSQQPKQTIGGEDL
>FGENESH:[mRNA] 2 6 exon (s) 8114 - 24847 255 bp, chain -
ATGCAAGTTATTGAACAAATATTATTATGCTTAGCCTACAATTTTCAAAATAGTTTAAACAAATTCATATTTTAGTTC
ATACTACTTTTAAACAAACAACTAATAAAAAAGATAAGTTTATTTTAAAAAGTGTATTACTAACAAGTTTAAATA
ATTTTAAACGTGTGCAAACTCAAGTGCAGTGTGCATTACTTAAAGAGTTAAAAATAAATGAATTATCTAAAATCATG
TTTAAATTCATAGTCAATAGTTGA
>FGENESH: 2 6 exon (s) 8114 - 24847 84 aa, chain -
```

MQVIEQILLCLAYNFQNSLTNSYFSSYYFKTKQTNKKNFILKKCITNKFNNFKRVQTQVQCALLKELKINELSKIM
FKFIVNS

Gene prediction in region between miR-1 and miR-133 in *H. microstoma* genome

Length of sequence: 15123
Number of predicted genes 3: in +chain 1, in -chain 2.
Number of predicted exons 6: in +chain 2, in -chain 4.
Positions of predicted genes and exons: Variant 1 from 1,
Score:21.828844

G Str	Feature	Start	End	Score	ORF	Len
1 -	PolA	60		2.62		
1 -	1 CDS1	90 -	120	-8.41	90 -	119 30
1 -	2 CDSf	4016 -	4125	1.52	4018 -	4125 108
1 -	TSS	4290		1.49		
2 +	TSS	5110		-5.80		
2 +	1 CDSf	5271 -	5372	8.35	5271 -	5372 102
2 +	2 CDS1	7571 -	7735	-3.63	7571 -	7735 165
2 +	PolA	7739		2.62		
3 -	PolA	9165		0.42		
3 -	1 CDS1	9201 -	9314	-2.19	9201 -	9314 114
3 -	2 CDSf	12154 -	12159	2.27	12154 -	12159 6
3 -	TSS	13000		0.09		

Predicted protein(s):

>FGENESH:[mRNA] 1 2 exon (s) 90 - 4125 141 bp, chain -
ATGAGCATACTTATCTTCGCTCTTGTAACCAACATCTACCTCTATTTCTATTCACCTGCTCTAGAAATAAAGTTTC
AGCAAAACGCTCTCAAAAATATCGTGAATTGAGGTATGGCAGTTTAAACAGCATGAGGTTTAA
>FGENESH: 1 2 exon (s) 90 - 4125 46 aa, chain -
MSILIFALVNQHLPLFLFTCSRNKVSAKRSQKYRELRYGSLKQHEV
>FGENESH:[mRNA] 2 2 exon (s) 5271 - 7735 267 bp, chain +
ATGGTTGGCCAAGCACATCACGGAATAGGCGTAGAATCCATAACCTCGGACTTAGCAATTGCCTATTGGCAAGACTT
ATTAACGAGGTATGGAGACAAACGCAATTTATGCGTTCCTGCGATTTGCTGCCTACATTTTGCCAAATTGAACCGC
TTCCAATCTACATCCCCCTCTTACACTTGCAGGGAAAGCAAATACCGCTCCGCGAAAATGTCTAATTAAAAGACGA
TTAAGACAA
ACTACTGATAAACTTAATCCCATTGTA
>FGENESH: 2 2 exon (s) 5271 - 7735 88 aa, chain +
MVGQAHHGIGVESITSDLAIAIWQDLLNEVWRQTQFMRSCDLLPTFCQIEPLPNLHPPLTLGKANTAPRKCLIKRR
LRQTTDKLNPI
>FGENESH:[mRNA] 3 2 exon (s) 9201 - 12159 120 bp, chain -
ATGGAGGGTATAATTTTGAGGAAAAATGCACACATATTGAATTGTGCAGGTGTAAAGTTAATTGAGGCGATTGCAAA
TTGTATAGTTCATGAAGTGTTTCCTTATTCAAAGCACCCCTGA
>FGENESH: 3 2 exon (s) 9201 - 12159 39 aa, chain -
MEGIILRKNAHILNCAGVKLIEAIANCIVHEVFPYSKHP

Gene prediction in region between miR-1 and miR-133 in *E. granulosus* genome

Length of sequence: 11833
Number of predicted genes 1: in +chain 1, in -chain 0.
Number of predicted exons 4: in +chain 4, in -chain 0.
Positions of predicted genes and exons: Variant 1 from 1, Score:1.270266

G Str	Feature	Start	End	Score	ORF	Len
1 +	1 CDSf	820 -	973	4.61	820 -	972 153
1 +	2 CDSi	4041 -	4197	3.52	4043 -	4195 153
1 +	3 CDSi	7100 -	7259	0.01	7101 -	7259 159
1 +	4 CDSi	11650 -	11727	4.14	11650 -	11727 78

Predicted protein(s):

```
>FGENESH:[mRNA] 1 4 exon (s) 820 - 11727 549 bp, chain +
ATGGGAGCGGACGGGGAAGAACTTAACAGTGCATAGCTCCTTCAATGCACGTTCTCATGCACGATCAAGCACTGAA
CGGCGACAGTGTAACACTACAGCCTTTGCAACCCATTCGCAGCGAAGAGGGGAGCGAGATGAAAGTGAAGTGGGAGGAG
GGTTAAAGACTGCGAGCGTAGCTTTGGAGAGGGCGAAACCTCAAACGTGGATTAATGGAAGCTCCTCAAAGCGTAGC
ATAGCTAGAATAAAGTCAGAATTTAATGGAACGATAAAAAATGGAAATAAACACCTGCTTATTAACCAAAATCTTCC
ACATATTACTACAACCAACGGCGTTCTATCTCGAATAGTTGGATACGCTGGTGAAAGACACCGCTATGATCTCCTTT
CCCAATATTTTTTGTCTAAGAGGTACATTCATTTGCACACTAGTGAGGACCGTATGCTATTTTTACTGTTGGCTTTT
TACCAAAAAGGGGTCAATTCGTAATGCACCGTGAAGAGATCTTCTATCTGTACGATGGAGGAAAGGGATGAAGGAAA
GTGGATTTCT
>FGENESH: 1 4 exon (s) 820 - 11727 183 aa, chain +
MGADGEELNSAIAPSMHVLMDQALNGDSVTTAFATHSQRRGERDESEVGGGLKTASVALERAKPQTWINGSSSKRS
IARIKSEFNGTIKNGNKHLLINQNLPHITTTNGVLSRIVGYAGERHRYDLSQYFLSKRYIHLHTSEDRMLFLLLLAF
YQKGSIRNAPWKRSSICTMEERDEGKWIS
```

Gene prediction in region between miR-1 and miR-133 in *E. multilocularis* genome

Length of sequence: 11705
no reliable predictions

Gene prediction in region between miR-1 and miR-133 in *T. solium* genome

Length of sequence: 11660
Number of predicted genes 2: in +chain 2, in -chain 0.
Number of predicted exons 2: in +chain 2, in -chain 0.
Positions of predicted genes and exons: Variant 1 from 1, Score:8.071529

G Str	Feature	Start	End	Score	ORF	Len
1 +	TSS	1497		-4.80		
1 +	1 CDS	1546 -	1815	8.39	1546 -	1815 270
1 +	PolA	2062		1.26		
2 +	TSS	6789		-0.90		
2 +	1 CDS	6948 -	7271	6.54	6948 -	7271 324
2 +	PolA	8092		1.26		

Predicted protein(s):

```
>FGENESH:[mRNA] 1 1 exon (s) 1546 - 1815 270 bp, chain +
ATGAGTACCCAAATTATCAAGGGAATAAGGCGTTTGACTAGACACACGCAAACAGTGAGGAGGAATTGGGGTCAGAT
GGCTGCGCTACATAACGCTACATCTCCGTTTTGCGGAAAACCTCGTCGATGGTGATCCGAAAAGAAGTTACAAAATGA
AAGAAAACCTCGGCTGGGCTTCAACTAGAACAAAATCCACTGAGGCATACAGAGTAGAGAGAAATAAAAAGGGTGAA
CCGGTTCGTC
TGTACAGCGTGTGTAATCAACGTCGTGTGA
>FGENESH: 1 1 exon (s) 1546 - 1815 89 aa, chain +
MSTQIIKGI RRLTRHTQTVRRNWGQMAALHNATSPFCGKLVDGDPKRSYKMKENFGWASTRTKSTEAYRVERNKKGE
PVVCTACVINVV
>FGENESH:[mRNA] 2 1 exon (s) 6948 - 7271 324 bp, chain +
ATGAAGCTTATTACAGAGCTTAAAGTGCTCCGAGCAGGATGGGATTAACATCCACGAGTAGCGTTAATAAGGCCTT
TGACTTAATGAGCTGTACATTTACATCGACTCGCAGGTGGCATCACGTTTATTTGCTGGGGCAATACGTACATTG
TCAAAATGCTTCATTTATTGGAAGTGTTACCACAACAAGAGGCATTCCATCTCGATCAATCGGGTACGCTGGTGAAT
TGCAACGATGCGATCCCATTTTCGCAATACCTTCTGTCTAAGGAGTACATTTATTTGCACACAAATGAGAACCGTATG
CTATTTTACGATTAG
>FGENESH: 2 1 exon (s) 6948 - 7271 107 aa, chain +
MKLITELKVPPSRMGLTSTSSVNKAFDLMSCHISHRLAGGITFICWGNITYIVKMLHLLLEVLPQQEAFHLDQSGTLVN
CND AIPFRNTFCLRSTFICTQMRTVCYFYD
```

Приложение 7

Гены фланкирующие miR-1 и miR-133 в геномах плоских червей.

<i>Schistosoma mansoni</i> хромосома W							
+ цепь				- цепь			
имя	продукт	начало	конец	имя	продукт	начало	конец
Smp_171440	putative mind bomb	42445859	42484968				
				miR-133	miR-133	42487607	42487732
Smp_171450	putative mind bomb	42507616	42538354	miR-1b	miR-1b	42513103	42513270
				Smp_171460	putative cell adhesion molecule	42540347	42558123
<i>Clonorchis sinensis</i> scf02043							
+ цепь				- цепь			
имя	продукт	начало	конец	имя	продукт	начало	конец
csin005098	mind bomb 20 K10645 E3 ubiquitin-protein ligase mind-bomb [EC:6.3.2.19]	139	95986				
				miR-133	miR-133	112084	112210
csin005100	hypothetical protein LOC758630	145086	151114	miR-1b	miR-1	146121	146220
				csin005101	reverse transcriptase	152285	157106

<i>Hymenolenis Microstoma</i> pathogen_HYM_scaffold_88						
+ цепь				- цепь		
имя	продукт	начало	конец	имя	продукт	конец
HmN_000551300	E3 ubiquitin protein ligase mib1	18294	28769			
				miR-133	mir133	34316
				miR-1	mir1	49528
				HmN_000551400	hydrothetical protein	52836
HmN_000551500	contactin	54601	64056			
<i>Echinococcus granulosus</i> pathogen_EgG_scaffold_0013						
+ цепь				- цепь		
имя	продукт	начало	конец	имя	продукт	конец
				EgrG_000694700	E3 ubiquitin protein ligase mib1	1117749
miR-1	mir1	1131651	1131717			
miR-133	mir133	1136615	1136687			
				EgrG_000694800	mind bomb	1161157
<i>Echinococcus multilocularis</i> pathogen_EmW_scaffold_03						
+ цепь				- цепь		
имя	продукт	начало	конец	имя	продукт	конец
				EmuJ_000694700	E3 ubiquitin protein ligase mib1	1191906
miR-1	mir1	1198289	1198355			
miR-133	mir133	1210020	1210082			
				EmuI_000694800	mind bomb	1234774

Приложение 8

Фрагменты аминокислотных последовательностей, кодируемые экзонами, окружающими интронную микроРНК miR-190a.

C. sinensis

VGPGSTNRGLYVRPICYPFRPQKAIPEQDEDRSGDEAEFRIATAIDQLKSILDCE
PPSDPTILQSAHSVAVATQSLIHTARSIGLAPPSDAVDRARRAGTSHHGASLWRT
ELTVALATQDMCQLAQLCSAVLQEENAHPSKDLFGTSTRLVPSKERLLAAVRRV
AAASAQLLMSAKSRRSKCSSADIQKLQ

S. japonicum

GGSGSGSSHKSIFIRPTCYPLQVSHDQGGEQIINDEAECRIVDAINQLNLSLEKC
LVDNKLAQSLVSVARSVAVSVQNLIRTARTVVSVPND AVERARTAESASQKSTS
SAVLWRTELNVSLATQHLCQLSKLCSETVPSSTSTKLENNTGELSGGLILSRERL
LAAVRQVATAGAQLLLAALKLRKEALMSSDIRKLLK

S. mansoni

GSSKSHKSIFIRPTCYPLQISSEQTTEQTMNDEAECRIVDAINQLNSSLEKCSAD
NKLAQSLVLTARSVAVSVQNLIRTARTVISVPPSNAVDRARTAEGASQKSTSSAA
LWRTELNVSLATQHLCQLSKLCSETVPSITSQKLENNAGELSGGLILSRERLLAA
VRQVATAGAQLLLAALKLRKEALMSADIRKLLK

csi- *C. sinensis*, sj- *S. japonicum*, sma- *S. mansoni*

sj- GGSGSGSSHKSIFIRPTCYPL--QVSHDQGGEQIINDEAECRIVDAINQLNLSLE
sma ---GSSKSHKSIFIRPTCYPL--QISSEQTTEQTMNDEAECRIVDAINQLNSSLE
csi --VGPGSTNRGLYVRPICYPFRPQKAIPEQDEDRSGDEAEFRIATAIDQLKSILD
*...:::*** ***: * : : *: .***** **. **:***: *:

sj- KCLVDNKLAQSLVSVARSVAVSVQNLIRTARTVVSVPND AVERARTAESASQKS
sma KCSADNKLAQSLVLTARSVAVSVQNLIRTARTVISVPPSNAVDRARTAEGASQKS
csi ---CEPPSDPTILQSAHSVAVATQSLIHTARSIGLAPPSDAVDRARRAG---TS
: :*: **:*****:*.**:*::: .**.:**:* ** *

sj- TSSAVLWRTELNVSLATQHLCQLSKLCSETVPSSTSTKLENNTGELSGGLILSRE
sma TSSAALWRTELNVSLATQHLCQLSKLCSETVPSITSQKLENNAGELSGGLILSRE
csi HHGASLWRTELTVALATQDMCQLAQLCSAVLQEENAHPSKDLFGTSTRLVPSKE
. * *****. *:*****.:***::*** .: . .: .:: * *:***:

sj- RLLAAVRQVATAGAQLLLAALKLRKEALMSSDIRKLLK
sma RLLAAVRQVATAGAQLLLAALKLRKEALMSADIRKLLK
csi RLLAAVRRVAAASAQLLMSAKSRRSKCSSADIQKLQ
*****:***:*.*****:*** *: . *:***:***:

Приложение 9

Выравнивание талина плоских червей. Выравнивание проводили, используя программу ClustalW2.

Вид	Accession number (gene)	белок	Database
<i>C. sinensis</i>	CLF_105939	талин	UniProt
<i>E. granulosus</i>	EgrG_000736000	талин	UniProt
<i>E. multilocularis</i>	EmuJ_000736000	талин	UniProt
<i>H. microstoma</i>	HmN_000220000	apolipoprotein A I binding protein (гомологичен белку талину)	UniProt
<i>S. mansoni</i>	Smp_037860	предполагаемый талин	UniProt

csi – *C. sinensis*, sma – *S. mansoni*, hmi – *H. microstoma*, egr – *E. granulosus*, emu – *E. multilocularis*

```

hmi -----MDGTRKTLRVDDSKTLAELMLPICTKMGIYNYE
egr MPWAFAPAGPPMVGDSRRRLALRIHVPDADVTKTLVFDALMTVGQACDQIRHQIREIDGLDNPKDYGFLPHEDNKKGLWLDNSRSLEHYILRNGDIEYKYRFRWLYIRTMDGTRKTLRVDDSKTLAELMLPICTKMGIYNYE
emu MPWAFAPAGPPMVGDSRRRLALRIHVPDADVTKTLVFDALMTVGQACDQIRHQIREIDGLDNPKDYGFLPHEDNKKGLWLDNSRSLEHYILRNGDIEYKYRFRWLYIRTMDGTRKTLRVDDSKTLAELMLPICTKMGIYNYE
csi -----
sma -----

hmi EYLLVRDTEEA EKERTMTLKRA-HQSGGLVGTLRDADKMEKLRKELHTDDEVIWLNPAQSLRQQGIDEKEI LLLRRRYFFSDMNVDARDPVQLNLLYVQLKDAI LNGTHP VNLEEAVTLAALQCQIELGNYSPTKFRPGYLD
egr EYLLVRDTEEA EKDRGVTLKRAHQ TGGLVGTLRDADKMEKLRKELHTDDEVIWLNPAQSLRQQGIDEKEI LLLRRRYFFSDMNVDARDPVQLNLLYVQLKDAI LNGTHP VTLEEAVTLAALQCQVELGNYNPNKFKSGYLD
emu EYLLVRNTEEA EKDRGVTLKRAHQ TGGLVGTLRDADKMEKLRKELHTDDEVIWLNPAQSLRQQGIDEKEI LLLRRRYFFSDMNVDARDPVQLNLLYVQLKDAI LNGTHP VTLEEAVTLAALQCQVELGNFNPKNFRSGYLD
csi -----
sma -----

hmi LKDYL PKEFQVKVSEKKIFQQHATL NGLTDIEARVKYCHFCRSLKTYGITFFLVKEKMGKNR LVPRL LGITKDSVVR L DERTKEVVKVWPLTSILKWAAS PNAFTMDFGEYSPDEYYTAQTAEGEQISQLIAGYIDIILK
egr LKDYL PKEF LKVNVEKKIFQQHATL NGLSDIEARVKYCHFCRSLKTYGITFFLVKEKMGKNR LVPRL LGITKDSVVR L DERTKEVVKVWPLTSILKWAAS PNAFTMDFGEYSPDEYYTAQTAEGEQISQLIAGYIDIILK
emu IKDYL PKEF LKVNVEKKIFQQHATL NGLSDIEARVKYCHFCRSLKTYGITFFLVKEKMGKNR LVPRL LGITKDSVVR L DERTKEVVKVWPLTSILKWAAS PNAFTMDFGEYSPDEYYTAQTAEGEQISQLIAGYIDIILK
csi -----
sma -----

hmi KQKARDHQGLQGDEESAMYEENVRAERARFVNDRRSVGPADRESERFAI EETIERQRRLQQQTALIPLLNGASQQAEVNDDNMVG YIGTSERRYIQTGSIPTLSSEARMRSNDDSTDDFCTGGTQYYICKKMPAQRAL
egr KQKARDHQGLQGDEEAAMYEENVRAERAKFVHTERRSVGPADRM RVQARVEETIEKQRFQ-QPQQA-----
emu KQKARDHQGLQGDEEAAMYEENVRAERAKFVHTERRSVGPADRM RVQARVEETIEKQRLQ-QPQQA-----
csi -----MQGE-----INGQFWYWDSQRE-----
sma -----

```

```

hmi HITIEENISALQEGKQRLDIGPPTERVLINLXLIALVARFVQNDRRSVGPADRESERFAIETIERQRRILQQQTALIPPLLNGASQQAE--V--NDDNMVGYIGTSERRYIQTGSIPTLSSEAARMRSNDDSTDDFCTGGT
egr -----QPPLLNGTAQQMV--VNDDNNMVGYIGTSERRYIQAGSIPTLSSEIGRIKV-DDTTDDFITGGT
emu -----LPPLLNGTAQQMV--VNDDNNMVGYIGTSERRYIQAGSIPTLSSEIGRIKV-DDTTDDFITGGT
csi -----YSNLGGVGAT-----IVQHQRLPPPRRVGPKD-----GFVNGALEETIQPKMDDSIQMATGYMQTNGWSHQNL-HTDRTDFVDGQWAERPMSPDNFMFMGGS
sma -----

hmi QYYICKMTMPAQRALHITIEENISALQEGKQRLDIGPPTERVLINLGHDEASRRWLDESMGATEVRVADEMGAMNAAVAQAVRSANRADAVVRSVGPMTYGVAEITDPADDLMRMQQSFRVVTVHFFPAFVDNVKRVAVLRE
egr QYYVCKTMTMPAQRALHVTIEENINALEEGKQRLDIGPPAERVLVNLGHDEASRRWLYESMGVTEVRVADEMGAMNAAVAQAVRSANRADSA---GGGVHFGVTEVTDPSDDLMRVQQSFRVVTVHFFPAFVDNVKRVAVLRE
emu QYYVCKTMTMPAQRALHVTIEENINALEEGKQRLDIGPPAERVLANLGHDEASRRWLDESMGVTEVRVADEMGAMNAAVAQAVRSANRADSA---GGGVHFGVTEVTDPSDDLMRVQQSFRVVTVHFFPAFVDNVKRVAVLRE
csi HTFHYQEITPAQRALLVTIIEDVETLQAAKEQLYLSPPDED-RIIGIGSDEASKRWLSESIGASQAKVTDEVGAMNAAVAQALRSANRAEAY-DSTGMSQVGLGVSDPDGDDLMMMQQSFRVVTIHFFPAFVDDVKRVAVLRE
sma -----

hmi SALLRAEDEPDERVRHGITDESEANAQNLLGAARTVADSFTTELLKAATPLTRQTEYDLDVNN---YVTEQGVQAPGSSRKAILAANRVGEASNDFLRYVMQDSEVTDGEIVPEEDEG-----VYQDKLLELAKEVA
egr SGLLRAEDEPDERLRLDITDQSEANAQNLLGAARTVADSFTALLKAATPLTRQTDYNLDTVN---YVTEQGSQVAGSSRKAILAANRVGEASNDFLRYVLQDTEVLEGEIVPEVDERAYQADLLALYQDKLLELAKEVA
emu SGLLRAEDEPDERLRLDITDQSEANAQNLLGAARTVADSFTTELLKAATPLTRQTDYNLDTVN---YVTEQGLQVAGSSRKAILAANRVGEASNDFLRYVLQDTEVLEGEIVPEVDERAYQADLLALYQDKLLELAKEVA
csi VGAIRADQTGEF---VIAAQSEESSQNLLSAAHVDAFTDLLESARPLATGQPREEVVTDSTIRSQAVTTGVPVSSSRKAIIDAASRVGEASNDLLRHVMHEGDGEEDFE---ASSLMLTEERLYKDQLLSLAKAVA
sma -----

hmi NSTAVLVVKAKNLATQTNLDSHQMVVMNATQTGLCTSQLVACTKVLAPTIHQASCQQQLSEASARDVSNVAVDSVVRTARSSGQTAHDMRLSDADVQEVNAAVIEVEDAAVEVRTSLDRLNAHLLSGSARPYQGDSLDLDFQ
egr NSTAVLVVKAKNLATQTSLDPDHQQLVMAATNTGLCTSQLVACTKVLAPTIHQASCQQQLSESTCEVATAVDDVVRVARGAGQAAHDTINLSEPEVHEIDSAMVQVESAAATEVRTSLDRLNAHLLRGSIRPYQGDTLDLDFQ
emu NSTAVLVVKAKNLATQTSLDLDHQQLVMAATNTGLCTSQLVACTKVLAPTIHQASCQQQLSESTYEVATSVDDVVRVARGAGQAAHDTINPSEPEVHEIDSAMVQVESAAATEVRTSLDRLNAHLLRGSIRPYQGDTLDLDFQ
csi NTTASLVVKAKNLATQTSLDPEAQQHVIAAATQTGLCTSQLVACTKVLAPTIYQPSQQQLSEAAAREVSWAVDGVQASRAAGARTADQPV---VQVQPVRTAVAETEMAATEVRDALDQLNAHLSKASAKTSSGDALDNFQ
sma -----

hmi QAYDALQQ--ETDGIRLVAAARRLSQVTAQMNNLKVQAEETLEGDPERQTRLFAAAKQLADSTTDLINQAKVCSSDPDSVPRKAALKHSADDLVVAYASAAELLNARVIRSLQAAARAVVSASNNLITTSRVASSKSRSN
egr QAYDELQR--ETDGVRLVAAARRLSQVTAQMISDLKVQAEETVEGDPERQTRLFAAAKQLADATTELINQAKICSSNPDSLTPQADLKHAADNLVVAYASAAELLNARVIRSLQAAARAVVSASNNLITTSRYAANKSRANN
emu QAYDELQR--ETDGVRLVAAARRLSQVTAQMISDLKMQAEETVEGDPERQTRLFAAAKQLADATTELINQAKICSSNPDSLTPQADLKHAADNLVVAYASAAELLNARVIRSLQAAARAVVSASNNLITTSRYAANKSRANN
csi LAYDQLQQYHTDQGRMVASARRMAQATAQMIADIKAQAEALADDPDRQSRLFAAAKQLADATTILIASAKVCSTNPENPVTQEELRQAESLNLIVHSAADLLHRRILRNLQAAARAATGATQLVNVSVQAAKRSRGNT
sma -----

hmi YHMASDERAVNDLLPKMVSAIRFIRDPEDPLAQLELICETCKQAVQPCSQLARSCRQIVPTISDAALQNALDGSSSQMVAVETLKAACLARASPIARQLQMDGALASLLRTVREAEIEKLAKAGTLTALPDDRVEDRYQTL
egr YHILINEKAVSDLLPKMVSAIRFIRDPEDPLAQLELICACEHAIQPCGQLARSCRSMVPTIGDPAVQSALDNSTSQMVAVETLKAACLARVSPARQLQMDGALASLLRTVREAEIELEDLSKAGTLTALPDDKVEDRYRIL
emu YHILINEKTVSDLLPKIVSAIRFIRDPEDPLAQLELICACENAIQPCNQLARSCRSMVPTIGDPAVQSALDNSTSQMVAVETLKAACLARVSPARQLQMDGALASLLRTVREAEIELEDLAKAGTLTALPDDKVEDRYRIL
csi YQVISDGKLVNGLIPRTVISIRESRACPDPLTQVELISACERFVLPCESLVRSSRSVAPTVDPTTQAALDNSTSQLSGAIEVLRTCLARLTPLTRQMQVDGALARLARLAVEAAAIEGLKQGT LAPLPDEKIDDCFNLL
sma -----

hmi KVGVRDTQNSISEVLSAVDTLAQDYASQPSPNRDQSEDWLGSANRLASGVSDLVRSTRSCLAEERPVD-----SLASCVRSSAQLAYQLVCEARKLEPVQQANLTPDQQFVLESNRNVNANCKLVGD
egr KVSIRDAQNATNEVTSVAVDSLEQDYAAPQSPNCQGEDWLGSANRLAGAMSDLLRSTRSCLVSEDRPIDS-----SGASAARTAAQLAYQLVCEARKLEALQPTVSSPDQQADVLESNRNVAINCKLIGD
emu KVSIRDARNATNEVTSVAVDSLEQDYAAPQSPNCQGEDWLGSANRLAGAMSDLSRSIRSCLVSEDRPIDS-----SGAFAARTAAQLAYQLVCEARKLEALQPTVSSPDQQADVLESNRNVAINCKLIGD
csi GTSVQDANVSTHELHSIVETMAQQQRDMM-----SRSDVCGVPASMLATAIAGLVHATRIGIVAHDAYDAADAGRSGAVGPSSDSTR LAVTQDTRQAVQLAYELVKAARDARFAY-----DDGQMEAL---ATVVSHEQLTV
sma -----

```

