

Дольский Александр Алексеевич

**Некодирующие РНК в патогенезе заболеваний, ассоциированных с
ломкой X-хромосомой**

1.5.3 – Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный Юдкин Дмитрий Владимирович

Руководитель: кандидат биологических наук, заведующий отделом геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные Демаков Сергей Анатольевич

оппоненты: доктор биологических наук, директор ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук

Дымова Майя Александровна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Ведущая Федеральное государственное бюджетное учреждение
организация: науки Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита состоится «27» мая 2022 г. в 13-30 на заседании диссертационного совета 64.1.001.1 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.С. Непомнящих

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. На сегодняшний день существует целый ряд заболеваний, обобщенных под общим термином «фраксопатии». Он включает в себя синдромы, связанные с экспансией CGG повтора в 5'-НТО мРНК гена *FMR1*, продуктом которого является белок FMRP (Richter J.D., Zhao X., 2021). В случае гена *FMR1*, выделяют 3 основных аллеля, которые отличаются как уровнем мРНК и белка FMRP, так и фенотипическими проявлениями у пациентов: норма (менее 55 CGG триплетов), премутация (от 55 до 200 CGG триплетов), полная мутация (больше 200 CGG триплетов и метилирование промоторной области гена) (Rajaratnam A. et al., 2017). При экспансии в диапазоне от 55 до 200 CGG повторов возникает премутантный аллель гена *FMR1* (Saldarriaga W. et al., 2014), что сопровождается изменением уровня мРНК и количества белка FMRP относительно нормы (Tassone F. et al., 2007). Частота встречаемости в популяции этого варианта гена составляет 1:150-300 у женщин и 1:450-850 у мужчин (Hunter J. et al., 2014; Rajaratnam A. et al., 2017). У носителей премутантного аллеля могут развиваться заболевания, ассоциированные с ломкой X-хромосомой, такие как синдром тремора и атаксии (FXTAS), а также синдром первичной овариальной недостаточности (FXPOI) (Hagerman R.J., Hagerman P., 2016; Pirozzi F., Tabolacci E., Neri G., 2011). У носителей полной мутации гена *FMR1* развивается синдром ломкой X-хромосомы (FXS). Частота встречаемости полной мутации гена *FMR1* в популяции составляет 1:7000 у мужчин и 1:11000 у женщин (Hunter J. et al., 2014; Rajaratnam A. et al., 2017).

На данный момент методов целенаправленного лечения фраксопатий не существует. Генетическое тестирование данных синдромов заключается лишь в анализе размера CGG повтора у пациентов при планировании семьи и оценке риска его увеличения в следующем поколении. Однако по этим данным невозможно установить степень проявлений FXTAS и FXPOI у носителей премутантного аллеля (Ennis S., Ward D., Murray A., 2006; Hipp H.S. et al., 2016; Sullivan A.K. et al., 2005). Поскольку FXTAS и FXPOI развиваются в позднем возрасте, изучение механизмов их патогенеза и создание новых методов диагностики может помочь пациентам начать раннюю медикаментозную терапию для купирования проявления синдромов.

Известно, что размер CGG повтора напрямую не коррелирует с развитием патологий у носителей премутантного аллеля гена *FMR1* (Ennis S., Ward D., Murray A., 2006; Hipp H.S. et al., 2016; Sullivan A.K. et al., 2005). Вклад в проявление заболевания могут вносить также другие факторы, в частности в

некоторых работах показано участие в этом некодирующих РНК (Zongaro S. et al., 2013). Однако, существующие данные не позволяют сформировать представление о регуляции активности гена *FMR1* и патогенезе этих синдромов при участии микроРНК.

Для того чтобы пролить свет на патогенез заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, а также приблизиться к разработке методов терапии и диагностики, необходимо провести детальные исследования участия некодирующих РНК в регуляции активности гена *FMR1* и в развитии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой на различных моделях: клеточных линиях В-лимфоцитов, которые получены от пациентов с разными вариантами гена *FMR1*, а также мышей моделей FXТAS. Использование линий клеток позволяет установить зависимость активности этого гена от уровня экспрессии микроРНК, характерных для человека. Однако, клеточные культуры не отражают изменения паттерна экспрессии микроРНК в зависимости от пола и возраста, а также в целом в организме, поэтому необходимо использовать линию мышей модели FXТAS. Использование этих двух модельных систем позволит получить комплексное представление об участии микроРНК в регуляции активности гена *FMR1* в организме человека.

Целью данной работы является исследование уровня экспрессии микроРНК, комплементарных мРНК гена *FMR1*, и их роли в регуляции активности этого гена. В связи с этим были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать экспрессию микроРНК, потенциально взаимодействующих с мРНК гена *FMR1* в культурах клеток пациентов с заболеваниями, ассоциированными с ломкой X-хромосомой в зависимости от их генотипа и активности этого гена;

2. Определить взаимодействие выбранных микроРНК с мРНК гена *FMR1* в трансгенной клеточной модели;

3. Исследовать уровень экспрессии микроРНК, взаимодействующих с мРНК гена *FMR1* и изменяющих свою экспрессию в зависимости от активности этого гена, в линии лабораторных мышей *Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}* с премутацией гена *fmr1*.

Научная новизна. Частота встречаемости заболеваний, вызванных экспансией повторов, в частности фраксопатий, высока в популяции человека, однако механизмы развития проявлений этих заболеваний остаются неизвестными. Предполагают, что микроРНК могут участвовать в регуляции активности гена *FMR1* и быть связаны с развитием заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, в случае пациентов с премутантным

аллелем гена *FMR1*. Однако на сегодняшний день существует мало данных о роли микроРНК в патогенезе этих заболеваний. В связи с этим в данной работе:

1. Впервые проведено исследование уровня экспрессии выбранных микроРНК в клеточных культурах, полученных от пациентов, обладающих нормой, премутацией, а также метилированной и неметилированной полной мутацией гена *FMR1*. В результате получены данные об уровне экспрессии hsa-miR-182-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-302a-3p в зависимости от активности гена *FMR1*.

2. Для экспериментальной оценки взаимодействия микроРНК с 3'-областью мРНК гена *FMR1* была создана модельная система на основе плазмидной ДНК. В результате, впервые экспериментально подтверждено взаимодействие hsa-miR-25-3p, hsa-miR-148a-3p и hsa-miR-139-5p с данным участком мРНК.

