

РНК КАК БИОМАРКЁР В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

В. П. Мудров^{1,2}

¹ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Москва, Россия

²ГБУЗ «ГКБ № 52 ДЗМ», г. Москва, Россия

Резюме

Геномная информация становится всё более важной для персонализированной медицины, профилактики инфекционных заболеваний и клинической лабораторной диагностики. Применение РНК в качестве биомаркера в клинической лабораторной диагностике связано с размером этой молекулы и временем жизни. Выделяют кодирующие и некодирующие типы РНК. Некодирующие РНК (кольцевые РНК, микроРНК и др.) играют важную роль в качестве регуляторов различных заболеваний, включающих онкологические и сердечно-сосудистые патологии, диабет, остеопороз. По длине нуклеотидной последовательности в некодирующие РНК входят: транспортная РНК (74–95 п.н.), малая ядерная РНК (100–300 п.н.), малая ядрышковая РНК (100–300 п.н.), рибосомальная РНК (121–5000 п.н.), управляющая РНК (55–70 п.н.), микроРНК (19–23 п.н.), piwi-РНК (24–30 п.н.), короткая интерферирующая РНК (21–25 п.н.), кольцевая РНК (>200 п.н.), ультраконсервативная РНК (>200 п.н.). Малые РНК выполняют свои функции на основе явления, названного РНК-интерференцией. Аналитический метод нового поколения CRISPR/Cas, основанный на неспецифическом расщеплении ДНК и РНК, открыл новые возможности в диагностике и лечении. Благодаря раскрытию структурных и функциональных компонентов этих разнообразных систем появляются новые инструменты, в том числе применимые к молекулярной диагностике и генной терапии.

Ключевые слова: типы РНК, некодирующая РНК, матричная РНК, кольцевая РНК, микроРНК, CRISPR/Cas

DOI: 10.58953/15621790_2024_15_1-2_13

RNA AS A BIOMARKER IN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS

V. P. Mudrov^{1,2}

¹Russian Medical Academy for Continuing Professional Education, Moscow, Russia

²City Clinical Hospital No. 52 of the Department of Health of Moscow, Moscow, Russia

Summary

Genomic information is becoming increasingly important for personalized medicine, infectious disease prevention, and clinical laboratory diagnostics. The use of RNA as a biomarker in clinical laboratory diagnostics is related to the size of this molecule and the lifetime. Coding and non-coding types of RNA are distinguished. Non-coding RNAs (circular RNAs, microRNAs, etc.) play an important role as regulators of various diseases, including oncological and cardiovascular pathologies, diabetes, osteoporosis. In terms of the length of the nucleotide sequence, non-coding RNAs include: transport RNA (74–95 b.p.), small nuclear RNA (100–300 b.p.), small nucleolar RNA (100–300 b.p.), ribosomal RNA (121–5000 b.p.), guided RNA (55–70 b.p.), microRNA (19–23 b.p.), piwiRNA (24–30 b.p.), small interfering RNA (21–25 b.p.), circular RNA (>200 b.p.), ultraconservative RNA (>200 b.p.). Small RNAs perform their functions based on a phenomenon called RNA interference. The analytical method of the new generation CRISPR/Cas, based on the nonspecific cleavage of DNA and RNA, has opened up new possibilities in diagnosis and treatment. Thanks to the disclosure of the structural and functional components of these diverse systems, new tools are emerging, including those applicable to molecular diagnostics and gene therapy.

Keywords: types of RNA, non-coding RNA, matrix RNA, circular RNA, microRNA, CRISPR/Cas

Молекулярно-биологические исследования в клинической лабораторной практике применяются для диагностики наследственных, инфекционных, онкологических заболеваний, для идентификации личности и типирования лейкоцитарного антигена человека, в области фармакогенетики. Прогресс обусловлен

огромным ростом знаний о молекулярных основах заболеваний в сочетании с развитием технологических возможностей.

По своей химической структуре РНК отличаются от ДНК дополнительной молекулой кислорода и заменой тимина на урацил, но роли двух нуклеи-

новых кислот в клетке существенно различаются. ДНК — «оригинал» генома, РНК — «рабочая копия» генома, уничтожаемая после нескольких циклов использования. РНК за счёт замены дезоксирибозы на рибозу значительно более гидрофильна и, в связи с этим, более лабильна и может доставлять короткоживущие матричные РНК (мРНК) к месту синтеза.

Особенности исследования ДНК и РНК связаны с их временем жизни. ДНК — консервативная молекула с долгим временем жизни. ДНК человека содержит 3 миллиарда пар оснований. Средний период полураспада ископаемой митохондриальной ДНК (мтДНК) для последовательности из 242 пар нуклеотидов (п.н.) оценивается в 521 год. Короткие фрагменты ДНК могут присутствовать в течение очень длительного времени: при -5°C предсказательный период полураспада для фрагмента мтДНК длиной 30 п.н. в кости оценивается в 158 тыс. лет, при 15°C для фрагмента 500 п.н. — 180 лет, при 25°C для 500 п.н. — 30 лет [1].

РНК — короткоживущая молекула. Период полураспада транспортной РНК (тРНК) составляет около 10 мин при 100°C . Ожидаемый период полураспада матричной РНК (мРНК), состоящей из 1000 или более нуклеотидов, составляет ~1 мин при 100°C из-за химической нестабильности РНК при высоких температурах. По данным исследователей, средний период полураспада мРНК, определенный методом геномного контроля, составляет 3,4 и 1,5 мин при 20° и 42°C , соответственно, что указывает на быстрый оборот мРНК во всем диапазоне температур, обеспечивающим рост клеток [2,3]. В целом, время существования эукариотических мРНК составляет от нескольких минут до нескольких дней, а в РНК стабилизирующем растворе при 45°C более 4 месяцев.