```

hmi      NLNRTLSECLLKALPGQKELSEASNLVQRRRKDLVRFSEEPSVFE-YPIEETRIEKIQSEFTGAAVDLNQATADLTSCYTPVNFCKSSVRFAGAYDNLVDKGIQLSRTRSS-----KDPSSNQLISGLVDVSDRSDEML
egr      NLNRLFECLLKALPGQKELSEASDLVGRRRKDLVRFADNPTVFE-YPIEETRVERTQTEFAGAAVEFNQATADLTSCYTPSNFRSSSVRFAGAYDSLVDKGLQLSRAKSP-----KDPTGPQLITGLVEVSDRSSEML
emu      NLNCALLECLLKALPGQKELSEASDLVGRRRKDLVRFADNPTVFE-YPIEETRVERTQTEFAGAAVEFNQATADLTSCYTPSNFRSSSVRFAGAYDSLNVKGLQLSRAKSP-----KDPTGPQLITGLVEVSDRSSEML
csi      QLLDTLGRCL-LRGLPGHREINEATNLI EKRRREDLVQLSHEAPTRRVRWVEPSVYERAQSELTRA AVEFNQATGDL LSSYSPGAFRRTRRFTGAYDTLTVKGV D LCMGVP PNEVPLPEPPP INRDLVDGLVNVSNHSYALM
sma      -----

hmi      ESAKQLCSQPEAEPLRQRL LGAARSVTDSISHLLSVSASGVI PGVADCD AALRRLESMRPLLEYPDRPVNSHIYQTCVHACAQSLTPLSEGIRGTL DGVKSHNTEVFTSNVRRVTD SLCQLAEETSQAAYLIGVSHPTSEPG
egr      EDAKQVCSQPEAEPLRQKLHLAARSVTDSISHLLSVSVSGVVPGVADCD AELRRLEAMRPLLEYPDRPTNQHTYQLCVSSFAQSLAPLSDGIRGTL DGIKSHNTEVFTSNIRKVTDC LCQVVEETSQAAYLIGVAHPTSEPG
emu      EDAKQVCSQPEAEPLRQKLHLAARSVTDSISHILSISVSGVVPGVADCD AELRRLEAMRPLLEYPGRPTNQHTYQLCVSSFAQSLAPLSDGIRGTL DGVRSNTEVFTSNIRKVTDC LCHVVEETSQAAYLIGVAHPTSEPG
csi      TEAGRVCARPDEQEIRDRFQTAARDVTESISQLLTICTSGVTAEQRDCEVALRRLEALRP LLENPNRPVNQKTYCECVDEVARSITPLADSLRTMSNAAEKHTQEFGA A VRQCSNSMCQLIEETAQAAYLIGLADPRSEPG
sma      -----

hmi      RVGLIDIAFFERLQDIRNICRSISSPQVTEREVVSLANDMSANMRS LRDACNSIRAKSTNPEAQ RKLQALSNDATQSMSDLIQRS-----ADWSDEGR RATNNHAHAVNTNIDRLMNYLSSTNEFTSEPS
egr      RGGPVDIAFFERLQDIKNICRAMKSPEVTERQVVNLANDMSANVRS LRDACNTIAAQANNQEARRR LQNLADDSVKMSSELIQRS-----ADWSDEGR RITANNIHAVNGNIDRLVSFITSISEFGGEPA
emu      RGGPVDIAFFERLQDIKNICRAMKSPEVTERQVVNLANDMSANVRS LRDACNTIAAQASNQEARRR LQNLADDSVKMSSELIQHS-----ADWSDEGR RITANNIHAVNGNIDRLVSFITSISEFGGEPA
csi      RPSLVDPQLFMRSQREIQVCDAICDPSITNRQIITLSTEMARS AKTLC EACSAVSAQTNNP DARHQLNAL TRETMQSITALIQR RGNVSTAAGSQ LAEVNGEWDEANRQVTLANARGVSSNVARLVHMVTQGPQFIGQAA
sma      -----

hmi      RMGGEIKAVQQPICAAGQACLES GKVILASKHMLQTAESKAQPSDTAF AAFTAASRD L TDNTKHLLSVLNAQAPGQAECQRALLNIRRLHELERDKMSIMDGAFAPRHQATEEGFLKQLSVNSRALRDIAPQVGHGATSE
egr      RISSEARS AQQPICLAGQACLESGRGVILASKHMLQTAETSGEPSNTAFGAFTAASRD L TDNTKHLLAVLNEQGPQAECQRALLNIRRLHELERDKMAMMDGVFTPRHDSNEEGFLKQLTISARAVRDMATPVGRGATSE
emu      RISSEARS AQQPICLAGQACLESGRGVILASKHMLQTAETSGEPSNTAFGAFTAASRD L TDNTKHLLAVLNEQGPQAECQRTLLNIRRLHELERDKMAMMDGVFTPRHDSNEEGFLKQLTISTRAVRDMATSVGRGATSE
csi      RVTDEAREAAQQPVC SAGLSSLNAAQAVLRAAQTLITNA-RLGQ-PQQAFLSFSTASKELSES IKALAAAMREHAPGQLE CQRVLQNINGLLQELQRAKMASMEGRLQPRELNEEGFQKQLATCCRALD AAPNVGGAARSE
sma      -----

hmi      AEKLGHTVRELDLLL PGLVSSALGAASRSSNPSAQMTYLEHTRTVIESAEQLVSAAKQAGGNPRSDNL RVTVNDCVNAQVASCEELL SAIEGISSQQNFINKLMAILDESQNLVDKPGRIPSDA HFTDYQSRLLRLVRHMEQ
egr      AERLGHAVRELDLLL PGLVSSALGAASRAPNSSAQLIYVEHTRTVLESVEQLISA AKQAGGNPRSDP IREAVGDGVKAQIDSCEELL SAIEGVASQQSFMAKLMVLEESRALVDKPGRAPYDA HFTDYQSRLLRLARHMEQ
emu      AERLGHAVRELDLLL PGLVSSALGAASRAPNSSAQLIYVEHTRTVLESVEQLISA AKQAGGNPRSDP IREAVDDGVKAQIDSCEELL SAIEGVASQQSFLAKLMVLEESRALVDKPGRAPYDA HFTDYQSRLLRLARHMEQ
csi      AEQLGHSVRVVDSYLPGITSSAIAAASRSP LSSTQLVYLEHASTILEAADQLVRVARDAGGNPRATHLPHLDEAVRGLMESCEDLLTALDDVASRQGHVSTLIDTINRSLAQTEEIIQVPVDARFADYQARLLRIARHMEQ
sma      -----

hmi      QTEVTVRTARRPQETASQEITGLVQSLAQDYAEICMISR DACETIRDPHEAEKLRWAVKNLGQTTRGLI LATVNAASSKSDTSSLTRK GALVRPPASIRSLDFSAGAMNERLRELIALLEAQGP GTQACLQGASTVSGIIAD
egr      QTEATVRAARRPQESISQEMTGLVQNL AQDYAEICMISR DACETLRDPHEAEKLRWAVKNLGQTTRGLIMATVNVASSRPDT-SINRGSVGAKPPAYLRSLDFSAGAMNDR LRELIALLEMQGP GTQACLQGASTVSGIIAD
emu      QTEATVRAARRPQESTSQEMTGLVQNL AQDYAEICMISR DACETLRDPHEAEKLRWAVKNLGQTTRGLIMATVNVSSSRDP-SFSRGSVGPKPPAYLRSLDFSAGAMNDR LRELIALLEMQGP GTQACLQGASTVSGIIAD
csi      LTQAIQLRARQPP--SDGELAPLAHTLAQ EYQEMCQTCKGAAATLPDARQADELRGAVRAVGMAELVQATTAAIRAYDS--HGDQQMLSRNQGIAYLDTRA EALDSKLRDLIALLD TQGPNTQACLQSASTVSGIIAD
sma      -----

hmi      LDTTILFASSGTLHPPIRD DVMQNLESQQR--YSAISSGY-----DAFD--REAQSHFISIRESIHR TADALVQDTRSLVLGAGEDQTRLAGSTQMAVRNISQLADVVKQGAALIGPGQSDSQVQILSTAKDTAVALRNT
egr      LDTTILFASSGTLHPPIRD DADVHQLEA QHR--YSALSSGY-----DDFG--REAQGNFISIRESIHR TADALVQDTRSLVMCAGEDQTRLAGSTQMAVRNISQLADVVKQGAALIGPGQSDSQVLILGA AKDAAVALRST
emu      LDTTILFASSGTLHPPIRD DADVHQLEA HHR--YSALSPGY-----DDFG--REAQGNFISIRESIHR TADALVQDTRSLVMGAGEDQTRLAGSTQKAVRNISQLADVVKQGAALIGPGQSDSQVLILGA AKDAAVALRST
csi      LDTTILFASSGTLHGPVHDDVDALLGPDDYRPPYALPGAGEAIADRGSRFGNREYPEEGFTVRDSIVRTARALVDDTQSLVSGTGEDQTRLATTAHVAVERVTQLADVVKRGAAVIGPGQPD TQVEVLSACRDVATGLRDV
sma      -----MIFIKVELLTSCRDVATALRSV
          :* :* :.:*.*.*.

```


Приложение 10

Выравнивание аминокислотных последовательностей, кодируемых генами, содержащими интронную микроРНК miR-92b. Выравнивание проводили, используя программу ClustalW2.

```
E. granulosus MSNDPSSQRNLRRDRDNGSYVEDQQFEDESAAILGDEDDVQEESEGEDLFRDDMERDYRPIPELDVYEPEGLASTD-DFSSMSPTTRAEAEERAMRERDRAEALATGLLRRLGLVADLYGIDEEEGEVPAARRR
S. japonicum -----
F. hepatica -----
C. sinensis --EPPSRSDPL--APPSPDLDDAPFEDESAAILGDDGAEIEEEETGENLFGDDMERDYRPIPELDVYEAEGGLAPDDEEIEEMSPATARAEVERELRQRDRQALAAAGGLRRGLLADLYGPEDDDEVIPTRRRR
O. viverrini --EPPSRSDPL--APPSPDLDDAPFEDESAAILGDDGAEIEEEETGENLFGDDMERDYRPIPELDVYEAEGGLAPDDEEIEEMSPATARAEERELRQRDRQALAAAGGLRRGLLADLYGPEDDDEVIPARRR

E. granulosus LAERVAAGLEMEPSGDFGEALESIENLEDMHGMTVNEWVQQPATRQEIKNRFKSLRTFLDEHGVSVYAERI IQMARENRCLSVDYQHLAAAEQVLAYFLPEAPFHVLEIFNEGALEVTIARYPRYDRISN
S. japonicum -----
F. hepatica -----
C. sinensis LAERAAAGMGPGM-EEPEAVLESIENLEDMKGMSVVEWVQQPATRQEIKNRFKAFRLTFLDEHDRVYAERI IQMARENRCLSLYVDYQHLASAEQVLAYFLPEAPQHILEIFDEAARDVTLARFPYDRITN
O. viverrini LAERAAAGMGPGM-EEPEAVLESIENLEDMKGMSVVEWVQQPATRQEIKNRFKAFRLTFLDEHDRVYAERIVQMARENRCLSLYVDYQHLASAEQVLAYFLPEAPQHILEIFDEAARDVTLARFPYDRITN

E. granulosus HVNVRIVDLPLIEDLRSLRHLHLSQLVRTSGVVTSSATSVMPQLSVVRYNCVKCSCVLGPFVQTQISSEIKPTLCSECQSTGPF EINLEKTVYKNYQRITIQESPGKVPPGRLPRSKDAILLDDLVD SCKPGD
S. japonicum -----
F. hepatica -----MLVVE-----SHRDTVASWWKSTLAKSTVFKNYQRITLQESPGKVPPGRLPRSKDAILLDDLVDACKPGD
C. sinensis RVHVRINDLPLIEDLRCLRLHLNLQLVRTSGVVTSSSTSVLPQLSVVRYNCSKCGCLLGPFVQNQAGSEVRPTTCDPCQSGGPFELNMEQTVFKNYQRITVQESPGKVPPGRLPRSKDVILLDDLVDACKPGD
O. viverrini RVHVRINDLPLIEDLRCLRLHLNLQLVRTSGVVTSSSTSVLPQLSVVRYNCSKCGCLLGPFVQNQAGSEVRPTTCDPCQSGGPFELNMEQTVFKNYQRITVQESPGKVPPGRLPRSKDVILLDDLVDACKPGD

E. granulosus EIELTGIYTNNSCSLNVQTGFVPVSTVIHANNVIRKEDKVLGNLTDEDVKTITKLSRDERIAERI FASIAPSIYGHDDIKRGIALALFGGEAKNPGEKHKIRGDINVLCCGDPGTAKSQFLKYVEQLAPR
S. japonicum -----
F. hepatica EIELTGIYTHSYDGS LNTKQGFVPVFATVI ISNNILRKDDKVNAATLTDEDTRAI IKLSRDERIADRI FASIAPSVYDHDDIKRAIALALFGGEPKNPGGKHKVVRGDINVLCCGDPGTAKSQFLKSVEQLAPR
C. sinensis EIELTGIYTHSYDGS LNTQQGFVPVFATVILANNVVRKDDKVTVVEKLTDEDTKAILKLSRDERIADRI FASIAPSVYGHEDIKRGIALALFGGEPKNPGGKHKVVRGDINVLCCGDPGTAKSQFLKSVEQLAPR
O. viverrini EIELTGTYTHSYDGS LNTQQGFVPVFATVILANNIVRKDDKVTVVEKLTDEDTKAILKLSRDERIADRI FASIAPSVYGHEDIKRGIALALFGGEPKNPGGKHKVVRGDINVLCCGDPGTAKSQFLKSVEQLAPR

E. granulosus CVFTTQGASAVGLTAYVTRNPMSKEWTEAGALVLSDKGVCLIDEFDK-----MNDQDRTSIHEAMEQQSISISKAGIVTSLQARCSVIAAANPIGGRYDPSLTFSDNVDLSEPILSRFDVLCVV
S. japonicum -----
F. hepatica SVFTTQGASAVGLTAYVTRSPVSHWTEAGALVLADRGVCLIDEFDKSGHSTYSYFPMQNDQDRTSIHEAMEQQSISVSKAGIVTSLQARCTIIAAANPIGGRYDPSMTFSDNVDLSEPILSRFDILCVV
C. sinensis SVFTTQGASAVGLTAYVTRNPMSKEWTEAGALVLADRGVCLIDEFDK-----MNDQDRTSIHEAMEQQSISISKAGIVTSLQARCTIIAAANPIGGRYDPSMTFSDNVDLSEPILSRFDILCVV
O. viverrini SVFTTQGASAVGLTAYVTRNPMSKEWTEAGALVLADRGVCLIDEFDK-----MNDQDRTSIHEAMEQQSISISKAGIVTSLQARCTIIAAANPIGGRYDPSMTFSDNVDLSEPILSRFDILCVV

