

## ПРОЦЕССЫ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ КАК МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ В НЕРВНОЙ И ИММУННОЙ СИСТЕМАХ

КАЗАКОВА Т. Б., академик РАМН КОРНЕВА Е. А.

ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН»,  
Санкт-Петербург

**Казакова Т. Б., Корнева Е. А.** Процессы РНК-интерференции как механизм регуляции активности генов в нервной и иммунной системах // Мед. академ. журн. 2009. Т. 9. № 2. С. 25–35. ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН», Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12.

Обзор посвящен анализу результатов исследования процессов РНК-интерференции в нервной и иммунной системах, структуре и функциям малых РНК, возможностям использования сиРНК и микроРНК в терапии заболеваний человека, а также ряду проблем, связанных с анализом особенностей функционирования системы сиРНК у разных организмов, природы сигналов для появления днРНК, технологических подходов к скринингу мишеней для РНК-интерференции.

**Ключевые слова:** РНК-интерференция, малые РНК, мозг, иммунная система, иРНК.

**Kazakova T. B., Korneva E. A.** RNA interference as a regulatory mechanism of genes activity in the nervous and immune systems // Med. Acad. Journ. 2009. Vol. 9. № 2. P. 25–35. Research Institute of Experimental Medicine of the RAMS, St. Petersburg, 197376.

The review is devoted to the research results of the RNA interference processes in the nervous and immune systems, the small RNAs structures and functions, the possibility in the use of the siRNAs and miRNAs in the human disease therapy, and also – to the several problems connected with analysis of the siRNAs systems particularity functioning in different organisms, nature of the signals for dsRNAs appearance, technologic approaches to the RNAi targets screening.

**Key words:** RNA interference, small RNAs, brain, immune system, RNAi

Открытие процесса РНК-интерференции, оказывающего эффект «молчания» генов под действием двунигчатой РНК (днРНК), определило развитие нового этапа современной биологии и существенно расширило понимание механизмов работы генов, показав возможность регуляции их экспрессии. Считается, что механизм РНК-интерференции с участием эндогенной днРНК – это возникшая в ходе эволюции защитная система, действующая на уровне нуклеиновых кислот и защищающая геном от вторжения чужеродных нуклеиновых кислот (вирусов) или проявления негативных функций генома (встраивание в геном так называемых «эгоистических» генов – мобильных элементов), а также процесса супрессии хроматина по типу РНК-интерференции, т. е. с образованием днРНК [3]. Вирусы на некоторых стадиях развития в клетке могут образовывать молекулы днРНК. Передвижение мобильных элементов по геному также может приводить к синтезу днРНК и вызывать мутации и хромосомные перестройки.

За открытие механизма интерференции РНК в 2006 г. Mello С. и Fire А. были награждены Нобелевской премией по физиологии и медицине [16, 4]. Это открытие было сделано ими в 1998 г. в экспериментах с инъекцией в организм нематоды мРНК, соответствующей по последовательностям присутствующей в организме червя мРНК. Было получено более выраженное, чем при использовании антисенс-РНК, ингибирование экспрессии гомологичного гена, практически блокада этого процесса. Оказалось, что

данный эффект был вызван днРНК, присутствующей в препарате в виде примеси. Инъекции антисенс-РНК или днРНК в гонады червя позволили зафиксировать слабый эффект блокирования экспрессии мРНК введением антисенс-РНК и 100% блокирование – введением днРНК, связывающейся с комплементарными последовательностями мРНК и препятствующей тем самым синтезу кодируемого мРНК белка [23]. Механизм РНК-интерференции обнаружен у червей, растений, млекопитающих и человека [24]. Открытие двунигчатых малых некодирующих РНК опровергло постулат о наличии в клетке только трех типов классических РНК: матричных (мРНК), рибосомальных (рРНК) и транспортных (тРНК) [27]. Малые некодирующие РНК участвуют в регуляции различных клеточных процессов, таких, как дифференцировка, пролиферация и функциональная активность клетки, обуславливая деградацию мРНК и подавление синтеза белка (трансляцию). Малые РНК состоят из 10–25 или 30–40 нуклеотидов, присутствуют во всех клетках и блокируют экспрессию мРНК как в цитоплазме, так и на рибосомах [27]. Всего несколько молекул малых днРНК могут блокировать большое количество молекул различных мРНК.

### ТИПЫ МАЛЫХ днРНК

**Silencing (siRNAs) – «заставляющие молчать» (cuРНК).** Показано, что в процессе инициации РНК-интерференции происходит нарезание молекул



днРНК на короткие фрагменты в 21–23 нуклеотида, получившие название «сайлинги» РНК (сиРНК, «заставляющая молчать» мРНК) [57]. Вначале днРНК вступает в комплекс с белком Dicer 2 (РНКаза III), обладающим ферментативной активностью и «нарезающим» днРНК на короткие фрагменты. Затем сиРНК соединяется с другим белковым комплексом семейства Argonaute (Ago) – комплексом RISC (РНК индуцирующий сайлинги-комплекс), в составе которого присутствует геликаза, отщепляющая одну из нитей РНК. Антисенс-РНК-нить в составе комплекса связывается с комплементарными последовательностями мРНК-мишени, разрывая ее на фрагменты и блокируя синтез белка [9] (рис. 1).

**Piwi (piRNAs) – (пиРНК), содержащаяся в Пиви-белках.** Интерференции РНК инициируют и осуществляют и другие малые РНК. У млекопитающих выделены комплексы белков Piwi (у крыс) и Piwi (у человека), содержащие короткие (29–31) последовательности нуклеотидов, получившие название пиРНК. Piwi-белки относятся к подклассу белков семейства Argonaute и регулируют созревание стволовых эмбриональных клеток. 94% пиРНК картировано в 100 определенных областях генома крысы, внутри которых пиРНК синтезируются с одной из нитей

днк [43]. В отличие от других малых РНК пиРНК синтезируются одностранными, они осуществляют посттрансляционный сайлинги мРНК-мишени, участвуют в изменении конформации хроматина и играют регулируемую роль в созревании сперматозоидов [11].