3. Были получены данные об уровне экспрессии hsa-miR-182-5p, hsa-miR-25-3, hsa-miR-139-5p в головном мозге мышинной модели FXTAS. Впервые показано, что hsa-miR-139-5p изменяет свою экспрессию в ответ на изменение активности гена *fmr1* у модельных животных. В дальнейшем данная микроРНК может быть исследована в качестве возможного раннего диагностического маркера развития заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, которые напрямую не коррелируют с размером CGG повтора у пациентов с премутантным аллелем гена *FMR1*;

4. Показано, что hsa-miR-182-5p не взаимодействует с мРНК гена *FMR1*. Однако уровень ее экспрессии повышен в группе клеточных линий с полной мутацией гена *FMR1* относительно контрольной линии GM06895. Таким образом впервые описана микроРНК с вероятной ролью в развитии FXS при отсутствии мРНК и белка FMRP.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы. Данная работа посвящена изучению роли некодирующих РНК в развитии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Полученные результаты расширяют представления о роли микроРНК в патогенезе заболеваний, ассоциированных с синдромом ломкой X-хромосомы.

Важное теоретическое значение имеют данные об участии микроРНК в регуляции активности гена *FMR1* и развитии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. В работе показана важность исследований не только уровней микроРНК для определения их участия в патогенезе, но и непосредственно самой возможности взаимодействий между матричной РНК гена и регуляторной микроРНК. Только в результате такого подхода можно

сделать вывод об участии определенных микроРНК в регуляции активности генов-мишеней.

Практическое значение работы заключается в возможности использования результатов для прогнозирования течения заболеваний у пациентов с премутацией гена *FMR1*. В настоящее время диагностика позволяет установить только размер CGG повтора. Это помогает установить риски передачи увеличенного повторенного тракта следующему поколению, однако не решает проблему диагностики проявления заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Поскольку FXТAS и FXPOI развиваются в позднем возрасте, изучение роли микроРНК могут лечь в основу создания новых методов ранней диагностики, что поможет носителям премутантного аллеля начать раннюю медикаментозную терапию для купирования проявления синдромов в случае риска их возникновения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Уровень экспрессии hsa-miR-182-5p повышен в клеточных культурах с полной мутацией гена *FMR1* в случае отсутствия мРНК и белка FMRP;

2. микроРНК hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-25-3p и hsa-miR-139-5p взаимодействуют с мРНК гена *FMR1*;

3. miR-139-5p участвует в регуляции активности гена *fmr1* в клеточных линиях В-лимфоцитов и в головном мозге мышей линии *Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}* с премутацией гена *fmr1*.

Степень достоверности и апробации результатов. Научные положения и выводы являются обоснованными. Полученные результаты являются достоверными и опираются на список литературы, процитированной в диссертации. Материалы диссертационной работы были представлены на 6 международных научных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 141 странице, включает 11 рисунков, 7 таблиц, 4 приложения. Список литературы включает 233 источника.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 научных публикаций в журналах из перечня ВАК. Также результаты представлены на 6 отечественных и зарубежных конференциях.

Вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в постановке задач, решаемых в рамках диссертационной работы, все представленные экспериментальные данные были получены лично. Автор принимал

непосредственное участие в статистическом анализе, интерпретации данных, представлении результатов на конференциях, а также публикации результатов в рецензируемых журналах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы состоит из 5 разделов и заключения. В первом разделе рассматриваются исторические этапы исследования заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Во втором разделе рассмотрены современные представления о заболеваниях: синдром ломкой X-хромосомы (FXS), первичная овариальная недостаточность, ассоциированная с ломкой X-хромосомой (FXPOI), синдром атаксии и тремора, ассоциированный с ломкой X-хромосомой (FXTAS), а также других нейропсихиатрических расстройств, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. В третьем разделе рассмотрена классификация некодирующих РНК, подробно рассмотрены особенности строения и функции микроРНК. В четвертом разделе описаны современные представления о механизмах патогенеза заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. В пятом разделе представлена информация о роли микроРНК в развитии и работе центральной нервной системы.

Материалы и методы. В работе использованы следующие модельные системы: мышинная модель FXTAS, клеточные линии В-лимфоцитов человека; клеточная линия HEK293. В работе применялись стандартные подходы по содержанию лабораторных животных, культивированию линий клеток. Используются методы молекулярной биологии: выделение ДНК и РНК, реакция обратной транскрипции, ПЦР в реальном времени с использованием систем детекции SYBR и TaqMan; вестерн-блот гибридизация; секвенирование по Сэнгеру. В процессе создания генно-инженерных конструкций использовали стандартные методы генетической инженерии.

Результаты и обсуждение. На сегодняшний день существуют базы данных (mirbase.org, targetscan.org, mirdb.org), позволяющие проводить поиск последовательностей микроРНК и их гены-мишени. Выбрав микроРНК, мишенью которых является мРНК гена *FMR1*, необходимо провести анализ их экспрессии в клеточных линиях пациентов с разными вариантами аллеля гена *FMR1*, что позволит изучить их уровень в зависимости от активности этого гена. Однако также необходимо экспериментально подтвердить их взаимодействие с мРНК гена-мишени, поскольку базы данных только предсказывают такое взаимодействие (Agarwal V. et al., 2015; Friedman R.C. et al., 2009; Kozomara A., Griffiths-Jones S., 2011; Kozomara A., Griffiths-Jones S., 2014; Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P., 2005). Обнаружить такую связь можно в искусственных

модельных системах с использованием генно-инженерных конструкций, которые позволяют активировать сверхэкспрессию определенной микроРНК с возможностью детекции их взаимодействия с 3'-НТО мРНК гена *FMR1* (Landthaler M. et al., 2008).

В результате исследования уровня экспрессии микроРНК в культурах клеток и анализа их взаимодействия с мРНК гена *FMR1* на первом этапе будут отобраны те микроРНК, которые с наибольшей вероятностью связаны с регуляцией гена *FMR1* и развитием фраксопатий. На следующем этапе, выбранные микроРНК будут исследованы в мышинной модели FXTAS, обладающей премутантным аллелем гена *fmr1*. в зависимости от пола и возраста, что поможет установить их вовлеченность в патогенез заболеваний.