РНК в живых организмах можно разделить на 2 группы в соответствии с их кодирующим потенциалом для белков: кодирующие и некодирующие РНК (нкРНК). Проект «Геном человека» показал, что менее 2% генома человека составляют гены, кодирующие белок. Тем не менее, большая часть геномной ДНК представляет собой транскрипционную матрицу, указывающую, что транскриптом человека преимущественно содержит нкРНК, ~98% [4]. Было продемонстрировано, что нкРНК играют решающую роль в регуляции экспрессии генов, влияя на транскрипцию генов-мишеней или пост-транскрипционные модификации.

Этими особенностями обусловлен поиск новых биомаркёров, новых методов молекулярной диагностики, новой интерпретации получаемых данных для диагностики и возможной терапии, в том числе с применением машинного обучения искусственного интеллекта.

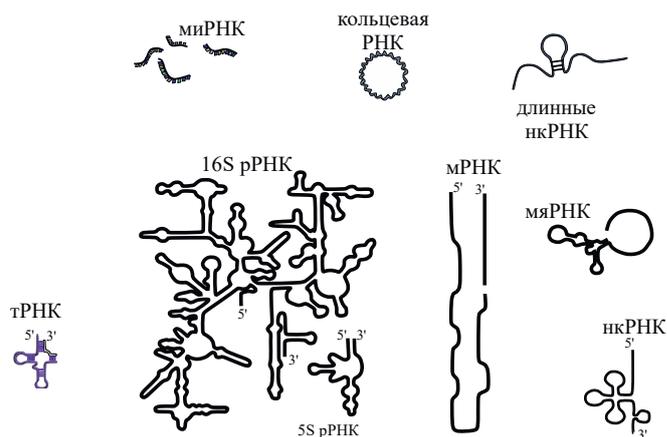
Особенности и назначение некодирующих РНК

В отличие от матричной РНК (мРНК), некодирующие РНК не транслируются в белки, но выполняют важные клеточные функции обеспечения процессинга РНК, модификации, регуляции транскрипции, трансляции мРНК.

НкРНК можно разделить на две основные категории: длинные нкРНК (длнкРНК) и малые нкРНК (мнкРНК) [5]. ДлнкРНК имеют длину более 200 нк и составляют большую часть некодирующего транскриптома у млекопитающих [6]. МнкРНК представляют собой большую группу некодирующих РНК длиной <200 нуклеотидов, включают piwi-взаимодействующие РНК, микроРНК, РНК-инициаторы транскрипции, эндогенные малые интерферирующие РНК и др. [7]. Основные виды РНК представлены в таблице 1.

По длине нуклеотидной последовательности в некодирующие РНК входят: транспортная РНК (тРНК, 74–95 п.н.), малая ядерная РНК (мяРНК, 100–300 п.н.), малая ядрышковая РНК (мядрРНК, 100–300 п.н.), рибосомальная РНК (рРНК, 121–5000 п.н.), направляющая РНК (нРНК, 55–70 п.н.), микроРНК (19–23 п.н.), пиРНК (piwi-РНК, 24–30 п.н.), короткая (малая) интерферирующая РНК (киРНК, миРНК 21–25 п.н.), кольцевые РНК (колРНК, >200 п.н.), ультраконсервативные РНК (укРНК, >200 п.н.).

Рисунок 1. Типы РНК в линейном виде



Направляющая РНК (нРНК, guided RNA — gRNA) — короткая последовательность РНК, направляющая Cas9-эндонуклеазу или другие Cas-белки при распознавании и разрезании специфичной двуцепочечной ДНК. Применяется в лабораторных исследованиях и технологии редактирования генома CRISPR-Cas. У бактерий и архей нРНК являются частью системы CRISPR-Cas, выполняющей роль

Таблица 1.

Виды РНК (по [8], с изменениями)

| Вид РНК | Сокращенное название | Размер, нукл. | Функция |
|--------------------------------------|----------------------|---------------|--|
| Кодирующая РНК | | | |
| матричная РНК (информационная) | мРНК | 300-30.000 | информация о белке |
| Структурные некодирующие РНК | | | |
| транспортная РНК | тРНК | 74-95 | транспорт аминокислот |
| малая ядерная РНК | мяРНК | 90-200 | сплайсинг |
| малая ядрышковая РНК | мядрРНК | 80-1000 | процессинг рРНК, регуляция сплайсинга и трансляции |
| рибосомальная РНК | рРНК | 121-5.000 | синтез белка |
| структурные рибосомные РНК | 5S рРНК | 120 | |
| | 5,8S рРНК | 150 | |
| | 18S рРНК | 1800 | |
| | 28S рРНК | 4000-5000 | |
| Регуляторные некодирующие РНК | | | |
| направляющая РНК | нРНК | 55-70 | редактирование ДНК/РНК |
| микроРНК | микроРНК | 19-23 | регуляция транскрипции |
| <i>piwi</i> -РНК | пиРНК | 24-30 | регуляция иммунного ответа |
| короткая (малая) интерферирующая РНК | киРНК, миРНК | 21-25 | регуляция иммунного ответа |
| кольцевые РНК | колРНК | 500 | связывание микроРНК |
| ультраконсервативные РНК | укРНК | 200-100000 | связывание микроРНК, альтернативный сплайсинг |

адаптивной иммунной защиты от вирусов. У человека нРНК – это искусственно сконструированная нуклеиновая кислота [9].