E. granulosus RDTVDSVQDEMLAKFVVGSHMRHHPNLSSESESEALVAQLASLGATTGSADASVG DYELPQD L LK KYIIMYAKDRVHPKLNQMDQDKVAKAYADLRRESMATGSIPI TVRHIESV VRLSEAHARMHLREYVNE
S. japonicum -----MLARFVVGSHMRHHPNMTPEERI SLNNQLSERGVPRS---GSYADIQPLDQELLKKYIIYAKDRIHPKLNQMDQDKVAAAYADLRRESMTGSLPITVRHIESVIRLSEAHARHLHREFVNE
F. hepatica RDTVDSIQDEMLARFVVGSHMRHHPNLTAEEHDTLAQQLADAGAARS---GSSPELQPLAQD L LK KYVIYAKDRIHPKLNQMDQNKIAAAYADLRRESMTGSLPITVRHIESVIRMSEAHARIHLREFVNE
C. sinensis RDTVDPIQDEMLARFVVGSHMRHHPNISQDEHATLVEQLAESGAARS---GSSPDLPLEQD L LK KYIIYAKDRIHPKLNQMDQDKIAAAYADLRRESMTGSLPITVRHIESVIRMSEAHARIHLREFVND
O. viverrini RDTVDPIQDEMLARFVVGSHMRHHPNISQDEHATLVEQLAESGAARS---GSSPDLPLEQD L LK KYIIYAKDRIHPKLNQMDQDKIAAAYADLRRESMTGSLPITVRHIESVIRMSEAHARIHLREFVND
***:*****:::* :* **: . * . : **: *:*****:*****:*****:*: * ***** **:*****:*:*****:****:***:
```


Приложение 11

микроРНК, предсказанные для плоских червей, не принадлежащих семейству Opisthorchiidae. fhe – *F. hepatica*, gsa – *G. salaris*, sma – *S. mansoni*, sja – *S. japonicum*, hmi – *H. microstoma*, egr – *E. granulosus*, emu – *E. multilocularis*

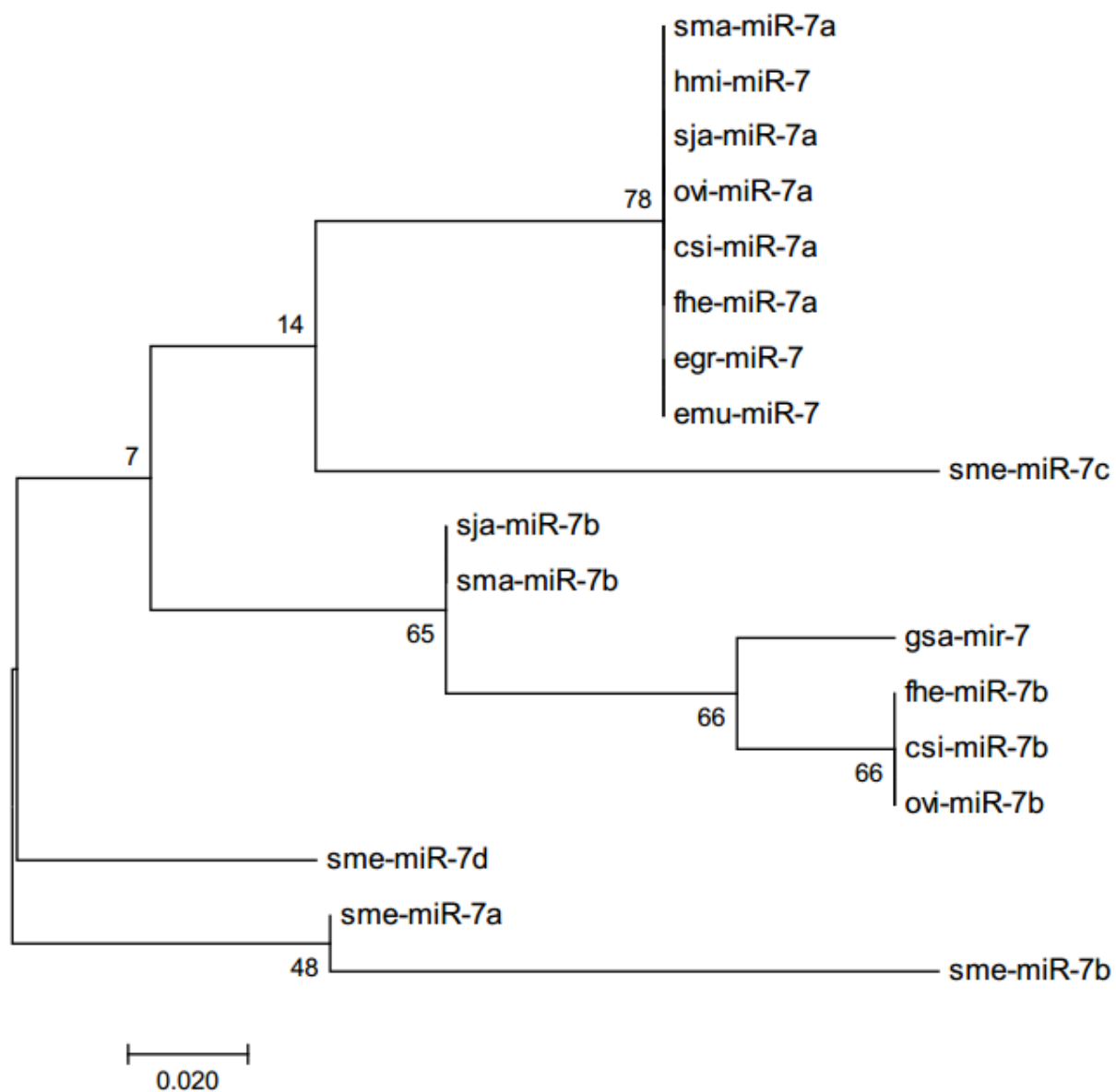
семейство микроРНК	микроРНК	зрелая микроРНК	микроРНК стар	пре-микроРНК
mir-36	fhe-miR-36b	ucaccggguguuuuucacccuc	ggguggauacagucgguu aug	ggguggauacagucgguuauuguccaaaaauccgcacuaccgaacaacuuaacauuuggucg aucgggcuacgaucacgcuauugcuccaucguguucagucaguaacacuggcugaccgaugag aagaaccucgaucugcuauacagaucaaucgugaucuauugguacaccgaucgguuguuccc gcaugguuggucguguccgaucgggaugagcggacgcaucaccggguguuuuucaccuc
mir-36	fhe-miR-36c	ccaccggguagacauuca uccgc	ggguaaugccugucggu uagug	ggguaaugccugucgguuaguguauauguaauaacugaucugaccgacuauccgcaucccg aucugaucugagaccucgaaugcgaucgagucgaagaucgggaucaggguuugccguugauuc ggagaucuuacaccacggguagacauucauccgc
mir-184	fhe-miR-184b	uggacggagauuuguua agagc	cacaaacuucucucugu ucauc	uggacggagauuuguuaagagcagguggcagaccaaagcucuuaucugacuugaucuua ugcacaacuucucucuguucauc
mir-190	fhe-miR-190b	ugauauguaugguuuuc ggug	cccgaaccguacauuc cguc	ugauauguaugguuuucgguugugucuauuguggccguccacacccccggaaccguacauuc cguc
mir-210	fhe-miR-210	uugugcgucguuucagu gaccgaa	aggccacugaucugcgu cccggg	aggccacugaucugcguuaccggguguguuuacuccggcgggguaaaucgucgguuucaguu accagccuccgacgcuguccccuaccgguugccuugugcguuucagugaccgaa
mir-277	fhe-miR-277b	aaaaugcaucauaccc gaga	uggggcagucggugcauu ucca	uggggcagucggugcauuuccacuucacgguuguagcccaguuuuuucauuccuuauc augaucuggugucggccaauggugaucuuuccgcuacggggaucacauuugaacuaacugac uugccaagacauguggaggaggagaagaggagucaggguuugacgugaaaaugcaucauaccc cgaga
mir-750	fhe-miR-750	ccgaucugacucuucca gcucu	aaguuggaagguuagacc uagcgu	aaguuggaagguuagaccuagcguuuugguuuugcuuuccauagcauaaaccgguuuaccgaa gagcacaccgaucugacucuuccagcucu
mir-210	fhe-miR-2161	ugugcguaguucagug auuagc	uagucacugggcuacgaa cacg	uagucacugggcuacgaacacgcuuuggacaauugugguggugcaaugcacuugcuaccgcgug ugcguaguucagugauuagc
let-7	fhe-let7b	agagguagugacucaua ugacu	ucaugugucacuaacu ucaca	agagguagugacucauaugacuuuaccaaauugucuuggcgaaucugagacaguugugucuaa guacucucuuuuacucgcuaccucguugucuguguuugucugucugucugucuaucuuucggu cagccagucagucacgucacagucagccaguggagagcacagaugugucucacuaacuua ca

Приложение 12

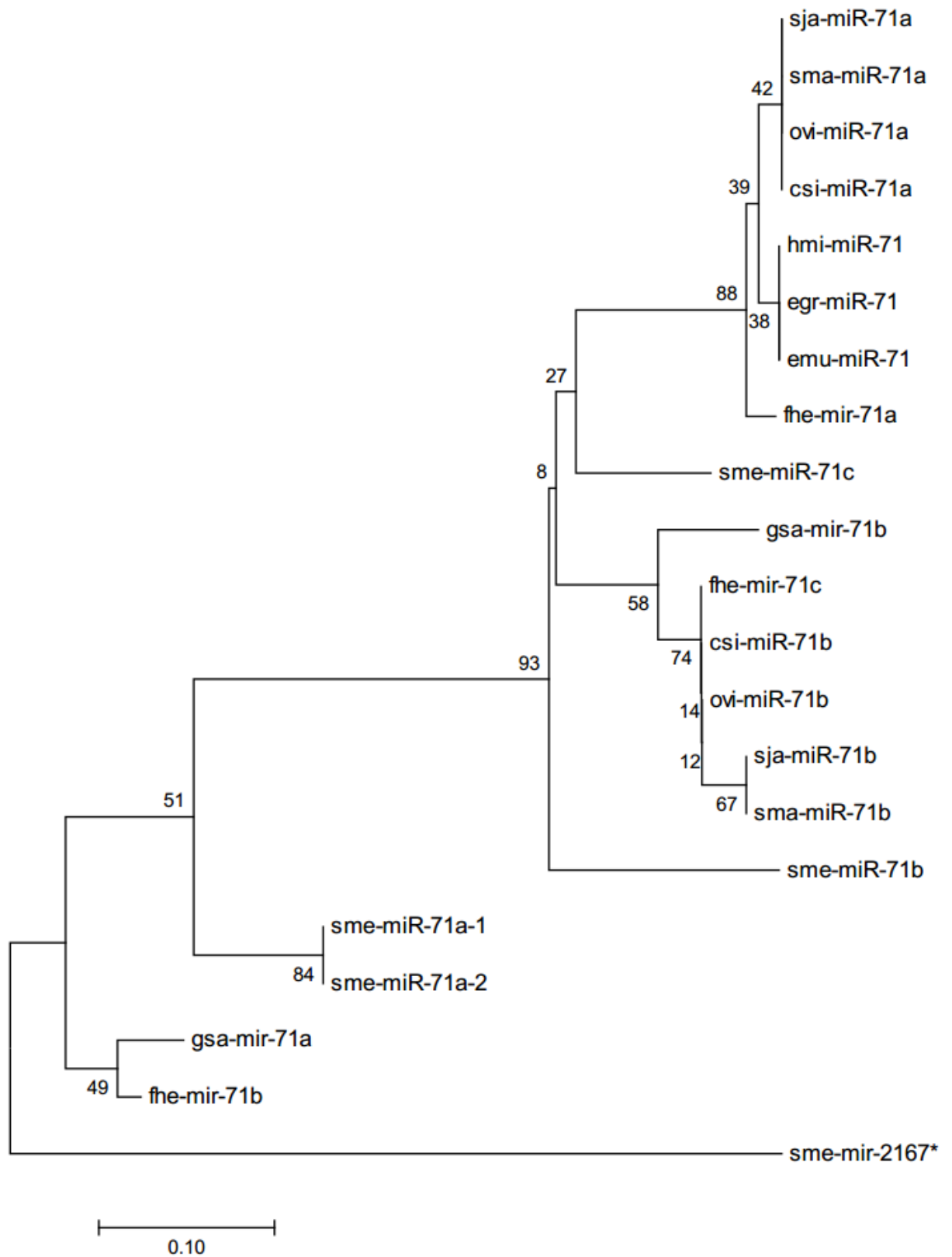
Филогенетические деревья микроРНК плоских червей, построенные с использованием алгоритма *maximum likelihood*. Для построения проводилось выравнивание последовательностей зрелых микроРНК.

Обозначение видов: *csi* – *C. sinensis*, *sma* – *S. mansoni*, *sja* – *S. japonicum*, *fhe* – *F. hepatica*, *sme* – *S. mediterranea*, *hmi* – *H. microstoma*, *egr* – *E. granulosus*, *emu* – *E. multilocularis*, *gsa* – *G. salaris*, *ovi* – *O. viverrini*

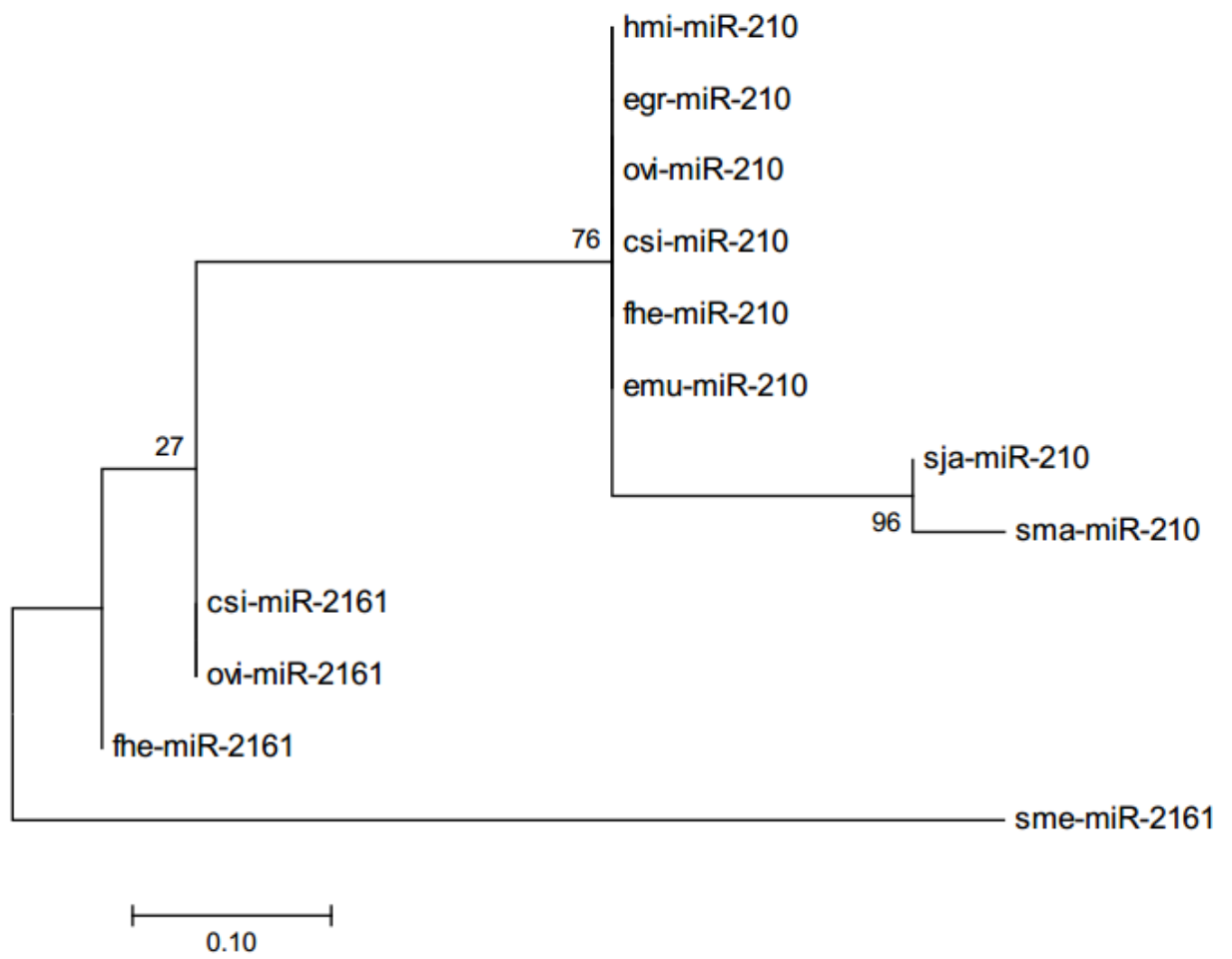
микроРНК, принадлежащие к семейству miR-7.



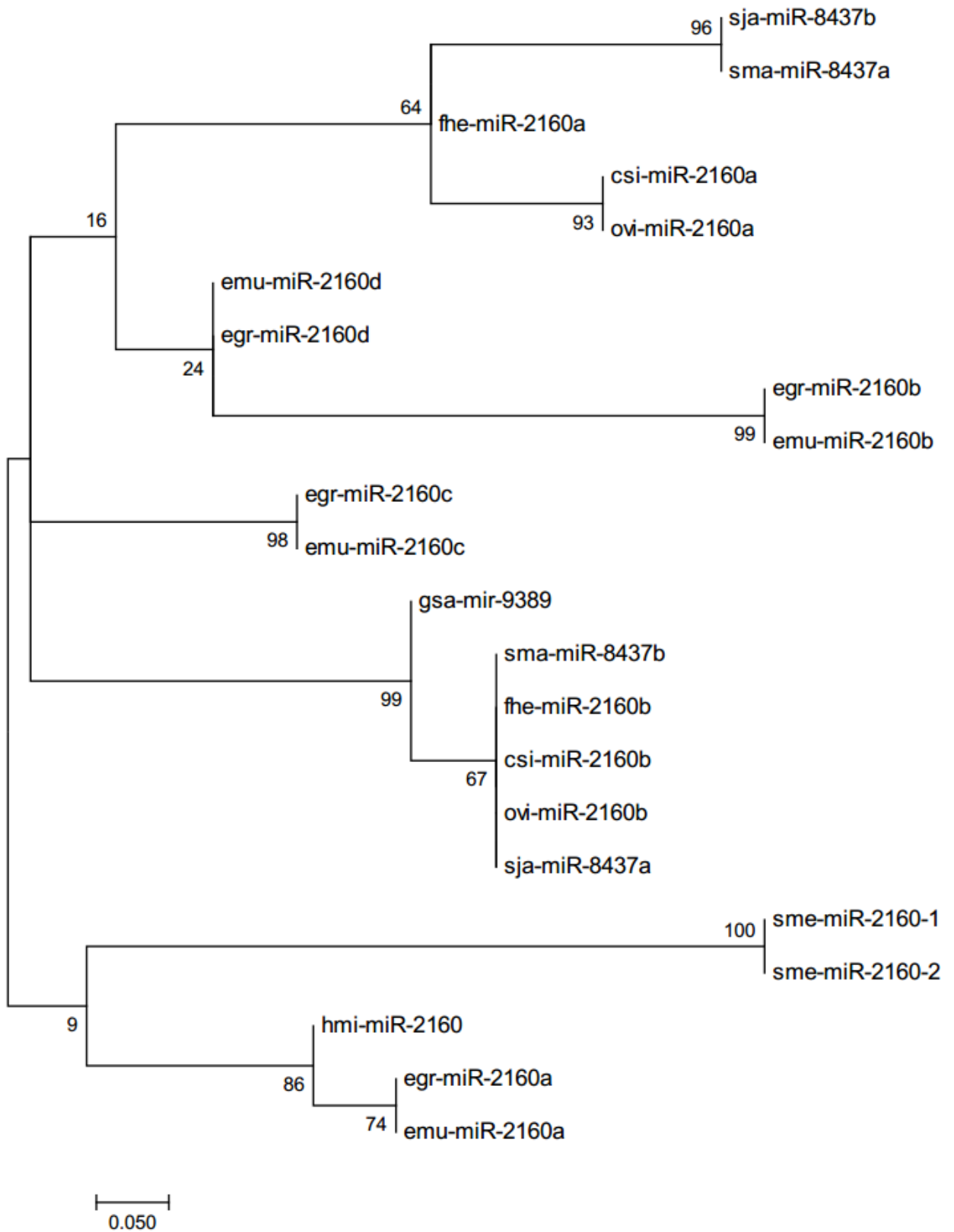
микроРНК, принадлежащие к семейству miR-71. Данное филогенетическое дерево показывает, что у описторхид был утрачен один из кластеров miR - 71/miR-2.



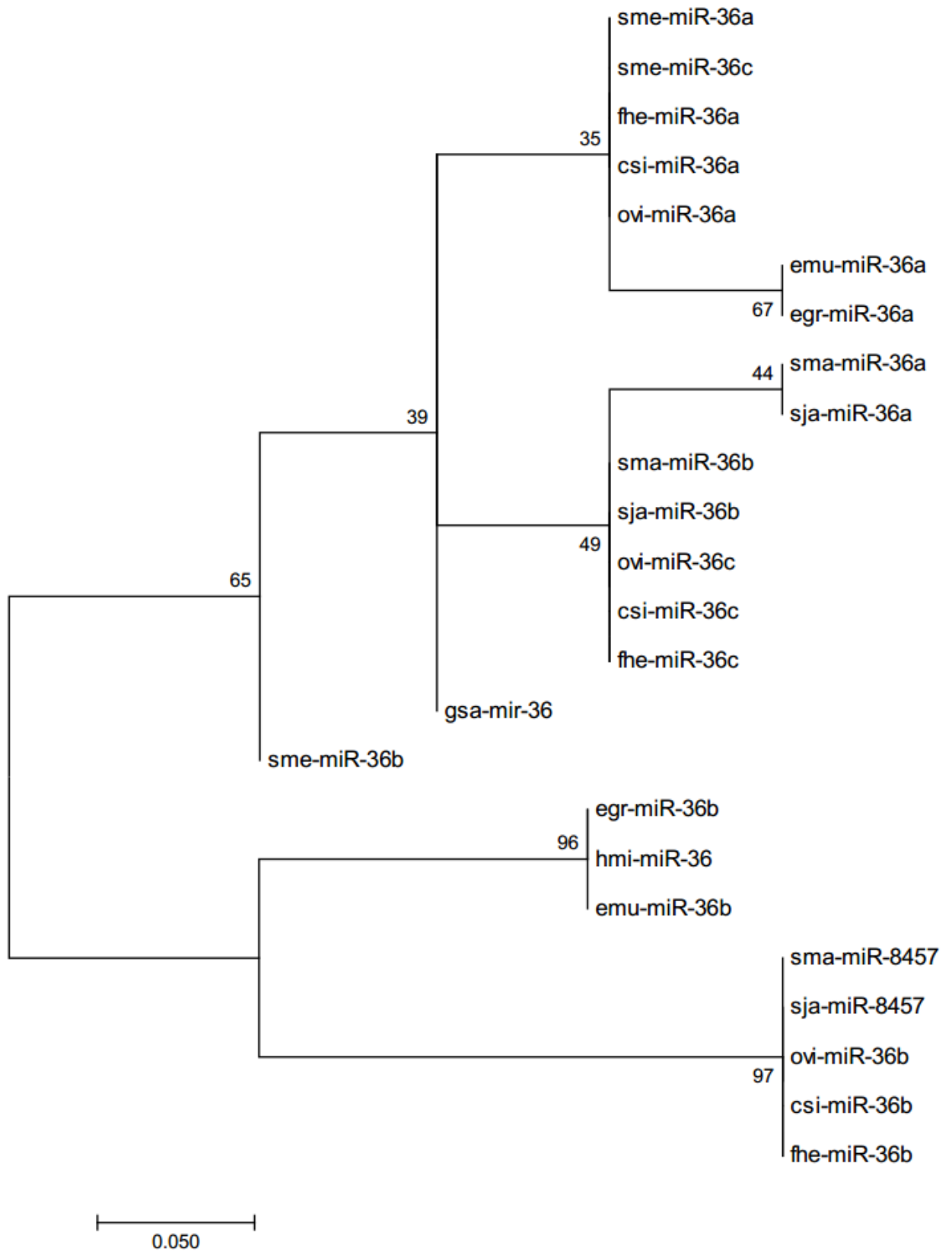
микроРНК, принадлежащие к семейству miR-210.



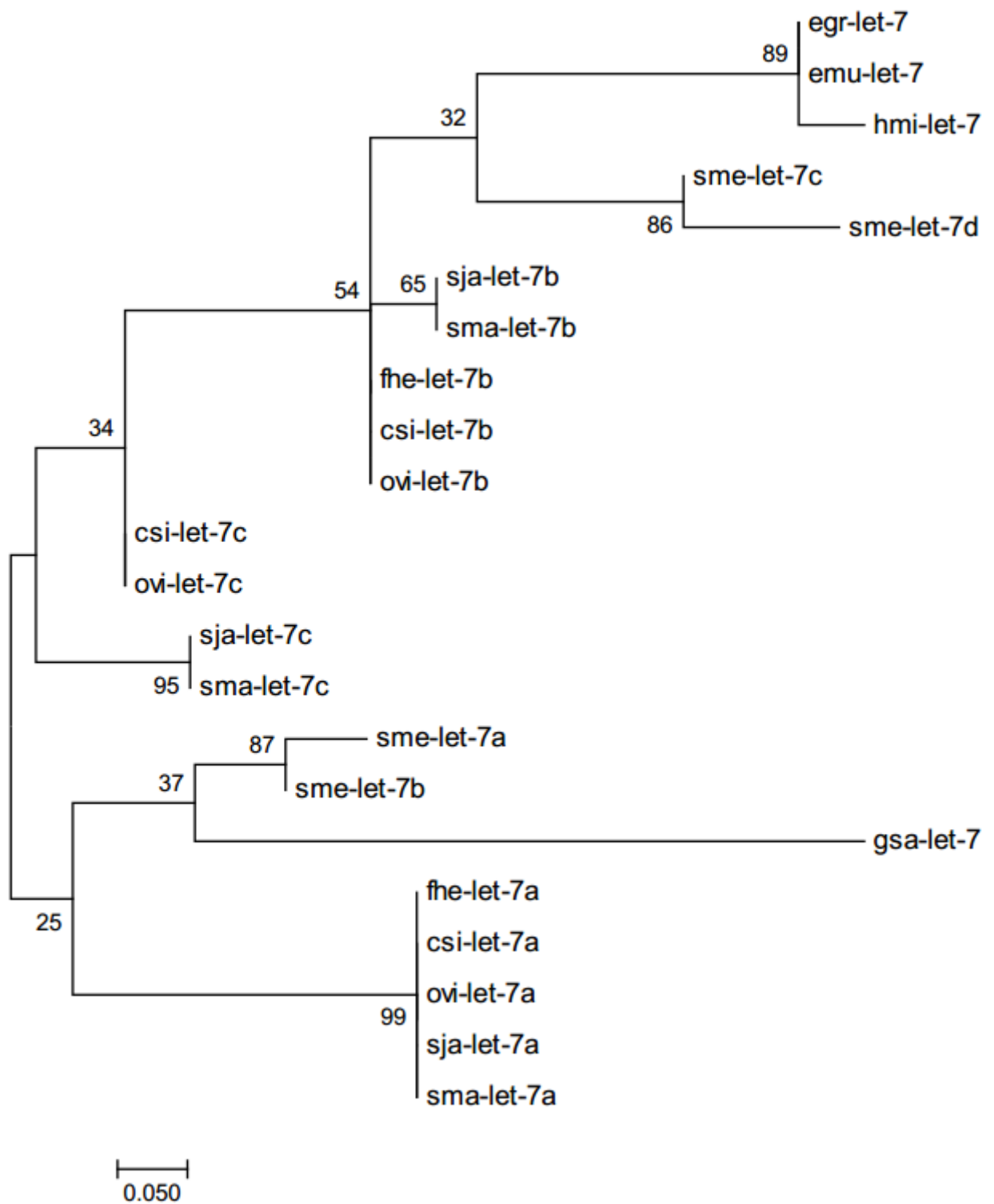
микроРНК, принадлежащие к семейству miR-2160.



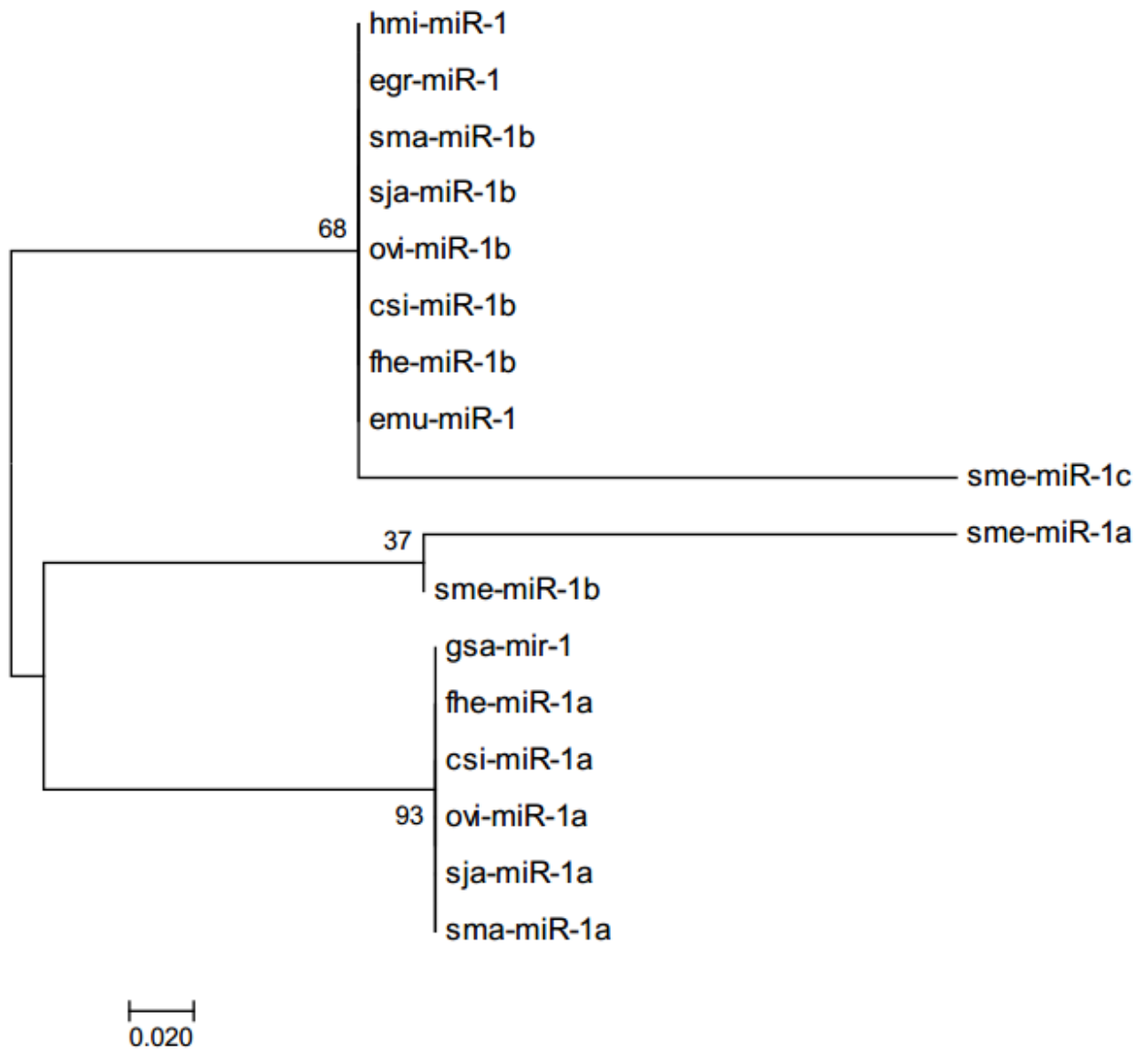
микроРНК, принадлежащие к семейству miR-36.



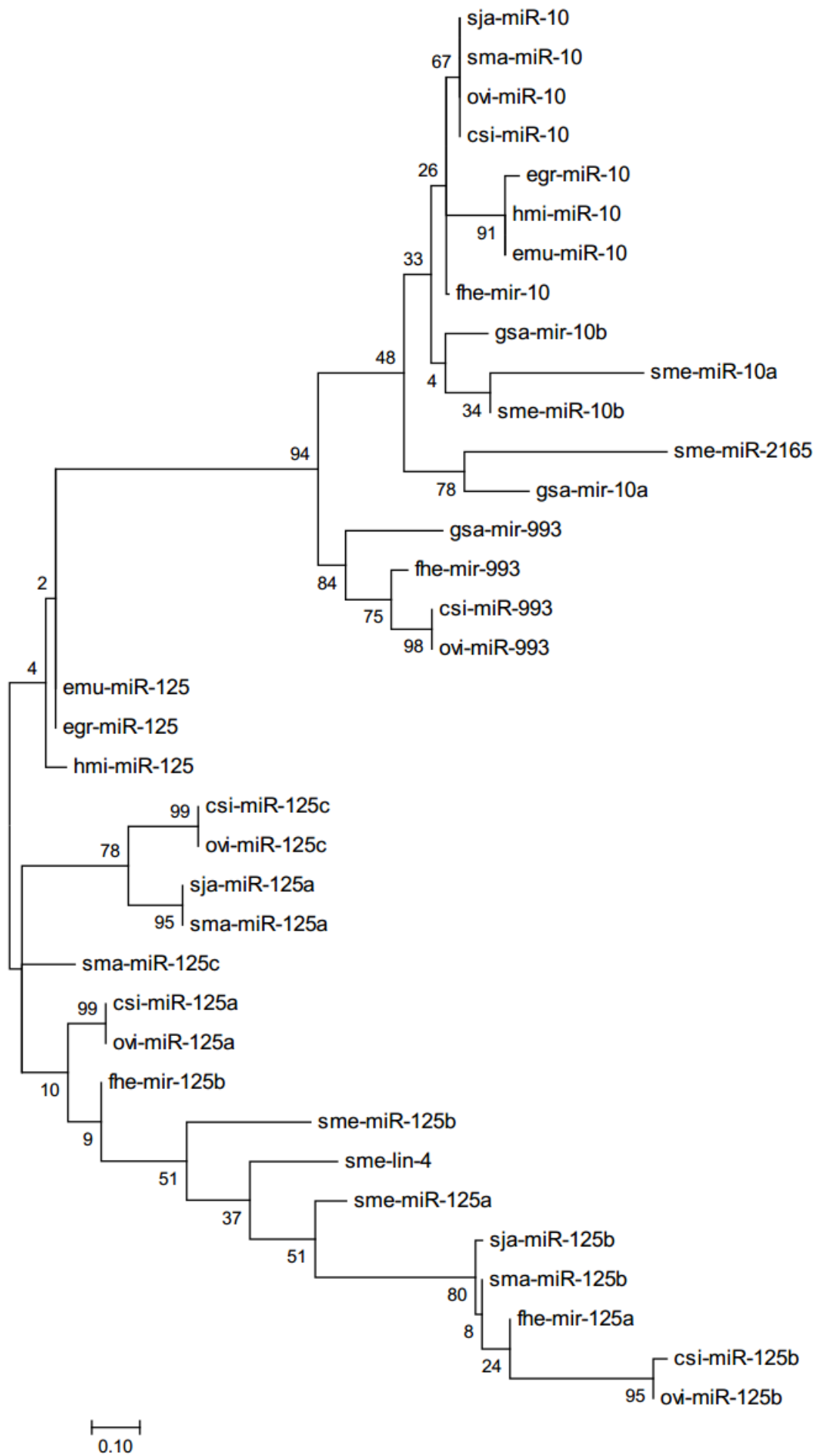
микроРНК, принадлежащие к семейству let-7.



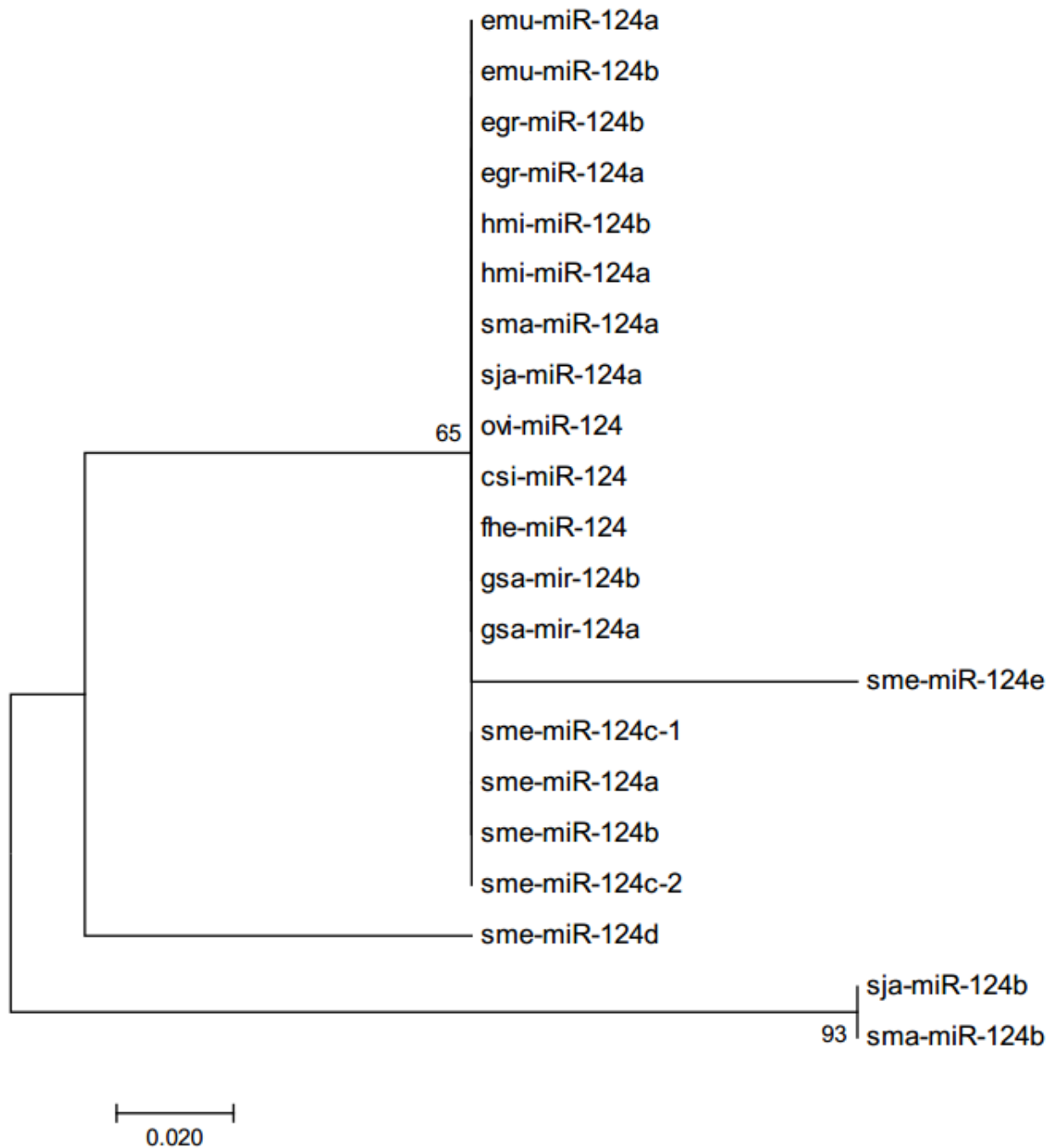
микроРНК, принадлежащие к семейству miR-1.



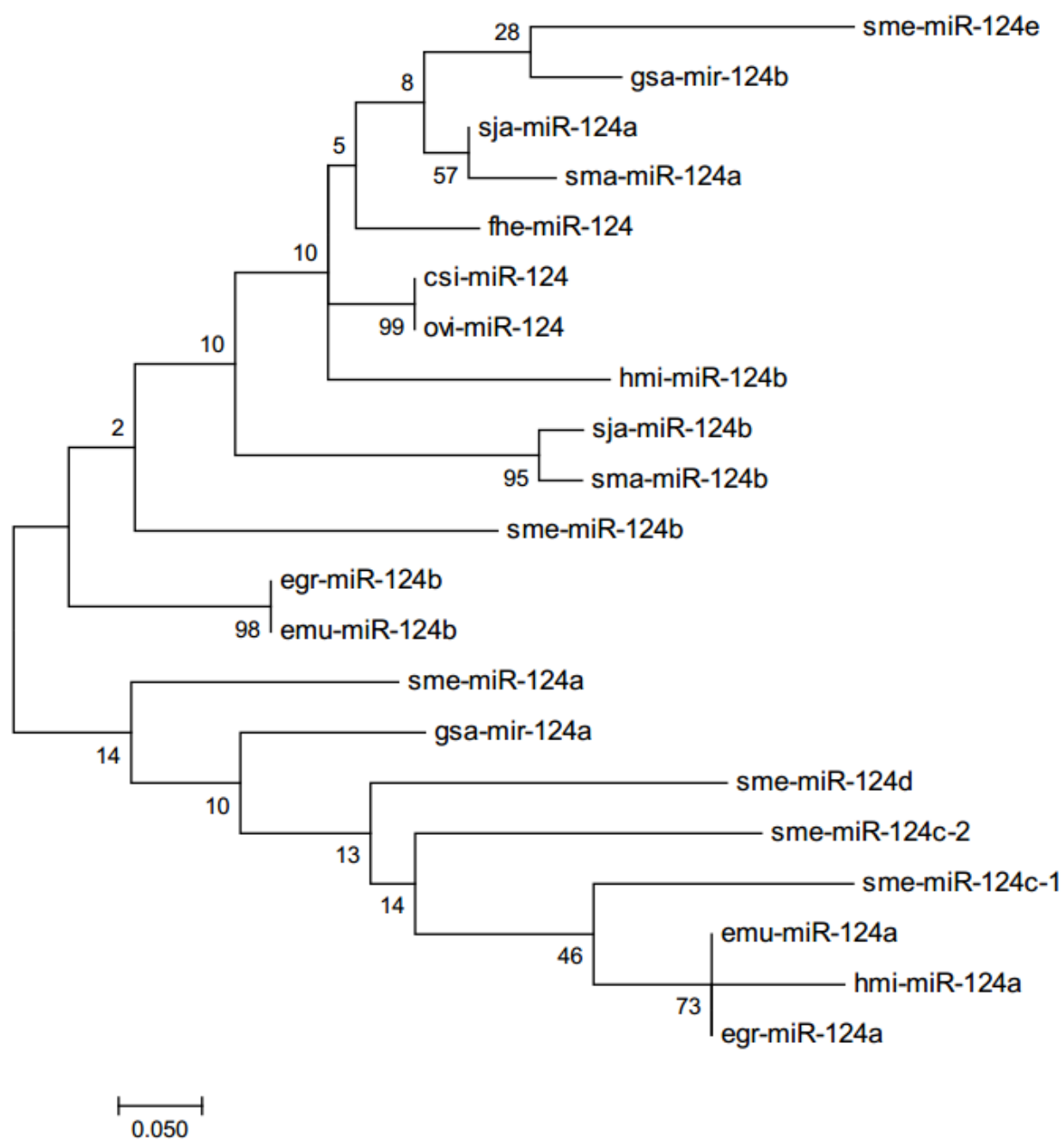
микроРНК, принадлежащие к семейству miR-10 (выравнивание было проведено для пре-микроРНК).



микроРНК, принадлежащие к семейству miR-124.



микроРНК, принадлежащие к семейству miR-124 (выравнивание было проведено для пре-микроРНК).



Выравнивание последовательностей зрелых микроРНК, принадлежащих к семейству miR-124.

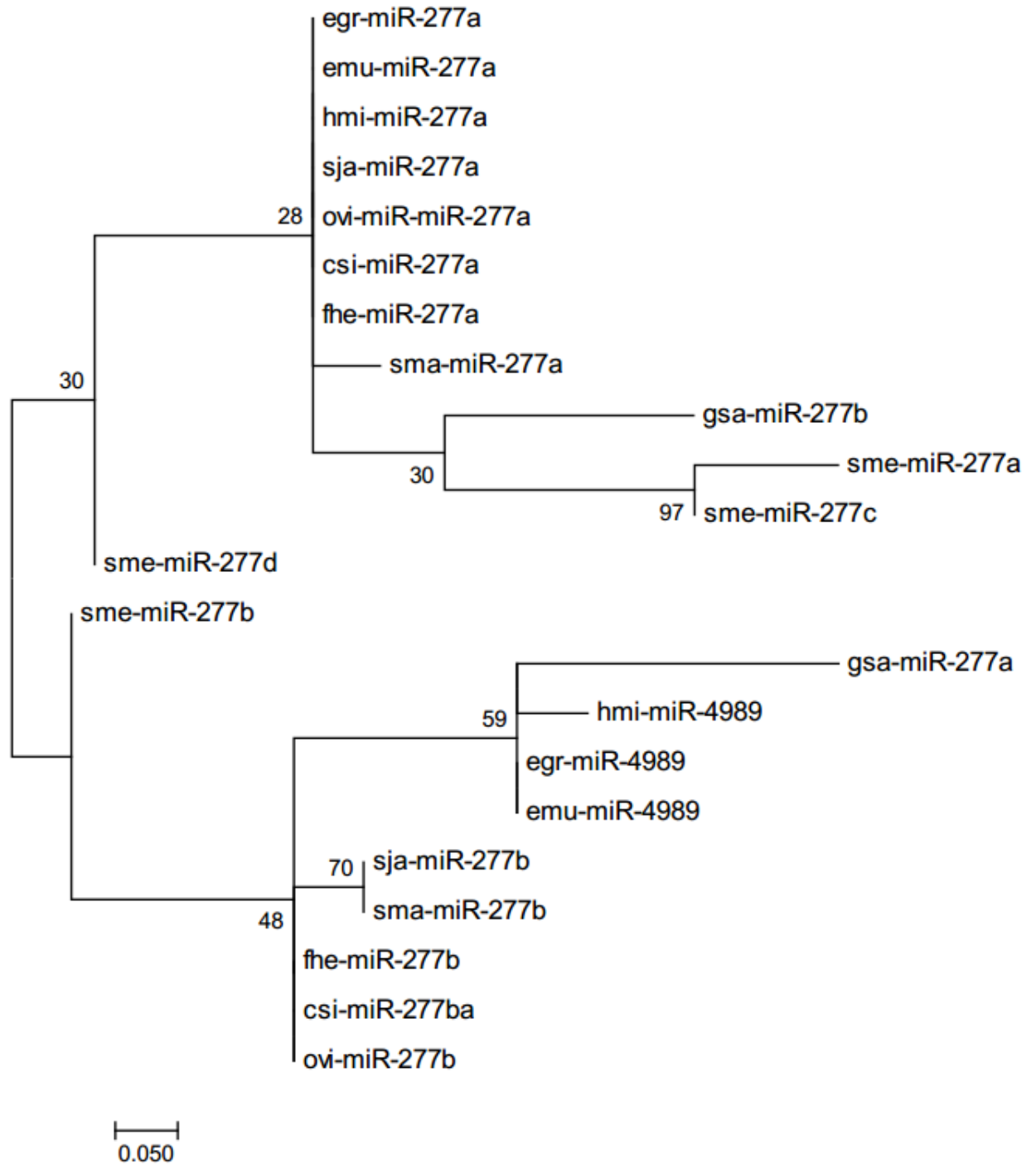
```