Выбор микроРНК, потенциально взаимодействующих с мРНК гена *FMR1*. С использованием баз данных (mirbase.org, targetscan.org, mirdb.org), нами были выбраны 7 микроРНК, потенциально взаимодействующие с мРНК гена *FMR1* – hsa-miR-182-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-302a-3p. Эти микроРНК обладают высокой вероятностью взаимодействия с мРНК гена *FMR1* за счет консервативных прочных типов комплементарной связи с 3'-НТО мРНК. Наличие таких типов связей как 8mer, 7mer-A1 и 7mer-m8 ранее показано для ряда микроРНК, которые обладают экспериментально подтвержденными регуляторными функциями (Nielsen C.V. et al., 2007).

Исследование активности гена *FMR1* в клеточных культурах В-лимфоцитов. В исследовании использованы постоянные клеточные культуры В-лимфоцитов с различным генотипом: Норма гена *FMR1* – GM06895, GM06865, CPG166, CPG8; премутация – GM06891, GM06891E; неметирированная полная мутация – GM06897; полная мутация – GM04025, CPG18, CPG7. Большое разнообразие генотипов *FMR1* в используемых клеточных линиях В-лимфоцитов позволяет найти возможные корреляции активности гена *FMR1* с уровнем микроРНК, которые теоретически взаимодействуют с мРНК этого гена.

В результате анализа полученных данных показано, что уровень экспрессии мРНК и белка FMRP напрямую не связан с нормой и премутацией гена *FMR1* в постоянных клеточных линиях В-лимфоцитов. микроРНК участвуют в процессах транскрипции и трансляции, изменяя стабильность мРНК и уровень синтеза пептидов (Bhattacharyya S.N. et al., 2006; Braun J.E. et al., 2012; Mathonnet G. et al., 2007). Критерием при изучении уровней экспрессии микроРНК в зависимости от активности гена *FMR1* является соотношение уровня экспрессии мРНК этого гена к уровню белка FMRP – коэффициента, который позволяет

разделить все клеточные линии на группы со схожей активностью этого гена (Таблица 1).

Таблица 1. Характеристика групп клеточных линий, используемых для анализа уровня экспрессии микроРНК.

Гр.	Кл. линия	Отношение уровня белка FMRP к уровню мРНК гена <i>FMR1</i>	Характеристика групп клеточных линий
1	GM06865	0,26	Клеточные линии, несущие норму и премутацию гена <i>FMR1</i> , со значениями критерия разделения менее единицы. Группа характеризуется нормальным или повышенным уровнем экспрессии мРНК гена <i>FMR1</i> и сниженным уровнем белка FMRP.
	GM06891	0,34	
2	GM06891E	1,07	Клеточные линии, несущие норму и премутацию гена <i>FMR1</i> , со значениями критерия разделения больше единицы Группа характеризуется сниженной экспрессией мРНК гена <i>FMR1</i> при отсутствии изменения уровня белка FMRP
	CPG8	1,36	
	CPG166	1,49	
3	GM06897	6,5	Клеточная линия, несущая аллель неметилированной полной мутации гена <i>FMR1</i> с пониженной экспрессией мРНК и повышенным уровнем белка FMRP.
4	GM04025	–	Клеточные линии с аллелем полной мутации без активности гена <i>FMR1</i>
	CPG18	–	
	CPG7	–	
**	GM06895	1	Контрольная клеточная линия

** Клеточная линия, используемая для нормировки результатов уровня экспрессии мРНК и белка FMRP.

Значения такого коэффициента могут быть больше, либо меньше единицы, либо равны единице. Отдельную группу клеточных линий составляют культуры с полной мутацией гена *FMR1*. В группу 1 вошли клеточные линии GM06865 и GM06891 с коэффициентом меньше единицы. В группу 2 вошли клеточные культуры GM06891E, CPG8 и CPG166 с коэффициентом больше единицы. Культура клеток GM06897 с неметилированной полной мутацией, с самым высоким уровнем белка при пониженной экспрессии мРНК гена *FMR1*, будет

рассматриваться отдельно как группа 3. Группа 4 включает линии GM04025, CPG18 и CPG7, которые несут полную мутацию гена *FMR1* и не обладают экспрессией мРНК и белка FMRP.

Экспрессия микроРНК в группах клеточных линий В-лимфоцитов. Уровень экспрессии микроРНК, был исследован в пяти группах клеточных линий В-лимфоцитов с различной активностью гена *FMR1*. Экспрессия микроРНК представлена как среднее значение безразмерной величины между всеми клеточными линиями, входящими в определенную группу. Данное значение отражает во сколько раз отличается тот или иной уровень экспрессии определенной микроРНК в каждой группе относительно аналогичных показателей в клеточной линии GM06895.

Увеличение экспрессии микроРНК может быть связано со снижением активности гена *FMR1* и наоборот – уменьшение экспрессии микроРНК может влиять на увеличение активности этого гена. Мы предположили, что в группах клеточных линий с коэффициентом < 1 уровень микроРНК должен повышаться. В клеточных линиях с коэффициентом > 1 – уровень микроРНК должен снижаться. Данному критерию может соответствовать только hsa-miR-139-5p (Таблица 2). Эта микроРНК достоверно ($P < 0,05$) снижает свою экспрессию в Группе 2 и клеточной линии GM06897 со значением коэффициента > 1 . Хотя в группе 1 со значением коэффициента < 1 нет достоверного повышения, в данной группе существует тенденция к повышению уровня экспрессии, которая рассчитана с использованием коэффициента корреляции Пирсона, где коэффициент $r = 0,442$ со значением достоверности $p = 0,38$.

Также была отмечена hsa-miR-25-3p, поскольку уровень ее экспрессии достоверно не отличается от контрольной клеточной линии во всех группах клеток. Возможно, эта микроРНК может быть связан не с геном *FMR1*, а другими генами-мишенями.

Для hsa-miR-182-5p показано увеличение уровня экспрессии в группе клеточных линий с полной мутацией гена *FMR1*. Таким образом, hsa-miR-182-5p может быть исследована как новый дополнительный диагностический маркер при синдроме ломкой X-хромосомы.

Анализ взаимодействия микроРНК с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*. Помимо анализа экспрессии микроРНК, необходимо экспериментально подтвердить их взаимодействие с 3'-НТО мРНК этого гена. Для анализа взаимодействия 3'-НТО мРНК гена *FMR1* с исследуемыми микроРНК необходимо провести индукцию экспрессии микроРНК с использованием плазмидных конструкций (Рисунок 1).

