

Роль микроРНК в патогенезе наследственных заболеваний

Плотникова О.М.¹, Скоблов М.Ю.²

- 1 — Московский физико-технический институт (государственный университет), 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9
- 2 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» 115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

На сегодняшний день известно около 7000 наследственных заболеваний. Однако современные методы ДНК диагностики выявляют причину возникновения заболеваний примерно в 40% случаев. Отчасти это обусловлено сложностью и большим разнообразием молекулярных механизмов их патогенеза. МикроРНК являются одним из мощнейших регуляторов экспрессии генов. Однако участие их в патогенезе наследственных заболеваний пока недостаточно изучено из-за сложностей поиска таких нарушений. В данной работе проведён анализ описанных механизмов патогенеза наследственных заболеваний, опосредованных нарушениями регуляции экспрессии генов посредством микроРНК. Такие случаи были выявлены при таких наследственных заболеваниях как муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, бета-талассемия, глаукома, лице-лопаточно-плечевая миодистрофия Ландузи-Дежерина, болезнь Гиршпрунга, синдром Ретта, синдром Туретта, пемфигус (болезнь Хейли-Хейли).

Ключевые слова: микроРНК, регуляция экспрессии генов, патогенез наследственных заболеваний

Для цитирования: Плотникова О.М., Скоблов М.Ю. Роль микроРНК в патогенезе наследственных заболеваний. *Медицинская генетика* 2020; 19(9): 5-17

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.5-17

Автор для корреспонденции: Плотникова О.М.; e-mail: plotnikova@phystech.edu

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ» на выполнение НИР в 2020 году.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 15.07.2020.

MicroRNA role in hereditary genetic diseases

Plotnikova O.M.¹, Skoblov M.Yu.²

- 1 — Moscow Institute of Physics and Technology
Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701, Russian Federation
- 2 — Research Centre for Medical Genetics
Moskvorechie str., 1, Moscow, 115522, Russian Federation

To date, about 7,000 hereditary diseases are known. However, modern diagnostic methods reveal the cause of the disease in about 40% of cases. This is partly due to the complexity and wide variety of molecular mechanisms of pathogenesis. MicroRNAs are one of the most powerful genes expression regulators. But their participation in the pathogenesis of hereditary diseases has not yet been studied enough because of the difficulties in finding such disorders. In this work, we collected and analyzed pathogenesis of hereditary diseases mediated by dysregulation of gene expression by microRNA. such cases have been identified for such hereditary diseases as cystic fibrosis, Duchenne muscular dystrophy, beta-thalassemia, glaucoma, facioscapulohumeral muscular dystrophy Landouzy-Dejerine, Hirschsprung disease, Rett syndrome, Tourette syndrome, pemphigus (Hailey-Hailey disease).

Keywords: miRNA, gene expression regulation, pathogenesis of hereditary diseases

For citation: Plotnikova O.M., Skoblov M.Yu. MicroRNA role in hereditary genetic diseases. *Medical genetics*. 2020; 19(9): 5-17. (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.5-17

Corresponding author: Plotnikova O.M.; e-mail: plotnikova@phystech.edu

Funding. The work was supported by state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of Russia for the Research Centre for Medical Genetics.

Conflict of Interest. Authors declare no conflict of interest.

Accepted: 15.07.2020.

Введение

МикроРНК – класс малых некодирующих РНК, участвующих в регуляции экспрессии генов. Совместно с белком аргонавтом (AGO) микроРНК образует RISC-комплекс, который связывается с матричной РНК (мРНК) и приводит к ингибированию трансляции с последующей возможной деградацией мРНК. Таким образом, микроРНК играет важную роль в регуляции экспрессии белков. У человека в настоящий момент известно более 2600 микроРНК [miRBase v.22.1, <http://www.mirbase.org>].

Согласно базе данных PubMed, с момента открытия микроРНК опубликовано более ста тысяч статей по их исследованию. Широко известно, что микроРНК являются мощными регуляторами, принимающими участие во всех молекулярных и клеточных процессах, как в норме, так и при различных заболеваниях. При этом показано, что один ген может регулироваться несколькими микроРНК, и одна микроРНК может регулировать несколько сотен мишеней [1].

Однако до сих пор отсутствует полноценное понимание микроРНК-мРНК интерактома человека. Общедоступным способом определения микроРНК-мРНК взаимодействий является использование программ предсказания, результаты которых плохо согласуются с экспериментальными данными [2]. Экспериментальное исследование микроРНК-мРНК взаимодействий происходит при использовании репортерной люциферазной системы. Другие экспериментальные методы позволяют определить косвенное влияние микроРНК на экспрессию генов и не так просты в своей постановке.

Понимание регуляции микроРНК и их мишеней позволяет определять причины возникновения заболеваний, вызванных изменением экспрессии генов. Так, существует ряд работ, где показана связь дисрегуляции экспрессии генов за счёт микроРНК с развитием онкологических заболеваний [3, 4], нейродегенеративных болезней [5], сердечной недостаточности [6], аутоиммунных заболеваний [7] и многих других.

В данной работе собраны описанные механизмы патогенеза наследственных заболеваний, опосредованные нарушением регуляции микроРНК. Такие нарушения были выявлены при таких наследственных заболеваниях, как муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, бета-талассемия, глаукома, лице-лопаточно-плечевая миодистрофия Ландузи-Дежерина, болезнь Гиршпрунга, синдром Ретта, синдром Туретта, пемфигус (болезнь Хейли-Хейли) (таблица). В их основе лежат механизмы, связанные либо с потерей сайта связывания микроРНК, либо с его усилением, либо с измене-

нием последовательности самой микроРНК (рисунок). Важно также отметить, что изучение роли микроРНК в патогенезе не только важно для понимания механизмов развития заболеваний, но и даёт возможность для разработки методов их терапии.

Муковисцидоз

Муковисцидоз (OMIM 219700) – аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, характеризующееся поражением желёз внешней секреции. Патогенез муковисцидоза связан с нарушением функции гена *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), кодирующего ионный канал, регулирующий транспорт ионов хлора через мембрану в эпителиальных клетках.

В 2011 году Gillen с соавт. провели анализ микроРНК, которые напрямую взаимодействуют с 3'-нетранслируемой областью (3'UTR) гена *CFTR*. С помощью биоинформатических программ было предсказано 106 микроРНК, способных взаимодействовать с 3'UTR областью гена *CFTR*. С учетом различных дополнительных характеристик (оценка предсказания, консервативность, экспрессионные данные микроРНК) для дальнейшего экспериментального изучения из них было отобрано 13 микроРНК. В результате, при трансфекции микроРНК в клеточную линию Сасо-2 было показано уменьшение уровня мРНК гена *CFTR* для 12 из 13 выбранных микроРНК. Методом вестерн-блота было также показано снижение экспрессии белка *CFTR* на более чем 40% от нормы. Для двух микроРНК miR-145 и miR-494 были проведены дополнительные эксперименты с использованием люциферазных конструкций, которые показали их прямое взаимодействие с 3'UTR гена *CFTR*. Внесение мутаций в сайт связывания микроРНК приводило к тому, что они переставали подавлять активность люциферазы [8].