**Nucleolar (snoRNAs) – ядрышковые двуни-чатые (сноРНК).** Все эукариотические клетки содержат также малые ядрышковые РНК (10–20 нуклеотидов) (сноРНК), регулирующие модификацию рибосомальных РНК и сборку рибосом. Малые сноРНК могут формировать комплексы из одной молекулы РНК и специфического набора белков и принадлежать к 2 различным классам: 1) «C/D box», содержащий консервативные последовательности, именуемые boxes C и D, и 2) «H/ACA box», содержащий такие же консервативные последовательности [6]. Часть сноРНК кодируется одной копией генов, тогда как РНК класса 2 кодируются множеством копий. 6 сноРНК 1-го класса и 1 сноРНК 2-го класса были выделены из мозга мышей. Активная экспрессия сноРНК отмечена также в мозгу человека, где они не комплементарны рибосомальным РНК, но комплементарны мРНК, кодирующим белки, вовлеченные в процессы памяти (например, мРНК,

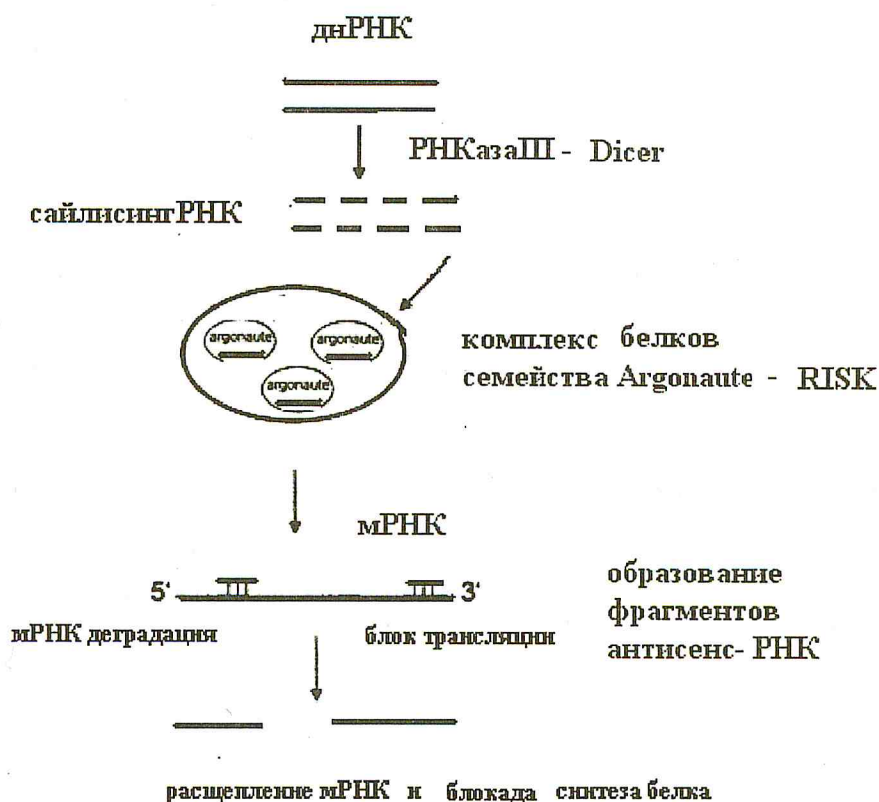


Рис. 1. Схема (изменена) процесса РНК-интерференции: двуни-чатая РНК (днРНК) вызывает «молчание» гена (Hammond S. et al., 2000).

РНКаза (Dicer) разрезает днРНК на фрагменты сиРНК.

Белковый комплекс RISC (РНК-иницирующий сайлинги-комплекс), представленный белками семейства Argonaute, отщеп-ляет одну нить РНК и доставляет вторую (антисенс) нить к комплементарным последовательностям мРНК-мишени



кодирующей рецептор 2С серотонина, связанный с процессом консолидации памяти). Модификация этих мРНК ассоциируется с нарушениями памяти и шизофренией. В мозгу человека сноРНК картируются на хромосоме в области, нарушения функций которой связывают с развитием синдрома Prader-Willi – нейро-поведенческими расстройствами, ведущими к нарушению памяти [53, 50]. Методом *in situ* гибридизации выявлены 4 сноРНК, локализующиеся в гиппокампе и амигдале, – двух областях, участвующих в реализации таких важных функций мозга, как обучение и формирование ощущения страха. Более того, 3 сноРНК из четырех более активно экспрессируются в вентральной области гиппокампа, по сравнению с интенсивностью их экспрессией в его дорзальной части, что, по-видимому, лежит в основе механизмов, обуславливающих функциональные особенности этих областей гиппокампа [31].

**Cytoplasmic (cytoRNAs) – цитоплазматические днРНК (цитоРНК).** Малые цитоплазматические днРНК (цитоРНК), обнаруженные у человека и животных, также участвуют в процессах интерференции РНК. У мышей была обнаружена цитоРНК BC1, кодируемая геном *bc1*, локализующимся на хромосоме 7 [17]. У человека охарактеризована малая цитоплазматическая РНК BC200 [59]. Структурно РНК BC200 подобна РНК BC1 мыши, которая найдена только в нервной ткани в различных количествах и в различных структурах мозга. РНК BC1 активно экспрессируется в клетках обонятельных долей, гиппокампа и нейронах коры, обнаружена также в аксонах и сомато-дендритах. РНК BC200 человека имеет ту же локализацию, экспрессируется в нейронах и транспортируется в дендриты [60]. Этот факт указывает на возможную регуляторную роль обеих малых РНК в процессах трансляции в дендритах и синапсах. РНК BC1 и BC200 образуют комплекс с белком, что приводит к снижению и замедлению умственной деятельности. BC200 РНК имеет области, комплементарные к различным мРНК, локализующимся в синапсах и кодирующим белки (возможно, белок ментальной ретардации), вовлеченные в формирование феномена синаптической пластичности, связанной с процессами обучения и памяти [69]. РНК BC1 и BC200 ингибируют сборку малых рибосомальных субъединиц на некоторых мРНК и ассоциацию с поли-А связывающим белком РАВР. Продукция BC1 РНК регулируется в динамике развития нервной системы и изменения нейрональной активности, однако механизмы регуляции этого процесса в настоящее время неизвестны. В мозгу больных болезнью Alzheimer'a наблюдается резкое уменьшение концентрации BC200 РНК, что связывают с развитием нейро-дегенеративных расстройств. Показано участие BC200 РНК в процессах

интерференции мРНК, участвующей в регуляторных процессах, влияющих на развитие злокачественных образований [47].

