

МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БИОМАРКЕРЫ: БИОГЕНЕЗ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СТРАТЕГИИ

Тигунцев В.В.^{1,2}, Иванова С.А.², Серебров В.Ю.^{1,3}, Бухарева М.Б.³

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² НИИ психического здоровья, г. Томск

³ Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск

РЕЗЮМЕ

В данном обзоре рассмотрены история открытия, биогенез и функционирование основных групп малых некодирующих РНК у человека: микроРНК и коротких интерферирующих РНК; отмечены их сходства и различия. Обозначенные молекулы РНК ингибируют экспрессию генов на уровне трансляции посредством РНК-интерференции. МикроРНК и короткие интерферирующие РНК, как было обнаружено, циркулируют во многих биологических жидкостях и могут служить биомаркерами различных заболеваний у человека благодаря своей консервативной последовательности, тканеспецифичности, устойчивости к факторам внешней среды.

Рассмотрены применяемые методические подходы изучения искомым молекул. Эти подходы можно разделить на клонирование, биоинформатический анализ и методы гибридизации (нозерн-блот, RT-PCR, гибридизация *in situ*, анализ на микрочипах, репортерный анализ). Возможное нацеленное на микроРНК и короткие интерферирующие РНК терапевтическое вмешательство предполагает доставку в целевую ткань микроРНК, анти-микроРНК, антагомиров, микроРНК-губок либо имитаторов микроРНК посредством вирусных молекул, липосом или наночастиц.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: микроРНК, короткие интерферирующие РНК, РНК-интерференция, биомаркеры.

Введение

В последнее время все большую популярность обретает изучение малых некодирующих РНК (нкРНК). Эти небольшие одноцепочечные молекулы РНК были обнаружены у многих живых организмов и, как оказалось, вовлечены во многие физиологические и патологические процессы: клеточное развитие, пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, секрецию инсулина, биосинтез холестерина и др. [1–3]. Наиболее изученным классом являются микроРНК (миРНК), однако в этом обзоре будут также рассмотрены короткие интерферирующие РНК (киРНК).

Малые нкРНК являются регуляторами экспрессии генов на уровне трансляции. По-

сле своего открытия этот процесс был назван *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) – пост-транскрипционный сайленсинг генов, но позже данный термин стал применяться исключительно для растений, а в отношении человека и животных ввели понятие РНК-интерференции (РНКи). Определенные особенности малых нкРНК – их малая длина (20–30 нт), их связь с белками-представителями семейства Ago (*Argonaute*) и их типичный эффект отрицательной регуляции и (или) подавления экспрессии целевых генов. Исходя из этих определенных особенностей, различные классы малых нкРНК могут проводить разные и комплексные схемы генной регуляции [4]. Объем литературы по малым нкРНК продолжает расти, открываются новые их классы, такие как пвРНК (piRNA, piwi-взаимодействующие РНК), пакиРНК (gasiRNA, повтор-ассоциированные киРНК), та-

✉ Тигунцев Владимир Владимирович, e-mail: cristall2009@live.ru

киРНК (tasiRNA, транс-активные киРНК), наткиРНК (natsiRNA, киРНК с натуральным антисмысловым транскриптом), гх-киРНК (hc-siRNA, гетерохромные киРНК), мскРНК (scnRNA, малые сканирующие РНК), 21U-РНК (21-мерные РНК с 5'-уридином). Появляется все больше сведений по пвРНК набирает обороты несколько сильнее из-за их роли в защите генома зародышевой линии [5]. Многие из этих малых нкРНК были обнаружены у растений и низших беспозвоночных. Поскольку эта область молекулярной биологии сравнительно молода, многие англоязычные термины не имеют русского эквивалента. Выше мы предлагаем свои варианты названий классов нкРНК.

Открытие посттранскрипционного сайленсинга генов

Начальное открытие посттранскрипционного сайленсинга генов было совершено в 1990 г. Две группы [6,7] одновременно сообщили в журнале *The Plant Cell*, что когда они попытались сверхэкспрессировать у петунии гены *DFR* (дигидрофлавонол-4-редуктазы) или *CHS* (халконсинтазы), которые вовлечены в пигментацию цветков (путем введения трансгенов), пигментация антоцианина была значительно понижена в значительной части (~42%) трансформированных растений. Цветки были или полностью белыми, или с сильно пониженной пигментацией, показывающей новый цветовой фенотип: узорчатые цветы характеризуются маленькими розовыми неклональными клиньями в кончиках лепестков, а в противном случае – чистыми белыми цветами, бледно-пестрыми цветами со множеством маленьких неклональных секторов. Трансгенных петуний не было в любом из генотипов, продуцирующих цветы, которые были визуальнее темнее, чем генотип *parental*. Это было уникальной находкой Jorgensen и соавт., которые ввели ген *CHS* в полученные более темные петунии. Дальнейшая молекулярная характеристика трансгенных петуний выявила, что введенные трансгенные последовательности не изменились; скорее наблюдалось впечатляющее уменьшение экспрессии введенного трансгена, как и эндогенного гена. Поскольку экспрессия введенного трансгена и эндогенного гена была координационно подавлена, этот феномен был назван «косупрессия». Уже было известно, что антисмысловые РНК могли устранять экспрессию генов посредством гибридизации с эндогенными мРНК, формируя двухцепочечные РНК (дцРНК), что либо ингибирует трансляцию, либо ведет к уничтожению клеточной РНК.

Подобные косупрессии феномены были впоследствии открыты у некоторых других растений. У грибка *Neurospora crassa* трансгенно индуцированный сайленсинг гена был назван «усмирение». РТГС также может вызываться вирусами, это феномен был назван VIGS (индуцированный вирусами сайленсинг генов) [8].

Открытие микроРНК, коротких интерферирующих РНК и РНК-интерференции

Через два года после сведений о РТГС у растений из лаборатории Victor Ambros сообщили о клонировании у *Caenorhabditis elegans* гетерохронного гена *lin-4* [9]. У *C. elegans* гетерохронные гены контролируют развитие и дифференцировку генов; таким образом, гетерохронные гены – аналоги гомеотических генов многоклеточных. Lee и соавт. обнаружили, что *lin-4* не кодирует белок. Они также идентифицировали два малых транскрипта *lin-4* длиной ~22 и 61 нт. Они отметили, что эти короткие транскрипты содержат последовательности, комплементарные повторяющемуся последовательному элементу в 3'-НТО (3'-нетранслируемая область) мРНК *lin-14*. Авторы предположили, что *lin-4* отрицательно регулирует трансляцию *lin-14* через взаимодействие РНК-РНК. Следовательно, *lin-4* была первой открытой миРНК, однако термин «миРНК» появился только через несколько лет. Интересно, что об открытии РНКи, опосредованной дцРНК, сообщили до открытия второй миРНК (также у *C. elegans*) и впоследствии мира миРНК в Царстве животных.

В своей публикации Fire и соавт. [10] продемонстрировали, что инъекция дцРНК в гонады *C. elegans* приводит к сильной и специфической супрессии генов, причем на одну клетку требовалось лишь несколько молекул дцРНК. Они также обнаружили, что введение дцРНК в полость головы или хвоста приводило к специфичной и сильной интерференции с экспрессией генов в выводке потомства. По аналогии дцРНК, введенные в полость тела или гонады молодых взрослых особей, также приводили к генспецифичной интерференции в соматических тканях. Это позволяет предположить, что дцРНК-опосредованная интерференция показала неожиданную способность пересекать клеточные границы. Fire и соавт. исследовали ген *unc-22* у *C. elegans* и введенную дцРНК длиной 742 нт. Впоследствии они расширили исследование и включили много других генов. В каждом случае они наблюдали, что

введенные дцРНК приводили к генспецифичным известным немутантным фенотипам. Этот феномен «нокдауна» специфичной генной экспрессии дцРНК был назван РНК-интерференцией (РНКи).

Пока открытие РНКи у *C. elegans* дало начало характеристике и пониманию механизма РНКи, исследователи, изучающие регуляцию развития у *C. elegans* и попытавшиеся разложить на составляющие гетерохронный путь, открыли вторую миРНК (хотя еще не названную миРНК). Ruvkun и соавт. [11] сообщили, что 21 нт РНК *let-7* временным образом регулирована и комплементарна элементам в 3'-НТО гетерохронных генов *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* и *daf-12*, а экспрессия этих генов может непосредственно контролироваться *let-7*. Менее чем через год другая публикация из той же лаборатории в сотрудничестве с другими исследователями [12] показала наличие 21 нт РНК *let-7* у большого количества животных, включая позвоночных.