sme-miR-124a    --TAAGGCA--CGCGGTGAATGCTT-
sme-miR-124b    --TAAGGCA--CGCGGTGAATGCTGA
sme-miR-124c-1  --TAAGGCA--CGCGGTGAATGCCA-
sme-miR-124c-2  --TAAGGCA--CGCGGTGAATGCCA-
sme-miR-124d    --TAAGGCA--CGCGGTGAAGTGGGT-
sme-miR-124e    --TAAGGCA--CGCTGTGAATGCCA-
gsa-mir-124a    --TAAGGCA--CGCGGTGAATACC--
gsa-mir-124b    --TAAGGCA--CGCGGTGAATATC--
fhe-miR-124     --TAAGGCA--CGCGGTGAATGTCA-
csi-miR-124     --TAAGGCA--CGCGGTGAATGTC--
ovi-miR-124     --TAAGGCA--CGCGGTGAATGTC--
sja-miR-124a    --TAAGGCA--CGCGGTGAATGTCA-
sja-miR-124b    ATCAAGGCAATCGCGGAAAA-----
sma-miR-124a    --TAAGGCA--CGCGGTGAATGTCA-
sma-miR-124b    ATCAAGGCAATCGCGGAAAA-----
hmi-miR-124a    --TAAGGCA--CGCGGTGAATGCCA-
hmi-miR-124b    --TAAGGCA--CGCGGTGAATACCA-
egr-miR-124a    --TAAGGCA--CGCGGTGAATGCCA-
egr-miR-124b    --TAAGGCA--CGCGGTGAATACC--
emu-miR-124a    --TAAGGCA--CGCGGTGAATGCCA-
emu-miR-124b    --TAAGGCA--CGCGGTGAATACC--
          * * * * *   * * *   *   *