МикроРНК представляют собой небольшие эндогенные некодирующие РНК, которые участвуют в посттранскрипционном глушении генов, регулируя ряд метаболических функций в организме человека, включая иммунный ответ, клеточную физиологию, развитие органов, ангиогенез, передачу сигналов и другие аспекты [10].

МикроРНК – посттранскрипционные регуляторы экспрессии генов, подавляющие более 30% генов. МикроРНК известны своей ролью в посттранскрипционной регуляции матричной РНК посредством прямого связывания с 3'-нетранслируемыми участками молекул мРНК-мишеней. Недавние исследования показали, что микроРНК способны регулировать некодирующие РНК. Они включают прямое взаимодействие между двумя микроРНК, либо в их зрелой, либо первичной форме, последующие изменения экспрессии микроРНК из-за изменений транскрипции, направленных на микроРНК, и влияние на уровни микроРНК и мРНК в масштабах клетки в результате манипуляций с микроРНК.

Физические свойства микроРНК, такие как высокая стабильность в организме и устойчивость к различным условиям хранения (высокий или низкий уровень pH и циклы замораживания-оттаивания), подтверждают их пригодность в качестве современных молекулярных маркеров. Потенциальным объяснением механизмов защиты от расщепления РНКазой, объясняющих такую защиту и неуязвимость, может быть их небольшая длина, их связывание с белковыми комплексами, а также тот факт, что микроРНК встроены в экзосомы.

МикроРНК представляют собой группу эндогенных некодирующих РНК, регулирующих экспрессию генов. Изменение экспрессии микроРНК приводит к изменениям в профиле генов, вовлеченных в ряд биологических процессов, включая иммунобиогенез, гомеостаз и инфекционный контроль. МикроРНК контролируют многие важные клеточные активности, такие как рост, дифференцировка и метаболизм. В частности, в иммунной системе микроРНК стали важнейшим биологическим компонентом при заболевании и гомеостазе. Было обнаружено, что микроРНК регулируют воспалительные реакции и аутоиммунные патологии. МикроРНК могут играть важную роль в нарушении ре-

гуляции, влияющей на целостность эндотелия, функцию гладкомышечных клеток сосудов и клеток воспаления, а также клеточный гомеостаз холестерина, стимулирующий образование и рост атеросклеротической бляшки.

Влияя на трансляцию белка, микроРНК являются регуляторами клеточного цикла, апоптоза, гемопоеза, дифференцировки адипоцитов, секреции инсулина, участвуют в регуляции развития онкологических заболеваний, неврологических расстройств, вирусных инфекций, метаболических нарушений. Различные циркулирующие микроРНК, такие как miR-17, miR-17-5p, miR-29b, miR-30, miR-92a, miR-126, miR-143, miR-145, miR-146a, miR-212, miR-218, miR-221, miR-222, miR-361-5p выступают в качестве биомаркеров для клинической диагностики атеросклероза [10].

Стабильная структура микроРНК, присутствие в различных жидкостях организма и способность проходить через гематоэнцефалический барьер позволяет быть биомаркерами для диагностики и прогноза заболеваний центральной нервной системы.

Из-за широкого спектра нижестоящих мишеней одна микроРНК может влиять на иммунный ответ несколькими способами и одновременно проявлять мультиорганный повреждение при сепсисе.

МикроРНК стали интересными кандидатами для разработки новых терапевтических стратегий, поскольку могут воздействовать не только на отдельные мРНК, но и на сети функционально ассоциированных генов. Были предложены следующие классы потенциально эффективных терапевтических средств на основе РНК для противодействия нарушенной экспрессии генов: антисмысловые олигонуклеотиды (анти-микроРНК), микроРНК-миметики, микроРНК-ингибиторы. Антисмысловые олигонуклеотиды обладают способностью глушить микроРНК, модифицирующие метаболические пути или снижающие нерегулируемую экспрессию [11].

ПиРНК (piwi-РНК) представляют собой новую и разнообразную группу киРНК из 30.000 видов, взаимодействующие с белками подсемейства *PIWI* семейства *AGO* (*Argonaut*), выполняя важные функции поддержания целостности и стабильности генома зародышевых стволовых клеток. ПиРНК — короткие молекулы, закодированные в центромерных и теломерных областях хромосомы, в обеих цепях геномной ДНК. ПиРНК весьма изменчивы и разнообразны (до 500 000 видов в одном организме). В отличие от киРНК и микроРНК, они образуются одной цепью с характерной особенностью — урацилом (U) на 5'-конце и метилированным 3'-концом. Главная функция пиРНК — подавление активности мобильных генетических элементов на уровне транскрипции и трансляции [12].

Короткие интерферирующие РНК (киРНК) или малые интерферирующие РНК (миРНК) — класс двухцепочечных РНК, нарушающих экспрессию определенных генов с комплементарными нуклеотидными последовательностями путем деградации мРНК после транскрипции, предотвращая трансляцию. КиРНК — «шаблоны» для поиска в цитоплазме и уничтожения молекул мРНК, имеющие длину 20–25 нуклеотидов и «особенность» в 2 неспаренных нуклеотида на 3'-концах и фосфорилированные 5'-концы [13,14].

Кольцевые РНК (колРНК) представляют собой новый класс эндогенных РНК, в изобилии экспрессирующихся в эукариотических клетках. Эти молекулы образуются из мРНК-предшественников путем неканонического сплайсинга и широко экспрессируются у различных видов. КолРНК включают экзонные колРНК, экзон-интронные колРНК и кольцевые интронные РНК [15]. Широкое присутствие колРНК в эукариотических клетках показывает, что колРНК являются не только непреднамеренными продуктами сплайсинга РНК, но и важным компонентом семейства нкРНК [16].