В другой работе Megiorni с соавт. с помощью биоинформатических программ предсказали, что микроРНК miR-101 и miR-494 могут взаимодействовать с 3'UTR областью *CFTR*. В работе были созданы люциферазные конструкции, включающие 3'UTR область гена *CFTR*, и было показано, что данные микроРНК снижают уровень люциферазной активности на ~40% и ~60% соответственно. Одновременная экспрессия двух исследуемых микроРНК *in vitro* приводила к синергическому эффекту и к снижению экспрессии *CFTR* на ~80%. Было также показано, что после внесения мутаций в сайт связывания, микроРНК переставали подавлять активность люциферазы. Таким образом, было показано, что сайты предсказаны верно и являются

Описанные случаи возникновения наследственных заболеваний посредством микроРНК

Болезнь	OMIM	микроРНК	Ген-мишень	Клеточная линия / модель исследования	Ссылка		
Муковисцидоз	219700	miR-494, miR-384, miR-376b, miR-1246, miR-145, miR-331-3p	<i>CFTR</i>	Саго-2	[8]		
		miR-494, miR-384, miR-1290, miR-1246, miR-145, miR-1827, miR-331-3p	<i>CFTR</i>	PANC-1	[8]		
		miR-600, miR-494, miR-607, miR-384	<i>CFTR</i>	16HBE14o-	[8]		
		miR-145, miR-494	<i>CFTR</i>	Саго-2	[8]		
		miR-494	<i>SLC12A2</i>	Саго-2	[8]		
		miR-1246, miR-377, miR-101, miR-1246, miR-494, miR-384	<i>SLC12A2</i>	PANC-1	[8]		
		miR-101, miR-494	<i>CFTR</i>	HEK293	[9]		
		miR-138	<i>SIN3A</i>	HEK293T	[10]		
		miR-509-3p, miR-494	<i>CFTR</i>	HEK293T	[11]		
		miR-93	<i>IL8</i>	IB3-1	[12]		
		miR-144 and miR-101	<i>CFTR</i>	HBE	[13]		
		Миодистрофия Дюшенна	310200	miR-31	<i>DMD</i>	C2, клеточная культура миобластов пациентов ДМД	[14]
				miR-31	<i>DMD</i>	H2KSF1, mdx-мышинная модель	[15]
let-7c, miR-150, miR-196b, miR-296-5p, miR-133b	<i>DMD</i>			C2C12	[16]		
let-7	<i>DMD</i>			C2C12, HEK293T, mdx-мышинная модель	[17]		
miR-29	<i>DMD</i>			C2C12, клеточная культура миобластов пациентов ДМД, mdx-мышинная модель	[18]		
miR-21, miR-29a, miR-29c	<i>DMD</i>			клеточная культура миобластов и фибробластов пациентов ДМД, mdx-мышинная модель	[19]		
Бета – талассемия	613985			miR-96	<i>HbF</i>	Клеточная культура ретикулоцитов	[20]
		miR-486-3p	<i>BCL11A</i>	HEK293T	[21]		
		miR-210	<i>BCL11A</i>	K562, клеточная культура эритроидных предшественников больных бета-талассемией	[22]		
		miR-15a и miR-16-1	<i>MYB</i>	HEK293	[23]		
		miR-26	<i>MYB</i>	K562	[24]		
		miR-326	<i>KLF1</i>	HEK293, K562	[25]		
		miR-4516	<i>MAPK10</i>	SH-SY5Y	[26]		
Болезнь Гишпрунга	142623	miR-4516	<i>MAPK10</i>	SH-SY5Y	[26]		
Глаукома	602482	miR-548l	<i>FOXC1</i>	HEK-293T	[27]		
Синдром Ретта	312750	miR-199a	<i>SIRT1, HIF1a, PDE4D</i>	HEK293T, Neuro2A	[28]		
Синдром Туретта	137580	miR-189	<i>SLITRK1</i>	N2a	[29]		
Лице-лопаточно-плечевая миодистрофия Ландузи-Дежерина	158900, 158901	miR-411	<i>YAF2</i>	C2C12	[30]		
Пемфигус	169600	miR-125b	<i>Notch1, p63</i>	HEK293	[31]		

ся местами связывания данных микроРНК с 3'UTR гена *CFTR* [9].

В аналогичной работе [10] прямое взаимодействие гена *CFTR* с другими микроРНК – miR-144 и miR-101 было подтверждено экспериментами на клеточной линии НВЕ. Авторами была создана люциферазная конструкция с мутацией двух нуклеотидов в предсказанном сайте связывания микроРНК. Последующие

эксперименты *in vitro* показали, что люциферазная активность была примерно одинакова для конструкций как с мутацией, так и без неё, в то время как при трансфекции в клеточную линию НВЕ микроРНК miR-144 и miR-101 люциферазная активность конструкции дикого типа снижалась до ~60% [10].

Помимо работ, демонстрирующих регуляцию гена *CFTR* напрямую посредством микроРНК, существу-

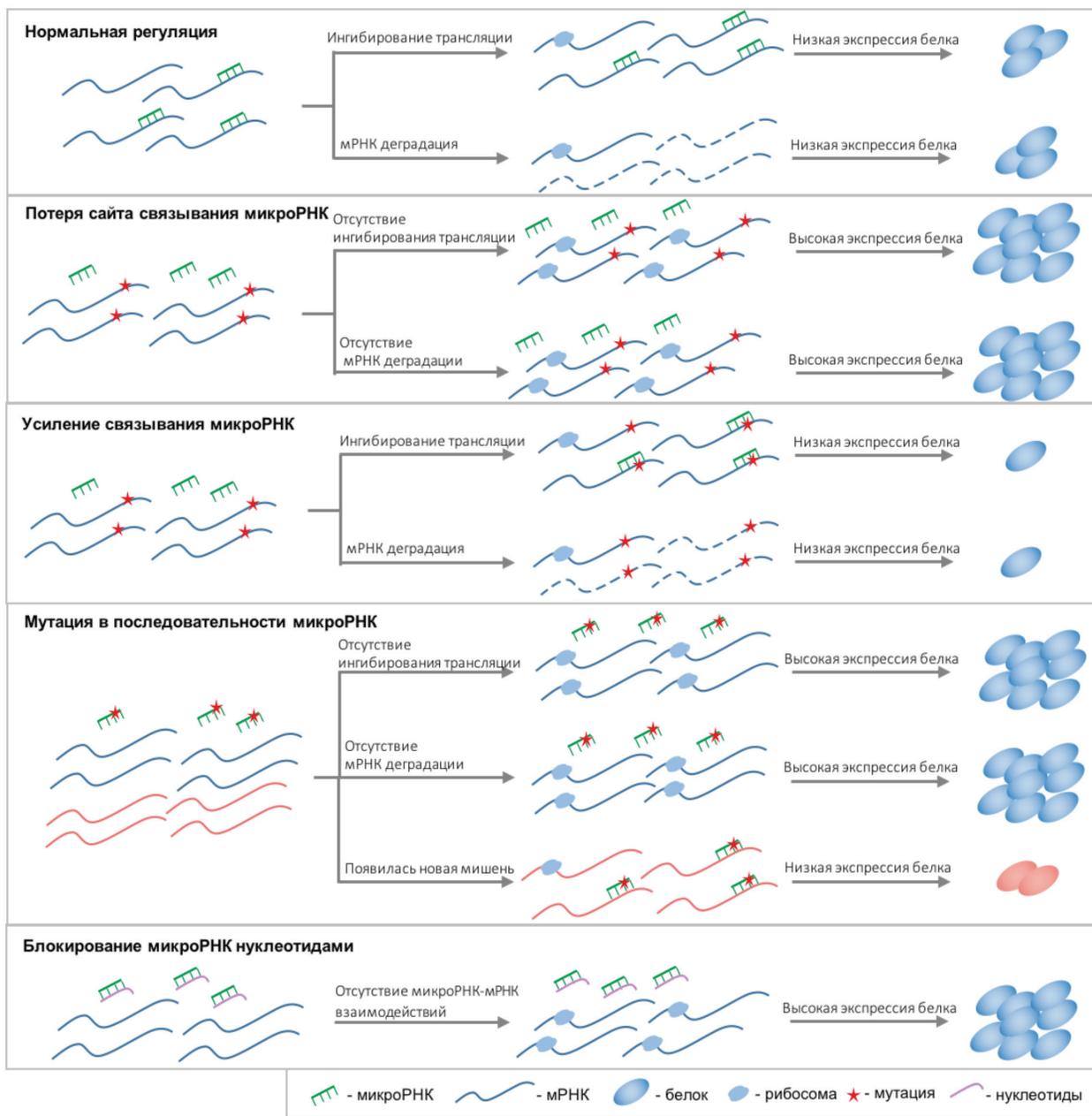


Рисунок. Механизмы действия микроРНК в норме и при патологии.