**MicroRNAs (miRNAs) – дн микроРНК (миРНК).** Кроме перечисленных малых РНК существует класс двунитчатых микроРНК, присутствующих в нейронах и их отростках. Известны два пути синтеза микроРНК: миРНК транскрибируется РНК полимеразой II в предшественник – пре-миРНК, которая внутри ядра ассоциируется с другими еще неизвестными факторами, образуя большой комплекс в 650 kDa, который при участии эндонуклеазы типа RNase III, называемой Droscha, или другого типа эндонуклеазы, высвобождает петлю длиной в 70 нуклеотидов, являющуюся предшественником РНК (пре-миРНК) [44]. Белок RanGTP exportin 5 транспортирует пре-миРНК в цитоплазму [67], где другая РНКаза III, Dicer, отщепляет петлю с образованием 20–22 нуклеотидного дуплекса миРНК [32]. Дуплекс миРНК включается в комплекс RISC, представленный белками семейства Argonaute, где геликаза отделяет одну нить от другой, оставляя в комплексе антисенс нить миРНК, которая и осуществляет интерференцию мРНК мишени на рибосомах или в цитоплазме [49]. Более поздние исследования показали, что белки семейства Argonaute не только участвуют в формировании комплекса с короткими фрагментами миРНК, но и играют важную роль в созревании миРНК и обеспечении их функций [18]. Одни белки этого семейства увеличивают посттранскрипционную продукцию миРНК и стабилизируют зрелые миРНК, другие (Ago2), содержащие эндонуклеазу, – специфически расщепляют одну из нитей пре-миРНК и создают петлю, состоящую из 11–12 нуклеотидов (ас-пре-miRNA). Отмечено, что при раке наблюдается низкая экспрессия Ago2. Исследования, проведенные на *Arabidopsis*, позволили выявить особенности связывания белков семейства Argonaute с малыми РНК в зависимости от их нуклеотидных последовательностей. Так, Ago1 «заякоривает» миРНК с 5'-концевым уридином, Ago2 и Ago4 – с 5'-концевым аденозином, а Ago5 – предположительно с миРНК, нуклеотидные последовательности которой начинаются с цитозина [51]. МикроРНК может действовать как на уровне синтеза РНК (транскрипции), так и на уровне синтеза белка (трансляции). Определение мишеней миРНК затруднено. Предполагается, что одна миРНК может связываться с большим количеством мРНК-мишеней [55]. Например, у мух одна миРНК может связываться в среднем с 54 мишенями, а у человека их количество может достигать 200 [34]. Показано, что эффекты действия миРНК могут зависеть и от связывания ее с множеством сайтов одной и той же мРНК-мишени. Около 30–40% всех транскриптов-мишеней имеют не один сайт связывания для миРНК. Кроме того,



мРНК могут иметь сайты для связывания нескольких миРНК и быть взаимозаменяемыми [40, 65]. Функции миРНК могут выполнять и сиРНК [20].

Около 15% из 10 000 уникальных генов дрозофилы регулируются, по крайней мере, одной миРНК, 1/5 этих мишеней может контролироваться двумя или более миРНК из различных семейств. У млекопитающих от 30 до 50% тотальных мРНК, по-видимому, контролируются миРНК [7]. Предполагается, что существует 2 вида кода миРНК [30, 66]:

- 1) миРНК в период цикла день–ночь обеспечивает на разных стадиях развития тканеспецифическую экспрессию генов и тканеспецифический профиль экспрессии белков;
- 2) другой вид кода представляет собой распределение сайтов связывания miRNA на 3'-концах мРНК.

С помощью компьютерных программ на основании знания об известных последовательностях миРНК предсказано, что общее число миРНК человека составляет, по крайней мере, 800 и только 400–500 из них могут иметь консервативные последовательности [8]. Показано, что экспрессия более 50% мРНК млекопитающих может регулироваться как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции [64]. Так как нейрональные синапсы являются местом активного синтеза белков, для модулирования генной активности в данном случае контроль над трансляцией был бы более эффективным, нежели контроль над транскрипцией. Действительно, некоторые миРНК были найдены в активно транслирующей полисомной фракции, где они могли действовать в качестве регуляторов трансляции [36].

## РОЛЬ микроРНК В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Генами-мишенями миРНК, активными в зрелой нервной системе, являются гены рецепторов нейротрансмиттеров, факторов, вовлеченных в транспорт ионов и рецепторов, ответственных за высвобождение синапсов [28]. На *C. elegans* и *Drosophila* показано, что миРНК играют существенную роль в клеточной дифференцировке и поддержании экспрессии клеточных хемо-сенсорных рецепторов в нейронах, обеспечивая лево-правую асимметрию, путем репрессии специфического (homeobox) транскрипционного фактора [34]. Показано, что миРНК дрозофилы подавляют эмбриональный апоптозис, используя в качестве мишеней мРНК про-апоптотических факторов [10].

О роли миРНК у млекопитающих известно мало. Одни миРНК экспрессируются в нейронах, другие – в астроцитах, где миРНК регулируют дифференцировку клеток-предшественников. В процессе фор-

мирования мозга от 20 до 80% дифференцированных клеток дегенерирует. При этом экспрессия многих миРНК резко возрастает. Однако роль миРНК не ограничивается стадиями развития нервной системы, они функционируют во взрослом мозге, где осуществляют местную регуляцию трансляции мРНК, играя важную роль в формировании аксона, развитии синапса и нейрональной пластичности [56, 42, 14]. Дифференцировка нейронов и формирование синапсов характеризуются определенным набором миРНК.

Показано, что микроРНК-21 действует как анти-апоптотический фактор при высокой степени малигнизации рака мозга – глиобластоме [12].

МикроРНК-124а, инъецируемая в клетки HeLa, вызывает *down*-регуляцию более 100 мишеней мРНК и индуцирует новый профиль экспрессии, свойственный зрелому нейрону [46].

МикроРНК-132 (miR-132) и микроРНК-219 (miR-219) регулируют экспрессию генов, отвечающих за циркадный период [13]. Экспрессия гена miR-219 регулируется в период смены дня и ночи, а miR-219 играет роль в регуляции длины циркадного дня. Экспрессия гена miR-132 является светоиндуцибельной, и miR-132 модулирует период восприимчивости к свету. Выключение miR-219 удлиняет циркадный период, а выключение miR-132 – ухудшает влияние эффектов света на суточный ритм. Обе малые РНК функционируют в супрахиазматическом ядре гипоталамуса. Предсказано около 47 мишеней мРНК для miR-132 и 32 мишени мРНК – для miR-219.

МикроРНК-134 экспрессируется в гиппокампе, гиппокампальных дендритах, где контролирует местный синтез белка. При «созревании» мозга ее экспрессия возрастает.