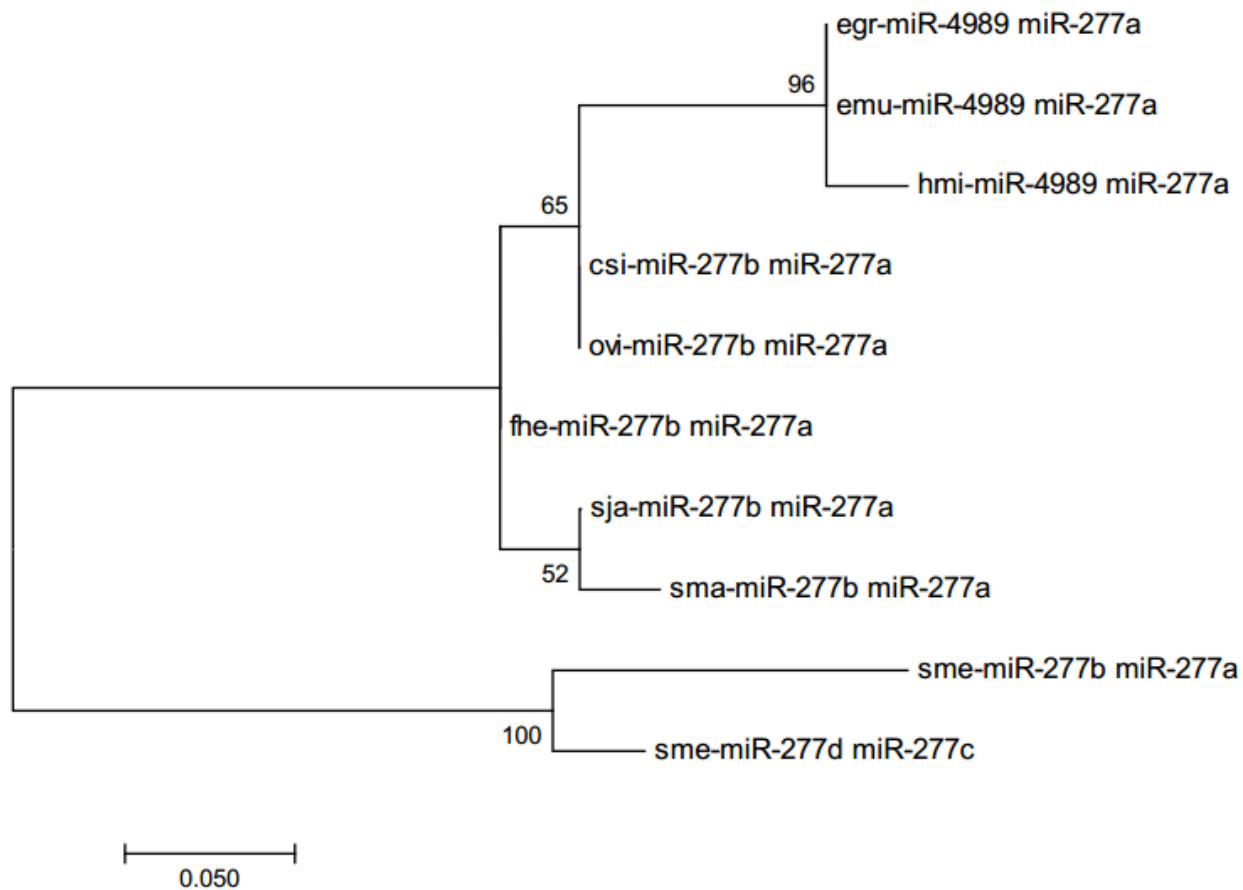
```

Данное выравнивание показывает, что miR-124b у шистосом сильно отличается от других представителей этого семейства. Вероятно, что у шистосом произошла дупликация гена miR-124 с последующим сдвигом затравочного участка.

микроРНК, принадлежащие к семейству miR-277.



микроРНК, принадлежащие к семейству miR-277 (выравнивание было проведено для объединённых последовательностей зрелых микроРНК, принадлежащих к семейству miR-277).



Приложение 13

мРНК мишени, предсказанные тремя программами (RNAhybrid, PITA и TargetScan). csi – *C. sinensis*, ofe – *O. felineus*, ovi – *O. viverrini*

микроРНК	мРНК	продукт
csi-miR-71b-5p	TMA-2	Clonorchis sinensis membrane antigen precursor (TMA-2) mRNA

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-bantam-3p	GBJA01010386	RalA-binding protein 1 [Clonorchis sinensis]	RalA-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=RALBP1 PE=1 SV=3	GO:0007165, GO:0005622	K08773
ofe-let-7a-5p	GBJA01007186	hypothetical protein CLF_103862 [Clonorchis sinensis]			
ofe-let-7a-5p	GBJA01010237	hypothetical protein T265_15517 [Opisthorchis viverrini]gb KER19520.1 hypothetical protein T265_15517 [Opisthorchis viverrini]	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 4 OS=Xenopus laevis GN=cpsf4 PE=2 SV=1	GO:0046872, GO:0008270, GO:0003676	K14404
ofe-let-7a-5p	GBJA01001007	Ras-related protein Rab-39B [Clonorchis sinensis]	Ras-related protein Rab-39B OS=Bos taurus GN=RAB39B PE=2 SV=1	GO:0006886, GO:0016020, GO:0003924, GO:0006913, GO:0005622, GO:0007165, GO:0015031, GO:0006184, GO:0007264, GO:0005525	K07925

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-let-7a-5p	GBJA01005089	anaphase-promoting complex subunit 4, partial [Clonorchis sinensis]	Sideroflexin-1 OS=Sus scrofa GN=SFXN1 PE=2 SV=1	GO:0006812, GO:0016020, GO:0008324, GO:0055085	K03351
ofe-let-7a-5p	GBJA01010976	tyrosinase [Clonorchis sinensis]gb AGG11800.1 tyrosinase [Clonorchis sinensis]	Tyrosinase OS=Pelophylax nigromaculatus GN=TYR PE=2 SV=1	GO:0008152, GO:0016491	K00505
ofe-let-7a-5p	GBJA01012269	diacylglycerol O-acyltransferase 1 [Clonorchis sinensis]	Diacylglycerol O-acyltransferase 1 OS=Bos taurus GN=DGAT1 PE=2 SV=2	GO:0008374	K11155
ofe-let-7a-5p	GBJA01010196	hypothetical protein T265_04402 [Opisthorchis viverrini]gb KER28861.1 hypothetical protein T265_04402 [Opisthorchis viverrini]			
ofe-let-7a-5p	GBJA01009717	hypothetical protein T265_06439 [Opisthorchis viverrini]gb KER26241.1 hypothetical protein T265_06439 [Opisthorchis viverrini]			
ofe-let-7a-5p	GBJA01004970	hypothetical protein T265_05270 [Opisthorchis viverrini]gb KER27711.1 hypothetical protein T265_05270 [Opisthorchis viverrini]	Probable tyrosine--tRNA ligase, mitochondrial OS=Drosophila melanogaster GN=CG16912 PE=2 SV=1	GO:0005737, GO:0006437, GO:0004812, GO:0000166, GO:0006418, GO:0004831, GO:0005524	K01866
ofe-let-7a-5p	GBJA01002609	hypothetical protein CLF_101011 [Clonorchis sinensis]			

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			GO	KEGG
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO		
ofe-let-7a-5p	GBJA01008578	protein lozenge [Clonorchis sinensis]	Protein lozenge OS=Drosophila melanogaster GN=lz PE=2 SV=2	GO:0003700, GO:0006355, GO:0005634, GO:0005524, GO:0003677	K09280	
ofe-let-7a-5p	GBJA01009727	DNA polymerase alpha subunit A [Clonorchis sinensis]	DNA polymerase alpha catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=POLA1 PE=1 SV=2	GO:0006139, GO:0000166, GO:0003887, GO:0006260, GO:0003676, GO:0003677, GO:0001882	K02320	
ofe-let-7a-5p	GBJA01011148	hypothetical protein T265_04273 [Opisthorchis viverrini]gb KER28975.1 hypothetical protein T265_04273 [Opisthorchis viverrini]	Protein piccolo (Fragment) OS=Gallus gallus GN=PCLO PE=2 SV=1	GO:0005515	K16882	
ofe-let-7b-5p	GBJA01009875	7 8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase [Clonorchis sinensis]	7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase OS=Homo sapiens GN=NUDT1 PE=1 SV=3	GO:0016787, GO:0008413, GO:0006281	K03574	
ofe-let-7b-5p	GBJA01010976	tyrosinase [Clonorchis sinensis]gb AGG11800.1 tyrosinase [Clonorchis sinensis]	Tyrosinase OS=Pelophylax nigromaculatus GN=TYR PE=2 SV=1	GO:0008152, GO:0016491	K00505	
ofe-let-7b-5p	GBJA01006969	JNK-interacting protein 3 [Clonorchis sinensis]	JNK-interacting protein OS=Caenorhabditis elegans GN=unc-16 PE=1 SV=3		K04436	
ofe-let-7b-5p	GBJA01001842	39S ribosomal protein L46 mitochondrial [Clonorchis sinensis]	39S ribosomal protein L46, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPL46 PE=1 SV=1		K17427	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-let-7b-5p	GBJA01004908	hypothetical protein CLF_100431 [Clonorchis sinensis]			
ofe-let-7b-5p	GBJA01012437	WD repeat-containing protein 20, partial [Clonorchis sinensis]	WD repeat-containing protein 20 OS=Homo sapiens GN=WDR20 PE=1 SV=2	GO:0005515	
ofe-let-7c-5p	GBJA01009717	hypothetical protein T265_06439 [Opisthorchis viverrini]gb[KER26241.1] hypothetical protein T265_06439 [Opisthorchis viverrini]			
ofe-let-7c-5p	GBJA01011910	AP-2 complex subunit alpha, partial [Clonorchis sinensis]	AP-2 complex subunit alpha-2 OS=Rattus norvegicus GN=Ap2a2 PE=1 SV=3	GO:0030131, GO:0006886, GO:0030117, GO:0016192, GO:0005488	K11824
ofe-miR-10-5p	GBJA01011483	poly(U)-binding-splicing factor PUF60 [Clonorchis sinensis]	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 OS=Bos taurus GN=PUF60 PE=2 SV=1	GO:0003676, GO:0000166	K12838
ofe-miR-125a-5p	GBJA01005241	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase [Clonorchis sinensis]	Probable delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase OS=Caenorhabditis elegans GN=alh-13 PE=2 SV=1	GO:0005737, GO:0004349, GO:0006561, GO:0016620, GO:0004350, GO:0008152, GO:0055114, GO:0016491	K12657
ofe-miR-125a-5p	GBJA01000227	vacuolar protein sorting-associated protein 13D, partial [Clonorchis sinensis]	Vacuolar protein sorting-associated protein 13D OS=Homo sapiens GN=VPS13D PE=1 SV=1		

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-125c-5p	GBJA01005241	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase [Clonorchis sinensis]	Probable delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase OS=Caenorhabditis elegans GN=alh-13 PE=2 SV=1	GO:0005737, GO:0004349, GO:0006561, GO:0016620, GO:0004350, GO:0008152, GO:0055114, GO:0016491	K12657
ofe-miR-125c-5p	GBJA01010255	cysteine and glycine-rich protein, partial [Clonorchis sinensis]	Cysteine and glycine-rich protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Csrp1 PE=2 SV=2	GO:0008270	K09377
ofe-miR-125c-5p	GBJA01000227	vacuolar protein sorting-associated protein 13D, partial [Clonorchis sinensis]	Vacuolar protein sorting-associated protein 13D OS=Homo sapiens GN=VPS13D PE=1 SV=1		
ofe-miR-993-3p	GBJA01012173	hypothetical protein T265_04487 [Opisthorchis viverrini]gb KER28799.1 hypothetical protein T265_04487 [Opisthorchis viverrini]		GO:0006368, GO:0008023	
ofe-miR-993-3p	GBJA01002982	hypothetical protein T265_02977 [Opisthorchis viverrini]gb KER30625.1 hypothetical protein T265_02977 [Opisthorchis viverrini]	GPI transamidase component PIG-T OS=Mus musculus GN=Pigt PE=1 SV=2	GO:0042765, GO:0016255	K05292
ofe-miR-993-3p	GBJA01008906	dihydropteridine reductase [Clonorchis sinensis]	Dihydropteridine reductase OS=Bos taurus GN=QDPR PE=2 SV=1	GO:0008152, GO:0016491	K00357
ofe-miR-124-3p	GBJA01010633	polyprotein [Clonorchis sinensis]			

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-993-3p	GBJA01003639	hypothetical protein T265_09820 [Opisthorchis viverrini]gb[KER21990.1] hypothetical protein T265_09820 [Opisthorchis viverrini]	Ero1-like protein OS=Drosophila melanogaster GN=Ero1L PE=2 SV=2	GO:0016671, GO:0003756, GO:0055114, GO:0005783	K10950
ofe-miR-755-3p	GBJA01006590	hypothetical protein T265_03139 [Opisthorchis viverrini]gb[KER30404.1] hypothetical protein T265_03139 [Opisthorchis viverrini]	Mitochondrial inner membrane protease subunit 1 OS=Homo sapiens GN=IMMP1L PE=2 SV=1	GO:0042720, GO:0006627, GO:0016020, GO:0006508, GO:0008233, GO:0008236	K09647
ofe-miR-124-3p	GBJA01011240	hypothetical protein T265_02505 [Opisthorchis viverrini]gb[KER31179.1] hypothetical protein T265_02505 [Opisthorchis viverrini]	Fructose-2,6-bisphosphatase TIGAR OS=Bos taurus GN=TIGAR PE=2 SV=1	GO:0003824, GO:0008152	K14634
ofe-miR-124-3p	GBJA01009530	ATP-dependent RNA helicase DDX47/RRP3 [Clonorchis sinensis]	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47 OS=Bos taurus GN=DDX47 PE=2 SV=1	GO:0005524, GO:0003676, GO:0004386	K14777
ofe-miR-124-3p	GBJA01008805	hypothetical protein T265_01220 [Opisthorchis viverrini]gb[KER32730.1] hypothetical protein T265_01220 [Opisthorchis viverrini]	Growth hormone-regulated TBC protein 1 OS=Homo sapiens GN=GRTP1 PE=1 SV=4	GO:0032313, GO:0005097	
ofe-miR-124-3p	GBJA01011014	putative ift20 [Schistosoma mansoni]	Intraflagellar transport protein 20 homolog OS=Danio rerio GN=ift20 PE=2 SV=1		K16473
ofe-miR-124-3p	GBJA01006055	actin-interacting protein 1 [Clonorchis sinensis]	Actin-interacting protein 1 OS=Drosophila melanogaster GN=flr PE=2 SV=1	GO:0005515	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-124-3p	GBJA01000778	PREDICTED: ras-related protein Rab-28-like [Strongylocentrotus purpuratus]	Ras-related protein Rab-28 OS=Homo sapiens GN=RAB28 PE=1 SV=2	GO:0006886, GO:0016020, GO:0003924, GO:0006913, GO:0005622, GO:0007165, GO:0015031, GO:0006184, GO:0007264, GO:0005525	K07915
ofe-miR-124-3p	GBJA01007877	5'-methylthioadenosine phosphorylase [Clonorchis sinensis]	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase OS=Anopheles gambiae GN=AGAP005129 PE=3 SV=4	GO:0017061, GO:0009116, GO:0016763, GO:0004645, GO:0003824	K00772
ofe-miR-124-3p	GBJA01000609	hypothetical protein T265_08114 [Opisthorchis viverrini]gb[KER24179.1]hypothetical protein T265_08114 [Opisthorchis viverrini]	3-hydroxypropionyl-coenzyme A dehydratase OS=Metallosphaera sedula (strain ATCC 51363 / DSM 5348) GN=Msed_2001 PE=1 SV=1	GO:0003824, GO:0008152	K01692
ofe-miR-124-3p	GBJA01000016				
ofe-miR-124-3p	GBJA01009027	protein transport protein SEC24 [Clonorchis sinensis]	Protein transport protein Sec24C OS=Homo sapiens GN=SEC24C PE=1 SV=3	GO:0006886, GO:0006888, GO:0030127, GO:0008270	K14007
ofe-miR-124-3p	GBJA01010257	hypothetical protein T265_04656 [Opisthorchis viverrini]gb[KER28517.1]hypothetical protein T265_04656 [Opisthorchis viverrini]			

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-124-3p	GBJA01001708	hypothetical protein T265_14181, partial [Opisthorchis viverrini]gb[KER25615.1] hypothetical protein T265_14181, partial [Opisthorchis viverrini]	Transmembrane protein 8A OS=Mus musculus GN=Tmem8a PE=2 SV=1		
ofe-miR-124-3p	GBJA01000386	calcium-dependent secretion activator 1 [Clonorchis sinensis]	Calcium-dependent secretion activator 1 OS=Xenopus laevis GN=cadps PE=2 SV=1	GO:0005515	
ofe-miR-133-3p	GBJA01002586	anaphase-promoting complex subunit 4, partial [Clonorchis sinensis]	Anaphase-promoting complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=ANAPC4 PE=1 SV=2	GO:0005515, GO:0030071, GO:0031145, GO:0005680	K03351
ofe-miR-184-3p	GBJA01006871				
ofe-miR-184-3p	GBJA01006564	autophagy protein 5 [Clonorchis sinensis]	Autophagy protein 5 OS=Pongo abelii GN=ATG5 PE=2 SV=1	GO:0005737, GO:0006914	K08339
ofe-miR-184-3p	GBJA01011693	BET1 homolog [Clonorchis sinensis]	BET1 homolog OS=Mus musculus GN=Bet1 PE=2 SV=1	GO:0005515	K08504
ofe-miR-184-3p	GBJA01004497	LOW QUALITY PROTEIN: hypothetical protein T265_14157 [Opisthorchis viverrini]gb[KER25693.1] LOW QUALITY PROTEIN: hypothetical protein T265_14157 [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-184-3p	GBJA01011143	hypothetical protein T265_13360 [Opisthorchis viverrini]gb[KER29435.1] hypothetical protein T265_13360 [Opisthorchis viverrini]	Exosome complex component MTR3 OS=Danio rerio GN=exosc6 PE=2 SV=2		K12587

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-184-3p	GBJA01003911	hypothetical protein T265_11475 [Opisthorchis viverrini]gb KER19845.1 hypothetical protein T265_11475 [Opisthorchis viverrini]	Dynamitin-1-like protein OS=Danio rerio GN=dnm1l PE=2 SV=1	GO:0003924, GO:0005525	K17065
ofe-miR-184-3p	GBJA01003945	hypothetical protein T265_07505 [Opisthorchis viverrini]gb KER24941.1 hypothetical protein T265_07505 [Opisthorchis viverrini]	Ribonuclease H2 subunit B OS=Xenopus tropicalis GN=maseh2b PE=2 SV=1	GO:0005634	K10744
ofe-miR-184-3p	GBJA01003724	hypothetical protein T265_00188 [Opisthorchis viverrini]gb KER33983.1 hypothetical protein T265_00188 [Opisthorchis viverrini]	Abhydrolase domain-containing protein FAM108C1 OS=Danio rerio GN=fam108c1 PE=2 SV=1		
ofe-miR-184-3p	GBJA01006179	hypothetical protein T265_14755, partial [Opisthorchis viverrini]gb KER22922.1 hypothetical protein T265_14755, partial [Opisthorchis viverrini]	TBC1 domain family member 24 OS=Xenopus laevis GN=tbc1d24 PE=2 SV=1	GO:0032313, GO:0005097	
ofe-miR-184-3p	GBJA01000499	propionyl-CoA carboxylase alpha chain mitochondrial [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-184-3p	GBJA01002047	hypothetical protein T265_06991 [Opisthorchis viverrini]gb KER25589.1 hypothetical protein T265_06991 [Opisthorchis viverrini]	tRNA (cytosine(38)-C(5))- methyltransferase OS=Mus musculus GN=Trdmt1 PE=2 SV=2	GO:0008168, GO:0006306, GO:0008146, GO:0003677	K15336
ofe-miR-184-3p	GBJA01002111	PREDICTED: galectin-2 isoform X3 [Cricetulus griseus]ref XP_007622825.1 PREDICTED: galectin-2 isoform X3 [Cricetulus griseus]	Galectin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Lgals2 PE=2 SV=1	GO:0030246	K10090

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-184-3p	GBJA01001078	hypothetical protein CLF_105727 [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-190a-5p	GBJA01008602				
ofe-miR-190a-5p	GBJA01008253	THO complex subunit 3 [Clonorchis sinensis]	THO complex subunit 3 OS=Bos taurus GN=THOC3 PE=2 SV=1		
ofe-miR-190a-5p	GBJA01011699	hypothetical protein CLF_104564 [Clonorchis sinensis]		GO:0005515	K12880
ofe-miR-190a-5p	GBJA01001855	hypothetical protein T265_13152, partial [Opisthorchis viverrini]gb[KER30545.1] hypothetical protein T265_13152, partial [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-190a-5p	GBJA01006650	ELAV-like protein 2 [Clonorchis sinensis]	ELAV-like protein 2 OS=Pongo abelii GN=ELAVL2 PE=2 SV=1	GO:0003723, GO:0003676, GO:0000166	K13208
ofe-miR-190a-5p	GBJA01001578	hypothetical protein CLF_111034 [Clonorchis sinensis]		GO:0005515	
ofe-miR-190a-5p	GBJA01011253	calsyntenin-1 [Clonorchis sinensis]	Calsyntenin-2 OS=Homo sapiens GN=CLSTN2 PE=1 SV=2	GO:0016020, GO:0007156, GO:0005509	
ofe-miR-1989-5p	GBJA01004069				
ofe-miR-1989-5p	GBJA01011746	hypothetical protein T265_13238 [Opisthorchis viverrini]gb[KER30141.1] hypothetical protein T265_13238 [Opisthorchis viverrini]	DTW domain-containing protein 2 OS=Macaca fascicularis GN=DTWD2 PE=2 SV=1		

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-1989-5p	GBJA01008381	hypothetical protein T265_03123 [Opisthorchis viverrini]gb KER30515.1 hypothetical protein T265_03123 [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-1989-5p	GBJA01003707	hypothetical protein T265_03069 [Opisthorchis viverrini]gb KER30454.1 hypothetical protein T265_03069 [Opisthorchis viverrini]	Bone morphogenetic protein 1 OS=Homo sapiens GN=BMP1 PE=1 SV=2	GO:0005515	
ofe-miR-1992-3p	GBJA01002835	protein FAM154A [Clonorchis sinensis]	Protein FAM154A OS=Rattus norvegicus GN=Fam154a PE=2 SV=1		
ofe-miR-1992-3p	GBJA01001321	hypothetical protein CLF_101351 [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-1992-3p	GBJA01012378	retrovirus-related Pol polyprotein from type-1 retrotransposable element R2, partial [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-1992-3p	GBJA01011594				
ofe-miR-1992-3p	GBJA01009881	transcription initiation factor TFIID subunit 13, partial [Clonorchis sinensis]	Transcription initiation factor TFIID subunit 13 OS=Pongo abelii GN=TAF13 PE=2 SV=1	GO:0046982, GO:0006366	K08829
ofe-miR-1992-3p	GBJA01011886	hypothetical protein T265_11016 [Opisthorchis viverrini]gb KER20434.1 hypothetical protein T265_11016 [Opisthorchis viverrini]	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Homo sapiens GN=CAND1 PE=1 SV=2	GO:0005488	K17263
ofe-miR-1992-3p	GBJA01005528				

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-1a-3p	GBJA01008530				
ofe-miR-1a-3p	GBJA01007638	prefoldin subunit 5 [Clonorchis sinensis]	Prefoldin subunit 5 OS=Bos taurus GN=PF0DN5 PE=2 SV=1	GO:0016272, GO:0006457, GO:0051082	K04797
ofe-miR-1a-3p	GBJA01010701	hypothetical protein T265_05258 [Opisthorchis viverrini]gb[KER27769.1] hypothetical protein T265_05258 [Opisthorchis viverrini]	WD repeat-containing protein 46 OS=Homo sapiens GN=WDR46 PE=1 SV=3	GO:0005515	K14768
ofe-miR-1a-3p	GBJA01010051	intraflagellar transport protein 140 homolog [Clonorchis sinensis]	Intraflagellar transport protein 140 homolog OS=Homo sapiens GN=IFT140 PE=1 SV=1	GO:0051603, GO:0004175, GO:0005839, GO:0019773, GO:0004298, GO:0006511, GO:0005515	
ofe-miR-1a-3p	GBJA01007625	succinyl-CoA synthetase beta subunit [Clonorchis sinensis]	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial (Fragment) OS=Sus scrofa GN=SUCLG2 PE=1 SV=2	GO:0003824, GO:0008152, GO:0005524	K01900
ofe-miR-1a-3p	GBJA01000153	hypothetical protein T265_04177 [Opisthorchis viverrini]gb[KER29082.1] hypothetical protein T265_04177 [Opisthorchis viverrini]	WD repeat-containing protein WRAP73 OS=Homo sapiens GN=WRAP73 PE=2 SV=1	GO:0005515	
ofe-miR-1a-3p	GBJA01004682				
ofe-miR-1a-3p	GBJA01009630	SJCHGC09541 protein [Schistosoma japonicum]			K16172

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-1a-3p	GBJA01002281	DNA polymerase epsilon subunit 1 [Clonorchis sinensis]	Zinc transporter ZIP11 OS=Rattus norvegicus GN=Slc39a11 PE=2 SV=1	GO:0046873, GO:0016020, GO:0030001, GO:0055085	K02324
ofe-miR-1a-3p	GBJA01001667	synaptogyrin-2 [Clonorchis sinensis]	Synaptogyrin-2 OS=Bos taurus GN=SYNGR2 PE=2 SV=1	GO:0016020	
ofe-miR-1a-3p	GBJA01006236	hypothetical protein CLF_100215 [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-1a-3p	GBJA01002039	hypothetical protein T265_10567 [Opisthorchis viverrini]gb[KER21016.1]hypothetical protein T265_10567 [Opisthorchis viverrini]	Zinc finger protein 594 OS=Homo sapiens GN=ZNF594 PE=2 SV=3	GO:0046872, GO:0003676	K09228
ofe-miR-1a-3p	GBJA01006405	transmembrane protein 56 [Clonorchis sinensis]	Transmembrane protein 56 OS=Mus musculus GN=Tmem56 PE=2 SV=1	GO:0016021	
ofe-miR-1a-3p	GBJA01003991	glutamate receptor ionotropic kainate 3, partial [Clonorchis sinensis]	Glutamate receptor, ionotropic kainate 4 OS=Mus musculus GN=Grik4 PE=2 SV=2	GO:0006810, GO:0005215, GO:0005216, GO:0016020, GO:0005234, GO:0004872, GO:0006811, GO:0004970	K05202
ofe-miR-1a-3p	GBJA01005935	kaptin [Clonorchis sinensis]	Kaptin OS=Mus musculus GN=Kptn PE=2 SV=1		
ofe-miR-1a-3p	GBJA01010671	synergina gamma [Clonorchis sinensis]	Synergina gamma OS=Homo sapiens GN=SYNRRG PE=1 SV=2	GO:0005509, GO:0005515	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-1a-3p	GBJA01010671	synergina gamma [Clonorchis sinensis]	Synergina gamma OS=Homo sapiens GN=SYNRG PE=1 SV=2	GO:0005509, GO:0005515	
ofe-miR-1a-3p	GBJA01008762	pollen-specific protein SF3 [Clonorchis sinensis]	Pollen-specific protein SF3 OS=Helianthus annuus GN=SF3 PE=2 SV=1	GO:0008270	
ofe-miR-1a-3p	GBJA01004539	hypothetical protein T265_05200 [Opisthorchis viverrini]gb[KER27844.1] hypothetical protein T265_05200 [Opisthorchis viverrini]	Testis-expressed sequence 9 protein OS=Mus musculus GN=Tex9 PE=2 SV=1		
ofe-miR-1a-3p	GBJA01010308	hypothetical protein T265_09621 [Opisthorchis viverrini]gb[KER22259.1] hypothetical protein T265_09621 [Opisthorchis viverrini]	Leucine-rich repeat-containing protein 40 OS=Xenopus tropicalis GN=lrrc40 PE=2 SV=1	GO:0005515	
ofe-miR-1a-3p	GBJA01005527	dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2 [Clonorchis sinensis]	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2 OS=Homo sapiens GN=DYRK2 PE=1 SV=3	GO:0004674, GO:0006468, GO:0016772, GO:0005524, GO:0004672	K08825
ofe-miR-1a-3p	GBJA01001132	hypothetical protein T265_13637 [Opisthorchis viverrini]gb[KER28187.1] hypothetical protein T265_13637 [Opisthorchis viverrini]	UPF0468 protein C16orf80 homolog OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_34o2 PE=2 SV=1		
ofe-miR-1a-3p	GBJA01003209	inactive rhomboid protein 2 [Clonorchis sinensis]	Inactive rhomboid protein 1 OS=Danio rerio GN=rhbf1 PE=2 SV=1	GO:0004252, GO:0016021, GO:0006508	
ofe-miR-1a-3p	GBJA01010667	hypothetical protein CLF_111252 [Clonorchis sinensis]			

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-1a-3p	GBJA01002620	glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-2, partial [Clonorchis sinensis]	Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-2 OS=Mus musculus GN=Grin2b PE=1 SV=3	GO:0006810, GO:0005215, GO:0006811, GO:0016020, GO:0005234, GO:0004872, GO:0005216, GO:0004970	K05210
ofe-miR-1a-3p	GBJA01008262	serine incorporator 1 [Clonorchis sinensis]	Serine incorporator 3 OS=Pongo abelii GN=SERINC3 PE=2 SV=1	GO:0016020	
ofe-miR-1a-3p	GBJA01009066				
ofe-miR-1a-3p	GBJA01004215	UPF0428 protein CXorf56 homolog [Clonorchis sinensis]	UPF0428 protein CXorf56 homolog OS=Bos taurus PE=2 SV=1		
ofe-miR-1b-3p	GBJA01001531	retinol dehydrogenase 12 [Clonorchis sinensis]	Retinol dehydrogenase 12 OS=Bos taurus GN=RDH12 PE=2 SV=1	GO:0008152, GO:0016491	
ofe-miR-1b-3p	GBJA01004257	cell cycle related kinase, partial [Clonorchis sinensis]	Cyclin-dependent kinase 20 OS=Danio rerio GN=cdk20 PE=2 SV=1	GO:0016772, GO:0006468, GO:0004674, GO:0005524, GO:0004672	K08817
ofe-miR-1b-3p	GBJA01009829				
ofe-miR-210-3p	GBJA01010284	myoglobin [Clonorchis sinensis]	Globin-3 OS=Paramphistomum epiclitum PE=1 SV=2	GO:0005506, GO:0019825, GO:0020037, GO:0015671	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-210-3p	GBJA01008819	acetyl-CoA C-acetyltransferase [Clonorchis sinensis]	Acetyl-CoA acetyltransferase A, mitochondrial OS=Xenopus laevis GN=acat1-a PE=2 SV=1	GO:0003824, GO:0016747, GO:0008152	K00626
ofe-miR-210-3p	GBJA01001922	acylaminoacyl-peptidase [Clonorchis sinensis]	X-ray repair cross-complementing protein 5 OS=Gallus gallus GN=XRCC6 PE=2 SV=1	GO:0000723, GO:0043564, GO:0006303, GO:0042162, GO:0005634, GO:0004003, GO:0003676, GO:0003677, GO:0003684	K01303
ofe-miR-210-3p	GBJA01004003				
ofe-miR-210-3p	GBJA01011184	brain-specific homeobox protein homolog [Clonorchis sinensis]	Brain-specific homeobox protein homolog OS=Gallus gallus GN=BSX PE=2 SV=1	GO:0003700, GO:0006355, GO:0005634, GO:0003677, GO:0043565	
ofe-miR-210-3p	GBJA01001874	kinesin-2 [Clonorchis sinensis]	Probable 125 kDa kinesin-related protein OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g36200 PE=2 SV=2	GO:0005871, GO:0008017, GO:0007018, GO:0005524, GO:0003777	K10405
ofe-miR-210-3p	GBJA01001432				
ofe-miR-210-3p	GBJA01002580	sorting nexin-14 [Clonorchis sinensis]	Sorting nexin-14 OS=Mus musculus GN=Snx14 PE=2 SV=1	GO:0035091	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-2160a-5p	GBJA01004086				
ofe-miR-2160a-5p	GBJA01012027	probable ATP-dependent RNA helicase DHX35 [Clonorchis sinensis]	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX35 OS=Homo sapiens GN=DHX35 PE=1 SV=2	GO:0005524, GO:0003676, GO:0004386	K13117