В конце 2001 г. три группы независимо ввели термин микроРНК (миРНК) для обозначения эндогенных малых нкРНК, которые также включают *lin-4* и *let-7* [13, 14, 15]. Эти малые РНК принадлежат к большому классу малых нкРНК, которые продуцируются эндогенно и процессируются из длинных складчатых структур. Важно подчеркнуть, что назначение термина «миРНК» состоит в разделении эндогенных малых РНК (миРНК) и малых нкРНК, выделенных из экзогенно введенных длинных двухцепочечных нкРНК (киРНК). Однако с улучшением понимания биологии миРНК и киРНК и открытием эндогенных киРНК эти отличия стали менее явными.

В конце 2001 г. идентификация некоторых важных компонентов механизма РНКи и характеристика их роли привели к пониманию механизма посттранскрипционного сайленсинга генов. Работа многих лабораторий внесла вклад в развитие этой модели РНКи. Hannon и соавт. ввели термины RISC [16] и Dicer [17]. Также в то время было показано, что пути процессинга эндогенных нкРНК (например, *let-7*) и экзогенно введенных дцРНК пересекаются [18, 19].

Биогенез и функционирование миРНК у человека

Как известно, гены миРНК транскрибируются РНК-полимеразой II [20]. В составе первичного транскрипта (pri-miRNA, прай-миРНК) имеется участок длиной ~70 нт, включающий в себя последовательность миРНК и способный формировать шпильку. Шпилька вырезается ядерной эндону-

клеазой Droscha в комплексе с белком, связывающим РНК, DGCR8 (аналог у дрозофилы – Pasha). DGCR8 ингибирует неспецифическую РНКазную активность Droscha и способствует правильному созреванию пре-миРНК (pre-miRNA). Показано, что Droscha у человека селективно расщепляет РНК-шпильку, несущие большую терминальную петлю длиной не менее 10 нт. От соединения этой петли и стебля Droscha отрезает примерно два оборота спирали дцРНК (~22 нт) и таким образом формирует один из концов зрелой миРНК [20]. Для эффективного процессинга прай-миРНК необходимо, чтобы стебель после этого сайта разрезания продолжался еще на один оборот спирали (~10–11 нт). Таким образом, сайт разрезания для Droscha определяется в основном расстоянием от терминальной петли.

При помощи белка Exportin-5 пре-миРНК переносится в цитоплазму и обрабатывается эндонуклеазой Dicer, ассоциированной с РНК-связывающим белком TRBP (аналог у дрозофилы – Loqs). В результате формируется дцРНК длиной ~22 нт, содержащая по два неспаренных нуклеотида на 3'-концах. Предполагается, что миРНК-дуплекс расплетается геликазоподобным ферментом, и затем одна из цепей дуплекса входит в состав рибонуклеопротеиновых эффекторных комплексов RISC (RNA-induced silencing complex) [16]. Согласно текущей модели выбор цепи определяется стабильностью двух концов дуплекса: та цепь, чей 5'-конец легче раскручивается, будет инкорпорирована в RISC [21, 22]. Как правило, pre-miRNA дает начало только одной стабильной зрелой миРНК, а вторая цепь подвергается деградации [23, 24]. Тем не менее экспериментально показано, что в клетках 293T, трансфицированных miR-30-предшественником, образуются две зрелые миРНК: miR-30 и анти-miR-30 (соответственно с 3'- и с 5'-плечей miR-30-предшественника) [25]. Возможно, в случае если оба конца миРНК-миРНК*-дуплекса одинаково стабильны, каждая из нитей может быть инкорпорирована в RISC.

У человека в состав комплекса RISC наряду с малыми некодирующими РНК входят белки семейства Argonaute GEMIN3 и GEMIN4 [26, 27]. Биологическая роль многих белков семейства Argonaute заключается в индукции апоптоза через механизм РНК-интерференции [28]. GEMIN3 и GEMIN4 принимают участие в пролиферации и дифференцировке клеток [29]. При полной комплементарности миРНК с мРНК происходит ее деградация посредством ускоренного деаденирования, а при неполной – взаимодействие

с 3'-НТО мРНК, что приводит к подавлению трансляции [30, 31]. Эффективность регуляции экспрессии генов определяется комплементарностью между регуляторными РНК и сайтом связывания в 3'-НТО.

Альтернативный процессинг Drosha в ядре: миртронный путь

Некоторые прай-миРНК, которые кодируются интронами, не содержат сегмент длиной 11 нт, который обычно обнаруживается в прай-миРНК и требуется для расщепления ферментом Drosha. Недостаток этого сегмента создает особенность пре-миРНК интронного транскрипта. Для обозначения пре-миРНК и интронных особенностей как определяющих характеристик Ruby и соавт. [32] ввели термин «миртроны». Миртроны были обнаружены как у *Dr. melanogaster*, *C. elegans*, так и у млекопитающих [32–34]. Первая (ядерная) фаза процессинга этих миртронов вовлекает сплайсосомы вместо Drosha. Поскольку миртроны процессируются сплайсосомами, они содержат сигналы, необходимые для процессинга сплайсосом, наподобие фланкированных 5'- и 3'-сплайс-сайтов, как и последовательности с точками ветвления. После процессинга сплайсосомами миртроны высвобождаются как петлевая структура. Петлевые миртроны сначала приобретают линейную структуру под действием девятизвучающего фермента DBR1, который гидролизует 2'-5'-фосфодиэфирную связь в точках ветвления вырезанных интронных петель. Следовательно они складываются в шпильки (pre-miRNA) для транспортировки в цитоплазму экспортином-5. Процессинг в цитоплазме следует каноничному пути Dicer [5].

Номенклатура миРНК

Текущая номенклатура миРНК следует нескольким правилам.

1. Новые открытые миРНК получают последовательные числовые идентификаторы. Например, если последняя открытая миРНК называется miR-100, следующая будет названа miR-101.

2. Трех- или четырехбуквенная приставка может быть назначена для обозначения вида. Например, hsa-miR-101 (hsa для *Homo sapiens*), dme-miR-281 (dme для *Drosophila melanogaster*). Однако видовая приставка обычно не используется в литературе.

3. Ортологичные миРНК у различных видов получают одно название. Например, hsa-miR-281 и dme-miR-281.

4. Паралогичные миРНК с одним-двумя различающимися основаниями получают суффиксы, например miR-10a и miR-10b.

5. Если идентичные миРНК происходят из отдельных локусов в данном организме, они получают числовые суффиксы. Например, miR-281-1 miR-281-2 у *Drosophila melanogaster* [35].

Биогенез киРНК и механизм РНК-интеференции, различия между миРНК и киРНК

КиРНК – двухцепочечные нкРНК, которые регулируют экспрессию генов через запуск деградации целевой мРНК. В то время как миРНК могут подавлять трансляцию и инициировать деградацию целевой мРНК, киРНК функционируют только вторым способом [5].

Как считалось ранее, киРНК первично экзогенны по происхождению и могут быть выделены из вирусов, транспозонов или трансгенов. Однако теперь известно, что некоторые дцРНК, обнаруженные в клетке, могут дать начало эндогенным киРНК. Эндогенные дцРНК продуцируются путем превращения одноцепочечной РНК в дцРНК РНК-зависимой РНК-полимеразой или альтернативно посредством транскрипции инвертированных ДНК-повторов ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Эндогенные киРНК обнаружены у *C. elegans*, *Dr. melanogaster*, млекопитающих [4].

В 1998 г. Kennerdell и Carthew [36] опубликовали работу, показывающую, что дцРНК могут запускать сильный ответ в виде РНКи у эмбрионов *Drosophila*. Tuschl и соавт. [37] создали *in vitro* систему лизата эмбрионов *Drosophila*, которая широко используется различными исследователями для биохимической и молекулярной характеристики РНКи, инициированной киРНК.