МикроРНК-134 (miR-134) регулирует размер дендритных выростов, выпячивание дендритов, представленных на мембране нейронов, отвечает за увеличение количества синапсов [41]. По утверждению Greenberg's, если один нейрон формирует тысячи синапсов, то селективный контроль над формированием одного синапса без влияния на другие значительно увеличил бы хранилище информации и вычислительный объем мозга [цит. по 41]. Когда нейроны подвержены воздействию miR-134, размер выростов дендритов и количество синапсов значительно уменьшаются. При ингибировании экспрессии miR-134 размер выпячивания выростов дендритов возрастает, увеличивая количество синапсов (рис. 2).

В основе регуляторного действия miR-134 лежит ее способность ингибировать экспрессию гена *Limk1*, ответственного за формирование пластичности гиппокампальных синапсов и рост дендритных выростов. Потеря *Limk1* обуславливает возникнове-



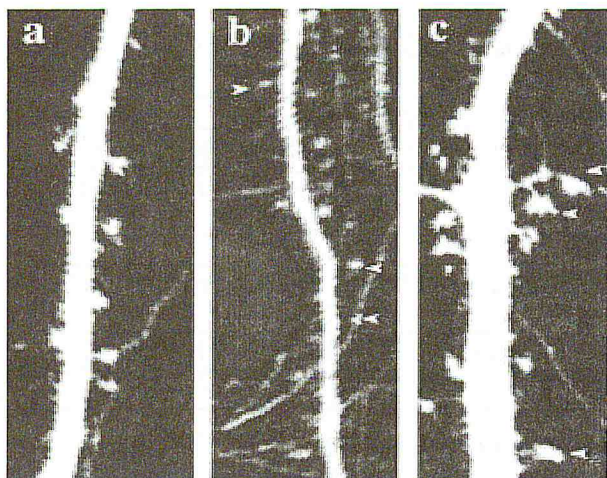


Рис. 2. miR-134 регулирует размер дендритных выростов (Greenberg et al., 2006).

а – выросты дендритов нейрона в гиппокампе крыс в состоянии перед изменениями, вызванными экспрессией miR-134; б – уменьшение размера выростов дендритов при увеличении уровня miR-134; в – увеличение размера выростов дендритов после супрессии miR-134

ние Williams-синдрома. Когда на нейроны действует ростовой фактор (brain-derived neurotrophic factor – BDNF), влияние miR-134 прекращается и ген *Limk1* снова становится активным, усиливая рост дендритных выростов. Активация *Limk1* BDNF включает синтез белков, нарушенный при бугорчатом склерозе и синдроме хрупкости хромосом (Fragile X) [45].

МикроРНК-134 отвечает также за нарушения ментальной ретардации и аутизм.

Механизм действия микроРНК еще неясен, в том числе и в связи с использованием различных технологических подходов для его исследования. Возможно, существует множество механизмов, с помощью которых микроРНК блокируют экспрессию генов, или же существует один общий механизм, а множественные эффекты их действия являются вторичными [22]. В результате микроРНК играют важную роль в патогенезе многих заболеваний человека: нейродегенерции, раке, нарушениях метаболизма, проявлении вирусных инфекций.

**Синдромы, обусловленные интерферирующим действием микроРНК в нервной системе:**

- 1) Tourette's-синдром – нейропсихиатрическое нарушение, характеризующееся судорожными сокращениями голосовых и двигательных мышц [46];
- 2) DiGeorge-синдром, характеризующийся различными дефектами, приводящими к развитию шизофрении, состояния навязчивых неврозов [28];
- 3) Fragile X-синдром хрупкости хромосомы, связанный с нарушением памяти, вызван увеличением содержания miR-134, ингибирующей экспрессию гена *Limk1*, кодирующего белки, синтез которых нарушается и при бугорчатом склерозе [45];

4) Williams-синдром обусловлен увеличением содержания miR-134 и потерей *Limk1*.

Гены, кодирующие в нейронах микроРНК, комплексы белков с микроРНК, и сами микроРНК, функционирующие в дендритах, отвечающие за их рост и вызывающие данные заболевания, в настоящее время определены.

Таким образом, некодирующие РНК необходимы для развития и функционирования мозга. Они вовлечены в механизмы формирования синаптической пластичности. Аномалии в экспрессии некодирующих РНК обуславливают различные дисфункции мозга у человека, что позволяет считать их возможными мишенями для терапии ряда заболеваний. Удаление гена определенной микроРНК приводит к нарушениям в нервной и иммунной системах, развитию злокачественных заболеваний, нарушениям деятельности сердца, легких и развитию других негативных изменений.

**РОЛЬ микроРНК В ИММУННОЙ СИСТЕМЕ**

МикроРНК играют важную роль в регуляции функций иммунной системы [52]. В табл.1 представлены возможные эффекты действия микроРНК, предсказанные на основании компьютерного анализа молекулярной структуры микроРНК, функционирующих в иммунной системе, и обозначены возможные мишени их действия у млекопитающих [8]. Так, микроРНК-125b участвует в регуляции иммунного ответа [61]. МикроРНК-155 регулирует активность генов цитокинов, хемокинов и транскрипционных [15]. Исследования факторов, играющих ключевую роль в механизмах реализации функций иммунной системы у мышей, позволили установить, что недостаток *bic/microRNA-155* (у мышей и *Bic/microRNA-155* – у человека), необходимой для обеспечения нормальной функции Т- и В-лимфоцитов и дендритных клеток, приводит к развитию иммунодефицита [54].

Наиболее подробно изучена роль микроРНК-155 (miR-155), регулирующей процессы, протекающие в нервной и иммунной системах.

Впервые в мире Шарпом были получены *knockout*-мыши, дефицитные по микроРНК-155-гену (у мышей – *bic/miR-155*, у человека – *Bic/miR-155*), которые не могли противостоять инфекциям и формировать иммунный ответ на заражение бактериями типа *Salmonella typhimurium*, что приводило к возникновению гастроэнтерита [54]. У них также развивались симптомы, схожие с аутоиммунными нарушениями. У *knockout* по *bic/miR-155* мышей наблюдается выраженное изменение состава крови (рис. 3). Нарушается также способность CD4<sup>+</sup> Т-клеток синтезировать цитокины, В-клеток – производить антитела, дендритных клеток – представлять чуже-



Предсказанные мишени мРНК в иммунной системе млекопитающих  
(Bentwich I., 2005)