ют исследования, в которых были изучена роль микроРНК регулирующих экспрессию других генов, способных влиять как на экспрессию гена *CFTR*, так и на воспалительные процессы. Всё это в результате отражается на течении заболевания.

Так, в работе Ramachandran с соавт. было показано, что микроРНК miR-138 напрямую связывается с геном *SIN3A*, кодирующим транскрипционный фактор. Дополнительные эксперименты показали, что *SIN3A* способен регулировать экспрессию гена *CFTR*, взаимодействуя с miR-138 [11].

Позднее, этот же коллектив, проводя экспрессионный анализ микроРНК в первичной культуре эпителия больных муковисцидозом, обнаружил повышенную экспрессию miR-509-3p и miR-494 по сравнению с контрольной группой. Существование прямого взаимодействия этих микроРНК с мРНК гена *CFTR* было подтверждено экспериментами на клеточной линии HEK293. Далее, при инфицировании культуры эпителиальных клеток контрольной группы с помощью бактерий стафилококка (*Staphylococcus aureus*) было показано увеличение их экспрессии и уменьшение экспрессии гена *CFTR*. Аналогичный эффект наблюдался при стимулировании провоспалительными цитокинами *TNF-α* или *IL-1β*. Дальнейшие эксперименты показали, что miR-509-3p и miR-494 участвуют также в воспалительных процессах, в частности в активации пути NF-κB [12].

Роль в регуляции воспалительных процессов была также показана в другой работе для miR-93. Fabbri с соавт. установили высокий уровень экспрессии микроРНК miR-93 в линии бронхиальных клеток больного муковисцидозом, инфицированных *Pseudomonas aeruginosa*. Экспериментами *in vitro* было подтверждено прямое взаимодействие miR-93 с 3'UTR гена *IL8*, которое нарушалось при внесении мутаций в сайт связывания микроРНК [13].

Миодистрофия Дюшенна

Миодистрофия Дюшенна (OMIM 310200) – X-сцепленное рецессивное наследственное заболевание с поражением мышечных волокон, манифестирующее, в основном, в раннем возрасте и характеризующееся быстрой прогрессией. Патогенез заболевания связан с мутациями в гене *DMD*, кодирующем белок дистрофин.

При этом заболевании у больных в крови и в мышечных тканях были выявлены микроРНК с экспрессией, отличной от здоровых людей [14]. Так, в работе Гресо с соавторами в 2009 году была найдена повышенная экспрессия miR-31 у больных миодистрофией Дю-

шенна [15, 16]. Роль данной микроРНК в патогенезе заболевания была исследована на клеточных линиях *in vitro* и на модельных mdx-мышцах [17]. Было найдено, что уровень экспрессии микроРНК miR-31 был в 50 раз выше в мышечных волокнах mdx-мышей по сравнению с контрольными образцами. *In situ* гибридизация показала преимущественную локализацию miR-31 в регенерирующих миобластах mdx-мышей и отсутствие её в тканях мышечной дикого типа. Анализ изменения экспрессии miR-31 показал, что повышенный уровень miR-31 частично связан со сниженной способностью миобластов больных с миодистрофией Дюшенна завершить программу дифференцировки и частично вызван интенсивной регенерацией (с участием активированных сателлитных клеток).

Взаимодействие miR-31 и гена *DMD* было подтверждено в эндогенных условиях на клеточной линии миобластов C2 с использованием люциферазной системы. Для этого были созданы конструкции, содержащие 3'UTR гена *DMD* дикого типа и делецию сайта связывания с miR-31. На клеточной линии C2 было показано, что экспрессия miR-31 не влияет на уровень мРНК гена *DMD*, но ингибирует его трансляцию, уменьшая количество образующегося белка дистрофина. Для изучения возможности применения ингибиторов miR-31, был проведен эксперимент на клеточной культуре миобластов пациентов с миодистрофией Дюшенна. Было показано, что при добавлении ингибитора miR-31 уровень белка дистрофина увеличивается, в то время как уровень мРНК дистрофина не изменяется [17].

Исследование роли miR-31 в патогенезе миодистрофии Дюшенна привело к работам по разработке терапии заболевания на основе технологий по блокированию активности miR-31. Использование такого подхода совместно с широко известной технологией пропуска экзона с использованием модифицированных олигонуклеотидов должно было повысить эффективность лечения больных миодистрофией Дюшенна с низким уровнем экспрессии откорректированного (in-frame) транскрипта *DMD*. Исследование было проведено на клеточной линии и на mdx-мышью модели, имеющих преждевременный стоп-кодон в 23 экзоне [18]. Эксперименты на клеточной линии показали, что данный подход наиболее эффективен при использовании «протектора» (олигонуклеотида, блокирующего место связывания микроРНК) вместе с технологией пропуска экзона. Однако, подтвердить данное наблюдение на мышью модели не получилось. Авторы указывают на ряд трудностей, связанных, например, с успешной доставкой олигонуклеотидов в клетки [18]. Авторы указывают на наличие более сложной

модели регуляции экспрессии гена *DMD*, включающей некодирующую РНК *linc-31*, роль которой была недавно описана [19].

Другим интересным примером разработки терапии для миодистрофии Дюшенна является исследование регуляции гена *UTRN*, являющегося паралогом гена *DMD* и кодирующего белок утروفин. Ранее было показано, что увеличение экспрессии утروفина позволяет избежать фенотипа миодистрофии Дюшенна у *mdx*-мышей [20–22]. Для гена *UTRN* также была изучена регуляция посредством микроРНК. Было показано, что пять микроРНК (*let-7c*, *miR-150*, *miR-196b*, *miR-296-5p*, *miR-133b*) способны влиять на экспрессию этого гена, а использование олигонуклеотидов, блокирующих *let-7*, приводило к увеличению экспрессии белка утروفина в клеточной линии *C2C12* [23].

Эта работа получила продолжение в виде разработок потенциального метода лечения миодистрофии Дюшенна путём блокирования микроРНК *let-7* [24]. Вначале было показано прямое взаимодействие микроРНК *let-7c* с мРНК гена *UTRN*, которое было исследовано с использованием люциферазной конструкции, содержащей 3'UTR гена утروفина.

Для блокировки активности *let-7* был разработан модифицированный олигонуклеотид, протестированный на клеточных линиях мышечной ткани мыши (*C2C12*) и линии НЕК293Т. В обоих случаях использование олигонуклеотида приводило к увеличению экспрессии мРНК и белка утروفина. Далее была проведена серия экспериментов *in vivo* на мышах. Блокирующий олигонуклеотид вводили *mdx*-мышам дважды в неделю в течение одного месяца. Полученные результаты сравнивались с контрольной группой мышей, которым вводились контрольные олигонуклеотиды. Анализ экспрессии методом вестерн-блота показал увеличение количества белка утروفина в тканях мышей, получавших препарат: в диафрагме в 1,4 и 1,8 раз; в икроножной мышце – в 1,3 и 1,7 раз; в мышечной ткани у большеберцовой кости – в 2,1 и 2,3 раза для низкой и высокой доз, соответственно. Также было показано соответствующее увеличение мРНК утروفина в этих тканях. Эффект от лечения оценивался морфологически, биохимически и физиологически, и было показано фенотипическое улучшение. Авторы указывали на необходимость изучения эффективности лечения с более раннего возраста, а также совместно с другими методами терапии [24].

В ряде работ изучалась функциональная роль микроРНК, которые могли бы нарушать процессы корректной дифференцировки мышечной ткани. Так, в работе Wang с соавт. на клеточных линиях и *mdx*-мышью модели было показано, что потеря микроРНК *miR-29* в миобластах приводит к их диф-

ференцировке в миофибробласты. Было продемонстрировано, что *miR-29* находится под негативной регуляцией трансформирующего ростового фактора бета *TGF- β* [25].