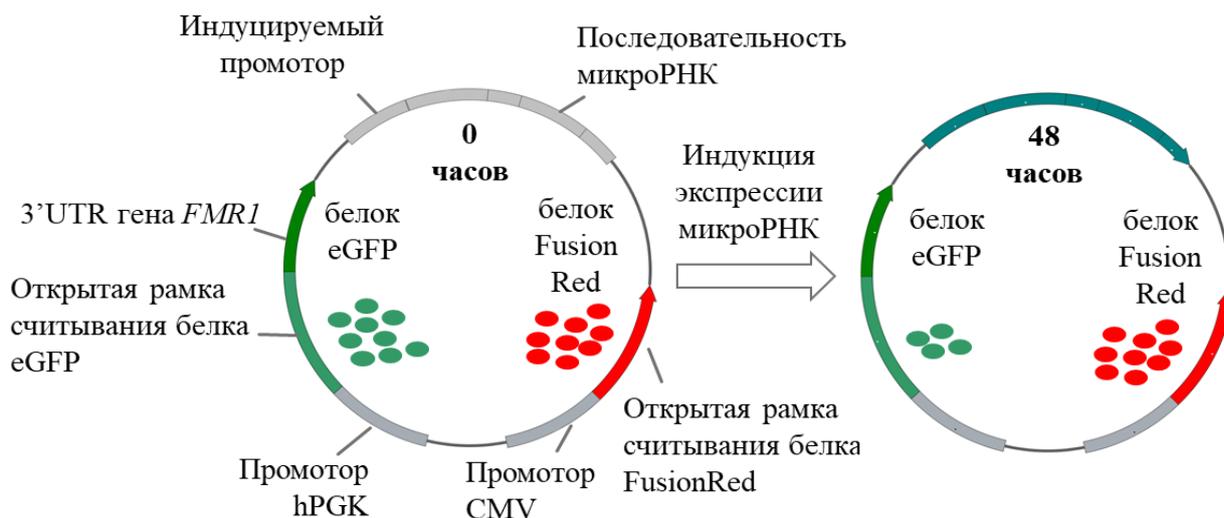


Рисунок 1. Схема эксперимента по определению взаимодействия 3'-НТО мРНК гена *FMR1* с исследуемыми микроРНК.

В начальный момент времени после липофекции НЕК293 происходит синтез FusionRed и eGFP, экспрессия которых регулируется конститутивными промоторами CMV и hPGK, соответственно. При этом мРНК белка eGFP содержат последовательность 3'-НТО мРНК гена *FMR1*. Также эта конструкция содержит последовательность микроРНК под регуляцией индуцируемого доксициклином промотора. В случае, если происходит связывание зрелой микроРНК с последовательностью 3'-НТО мРНК гена *FMR1*, которая расположена в мРНК белка eGFP, снижается количество этого репортерного белка.

Флуоресценцию репортерных белков измеряли в первый день после трансфекции до индукции экспрессии микроРНК и через 48 часов после добавления доксициклина. При транзientной экспрессии созданными конструкциями, которые содержат последовательность определенной микроРНК, уровень eGFP должен изменяться при ее взаимодействии с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*. Флуоресцентный сигнал eGFP был нормирован на сигнал FusionRed, экспрессирующийся в той же самой культуре клеток. Уровень экспрессии репортерных белков, нарабатываемых с плазмиды, которая содержит все функциональные элементы за исключением гена микроРНК, считается контрольным уровнем – флуоресцентный сигнал eGFP, нормированный относительно уровня FusionRed, принят за единицу. Каждый эксперимент проведен в трех биологических повторах. Изменение уровня eGFP, нормированного на сигнал Fusion Red представлено как безразмерная величина, которая отражает во сколько раз отличается то или иное значение относительно аналогичных показателей в контрольной клеточной линии в начальный момент времени, либо через 48 часов после добавления доксициклина (Рисунок 2).

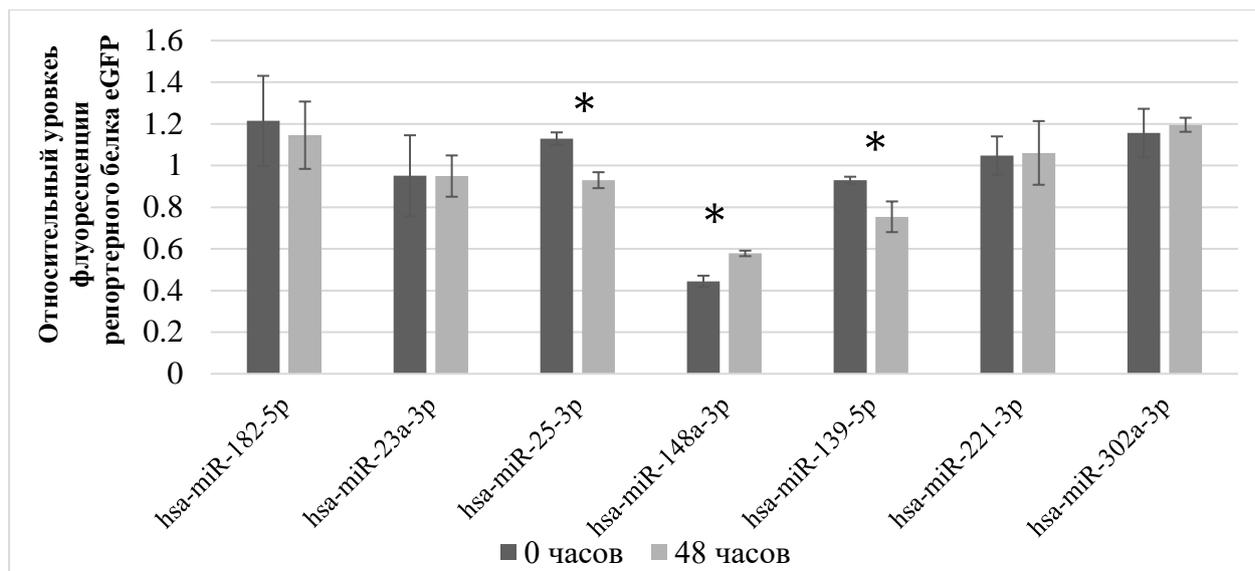


Рисунок 2. Анализ взаимодействия микроРНК с 3'-НТО мРНК гена *FMRI*. Относительный уровень экспрессии белка eGFP до (0 часов) и после (48 часов) индукции экспрессии микроРНК после активации доксициклином. (*) Значимые различия, $P < 0,05$.