КолРНК представляют собой высокостабильную форму нкРНК, поскольку они естественным образом устойчивы к РНК-нуклеазам. В отличие от линейных РНК, колРНК образуют ковалентно замкнутую структуру без 5'- или 3'-конца и имеют гораздо более длительный период полураспада от 18,8 до 23,7 ч, что намного больше диапазона родственных линейных РНК в 4,0–7,4 ч [17]. Эта стабильность, по-видимому, является результатом их устойчивости к механизму линейной деградации РНК.

Функционально важным различием между колРНК и родственными им мРНК является иммуногенность [18]. В то время как собственные колРНК не являются иммуногенными, рецепторы распознавания паттернов РНК, Toll-подобный рецептор 7/8 и индуцируемый ретиноевой кислотой ген-1 (RIG-I), могут активироваться экзогенными колРНК, делая саму колРНК иммуностимулирующей. КолРНК участвуют в ингибировании микроРНК, онкогенезе, врожденном противовирусном иммунном ответе.

В англоязычной литературе колРНК часто называют губками, впитывающими или сорбирующими микроРНК (англ. microRNA sponges) [19]. Связываясь с сайтами негативных регуляторов экспрессии генов, микроРНК уже не могут взаимодействовать с комплементарными мРНК-мишенями и мешать их трансляции. Кольцевые РНК могут служить структурной основой для сборки белковых комплексов, обеспечивая межбелковые взаимодействия, и могут секвестрировать белки, ограничивая их перемещение.

Ультраконсервативные РНК. В подмножестве длинных некодирующих РНК выделяют ультраконсервативные РНК (укРНК), представляющие собой высококонсервативные РНК длиной более 200 нуклеотидов транскрибируемые из 481 консервативного фрагмента ДНК генома [20].

УкРНК обладают высокой степенью консервативности не только среди видов живых организмов, но и на протяжении всей их эволюции. Наличие эволюционной консервативности указывает, что укРНК могут выполнять критические физиологические функции. Отдельные исследования показали, что они играют важную роль в регуляции экспрессии генов во время канцерогенеза. Многие укРНК могут играть как положительную, так и отрицательную регуляторную роль в прогрессировании рака. Являясь разновидностью длинной некодирующей РНК, укРНК регулируют экспрессию генов-мишеней, конкурируя за связывание с миРНК и приводя к стабилизации мРНК. Другой механизм функционирования укРНК заключается в регуляции альтернативного сплайсинга. Альтернативный сплайсинг — процесс, посредством которого из одного и того же гена могут быть получены различные транскрипты мРНК, приводящие к образованию различных изоформ белка. укРНК также могут функционировать как каркасы для сборки белковых комплексов, участвующих в регуляции генов [21].

Аберрантно экспрессируемая укРНК (uc.63+) может действовать как канцероген, способствуя инвазии и миграции раковых клеток в различные ткани опухоли. УкРНК K.98 приводит к аномальной пролиферации эндотелиальных клеток аорты, усиленной адгезии и значительно повышает уровни факторов воспалительной транскрипции за счет активации NF-κB и увеличения экспрессии ICAM-1 и VCAM-1. УкРНК K.323 может предотвращать гипертрофию миокарда путем ингибирования экспрессии предсердного натрийуретического пептида и натрийуретического пептида В-типа.

РНК-интерференция

Малые РНК выполняют свои функции на основе явления, названного РНК-интерференцией (подавление экспрессии гена на стадии транскрипции или трансляции при активном участии малых молекул РНК) [13]. Регуляторный механизм малых РНК основан на следующем:

1. При РНК-интерференции расщепляется только мРНК.
2. Двухцепочечная РНК (дцРНК) вызывает расщепление значительно эффективнее одноцепочечной.
3. ДцРНК, комплементарная участку зрелой мРНК, вызывает расщепление последней.

4. Несколько молекул дцРНК на клетку достаточно для полного «выключения» целевого гена, что указывает на существование каскадного механизма катализа [22].

Механизм РНК-интерференции у высших животных опосредован микроРНК и пиРНК, одноцепочечными молекулами со специфической структурой, которая не обнаруживается интерфероновой системой. В процессе РНК-интерференции участвуют короткие интерферирующие РНК (киРНК отсутствуют у позвоночных), микроРНК, пиРНК.

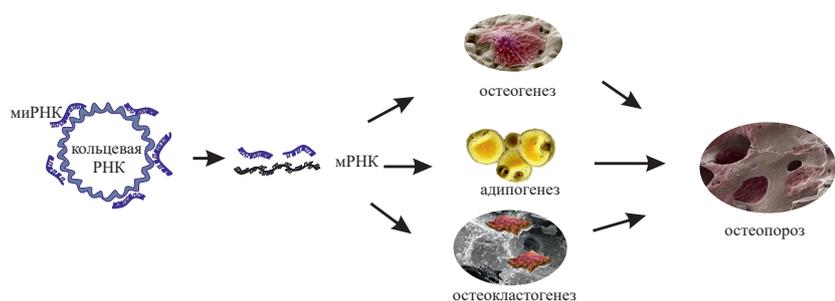
Короткой интерферирующей РНК (киРНК) или малой интерферирующей РНК (миРНК, small interference RNA), связывается комплекс белков RISC (RNA-induced silencing complex) с эндонуклеазой семейства *Argonaute*. Связывание с киРНК активирует RISC и запускает в клетке поиск молекул ДНК и РНК, комплементарных киРНК, для деградации или инактивации [14]. Для многих организмов этот феномен является одним из основных способов иммунной защиты против инфекций. Клеточное происхождение (биогенез) микроРНК и киРНК различается: микроРНК происходят из генома, тогда как киРНК могут быть эндогенными или возникать в результате вирусной инфекции или из других экзогенных источников. Другое ключевое различие: дуплексы киРНК характеризуются идеальным спариванием оснований, в то время как спирали микроРНК содержат несовпадения и выпетливания в стержне, имеют более протяженные концевые петли.