Этапы процессинга длинных дцРНК (предшественник киРНК, экзогенно введенный или эндогенно продуцируемый) посредством Dicer в цитоплазме и формирования siRISC очень похожи на таковые у миРНК. Процессинг длинной дцРНК приводит к образованию дцРНК длиной ~22 нт, каждая цепь которой имеет 3'-выступающий конец длиной 2 нт; расплетению дуплекса с использованием АТФ-зависимой хеликазной активности Dicer [38] и загрузке антисмысловой ведущей цепи в siRNA-induced silencing complex (siRISC). Как и в случае миРНК, расплетение 22 нт киРНК-дуплекса начинается с 5'-конца цепи, которая наименее термодинамически стабильна, и эта цепь действует как ведущая цепь. У *Drosophila* термодинамическое различие между двумя

цепями выявляет дцРНК-связывающий белок R2D2 (содержит 2 дцРНК-связывающих домена (R2) и связан с Dicer-2 (D2)), поддерживающий Dicer-2. R2D2 также способствует загрузке в RISC ведущей цепи. Способность siRISC к расщеплению целевой мРНК обусловлена эндонуклеазной активностью Ago2.

В отличие от миРНК, которые далеко не всегда формируют идеальный дуплекс с целевой последовательностью, киРНК требуется образовать точно соответствующий дуплекс с целевой мРНК для инициации РНКи. Ведущая цепь направляет siRISC к точно комплементарному региону целевой РНК, и Ago2-опосредованное разрезание целевой РНК происходит в области точной комплементарности. Нуклеазная активность Ago2 опосредована доменом Piwi и очень точна: Ago2 расщепляет целевую РНК между нуклеотидами, которые соответствуют ведущей цепи киРНК длиной 10 и 11 нт (по счету от 5'-конца ведущей цепи) [39]. Также Ago2 расщепляет мРНК в интервале 21–23 нт, который соответствует длине ведущей цепи [38]. Когда совершено начальное разрезание, клеточные экзонуклеазы атакуют фрагменты до полной деградации. Цель разрушается, освобождая siRISC для расщепления других целей.

В 2009 г. было сообщено о важном компоненте siRISC у *Drosophila* [40]. Посредством объединения *in vitro* RISC с Dicer2-R2D2-Ago2 и последующего сравнения его активности с или без клеточной экстракции S2, было обнаружено, что S2-экстракт значительно повышает активность RISC. Усиливающий активность RISC комплекс, очищенный от экстракта S2, состоит из двух белков: транслин (известный как яичково-мозговой связанный с РНК белок (ТВ-RBP)) и транлин-связанный фактор X (translin-associated factor X (TRAX)). Комплекс ТВ-RBP-TRAX был назван «комплекс СЗРО» (component 3 promoter of RISC), поскольку предполагается, что это третий компонент кроме Dicer2 и R2D2, который иницирует активность siRISC. Последующий анализ ступенчатого процесса активации siRISC позволил авторам определить, что СЗРО специфично усиливает расплетающую киРНК активность Dicer2-R2D2-Ago2 посредством удаления из киРНК продуктов расщепления пассажирской цепи.

Обычно не акцентируется внимание на том, что в клетках млекопитающих миРНК и киРНК загружаются в тот же РНК-индуцированный комплекс сайленсинга, где они индуцируют деградацию мРНК или трансляционный сайленсинг, зависящий от комплементарности к цели.

В противовес этому у *Drosophila* сборка miRISC и siRISC включает разные белки. Например, недостаток Ago2 у эмбрионов *Drosophila*, который ведет к невозможности индуцированной киРНК РНКи, не влияет на индуцированную миРНК РНКи. В противовес этому Ago1, который не существует для индуцированной киРНК РНКи, требуется для продукции зрелой миРНК и индуцированной миРНК РНКи [34].

Техники изучения малых нкРНК

Экспрессия малых РНК может быть исследована с использованием некоторых традиционных техник исследования экспрессии мРНК. Новые малые РНК могут быть клонированы, а их потенциальные цели могут быть идентифицированы с использованием биоинформатического анализа. Для изучения экспрессии уже известных малых РНК могут быть использованы основанные на гибридизации техники, такие как нозерн-блот, метод РНКазной защиты, RT-PCR, гибридизация *in situ* (ISH), анализ миРНК на микрочипах и репортерный анализ.

Для детекции малых РНК, выделенных из длинных предшественников посредством точного процессинга, таких как миРНК, могут быть использованы антисмысловые олигонуклеотиды той же длины с маркированным 5'-концом. Для детекции малых РНК, выделенных из длинных предшественников посредством случайного процессинга, таких как киРНК, могут быть использованы антисмысловые зонды с внутренней меткой, которые созданы путем частичного гидролиза длинных антисмысловых транскриптов РНК с внутренней меткой. Гель, используемый в нозерн-блоте малых РНК, – полиакриламидный (вместо обычного агарозного геля, используемого в нозерн-блоте мРНК). Количество общей РНК 5 мкл и более.

В противовес ISH мРНК, которые длиннее, ISH для малых РНК страдает от присущего риска потери результата, поскольку малые РНК имеют тенденцию выходить из тканей во время процессинга. Более длительная или сверхфиксация с использованием формальдегида также не является решением, поскольку она может вмешиваться в гибридизацию зондов. Рена и соавт. [41] продемонстрировали, что использование стандартной фиксации формальдегидом ведет к вещественной потере миРНК из тканей. Однако добавление этапа дополнительной фиксации с 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (EDC) помогает преодолеть проблему, поскольку EDC необратимо иммобилизует миРНК на их 5'-фосфате и не вме-

шивается в гибридизацию. Они также определили оптимальные параметры гибридизации для зондов из 130 замкнутых нуклеиновых кислот (ЗНК, locked nucleic acids, LNA) путем записи температуры плавления нуклеиновых кислот во время ISH. LNA – химически модифицированные синтетические нуклеотиды, у которых более высокая температура плавления и повышенная специфичность.

Анализ на микрочипах для малых РНК также испытывается и может давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты. Эти методы нуждаются в стандартизации, основанной на нуждах лаборатории. Различные платформы микрочипов для малых нкРНК, включающие платформы микрочипов для миРНК, на данный момент продаются коммерческими поставщиками. Эти платформы используют флуоресценцию для детекции. Косвенный метод определения экспрессии малых нкРНК – использование репортерных конструкций. Например, репортерный трансген (GFP, или lacZ), несущий 3'-НТО с последовательностью, комплементарной миРНК и (или) киРНК, вводится, и экспрессия его паттернов сравнивается с трансгеном с мутантным или удаленным сайтом комплементарности миРНК. Коэкспрессия этого «сенсора» мРНК с миРНК и (или) киРНК ведет к потере репортерной экспрессии. Этот метод также может быть использован для проверки целевых взаимодействий *in vivo* [42].

Большинство известных на данный момент миРНК были определены путем клонирования, что позволяет наиболее мощному методу открывать новые малые РНК. В своей простейшей форме такой метод включает адаптер лигирования обоих концов малых РНК. Адаптер лигированные малые РНК амплифицируются посредством RT-PCR с использованием адаптер-специфичных праймеров. Продукты ПЦР клонируются и секвенируются. Количество стартового материала 10–200 мкл (рекомендуется). Биоинформатический анализ также используется для идентификации потенциальных целей миРНК и (или) киРНК. Однако такой анализ может давать ложноположительный результат; тем не менее экспериментальное подтверждение – лучшее доказательство в этом отношении [42].

Тканеобогащенная экспрессия миРНК

Хотя все ткани содержат миРНК, уровни отдельных миРНК различаются между различными типами тканей. Например, miR-1 обогащена в мышечной и сердечной ткани, в то время как экспрессия miR-124 усилена в мозговой ткани [43]. Другие примеры тканевого обогащения миРНК

включают miR-122 в гепатоцитах, miR-142 специфична к лимфоидной ткани, miR-375 экспрессируется в панкреатических клетках, а miR-223 обнаружена в миелоидной ткани [43–46]. Экспрессия миРНК в различных тканях или клетках может также быть усилена под действием эндогенных и экзогенных стимулов. Например, let-7d, let-7e, miR-768-3p и miR-768-5p существенно положительно регулированы в фибробластах человека при окислительном стрессе, вызванном ионизирующей радиацией, H₂O₂ и этопозидом [47].