В таблице 2 представлены данные результатов анализа экспрессии микроРНК в группах клеточных линий, а также анализа их взаимодействия с 3'-областью мРНК гена *FMRI*.

Таблица 2. Общие данные по результатам анализа уровня микроРНК в клеточных группах В-лимфоцитов и исследования их взаимодействия с 3'-НТО мРНК гена *FMRI*. Жирным шрифтом отмечены микроРНК, которые выбраны для анализа их экспрессии в линии мышей *Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}*; $K = \frac{\text{уровень белка FMRP}}{\text{уровень мРНК гена FMRI}}$; Зеленый цвет – достоверное увеличение уровня экспрессии микроРНК. Оранжевый цвет – достоверное снижение уровня экспрессии микроРНК.

		hsa-miR-182-5p	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-25-3p	hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-302a-3p
Взаимодействие с 3'-НТО мРНК гена <i>FMRI</i>		НЕТ	НЕТ	ДА	ДА	ДА	НЕТ	НЕТ
Группы клеток								
Группа 1 K<1	Клеточные линии, несущие норму и премутацию гена <i>FMRI</i> , со значениями критерия разделения менее единицы	1,68	0,98	1,08	0,41	1,46	1,13	0,45
Группа 2 K>1	Клеточные линии, несущие норму и премутацию гена <i>FMRI</i> , со значениями отношения больше единицы	1,61	0,44	0,89	0,6	0,33	1,09	1,7
Группа 3 K>1	Клеточная линия, несущая аллель неметилированной полной	0,55	0,36	0,82	0,67	0,48	0,28	0,24
Группа 4 K=отс.	Клеточные линии с аллелем полной мутации без активности гена <i>FMRI</i>	7,90	1,02	1,25	0,39	0,56	1,15	0,7

В результате оценки активности этого гена в линиях В-лимфоцитов показано, что размер повторенной последовательности не всегда связан с активностью гена

FMRI. При использовании клеточных линий В-лимфоцитов важен не только генотип, но и активность гена *FMRI* – уровень экспрессии мРНК и белка, что позволит определить связь с экспрессией микроРНК, которые взаимодействуют с 3'-НТО мРНК. В результате этого анализа показано, что при экспрессии hsa-miR-25-3p и hsa-miR-139-5p уровень репортерного белка eGFP снижается, однако для hsa-miR-148a-3p уровень сигнала повышается. В основном микроРНК являются негативными регуляторами активности генов-мишеней – при повышении уровня микроРНК, количество продукта гена-мишени снижается (Huang J. et al., 2010). Однако с помощью математического моделирования было обнаружено, что при сверхэкспрессии определенной микроРНК, она может стать положительным регулятором уровня белка (Nyayanit D., Gadgil C.J., 2015). Аналогичным образом может действовать hsa-miR-148a-3p в случае мРНК гена *FMRI*. Однако при исследовании ее экспрессии в клеточных культурах В-лимфоцитов не было показано корреляций между ее экспрессией и активностью гена *FMRI* в разных группах клеточных линий.

В случае микроРНК, которые являются негативными регуляторами активности генов, увеличение их экспрессии должно быть связано со снижением активности гена *FMRI*, и наоборот, уменьшение экспрессии микроРНК должно приводить к увеличению активности этого гена. В результате исследования показано, что hsa-miR-139-5p изменяет свою экспрессию в зависимости от активности гена *FMRI* в клеточных линиях В-лимфоцитов и взаимодействует с 3'-НТО мРНК этого гена. Поэтому эта микроРНК выбрана для дальнейшего анализа в модельных мышах как потенциальный кандидат, участвующий в регуляции активности гена *FMRI*.

Также была отмечена hsa-miR-25-3p, поскольку показано ее взаимодействие с 3'-НТО мРНК гена *FMRI*, однако уровень ее экспрессии достоверно не отличается от контрольной клеточной линии во всех группах клеток. Уровень ее экспрессии в клеточных линиях может быть связан не с геном *FMRI*, а другими генами-мишенями. Возможно, уровень этой микроРНК будет коррелировать с активностью гена *FMRI* только в определенном возрасте, что можно обнаружить при исследовании на модельных животных.

Дополнительно была выбрана hsa-miR-182-5p в связи с тем, что уровень этой микроРНК увеличен в клеточной группе с полной мутацией, а в остальных клеточных группах не было связи с активностью гена *FMRI*. Предполагается, что уровень этой микроРНК не будет изменяться в модельных животных, которые обладают нормой и премутацией гена *fmr1*. Если эта гипотеза подтвердится,

можно сделать вывод, что данная микроРНК связана только с полной мутацией гена *FMRI* и заболеванием FXS.

Исследование активности гена *fmr1* в образцах головного мозга модельных мышей FXTAS. Чтобы установить роль микроРНК в регуляции активности гена *FMRI*, необходимо исследовать их уровень в зависимости от пола и возраста. Данный ген находится на половой X-хромосоме, поэтому, возможно, что микроРНК могут по-разному регулировать активность гена у самок и самцов (Sohrabji F., Selvamani A., 2019). Также важным фактором является возраст, поскольку заболевания, ассоциированные с ломкой X-хромосомой, развиваются в позднем возрасте. Таким образом, необходимо провести анализ уровня экспрессии микроРНК в раннем возрасте и на момент развития симптомов заболевания, чтобы установить их роль в этом процессе. Для определения паттерна экспрессии выбранных ранее микроРНК в зависимости от пола и возраста использована мышинная модель FXTAS – *Fmr1* CGG KI (*Fmr1*^{tm2Cgr/DlnJ}). У таких мышей нативный короткий CGG повтор в 5'-НТО гена *fmr1*, соответствующий норме, был заменен на последовательность из 98 CGG триплетов, что соответствует премутантному аллелю (Bontekoe C.J.M. et al., 2001). Согласно литературным данным показано, что в этой мышинной модели наблюдается снижение способности к визуально-пространственному обучению, повышается уровень тревожности наряду с развитием умеренных нейромоторных нарушений (Berman R., Willemsen R., 2009). Также установлено, что в среднем наблюдаемые проявления возникают в возрасте 7,5 месяцев. На основе результатов поведенческих тестов был сделан вывод, что все наблюдаемые проявления коррелируют с проявлениями FXTAS у человека (Berman R., Willemsen R., 2009).