Анти-смысловая киРНК способна с помощью RISC-комплекса распознавать мРНК и специфически вызывать её деградацию. Разрез целевой мРНК всегда происходит точно в месте, комплементарном 10 и 11 нуклеотидам анти-смысловой цепи киРНК. КиРНК подавляют экспрессию различных мобильных генетических элементов, ограничивают экспрессию собственных генов, срабатывая в ответ на гиперэкспрессию. Регуляция работы генов может происходить не только на уровне трансляции, но и во время транскрипции. Разработана технология «выключения» (нокдауна) отдельных генов *in vitro* (на культурах клеток) и *in vivo* (на эмбрионах), что стало стандартом при изучении генов.

Механизм действия многих микроРНК аналогичен действию киРНК. Короткая одноцепочечная РНК в составе белкового комплекса RISC с высокой специфичностью связывается с комплементарным участком в 3'-нетранслируемой области мРНК-мишени. Связывание приводит к расщеплению мРНК. Однако активность микроРНК (по сравнению с киРНК) уже более дифференцирована — если комплементарность

менном этапе практически не поддающееся лечению. Существующие препараты имеют очевидные побочные реакции и не подходят для длительного применения. Избыточная экспрессия или нокдаун ключевых колРНК и микроРНК может быть новой терапевтической стратегией при остеопорозе. Полагают, что понимание дисрегуляции генов, специфичных для остеопороза, и опосредуемой сетью «колРНК-микроРНК-мРНК», необходимо для разработки перспективных терапевтических мишеней для лечения остеопороза (рис. 2) [34].

Регуляторная ось «кольцевая РНК – микроРНК – матричная РНК» при остеопорозе



Несмотря на то, что в последние годы появилось много новых разработок в области лечения и таргетной терапии онкологических заболеваний, по-прежнему необходимы новые исследования для выявления биомаркёров этих и других патологий. Биоинформационный анализ помог определить диагностический потенциал регуляторной сети колРНК-микроРНК-мРНК при раке молочной железы [35].

Лечение кальцифицирующей болезни аортального клапана (КБАК) основывается на хирургическом вмешательстве с заменой клапана. Однако не всем пациентам показано хирургическое лечение, а медикаментозная терапия антигипертензивными препаратами не может замедлить патологический процесс. С помощью биоинформатического анализа определены функциональная роль сети колРНК-микроРНК-мРНК в патогенезе КБАК и новые мишени для терапии. В частности, идентифицированы оси генов колРНК-микроРНК-hub. В этом исследовании определено, что hsa_circ_0026817-hsa-miR-211-5p-CACNA1C, hsa_circ_0007215-hsa-miR-1343-3p-RBL1, hsa_circ_0007215-hsa-miR-1252-5p-MESP2 кодируют кальциевые каналы в патофизиологических процессах в клапанных интерстициальных и эндотелиальных клетках [36]. Для визуализации сети регуляции микроРНК-мРНК использовалось программное обеспечение “Cytoscape”.

В работе других исследователей для скрининга генов, связанных с развитием гипертензии был проведен

анализ сети взвешенной коэкспрессии генов с использованием пакета «clusterProfiler». Анализ дифференциальной экспрессии применяли к профилям экспрессии микроРНК. Для выбора целевых мРНК использовались базы данных “TargetScanHuman” и “miRDB”. Всего после комплексного анализа было получено 36 пар микроРНК-мРНК, а три мРНК и hsa-miR-5589-5p были идентифицированы как ключевые соединения. Гены Hub, KIAA0513, ARID3A и LRPAP1, а также hsa-miR-5589-5p были определены как потенциальные диагностические биомаркёры артериальной гипертензии [37].

Рисунок 2.

Используя накопленную информацию о последовательностях микроРНК, исследователи смогли разработать алгоритмы ab initio для прогнозирования действия микроРНК независимо от знания последовательности генома. Совокупность накопленных данных позволяет определять как диагностический биомаркер патологии, так и потенциальную терапевтическую мишень [38].

Система CRISPR/Cas — новый инструмент клинической лабораторной диагностики

Технология редактирования генома на основе CRISPR (кластеризованных коротких палиндромных повторов с регулярным чередованием) представляет собой новую РНК-управляемую нуклеазную систему, первоначально идентифицированную по адаптивным иммунным системам микроорганизмов [12,14].

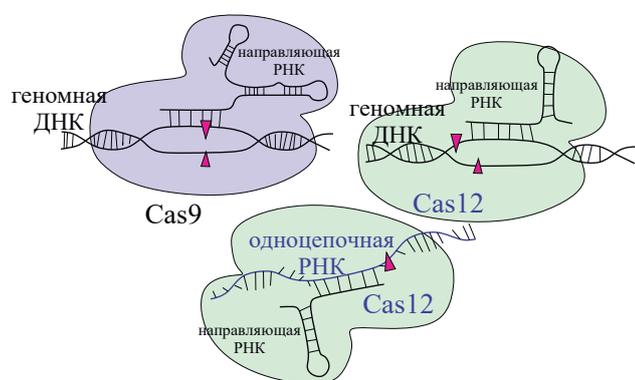
CRISPR/Cas — аналитический метод нового поколения, основанный на неспецифическом расщеплении ДНК и РНК. Этот метод обеспечивает многообещающие достижения в диагностике возникающих инфекционных заболеваний на основе CRISPR, благодаря его высокой специфичности, универсальности и быстрому циклу обнаружения [9,39].