ofe-miR-2160a-5p	GBJA01001846	ankyrin repeat domain-containing protein 17, partial [Clonorchis sinensis]	Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=ANKHD1 PE=1 SV=1	GO:0003723, GO:0005515	K16726
ofe-miR-2160a-5p	GBJA01002479	beta-1 4-mannosyltransferase [Clonorchis sinensis]	Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase OS=Homo sapiens GN=ALG1 PE=1 SV=2	GO:0016757	K03842
ofe-miR-2160a-5p	GBJA01005799	hypothetical protein T265_07590 [Opisthorchis viverrini]gb[KER24862.1]hypothetical protein T265_07590 [Opisthorchis viverrini]	COP9 signalosome complex subunit 7b OS=Mus musculus GN=Cops7b PE=1 SV=1	GO:0005515	K12180
ofe-miR-2160a-5p	GBJA01012522	hypothetical protein T265_08791 [Opisthorchis viverrini]gb[KER23306.1]hypothetical protein T265_08791 [Opisthorchis viverrini]	Uncharacterized protein K02A2.6 OS=Caenorhabditis elegans GN=K02A2.6 PE=2 SV=1	GO:0006508, GO:0004190	
ofe-miR-2160a-5p	GBJA01003592	hypothetical protein T265_04431 [Opisthorchis viverrini]gb[KER28824.1]hypothetical protein T265_04431 [Opisthorchis viverrini]	Protein CLEC16A OS=Homo sapiens GN=CLEC16A PE=2 SV=2		
ofe-miR-2160b-5p	GBJA01010536	5-hydroxytryptamine receptor 7 [Clonorchis sinensis]	5-hydroxytryptamine receptor 1A OS=Rattus norvegicus GN=Htr1a PE=2 SV=1	GO:0016021, GO:0007186, GO:0004930	K04163

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-2160b-5p	GBJA01002436	tyrosine-protein kinase Fyn [Clonorchis sinensis]	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yrk OS=Gallus gallus GN=YRK PE=2 SV=2	GO:0006468, GO:0016772, GO:0004713, GO:0005515, GO:0004672, GO:0005524	K05703
ofe-miR-2160b-5p	GBJA01005013	hypothetical protein CLF_111075 [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-2160b-5p	GBJA01003592	hypothetical protein T265_04431 [Opisthorchis viverrini]gb[KER28824.1]hypothetical protein T265_04431 [Opisthorchis viverrini]	Protein CLEC16A OS=Homo sapiens GN=CLEC16A PE=2 SV=2		
ofe-miR-2160b-5p	GBJA01010474	hypothetical protein T265_15143 [Opisthorchis viverrini]gb[KER21259.1]hypothetical protein T265_15143 [Opisthorchis viverrini]	Protein FAM188A OS=Macaca fascicularis GN=FAM188A PE=2 SV=1	GO:0005509	
ofe-miR-745-3p	GBJA01002974	hypothetical protein T265_11810 [Opisthorchis viverrini]gb[KER19409.1]hypothetical protein T265_11810 [Opisthorchis viverrini]	Myosin regulatory light chain sqh OS=Drosophila melanogaster GN=sqh PE=1 SV=1	GO:0005509	K12757
ofe-miR-745-3p	GBJA01002264	hypothetical protein T265_15265, partial [Opisthorchis viverrini]gb[KER20643.1]hypothetical protein T265_15265, partial [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-745-3p	GBJA01010209	zinc finger protein 407 [Clonorchis sinensis]	Zinc finger protein 407 OS=Homo sapiens GN=ZNF407 PE=2 SV=2	GO:0046872, GO:0003676	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-745-3p	GBJA01011140	zinc transporter ZIP9-B [Clonorchis sinensis]	Zinc transporter ZIP9 OS=Rattus norvegicus GN=Slc39a9 PE=2 SV=1	GO:0046873, GO:0016020, GO:0030001, GO:0055085	K14715
ofe-miR-745-3p	GBJA01006651	hypothetical protein T265_00587 [Opisthorchis viverrini]gb[KER33470.1] hypothetical protein T265_00587 [Opisthorchis viverrini]	Max dimerization protein 3 OS=Danio rerio GN=mx3d3 PE=2 SV=1	GO:0046983	K09114
ofe-miR-745-3p	GBJA01001573	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase [Clonorchis sinensis]	Putative N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase OS=Homo sapiens GN=AMDHD2 PE=2 SV=2	GO:0016810	K01443
ofe-miR-745-3p	GBJA01003634	hypothetical protein T265_07808 [Opisthorchis viverrini]gb[KER24538.1] hypothetical protein T265_07808 [Opisthorchis viverrini]	UPF0586 protein C9orf41 OS=Homo sapiens GN=C9orf41 PE=1 SV=1		
ofe-miR-745-3p	GBJA01004958	LOW QUALITY PROTEIN: hypothetical protein T265_12920, partial [Opisthorchis viverrini]gb[KER31712.1] LOW QUALITY PROTEIN: hypothetical protein T265_12920, partial [Opisthorchis viverrini]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Oryctolagus cuniculus GN=HNRNPK PE=2 SV=1	GO:0003723	K12886
ofe-miR-745-3p	GBJA01004345	glycosyltransferase-like protein LARGE [Clonorchis sinensis]	Glycosyltransferase-like protein LARGE2 OS=Mus musculus GN=Gylt1b PE=2 SV=1	GO:0016757	K09668
ofe-miR-745-3p	GBJA01010790	hypothetical protein T265_00511 [Opisthorchis viverrini]gb[KER33620.1] hypothetical protein T265_00511 [Opisthorchis viverrini]	LIM/homeobox protein Lhx4 OS=Mus musculus GN=Lhx4 PE=1 SV=4	GO:0008270	K09374

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-745-3p	GBJA01011998	hypothetical protein CLF_112698 [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-745-3p	GBJA01004935	ATPase family AAA domain-containing protein 2 [Clonorchis sinensis]	ATPase family AAA domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GN=Atad2 PE=1 SV=1	GO:0005524, GO:0017111, GO:0005515, GO:0000166	
ofe-miR-745-3p	GBJA01009516	hypothetical protein T265_05735 [Opisthorchis viverrini]gb[KER27203.1] hypothetical protein T265_05735 [Opisthorchis viverrini]	FMRamide-activated amiloride-sensitive sodium channel OS=Helix aspersa PE=2 SV=1	GO:0016020, GO:0005272, GO:0006814	
ofe-miR-745-3p	GBJA01009029				
ofe-miR-745-3p	GBJA01009268	hypothetical protein T265_10344 [Opisthorchis viverrini]gb[KER21302.1] hypothetical protein T265_10344 [Opisthorchis viverrini]	Histone-lysine N-methyltransferase SETD2 OS=Homo sapiens GN=SETD2 PE=1 SV=3	GO:0006355, GO:0034968, GO:0005694, GO:0005515, GO:0018024	K11423
ofe-miR-745-3p	GBJA01002417	hypothetical protein T265_07109 [Opisthorchis viverrini]gb[KER25427.1] hypothetical protein T265_07109 [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-745-3p	GBJA01008107				
ofe-miR-277a-3p	GBJA01007838	hypothetical protein T265_10726 [Opisthorchis viverrini]gb[KER20809.1] hypothetical protein T265_10726 [Opisthorchis viverrini]	High mobility group protein DSP1 OS=Drosophila melanogaster GN=Dsp1 PE=2 SV=1		K10802

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-277a-3p	GBJA01008623	hypothetical protein T265_10364 [Opisthorchis viverrini]gb KER21285.1 hypothetical protein T265_10364 [Opisthorchis viverrini]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens GN=HNRNPH1 PE=1 SV=4	GO:0003676, GO:0000166	K12898
ofe-miR-277a-3p	GBJA01010559	hypothetical protein T265_06765 [Opisthorchis viverrini]gb KER25847.1 hypothetical protein T265_06765 [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-277a-3p	GBJA01006384	dual specificity protein phosphatase 15 [Clonorchis sinensis]	Dual specificity protein phosphatase 22 OS=Homo sapiens GN=DUSP22 PE=1 SV=1	GO:0006470, GO:0008138	K14819
ofe-miR-277a-3p	GBJA01004302	hypothetical protein T265_04941 [Opisthorchis viverrini]gb KER28185.1 hypothetical protein T265_04941 [Opisthorchis viverrini]	ERI1 exoribonuclease 3 OS=Bos taurus GN=ERI3 PE=2 SV=1	GO:0003676	
ofe-miR-61-3p	GBJA01011899	hypothetical protein T265_00750 [Opisthorchis viverrini]gb KER33446.1 hypothetical protein T265_00750 [Opisthorchis viverrini]	Phosphoglucomutase-2 OS=Homo sapiens GN=PGM2 PE=1 SV=4	GO:0000287, GO:0005975, GO:0016868	K15779
ofe-miR-61-3p	GBJA01005663	delta-like protein 4 [Clonorchis sinensis]	Delta-like protein 4 OS=Mus musculus GN=Dlil4 PE=2 SV=2	GO:0007154, GO:0016020, GO:0005515	K06051
ofe-miR-61-3p	GBJA01005008	hypothetical protein T265_05076 [Opisthorchis viverrini]gb KER28031.1 hypothetical protein T265_05076 [Opisthorchis viverrini]	Ribosome biogenesis protein WDR12 homolog OS=Drosophila grimshawi GN=GH13339 PE=3 SV=1	GO:0005515	K15456

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-281-3p	GBJA01006300	hypothetical protein T265_09665 [Opisthorchis viverrini]gb KER22181.1 hypothetical protein T265_09665 [Opisthorchis viverrini]	Ras-like protein family member 10B OS=Mus musculus GN=Ras 10b PE=1 SV=1	GO:0006184, GO:0016020, GO:0007165, GO:0007264, GO:0005525	K07851
ofe-miR-281-3p	GBJA01011740	hypothetical protein T265_13531, partial [Opisthorchis viverrini]gb KER28664.1 hypothetical protein T265_13531, partial [Opisthorchis viverrini]	Dystrobrevin beta OS=Homo sapiens GN=DTNB PE=1 SV=1	GO:0008270, GO:0005509	
ofe-miR-281-3p	GBJA01003806	polyprotein [Clonorchis sinensis]	Uncharacterized protein K02A2.6 OS=Caenorhabditis elegans GN=K02A2.6 PE=2 SV=1		
ofe-miR-2a-3p	GBJA01001901	hypothetical protein CLF_108299 [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-2a-3p	GBJA01010347	hypothetical protein T265_14803, partial [Opisthorchis viverrini]gb KER22643.1 hypothetical protein T265_14803, partial [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-2a-3p	GBJA01000815	hypothetical protein T265_06248 [Opisthorchis viverrini]gb KER26530.1 hypothetical protein T265_06248 [Opisthorchis viverrini]	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Xenopus laevis GN=ybx1 PE=2 SV=1	GO:0006355, GO:0003676, GO:0003677	K09276
ofe-miR-2a-3p	GBJA01011758	hypothetical protein T265_03550 [Opisthorchis viverrini]gb KER29962.1 hypothetical protein T265_03550 [Opisthorchis viverrini]	Deleted in autism protein 1 homolog OS=Xenopus tropicalis PE=2 SV=1		

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-2a-3p	GBJA01001526	trichoplein keratin filament-binding protein [Clonorchis sinensis]	Trichoplein keratin filament-binding protein OS=Danio rerio GN=tchp PE=2 SV=1		K16811
ofe-miR-2a-3p	GBJA01010713				
ofe-miR-2a-3p	GBJA01006012	hypothetical protein T265_09466 [Opisthorchis viverrini]gb[KER22452.1] hypothetical protein T265_09466 [Opisthorchis viverrini]	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class U protein OS=Cricetulus griseus GN=PIGU PE=1 SV=3	GO:0016021, GO:0006506, GO:0005789	K05293
ofe-miR-2a-3p	GBJA01010189	hypothetical protein T265_00516 [Opisthorchis viverrini]gb[KER33624.1] hypothetical protein T265_00516 [Opisthorchis viverrini]	UPF0046 protein K07C11.7 OS=Caenorhabditis elegans GN=K07C11.7 PE=1 SV=2		
ofe-miR-2a-3p	GBJA01006116	UPF0454 protein C12orf49 homolog, partial [Clonorchis sinensis]	UPF0454 protein C12orf49 homolog OS=Gallus gallus GN=RCJMB04_18o22 PE=2 SV=1		
ofe-miR-2a-3p	GBJA01010102	hypothetical protein T265_04696 [Opisthorchis viverrini]gb[KER28466.1] hypothetical protein T265_04696 [Opisthorchis viverrini]	Zinc finger C2HC domain-containing protein 1A OS=Danio rerio GN=zc2hc1a PE=2 SV=1		
ofe-miR-2a-3p	GBJA01002342	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain-containing protein 1 [Clonorchis sinensis]	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gdpd1 PE=2 SV=1	GO:0008081, GO:0006071, GO:0006629, GO:0008889	
ofe-miR-2a-3p	GBJA01005286	hypothetical protein T265_02002 [Opisthorchis viverrini]gb[KER31919.1] hypothetical protein T265_02002 [Opisthorchis viverrini]	UPF0577 protein KIAA1324-like homolog OS=Mus musculus PE=2 SV=1		

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-2a-3p	GBJA01002433	hypothetical protein T265_04290 [Opisthorchis viverrini]gb[KER28998.1] hypothetical protein T265_04290 [Opisthorchis viverrini]	Coiled-coil domain-containing protein 77 OS=Xenopus laevis GN=ccdc77 PE=2 SV=1		K16757
ofe-miR-2a-3p	GBJA01003644	hypothetical protein T265_14319, partial [Opisthorchis viverrini]gb[KER24873.1] hypothetical protein T265_14319, partial [Opisthorchis viverrini]	Cyclin-dependent kinase-like 2 OS=Pongo abelii GN=CDKL2 PE=2 SV=1	GO:0016772, GO:0006468, GO:0004674, GO:0005524,	K08824
ofe-miR-2a-3p	GBJA01000566	hypothetical protein T265_06192 [Opisthorchis viverrini]gb[KER26621.1] hypothetical protein T265_06192 [Opisthorchis viverrini]	LisH domain and HEAT repeat- containing protein KIAA1468 homolog OS=Danio rerio GN=zgc:66014 PE=2 SV=1	GO:0005488, GO:0005515	
ofe-miR-2b-3p	GBJA01004047				
ofe-miR-2b-3p	GBJA01000892				
ofe-miR-2b-3p	GBJA01000397	hypothetical protein T265_06435 [Opisthorchis viverrini]gb[KER26319.1] hypothetical protein T265_06435 [Opisthorchis viverrini]	WD repeat-containing protein 13 OS=Homo sapiens GN=WDR13 PE=1 SV=2	GO:0005515	
ofe-miR-2b-3p	GBJA01001426	SJCHGC04562 protein [Schistosoma japonicum]	Sjogren syndrome nuclear autoantigen 1 homolog OS=Mus musculus GN=Ssna1 PE=1 SV=1		K16780
ofe-miR-2b-3p	GBJA01009434				

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-2b-3p	GBJA01003524	hypothetical protein T265_07570 [Opisthorchis viverrini]gb KER24839.1 hypothetical protein T265_07570 [Opisthorchis viverrini]	Pre-mRNA-splicing regulator female-lethal(2)D OS=Drosophila pseudoobscura pseudoobscura GN=fl(2)d PE=3 SV=2		
ofe-miR-2b-3p	GBJA01006969	JNK-interacting protein 3 [Clonorchis sinensis]	JNK-interacting protein OS=Caenorhabditis elegans GN=unc-16 PE=1 SV=3		K04436
ofe-miR-2b-3p	GBJA01009549	potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4 [Clonorchis sinensis]	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 OS=Homo sapiens GN=HCN2 PE=1 SV=3	GO:0005216, GO:0016020, GO:0006811, GO:0055085	K04955
ofe-miR-2b-3p	GBJA01002096	NADPH-ferrihemoprotein reductase [Clonorchis sinensis]	NADPH--cytochrome P450 reductase OS=Drosophila melanogaster GN=Cpr PE=2 SV=2	GO:0005506, GO:0016491, GO:0055114, GO:0010181	K00327
ofe-miR-2b-3p	GBJA01010727	S phase cyclin A-associated protein in the endoplasmic reticulum [Clonorchis sinensis]	S phase cyclin A-associated protein in the endoplasmic reticulum OS=Homo sapiens GN=SCAPER PE=1 SV=1		
ofe-miR-2c-3p	GBJA01004047				
ofe-miR-2c-3p	GBJA01007262				
ofe-miR-2c-3p	GBJA01000397	hypothetical protein T265_06435 [Opisthorchis viverrini]gb KER26319.1 hypothetical protein T265_06435 [Opisthorchis viverrini]	WD repeat-containing protein 13 OS=Homo sapiens GN=WDR13 PE=1 SV=2	GO:0005515	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-2c-3p	GBJA01003923	cysteine protease 8 [Paragonimus westermani]	Cathepsin L OS=Schistosoma mansoni GN=CL1 PE=2 SV=1	GO:0006508, GO:0008234	K01373
ofe-miR-2c-3p	GBJA01000298	CCR4-NOT transcription complex subunit 1 [Clonorchis sinensis]	CCR4-NOT transcription complex subunit 1 OS=Homo sapiens GN=CNOT1 PE=1 SV=2	GO:0005488	K12604
ofe-miR-2c-3p	GBJA01001526	trichoplein keratin filament-binding protein [Clonorchis sinensis]	Trichoplein keratin filament-binding protein OS=Danio rerio GN=tchp PE=2 SV=1		K16811
ofe-miR-2c-3p	GBJA01009640	hypothetical protein T265_07175 [Opisthorchis viverrini]gb[KER25375.1] hypothetical protein T265_07175 [Opisthorchis viverrini]	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Drosophila melanogaster GN=ATPsyn-d PE=2 SV=2	GO:0000276, GO:0015078, GO:0015986	K02138
ofe-miR-2c-3p	GBJA01001736	hypothetical protein T265_01451 [Opisthorchis viverrini]gb[KER32581.1] hypothetical protein T265_01451 [Opisthorchis viverrini]	40S ribosomal protein S18 OS=Aequipecten irradians GN=RPS18 PE=2 SV=1	GO:0005840, GO:0005622, GO:0003735, GO:0003723, GO:0003676, GO:0006412	K02964
ofe-miR-2c-3p	GBJA01001736	hypothetical protein T265_01451 [Opisthorchis viverrini]gb[KER32581.1] hypothetical protein T265_01451 [Opisthorchis viverrini]	40S ribosomal protein S18 OS=Aequipecten irradians GN=RPS18 PE=2 SV=1	GO:0005840, GO:0005622, GO:0003735, GO:0003723, GO:0003676, GO:0006412	K02964
ofe-miR-2c-3p	GBJA01001786				

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-2c-3p	GBJA01008290	hypothetical protein T265_12760 [Opisthorchis viverrini]gb KER32799.1 hypothetical protein T265_12760 [Opisthorchis viverrini]	Probable malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial OS=Drosophila melanogaster GN=beg PE=2 SV=2	GO:0016740, GO:0008152	K00645
ofe-miR-2c-3p	GBJA01008303	hypothetical protein T265_08361 [Opisthorchis viverrini]gb KER23862.1 hypothetical protein T265_08361 [Opisthorchis viverrini]	Transmembrane protein 87A OS=Xenopus tropicalis GN=tmem87a PE=2 SV=1	GO:0016021	
ofe-miR-2c-3p	GBJA01006741	hypothetical protein T265_00844 [Opisthorchis viverrini]gb KER33141.1 hypothetical protein T265_00844 [Opisthorchis viverrini]		GO:0016021	
ofe-miR-2c-3p	GBJA01006456	hypothetical protein T265_05263 [Opisthorchis viverrini]gb KER27775.1 hypothetical protein T265_05263 [Opisthorchis viverrini]	Protein lin-54 homolog OS=Pongo abelii GN=LIN54 PE=2 SV=1		
ofe-miR-2c-3p	GBJA01001408	leucine-rich repeat protein soc-2 homolog [Clonorchis sinensis]	Leucine-rich repeat protein soc-2 OS=Caenorhabditis elegans GN=soc-2 PE=1 SV=3	GO:0000164, GO:0005515, GO:0046579	
ofe-miR-2c-3p	GBJA01012010	protein tyrosine phosphatase receptor type B [Clonorchis sinensis]	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase beta OS=Homo sapiens GN=PTPRB PE=1 SV=3	GO:0016311, GO:0006470, GO:0004725, GO:0016791, GO:0005515	K05694
ofe-miR-2d-3p	GBJA01007906	hypothetical protein T265_04263 [Opisthorchis viverrini]gb KER29079.1 hypothetical protein T265_04263 [Opisthorchis viverrini]			

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-2d-3p	GBJA01006591	hypothetical protein T265_14166, partial [Opisthorchis viverrini]gb[KER25669.1] hypothetical protein T265_14166, partial [Opisthorchis viverrini]	Stromal membrane-associated protein 2 OS=Gallus gallus GN=SMAP2 PE=2 SV=1	GO:0032312, GO:0008060, GO:0008270	K12486
ofe-miR-2d-3p	GBJA01012294	cystatin-1 [Clonorchis sinensis]	Cystatin-B OS=Bos taurus GN=CSTB PE=1 SV=1	GO:0004869, GO:0004866, GO:0005622	K13907
ofe-miR-2d-3p	GBJA01010239	adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate transporter 1 [Clonorchis sinensis]	Adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate transporter 1 OS=Homo sapiens GN=SLC35B2 PE=1 SV=1	GO:0055085	K15276
ofe-miR-2d-3p	GBJA01008290	hypothetical protein T265_12760 [Opisthorchis viverrini]gb[KER32799.1] hypothetical protein T265_12760 [Opisthorchis viverrini]	Probable malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial OS=Drosophila melanogaster GN=beg PE=2 SV=2	GO:0016740, GO:0008152	K00645
ofe-miR-2d-3p	GBJA01006741	hypothetical protein T265_00844 [Opisthorchis viverrini]gb[KER33141.1] hypothetical protein T265_00844 [Opisthorchis viverrini]		GO:0016021	
ofe-miR-2d-3p	GBJA01002379	hypothetical protein T265_05027 [Opisthorchis viverrini]gb[KER28043.1] hypothetical protein T265_05027 [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-2d-3p	GBJA01004727	hypothetical protein T265_05319 [Opisthorchis viverrini]gb[KER27690.1] hypothetical protein T265_05319 [Opisthorchis viverrini]	Delta-like protein 4 OS=Mus musculus GN=Dll4 PE=2 SV=2	GO:0005515	K02599
ofe-miR-2d-3p	GBJA01009546	protein FAM73B [Clonorchis sinensis]	Protein FAM73B OS=Mus musculus GN=Fam73b PE=1 SV=1		

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-2d-3p	GBJA01009549	potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4 [Clonorchis sinensis]	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 OS=Homo sapiens GN=HCN2 PE=1 SV=3	GO:0005216, GO:0016020, GO:0006811, GO:0055085	K04955
ofe-miR-2d-3p	GBJA01005585	hypothetical protein T265_13266, partial [Opisthorchis viverrini]gb KER29992.1 hypothetical protein T265_13266, partial [Opisthorchis viverrini]	Parafibromin OS=Mus musculus GN=Cdc73 PE=2 SV=1		K15175
ofe-miR-2d-3p	GBJA01001532	hypothetical protein T265_07542 [Opisthorchis viverrini]gb KER24920.1 hypothetical protein T265_07542 [Opisthorchis viverrini]	Serine/threonine-protein kinase PLK4 OS=Rattus norvegicus GN=Plk4 PE=2 SV=1	GO:0006468, GO:0016772, GO:0004713, GO:0005515, GO:0004672, GO:0005524	K08863
ofe-miR-2d-3p	GBJA01002330	hypothetical protein T265_00303 [Opisthorchis viverrini]gb KER33855.1 hypothetical protein T265_00303 [Opisthorchis viverrini]	GPI ethanolamine phosphate transferase 3 OS=Homo sapiens GN=PIGO PE=2 SV=3	GO:0003824, GO:0008152	K05288
ofe-miR-2d-3p	GBJA01001214	centromere protein J [Clonorchis sinensis]	Centromere protein J OS=Pan troglodytes GN=CENPJ PE=2 SV=1		K11502
ofe-miR-2d-3p	GBJA01010783	striated muscle preferentially expressed protein kinase [Clonorchis sinensis]	Striated muscle preferentially expressed protein kinase OS=Homo sapiens GN=SPEG PE=1 SV=4	GO:0016772, GO:0006468, GO:0005524, GO:0005515, GO:0004672	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-2e-3p	GBJA01007906	hypothetical protein T265_04263 [Opisthorchis viverrini]gb[KER29079.1] hypothetical protein T265_04263 [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-2e-3p	GBJA01010239	adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate transporter 1 [Clonorchis sinensis]	Adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate transporter 1 OS=Homo sapiens GN=SLC35B2 PE=1 SV=1	GO:0055085	K15276
ofe-miR-2e-3p	GBJA01004727	hypothetical protein T265_05319 [Opisthorchis viverrini]gb[KER27690.1] hypothetical protein T265_05319	Delta-like protein 4 OS=Mus musculus GN=Dll4 PE=2 SV=2	GO:0005515	K02599
ofe-miR-2f-3p	GBJA01004047				
ofe-miR-2f-3p	GBJA01001526	trichoplein keratin filament-binding protein [Clonorchis sinensis]	Trichoplein keratin filament-binding protein OS=Danio rerio GN=tchp PE=2 SV=1		K16811
ofe-miR-2f-3p	GBJA01006597	hypothetical protein T265_14214 [Opisthorchis viverrini]gb[KER25392.1] hypothetical protein T265_14214 [Opisthorchis viverrini]	Calpain OS=Schistosoma mansoni PE=2 SV=1	GO:0006508, GO:0004198, GO:0005509, GO:0005622	K08585
ofe-miR-2f-3p	GBJA01003527	phosphoinositol 4-phosphate adaptor protein [Clonorchis sinensis]	Pleckstrin homology domain-containing family A member 3 OS=Homo sapiens GN=PLEKHA3 PE=1 SV=2	GO:0005737, GO:0046836, GO:0017089, GO:0051861	K08051
ofe-miR-2f-3p	GBJA01002725	hypothetical protein T265_04518 [Opisthorchis viverrini]gb[KER28730.1] hypothetical protein T265_04518 [Opisthorchis viverrini]	Guanine nucleotide exchange factor DBS OS=Mus musculus GN=Mcf2l PE=1 SV=2	GO:0005089, GO:0035023	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-31-5p	GBJA01006396	hypothetical protein T265_01588 [Opisthorchis viverrini]gb KER32365.1 hypothetical protein T265_01588 [Opisthorchis viverrini]	Coiled-coil domain-containing protein 28B OS=Mus musculus GN=Ccdc28b PE=2 SV=3		
ofe-miR-31-5p	GBJA01006234	hypothetical protein T265_02903 [Opisthorchis viverrini]gb KER30759.1 hypothetical protein T265_02903 [Opisthorchis viverrini]	Synaptobrevin homolog YKT6 OS=Bos taurus GN=YKT6 PE=2 SV=1	GO:0016021, GO:0006810, GO:0016192	K08516
ofe-miR-31-5p	GBJA01003701	hypothetical protein T265_14112, partial [Opisthorchis viverrini]gb KER25935.1 hypothetical protein T265_14112, partial [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-31-5p	GBJA01001659				
ofe-miR-31-5p	GBJA01000071	Rac GTPase-activating protein 1 [Clonorchis sinensis]	Rac GTPase-activating protein 1 OS=Homo sapiens GN=RACGAP1 PE=1 SV=1	GO:0035556, GO:0007165, GO:0005622	K16733
ofe-miR-31-5p	GBJA01000514	hypothetical protein T265_09904 [Opisthorchis viverrini]gb KER21872.1 hypothetical protein T265_09904 [Opisthorchis viverrini]	Transforming protein Ski OS=Avian erythroblastosis virus (strain Sloan-Kettering) GN=V-SKI PE=3 SV=1	GO:0046332, GO:0005634	
ofe-miR-31-5p	GBJA01003554	complexin-1 [Clonorchis sinensis]	Complexin-1 OS=Hirudo medicinalis GN=cpx1 PE=2 SV=1	GO:0019905, GO:0006836	K15294
ofe-miR-31-5p	GBJA01006887	hypothetical protein T265_09709 [Opisthorchis viverrini]gb KER22111.1 hypothetical protein T265_09709 [Opisthorchis viverrini]	Early growth response protein 3 OS=Mus musculus GN=Egr3 PE=2 SV=2	GO:0046872, GO:0003676	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-36b-3p	GBJA01006564	autophagy protein 5 [Clonorchis sinensis]	Autophagy protein 5 OS=Pongo abelii GN=ATG5 PE=2 SV=1	GO:0005737, GO:0006914	K08339
ofe-miR-36b-3p	GBJA01011223				
ofe-miR-36b-3p	GBJA01002594				