Первая группа самцов состояла из 6 гемизигот линии *Fmr1*^{tm2Cgr/DlnJ}, обладающей премутантным аллелем гена *fmr1*. Вторая группа самцов состояла из 6 контрольных животных – носителей нормального аллеля гена *fmr1*.

Первая группа самок состояла из 6 гомозигот линии *Fmr1*^{tm2Cgr/DlnJ}, несущих два премутантных аллеля гена *fmr1*. Вторая группа самок включала 6 гетерозигот линии *Fmr1*^{tm2Cgr/DlnJ}, несущих премутантный и нормальный аллель гена *fmr1*. Третья группа самок состояла из 6 контрольных животных – носителей двух нормальных аллелей гена *fmr1*.

Анализ экспрессии мРНК гена *fmr1*, уровня белка *Fmrp* и микроРНК проводился в образцах головного мозга трех мышей возрастом 1 месяц и трех мышей возрастом 8 месяцев из каждой группы. Возраст 8 месяцев был выбран, поскольку он является временной точкой начала проявлений FXTAS (Berman R.,

Willemsen R., 2009). Значения экспрессии гена *fmr1* в группах животных представлены как безразмерные величины, которые отражают во сколько раз отличается среднее значение уровня экспрессии трех животных в экспериментальной группе относительно среднего значения показателей в контрольной группе животных аналогичного пола и возраста (Таблица 3).

Уровни белка Fmrp в группах животных представлены как безразмерные величины, которые отражают то, во сколько раз отличается то или иное среднее значение уровня белка Fmrp, нормированное на уровень белка Gapdh относительно показателей в контрольной группе животных аналогичного пола и возраста (Таблица 3).

Анализ экспрессии микроРНК в образцах головного мозга модельных мышей FXTAS. В результате анализа уровня микроРНК в клеточных линиях В-лимфоцитов, а также анализа взаимодействия микроРНК с мРНК гена *FMR1* выбраны hsa-miR-139-5p, hsa-miR-25-3p и hsa-miR-182-5p для исследования паттерна их экспрессии в мышцах линии Fmr1tm2Cgr/DlnJ с охарактеризованной активностью гена *fmr1* в головном мозге.

Анализ сходства выбранных микроРНК человека и гомологичных микроРНК, обнаруженных в организме мышей, проведен на основе данных targetscan.org. Показано, что разница между этими микроРНК человека и мыши не существенна, что позволяет сравнить результаты изменения их экспрессии в клеточных линиях В-лимфоцитов человека и паттерна экспрессии в мышцах.

В таблице 3 представлены общие данные результатов анализа активности гена *fmr1* и уровня экспрессии микроРНК в головном мозге мышей моделей FXTAS.

Таблица 3. Общие данные по результатам анализа активности гена *fmr1* и уровня экспрессии микроРНК в головном мозге мышей моделей FXTAS. Зеленый цвет – достоверное увеличение уровня экспрессии микроРНК. Оранжевый цвет – достоверное снижение уровня экспрессии микроРНК. Значимые различия, $P < 0,05$.

	Самки гомозиготы по премутантному гену <i>fmr1</i>		Самки гетерозиготы по премутантному гену <i>fmr1</i>		Самцы гемизиготы по премутантному гену <i>fmr1</i>	
	1 месяц	8 месяцев	1 месяц	8 месяцев	1 месяц	8 месяцев
Уровень белка fmrp	0,18	33,47	0,81	37,80	1,61	3,27
Уровень мРНК гена <i>fmr1</i>	0,61	0,78	1,26	0,69	0,63	0,59
mmu-miR-139-5p (ID: MIMAT0000656)	0,59	0,33	0,75	0,70	0,41	0,13
mmu-miR-25-3p (ID: MIMAT0000652)	1,32	0,83	1,95	2,60	0,58	0,24
mmu-miR-182-5p (ID: MIMAT0000211)	0,92	0,82	1,33	0,56	1,17	1,00

Было предположено, что самки гомозиготы, несущие два премутантных аллеля, будут обладать уровнем активности гена *fmr1*, сравнимым с самцами гемизиготами, но также будут обладать возможными различиями, связанными с полом. Самки гетерозиготы по премутантному аллелю гена *fmr1* должны быть сравнимы с самками нормального генотипа, что связано с инактивацией X-хромосомы. В связи с тем, что белок FMRP главным образом участвует в регуляции развития нейронов для исследования взаимосвязи активности гена *fmr1* и микроРНК были использованы образцы головного мозга животных. Аналогично исследованию, проведенному на клеточных линиях человека, мы предполагали, что увеличение экспрессии микроРНК может быть связано со снижением активности гена *fmr1* и наоборот – уменьшение экспрессии микроРНК может влиять на увеличение активности этого гена. Однако, в случае мышей, на уровень экспрессии микроРНК помимо генотипа может влиять возраст и пол животных (Guo D. et al., 2017).

Анализ сходства микроРНК проведен на основе данных targets.org. В результате показано, что мышинные гомологи miR-139-5p, miR-25-3p, miR-182-5p человека имеют близкую по нуклеотидному составу последовательность и с аналогичной вероятностью взаимодействуют с 3'-НТО мРНК гена *fmr1*.

В результате анализа уровня мРНК гена *fmr1* у мышей в возрасте 1 месяца все группы имеют разную активность гена. У самок гомозигот по премутантному аллелю уровень мРНК и белка снижен относительно контрольной группы самок аналогичного возраста. В группе гетерозигот по премутантному аллелю отсутствуют различия как в уровне мРНК, так и белка относительно контроля. В группе самцов гемизигот – уровень мРНК снижен, тогда как уровень белка не отличается от контрольной группы самцов аналогичного возраста. Однако в возрасте 8 месяцев группы самок гомозигот и гетерозигот, а также самцов гомозигот имеют общие признаки. Уровень белка во всех группах повышен в этом возрасте. В данном возрасте в головном мозге мышей наблюдаются убиквитин-положительные включения – характерный признак FXTAS (Hagerman R.J. et al., 2004). Эти включения образуются за счет связывания мРНК премутантного аллеля гена *fmr1* с CGG-связывающими белками. Также показано наличие белка Fmrp в таких включениях. Повышение уровня белка Fmrp, наблюдаемое в возрасте 8 месяцев, вероятно, связано с накоплением белка в таких включениях. Уровень мРНК достоверно снижен в группах самок гомозигот и самцов гемизигот. Однако в группе самок гетерозигот по премутантному аллелю уровень мРНК достоверно не отличается от значений в контрольной группе. Это подтверждает нашу гипотезу о том, что самки

гетерозиготы сравнимы с самками нормального генотипа за счет X-инактивации и протективного эффекта, связанного с экспрессией нормального аллеля гена *fmr1* (Hagerman R.J. et al., 2004).