Прокариотические клетки, бактерии и археи, обладают наследственным адаптивным иммунитетом против чужеродных генетических элементов, опосредуемым CRISPR и CRISPR-ассоциированными (Cas) белками. Прокариотические клетки хранят генетические элементы инфекционных агентов, таких как бактериофаги, плазмиды или транспозоны, в геномных локусах, называемых массивами CRISPR, что позволяет клетке запоминать, распознавать и устранять инфекции.

Белки семейства Cas способствуют адаптивному иммунитету посредством многоступенчатого процесса, который включает адаптацию, биогенез РНК CRISPR

и интерференцию. Во время адаптации, которая является первым этапом иммунитета к CRISPR, чужеродные генетические элементы распознаются, обрабатываются и отбираются для интеграции в массив CRISPR, обеспечивая элемент отзыва при повторном заражении. На стадии биогенеза *crRNA* матрица CRISPR транскрибируется в длинный предшественник (*pre-crRNA*) и перерабатывается в зрелую форму в виде *crRNA*. На последнем этапе зрелые *crRNA* направляют Cas-белки для расщепления комплементарных последовательностей чужеродной ДНК (интерференция) и устранения этих элементов.

Рисунок 3.
Действие системы CRISPR/Cas



В настоящее время системы CRISPR-Cas разделены на два класса, шесть типов и несколько подтипов на основе эволюционных взаимосвязей. В зависимости от природы эффекторных рибонуклеопротеиновых комплексов были определены два основных класса систем CRISPR-Cas: класс 1 (включает типы I, III и IV) и класс 2 (включает типы II, V и VI). Системы класса 1 характеризуются комплексом множества эффекторных белков, а системы класса 2 включают единственный *crRNA*-связывающий белок. Большинство идентифицированных систем CRISPR-Cas (около 90%) относятся к системам класса 1. Среди разнообразных систем CRISPR системы класса 2 в первую очередь применялись для диагностики, поскольку эти системы проще реконструировать. Они включают ферменты с сопутствующей активностью, которые служат основой многих диагностических анализов на основе CRISPR.

Система CRISPR-Cas была предложена для воздействия на определённые области генома эукариот и стала мощным инструментом геномной инженерии. Исследователи изучили множество подходов для улучшения активности системы CRISPR-Cas по редактированию генома и доставки ее компонентов как *ex vivo*, так и *in vivo*. Эти решения применяются для редактирования генома в доклинических исследованиях и клинических испытаниях.

Базы данных РНК

С возрастанием количества данных стало невозможным вручную анализировать последовательности, в связи с чем стали применяться компьютерные программы для поиска и сопоставления последовательностей нуклеиновых кислот, их функций. Процесс применения вычислительных методов для извлечения, организации и интерпретации биологических данных привел к развитию междисциплинарной дисциплины — биоинформатики, интегрирующей химию, биологию, генетику, математику и статистические методы с алгоритмами машинного обучения. Биоинформатический анализ позволяет предсказывать пространственную структуру биополимеров и вести их поиск в геномике и протеомике.

Создание и применение баз данных (библиотек) для использования в методах биоинформатики важно для выявления новых ассоциаций колРНК с заболеваниями. Систематический сбор и обработка данных о связи колРНК с заболеванием имеют решающее значение для изучения клинической значимости колРНК. Быстрое развитие вычислительных алгоритмов облегчило построение новых моделей прогнозирования связей колРНК с заболеванием [15]. Например, линейное кодирование с ограничением локализации может использоваться для прогнозирования колРНК, ассоциированных с заболеваниями человека, путем интеграции известной ассоциации колРНК с заболеванием, сети семантического сходства колРНК, сети семантического сходства заболеваний, реконструированной сети сходства колРНК и реконструированных данных сети сходства заболеваний.

База данных тканеспецифичных колРНК “TSCD” содержит информацию, относящуюся к систематическому анализу тканеспецифичных колРНК, и может быть использована для идентификации новых биомаркёров органогенеза и развития заболеваний. База данных “circR2Disease” предоставляет платформу для исследования патологических механизмов и содержит 725 экспериментально подтвержденных ассоциаций между 100 заболеваниями и 661 колРНК [40]. База данных колРНК, специфичных для рака “CSCD”, была создана на основе наборов данных секвенирования РНК из образцов опухолевых и нормальных тканей, чтобы служить ресурсом для функциональных исследований специфичных для рака колРНК [41]. Эта база данных может быть использована для выявления потенциальных функций кольцевых РНК. База данных “MiOncoCirc”, созданная на основе секвенирования экзосомных образцов биологических образцов рака человека, предоставляет исчерпывающие данные, включая кольцевые РНК

из метастазов, первичных опухолей и очень редких типов рака [17]. “Circ2Traits” фокусируется на построении сетей колРНК-микроРНК-мРНК и используется для определения взаимодействий между колРНК и микроРНК, ассоциированными с заболеванием [42]. База данных “Circad” представляет собой набор экспериментально подтвержденных ассоциаций между кольцевыми РНК и заболеваниями и содержит подробную аннотацию колРНК, включая название, локус генома и ассоциированное заболевание.