Хотя миРНК выявлены в различных тканях организма, источники внеклеточных миРНК в большинстве случаев не ясны. Согласно некоторым гипотезам, миРНК пассивно выходят или активно высвобождаются из клеток в циркуляторной системе. Обнаружено, что вышедшие миРНК связаны с белками Argonaute или в апоптотических тельцах, которые защищают миРНК от РНКазной деградации [48, 49]. Однако многочисленные доказательства поддерживают идею, что клеточные миРНК могут также быть активно секретированы в циркулирующую кровь. Активно секретлируемые миРНК обнаружены в экзосомах и микрочастицах [50, 51] или связанными с липопротеинами [52, 53]. Подобно гормонам и цитокинам секретированные миРНК могут служить как новые сигнальные молекулы в межклеточных коммуникациях [52]. Экспериментально подтвержденное тканевое обогащение миРНК предполагает не только влияние миРНК на клеткоспецифичные процессы, но и участие миРНК как диагностических биомаркеров и возможных таргетных молекул в будущих стратегиях лечения заболеваний.

МиРНК как биомаркеры

Для оценки эффективности миРНК как биомаркеров важно учесть, что они показывают удовлетворительную предсказуемость и во время болезни изменяют экспрессию. Легкость получения и выявления биомаркера в клинических образцах также важна. МикроРНК обнаружены циркулирующими во многих жидкостях человеческого тела, и их экспрессия изменяется соответственно уровню аналогичных тканевых микроРНК [54]. Внеклеточные миРНК становятся новым и многообещающим классом потенциальных биомаркеров в диагностике заболеваний человека из-за ограничений других методов и следующих преимуществ:

1. Циркулирующие миРНК показали неожиданную стабильность в различных жидкостях тела. МиРНК могут оставаться стабильными не

только в среде, богатой РНКазами, но и в экстремальных условиях, включая высокие температуры, высокий или низкий рН и циклы заморозки – разморозки [55, 56].

2. Последовательности большинства миРНК сохранены среди различных индивидов и идентифицированы в различных тканевых и клеточных типах, а сами миРНК могут легко быть обнаружены с использованием количественной ПЦР с обратной транскрипцией (qRT-PCR).

3. Экспрессия миРНК ткане- и клеткоспецифична, изменяется во время патологических процессов. Что наиболее важно, изменения уровней миРНК в циркуляции вызывают изменения в пораженных тканях.

4. Получение клинических образцов, которые содержат циркулирующие миРНК, – неивазивный и простой процесс [57].

Стратегии терапевтического вмешательства с использованием миРНК

Одна из наиболее острых проблем использования молекул РНК – их таргетная доставка в клетки. В силу своей природы молекулы РНК отрицательно заряжены и гидрофильны, следовательно, не могут сами по себе преодолеть клеточную мембрану, а в естественной среде они быстро подвергаются РНКазной деградации. Поэтому синтезируют РНК с измененной химической структурой и используют вспомогательные молекулярные комплексы для облегчения их доставки.

Методы снижения уровня миРНК, с терапевтической точки зрения, востребованы в случаях, когда миРНК играет центральную роль в патогенезе заболевания или снижает чувствительность к терапии. Например, miR-21 опосредует рост, инвазию и метастазирование опухолей и снижает реакцию их клеток на цитостатический препарат оксалиплатин [58]. Если же требуется увеличение уровня миРНК, используют вирусные и липосомные методы доставки [59, 60]. Кстати говоря, такие методы после некоторых модификаций можно использовать и для доставки киРНК [61]. Однако следует помнить, что применение вирусных методов *in vivo* ограничено высокой иммуногенностью вирусных белков, возможностью интеграции в нежелательные места генома, а также сложностью процедур производства и хранения [62].

Еще один способ доставки разработали Борисенко и соавт. [63]. Они использовали поликатионные наночастицы – производные полиэтиленамина для доставки специализированных киРНК

в клетки, пораженные вирусом простого герпеса 2-го типа. Авторы установили, что киРНК в составе использованных поликатионных комплексов *in vitro* выражено подавляют репликацию вируса и могут быть использованы при создании новых препаратов против герпесвирусов.

Если же экспрессия генов миРНК ингибирована гиперметилированием CpG-островков, возможно восстановить транскрипцию деметилирующими препаратами [64]. По-видимому, искусственное увеличение уровня миРНК в норме высоко экспрессированных и не оказывающих токсического эффекта на клетку в высоких концентрациях является одной из привлекательных идей таргетной терапии заболеваний, сопровождающихся сниженной экспрессией этих миРНК [65].

Имитаторы миРНК

В 2009 г. Wang усовершенствовал двухцепочечные малые молекулы РНК, тем самым создав имитаторы миРНК, которые служат инструментом усиления функций специфических миРНК [66]. Эти имитаторы миРНК специфически нацеливаются на мРНК схожим с миРНК способом в клетках млекопитающих. Их 5'-конец обладает мотивом, частично комплементарным 3'-UTR специфического целевого гена. Однажды проникнув в клетку, эти двухцепочечные миРНК-подобные РНК-фрагменты ингибируют трансляцию специфических целевых генов, тем самым давая генспецифичный эффект. Эта технология, кроме того, была разработана индустриальным сектором, а группа миРНК-имитаторов доступна для большинства человеческих миРНК, включая миРНК при нейродегенерации. Например, miR-153 и miR-205 нацеливаются на гены α -синуклеина и LRRK2 соответственно [67, 68], и, следовательно, возможно использовать имитаторы miR-153 и miR-205 для распутывания сети белков-целей, связанных с болезнью Паркинсона, что позволит открыть новые терапевтические цели и подходы.

МиРНК, анти-миРНК и антагомиры

Блокирование миРНК показало свои возможности в терапевтических вмешательствах. Начальные исследования фокусируются на анти-миРНК или антисмысловых олигонуклеотидах, которые блокируют эндогенные миРНК. Антисмысловой олигонуклеотид может связываться со зрелой цепью миРНК и индуцирует деградацию или стехиометрическое формирование дуплекса [69]. Hutvagner и соавт. тогда показали, что модификация антисмыслового олигонуклеотида, которая

дает начало ныне известному антагомиру, принимает участие в нуклеазной защите и повышенной аффинности к целевым миРНК [70]. Например, в замкнутой нуклеиновой кислоте рибозные кольца анти-миРНК «замкнуты» метиленовым мостом, соединяющим атомы 2'-О и 4'-С. Этот блокирующий механизм не только повышает его стабильность, но также повышает эффективность гибридизации с целевой одноцепочечной молекулой РНК [65, 71].

Используя эту технологию, Si и соавт. успешно снижали концентрацию miR-21, избыточно продуцируемой в тканях многих типов опухолей [72]. Тем же способом Koval и соавт. ингибировали miR-155, уровень которой вдвое повышается в спинальном узле у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом в модели данного заболевания на мышцах через доставку анти-miR-155 в ЦНС. Это ингибирование вызвало всеобщую репрессию целевых миРНК в перитонияльных макрофагах и повысило выживаемость [73]. Этот способ был модифицирован конъюгацией антагомира с холестерином [74].

В 2005 г. исследовательская группа под руководством Stoffel впервые ингибировала мышечную miR-122 *in vivo* путем введения конъюгированных с холестерином на 3'-конце 3', 2'-О-метилолигонуклеотидов [75]. В 2009 г. на основе ЗНК-модифицированных олигонуклеотидов разработан пока единственный таргетный лекарственный препарат миравирсен, нацеливающийся на miR-122, которая участвует в патогенезе вирусного гепатита С и необходима для репликации вируса. В настоящее время препарат проходит фазу клинических испытаний, доклинические испытания не выявили его токсических эффектов [76].

МиРНК губки, впервые обнаруженные Elbert и соавт. [77], способны ингибировать многочисленные миРНК одновременно. Например, миРНК губки с гептамерной последовательностью способны нацеливаться на целое семейство миРНК, имеющее такую же последовательность [78], тем самым осуществляя широкую репрессию миРНК. Подобно анти-миРНК и антагомирам, эти губки также могут быть использованы для нацеливания на многочисленные миРНК. В последнее время Tap и соавт. использовали miR-277 губки, чтобы блокировать опосредованную rCGG-повтором нейродегенерацию при синдроме связанного с ломкой X-хромосомой тремора и (или) атаксии (FXATS), а также нейродегенеративного расстройства с поздней манифестацией [79].

Трудности лечения миРНК

Когда речь заходит о терапии, основанной на новых лекарственных молекулах, всегда встает вопрос стабильности и иммуногенности, а также токсичности. Токсичность экзогенно поставляемых киРНК или коротких шпичечных РНК (кшРНК, short hairpin RNA, shRNA) была продемонстрирована в моделях на клеточных культурах [80] и *in vivo* [81]. В модели на клеточных культурах с использованием комбинации 176 случайно выбранных киРНК выявлено, что киРНК-индуцированная клеточная токсичность (обнаруживаемая по сниженной клеточной выживаемости) зависит от последовательностей, но не зависит от целевых нкРНК. Зависимая от последовательностей природа токсичности может быть обусловлена степенью нецелевого сайленсинга генов, вовлеченных в клеточный стресс и выживание.