Также в исследовании экспрессии микроРНК в линии мышей *Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}* выбрана *mmi-miR-25-3p*, поскольку показано ее взаимодействие с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*, однако уровень ее экспрессии достоверно не отличается от контрольной клеточной линии GM06895 во всех группах клеток. Мы предположили, что уровень этой микроРНК может коррелировать с активностью гена *fmr1* только в определенном возрасте животных. Однако в результате исследования мышей в возрасте 1 и 8 месяцев корреляций уровня экспрессии этой микроРНК с активностью гена *fmr1* обнаружено не было. Таким образом, данная микроРНК взаимодействует с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*, что показано в созданной модельной системе, но, вероятно, не имеет патологического значения в случае заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, из-за отсутствия корреляций между ее уровнем и активностью гена *fmr1*.

Дополнительно в исследовании экспрессии микроРНК в линии мышей *Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}* выбрана *mmi-miR-182-5p*. Уровень ее экспрессии увеличен в клеточной группе с полной мутацией, при этом в остальных клеточных группах выраженных корреляций между ее уровнем и активностью гена *fmr1* установлено не было. Нами было предположено, что уровень *mmi-miR-182-5p* не будет изменяться в моделях FXTAS. В результате анализа уровня экспрессии микроРНК было показано, что ее уровень не изменяется в группе самок гомозигот и самцов гемизигот по премутантному аллелю гена *fmr1* как в возрасте 1 месяц, так и 8 месяцев. В группе самок гетерозигот в возрасте 1 месяц также не было достоверных отличий уровня ее экспрессии относительно контрольной группы самок аналогичного возраста. Исключением являются самки гетерозиготы в возрасте 8 месяцев, где уровень *mmi-miR-182-5p* снижен. Однако данные о том, что у самок гомозигот и самцов гемизигот уровень данной микроРНК достоверно не отличается от уровня, определенного у животных с нормальным генотипом, говорят об отсутствии влияния *mmi-miR-182-5p* на активность премутантного аллеля гена *fmr1*. Это наблюдение подтверждает данные об отсутствии взаимодействия этой микроРНК с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*. Аналогичная картина повышения экспрессии определенных микроРНК без взаимодействия с мРНК гена *FMR1* в случае полной мутации была ранее показана в литературе (Putkonen N. et al., 2020). Таким образом, *mmi-miR-182-5p* может служить маркером синдрома ломкой X-хромосомы.

В связи с тем, что видимые проявления FXTAS у мышей развиваются на 7,5 месяц, возможно, уровень экспрессии микроРНК у мышей возрастом 8 месяцев наиболее вероятно указывает на взаимосвязь уровня *mmi-miR-139-5p* с активностью гена *fmr1* и развитием патологии. В данном возрасте активность гена *fmr1* во всех группах животных аналогична группам клеточных линий 2 и 3, где значение отношения уровня белка к *FMR1* > 1. Как в этих группах клеточных линий, так и у самок гомозигот, гетерозигот, а также самцов гомозигот – уровень *miR-139-5p* снижен. Также уровень данной микроРНК снижен в возрасте 1 месяц у самок гомозигот и самцов гетерозигот, однако выраженной взаимосвязи с активностью гена *fmr1* не обнаружено. Полученные данные указывают на то, что *miR-139-5p* участвует в регуляции активности гена *fmr1* и развитии FXTAS. Это было подтверждено при исследовании ее экспрессии в зависимости от активности гена *fmr1*, в модельной линии мышей, а также подтверждено ее взаимодействием с 3'-НТО мРНК гена *FMR1* с использованием созданной модельной системы. Были предположены два способа влияния микроРНК. Во-первых, микроРНК могут изменять экспрессию, что приводит к изменению уровня белка FMRP. Во-вторых, изменение активности гена может привести к изменению экспрессии взаимодействующих с ним микроРНК. Однако чтобы сделать вывод об этом, необходимо проводить дальнейшие исследования связи экспрессии микроРНК, возраста и тяжести заболеваний у человека на большой выборке пациентов, причем в образцах крови – доступном типе биологического материала.

Заключение. С использованием открытых баз данных mirbase.org, targetscan.org, mirdb.org нами были выбраны 7 микроРНК с потенциальным взаимодействием с мРНК гена *FMR1* – *hsa-miR-182-5p*, *hsa-miR-23a-3p*, *hsa-miR-25-3p*, *hsa-miR-148a-3p*, *hsa-miR-139-5p*, *hsa-miR-221-3p*, *hsa-miR-302a-3p*.

Для исследования связи экспрессии микроРНК с активностью гена *FMR1* выбраны постоянные культуры В-лимфоцитов пациентов с различным размером CGG повтора. В результате анализа активности гена *FMR1* все используемые клеточные линии были разделены на группы в зависимости от коэффициента – соотношения уровня белка FMRP к уровню экспрессии мРНК гена *FMR1*. В группу 1 вошли клеточные линии GM06865 и GM06891 с коэффициентом меньше единицы. В группу 2 вошли клеточные культуры GM06891E, CPG8 и CPG166 с коэффициентом больше единицы. Особенности генотипа и активности гена *FMR1* не позволяют включить линию GM06897 в группы, описанные выше. Клеточная линия GM06897 с редким вариантом неметирированной полной мутации гена *FMR1* включена в группу 3. Группа 4 включает линии GM04025,

CPG18 и CPG7, которые несут аллель полной мутации гена *FMR1*, не обладающие экспрессией мРНК и белка FMRP. Дальнейший анализ уровня экспрессии выбранных микроРНК был проведен с использованием этих групп клеточных линий.

Для экспериментального подтверждения взаимодействия выбранных микроРНК с мРНК гена *FMR1* была создана плазмидная конструкция, главными функциональными элементами которой являются последовательности, необходимые для доксициклин активируемой экспрессии микроРНК, а также для постоянной экспрессии репортерного белка eGFP с 3'-НТО мРНК гена *FMR1* в его мРНК. С использованием данной системы установлено, что экспрессия hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-25-3p и hsa-miR-139-5p влияет на уровень репортерного белка eGFP, что указывает на взаимодействие этих микроРНК с 3'-областью мРНК гена *FMR1*.