Самая полная общедоступная база данных последовательностей и аннотаций микроРНК, “miRBase”, сохранила в 2002 году всего 218 микроРНК [43]. В настоящее время в последнюю версию “miRBase v22.1” внесено 1917 предшественников микроРНК на основе анализа данных глубокого секвенирования РНК.

Заключение

Геномная информация становится всё более важной для персонализированной медицины, профилактики инфекционных заболеваний, клинической лабораторной диагностики, генной терапии. Некодирующие РНК (кольцевые РНК, микроРНК, длнкРНК и др.), играют жизненно важную роль в качестве регуляторов прогрессирования различных заболеваний, включающих онкологические и сердечно-сосудистые патологии, диабет, остеопороз.

Идентификация колРНК, ассоциированных с заболеваниями, может способствовать лучшему пониманию патогенеза, диагностики и лечения заболеваний. МикроРНК, учитывая их обширные регуляторные функции, имеют значительные перспективы в качестве неинвазивных биомаркеров. МикроРНК в регуляторных сетях участвуют в молекулярных процессах формирования и развития. Использование современных знаний и опыта для изучения других РНК семейства нкРНК, таких как микроРНК, обеспечит критическую точку отсчета для расширения стратегий исследования. Эти исследования будут иметь неопределимое значение для успешной разработки эффективной диагностики и терапии.

Некодирующие РНК в качестве диагностических биомаркеров и лекарственных средств, были изучены, исследованы и применены при сердечно-сосудистых и онкологических заболеваниях, системной красной волчанке, туберкулезе легких.

Интеграция стратегий персонализированной медицины в диагностику онкологических заболеваний обусловлена использованием генетических данных и биомаркёров. Эпигенетические биомаркёры, отражающие модификации ДНК и влияющие на экспрессию генов, стали индикаторами раннего выявления и оценки риска.

Иммунотерапия, глушение генов и методы редактирования, включая РНК-интерференцию и CRISPR / Cas9, предлагают инновационные средства для модуляции экспрессии генов и коррекции генетических aberrаций, приводящих к развитию онкологических заболеваний.

Список литературы

1. Allentoft M., Collins M., Harker D. et al. *The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils // Proc Biol Sci.* - 2012. - Vol. 279. - P.4724-4733.
2. Becskei A., Rahaman S. *The life and death of RNA across temperatures// Computational and structural biotechnology journal.* - 2022. - vol. 20. - P.4325-4336.
3. Sharova L., Sharov A., Nedorezov T. et al. *Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells // DNA Research.* - 2009. - Vol. 16. - P.45-58.
4. Consortium E. *An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome// Nature.* - 2012. - Vol.489. - P.57-74.
5. Awan H., Shah A., Rashid F., Shan G. *Primate-specific long non-coding RNAs and microRNAs // Genom. Proteom. Bioinform.* - 2017. - vol. 15. - P. 187-195.
6. Ponting C., Oliver P., Reik W. *Evolution and functions of long noncoding RNAs // Cell.* - 2009. - Vol.136. - P.629-641.
7. Kota S., Kota S. *Noncoding RNA and epigenetic gene regulation in renal diseases // Drug Discov. Today.* - 2017. - Vol.22. - P.1112-1122.
8. Назипова Н.Н. *Разнообразие некодирующих РНК в геномах эукариот// Математическая биология и биоинформатика.* - 2021. - № 2. - С. 256-298.
9. Wang M., Zhang R., Li J. *CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: Principles and methods // Biosens Bioelectron.* 2020 Oct 1;165:112430. doi: 10.1016/j.bios.2020.112430
10. Kappel A., Keller A. *miRNA assays in the clinical laboratory: workflow, detection technologies and automation aspects // Clinical chemistry and laboratory medicine.* - 2017. - Vol.55. - P.636-647.
11. Pagoni M., Cava C., Sideris D. et al. *miRNA-Based Technologies in Cancer Therapy // J Pers Med.* 2023 Nov 9;13(11):1586. doi: 10.3390/jpm13111586.
12. Yuan C., Qin H., Ponnusamy M., Chen Y., Lin Z. *PIWI interacting RNA in cancer: Molecular mechanisms and possible clinical implications*

(Review) // *Oncology reports 2021* Volume 46 Issue 3
<https://doi.org/10.3892/or.2021.8160>

13. Castell S., Martienssen R. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond // *Nat Rev Genet.* - 2013. - Vol. 14. - P.100-112.

14. Zhang J., Chen B., Gan C. et al. A comprehensive review of small interfering RNAs (siRNAs): mechanism, therapeutic targets, and delivery strategies for cancer therapy // *Int J Nanomedicine.* - 2023. - Vol. 18. - P. 7605-7635.

15. Wang C., Han C., Zhao Q., Chen X. Circular RNAs and complex diseases: from experimental results to computational models // *Briefings in Bioinformatics.* - 2021. - Vol.22. - P.1-27.

16. Salzman J., Gawad C., Wang P. et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types // *PLoS ONE.* - 2012. - Vol.7. - P.1-12.

17. Zhao S., Li S., Liu W. et al. Circular RNA signature in lung adenocarcinoma: a MiOnco-Circ database-based study and literature review // *Front Oncol.* 2020 Oct 9;10:523342. doi: 10.3389/fonc.2020.523342

18. Verbeke R., Hogan M., Lore K., Pardi N. Innate immune mechanisms of mRNA vaccines // *Immunity.* - 2022. - Vol.55. - P.1993-2005.