В другой работе было показано, что уровень экспрессии *miR-29* был ниже в образцах больных миодистрофией Дюшенна по сравнению с контрольной группой. Был проведён анализ образцов мышечной ткани и фибробластов от 14 больных и 11 здоровых людей и было показано, что другая микроРНК *miR-21* имеет более высокий уровень экспрессии в фибробластах и в мышечной ткани больных. Ряд экспериментов на клеточных линиях фибробластов и миобластов с ингибированием *miR-21* и введением синтетической *miR-29* показал их противоположную роль в регуляции фиброза мышечной ткани, а также их потенциальную роль в снижении фиброза в моделях *mdx*-мышей [26].

Бета-талассемия

Бета-талассемия (ОМIM 613985) – аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, характеризующееся снижением образования гемоглобина А (*HbA*, альфа-2/бета-2), из-за снижения синтеза цепей бета-глобина относительно цепей альфа-глобина. Такой дисбаланс в синтезе цепей глобина приводит к аномальному эритропоэзу [27].

В 2011 году впервые было показано, что экспрессия субъединицы гамма-гемоглобина *HbF*, являющейся основной у плода, регулируется микроРНК *miR-96*. Сравнение ретикулоцитов из пуповинной крови и из крови взрослых людей при иммунопреципитации комплекса AGO2 выявило увеличенное количество мРНК гамма-глобина. Авторы предположили, что гамма-глобин продолжает транскрибироваться при эритропоэзе у взрослых после переключения на гемоглобин А, но его ингибирование увеличивается с помощью микроРНК. Для поиска потенциальной микроРНК, подавляющей экспрессию гамма-глобина, авторы сравнили уровень экспрессии микроРНК в ретикулоцитах из пуповинной крови и крови взрослых и выявили ряд потенциальных микроРНК: *miR-96*, *miR-146a*, *let-7a*, *330-3p* и *miR-888*. Для них биоинформатически были предсказаны сайты связывания с мРНК гамма-глобина. Однако при проведении иммунопреципитации комплекса AGO2 на образцах РНК, выделенных из ретикулоцитов взрослых, было выявлено обогащение только для *miR-96*. Дальнейшие эксперименты по увеличению экспрессии исследуемых микроРНК *in vitro* показали значительное снижение гамма-глобина только в случае *miR-96*, а для *miR-146a* и *let-7a* экспрессия гамма-глобина не изменилась [28].

Особый интерес для потенциальной терапии бета-талассемии вызывают подходы по увеличению экспрессии гамма-глобина через регулирующие его транскрипционные факторы: *BCL11A*, *KLF1*, *C-MYB* [29]. В 2013 году был выявлен механизм регуляции экспрессии гамма-глобина с помощью miR-486-3p опосредовано, через транскрипционный фактор *BCL11A*. Изучение взрослой гемопоэтической системы выявило экспрессию miR-486-3p только в эритроидных клетках. На клеточной линии НЕК293Т с использованием люциферазной конструкции было показано, что miR-486-3p взаимодействует с 3'UTR гена *BCL11A*. Также было подтверждено снижение уровня экспрессии самого белка *BCL11A*. Таким образом, miR-486-3p способствует регуляции *HbF* путем посттранскрипционного ингибирования экспрессии *BCL11A* во время эритропоэза у взрослых [30].

В работе Bianchi с соавт. у больных талассемией был выявлен высокий уровень miR-210. Также была показана ассоциация экспрессии данной микроРНК с уровнем экспрессии гамма-глобина на клеточной линии K562 [31]. В 2017 году другим коллективом было подробно изучен механизм влияния miR-210 на экспрессию гамма-глобина через прямое взаимодействие микроРНК с транскрипционным фактором *BCL11A*. Сайт связывания miR-210 был найден в кодирующей области гена *BCL11A* и имел высокую консервативность. На клеточной линии K562 с использованием репортерной люциферазной системы было подтверждено данное взаимодействие. Также было показано снижение экспрессии белка *BCL11A* и снижение уровня мРНК гамма-глобина. Влияние miR-210 на *BCL11A* и гамма-глобин было подтверждено и на первичной культуре клеток эритроидных предшественников больных бета-талассемией. Таким образом, увеличение экспрессии miR-210 приводит к снижению экспрессии гена *BCL11A* и увеличению гамма-глобина, и потенциально может использоваться для разработки терапевтического подхода для бета-талассемии [32].

Известно, что трисомия 13-й хромосомы ассоциирована с увеличением уровня экспрессии HbF. Было показано, что это вызвано дисрегуляцией транскрипционного фактора *MYB* через взаимодействие с miR-15a и miR-16-1. Для этих двух микроРНК с помощью биоинформатического анализа был предсказан идентичный сайт связывания в 3'UTR гена *MYB*. Данное взаимодействие было подтверждено с использованием люциферазной системы на клеточной линии НЕК293. Было показано, что снижение уровня экспрессии *MYB* при использовании антисмысловых олигонуклеотидов приводит к увеличению экспрессии гамма-глобина [33]. Позже в другой работе было показано, что

miR-26b также напрямую взаимодействует с 3'UTR гена *MYB* и приводит к снижению его экспрессии [34].

Для гена транскрипционного фактора *KLF1*, который необходим для правильного созревания эритроидных клеток, был описан механизм регуляции экспрессии через прямое взаимодействие miR-326 с 3'UTR гена. Было показано, что из восьми микроРНК, биоинформатически предсказанных взаимодействующими с мРНК гена *KLF1*, только miR-326 значимо снижает люциферазную активность в клеточной линии НЕК293. Дополнительно их взаимодействие было подтверждено на клеточной линии K562, на конструкциях с внесенными мутациями в область связывания. Было показано, что увеличение экспрессии miR-326 приводит к снижению образования белка *KLF1*, при этом уровень мРНК изменялся не значимо, что говорит о пост-транскрипционном подавлении трансляции. Также было показано, что увеличение экспрессии miR-326 приводит к значительному снижению экспрессии *BCL11A* и увеличению экспрессии гамма-глобина на 50%, при этом экспрессия бета-глобина снижалась. Ингибирование эндогенной miR-326 в клеточной линии K562 показало обратный эффект: увеличение экспрессии *BCL11A* и бета-глобина и снижение – гамма-глобина. Дополнительно было показано, что у 23 больных талассемией экспрессия miR-326 коррелирует с уровнем HbF, в то время как у здоровых людей такая корреляция не наблюдалась [35].

Глаукома

Глаукома – наследственное заболевание преимущественно с аутосомно-доминантным типом наследования, вызывающее постепенное разрушение зрительного нерва, часто сопровождающееся повышенным внутриглазным давлением. Первичная открытоугольная глаукома первого типа (OMIM 609887) ассоциирована с гетерозиготными патогенными вариантами в гене *WDR36*, кодирующем один из белков с WD-повторами, играющих важную роль в активации T клеток и в биогенезе рибосомных РНК. В 2011 году, коллектив из Испании провёл поиск и анализ мутаций в генах *WDR36* и *TP53* у 268 неродственных больных с первичной открытоугольной глаукомой [36]. В гене *WDR36* была выявлена мутация с.*16T>C, которая предсказывалась биоинформатическими программами как сайт связывания с микроРНК miR-9 и miR-224. Однако экспериментов по проверке функциональной значимости данной мутации опубликовано не было.

Мутации в гене *FOXC1* приводят к возникновению глаукомы 3 типа (ARS; OMIM 602482). Данный ген кодирует транскрипционный фактор, участвующий в че-

репно-лицевом, глазном и сердечно-сосудистом развитии. В 2015 году этот же коллектив авторов опубликовал подробное описание двух семейных случаев глаукомы с аутосомно-доминантным типом наследования. В одной семье пробанд имел мутацию p.I126S в гене *FOXC1* вместе с мутацией с.*734A>T в некодирующей области в цис-положении. В другой семье у пробанда была аналогичная мутация с.*734A>T вместе с инсерцией p.G447_G448insDG также в цис-положении. В группе 348 здоровых людей мутация с.*734A>T отсутствовала [37].