ofe-miR-36b-3p	GBJA01011687	C-terminal pdz ligand of neuronal nitric oxide synthase protein [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-36b-3p	GBJA01005264	hypothetical protein T265_02377 [Opisthorchis viverrini]gb KER31319.1 hypothetical protein T265_02377 [Opisthorchis viverrini]			K16766
ofe-miR-36b-3p	GBJA01009516	hypothetical protein T265_05735 [Opisthorchis viverrini]gb KER27203.1 hypothetical protein T265_05735 [Opisthorchis viverrini]	FMRamide-activated amiloride-sensitive sodium channel OS=Helix aspersa PE=2 SV=1	GO:0016020, GO:0005272, GO:0006814	
ofe-miR-36b-3p	GBJA01009321	hypothetical protein T265_06918 [Opisthorchis viverrini]gb KER25685.1 hypothetical protein T265_06918 [Opisthorchis viverrini]	F-box/LRR-repeat protein 16 OS=Mus musculus GN=Fbx16 PE=2 SV=1	GO:0005515	K10282
ofe-miR-36b-3p	GBJA01000551	hypothetical protein T265_03812 [Opisthorchis viverrini]gb KER29613.1 hypothetical protein T265_03812 [Opisthorchis viverrini]		GO:0005158	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-36b-3p	GBJA01010292	hypothetical protein T265_06074 [Opisthorchis viverrini]gb[KER26707.1] hypothetical protein T265_06074 [Opisthorchis viverrini]	Chromosome-associated kinesin KIF4 OS=Xenopus laevis GN=kif4 PE=2 SV=1	GO:0005871, GO:0008017, GO:0007018, GO:0005524, GO:0003777	K10395
ofe-miR-307-3p	GBJA01011158	hypothetical protein T265_03569 [Opisthorchis viverrini]gb[KER29871.1] hypothetical protein T265_03569 [Opisthorchis viverrini]	Translation initiation factor eIF-2B subunit beta OS=Homo sapiens GN=EIF2B2 PE=1 SV=3	GO:0044237	K03754
ofe-miR-307-3p	GBJA01000157	hypothetical protein T265_09383 [Opisthorchis viverrini]gb[KER22553.1] hypothetical protein T265_09383 [Opisthorchis viverrini]	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog OS=Bos taurus GN=VTA1 PE=2 SV=1		K12199
ofe-miR-307-3p	GBJA01004627	galactokinase [Clonorchis sinensis]	N-acetylgalactosamine kinase OS=Rattus norvegicus GN=Galk2 PE=2 SV=1	GO:0005737, GO:0006012, GO:0016773, GO:0016301, GO:0046835, GO:0004335, GO:0008152, GO:0005524	K00849
ofe-miR-307-3p	GBJA01004241	hypothetical protein T265_00281 [Opisthorchis viverrini]gb[KER33824.1] hypothetical protein T265_00281 [Opisthorchis viverrini]	Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic OS=Mus musculus GN=Acss2 PE=1 SV=2	GO:0003824, GO:0008152	K01895
ofe-miR-307-3p	GBJA01008411	acetyl cholinesterase [Clonorchis sinensis]	Cholinesterase OS=Bos taurus GN=BCHE PE=2 SV=2	GO:0004104	K01050

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-71a-5p	GBJA01006562	fez family zinc finger protein 2 [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-71a-5p	GBJA01006633	G-protein coupled receptor fragment [Clonorchis sinensis]		GO:0016021, GO:0007186, GO:0004930	
ofe-miR-71a-5p	GBJA01003560	hypothetical protein T265_13417, partial [Opisthorchis viverrini]gb[KER29274.1] hypothetical protein T265_13417, partial [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-71a-5p	GBJA01010767	ribonuclease H2 subunit A [Clonorchis sinensis]	Ribonuclease H2 subunit A OS=Mus musculus GN=Rnaseh2a PE=1 SV=2	GO:0016070, GO:0003676, GO:0004523, GO:0003723	K10743
ofe-miR-71a-5p	GBJA01010039	hypothetical protein [Schistosoma japonicum]	Methylmalonic aciduria and homocystinuria type D homolog, mitochondrial OS=Gecko japonicus GN=GekBS024P PE=2 SV=1	GO:0009235, GO:0005739	K15265
ofe-miR-71a-5p	GBJA01006023	hypothetical protein T265_02080 [Opisthorchis viverrini]gb[KER31709.1] hypothetical protein T265_02080 [Opisthorchis viverrini]	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Dlat PE=1 SV=3	GO:0045254, GO:0004742, GO:0016746, GO:0006090, GO:0008152	K00627
ofe-miR-71a-5p	GBJA01011167	hypothetical protein T265_13482, partial [Opisthorchis viverrini]gb[KER28950.1] hypothetical protein T265_13482, partial [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-71a-5p	GBJA01007530	lysosomal protein NCU-G1-B [Clonorchis sinensis]	Lysosomal protein NCU-G1-A OS=Xenopus laevis PE=2 SV=2		

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-71a-5p	GBJA01003452	phosphatidylinositide phosphatase SAC1 [Clonorchis sinensis]	Phosphatidylinositide phosphatase SAC1-A OS=Danio rerio GN=sacm1la PE=2 SV=1	GO:0042578	
ofe-miR-71a-5p	GBJA01010097	hypothetical protein T265_15212, partial [Opisthorchis viverrini]gb KER20928.1 hypothetical protein T265_15212, partial [Opisthorchis viverrini]	tRNA methyltransferase 10 homolog A OS=Homo sapiens GN=TRMT10A PE=1 SV=1		K15445
ofe-miR-71a-5p	GBJA01010043	hypothetical protein T265_07624 [Opisthorchis viverrini]gb KER24795.1 hypothetical protein T265_07624 [Opisthorchis viverrini]	Cysteine protease ATG4D OS=Mus musculus GN=Atg4d PE=1 SV=1		K08342
ofe-miR-71a-5p	GBJA01007257	alpha-tocopherol transfer protein-like [Clonorchis sinensis]	Clavesin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Clvs2 PE=1 SV=1		
ofe-miR-71a-5p	GBJA01004325	cement precursor protein 3B variant 1 [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-71a-5p	GBJA01004966	activating signal cointegrator 1 complex subunit 2 [Clonorchis sinensis]	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 2 OS=Mus musculus GN=Ascc2 PE=2 SV=1	GO:0005515	
ofe-miR-71a-5p	GBJA01007141	hypothetical protein T265_03544 [Opisthorchis viverrini]gb KER29957.1 hypothetical protein T265_03544 [Opisthorchis viverrini]	SH2 domain-containing protein 4A OS=Homo sapiens GN=SH2D4A PE=1 SV=1	GO:0005515	
ofe-miR-71b-5p	GBJA01009277				
ofe-miR-71b-5p	GBJA01008190	A-kinase anchor protein 7 isoform gamma [Clonorchis sinensis]	A-kinase anchor protein 7 isoform gamma OS=Homo sapiens GN=AKAP7 PE=1 SV=2	GO:0003824	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-71b-5p	GBJA01007530	lysosomal protein NCU-G1-B [Clonorchis sinensis]	Lysosomal protein NCU-G1-A OS=Xenopus laevis PE=2 SV=2		
ofe-miR-71b-5p	GBJA01001084	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2 [Clonorchis sinensis]	Probable Golgi SNAP receptor complex member 2 OS=Drosophila melanogaster GN=membrin PE=2 SV=1	GO:0005795, GO:0006810	K03935
ofe-miR-71b-5p	GBJA01009996	patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 [Clonorchis sinensis]	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Pnpla2 PE=2 SV=1	GO:0006629, GO:0008152	
ofe-miR-71b-5p	GBJA01009783	BnaJ homolog subfamily C member 9 [Clonorchis sinensis]	Chaperone protein dnaJ 39 OS=Arabidopsis thaliana GN=ATJ39 PE=2 SV=2		K05516
ofe-miR-71b-5p	GBJA01004015	hypothetical protein T265_14432, partial [Opisthorchis viverrini]gb[KER24417.1] hypothetical protein T265_14432, partial [Opisthorchis viverrini]	Inositol polyphosphate multikinase OS=Homo sapiens GN=IPMK PE=1 SV=1	GO:0008440	K00328
ofe-miR-71b-5p	GBJA01012301	hypothetical protein T265_00980 [Opisthorchis viverrini]gb[KER33081.1] hypothetical protein T265_00980 [Opisthorchis viverrini]	Ran-binding proteins 9/10 homolog OS=Drosophila melanogaster GN=RanBPM PE=1 SV=1	GO:0005515	
ofe-miR-71b-5p	GBJA01003592	hypothetical protein T265_04431 [Opisthorchis viverrini]gb[KER28824.1] hypothetical protein T265_04431	Protein CLEC16A OS=Homo sapiens GN=CLEC16A PE=2 SV=2		
ofe-miR-76-3p	GBJA01000208	dynactin 1 [Clonorchis sinensis]	Dynactin subunit 1 OS=Gallus gallus GN=DCTN1 PE=2 SV=2	GO:0045502, GO:0010970, GO:0005869	K04648
ofe-miR-7a-5p	GBJA01004814				

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-7a-5p	GBJA01002833	rhodopsin-like orphan GPCR [Clonorchis sinensis]		GO:0016021	
ofe-miR-7a-5p	GBJA01012099	hypothetical protein T265_07574 [Opisthorchis viverrini]gb[KER24843.1] hypothetical protein T265_07574 [Opisthorchis viverrini]	Protein FAM76A OS=Gallus gallus GN=FAM76A PE=2 SV=1		
ofe-miR-7a-5p	GBJA01006357	UPF0468 protein C16orf80 homolog, partial [Clonorchis sinensis]	UPF0468 protein CG5343 OS=Drosophila melanogaster GN=CG5343 PE=1 SV=1		
ofe-miR-7a-5p	GBJA01006541	hypothetical protein T265_07639 [Opisthorchis viverrini]gb[KER24749.1] hypothetical protein T265_07639	Leucine-rich repeat and WD repeat-containing protein 1 OS=Xenopus tropicalis GN=lrwd1 PE=2 SV=1	GO:0005634, GO:0045892, GO:0005515	K13131
ofe-miR-7a-5p	GBJA01012126	LOW QUALITY PROTEIN: hypothetical protein T265_13509 [Opisthorchis viverrini]gb[KER28807.1] LOW QUALITY PROTEIN: hypothetical protein T265_13509 [Opisthorchis viverrini]	RAD50-interacting protein 1 OS=Mus musculus GN=Rint1 PE=2 SV=2		
ofe-miR-7a-5p	GBJA01003756	hypothetical protein T265_08805 [Opisthorchis viverrini]gb[KER23268.1] hypothetical protein T265_08805 [Opisthorchis viverrini]	Glycogenin-1 OS=Mus musculus GN=Gyg1 PE=2 SV=3	GO:0016757	K00750
ofe-miR-7a-5p	GBJA01001085	hypothetical protein CLF_100002 [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-7a-5p	GBJA01003155	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 [Clonorchis sinensis]	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 OS=Mus musculus GN=Adam10 PE=1 SV=2	GO:0006508, GO:0004222, GO:0008270, GO:0008237	K06704

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-7a-5p	GBJA01002419	alkylated DNA repair protein alkB homolog 1 [Clonorchis sinensis]			K10765
ofe-miR-7a-5p	GBJA01000676	matrix metalloproteinase-25 [Clonorchis sinensis]	Matrix metalloproteinase-25 OS=Homo sapiens GN=MMP25 PE=1 SV=1	GO:0006508, GO:0004222, GO:0008270, GO:0008237, GO:0031012	K07995
ofe-miR-7a-5p	GBJA01001552	hypothetical protein T265_13645 [Opisthorchis viverrini]gb[KER28132.1] hypothetical protein T265_13645 [Opisthorchis viverrini]	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F OS=Danio rerio GN=ptprf PE=2 SV=1	GO:0016311, GO:0006470, GO:0004725, GO:0016791, GO:0005515	K06777
ofe-miR-7a-5p	GBJA01005450	dedicator of cytokinesis protein 6 [Clonorchis sinensis]	Dedicator of cytokinesis protein 7 OS=Homo sapiens GN=DOCK7 PE=1 SV=4	GO:0007264, GO:0005085	
ofe-miR-7b-5p	GBJA01004814				
ofe-miR-8-3p	GBJA01003741	hypothetical protein T265_13475, partial [Opisthorchis viverrini]gb[KER28930.1] hypothetical protein T265_13475, partial [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-87-3p	GBJA01005862	hypothetical protein T265_02066 [Opisthorchis viverrini]gb[KER31692.1] hypothetical protein T265_02066 [Opisthorchis viverrini]	Cysteine dioxygenase type 1 OS=Danio rerio GN=cdo1 PE=2 SV=1	GO:0046439, GO:0005506, GO:0017172, GO:0055114	K00456
ofe-miR-87-3p	GBJA01003286	leishmanolysin-like peptidase [Clonorchis sinensis]			

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-87-3p	GBJA01000722	glycosyltransferase-like protein LARGE [Clonorchis sinensis]	Glycosyltransferase-like protein LARGE1 OS=Gallus gallus GN=LARGE PE=2 SV=1	GO:0016757	K09668
ofe-miR-87-3p	GBJA01011604	hypothetical protein T265_08371 [Opisthorchis viverrini]gb[KER23825.1] hypothetical protein T265_08371 [Opisthorchis viverrini]	Myotubularin-related protein 14 OS=Homo sapiens GN=MTMR14 PE=1 SV=2	GO:0016311, GO:0004725, GO:0016791	
ofe-miR-87-3p	GBJA01004802	hypothetical protein T265_13385, partial [Opisthorchis viverrini]gb[KER29348.1] hypothetical protein T265_13385, partial [Opisthorchis viverrini]	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial OS=Bos taurus GN=SHMT2 PE=2 SV=1	GO:0006544, GO:0004372, GO:0006563, GO:0030170, GO:0003824	K00600
ofe-miR-87-3p	GBJA01001585	hypothetical protein T265_14068, partial [Opisthorchis viverrini]gb[KER26145.1] hypothetical protein T265_14068, partial [Opisthorchis viverrini]	MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI1 OS=Mus musculus GN=Mecom PE=1 SV=1	GO:0046872, GO:0003676	
ofe-miR-87-3p	GBJA01010231	fibroblast growth factor receptor-like 1, partial [Clonorchis sinensis]	Fibroblast growth factor receptor-like 1 OS=Homo sapiens GN=FGFRL1 PE=1 SV=1	GO:0005515	
ofe-miR-87-3p	GBJA01009099	hypothetical protein CLF_101481 [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-87-3p	GBJA01012260	hypothetical protein T265_14458, partial [Opisthorchis viverrini]gb[KER24284.1] hypothetical protein T265_14458, partial [Opisthorchis viverrini]	Uncharacterized protein C14orf166B OS=Homo sapiens GN=C14orf166B PE=2 SV=2	GO:0005509	
ofe-miR-87-3p	GBJA01003063	ankyrin-2 [Clonorchis sinensis]	Inversin-B OS=Xenopus laevis GN=invs-b PE=1 SV=1	GO:0005515	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-87-3p	GBJA01007075	ubiquinone biosynthesis monoxygenase Coq6, partial [Clonorchis sinensis]	Ubiquinone biosynthesis monoxygenase COQ6 OS=Mus musculus GN=Coq6 PE=2 SV=3	GO:0050660, GO:0016709, GO:0008152, GO:0006744, GO:0055114, GO:0016491	K06126
ofe-miR-87-3p	GBJA01011631	hypothetical protein T265_02087 [Opisthorchis viverrini]gb[KER31718.1] hypothetical protein T265_02087 [Opisthorchis viverrini]	Protein SGT1 homolog OS=Mus musculus GN=Ecd PE=2 SV=2		
ofe-miR-87-3p	GBJA01008860	hypothetical protein T265_07078 [Opisthorchis viverrini]gb[KER25454.1] hypothetical protein T265_07078 [Opisthorchis viverrini]	Protein MEF2BNB homolog OS=Drosophila melanogaster GN=CG32590 PE=2 SV=1		
ofe-miR-87-3p	GBJA01010255	cysteine and glycine-rich protein, partial [Clonorchis sinensis]	Cysteine and glycine-rich protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Csrp1 PE=2 SV=2	GO:0008270	K09377
ofe-miR-9-5p	GBJA01004844	UDP-glucose 4-epimerase [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-3479a-3p	GBJA01002962	SET and MYND domain-containing protein 5 [Clonorchis sinensis]	SET and MYND domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=SMYD5 PE=1 SV=2	GO:0005515	
ofe-miR-3479b-3p	GBJA01001478	hypothetical protein T265_02463 [Opisthorchis viverrini]gb[KER31280.1] hypothetical protein T265_02463 [Opisthorchis viverrini]			

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-3479b-3p	GBJA01003578	hypothetical protein T265_09098 [Opisthorchis viverrini]gb KER22892.1 hypothetical protein T265_09098 [Opisthorchis viverrini]	Phosphorylase b kinase gamma catalytic chain, skeletal muscle isoform OS=Homo sapiens GN=PHKG1 PE=2 SV=3	GO:0006468, GO:0005964, GO:0005978, GO:0004689, GO:0004674, GO:0005516, GO:0004672, GO:0016772, GO:0005524	K00871
ofe-miR-96-5p	GBJA01002554	hypothetical protein CLF_110422 [Clonorchis sinensis]			
ofe-miR-96-5p	GBJA01008156	adrenodoxin-like protein mitochondrial [Clonorchis sinensis]	Adrenodoxin-like protein, mitochondrial OS=Drosophila melanogaster GN=Fdxh PE=2 SV=3	GO:0051536, GO:0051537, GO:0009055	
ofe-miR-96-5p	GBJA01008040	GTPase obg [Clonorchis sinensis]	GTPase obg OS=Fervidobacterium nodosum (strain ATCC 35602 / DSM 5306 / Rt17-B1) GN=obg PE=3 SV=1	GO:0000287, GO:0003924, GO:0005525	K03979
ofe-miR-new1-5p	GBJA01001330	hypothetical protein T265_13010, partial [Opisthorchis viverrini]gb KER31266.1 hypothetical protein T265_13010, partial [Opisthorchis viverrini]			
ofe-miR-new1-5p	GBJA01002862	elongation factor G [Clonorchis sinensis]	28S ribosomal protein S7, mitochondrial OS=Xenopus laevis GN=mrps7 PE=2 SV=1	GO:0006412	K02992
ofe-miR-new1-5p	GBJA01006035	hypothetical protein T265_10021 [Opisthorchis viverrini]gb KER21715.1 hypothetical protein T265_10021 [Opisthorchis viverrini]	Protein ariadne-2 OS=Drosophila melanogaster GN=ari-2 PE=2 SV=1	GO:0008270, GO:0005515	K11969

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК			
		Blastx vs Nr	Blastx vs Swissprot	GO	KEGG
ofe-miR-new1-5p	GBJA01007245	STE20-like serine/threonine-protein kinase [Clonorchis sinensis]	Serine/threonine-protein kinase 10 OS=Bos taurus GN=STK10 PE=3 SV=3	GO:0004674, GO:0006468, GO:0016772, GO:0005524, GO:0004672	K08837
ofe-miR-new1-5p	GBJA01002033	hypothetical protein T265_15320, partial [Opisthorchis viverrini]gb KER20428.1 hypothetical protein T265_15320, partial [Opisthorchis viverrini]	Actin-2 OS=Schistosoma mansoni PE=2 SV=1		K05692
ofe-miR-new1-5p	GBJA01003977	hypothetical protein T265_08974 [Opisthorchis viverrini]gb KER23074.1 hypothetical protein T265_08974 [Opisthorchis viverrini]	Cathepsin D OS=Chionodraco hamatus GN=ctsd PE=1 SV=2	GO:0006508, GO:0004190	K01379
ofe-miR-new1-5p	GBJA01006054	hypothetical protein T265_06954 [Opisthorchis viverrini]gb KER25599.1 hypothetical protein T265_06954 [Opisthorchis viverrini]	RNA exonuclease 1 homolog OS=Mus musculus GN=Rexo1 PE=1 SV=1	GO:0004527, GO:0003676	K14570

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК	
		GO	Kegg
ovi-bantam-3p	hypothetical protein T265_06312	GO:0005272, GO:0006814, GO:0016020	
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_11742		K15112
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_11640		
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_11247		
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_11247		
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_14643		K10802
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_07985	GO:0007165, GO:0035556	K16733
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_07891		
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_07042	GO:0003774, GO:0016459	K17751
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_06439		
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_06291	GO:0005743, GO:0006120, GO:0008137	
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_04273	GO:0005515	K16882
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_04187		
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_03834	GO:0005198, GO:0007155, GO:0015629, GO:0051015	K05700
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_03326		
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_03237	GO:0008537	K06698
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_02897	GO:0003677, GO:0003684, GO:0006281	K03511
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_00805	GO:0006811, GO:0015075, GO:0016020, GO:0055085	K03351
ovi-let-7a-5p	hypothetical protein T265_00803	GO:0005515, GO:0008270	K11305
ovi-let-7b-5p	hypothetical protein T265_01365	GO:0016787	
ovi-let-7b-5p	hypothetical protein T265_03326		
ovi-let-7c-5p	hypothetical protein T265_06439		
ovi-miR-125c-5p	hypothetical protein T265_12333		K02999
ovi-miR-125c-5p	hypothetical protein T265_12900	GO:0016209, GO:0016491, GO:0055114, GO:0051920	K03386
ovi-miR-993-3p	hypothetical protein T265_11631	GO:0006812, GO:0008324, GO:0016021, GO:0055085	
ovi-miR-993-3p	hypothetical protein T265_00067	GO:0003980, GO:0006486	K11718
ovi-miR-755-3p	hypothetical protein T265_03139	GO:0006508, GO:0008236, GO:0016020	K09647
ovi-miR-124-3p	hypothetical protein T265_12214		
ovi-miR-124-3p	hypothetical protein T265_11491		
ovi-miR-124-3p	hypothetical protein T265_11143	GO:0005515	
ovi-miR-124-3p	hypothetical protein T265_09060	GO:0016020	
ovi-miR-124-3p	hypothetical protein T265_09060	GO:0016020	
ovi-miR-124-3p	hypothetical protein T265_09060	GO:0016020	

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК	
		GO	Kegg
ovi-miR-124-3p	hypothetical protein T265_08418	GO:0005488, GO:0005515	
ovi-miR-124-3p	hypothetical protein T265_07527	GO:0016747	
ovi-miR-124-3p	hypothetical protein T265_03684	GO:0005515	K14409
ovi-miR-124-3p	hypothetical protein T265_03600	GO:0003677, GO:0003910, GO:0006281, GO:0006310, GO:0003909, GO:0051103, GO:0005524, GO:0071897	K10776
ovi-miR-124-3p	hypothetical protein T265_01675	GO:0006886, GO:0006888, GO:0008270, GO:0030127	K14007
ovi-miR-124-3p	hypothetical protein T265_12528		K10742
ovi-miR-133-3p	hypothetical protein T265_13683	GO:0005515, GO:0008270	K15716
ovi-miR-184-3p	hypothetical protein T265_04035	GO:0006355	K17570
ovi-miR-190a-5p	hypothetical protein T265_11499	GO:0004222, GO:0005524, GO:0006508, GO:0016020	K08955
ovi-miR-190a-5p	hypothetical protein T265_15071	GO:0005096, GO:0051056	
ovi-miR-190a-5p	hypothetical protein T265_09338		K13174
ovi-miR-190a-5p	hypothetical protein T265_12669		
ovi-miR-190b-5p	hypothetical protein T265_05574		
ovi-miR-1989-5p	hypothetical protein T265_08387		
ovi-miR-1992-3p	hypothetical protein T265_05575		
ovi-miR-1992-3p	hypothetical protein T265_00653	GO:0003993	K14410
ovi-miR-1a-3p	hypothetical protein T265_11477	GO:0005515	
ovi-miR-1a-3p	hypothetical protein T265_08952	GO:0004784, GO:0055114, GO:0006801, GO:0046872	K04565
ovi-miR-1a-3p	hypothetical protein T265_08382		K03678
ovi-miR-1a-3p	hypothetical protein T265_08211	GO:0003700, GO:0006355, GO:0043565	K17102
ovi-miR-1a-3p	hypothetical protein T265_14173		K02435
ovi-miR-1a-3p	hypothetical protein T265_05333	GO:0005525, GO:0007264	K07885
ovi-miR-1a-3p	hypothetical protein T265_04555	GO:0046872	
ovi-miR-1a-3p	hypothetical protein T265_01858		K17794
ovi-miR-1a-3p	hypothetical protein T265_01144	GO:0016021	K01530
ovi-miR-1b-3p	hypothetical protein T265_14866		
ovi-miR-1b-3p	hypothetical protein T265_07174	GO:0005515, GO:0019904	
ovi-miR-1b-3p	hypothetical protein T265_14173		K02435

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК	
		GO	Kegg
ovi-miR-210-3p	hypothetical protein T265_09161	GO:0005524	K10877
ovi-miR-210-3p	hypothetical protein T265_08533	GO:0019825, GO:0020037	
ovi-miR-210-3p	hypothetical protein T265_13842	GO:0004531, GO:0006259	K01158
ovi-miR-210-3p	hypothetical protein T265_04400	GO:0003676, GO:0008270, GO:0003723, GO:0005524, GO:0006955, GO:0016740, GO:0046872	K13203
ovi-miR-210-3p	hypothetical protein T265_02924	GO:0005488	
ovi-miR-210-3p	hypothetical protein T265_12716	GO:0005576	
ovi-miR-210-3p	hypothetical protein T265_00356	GO:0001104, GO:0006357, GO:0016592	K15146
ovi-miR-2160a-5p	hypothetical protein T265_15306	GO:0005515, GO:0007165	K10380
ovi-miR-2160a-5p	hypothetical protein T265_07590	GO:0005515	K12180
ovi-miR-2160a-5p	hypothetical protein T265_14214	GO:0004198, GO:0005622, GO:0006508, GO:0005509	K08585
ovi-miR-2160a-5p	hypothetical protein T265_04006	GO:0005085, GO:0007264	K06277
ovi-miR-2160a-5p	hypothetical protein T265_13012		K03842
ovi-miR-2160a-5p	hypothetical protein T265_01850	GO:0003676, GO:0003723, GO:0005515	K16726
ovi-miR-2160b-5p	hypothetical protein T265_14980	GO:0006812, GO:0055085, GO:0008324, GO:0016021	
ovi-miR-2161-3p	hypothetical protein T265_08731	GO:0004674, GO:0004672, GO:0005524, GO:0006468	K07376
ovi-miR-219-5p	hypothetical protein T265_09629	GO:0005515	K07199
ovi-miR-745-3p	hypothetical protein T265_15132	GO:0005515, GO:0005524	
ovi-miR-745-3p	hypothetical protein T265_07878	GO:0005488	
ovi-miR-745-3p	hypothetical protein T265_04780		
ovi-miR-745-3p	hypothetical protein T265_02692	GO:0000287, GO:0004721, GO:0030145, GO:0003824, GO:0043169	K04461
ovi-miR-277a-3p	hypothetical protein T265_06765		
ovi-miR-2a-3p	hypothetical protein T265_11504		K11666
ovi-miR-2a-3p	hypothetical protein T265_07690	GO:0005515	
ovi-miR-2a-3p	hypothetical protein T265_07561		
ovi-miR-2a-3p	hypothetical protein T265_06771		K16811

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК	
		GO	Kegg
ovi-miR-2a-3p	hypothetical protein T265_06193		
ovi-miR-2a-3p	hypothetical protein T265_13923		K01021
ovi-miR-2a-3p	hypothetical protein T265_04290		K16757
ovi-miR-2a-3p	hypothetical protein T265_04124		
ovi-miR-2a-3p	hypothetical protein T265_02991	GO:0005089, GO:0035023, GO:0005515	K07525
ovi-miR-2a-3p	hypothetical protein T265_02002		
ovi-miR-2a-3p	hypothetical protein T265_00516		
ovi-miR-2b-3p	hypothetical protein T265_10768	GO:0000166, GO:0003676	
ovi-miR-2b-3p	hypothetical protein T265_14563	GO:0003676, GO:0008270, GO:0016779	K13291
ovi-miR-2b-3p	hypothetical protein T265_08097	GO:0005509	
ovi-miR-2b-3p	hypothetical protein T265_07875		K01672
ovi-miR-2b-3p	hypothetical protein T265_07570	GO:0005634, GO:0048024	
ovi-miR-2b-3p	hypothetical protein T265_04263		
ovi-miR-2b-3p	LOW QUALITY PROTEIN:	GO:0005488, GO:0005515	