19. Zhang Y., Xue W., Li X. et al. The biogenesis of nascent circular RNAs // *Cell Rep.* - 2016. - Vol.15. - P.611-624.

20. Bejerano G., Pheasant M., Makunin I. et al. Ultraconserved elements in the human genome // *Science.* - 2004. - Vol.304. - P.1321-1325.

21. Taheri M., Ghafouri-Fard S. Long non-coding RNA signature in cervical cancer // *Klinical onkology.* - 2018. - Vol.31. - P.403-408.

22. Fire A., Xu S., Montgomery M. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature.* - 1998. - P.391. - P.806-811.

23. Brennan G., Henshall D. // MicroRNAs as regulators of brain function and targets for treatment of epilepsy // *Nat Rev Neurol.* - 2020. - Vol. 16. - P.506-519.

24. Cheng J., Ho W.-K., Wu B.-T. et al. miRNA profiling as a complementary diagnostic tool for amyotrophic lateral sclerosis // *Sci Rep.* 2023; 13: 13805. doi: 10.1038/s41598-023-40879-y.

25. Qian L., Zhao Q., Yu P. et al. Diagnostic potential of a circulating miRNA model associated with therapeutic effect in heart failure // *J Transl Med.* 2022 Jun 11;20(1):267. doi: 10.1186/s12967-022-03465-w

26. Танащян М.М., Раскуражев А.А., Кузнецова П.И. и др. Определение микроРНК при каротидном атеросклерозе: перспективы клинического применения // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* - 2023. - № 1. - С.69-74.

27. Боженко В.К., Гончаров С.В., Захаренко М.В. и др. Анализ экспрессии матричной РНК панели генов морфологически неизмененного эпителия прямой кишки как метод ранней диагностики патологии толстой кишки. // *Успехи молекулярной онкологии.* - 2023. - №4. - С.97-107.

28. Бурменская О.В., Байрамова Г.Р., Непша О.С. Донников А.Е. Цитокиновый профиль иммунокомпетентных клеток влагалища при хроническом рецидивирующем вульвовагинальном кандидоз // *Уральский медицинский журнал.* - 2011. - № 3. - С.44-49.

29. Горбенко А.С., Столяр М.А., Бахтина В.И. и др., Разработка метода определения мРНК гена ROR1 в лейкоцитах крови // *Лабораторная служба.* - 2021. - №1. - С. 32-37.

30. Столяр М.А., Горбенко А.С., Ольховский И.А. и др. Разработка метода определения мРНК гена JAK2 в венозной крови и оценка его диагностического значения в онкогематологии // *Клиническая лабораторная диагностика.* - 2021. - №6. - С. 379-384.

31. Jia S., Yu L., Wang L., Peng L. The functional significance of circRNA / miRNA / mRNA interactions as a regulatory network in lung cancer biology // *nt J Biochem Cell Biol.* 2024 Apr;169: 106548. doi: 10.1016/j.biocel.2024.106548.

32. Khan S., Jha A., Panda A.C., Dixit A. Cancer-Associated circRNA-miRNA-mRNA Regulatory Networks: A Meta-Analysis // *Front Mol Biosci.* 2021 May 12;8:671309. doi: 10.3389/fmolb.2021.67130

33. Su Q., Lv X. Revealing new landscape of cardiovascular disease through circular RNA-miRNA-mRNA axis // *Genomics.* - 2020. - Vol. 112, Iss. 2. - P.1680-1685.

34. Gao M., Zhang Z., Sun J. et al. The roles of circRNA- miRNA -mRNA networks in the development and treatment of osteoporosis // *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 Aug 5;13:945310. doi: 10.3389/fendo.2022.945310.

35. Erdogan C., Suer I, Murat Kaya M. et al. Bioinformatics analysis of the potentially functional circRNA-miRNA-mRNA network in breast cancer // *PLoS One.* 2024 Apr 18;19(4):e0301995. doi: 10.1371/journal.pone.0301995. eCollection 2024.

36. Song L., Wang Y., Feng Y. et al. Bioinformatics-based identification of CircR-

- NA-MicroRNA-mRNA network for calcific aortic valve disease// *Genet Res (Camb)* . 2023 May 17;2023:8194338. doi: 10.1155/2023/8194338. eCollection 2023.
37. Xu W., Liu F., Li Q. et al. Integrated analysis of miRNA and mRNA regulation network in hypertension // *Biochem Genet.* - 2023. - Vol.61. - P.2566-2579.
38. Yu T., Xu N., Haque N. et al. Popular computational tools used for miRNA prediction and their future development prospects // *Interdiscip Sci.* - 2020. - Vol.12. - P.395-413.
39. Мензоров А.Г., Лукьянчикова В.А., Кораблев А.Н. и др. Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9 // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* - 2016. - №6. - С. 930-944.
40. Yao D., Zhang L., Zheng M. et al. Circ2Disease: a manually curated database of experimentally validated circRNAs in human disease//*Sci Rep.* 2018 Jul 20;8(1):11018. doi: 10.1038/s41598-018-29360-3.
41. Xia S., Feng J., Chen K. et al. CSCD: a database for cancer-specific circular RNAs// *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;46(D1): D925-D929. doi: 10.1093/nar/gkx863.
42. Ghosal S., Das S., Sen R. et al. Circ2Traits: a comprehensive database for circular RNA potentially associated with disease and traits//*Front Genet* 2013 Dec 10;4:283. doi: 10.3389/fgene.2013.00283.
43. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: From microRNA sequences to function// *Nucleic Acids Res.* - 2019. - Vol.47. - P.D155-D162.