Выявленная мутация с.*734A>T находилась в 3'-нетранслируемой области гена *FOXC1* и биоинформатически было предсказано, что она находится в сайте связывания miR-548l. С использованием люциферазных конструкций на клеточной линии НЕК-293Т было показано, что экспрессия miR-548l приводит к снижению активности люциферазы в конструкции дикого типа. Наличие мутации с.*734A>T в дополнение к каждой из мутаций в кодирующих областях (p.I126S и p.G447_G448insDG) приводило к увеличению уровня экспрессии мутантной РНК и белка. Таким образом, было показано, что данная мутация, находящаяся в некодирующей области, повышает стабильность мРНК *FOXC1* за счёт разрушения сайта связывания с miR-548l [37].

Лице-лопаточно-плечевая миодистрофия Ландузи-Дежерина

Лице-лопаточно-плечевая миодистрофия Ландузи-Дежерина (ОМIM 158900, 158901) – аутосомно-доминантное наследственное нервно-мышечное заболевание, поражающее мышцы лица, лопаток и верхние части рук. Патогенез заболевания связан с увеличением экспрессии транскрипционного фактора *DUX4*, в 95% случаев вызванный уменьшением количества повторяющихся элементов D4Z4.

Однако, на течение заболевания влияет не только увеличение активности гена *DUX4*. В 2013 году была показана повышенная экспрессия микроРНК miR-411 в пролиферирующих первичных и иммортализованных миобластах больных [38]. Для поиска гена, с которым напрямую связывается микроРНК, были проанализированы результаты дифференциальной экспрессии мРНК при увеличении экспрессии miR-411. Было выявлено 4 потенциальных гена-мишени, из которых в дальнейшем детально изучался только ген *YAF2* (YY1 associated factor 2). Как было показано ранее *YAF2* подавляет экспрессию гена *YY1*, который, в свою очередь, подавляет миогенез [39]. На клеточной линии мышечных миобластов C2C12 было подтверждено, что увеличение экспрессии микроРНК miR-411 приводит к снижению экспрессии *YAF2*, а также к сниже-

нию экспрессии других миогенных маркеров, таких как *MYH1*, *MYOD*, *MYOG* [38].

Болезнь Гиршпрунга

Болезнь Гиршпрунга (ОМIM 142623) – тяжелое наследственное заболевание, при котором нарушена иннервация дистального отдела кишечника. Патогенез заболевания ассоциирован с мутациями в гене *RET* (рецептор тирозинового киназы). Недавно было показано, что нарушение экспрессии гена *MAPK10* (митоген-активируемая протеинкиназа 10) может влиять на течение заболевания [40].

В работе Wang в 2020 году было показано, что микроРНК miR-4516 напрямую взаимодействует с 3'UTR гена *MAPK10*, подавляя его экспрессию, и ассоциирована с болезнью Гиршпрунга [41]. В исследование была включена когорта 502 больных болезнью Гиршпрунга и 513 здоровых индивидов, у которых проводился таргетный анализ 13 полиморфизмов гена *MAPK10*: 5 находились в 3'UTR, 8 – в интронной области гена. Три полиморфизма статистически значимо чаще встречались у больных с болезнью Гиршпрунга. Дополнительный анализ гаплотипов выявил частую встречаемость у больных гаплотипа rs1201-rs7699978-rs2575675. Экспрессионный анализ на когорте 92 больных и 92 здоровых людей показал сниженную экспрессию гена *MAPK10* у больных в кишечнике. С помощью биоинформатических программ было предсказано, что miR-4516 взаимодействует с геном *MAPK10*. Было показано, что экспрессия данной микроРНК выше в когорте больных, а также показана отрицательная корреляция между экспрессией *MAPK10* и miR-4516. На клеточной линии нейробластомных клеток SH-SY5Y методами РТ-ПЦР и вестерн-блота было подтверждено снижение экспрессии гена *MAPK10* при увеличении экспрессии miR-4516. С использованием люциферазной системы на этой же клеточной линии было показано прямое взаимодействие микроРНК с предсказанным сайтом связывания в 3'-UTR гена *MAPK10*, которое нарушалось при внесении мутаций в данный сайт. С использованием люциферазной конструкции авторы изучили влияние гаплотипов rs1201-rs7699978-rs2575675 АСТ и GCT на наличие связывания с изучаемой микроРНК, показав, что гаплотип АСТ вызывает более сильную репрессию. Отдельным экспериментом *in vitro* было показано, что увеличение экспрессии miR-4516 подавляет миграционную способность клеток, в то время как ингибирование данной микроРНК, наоборот, увеличивает её. Дополнительное ингибирование гена *MAPK10* подтвердило, что миграционная способность клеток зависит не только от экспрессии

данной микроРНК, но и от экспрессии гена *MAPK10*. Таким образом, в данном исследовании была впервые показана функциональная роль микроРНК miR-4516 и гена *MAPK10* в патогенезе болезни Гиришпрунга, и подтверждено их прямое взаимодействие [41].

Синдром Ретта

Синдром Ретта (ОМIM 312750) – нейродегенеративное наследственное заболевание, связанное с нарушением функции гена *MECP2* (метил-СрG-связывающий белок 2), находящимся на X хромосоме [42].

Ранее была показана связь нарушения пути mTOR с фенотипом синдрома Ретта [43, 44]. В 2015 году группа японских ученых показала, что *MeCP2* играет важную роль в посттранскрипционном процессинге микроРНК, взаимодействуя с комплексом *DROSHA*. Среди микроРНК, регулируемых белком *MeCP2*, была обнаружена miR-199a, которая положительно контролирует передачу сигналов mTOR пути, взаимодействуя с ингибиторами передачи сигналов mTOR. Было показано, что частая делеция miR-199a у больных синдромом Ретта приводит к снижению активности пути mTOR в мозге и к фенотипу синдрома Ретта на мышинной модели [45]. В *MECP2*-дефицитных нейронах экспрессия miR-199a снижена, что приводит к увеличению экспрессии *SIRT1*, *HIF1a*, *PDE4D*. Это, в свою очередь, приводит к каскадному подавлению активности сигнального пути mTOR и уменьшению роста нейронов [45].

Синдром Туретта

Синдром Туретта (ОМIM 137580) – генетически обусловленное расстройство центральной нервной системы. Заболевание характеризуется хроническими моторными и голосовыми тиками и ассоциировано с мутациями в гене *SLITRK1*, кодирующем трансмембранный сигнальный белок, отвечающий за регуляцию синапсов и пресинаптическую дифференцировку в мозге [46].

Исследование 174 неродственных пробандов выявило у одного из них мутацию в гене *SLITRK1*, приводящую к сдвигу рамки считывания. Также была выявлена мутация в 3'UTR гена, встречающаяся у 2-х неродственных пробандов. У 4296 контрольных здоровых индивидуумов данный вариант отсутствовал. Биоинформатический анализ предсказал, что наличие данной замены приводит к усилению связывания miR-189 с сайтом. С использованием люциферазной конструкции было показано прямое взаимодействие miR-189

с сайтом связывания гена *SLITRK1* и более эффективное подавление экспрессии конструкции с мутацией. Дополнительные эксперименты на мышах показали колокализацию экспрессии гена *SLITRK1* и miR-189 в неокортексе, гиппокампе и ряде других регионов мозга [46].

Пемфигус (болезнь Хейли-Хейли)

Пемфигус (ОМIM 169600) – редкое генетическое заболевание, имеющее аутомно-доминантное наследование, относится к группе везикулобуллезных аутоиммунных заболеваний, поражающих кожу и слизистые оболочки. Заболевание манифестирует чаще в подростковом возрасте или в возрасте 30–40 лет. Патогенез заболевания связан с нарушением функций гена *ATP2C1* (Calcium-transporting ATPase type 2C member 1), кодирующего кальций-транспортную АТФазу.