Токсичность киРНК и (или) кшРНК была в деталях изучена Grimm и соавт. [82]. Они систематически исследовали длительные эффекты устойчивых высоких уровней экспрессии экзогенно управляемых кшРНК в печени взрослых мышей. А также оценили 49 отдельных кшРНК по их способности вызывать токсичность у мышей после внутривенного введения. Эти кшРНК были уникальны по последовательности, длине и направлены на шесть различных целей. Более 70% кшРНК вызывает дозозависимое повреждение печени и около 50% – гибель мышей. Не было обнаружено взаимосвязи между любой специфической последовательностью и токсичностью. Гепатотоксичность прямо коррелировала с высокими уровнями экспрессии кшРНК и отрицательной регуляцией выделенных из печени миРНК. Авторы предположили, что экзогенно введенные кшРНК и эндогенные миРНК участвуют в некоторых путях процессинга и транспорта для созревания, насыщая эти пути, особенно путь экспортина-5, тем самым вмешиваясь в биогенез и экспрессию выделенных из печени миРНК. Важность насыщения пути экспортина-5 продемонстрирована путем сверхэкспрессии экспортина-5 у этих мышей. Как результат – сайленсинг целевых миРНК, который был саботирован ранее, был спасен. Авторы предположили, что их открытия имеют фундаментальное значение для будущих РНКи-основанных стратегий у животных и человека. Однако работа показала, что риск насыщения путей малых нкРНК может быть минимизирован оптимизацией дозы и, следовательно, уровней экспрессии введенных РНК.

Вышеперечисленные методы миРНК-терапии на бумаге выглядят довольно привлекательно, однако нужно лучше понять биологию миРНК в целом, чтобы точно ответить на все появляющиеся вопросы. Например, в случае нейродегенеративных заболеваний нужно решить проблему прохождения терапевтических агентов через гематоэнцефалический барьер. Однако пара последних исследований бокового амиотрофического склероза показали, что олигонуклеотиды и миРНК могут проходить через гематоэнцефалический барьер и переходить в ЦНС, используя интратекальное вливание и желудочковый осмотический насос соответственно [83, 84].

Таким образом, микроРНК и короткие интерферирующие РНК представляют собой перспективные биомаркеры, однако на пути к их использованию в диагностических и терапевтических целях остаются нерешенные задачи.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Литература

1. *Boehm M., Slack F.* A Developmental Timing MicroRNA and Its Target Regulate Life Span in *C. elegans* // *Science*. 2005. V. 310, № 5756. P. 1954–1957.
2. *Sood P., Krek A., Zavolan M. et al.* Cell-type-specific signature of microRNAs on target mRNA expression // *PNAS USA*. 2006. V. 103, № 8. P. 2746–2751.
3. *Li M., Li J., Ding X. et al.* MicroRNA and cancer // *AAPS J.* 2010. V. 12, № 3. P. 309–317.
4. *Gbıldiyal M., Zamore P.D.* Small silencing RNAs: an expanding universe // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10, № 2. P. 94–108.
5. *Cboudhuri S.* Small Noncoding RNAs: Biogenesis, Function, and Emerging Significance in Toxicology // *J. Biochem. Molecular Toxicology*. 2010. V. 24, № 3. P. 195–216.
6. *Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R.* Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans // *The Plant Cell*. 1990. V.2, № 4. P. 279–289.
7. *van der Krol A.R., Mur L.A., Beld M. et al.* Flavonoid genes in *petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression // *The Plant Cell* 1990. V. 2, № 4. P. 291–299.
8. *Cogoni C., Macino G.* Post-transcriptional gene silencing across kingdoms // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000. V. 10, № 6. P. 638–643.
9. *Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V.* The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with anti-sense complementarity to *lin-14* // *Cell*. 1993. V. 75, № 5. P. 843–854.
10. *Fire A., Xu S., Montgomery M.K. et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. 1998. V. 391, № 6669. P. 806–811.
11. *Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M. et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. 2000. V. 403, № 6772. P. 901–906.
12. *Pasquinelli A.E., Reinhart B.J., Slack F. et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA // *Nature*. 2000. V. 408, № 6808. P. 86–89.
13. *Lau N.C., Lim L.P., Weinstein E.G., Bartel D.P.* An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* // *Science*. 2001.V. 294, № 5543. P. 858–862.
14. *Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs // *Science*. 2001. V. 294, № 5543. P. 853–858.
15. *Lee R.C, Ambros V.* An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans* // *Science*. 2001. V. 294, № 5543. P. 862–864.
16. *Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J.* An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells // *Nature*. 2000. V. 404, № 6775. P. 293–296.
17. *Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference // *Nature*. 2001. V. 409, № 6818. P. 363–366.
18. *Grisbok A., Pasquinelli A.E., Conte D. et al.* Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 2001. V. 106, № 1. P. 23–34.
19. *Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E. et al.* A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA // *Science*. 2001. V. 293, № 5589. P. 834–838.
20. *Lee Y., Kim M., Han J. et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II // *EMBO J.* 2004. V. 23, № 20. P. 4051–4060.
21. *Schwarz D., Zamore P.* Why do miRNAs live in the miRNP? // *Genes and Dev.* 2002. V. 16. P. 1025–1031.
22. *Kbvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D.* Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias // *Cell*. 2003. V. 115, № 2. P. 209–216.
23. *Bartel D.P.* MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell*. 2004. V. 116, № 2. P. 281–297.
24. *Kim V.N., Nam J.W.* Genomics of microRNA // *Trends Genet.* 2006. V. 22, № 3. P. 165–173.
25. *Zeng Y., Wagner E., Cullen B.* Both natural and designed microRNAs can inhibit the expression of cognate