миРНК	5' мишени миРНК	Предсказанные миРНК мишени
miR-125b, miR-125a	CCCUGAG	HIV-1 Inducer of short transcripts binding protein; Lymphoma Related Factor
miR-20, miR-106	AAAGUGC	B cell CLL/Lymphoma 11B isoform 2; B cell Lymphoma/Leukemia 11B; zinc finger protein HRIT1-a
miR-20, miR-106	AAAGUGC	Interleukin-17E precursor
miR-124a	UAAGGCA	TFE2-a; Ig Enhancer Binding Factor (E12/E47); TCF-3; Ig TF-1; IITF-1; kE2 binding factor
miR-141, miR-200b	AAUACUG	Transcription Factor 8; Negative Regulator of IL-2 (NIL-2-A zinc finger protein)
miR-27b, miR-183	CCAGUGU	B cell Translocation Gene 1 Protein (BTG1)
miR-30a, miR-30D, miR-30E	GUAAACA	B cell Lymphoma 9 Protein (BCL9); Legless homolog
miR-25, miR-92	AUUGCAC	Early Activation Antigen CD69; Early T cell Activation Antigen p60; GP32/28; LEU-23; MLR-3; EA1; BL-AC/P26; Activation Inducer Molecule (AIM)
miR-130a, miR-23b	GAAAUGU	Interferon Regulatory Factor 1
miR-124a	UAAGGCA	LPS-induced TNF-a factor; p53-induced Protein 7
miR-181a, miR-221	UGGUCCC	T cell Surface Glycoprotein CD4 precursor; T cell Surface Antigen T4/LEU-3
miR-20, miR-18	AAAGUGC, AAGGUGC	Runt-related Transcription Factor 1; acute myeloid leukemia 1 (aml1) oncogene; (RUNX1)
miR-19	GUGCAA	Runt-related Transcription Factor 1; acute myeloid leukemia 1 (aml1) oncogene; (RUNX1) phosphatase and tensin homolog (PTEN); mutated in multiple advanced cancers 1
miR-16	AGCAGCA	B cell CLL/Lymphoma 2 (BCL2), nuclear gene encoding

родные белки клеткам иммунной системы и активировать развитие иммунного ответа Т-клеток [54]. Методом *microarray* ДНК показано, что активность более 150 генов с широким диапазоном биологических функций нарушается у мутантов по миРНК-155, в частности страдает и ген *c-Maf*, который в норме усиливает продукцию цитокинов и является критичным для функционирования Т-клеток. Дефицит *miRNA-155* вызывает различные заболевания, например заболевания легких.

Ген *Vic/miRNA-155* человека, на 96% идентичный мышинному, связан с заболеваниями иммунной системы.

МиРНК-203 принимает участие в регуляции процессов дифференцировки клеток эпидермиса. Мишенью для миРНК-203 у позвоночных служит белок *p63*, являющийся регулятором стабильности стволовых клеток в эпителиальных тканях. МиРНК-203 ингибирует экспрессию мРНК, кодирующую данный белок [68, 58].

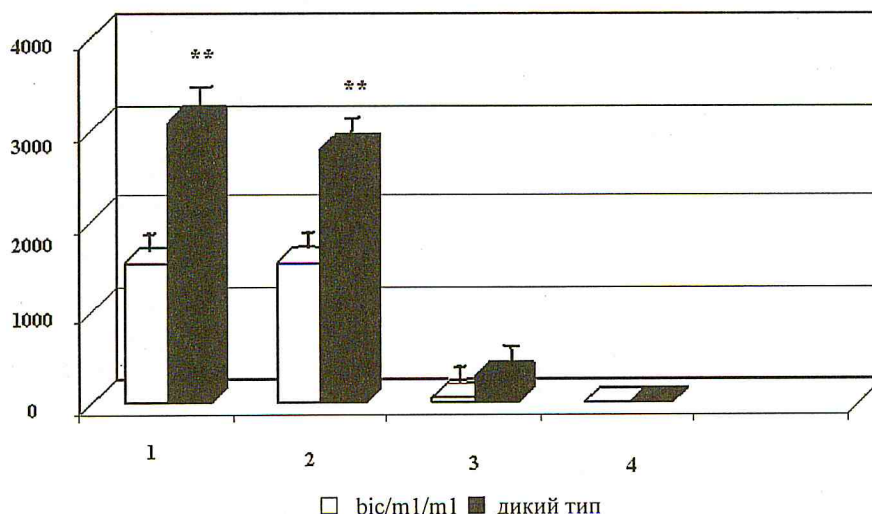


Рис. 3. Количество клеток крови у мышей BAL дикого типа и мутантных по *bic/microRNA-155* (Rogrigues et al., 2007)



## ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАЛЫХ РНК В ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

В 2003 г. в Вашингтоне прошла 10-я конференция Организации индустрии биотехнологии, на которой было принято решение о выделении шести миллиардов долларов на биотехнологические исследования, в том числе и на применение новых технологий, основанных на принципе РНК-интерференции [5].

Исследования с использованием малых РНК, с целью изучения молекулярных механизмов патогенеза инфекционных заболеваний и возможного их лечения, получили в настоящее время широкое распространение [19].

В качестве одной из удобных моделей для изучения роли малых РНК в процессах интерференции и выявления мишеней их действия были выбраны стволовые клетки человека, являющиеся предшественниками гематopoэтических клеток [14], а объектом исследований – вирус иммунодефицита человека (HIV) [38]. Известно, что Т-клетки и макрофаги являются первичной мишенью для вируса иммунодефицита человека [38].

Показано, что клетки иммунной системы экспрессируют антиHIV сиРНК, которые затем поступают в стволовые клетки, изменяя их генетически (рис. 4). В результате стволовые клетки формируют устойчивые к инфекции HIV Т-клетки и макрофаги. Последовательности, кодирующие антиHIV сиРНК, встраивали в лентивирусный вектор, первоначально возникший из вируса HIV, нейтрализованного методом геной инженерии. Вектор с антиHIV сиРНК доставляли к выделенным стволовым CD34<sup>+</sup>-клеткам, которые дают начало Т-клеткам и макрофагам. Затем эксперимент продолжили двумя путями [38]:

- 1) часть клеток культивировали в присутствии цитокинов, побуждающих стволовые клетки дифференцироваться и производить зрелые макрофаги, экспрессирующие антиHIV сиРНК;
- 2) часть стволовых клеток инъецировали мышши с иммунодефицитом, известным как SCID-hu, которой перед этим имплантировали ткани тимуса и печени человека. У этих мышшей CD34<sup>+</sup>-клетки созревали до Т-клеток, как это происходит и у человека. Оба эксперимента дали одинаково положительный результат. Стволовые клетки продолжали продуцировать устойчивые к вирусу макрофаги и Т-клетки.

Таким образом, оба варианта эксперимента дают один и тот же результат – формируется устойчивость иммунной системы мышши к вирусу HIV.