Экспрессионный анализ микроРНК клеточной культуры больных пемфигусом выявил повышенную экспрессию miR-125b, miR-181a, miR-181b и miR-99a, и пониженную экспрессию miR-106a, miR106b, miR-18b [47]. Для miR-125b были биоинформатически предсказаны взаимодействия с генами *NOTCH1* и *p63*, нарушение экспрессии которых ранее наблюдалось в культуре кератиноцитов больных пемфигусом [48]. Было показано, что повышенная экспрессия miR-125b приводит к снижению уровня белков, кодируемых генами *NOTCH1* и *p63*. Данные взаимодействия были подтверждены экспериментами с использованием люциферазной системы. Было показано, что при увеличении экспрессии miR-125b происходит снижение активности люциферазы, экспрессирующейся с конструкций, несущих 3'UTR генов *Notch1* и *p63*. Интересно отметить, что ранее авторы показали связь патогенеза пемфигуса с повышенным уровнем окислительного стресса в клетке [48]. На клеточной линии HaCat авторы показали, что при стимуляции окислительного стресса пероксидом водорода уровень экспрессии miR-125b увеличивается [47].

Патогенез заболеваний, вызванных мутациями в генах микроРНК

Также существуют исследования по изучению мутаций в генах, кодирующих микроРНК, приводящих к возникновению наследственных заболеваний. Так, в 2019 году была опубликована работа, описывающая активирующую мутацию в гене микроРНК miR-140, приводящую к развитию скелетной дисплазии [49]. Было описано две семьи, в которых наблюдалось

три пробанда с одинаковой однонуклеотидной заменой А на G в гене, кодирующем микроРНК miR-140 (MIR140:NR_029681.1:n.24A>G). Клинические признаки скелетной дисплазии включали непропорционально низкий рост с короткими конечностями, маленькими руками и ногами и гипоплазию средней части лица с маленьким носом. Мутация была выявлена с использованием полногеномного секвенирования, и был подтвержден её статус *de novo*. Данная замена отсутствовала в популяционной базе данных GnomAD.

Для подтверждения связи данной мутации с патогенезом заболевания была использована мышинная модель, созданная при помощи геномного редактирования. Анализ фенотипа мышей с данной мутацией показал сходие с пациентами аномалии скелетного развития. Было высказано предположение, что наличие данной мутации приводит к скелетной дисплазии за счёт появившейся дополнительной функциональности мутантной микроРНК. Действительно, было показано, что данная мутация не нарушала биогенеза мутантной miR-140-5p, но приводила к смене взаимодействующих с ней генов-мишеней. Мутантная микроРНК miR-140 конкурировала с консервативным РНК-связывающим белком *Ybx1* за общие сайты связывания, что в конечном итоге приводило к сильным фенотипическим изменениям. Данная публикация является первой работой, описавшей патогенную мутацию в микроРНК с приобретением функции. В этой работе был проведён ряд экспериментов, которые показали молекулярный механизм, объясняющий неоморфные действия мутантной микроРНК [49].

В другой публикации конца 2019 года изучались клинические случаи РАСопатии, которые могли быть вызваны мутациями в генах, кодирующих микроРНК. РАСопатия является группой редких наследственных заболеваний, патогенез которых ассоциирован с мутациями генов, участвующих в сигнальном пути киназ RAS-МАРК. Анализ результатов полно-экзомного секвенирования выявил 41 общий вариант у пяти пациентов. Восемь вариантов находились в последовательностях зрелых микроРНК (hsa-miR-1304-3p, hsa-miR-146a-3p, hsa-miR-196a-2-3p, hsa-miR-499a-3p, hsa-miR-499b-5p, hsa-miR-5481, hsa-miR-575, hsa-miR-593-5p), что могло влиять на вторичную структуру их предшественников и, как следствие, на их биогенез. Для шести из данных микроРНК описаны гены мишени из киназного пути RAS-МАРК. Для четырех микроРНК было показано изменение дифференциальной экспрессии по сравнению с контрольной группой здоровых людей [50]. Для изучения влияния данных вариантов в генах микроРНК на патогенез РАСопатий необходимы дальнейшие исследования.

Заключение

МикроРНК являются активными регуляторами экспрессии генов. Изучение их экспрессии и функции позволяет устанавливать новые механизмы патогенеза разных заболеваний. С каждым годом появляется все больше новых заболеваний, для которых описано нарушение регуляции экспрессии генов посредством микроРНК. Например, в марте 2020 года был описан микроРНК-зависимый механизм регуляции, влияющий на старение, молекулярные причины которого активно изучаются в последние годы. Было найдено, что повышение уровня активных форм кислорода (АФК), которые являются основным дегенеративным фактором, связано с экспрессией микроРНК miR-142-5p. Показано, что увеличение экспрессии данной микроРНК вызывает накопление АФК [51].

Можно ожидать, что в ближайшее время с активным использованием полногеномных данных увеличится количество описанных случаев наследственных заболеваний, вызванных нарушением регуляции микроРНК как за счёт нарушения сайта связывания с микроРНК, так и за счёт выявления новых мутаций в самих генах, кодирующих микроРНК. Понимание полной картины регуляции генов посредством микроРНК, позволит выявить новые механизмы патогенеза, а также открывает перспективы для разработки новых подходов к терапии наследственных заболеваний человека.

Литература

1. Selbach M., Schwanhäusser B., Thierfelder N., et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008;455(7209):58-63.
2. Плотникова О.М., Скоблов М.Ю. Эффективность программ, предсказывающих микроРНК-мРНК взаимодействия. *Молекулярная биология*. 2018;52(3):543-554.
3. Lin S., Gregory R.I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews cancer*. 2015;15(6):321-333.
4. Климентова Е.А., Гилязова И.Р., Кунсбаева Г.Б., и др. Ассоциация полиморфного варианта сайта связывания микроРНК rs10491534 гена TSC1 с тяжестью течения рака почки. *Медицинская генетика*. 2016;15(4):50-52.
5. Wong L.L., Wang J., Liew O.W., et al. MicroRNA and heart failure. *Int J Mol Sci*. 2016 Apr 6;17(4):502.
6. Ferrante M, Conti G.O. Environment and neurodegenerative diseases: an update on miRNA role. *Microna*. 2017;6(3):157-165.
7. de Almeida R.C., Chagas V.S., Castro M.A., et al. Integrative analysis identifies genetic variants associated with autoimmune diseases affecting putative microRNA binding sites. *Frontiers in Genetics*. 2018;9:139.
8. Gillen A.E., Gosalia N., Leir S.H., Harris A. MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Biochemical Journal*. 2011;438(1):25-32.
9. Megiorni F., Cialfi S., Dominici C., et al. Synergistic post-transcriptional regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 specific binding. *Plos One*. 2011;6(10): e26601.