- mRNAs when expressed in human cells // *Mol. Cell*. 2002. V. 9, № 6. P. 1327–1333.
26. Mourelatos Z., Dostie J., Pausbkin S. et al. miRNPs: A novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs // *Genes and Dev*. 2002. V. 16. P. 720–728.
 27. Hutvagner G., Zamore P.D. A miRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex // *Science*. 2002. V. 297. P. 2056–2060.
 28. Carmell M.A., Xuan Zh., Zhand M.Q., Hannon G.J. The argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis // *Genes and Dev*. 2002. V. 16, № 21. P. 2733–2742.
 29. Бабушкина Н.П., Кучер А.Н. Генетическая основа функционирования малых регуляторных РНК у человека // *Генетика человека и патология: сборник науч. трудов / под ред. В.П. Пузырева. Вып. 8. Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2007. С. 219–228.*
 30. Doench J.G., Petersen Ch.P., Sharp Ph.A. siRNAs can function as miRNAs // *Genes and Dev*. 2003. V. 17, № 4. P. 438–442.
 31. Lim L.P., Glasner M.E., Yekta S. et al. Vertebrate microRNA genes // *Science*. 2003. V. 299, № 5612. P. 1540.
 32. Ruby J.G., Jan C.H., Bartel D.P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing // *Nature*. 2007. V. 448, № 7149. P. 83–86.
 33. Berezikov E., Chung W.J., Willis J. et al. Mammalian mirtron genes // *Mol. Cell*. 2007. V. 28, № 2. P. 328–336.
 34. Okamura K., Hagen J.W., Duan H. et al. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila* // *Cell*. 2007. V. 130, № 1. P. 89–100.
 35. Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S. et al. MiRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature // *Nucleic Acids Res*. 2006. № 34. P. D140–D144.
 36. Kennerdell J.R., Carthew R.W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway // *Cell*. 1998. V. 95, № 7. P. 1017–1026.
 37. Tuschl T., Zamore P.D., Lehmann R. et al. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro // *Genes Dev*. 1999. V. 13, № 24. P. 3191–3197.
 38. Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals // *Cell*. 2000. V. 101, № 1. P. 25–33.
 39. Tomari Y., Zamore P.D. Perspective: machines for RNAi // *Genes Dev*. 2005. V. 19, № 5. P. 517–529.
 40. Liu Y., Ye X., Jiang F. et al. C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation // *Science*. 2009. V. 325, № 5941. P. 750–753.
 41. Pena J.T.G., Lee C.S., Roubanifard S.H. et al. miRNA in situ hybridization in formaldehyde and EDC-fixed tissues // *Nature Methods*. 2009. V. 6, № 2. P. 139–141.
 42. Aravin A., Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing // *FEBS Lett*. 2005. V. 579, № 26. P. 5830–5840.
 43. Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engle A. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs // *Nature*. 2005. V. 433, № 7027. P. 769–773.
 44. Poy M.N., Eliasson L., Krutzfeldt J. et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion // *Nature*. 2004. V. 432, № 7014. P. 226–230.
 45. Esau C., Davis S., Murray S.F., et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting // *Cell Metab*. 2006. V. 3, № 2. P. 87–98.
 46. Kbalaj M., Tavakkoli M., Stranaban A.W., Park C.Y. Pathogenic microRNA's in myeloid malignancies // *Front Genet*. 2014. V. 5, № 361. P.
 47. Simone N.L., Soule B.P., Ly D. et al. Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression. *PLoS One*. 2009. 4 (7): e6377. DOI: 10.1371/journal.pone.0006377.
 48. Wang K., Zhang S., Weber J. et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells // *Nucleic Acids Research*. 2010. V. 38, № 20. P. 7248–7259.
 49. Arroyo J.D., Chevillet J.R., Krob E.M. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma // *PNAS USA*. 2011. V. 108, №12. P. 5003–5008.
 50. Hunter M.P., Ismail N., Zhang X. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles // *PLoS ONE*. 2008. 3 (11): e3694. DOI: 10.1371/journal.pone.0003694. PMID: PMC2577891.
 51. Gallo A., Tandon M., Alevizos I., Illei G.G. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes // *PLoS ONE*. 2012. 7 (3): e30679. DOI: 10.1371/journal.pone.0030679.
 52. Valadi H., Ekstrom K., Bossios A. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // *Nature Cell Biology*. 2007. V. 9, № 6. P. 654–659.
 53. Wagner J., Riwanto M., Besler C. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein bound microRNAs // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013. V. 33, № 6. P. 1392–1400.
 54. Тигунцев В.В., Иванова С.А., Серебров В.Ю., Бухарева М.Б. Циркулирующие микроРНК открывают новый подход к диагностике и прогнозированию психических заболеваний // *Innovations and Science*. 2015. V. 4, № 1. P. 127–129.
 55. Chen X., Ba Y., Ma L. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases // *Cell*. 2008. № 18, № 10. P. 997–1006.
 56. Mitchell P.S., Parkin R.K., Krob E.M. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer

- detection // PNAS USA. 2008. V. 105, № 30. P. 10513–10518.
57. Тигунцев В.В., Иванова С.А., Серебров В.Ю., Бухарева М.Б. Достоинства и недостатки определения микроРНК как потенциальных диагностических биомаркеров // Innovations and Science. 2015. V. 4, № 1. P. 126–127.
 58. Jiang J., Zheng X., Xu X. et al. Prognostic significance of miR-181b and miR-21 in gastric cancer patients treated with S-1/Oxaliplatin or Doxifluridine/Oxaliplatin // PLoS One. 2011. 6 (8): e23271. DOI: 10.1371/journal.pone.0023271.
 59. Stegmeier F., Hu G., Rickles R.J. et al. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells // PNAS USA. 2005. V. 102, № 37. P. 13212–13217.
 60. Chung K.H., Hart C.C., Al-Bassam S. et al. Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155 // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34 (7): e53.
 61. Чехонин В.П., Цибулькина Е.А., Рябинина А.Е. и др. Иммунолипосомальные контейнеры как системы направленного транспорта малых интерферирующих РНК в шванновские клетки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. Т. 146, № 10. С. 431–434.
 62. Young L.S., Searle P.F., Onion D., Mautner V. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application // J. Pathol. 2006. V. 208, № 2. P. 299–318.
 63. Борисенко А.С., Свитиц О.А., Кривцов Г.Г. и др. Эффективность поликатионных наночастиц полиэтиленимин-полигидрокси-хитозана (ПЭИ-ПГ-ОХГ) в качестве вектора для коротких интерферирующих РНК, направленных на подавление репликации вируса простого герпеса 2 типа // Журн. микробиол. 2015. № 3. С. 31–37.
 64. Kota J., Chivukula R.R., O'Donnell K.A. et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model // Cell. 2009. V. 137, № 6. P. 1005–1017.
 65. Ширишова А.Н., Сметанина М.А., Аушев В.Н., Филипенко М.А., Кушлинский Н.Е. МикроРНК – новые перспективные биомаркеры опухолей и мишени химиотерапии. Часть 3. Терапевтическое применение микроРНК. Методы количественного определения // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2015. № 4. С. 31–39.
 66. Wang Z. miRNA mimic technology. miRNA interference technologies. Springer: Berlin, Heidelberg, 2009. P. 93–100.
 67. Doxakis E. Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by mir-7 and mir-153 // J. Biol. Chem. 2010. V. 285, №17. P. 12726–12734.
 68. Cho H.J., Liu G., Jin S.M. et al. MicroRNA-205 regulates the expression of Parkinson's disease-related leucine-rich repeat kinase 2 protein // Hum. Mol. Genet. 2014. V. 22, № 3. P. 608–620.
 69. Boutla A., Delidakis C., Tabler M. Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in Drosophila and the identification of putative target genes // Nucleic Acids Res. 2003 V. 31, № 17. P. 4973–4980.
 70. Hutvagner G., Simard M.J., Mello C.C., Zamore P.D. Sequence-specific inhibition of small RNA function // PLoS Biol. 2004. 2 (4): E98.
 71. Vester B., Wengel J. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA // Biochemistry. 2004. V. 43, № 42. P. 13233–13241.
 73. Si M.L., Zhu S., Wu H. et al. miR-21-mediated tumor growth // Oncogene. 2007. V. 26, № 19. P. 2799–2803.
 74. Weiler J., Hunziker J., Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? // Gene Ther. 2006. V. 13, № 6. P. 496–502.
 75. Krutzfeldt J., Rajewsky N., Braich R. et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs' // Nature. 2005. V. 438, № 7068. P. 685–689.
 76. Lindow M., Kauppinen S. Discovering the first microRNA-targeted drug // J. Cell Biol. 2012. V. 199, № 3. P. 407–412.
 77. Ebert M.S., Neilson J.R., Sharp P.A. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells // Nat. Methods. 2007. V. 4, № 9. P. 721–726.
 78. Xiao J., Yang B., Lin H. et al. Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination of the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 // J. Cell Physiol. 2007. V. 212, № 2. P. 285–292.
 79. Tan H., Poidevin M., Li H. et al. MicroRNA-277 modulates the neurodegeneration caused by Fragile X permutation rCGG repeats // PLoS Genet. 2012. 8 (5): e1002681. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002681. PMID: PMC3343002.
 80. Fedorov Y., Anderson E.M., Birmingham A. et al. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype // RNA. 2006. V. 12, № 7. P. 1188–1196.
 81. Calin G.A., Cimmino A., Fabbri M. et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia // PNAS USA. 2008. V. 105, № 13. P. 5166–5171.
 82. Grimm D., Streetz K.L., Jopling C.L. et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways // Nature. 2006. V. 441, № 7092. P. 537–541.
 83. Koval E.D., Shaner C., Zhang P. et al. Method for widespread microRNA-155 inhibition prolongs survival in ALS-model mice // Hum. Mol. Genet. 2013. V. 22, № 20. P. 4127–4135.
 84. Miller T.M., Pestronk A., David W. et al. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomized, first-in-man study // Lancet Neurol. 2013. V. 12, № 5. P. 435–442.

Поступила в редакцию 16.03.2016 г.

Утверждена к печати 15.03.2016 г.

Тигунцев Владимир Владимирович (✉) – студент 6-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск), лаборант-исследователь лаборатории молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья (г. Томск).

Серебров Владимир Юрьевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Иванова Светлана Александровна – д-р мед. наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья (г. Томск).

Бухарева Марина Борисовна – магистрант Национального исследовательского Томского политехнического университета (г. Томск).

✉ Тигунцев Владимир Владимирович, e-mail: cristall2009@live.ru

Сибирский государственный медицинский университет, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2, e-mail: office@ssmu.ru, тел. (382-2)-90-11-01.