Эта модель дает уникальную возможность изменить характер функционирования клеток тканей человека в организме животного. Таким образом, появилась новая технология защиты иммунной системы от вируса HIV и надежда на возможность борьбы с

другими инфекциями, а также с диабетом и многими другими заболеваниями.

Уже получены библиотеки интерферирующих РНК для стратегии скрининга РНК-мишеней определенных генов [33], которые делятся на два типа: 1-й тип – короткие двуничатые РНК в составе плазмидных или вирусных векторов, 2-й тип – сиРНК, полученные синтетическим путем или после обработки кДНК РНКазой III.

Выбор методических подходов к скринингу мишеней для РНК-интерференции осуществляется различными путями:

- а) клетки с геном «интереса» вносятся в отдельные лунки и проводится трансфекция или инфекция синтетическими сиРНК, короткими двуничатыми РНК (shRNAs) в составе плазмиды или упакованными в вирус. После чего различными методами анализируется фенотип клеток: измерением степени люминисцентности, скорости заживления ран, моделированием подвижности клеток, измерением функции протеосом, используя флуоресцентно-меченую плазмидную репортерную систему и микроскопический анализ для измерения митотической прогрессии.
- б) микроаррей клеток с помощью интерферирующих РНК. Для этого плазмиды, экспрессирующие сиРНК или shRNAs, помещают на плато с необходимыми для трансфекции компонентами и супернатантом экспрессирующего shRNAs лентивирусного вектора. После этого клетки помещают на плато, где и происходит их трансфекция или инфекция. Регистрируют полученный эффект РНК-интерференции на поведение клеток и выявляют положение действия малых РНК и их мишени;
- в) скрининг пула библиотеки множества генов. С этой целью множество shRNAs экспрессирующих векторов вводится в клетки, которые затем подвергаются воздействию селективных агентов, например молекулярных ингибиторов. Плазмиды, обнаруженные в выживших клетках, идентифицируют методом амплификации кДНК, ее сиквенса или микроаррей анализа ДНК.

Существует вероятность встраивания конструкций сиРНК в хромосому и возможность клетки постоянно продуцировать новые сиРНК [33].

Метод РНК-интерференции может быть применен в терапевтических целях [19, 37]. Техника РНК-интерференции (внутриклеточное выключение экспрессии генов) применяется при иммунотерапии рака [48], подавлении репликации ДНК вируса гепатита В введением конструкции плазмиды, содержащей сиРНК. Получены положительные результаты при исследовании молекулярных механизмов инфлюэнции, СПИДа [62], при гипертрофии кардиомиоци-

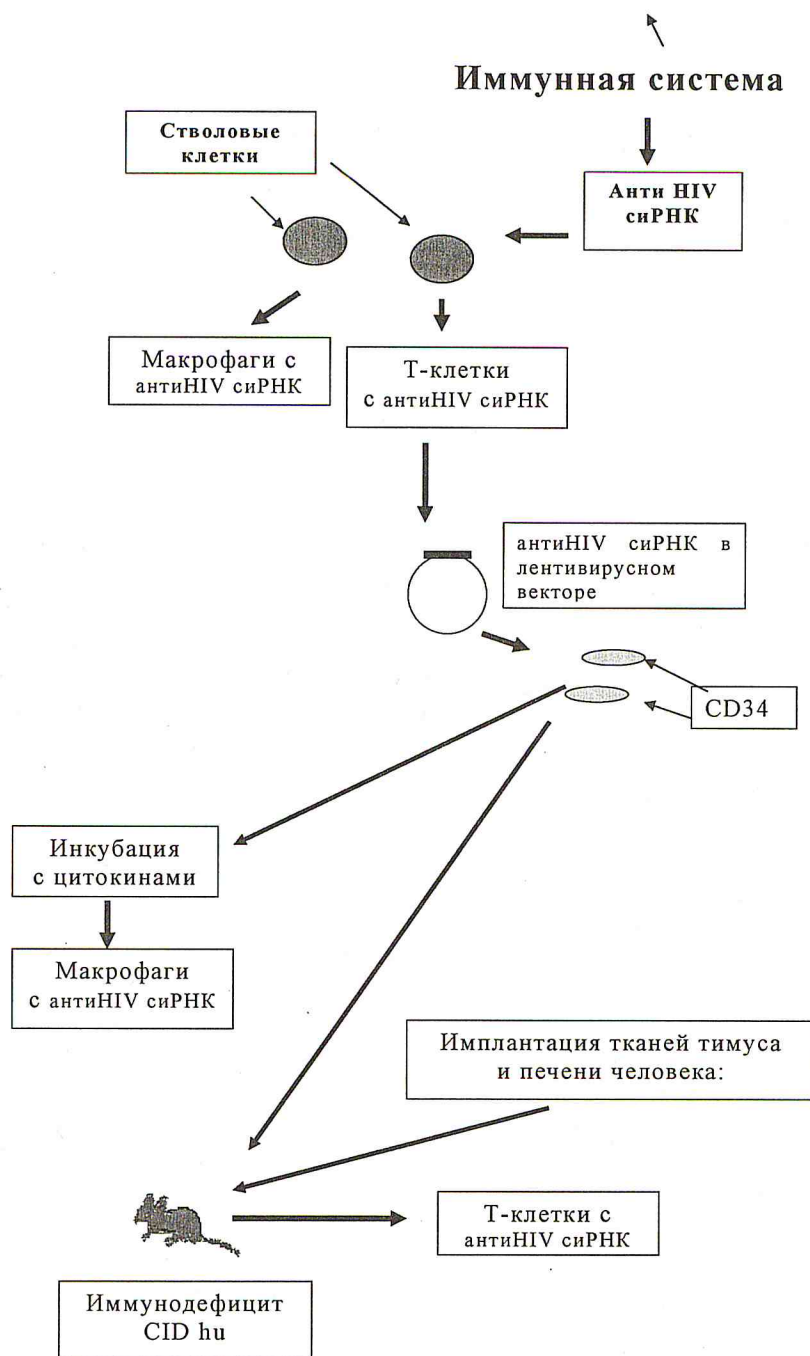


Рис. 4. Схема эксперимента с введением антиHIV сиРНК в стволовые клетки мыши

тов, фиброзе и экспрессии  $\beta$ -тяжелой цепи миозина в ответ на стресс, гипотиреозе и других заболеваниях [63]. Этот метод несет в себе потенциал применения в лечении широкого круга болезней, таких, как наследственные заболевания, гиперхолестеринемия и макулодистрофия сетчатки глаза, вирусные инфекции, и, как установлено, может быть использован для повышения эффективности лечения рака [25]. В 2006 г. американская фармацевтическая фирма «Sirna» начала клинические испытания первого лекарственного препарата «Sirna-027», механизм действия которого основан на процессе РНК-ин-

терференции [1]. «Sirna-027» – это специфическая микроРНК, помогающая при возрастной макулярной дегенерации сетчатки. Механизм РНК-интерференции в 10 тысяч раз повышает эффективность лечения раковых опухолей, поражающих легкие, противораковым препаратом «Таксол». Проанализировав 21 тысячу генов, выявили 87, которые изменяют чувствительность раковых клеток к химиотерапии, и 6 – к Таксолу [1]

Однако кратковременность действия сиРНК, ее нестабильность, сложность доставки в определенные клетки в целостном организме, а также чувстви-



тельность к нуклеазам ограничивают возможность использования сиРНК для терапии заболеваний человека.