ovi-miR-2c-3p	hypothetical protein T265_10247	GO:0005525	K07942
ovi-miR-2c-3p	hypothetical protein T265_07875		K01672
ovi-miR-2c-3p	hypothetical protein T265_06771		K16811
ovi-miR-2c-3p	hypothetical protein T265_05883		
ovi-miR-2c-3p	hypothetical protein T265_05685	GO:0005525, GO:0007264	K04513
ovi-miR-2d-3p	hypothetical protein T265_11899	GO:0005215, GO:0016021, GO:0055085	
ovi-miR-2d-3p	hypothetical protein T265_11670	GO:0005515	
ovi-miR-2d-3p	hypothetical protein T265_07542	GO:0004672, GO:0005524, GO:0006468, GO:0005515	K08863
ovi-miR-2d-3p	hypothetical protein T265_14166	GO:0005096	K12486
ovi-miR-2d-3p	hypothetical protein T265_13833	GO:0003677, GO:0003887, GO:0006260	K02325
ovi-miR-2d-3p	hypothetical protein T265_04514	GO:0055085	K15276
ovi-miR-2d-3p	hypothetical protein T265_04212	GO:0000166, GO:0003676, GO:0003887, GO:0003677, GO:0005634, GO:0006260, GO:0008270, GO:0008408, GO:0016020, GO:0030001, GO:0046873, GO:0055085	K02324
ovi-miR-2d-3p	hypothetical protein T265_04189	GO:0004672, GO:0005524, GO:0006468, GO:0005057, GO:0007165, GO:0035556	K04365
ovi-miR-2d-3p	hypothetical protein T265_02977	GO:0016255, GO:0042765	K05292
ovi-miR-2d-3p	hypothetical protein T265_01325	GO:0005515, GO:0008270	
ovi-miR-2d-3p	hypothetical protein T265_01059		
ovi-miR-2d-3p	hypothetical protein T265_00844	GO:0016021	
ovi-miR-2d-3p	hypothetical protein T265_00303	GO:0003824, GO:0008152	K05288
ovi-miR-2e-3p	hypothetical protein T265_15143		
ovi-miR-2e-3p	hypothetical protein T265_14116		
ovi-miR-2e-3p	hypothetical protein T265_13833	GO:0003677, GO:0003887, GO:0006260	K02325

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК	
		GO	Kegg
ovi-miR-2e-3p	hypothetical protein T265_05319	GO:0005515	
ovi-miR-2e-3p	hypothetical protein T265_04056		
ovi-miR-2f-3p	hypothetical protein T265_11504		K11666
ovi-miR-2f-3p	hypothetical protein T265_07561		
ovi-miR-2f-3p	hypothetical protein T265_06771		K16811
ovi-miR-2f-3p	hypothetical protein T265_06466	GO:0006810, GO:0016021, GO:0016192	K08517
ovi-miR-2f-3p	hypothetical protein T265_06033	GO:0006886, GO:0016192, GO:0030117, GO:0006810	K12394
ovi-miR-2f-3p	hypothetical protein T265_04124		
ovi-miR-31-5p	hypothetical protein T265_15478	GO:0008270, GO:0008745, GO:0009253	K01446
ovi-miR-31-5p	hypothetical protein T265_11253	GO:0001522, GO:0003723, GO:0009451, GO:0009982	
ovi-miR-31-5p	hypothetical protein T265_11143	GO:0005515	
ovi-miR-31-5p	hypothetical protein T265_09904	GO:0046332	K18499
ovi-miR-31-5p	hypothetical protein T265_09482	GO:0006508, GO:0008233	K01369
ovi-miR-31-5p	hypothetical protein T265_08099		K10373
ovi-miR-31-5p	hypothetical protein T265_07985	GO:0007165, GO:0035556	K16733
ovi-miR-31-5p	hypothetical protein T265_04278	GO:0036054, GO:0036055, GO:0070403	K11415
ovi-miR-31-5p	hypothetical protein T265_02943		K17569
ovi-miR-31-5p	hypothetical protein T265_02209	GO:0006812, GO:0008324, GO:0016021, GO:0055085	K14688
ovi-miR-31-5p	hypothetical protein T265_12908	GO:0004672, GO:0005524, GO:0006468, GO:0005488	K06228
ovi-miR-31-5p	hypothetical protein T265_01723	GO:0006836, GO:0019905	K15294
ovi-miR-36a-3p	hypothetical protein T265_10318	GO:0005515	
ovi-miR-36a-3p	hypothetical protein T265_06015	GO:0005741, GO:0006626	K17776
ovi-miR-36c-3p	hypothetical protein T265_06015	GO:0005741, GO:0006626	K17776
ovi-miR-36c-3p	hypothetical protein T265_05487	GO:0005515	K14962
ovi-miR-307-3p	hypothetical protein T265_10833	GO:0004335, GO:0005524, GO:0006012, GO:0046835	K18674
ovi-miR-307-3p	hypothetical protein T265_06859		
ovi-miR-307-3p	hypothetical protein T265_02407	GO:0005488	
ovi-miR-307-3p	hypothetical protein T265_00281	GO:0003824, GO:0008152	K01895
ovi-miR-71a-5p	hypothetical protein T265_15237		
ovi-miR-71a-5p	hypothetical protein T265_07624		K08342

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК	
		GO	Kegg
ovi-miR-71a-5p	hypothetical protein T265_06456	GO:0004672, GO:0005524, GO:0006468, GO:0004674, GO:0007165	K06071
ovi-miR-71a-5p	hypothetical protein T265_06054	GO:0016021	
ovi-miR-71a-5p	hypothetical protein T265_05836		K12795
ovi-miR-71a-5p	hypothetical protein T265_05613	GO:0005488	K14415
ovi-miR-71a-5p	hypothetical protein T265_04609	GO:0005509	K02183
ovi-miR-71a-5p	hypothetical protein T265_03852	GO:0006810, GO:0016021	
ovi-miR-71a-5p	hypothetical protein T265_00827	GO:0005515	K13956
ovi-miR-71a-5p	hypothetical protein T265_00155		
ovi-miR-71b-5p	hypothetical protein T265_11007	GO:0003924, GO:0005525	K02519
ovi-miR-71b-5p	hypothetical protein T265_06884	GO:0005509	K02183
ovi-miR-71b-5p	hypothetical protein T265_04536	GO:0016491, GO:0055114	K18914
ovi-miR-71b-5p	hypothetical protein T265_04431		
ovi-miR-71b-5p	hypothetical protein T265_04431		
ovi-miR-71b-5p	hypothetical protein T265_04189	GO:0004672, GO:0005524, GO:0006468, GO:0005057, GO:0007165, GO:0035556	K04365
ovi-miR-71b-5p	hypothetical protein T265_03308		
ovi-miR-71b-5p	hypothetical protein T265_00330	GO:0003824	K05956
ovi-miR-750-3p	hypothetical protein T265_00283		
ovi-miR-76-3p	hypothetical protein T265_08404		
ovi-miR-7a-5p	hypothetical protein T265_08132	GO:0003723, GO:0003964, GO:0006278, GO:0004222, GO:0006508, GO:0008237	K06704
ovi-miR-7a-5p	hypothetical protein T265_14364	GO:0004889, GO:0005216, GO:0006811, GO:0016021, GO:0045211, GO:0005230, GO:0006810, GO:0016020	
ovi-miR-7a-5p	hypothetical protein T265_02546	GO:0000287, GO:0016616, GO:0051287, GO:0055114, GO:0004449, GO:0006099	K00030
ovi-miR-87-3p	hypothetical protein T265_10657	GO:0005515	K17341
ovi-miR-87-3p	hypothetical protein T265_10657	GO:0005515	K17341

микроРНК	мРНК	аннотация мРНК	
		GO	Kegg
ovi-miR-87-3p	hypothetical protein T265_10653	GO:0005515	K06093
ovi-miR-87-3p	hypothetical protein T265_08371	GO:0004725, GO:0016311, GO:0016791	K18086
ovi-miR-87-3p	hypothetical protein T265_14450	GO:0001104, GO:0006357, GO:0016592	K15135
ovi-miR-87-3p	hypothetical protein T265_06958	GO:0005515	K13216
ovi-miR-87-3p	hypothetical protein T265_05884	GO:0001510, GO:0008168, GO:0009452	K14292
ovi-miR-87-3p	hypothetical protein T265_00065		K07189
ovi-miR-87-3p	hypothetical protein T265_00065		K07189
ovi-miR-96-5p	hypothetical protein T265_07771		
ovi-miR-96-5p	hypothetical protein T265_00669	GO:0005515	
ovi-miR-new1-5p	hypothetical protein T265_07712	GO:0022900, GO:0016651	

Приложение 14

Количество предсказанных мишеней для каждой микроРНК, и список процессов, в которых могут участвовать данные микроРНК

микроРНК	<i>O. felineus</i>			<i>O. viverrini</i>		
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg
Bantam-3p	1	signal transduction		1	sodium ion transport	
let-7a-5p	13	DNA replication; nucleobase-containing compound metabolic process; regulation of transcription, DNA-templated; tRNA aminoacylation for protein translation; tyrosyl-tRNA aminoacylation; transmembrane transport; cation transport; small GTPase mediated signal transduction; protein transport; signal transduction; nucleocytoplasmic transport; intracellular protein transport	DNA replication; Purine metabolism; Pyrimidine metabolism; Aminoacyl-tRNA biosynthesis; Glycerolipid metabolism; Retinol metabolism; Riboflavin metabolism; Tyrosine metabolism; Ubiquitin mediated proteolysis; mRNA surveillance pathway	17	transmembrane transport; ion transport; DNA repair; cell adhesion; mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone; intracellular signal transduction; signal transduction	Ubiquitin mediated proteolysis; Base excision repair

микроРНК	<i>O. felineus</i>		<i>O. viverrini</i>		
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO		процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO
let-7b-5p	6	DNA repair	Riboflavin metabolism; Tyrosine metabolism	2	
let-7c-5p	2		vesicle-mediated transport; intracellular protein transport Endocytosis	1	
miR-1a-3p	27	proteolysis; protein phosphorylation; ion transport; transport; transmembrane transport; metal ion transport; ubiquitin-dependent protein catabolic process; proteolysis involved in cellular protein catabolic process; protein folding	Neuroactive ligand-receptor interaction; FoxO signaling pathway; mTOR signaling pathway; Base excision repair; DNA replication; Nucleotide excision repair; Purine metabolism; Pyrimidine metabolism; Carbon metabolism; Citrate cycle (TCA cycle); Propanoate metabolism	9	small GTPase mediated signal transduction; regulation of transcription, DNA-templated; superoxide metabolic process; oxidation-reduction process
miR-1b-3p	3	protein phosphorylation		3	
					Aminoacyl-tRNA biosynthesis

микроРНК	<i>O. felineus</i>			<i>O. viverrini</i>		
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg
miR-2a-3p	15	protein phosphorylation; lipid metabolic process; glycerol metabolic process; GPI anchor biosynthetic process; regulation of transcription, DNA-templated	Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	11	regulation of Rho protein signal transduction	
miR-2b-3p	13	oxidation-reduction process; transmembrane transport; ion transport; regulation of transcription, DNA-templated	Fatty acid biosynthesis; Fatty acid metabolism	7	regulation of mRNA splicing, via spliceosome	Nitrogen metabolism
miR-2c-3p	15	protein dephosphorylation; dephosphorylation; positive regulation of Ras protein signal transduction; translation; ATP synthesis coupled proton transport; proteolysis	Fatty acid biosynthesis; Fatty acid metabolism; Oxidative phosphorylation; RNA degradation	5	small GTPase mediated signal transduction	Endocytosis; TGF-beta signaling pathway; Wnt signaling pathway; Nitrogen metabolism

микроРНК	<i>O. felinus</i>		<i>O. viverrini</i>		
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	
miR-2d-3p	15	protein phosphorylation; ion transport; transmembrane transport	Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis; FoxO signaling pathway; Dorso-ventral axis formation; Notch signaling pathway; Purine metabolism; Pyrimidine metabolism; RNA polymerase; Fatty acid biosynthesis; Fatty acid metabolism; Endocytosis	attachment of GPI anchor to protein; intracellular signal transduction; signal transduction; metal ion transport; DNA replication; protein phosphorylation; transmembrane transport	Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis; Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis; FoxO signaling pathway; mTOR signaling pathway; Base excision repair; DNA replication; Nucleotide excision repair; Purine metabolism; Pyrimidine
miR-2e-3p	3	transmembrane transport	Dorso-ventral axis formation; Notch signaling pathway; Purine metabolism; Pyrimidine metabolism; RNA polymerase	DNA replication	Base excision repair; DNA replication; Nucleotide excision repair; Purine metabolism; Pyrimidine metabolism
miR-2f-3p	5	regulation of Rho protein signal transduction; glycolipid transport; proteolysis		transport; vesicle-mediated transport; intracellular protein transport	SNARE interactions in vesicular transport

микроРНК	<i>O. felineus</i>		<i>O. viverrini</i>			
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg
miR-7a-5p	13	small GTPase mediated signal transduction; protein dephosphorylation; dephosphorylation; proteolysis; negative regulation of transcription, DNA-templated	RNA transport	3	tricarboxylic acid cycle; oxidation-reduction process; transport; ion transport; proteolysis; RNA-dependent DNA biosynthetic process	2-Oxocarboxylic acid metabolism; Biosynthesis of amino acids; Carbon metabolism; Citrate cycle (TCA cycle)
miR-7b-5p	1			0		
miR-8-3p	1			0		
miR-9-3p	1			0		
miR-10-5p	1			0		
miR-125a-5p	2	oxidation-reduction process; proline biosynthetic process	Biosynthesis of amino acids	0		
miR-125b-5p	0			0		
miR-125c-5p	3	oxidation-reduction process; proline biosynthetic process	Biosynthesis of amino acids	2	oxidation-reduction process	

микроРНК	<i>O. felinus</i>		<i>O. viverrini</i>		
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg
miR-993-3p	4	oxidation-reduction process; attachment of GPI anchor to protein; transcription elongation from RNA polymerase II promoter	Protein processing in endoplasmic reticulum; Folate biosynthesis; Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	2	protein glycosylation; transmembrane transport; cation transport
miR-12-5p	0			0	
miR-745-3p	17	histone lysine methylation; regulation of transcription, DNA-templated; sodium ion transport; transmembrane transport; metal ion transport	Lysine degradation; Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	4	
miR-36a-3p	0			2	protein targeting to mitochondrion
miR-36b-3p	9	microtubule-based movement; sodium ion transport; autophagy	Regulation of autophagy	0	
miR-36c-3p	0			2	protein targeting to mitochondrion mRNA surveillance pathway

микроРНК	<i>O. felineus</i>			<i>O. viverrini</i>		
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg
miR-31-5p	8	neurotransmitter transport; signal transduction; intracellular signal transduction; vesicle-mediated transport	SNARE interactions in vesicular transport	12	neurotransmitter transport; protein phosphorylation; transmembrane transport; cation transport; intracellular signal transduction; signal transduction; proteolysis; RNA modification; pseudouridine synthesis; peptidoglycan catabolic process	Hedgehog signaling pathway
miR-281-3p	3	small GTPase mediated signal transduction; signal transduction		0		
miR-3479a-3p	1			0		
miR-3479b-3p	2	glycogen biosynthetic process; protein phosphorylation				

микроРНК	<i>O. felinus</i>		<i>O. viverrini</i>		
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO
miR-61-3p	3	cell communication; carbohydrate metabolic process	Notch signaling pathway; Amino sugar and nucleotide sugar metabolism; Galactose metabolism; Glycolysis / Gluconeogenesis; Pentose phosphate pathway; Purine metabolism; Starch and sucrose metabolism	0	
miR-307-3p	5	carbohydrate phosphorylation; galactose metabolic process; cellular metabolic process	Carbon metabolism; Glycolysis / Gluconeogenesis; Propanoate metabolism; Pyruvate metabolism; Amino sugar and nucleotide sugar metabolism; Galactose metabolism; Endocytosis; RNA transport	4	carbohydrate phosphorylation; galactose metabolic process
					Carbon metabolism; Glycolysis / Gluconeogenesis; Propanoate metabolism; Pyruvate metabolism

микроРНК	<i>O. felinus</i>		<i>O. viverrini</i>		
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg
miR-71a-5p	15	pyruvate metabolic process; cobalamin metabolic process; RNA metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway	Regulation of autophagy; Carbon metabolism; Citrate cycle (TCA cycle); Glycolysis / Gluconeogenesis; Pyruvate metabolism; DNA replication	10	transport; signal transduction; protein phosphorylation Phosphatidylinositol signaling system; Regulation of autophagy
miR-71b-5p	9	lipid metabolic process; transport	Inositol phosphate metabolism; Oxidative phosphorylation	7	intracellular signal transduction; signal transduction; protein phosphorylation; oxidation-reduction process FoxO signaling pathway; mTOR signaling pathway; Phosphatidylinositol signaling system
miR-76-3p	1	transport along microtubule		1	
miR-96-5p	3				
miR-133-3p	1	anaphase-promoting complex-dependent catabolic process; regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	Ubiquitin mediated proteolysis	1	

микроРНК	<i>O. felinus</i>		<i>O. viverrini</i>		
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg
miR-87-3p	14	ubiquinone biosynthetic process; L-serine metabolic process; glycine metabolic process; dephosphorylation; oxidation-reduction process; L-cysteine metabolic process	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis; Biosynthesis of amino acids; Carbon metabolism; Cyanoamino acid metabolism; Glycine, serine and threonine metabolism; Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; One carbon pool by folate; Cysteine and methionine metabolism; Taurine and hypotaurine metabolism	7	7-methylguanosine RNA capping; RNA methylation; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; dephosphorylation
miR-184-3p	13	DNA methylation; autophagy	DNA replication; RNA degradation; SNARE interactions in vesicular transport; Regulation of autophagy	1	regulation of transcription, DNA-templated

микроРНК	<i>O. felineus</i>			<i>O. viverrini</i>		
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg
miR-124-3p	14	ER to Golgi vesicle-mediated transport; nucleoside metabolic process; small GTPase mediated signal transduction; protein transport; signal transduction; nucleocytoplasmic transport; intracellular protein transport	Protein processing in endoplasmic reticulum; Butanoate metabolism; Fatty acid degradation; Fatty acid metabolism; Lysine degradation; Phenylalanine metabolism; Propanoate metabolism; Tryptophan metabolism; Valine, leucine and isoleucine degradation; Cysteine and methionine metabolism; Fructose and mannose metabolism	10	ER to Golgi vesicle-mediated transport; intracellular protein transport; DNA biosynthetic process; DNA ligation involved in DNA repair; DNA recombination; DNA repair	DNA replication; Protein processing in endoplasmic reticulum; Base excision repair; mRNA surveillance pathway
miR-190a-5p	7	homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	RNA transport	4	regulation of small GTPase mediated signal transduction; proteolysis	RNA transport
miR-190a-5p	0			1		

микроРНК	<i>O. felineus</i>		<i>O. viverrini</i>		процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	
miR-210-3p	8	microtubule-based movement; regulation of transcription, DNA-templated; double-strand break repair via nonhomologous end joining; telomere maintenance; oxygen transport	7	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; immune response; DNA metabolic process	Homologous recombination
miR-2161-3p	0		1	protein phosphorylation	
miR-219-5p	0		1		FoxO signaling pathway

микроРНК	<i>O. felineus</i>		<i>O. viverrini</i>		процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO			
miR-277a-3p	5	protein dephosphorylation	Base excision repair	1			
miR-277b-3p	0			0			
miR-278-5p	0			0			
miR-750-3p	0			1			
miR-755-3p	1	proteolysis; protein processing involved in protein targeting to mitochondrion	Protein export	1	proteolysis	Protein export	
miR-1989-5p	4			1			
miR-1992-3p	7	transcription from RNA polymerase II promoter		2		Riboflavin metabolism	
miR-2162-3p	0			0			
miR-2160a-5p	7	proteolysis	N-Glycan biosynthesis	6	small GTPase mediated signal transduction; proteolysis; signal transduction	N-Glycan biosynthesis	

микроРНК	<i>O. felineus</i>		<i>O. viverrini</i>	
	количество мРНК-мишеней	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах GO	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg	процессы, в которых могут участвовать мРНК-мишени на основании аннотации в терминах Kegg
miR-2160b-5p	5	G-protein coupled receptor signaling pathway; protein phosphorylation	Neuroactive ligand-receptor interaction	transmembrane transport; cation transport
miR-new1-5p	7	proteolysis; protein phosphorylation; translation	Ribosome biogenesis in eukaryotes	electron transport chain

Приложение 15

Уровни экспрессии микроРНК марит *C. sinensis*, *O. felineus* и *O. viverrini* в rpm (read per million)

микроРНК	<i>C. sinensis</i>	<i>O. viverrini</i>	<i>O. felineus</i>
miR-125a-5p	$3,7 \cdot 10^5$	$3,32 \cdot 10^5$	$4,81 \cdot 10^5$
miR-281-3p	$1,12 \cdot 10^5$	$7,59 \cdot 10^4$	$5,15 \cdot 10^4$
miR-71a-5p	$1,17 \cdot 10^5$	$7,23 \cdot 10^4$	$6,61 \cdot 10^4$
miR-61-3p	$7,03 \cdot 10^3$	$6,26 \cdot 10^4$	$3,53 \cdot 10^4$
miR-3479b-3p	$3,29 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$3,99 \cdot 10^4$
miR-2b-3p	$1,89 \cdot 10^3$	$6,20 \cdot 10^2$	$4,1 \cdot 10^4$
miR-277b-3p	$5,03 \cdot 10^4$	$2,94 \cdot 10^4$	$2,57 \cdot 10^4$
miR-10-5p	$2,76 \cdot 10^4$	$5,12 \cdot 10^4$	$3,55 \cdot 10^4$
miR-1b-3p	$2,47 \cdot 10^4$	$2,58 \cdot 10^4$	$1,25 \cdot 10^4$
miR-125c-5p	$2,26 \cdot 10^4$	$5,53 \cdot 10^4$	$3,22 \cdot 10^4$
miR-96-5p	$3,57 \cdot 10^4$	$1,28 \cdot 10^4$	$1,72 \cdot 10^4$
miR-745-3p	$1,5 \cdot 10^4$	$1,73 \cdot 10^4$	$1,82 \cdot 10^4$
miR-36b-3p	$2,78 \cdot 10^3$	$4,24 \cdot 10^3$	$3,25 \cdot 10^3$
miR-87-3p	$2,83 \cdot 10^3$	$1,08 \cdot 10^4$	$6,41 \cdot 10^3$
miR-124-3p	$4,52 \cdot 10^2$	$7,24 \cdot 10^3$	$2,79 \cdot 10^3$
miR-750-3p	$7,29 \cdot 10^3$	$1,25 \cdot 10^4$	$9,89 \cdot 10^3$
miR-36a-3p	$6,19 \cdot 10^3$	$2,34 \cdot 10^4$	$6,25 \cdot 10^3$
miR-1993-3p	$6,33 \cdot 10^3$	$7,45 \cdot 10^3$	$7,34 \cdot 10^3$
miR-2e-3p	$2,17 \cdot 10^4$	$6,77 \cdot 10^3$	$1,27 \cdot 10^4$
miR-7a-5p	$7,36 \cdot 10^3$	$1,11 \cdot 10^4$	$4,98 \cdot 10^3$
miR-210-3p	$8,09 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^4$	$1,31 \cdot 10^4$
miR-755-3p	$9,16 \cdot 10^3$	$7,41 \cdot 10^3$	$9,81 \cdot 10^3$
miR-7b-5p	$4,43 \cdot 10^3$	$3,90 \cdot 10^3$	$1,79 \cdot 10^3$
miR-219-5p	$1,44 \cdot 10^4$	$6,96 \cdot 10^3$	$5,79 \cdot 10^3$
miR-307-3p	$4,77 \cdot 10^2$	$1,47 \cdot 10^3$	$6,86 \cdot 10^2$
miR-9-5p	$2,5 \cdot 10^3$	$4,51 \cdot 10^3$	$5,03 \cdot 10^3$
miR-190a-5p	$6,41 \cdot 10^3$	$1,38 \cdot 10^3$	$6,15 \cdot 10^3$
miR-36c-3p	$2,16 \cdot 10^3$	$4,27 \cdot 10^3$	$4,1 \cdot 10^3$
miR-993-3p	$9,55 \cdot 10^3$	$7,26 \cdot 10^3$	$6,62 \cdot 10^3$
miR-190b-5p	$1,5 \cdot 10^4$	$5,37 \cdot 10^3$	$5,22 \cdot 10^3$
let-7a-5p	$1,48 \cdot 10^4$	$8,82 \cdot 10^3$	$4,97 \cdot 10^3$
miR-2160b-5p	$6,15 \cdot 10^3$	$7,36 \cdot 10^3$	$4,9 \cdot 10^3$
let-7c-5p	$8,79 \cdot 10^3$	$1,49 \cdot 10^4$	$4,4 \cdot 10^3$
bantam-3p	$5,46 \cdot 10^3$	$8,19 \cdot 10^3$	$3,62 \cdot 10^3$
miR-2a-3p	$1,29 \cdot 10^3$	$1,28 \cdot 10^3$	$2,04 \cdot 10^3$
miR-3479a-3p	$2,49 \cdot 10^3$	$2,21 \cdot 10^3$	$2,35 \cdot 10^3$
let-7b-5p	$2,03 \cdot 10^3$	$2,26 \cdot 10^3$	$1,32 \cdot 10^3$

микроРНК	<i>C. sinensis</i>	<i>O. viverrini</i>	<i>O. felinus</i>
miR-2161-3p	2,59*10 ³	1,79*10 ²	1,67*10 ³
miR-new1-5p	1,58*10 ²	1,18*10 ²	1,27*10 ³
miR-133-3p	4,52*10	3,62*10 ²	1,08*10 ²
miR-278-5p	2,26*10	2,45*10 ³	5,48*10 ²
miR-71b-5p	6,11*10 ³	3,49*10 ³	1,04*10 ³
miR-125b-5p	1,47*10 ³	3,26*10 ³	2,82*10 ²
miR-8-3p	2,06*10 ²	4,34*10 ²	4,37*10 ²
miR-2c-3p	1,7*10 ²	6,24*10 ²	3,52*10 ²
miR-31-5p	5,83*10 ²	3,69*10 ²	4,72*10 ²
miR-2d-3p	1,2*10 ²	8,75*10	2,62*10 ²
miR-2160a-5p	8,97*10 ²	8,79*10 ²	4,05*10 ²
miR-277a-3p	2,3*10 ³	1,71*10 ²	1,87*10 ²
miR-1a-3p	1,79*10 ²	2,25*10 ²	9,63*10
miR-1992-3p	0	3,81	3,41
miR-2f-3p	2,19*10 ²	2,63*10 ²	5,62*10
miR-1989-5p	4,79*10 ²	4,68*10 ²	1,15*10 ²
miR-184-3p	1,58*10	1,52*10	5,11
miR-76-3p	2,35*10 ²	3,04*10 ²	5,11
miR-12-5p	9,04	0	0

10 микроРНК с высоким уровнем экспрессии марируют *C. sinensis*, *O. felinus* и *O. viverrini*

<i>C. sinensis</i>		<i>O. viverrini</i>		<i>O. felinus</i>	
микроРНК	RPM	микроРНК	RPM	микроРНК	RPM
miR-125a-5p	3,7*10 ⁵	miR-125a-5p	3,32*10 ⁵	miR-125a-5p	4,81*10 ⁵
miR-71a-5p	1,17*10 ⁵	miR-281-3p	7,59*10 ⁴	miR-71a-5p	6,61*10 ⁴
miR-281-3p	1,12*10 ⁵	miR-71a-5p	7,23*10 ⁴	miR-281-3p	5,15*10 ⁴
miR-277b-3p	5,03*10 ⁴	miR-61-3p	6,26*10 ⁴	miR-2b-3p	4,1*10 ⁴
miR-96-5p	3,57*10 ⁴	miR-125c-5p	5,53*10 ⁴	miR-3479b-3p	3,99*10 ⁴
miR-3479b-3p	3,29*10 ⁴	miR-10-5p	5,12*10 ⁴	miR-10-5p	3,55*10 ⁴
miR-10-5p	2,76*10 ⁴	miR-3479b-3p	5*10 ⁴	miR-61-3p	3,53*10 ⁴
miR-1b-3p	2,47*10 ⁴	miR-210-3p	3*10 ⁴	miR-125c-5p	3,22*10 ⁴
miR-125c-5p	2,26*10 ⁴	miR-277b-3p	2,94*10 ⁴	miR-277b-3p	2,57*10 ⁴
miR-2e-3p	2,17*10 ⁴	miR-1b-3p	2,58*10 ⁴	miR-745-3p	1,82*10 ⁴

Приложение 16

Дифференциально экспрессирующиеся микроРНК *O. felineus*. LogFC – логарифм от Fold Change