НИИ психического здоровья, 634014, г. Томск, ул. Алеутская, 4, e-mail: redo@mail.tomsknet.ru, тел. (382-2)-72-43-79.

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, г. Томск, ул. Ленина, 30, e-mail: tpu@tpu.ru, тел. (382-2)-60-63-33.

SMALL NONCODING RNA AS PERSPECTIVE BIOMARKERS: BIOGENESIS AND THERAPEUTIC STRATEGIES

Tiguntsev V.V.^{1,2}, Ivanova S.A.², Serebrov V.Yu.¹, Buhareva M.B.³

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

² Mental Health Research Institute, Tomsk, Russian Federation

³ National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

The review presents the opening story, biogenesis and functions of basic groups of human's small noncoding RNA: microRNA and short interfering RNA. These RNA molecules inhibit gene expression during translation by RNA interference. It was found that microRNA and short interfering RNA circulate in biofluids and can serve as biomarkers of different human diseases because of its conservative sequences, tissue specificity and resistance to environment factors.

The paper considers techniques to study noncoding RNA (cloning, bioinformatics analysis and hybridization methods: northern-blotting, RT-PCR, in situ hybridization, microarray analysis, reporter analysis). Possible noncoding RNA-targeted therapy can suggest delivery microRNA, anti-microRNA, antagomirs, microRNA-sponges to target tissue by virus molecules, liposomes or nanoparticles.

KEY WORDS: microRNA, short interfering RNA, RNA interference, biomarkers.

Bulletin of Siberian Medicine, 2016, vol. 15, no. 2, pp. 112–126

References

1. Boehm M., Slack F. A Developmental Timing MicroRNA and Its Target Regulate Life Span in *C. elegans* // *Science*. 2005. V. 310, № 5756. P. 1954–1957.
2. Sood P., Krek A., Zavolan M. et al. Cell-type-specific signature of microRNAs on target mRNA expression // *PNAS USA*. 2006. V. 103, № 8. P. 2746–2751.
3. Li M., Li J., Ding X. et al. MicroRNA and cancer // *AAPS J*. 2010. V. 12, № 3. P. 309–317.

4. Ghildiyal M., Zamore P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10, № 2. P. 94–108.
5. Choudhuri S. Small Noncoding RNAs: Biogenesis, Function, and Emerging Significance in Toxicology // *J. Biochem. Molecular Toxicology.* 2010. V. 24, № 3. P. 195–216.
6. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans // *The Plant Cell.* 1990. V.2, № 4. P. 279–289.
7. van der Krol A.R., Mur L.A., Beld M. et al. Flavonoid genes in *petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression // *The Plant Cell* 1990. V. 2, № 4. P. 291–299.
8. Cogoni C., Macino G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000. V. 10, № 6. P. 638–643.
9. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* // *Cell.* 1993. V. 75, № 5. P. 843–854.
10. Fire A., Xu S., Montgomery M.K. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature.* 1998. V. 391, № 6669. P. 806–811.
11. Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M. et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* // *Nature.* 2000. V. 403, № 6772. P. 901–906.
12. Pasquinelli A.E., Reinhart B.J., Slack F. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA // *Nature.* 2000. V. 408, № 6808. P. 86–89.
13. Lau N.C., Lim L.P., Weinstein E.G., Bartel D.P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* // *Science.* 2001. V. 294, № 5543. P. 858–862.
14. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs // *Science.* 2001. V. 294, № 5543. P. 853–858.
15. Lee R.C., Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans* // *Science.* 2001. V. 294, № 5543. P. 862–864.
16. Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells // *Nature.* 2000. V. 404, № 6775. P. 293–296.
17. Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference // *Nature.* 2001. V. 409, № 6818. P. 363–366.
18. Grishok A., Pasquinelli A.E., Conte D. et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell.* 2001. V. 106, № 1. P. 23–34.
19. Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E. et al. A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA // *Science.* 2001. V. 293, № 5589. P. 834–838.
20. Lee Y., Kim M., Han J. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II // *EMBO J.* 2004. V. 23, № 20. P. 4051–4060.
21. Schwarz D., Zamore P. Why do miRNAs live in the miRNP? // *Genes and Dev.* 2002. V. 16. P. 1025–1031.
22. Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias // *Cell.* 2003. V. 115, № 2. P. 209–216.
23. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell.* 2004. V. 116, № 2. P. 281–297.
24. Kim V.N., Nam J.W. Genomics of microRNA // *Trends Genet.* 2006. V. 22, № 3. P. 165–173.
25. Zeng Y., Wagner E., Cullen B. Both natural and designed microRNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells // *Mol. Cell.* 2002. V. 9, № 6. P. 1327–1333.
26. Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S. et al. miRNPs: A novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs // *Genes and Dev.* 2002. V. 16. P. 720–728.
27. Hutvagner G., Zamore P.D. A miRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex // *Science.* 2002. V. 297. P. 2056–2060.
28. Carmell M.A., Xuan Zh., Zhand M.Q., Hannon G.J. The argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis // *Genes and Dev.* 2002. V. 16, № 21. P. 2733–2742.
29. Babushkina N.P., Kucher A.N. Geneticheskaya osnova funkcionirovaniya malyih regulatorynyh RNK u cheloveka [Genetic base of functioning of human small regulatory RNA]. *Genetika cheloveka i patologiya: sbornik Sb. nauch. trudov / pod red. V. P. Puzyreva, Vyip. 8. Tomsk: Izd-vo «Pechatnaya manufaktura» Publ., 2007, pp. 219–228 (in Russian).*
30. Doench J.G., Petersen Ch.P., Sharp Ph.A. siRNAs can function as miRNAs // *Genes and Dev.* 2003. V. 17, № 4. P. 438–442.
31. Lim L.P., Glasner M.E., Yekta S. et al. Vertebrate microRNA genes // *Science.* 2003. V. 299, № 5612. P. 1540.
32. Ruby J.G., Jan C.H., Bartel D.P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing // *Nature.* 2007. V. 448, № 7149. P. 83–86.
33. Berezikov E., Chung W.J., Willis J. et al. Mammalian mirtron genes // *Mol. Cell.* 2007. V. 28, № 2. P. 328–336.
34. Okamura K., Hagen J.W., Duan H. et al. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila* // *Cell.* 2007. V. 130, № 1. P. 89–100.
35. Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S. et al. MiRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature // *Nucleic Acids Res.* 2006. № 34. P. D140–D144.
36. Kennerdell J.R., Carthew R.W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and friz-