10. Hassan F., Nuovo G.J., Crawford M, et al. MiR-101 and miR-144 regulate the expression of the CFTR chloride channel in the lung . *PLoS one*. 2012;7(11):e50837.
11. Ramachandran S., Karp P.H., Jiang P., et al. A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and $\Delta F508$ mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(33):13362-13367.
12. Ramachandran S., Karp P.H., Osterhaus S.R., et al. Post-transcriptional regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and function by microRNAs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;49(4):544-551.
13. Fabbri E., Borgatti M., Montagner G., et al. Expression of microRNA-93 and Interleukin-8 during *Pseudomonas aeruginosa*-mediated induction of Proinflammatory responses. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(6):1144-1155.
14. Hrach H.C., Mangone M. miRNA Profiling for Early Detection and Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4638.
15. Greco S., De Simone M., Colussi C. et al. Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J*. 2009;23(10):3335-3346.
16. Cacchiarelli D., Martone J., Girardi E., et al. MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the Duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin/nNOS pathway. *Cell Metab*. 2010;12(4):341-351.
17. Cacchiarelli D., Incitti T., Martone J., et al. miR-31 modulates dystrophin expression: new implications for Duchenne muscular dystrophy therapy. *EMBO Rep*. 2011;12(2):136-141.
18. Hildyard J.C., Wells D.J. Investigating synthetic oligonucleotide targeting of Mir31 in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS currents*. 8 (2016).
19. Ballarino M., Cazzella V., D'Andrea D., et al. Novel long noncoding RNAs (lncRNAs) in myogenesis: a miR-31 overlapping lncRNA transcript controls myoblast differentiation. *Mol Cell Biol*. 2015;35(4):728-736.
20. Tinsley J., Deconinck N., Fisher R., et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med*. 1998;4(12):1441-1444.
21. Chancellor D.R., Davies K.E., De Moor O., et al. Discovery of 2-arylbenzoxazoles as upregulators of utrophin production for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Med Chem*. 2011;54(9):3241-3250.
22. Tinsley J.M., Fairclough R.J., Storer R., et al. Daily treatment with SMT1100, a novel small molecule utrophin upregulator, dramatically reduces the dystrophic symptoms in the mdx mouse. *PLoS One*. 2011;6(5):e19189.
23. Basu U., Lozynska O., Moorwood C., et al. Translational regulation of utrophin by miRNAs. *PLoS one*. 2011;6(12):e29376. Mishra M.K., Loro E., Sengupta K., et al. Functional improvement of dystrophic muscle by repression of utrophin: let-7c interaction. *PLoS one*. 2017;12(10):eCollection.
24. Wang L., Zhou L., Jiang P., et al. Loss of miR-29 in myoblasts contributes to dystrophic muscle pathogenesis. *Mol Ther*. 2012;20(6):1222-1233.
25. Zanotti S., Gibertini S., Curcio M., et al. Opposing roles of miR-21 and miR-29 in the progression of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(7):1451-1464. 19
26. Thein S.L. Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis*. 2017;70:54-65.
27. Azzouzi I., Moest H., Winkler J., et al. MicroRNA-96 directly inhibits γ -globin expression in human erythropoiesis. *PLoS One*. 2011;6(7):e22838.
28. de Dreuzy E., Bhukhai K., Leboulch P., Payen E. Current and future alternative therapies for beta-thalassemia major. *Biomed J*. 2016;39:24-38.
29. Lulli V., Romania P., Morsilli O., et al. MicroRNA-486-3p regulates γ -globin expression in human erythroid cells by directly modulating BCL11A. *PLoS One*. 2013;8:e60436.
30. Bianchi N., Zuccato C., Lampronti I., et al. Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of gamma-globin gene expression. *BMB Rep*. 2009;42(8):493-499.
31. Gasparello J., Fabbri E., Bianchi N., et al. BCL11A mRNA targeting by miR-210: a possible network regulating γ -globin gene expression. *Int J Mol Sci*. 2017;18:E2530.
32. Sankaran V.G., Menne T.F., Scepanovic D., et al. MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:1519-1524.
33. Pule G.D., Mowla S., Novitzky N., Wonkam A. Hydroxyurea down-regulates BCL11A, KLF-1 and MYB through miRNA-mediated actions to induce γ -globin expression: implications for new therapeutic approaches of sickle cell disease. *Clin Transl Med*. 2016;5(1):1-15.
34. Li Y., Liu D., Zhang X., et al. miR-326 regulates HbF synthesis by targeting EKLF in human erythroid cells. *Exp Hematol*. 2018;63:33-40.
35. Blanco-Marchite C., Sánchez-Sánchez F., López-Garrido M.P., et al. WDR36 and P53 gene variants and susceptibility to primary open-angle glaucoma: analysis of gene-gene interactions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(11):8467-8478.
36. Medina-Trillo C., Aroca-Aguilar J.D., Ferre-Fernández J.J., et al. The Role of hsa-miR-5481 Dysregulation as a Putative Modifier Factor for Glaucoma-Associated FOXC1 Mutations. *Microna*. 2015;4(1):50-56.
37. Harafuji N., Schneiderat P., Walter M.C., Chen YW. miR-411 is up-regulated in FSHD myoblasts and suppresses myogenic factors. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8(1):55.
38. Wang H., Hertlein E., Bakkar N., et al. NF-kappaB regulation of YY1 inhibits skeletal myogenesis through transcriptional silencing of myofibrillar genes. *Mol Cell Biol*. 2007;27(12):4374-4387.
39. Heanue T.A., Boesmans W., Bell D.M., et al. A novel zebrafish RET heterozygous model of Hirschsprung disease identifies a functional role for mapk10 as a modifier of enteric nervous system phenotype severity. *PLoS Genet*. 2016;12:e1006439.
40. Wang Y., Jiang Q., Chakravarti A., et al. MicroRNA-4516-mediated regulation of MAPK10 relies on 3' UTR cis-acting variants and contributes to the altered risk of Hirschsprung disease. *J Med Genet*. 2020 Feb 17;1-9.
41. Amir R.E., Van den Veyver I.B., Wan M., et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet*. 1999;23:185-188.
42. Li Y., Wang H., Muffat J., et al. Global transcriptional and translational repression in human-embryonic-stem-cell-derived Rett syndrome neurons. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):446-458.
43. Marchetto M.C., Carromeu C., Acab A., et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2010;143:527-539.
44. Tsujimura K., Irie K., Nakashima H., et al. miR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes. *Cell reports*. 2015;12(11):1887-1901.
45. Abelson J.F., Kwan K.Y., O'Roak B.J., et al. Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science*. 2005;310(5746):317-320.
46. Manca S., Magrelli A., Cialfi S., et al. Oxidative stress activation of miR-125b is part of the molecular switch for Hailey-Hailey disease manifestation. *Exp Dermatol*. 2011;20(11):932-937.
47. Cialfi S., Oliviero C., Ceccarelli S., et al. Complex multipathways alterations and oxidative stress are associated with Hailey-Hailey disease. *Br J Dermatol*. 2010;162(3):518-526.
48. Grigelioniene G., Suzuki H.I., Taylan F., et al. Gain-of-function mutation of microRNA-140 in human skeletal dysplasia. *Nature medicine*. 2019;25(4):583-590.

49. Biso De Carvalho J., Loss de Morais G., dos Santos Vieira T.C., et al. miRNA genetic variants alters their secondary structure and expression in patients with RASopathies syndromes. *Frontiers in Genetics*. 2019;10:1144.

50. Teimouri M., Hosseini H., Shabani M., et al. Inhibiting miR-27a and miR-142-5p attenuate nonalcoholic fatty liver disease by regulating Nrf2 signaling pathway. *IUBMB life*. 2020;72(3):361-372.

References

1. Selbach M., Schwanhäusser B., Thierfelder N., et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008;455(7209):58-63.

2. Plotnikova O.M., Skoblov M.Yu. Effektivnost' programm, predskazyvayushchikh mikroRNK-mRNK vzaimodeystviya [Efficiency of the miRNA-mRNA interaction prediction programs] *Molekulyarnaya biologiya [Molecular biology]*. 2018;52(3):543-554. (In Russ.)

3. Lin S., Gregory R.I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews cancer*. 2015;15(6):321-333.

4. Klimentova E.A., Gilyazova I.R., Kunsbaeva G.B., Izmailov A.A., Sultanov I.M., Pavlov V.N., Khusnutdinova E.K. Assotsiatsiya polimorfnoogo varianta sayta svyazyvaniya mikroRNK rs10491534 gena TSC1 s tyazhest'yu techeniya raka pochki [Association of microRNA target site polymorphism rs10491534 of the TSC1 gene with severity renal cell carcinoma]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2016;15(4):50-52. (In Russ.)

5. Wong L.L., Wang J., Liew O.W., et al. MicroRNA and heart failure. *Int J Mol Sci*. 2016 Apr 6;17(4):502.

6. Ferrante M, Conti G.O.. Environment and neurodegenerative diseases: an update on miRNA role. *Microna*. 2017;6(3):157-165.

7. de Almeida R.C., Chagas V.S., Castro M.A., et al. Integrative analysis identifies genetic variants associated with autoimmune diseases affecting putative microRNA binding sites. *Frontiers in Genetics*. 2018;9:139.

8. Gillen A.E., Gosalia N., Leir S.H., Harris A. MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Biochemical Journal*. 2011;438(1):25-32.