В результате исследования уровня экспрессии выбранных микроРНК в группах клеточных линий и анализа их взаимодействия с мРНК гена *FMR1* показано, что hsa-miR-139-5p изменяет свой уровень в зависимости от активности гена *FMR1* в клеточных линиях В-лимфоцитов и взаимодействует с 3'-областью мРНК этого гена. Также установлено, что hsa-miR-25-3p взаимодействует с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*, однако уровень ее экспрессии достоверно не отличается от контрольной клеточной линии во всех группах клеток. Для hsa-miR-182-5p показан высокий уровень экспрессии в клеточной группе с полной мутацией, однако в остальных клеточных группах не было связи с активностью гена *FMR1*, при этом взаимодействие с мРНК гена *FMR1* установлено не было.

Для того чтобы экстраполировать результаты экспрессии микроРНК, полученные при исследовании клеточных линий человека на модельных мышах, был проведен анализ сходства гомологичных микроРНК с использованием данных targetscan.org. В результате показано, что мышинные гомологи miR-139-5p, miR-25-3p, miR-182-5p и человека имеют близкую по нуклеотидному составу последовательность и с аналогичной вероятностью взаимодействуют с мРНК гена *fmr1*.

Для исследования паттерна экспрессии выбранных микроРНК в зависимости от пола и возраста использована мышинная модель FXTAS (*Fmr1*^{tm2Cgr/DlnJ}), животные в которой обладают премутантным аллелем гена *FMR1*. В результате анализа экспрессии трех микроРНК в образцах головного мозга мышей *Fmr1*^{tm2Cgr/DlnJ} показано, что изменение уровня экспрессии *mmi-miR-25-3p* не связан с активностью гена *fmr1*. Эти данные сопоставимы с результатами анализа

экспрессии hsa-miR-25-3p в клеточных линиях В-лимфоцитов. Хотя было показано, что эта микроРНК потенциально может взаимодействовать с мРНК гена *FMR1*, вероятно, она не связана с развитием патологий в случае премутантного аллеля гена *FMR1*.

Показано, что у самок гомозигот и самцов гемизигот уровень hsa-miR-182-5p достоверно не отличается относительно контроля, что подтверждает отсутствие связи этой микроРНК с активностью премутантного аллеля гена *fmr1*. Однако в клеточных линиях с полной мутацией (группа 4 клеточных линий) уровень этой микроРНК значительно повышен. Возможно, это свидетельствует о том, что отсутствие мРНК и белка FMRP в случае аллеля полной мутации вызывает изменение уровня экспрессии данной микроРНК, что требует дальнейшего исследования на мышах с нокаутом гена *fmr1*.

Установлено, что miR-139-5p связана с изменением активности гена *fmr1*. Это было подтверждено при исследовании ее экспрессии в зависимости от активности гена *fmr1* в модельной линии мышей, а также подтверждено ее взаимодействие с 3'-областью мРНК гена *FMR1* с использованием созданной модельной системы.

ВЫВОДЫ:

1. Показано, что hsa-miR-182-5p не взаимодействует с мРНК гена *FMR1*. Однако, уровень экспрессии hsa-miR-182-5p в клеточных линиях с полной мутацией этого гена в 7,9 раз превышает уровень экспрессии этой микроРНК в контрольной клеточной линии, что указывает на ее участие в развитии синдрома ломкой X-хромосомы при отсутствии мРНК и белка FMRP;

2. На основе анализа взаимодействия микроРНК с мРНК гена *FMR1*, а также результатов поиска корреляций между их уровнем экспрессии и активностью этого гена установлено, что miR-139-5p является негативным регулятором активности гена *FMR1* в клеточных линиях В-лимфоцитов и в головном мозге мышей линии *Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}* с премутацией гена *FMR1*;

3. Показано, что hsa-miR-148a-3p и hsa-miR-25-3p взаимодействуют с мРНК гена *FMR1*, однако не установлено корреляций между уровнем их экспрессии и активностью этого гена в клеточных линиях В-лимфоцитов и в головном мозге мышей моделей синдрома атаксии и тремора, ассоциированного с ломкой X-хромосомой;

4. Установлено, что уровень экспрессии hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-302a-3p не связан с уровнями экспрессии мРНК гена *FMR1* и белка FMRP. Также показано, что эти микроРНК не взаимодействуют с мРНК гена *FMR1*.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Dolskiy A. A., Yarushkin A. A., Grishchenko I. V., Lemskaya N. A., Pindyurin A. V., Boldyreva L. V., Pustylnyak V. O., Yudkin D. V. miRNA expression and interaction with the 3' UTR of FMR1 in FRA_Xopathy pathogenesis // Non-coding RNA Res. – 2021. – V. 6. – № 1. – P. 1–7. (Scopus, WoS, РИНЦ)

DOI: 10.1016/j.ncrna.2020.11.006

2. Dolskiy A. A., Krainikova L. V., Pindyurin A. V., Boldyreva L. V., Yudkin D. V. Human FMR1 gene expression regulation by microRNA in a cellular model // Eur. J. Hum. Genet. – 2020. – Т. 28. – P. 337. (Scopus, WoS)

DOI: 10.1038/s41431-020-00739-z

3. Dolskiy A. A., Lemskaya N. A., Yudkin D. V. New insights on the role of noncoding RNAs in the pathology of Fragile X-associated disorders // Eur. J. Hum. Genet. – 2019. – V. 27. – P. 1732. (Scopus, WoS)

DOI: 10.1038/s41431-019-0494-2

4. Dolskiy A. A., Pustylnyak V. O., Yarushkin A. A., Lemskaya N. A., Yudkin D. V. Inhibitors of histone deacetylases are weak activators of the FMR1 gene in fragile X syndrome cell lines // Biomed Res. Int. – 2017. – V. 2017. – P. 1–5. (Scopus, WoS, РИНЦ)

DOI: 10.1155/2017/3582601

5. Юдкин Д.В., Лемская Н.А., Грищенко И.В., Дольский А.А. Изменение состава хроматина при экспансии тринуклеотидного повтора cgg в гене *fmr1* // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49. – №. 2. – С. 205-211. (Scopus, WoS, РИНЦ)

DOI: 10.7868/S002689841501019X

Разные этапы работы были поддержаны грантами Российского научного фонда № 15-15-10001 и № 18-15-00099.