- zled 2 act in the wingless pathway // *Cell*. 1998. V. 95, № 7. P. 1017–1026.
37. Tuschl T., Zamore P.D., Lehmann R. et al. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro // *Genes Dev*. 1999. V. 13, № 24. P. 3191–3197.
 38. Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals // *Cell*. 2000. V. 101, № 1. P. 25–33.
 39. Tomari Y., Zamore P.D. Perspective: machines for RNAi // *Genes Dev*. 2005. V. 19, № 5. P. 517–529.
 40. Liu Y., Ye X., Jiang F. et al. C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation // *Science*. 2009. V. 325, № 5941. P. 750–753.
 41. Pena J.T.G., Lee C.S., Rouhanifard S.H. et al. miRNA in situ hybridization in formaldehyde and EDC-fixed tissues // *Nature Methods*. 2009. V. 6, № 2. P. 139–141.
 42. Aravin A., Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing // *FEBS Lett*. 2005. V. 579, № 26. P. 5830–5840.
 43. Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engele A. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs // *Nature*. 2005. V. 433, № 7027. P. 769–773.
 44. Poy M.N., Eliasson L., Krutzfeldt J. et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion // *Nature*. 2004. V. 432, № 7014. P. 226–230.
 45. Esau C., Davis S., Murray S.F., et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting // *Cell Metab*. 2006. V. 3, № 2. P. 87–98.
 46. Khalaj M., Tavakkoli M., Stranahan A.W., Park C.Y. Pathogenic microRNA's in myeloid malignancies // *Front Genet*. 2014. V. 5, № 361. P.
 47. Simone N.L., Soule B.P., Ly D. et al. Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression. *PLoS One*. 2009. 4 (7): e6377. DOI: 10.1371/journal.pone.0006377.
 48. Wang K., Zhang S., Weber J. et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells // *Nucleic Acids Research*. 2010. V. 38, № 20. P. 7248–7259.
 49. Arroyo J.D., Chevillet J.R., Kroh E.M. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma // *PNAS USA*. 2011. V. 108, № 12. P. 5003–5008.
 50. Hunter M.P., Ismail N., Zhang X. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles // *PLoS ONE*. 2008. 3 (11): e3694. DOI: 10.1371/journal.pone.0003694. PMID: PMC2577891.
 51. Gallo A., Tandon M., Alevizos I., Illei G.G. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes // *PLoS ONE*. 2012. 7 (3): e30679. DOI: 10.1371/journal.pone.0030679.
 52. Valadi H., Ekstrom K., Bossios A. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // *Nature Cell Biology*. 2007. V. 9, № 6. P. 654–659.
 53. Wagner J., Riwanto M., Besler C. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013. V. 33, № 6. P. 1392–1400.
 54. Tiguntsev V.V., Ivanova S.A., Serebrov V.Yu., Buhareva M.B. Cirkuliruyushchie mikroRNK otkryvayut novyj podhod k diagnostike i prognozirovaniyu psichicheskikh zabolevanij [Circulating microRNA open a new technic to diagnose and to predict mental diseases]. *Innovations and Science*, 2015, vol. 4, no. 1, pp. 127–129 (in Russian).
 55. Chen X., Ba Y., Ma L. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases // *Cell*. 2008. № 18, № 10. P. 997–1006.
 56. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection // *PNAS USA*. 2008. V. 105, № 30. P. 10513–10518.
 57. Tiguntsev V.V., Ivanova S.A., Serebrov V.Yu., Buhareva M.B. Dostoinstva i nedostatki opredeleniya mikroRNK kak potentsialnykh diagnosticheskikh biomarkorov [Advantages and disadvantages of the definition of microRNAs as potential diagnostic biomarkers]. *Innovations and Science*, 2015, vol. 4, no. 1, pp. 126–129 (in Russian).
 58. Jiang J., Zheng X., Xu X. et al. Prognostic significance of miR-181b and miR-21 in gastric cancer patients treated with S-1/Oxaliplatin or Doxifluridine/Oxaliplatin // *PLoS One*. 2011. 6 (8): e23271. DOI: 10.1371/journal.pone.0023271.
 59. Stegmeier F., Hu G., Rickles R.J. et al. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells // *PNAS USA*. 2005. V. 102, № 37. P. 13212–13217.
 60. Chung K.H., Hart C.C., Al-Bassam S. et al. Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155 // *Nucleic Acids Res*. 2006. V. 34 (7): e53.
 61. Chehonin V.P., Tsibulkina E.A., Ryabinina A.E. i soavt. Immunoliposomalnye konteynery kak sistemy napravlenogo transporta malyih interferiruyuschih RNK v shvannovskie kletki [Immunoliposomal containers as systems of forwarded transport of short interfering RNA to Schwann cells]. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2008, T. 146, no 10, pp. 431–434 (in Russian).
 62. Young L.S., Searle P.F., Onion D., Mautner V. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application // *J. Pathol*. 2006. V. 208, № 2. P. 299–318.
 63. Borisenko A.S., Svitich O.A., Krivtsov G.G. i soavt. Effektivnost polikationnykh nanochastits polietilenimin-polidgidrozid-hitozana (PEI-PG-OHG) v kachestve vektora dlya korotkih interferiruyuschih RNK, napravlennykh na podavlenie replikatsii virusa prostogo gerpesa 2 tipa [Efficiency of polycationic polyethilenimin-polyhydrazide-chitosan nanoparticles (PEI-PG-OHG) as vector for short interfering RNA to suppress replication of herpes

- simplex virus type 2]. *Zhurn. Mikrobiol. – Microbiology, Zhurn. Mikrobiol.-Microbiology*, 2015, no 3, pp. 31–37. (in Russian).
64. Kota J., Chivukula R.R., O'Donnell K.A. et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model // *Cell*. 2009. V. 137, № 6. P. 1005–1017.
65. Shirshova A.N., Smetanina M.A., Aushev V.N., Filipenko M.L., Kushlinskiy N.E. MikroRNK – novyye perspektivnyye biomarkery i opuholey i misheni himioterapii. Chast 3. Terapevticheskoe primeneniye mikroRNK. Metodyi kolichestvennogo opredeleniya [MicroRNA – new perspective tumor biomarkers and chemotherapy targets. Part 3. Therapeutic using of microRNA. Quantitative methods.]. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy himii – Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*, 2015, no. 4. pp. 31–39. (in Russian).
66. Wang Z. miRNA mimic technology. miRNA interference technologies // Springer: Berlin, Heidelberg, 2009. P. 93–100.
67. Doxakis E. Post-transcriptional regulation of alphasynuclein expression by mir-7 and mir-153 // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285, № 17. P. 12726–12734.
68. Cho H.J., Liu G., Jin S.M. et al. MicroRNA-205 regulates the expression of Parkinson's disease-related leucine-rich repeat kinase 2 protein // *Hum. Mol. Genet.* 2014. V. 22, № 3. P. 608–620.
69. Boutla A., Delidakis C., Tabler M. Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in *Drosophila* and the identification of putative target genes // *Nucleic Acids Res.* 2003 V. 31, № 17. P. 4973–4980.
70. Hutvagner G., Simard M.J., Mello C.C., Zamore P.D. Sequence-specific inhibition of small RNA function // *PLoS Biol.* 2004. 2 (4): E98.
71. Vester B., Wengel J. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA // *Biochemistry*. 2004. V. 43, № 42. P. 13233–13241.
73. Si M.L., Zhu S., Wu H. et al. miR-21-mediated tumor growth // *Oncogene*. 2007. V. 26, № 19. P. 2799–2803.
74. Weiler J., Hunziker J., Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? // *Gene Ther.* 2006. V. 13, № 6. P. 496–502.
75. Krutzfeld J., Rajewsky N., Braich R. et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs' // *Nature*. 2005. V. 438, № 7068. P. 685–689.
76. Lindow M., Kauppinen S. Discovering the first microRNA-targeted drug // *J. Cell Biol.* 2012. V. 199, № 3. P. 407–412.
77. Ebert M.S., Neilson J.R., Sharp P.A. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells // *Nat. Methods*. 2007. V. 4, № 9. P. 721–726.
78. Xiao J., Yang B., Lin H. et al. Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination of the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 // *J. Cell Physiol.* 2007. V. 212, № 2. P. 285–292.
79. Tan H., Poidevin M., Li H. et al. MicroRNA-277 modulates the neurodegeneration caused by Fragile X permutation rCGG repeats // *PLoS Genet.* 2012. 8 (5): e1002681. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002681. PMCID: PMC3343002.
80. Fedorov Y., Anderson E.M., Birmingham A. et al. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype // *RNA*. 2006. V. 12, № 7. P. 1188–1196.
81. Calin G.A., Cimmino A., Fabbri M. et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia // *PNAS USA*. 2008. V. 105, № 13. P. 5166–5171.
82. Grimm D., Streetz K.L., Jopling C.L. et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways // *Nature*. 2006. V. 441, № 7092. P. 537–541.
83. Koval E.D., Shaner C., Zhang P. et al. Method for widespread microRNA-155 inhibition prolongs survival in ALS-model mice // *Hum. Mol. Genet.* 2013. V. 22, № 20. P. 4127–4135.
84. Miller T.M., Pestronk A., David W. et al. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomized, first-in-man study // *Lancet Neurol.* 2013. V. 12, № 5. P. 435–442.

Tiguntsev Vladimir V. (✉), Siberian State Medical University, Mental Health Research Institute, Tomsk, Russian Federation.

Ivanova Svetlana A., Mental Health Research Institute, Tomsk, Russian Federation.

Serebrov Vladimir Yu., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Buhareva Marina B., National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

✉ Tiguntsev Vladimir V., e-mail: cristall2009@live.ru

Siberian State Medical University, 2, Moscow Trakt, 634050, Tomsk, e-mail: office@ssmu.ru, ph. (382-2)-90-11-01.

Mental Health Research Institute, 4, Aleutskaya St., Tomsk, 634014, e-mail: redo@mail.tomsknet.ru, тел. (382-2)-72-43-79.

National Research Tomsk Polytechnical University, 30, Lenina Ave., Tomsk, 634050, e-mail: tpu@tpu.ru, тел. (382-2)-60-63-33.