9. Megiorni F., Cialfi S., Dominici C., et al. Synergistic post-transcriptional regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 specific binding. *Plos One*. 2011;6(10): e26601.

10. Hassan F., Nuovo G.J., Crawford M, et al. MiR-101 and miR-144 regulate the expression of the CFTR chloride channel in the lung . *PLoS one*. 2012;7(11):e50837.

11. Ramachandran S., Karp P.H., Jiang P., et al. A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and ΔF508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(33):13362-13367.

12. Ramachandran S., Karp P.H., Osterhaus S.R., et al. Post-transcriptional regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and function by microRNAs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;49(4):544-551.

13. Fabbri E., Borgatti M., Montagner G., et al. Expression of microRNA-93 and Interleukin-8 during *Pseudomonas aeruginosa*-mediated induction of Proinflammatory responses. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(6):1144-1155.

14. Hrach H.C., Mangone M. miRNA Profiling for Early Detection and Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4638.

15. Greco S., De Simone M., Colussi C. et al. Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J*. 2009;23(10):3335-3346.

16. Cacchiarelli D., Martone J., Girardi E., et al. MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the Duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin/nNOS pathway. *Cell Metab*. 2010;12(4):341-351.

17. Cacchiarelli D., Incitti T., Martone J., et al. miR-31 modulates dystrophin expression: new implications for Duchenne muscular dystrophy therapy. *EMBO Rep*. 2011;12(2):136-141.

18. Hildyard J.C., Wells D.J. Investigating synthetic oligonucleotide targeting of Mir31 in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS currents*. 8 (2016).

19. Ballarino M., Cazzella V., D'Andrea D., et al. Novel long noncoding RNAs (lncRNAs) in myogenesis: a miR-31 overlapping lncRNA transcript controls myoblast differentiation. *Mol Cell Biol*. 2015;35(4):728-736.

20. Tinsley J., Deconinck N., Fisher R., et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med*. 1998;4(12):1441-1444.

21. Chancellor D.R., Davies K.E., De Moor O., et al. Discovery of 2-arylbenzoxazoles as upregulators of utrophin production for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Med Chem*. 2011;54(9):3241-3250.

22. Tinsley J.M., Fairclough R.J., Storer R., et al. Daily treatment with SMT1100, a novel small molecule utrophin upregulator, dramatically reduces the dystrophic symptoms in the mdx mouse. *PLoS One*. 2011;6(5):e19189.

23. Basu U., Lozynska O., Moorwood C., et al. Translational regulation of utrophin by miRNAs. *PLoS one*. 2011;6(12):e29376.

24. Mishra M.K., Loro E., Sengupta K., et al. Functional improvement of dystrophic muscle by repression of utrophin: let-7c interaction. *PLoS one*. 2017;12(10):eCollection.

25. Wang L., Zhou L., Jiang P., et al. Loss of miR-29 in myoblasts contributes to dystrophic muscle pathogenesis. *Mol Ther*. 2012;20(6):1222-1233.

26. Zanotti S., Gibertini S., Curcio M., et al. Opposing roles of miR-21 and miR-29 in the progression of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(7):1451-1464. 19

27. Thein S.L. Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis*. 2017;70:54-65.

28. Azzouzi I., Moest H., Winkler J., et al. MicroRNA-96 directly inhibits γ-globin expression in human erythropoiesis. *PLoS One*. 2011;6(7):e22838.

29. de Dreuzy E., Bhukhai K., Leboulch P., Payen E. Current and future alternative therapies for beta-thalassemia major. *Biomed J*. 2016;39:24-38.

30. Lulli V., Romania P., Morsilli O., et al. MicroRNA-486-3p regulates γ-globin expression in human erythroid cells by directly modulating BCL11A. *PLoS One*. 2013;8:e60436.

31. Bianchi N., Zuccato C., Lampronti I., et al. Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of gamma-globin gene expression. *BMB Rep*. 2009;42(8):493-499.

32. Gasparello J., Fabbri E., Bianchi N., et al. BCL11A mRNA targeting by miR-210: a possible network regulating γ-globin gene expression. *Int J Mol Sci*. 2017;18:E2530.

33. Sankaran V.G., Menne T.F., Scepanovic D., et al. MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:1519-1524.

34. Pule G.D., Mowla S., Novitzky N., Wonkam A. Hydroxyurea down-regulates BCL11A, KLF-1 and MYB through miRNA-mediated actions to induce γ-globin expression: implications for new therapeutic approaches of sickle cell disease. *Clin Transl Med*. 2016;5(1):1-15.

35. Li Y., Liu D., Zhang X., et al. miR-326 regulates HbF synthesis by targeting EKLF in human erythroid cells. *Exp Hematol*. 2018;63:33-40.

36. Blanco-Marchite C., Sánchez-Sánchez F., López-Garrido M.P., et al. WDR36 and P53 gene variants and susceptibility to primary

- open-angle glaucoma: analysis of gene-gene interactions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(11):8467-8478.
37. Medina-Trillo C., Aroca-Aguilar J.D., Ferre-Fernández J.J., et al. The Role of hsa-miR-5481 Dysregulation as a Putative Modifier Factor for Glaucoma-Associated FOXC1 Mutations. *Microna.* 2015;4(1):50-56.
 38. Harafuji N., Schneiderat P., Walter M.C., Chen YW. miR-411 is up-regulated in FSHD myoblasts and suppresses myogenic factors. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8(1):55.
 39. Wang H., Hertlein E., Bakkar N., et al. NF-kappaB regulation of YY1 inhibits skeletal myogenesis through transcriptional silencing of myofibrillar genes. *Mol Cell Biol.* 2007;27(12):4374-4387.
 40. Heanue T.A., Boesmans W., Bell D.M., et al. A novel zebrafish RET heterozygous model of Hirschsprung disease identifies a functional role for mapk10 as a modifier of enteric nervous system phenotype severity. *PLoS Genet.* 2016;12:e1006439.
 41. Wang Y., Jiang Q., Chakravarti A., et al. MicroRNA-4516-mediated regulation of MAPK10 relies on 3' UTR cis-acting variants and contributes to the altered risk of Hirschsprung disease. *J Med Genet.* 2020 Feb 17;1-9.
 42. Amir R.E., Van den Veyver I.B., Wan M., et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* 1999;23:185-188.
 43. Li Y., Wang H., Muffat J., et al. Global transcriptional and translational repression in human-embryonic-stem-cell-derived Rett syndrome neurons. *Cell Stem Cell.* 2013;13(4):446-458.
 44. Marchetto M.C., Carroumeu C., Acab A., et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell.* 2010;143:527-539.
 45. Tsujimura K., Irie K., Nakashima H., et al. miR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes. *Cell reports.* 2015;12(11):1887-1901.
 46. Abelson J.F., Kwan K.Y., O'Roak B.J., et al. Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science.* 2005;310(5746):317-320.
 47. Manca S., Magrelli A., Cialfi S., et al. Oxidative stress activation of miR-125b is part of the molecular switch for Hailey-Hailey disease manifestation. *Exp Dermatol.* 2011;20(11):932-937.
 48. Cialfi S., Oliviero C., Ceccarelli S., et al. Complex multipathways alterations and oxidative stress are associated with Hailey-Hailey disease. *Br J Dermatol.* 2010;162(3):518-526.
 49. Grigelioniene G., Suzuki H.I., Taylan F., et al. Gain-of-function mutation of microRNA-140 in human skeletal dysplasia. *Nature medicine.* 2019;25(4):583-590.
 50. Biso De Carvalho J., Loss de Moraes G., dos Santos Vieira T.C., et al. miRNA genetic variants alters their secondary structure and expression in patients with RASopathies syndromes. *Frontiers in Genetics.* 2019;10:1144.
 51. Teimouri M., Hosseini H., Shabani M., et al. Inhibiting miR-27a and miR-142-5p attenuate nonalcoholic fatty liver disease by regulating Nrf2 signaling pathway. *IUBMB life.* 2020;72(3):361-372.