Существует ряд вопросов, наиболее четко изложенных в обзоре Григоровича [3]: «Как осуществляются все эти функции siRNA, каковы их молекулярные детали? Откуда, например, может появляться та необходимая для запуска реакции РНК-интерференции молекула двухцепочечной РНК? Если она создается в клетке «намеренно», то какие ферменты отвечают за ее создание? Какие свойства сигнализируют о том, что молекула одноцепочечной РНК «не своя» или ошибочная и подлежит уничтожению? Каковы особенности функционирования системы siRNA у разных организмов, и почему они возникли именно в таком виде? Как появляются siRNA в клетке млекопитающих, у которых пока не выявлены ферменты, ответственные за достраивание второй цепочки siRNA?».

Вместе с тем недавно было показано, что сиРНК различного происхождения, имеющие 21 нуклеотидную последовательность, могут, не проникая в клетку, связываться непосредственно с Toll-подобными рецепторами на ее мембране, что ведет к димеризации и активации внутриклеточного пути трансдукции сигнала через трансфактор NFκB. В результате трансфактор активирует экспрессию генов интерферона гамма и интерлейкина-12, являющихся вероятными агентами антиангиогенеза [39]. Следовательно, сиРНК могут действовать не только через механизм РНК-интерференции, что открывает дополнительные возможности их использования в терапии [39, 35].

Таким образом, клиническое использование механизма РНК-интерференции с помощью введения си- или миРНК требует дальнейших исследований, уточнений степени стабильности вводимых малых РНК, анализа возможных побочных эффектов, изучения механизмов нахождения мишеней и т. д.

Открытие ранее неизвестного явления и, частично, РНК-интерференции, механизмов ее реализации, является важнейшим достижением последнего десятилетия, открывающим новые возможности для понимания молекулярных и клеточных механизмов процессов онтогенетического развития и функционирования клеток организма и изменения их свойств, а также использования миРНК как медиаторов повышения чувствительности к лекарственным препаратам в терапевтических целях.

#### Литература

1. Авилон С. РНК-интерференция против «неправильных» генов // «Вокруг Света»: Генетический форум «Как заставить молчать гены? РНК-интерференция». 2007. 3 с. <http://geneforum.ru/login.php>
2. Вильгельм А.Э., Чумаков С.П., Прасолов В.С. Интерференция РНК: биология и перспективы применения в биомедицине и биотехнологии // Мол. биол. 2006. Т. 40. С. 387–403.
3. Григорович С. GenoTerra: Информационно-аналитическое издание о генетике. 2007. <http://genoterra.ru/news/view/18/776>
4. Клёнов М.С. Лауреаты Нобелевской премии 2006 года по физиологии и медицине / Э. Файер и К. Мэллоу // Природа. 2007. № 1. С. 76–79.
5. Appasani K. Global enthusiasm for RNA interference // Curr. Drug. Discovery. 2004. P. 32–34.
6. Bantounas I., Phylactou L.A., Uney J.B. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems // J. Mol. Endocrinol. 2004. Vol. 33. P. 545–557.
7. Bentwich I., Avniel A., Karov Y. et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs // Nat. Genet. 2005. Vol. 37. P. 766–770.
8. Bentwich I. Prediction and validation of microRNAs and their targets // FEBS Lett. 2005. Vol. 579. P. 5904–5910.
9. Bernstein E., Caudy A., Hammond S., Hannon G. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference // Nature. 2001. Vol. 409. P. 363–366.
10. Brennecke J., Hipfner D.R., Stark A. et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila // Cell. 2003. Vol. 113. P. 25–36.
11. Carthew R.W. A new RNA dimension to genome control // Science. 2006. Vol. 313. P. 305–306.
12. Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells // Cancer Res. 2005. Vol. 65. P. 6029–6033.
13. Cheng H.-Y.M., Papp J.W., Varlamova O. et al. MicroRNA modulation of circadian-clock period and entrainment // Neuron. 2007. Vol. 54. P. 813–829.
14. Cheng L.C., Tavazoie M., Doetsch F. Stem cells: from epigenetics to microRNAs // Neuron. 2005. Vol. 46. P. 363–367.
15. Couzin J. Erasing microRNAs reveals their powerful punch // Science. 2007. Vol. 316. P. 30.
16. Daneshmandi B. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006, Advanced Information // Nobelförsamlingen, The Nobel Assably at Karolinska Institutet. 2006.
17. DeChiara T.M., Brosius J. Neural BC1 RNA: cDNA clones reveal nonrepetitive sequence content // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 8. P. 2624–2628.
18. Diederichs S., Haber D.A. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression // Cell. 2007. Vol. 131. P. 1097–1108.
19. Dillon Ch.P., Sandy P., Nencioni A. et al. RNAi as an experimental and therapeutic tool to study and regu-



- late physiological and disease processes // *Ann. Rev. Physio.* 2005. Vol. 67. P. 147–173.
20. Doench J.G., Petersen Ch.P., Sharp P.A. siRNAs can function as miRNAs // *Genes. Dev.* 2003. Vol. 17. P. 438–442.
  21. Doench J.G., Sharp P.A. Specificity of microRNA target selection in translational repression // *Genes Dev.* 2004. Vol. 18. P. 504–511.
  22. Eulalio A., Huntzinger E., Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing // *Cell.* 2008. Vol. 132. P. 9–14.
  23. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature.* 1998. Vol. 391. P. 806–811.
  24. Fire A. RNA-triggered gene silencing // *TIG.* 1999. Vol. 15. P. 358–363.
  25. Giese K. siRNA as a route to new cancer therapies // *Curr. Drug. Discovery.* 2004. P. 25–28.
  26. Gregory R.I., Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer // *Cancer Res.* 2005. Vol. 65. P. 3509–3512.
  27. Großhans H., Filipowicz W. The expanding world of small RNAs // *Nature.* 2008. Vol. 451. P. 414–416.
  28. Grun D., Wang Y.L., Langenberger D., Gunsalus K.C., Rajewsky N. microRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets // *PLoS Comput. Biol.* 2005. P. 1:e13.
  29. Hammond S., Bernstein E., Beach D., Hannon G. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells // *Nature.* 2000. Vol. 404. P. 293–296.
  30. Hobert O. Common logic of transcription factor and microRNA action // *Trends Biochem. Sci.* 2004. Vol. 29. P. 462–468.
  31. Huttenhofer A., Kiefmann M., Meier-Ewert S. et al. RNomics: an experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, non-messenger RNAs in mouse // *EMBO J.* 2001. Vol. 20. P. 2943–2953.
  32. 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. Vol. 293. P. 834–838.
  33. Iorns E., Lord C.H.J., Turner N., Ashworth A. Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery // *Nature.* 2007. Vol. 6. P. 556–568.
  34. Johnston R.J., Hobert O. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans* // *Nature.* 2003. Vol. 426. P. 845–849.
  35. Kalluri R., Kanasaki K. Generic block an angiogenesis // *Nature.* 2008. Vol. 452. P. 543–545.
  36. Kim J., Krichevsky A., Grad Y. et al. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101. P. 360–365.
  37. Kim D.H., Rossi J. RNAi mechanisms and applications // *BioTechniques.* 2008. Vol. 44. P. 613–616.
  38. Kitabwalla M., Ruprecht R.M. Clinical implications of basic research // *N. Eng. J. Med.* 2002. Vol. 347. P. 1364–1367.
  39. Kleinman M.E., Yamada K., Takeda A. et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3 // *Nature.* 2008. Vol. 452. P. 591–597.
  40. Kloosterman W.P., Wienholds E., Ketting R.F., Plasterk R.H. Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo // *Nucleic. Acids. Res.* 2005. Vol. 32. P. 6284–6291.
  41. Kosik K.S. The neuronal microRNA system // *Nature Rev. Neuroscience.* 2006. Vol. 7. P. 911–920.
  42. Kosik K.S., Krichevsky A.M. The Elegance of the MicroRNAs: A Neuronal Perspective // *Neuron.* 2005. Vol. 47. P. 779–782.
  43. Lau N.C., Seto A.G., Kim J. et al. Characterization of the piRNA complex from rat testes // *Science.* 2006. Vol. 313. P. 363–372.
  44. Lee Y., Ahn C., Han J. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing // *Nature.* 2003. Vol. 425. P. 415–419.
  45. Lewis B.P., Shih I.H., Jones-Rhoades M.W. et al. Prediction of mammalian microRNA targets // *Cell.* 2003. Vol. 115. P. 787–798.
  46. Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engele P. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs // *Nature.* 2005. Vol. 433. P. 769–773.
  47. Lukiw W.J., Handley P., Wong L. et al. BC200 RNA in normal human neocortex, non-Alzheimer dementia (NAD), and senile dementia of the Alzheimer type (AD) // *Neurochem. Res.* 1992. Vol. 7. P. 591–597.
  48. Mao C.P., Hung C.F., Wu T.C. Immunotherapeutic strategies employing RNA interference technology for the control of cancers // *J. Biomed. Sci.* 2007. Vol. 14. P. 15–29.
  49. Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H. et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi // *Cell.* 2002. Vol. 110. P. 563–574.
  50. Meguro M., Mitsuya K., Nomura N. et al. Large-scale evaluation of imprinting status in the Prader-Willi syndrome region: an imprinted direct repeat cluster resembling small nucleolar RNA genes // *Hum. Mol. Genet.* 2001. Vol. 10. P. 383–394.
  51. Mi Sh., Cai T., Hu Y. et al. Sorting of small RNAs into Arabidopsis Argonaute complex is directed by the 5'-terminal nucleotide // *Cell.* 2008. Vol. 133. P. 116–127.
  52. Plasterk, R.H.A., RNA Silencing: The Genome's Immune System // *Science.* 2002. Vol. 296. P. 1263–1265.
  53. Presutti, C., Rosati J., Vincenti S., Nasi S. Non coding RNA and Brain // *Neurosci.* 2006. Vol. 7 (Suppl. 1). S5.
  54. Rodriguez A., Vigorito E., Clare S. et al. A Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function // *Science.* 2007. Vol. 316. P. 608–611.
  55. Rusinov V., Baev V., Minkov I.N., Tabler M. MicroInspector: a web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33 (Suppl. 2). P. W696–W700.



56. Sempere L.F., Freemantle S., Pitha-Rowe I. et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation // *Genome Biol.* 2004. Vol. 5. P. R13.
57. Sharp P.A. The Biology of Short RNAs // In «RNA World», Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, 2006.
58. Stefani G., Slack F.J. Small non-coding RNAs in animal development // *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 2008. Vol. 9 (3). P. 219–230.
59. Tiedge H., Chen W., Brosius J. Primary structure, neural-specific expression, and dendritic location of human BC200 RNA // *J. Neurosci.* 1993. Vol. 13. P. 2382–2390.
60. Tiedge H., Fremeau R.T.Jr., Weinstock P.H. et al. Dendritic location of neural BC1 RNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. Vol. 88. P. 2093–2097.
61. Tili E., Michaille J.-J., Cimino A. et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- $\alpha$  stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock // *J. Immunol.* 2007. Vol. 179. P. 5082–5089.
62. Tuschl T. Expanding small RNA interference // *Nat. Biotechnol.* 2002. Vol. 20. P. 446–448.
63. van Rooij E., Olson E.N. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets // *J. Clin. Invest.* 2007. Vol. 4. P. 2369–2376.
64. Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation // *Science.* 2007. Vol. 318. P. 1931–1934.
65. Vella M.C., Reinert K., Slack F.J. Architecture of a validated microRNA: target interaction // *Chem. Biol.* 2004. Vol. 11. P. 1619–1623.
66. Vo N., Klein M.E., Variamova O., Keller D.M. et al. cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102. P. 16426–16431/
67. Yi R., Qin Y., Macara I.G., Cullen B.R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs // *Genes Dev.* 2003. Vol. 17. P. 3011–3016.
68. Yi R., Poy M.N., Stoffel M., Fuchs E. A skin microRNA promotes differentiation by repressing «stemness» // *Nature.* 2008. Vol. 452. P. 225–229.
69. Zalfa F., Giorgi M., Primerano B. et al. The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses // *Cell.* 2003. Vol. 112. P. 317–327.