

АНТИСМЫСЛОВЫЕ РНК КАК ПОСЛАННИКИ В МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ: 20 ЛЕТ СПУСТЯ

©2012 г.

А. С. СИТИКОВ

Северо-западный Университет, Чикаго, США

I. Введение. II. Первые идеи о секреции и действии антисмысловых нуклеиновых кислот. III. Секреция нуклеиновых кислот. IV. Антисмысловые РНК. V. РНК интерференция. VI. Секретируемые «циркулирующие» малые РНК. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В статье «Специфические супрессорные Т-клетки секретируют РНК», написанной в 1991 г. мною совместно с А.В.Мунишкиным, было показано, что только линии супрессорных Т-клеток, в отличие от ряда контрольных клеточных линий, способны секретировать РНК [1]. Мы обнаружили, что эти РНК, скорее всего, находятся в составе рибонуклеопротеидных частиц, что, по-видимому, обеспечивает их стабильность во внеклеточной среде, и высказали предположение об антисмысловой по отношению к иммуноглобулиновым мРНК природе этих РНК. Факт внеклеточной секреции РНК клетками эукариот, как мы предположили, свидетельствует о возможной роли нуклеиновых кислот в качестве информационного посредника между клетками. В то время ничего не было известно ни о внутриклеточной регуляции экспрессии генов с помощью коротких антисмысловых РНК, ни о возможности переноса нуклеиновых кислот между клетками организма, ни, тем более, о путях такой передачи. В настоящее время эти процессы довольно подробно исследованы и их исключительная важность в жизнедеятельности эукариот не вызывает сомнений.

Принятые сокращения: кДНК - комплементарная ДНК; нт – нуклеотиды; диРНК – двуцепочечная РНК; РНП – рибонуклеопротеиды; киРНК – короткие интерферирующие РНК; RISC - RNA-induced silencing complex; пиРНК – РНК, ассоциированные с белками семейства Piwi; срРНП - секретируемые регуляторные рибонуклеопротеидные частицы; МНС - Major Histocompatibility Complex; эчРНК – экзосомные члночные РНК.

Адрес для корреспонденции: a-sitikov@northwestern.edu

II. ПЕРВЫЕ ИДЕИ О СЕКРЕЦИИ И ДЕЙСТВИИ АНТИСМЫСЛОВЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В 1928 г. Фредерик Гриффит показал, что убитые нагреванием стрептококки болезнетворного штамма содержат некий «трансформирующий» фактор, превращающий другой, неболезнетворный штамм стрептококков в болезнетворный, способный вызывать пневмонию у мышей точно так же, как и первый штамм. [2] Это был первый эксперимент, показавший, что бактериальная клетка способна передавать генетическую информацию другим бактериальным клеткам посредством процесса, в настоящее время называемого «трансформацией».

В 1944 г. Освальд Эвери с сотрудниками, пытаясь убедиться, что в экспериментах Гриффита не было «недоубитых» нагреванием болезнетворных стрептококков, обнаружили, что трансформирующим фактором является ДНК [3]. Идея экспериментов была проста: убитые болезнетворные стрептококки (после удаления клеточных мембран) обрабатывались или протеазой (чтобы удалить белок), или ДНКазой (чтобы удалить ДНК). Оказалось, что только после обработки болезнетворных стрептококков ДНКазой (но не протеазой) неболезнетворный штамм стрептококков переставал трансформироваться и не мог больше вызывать пневмонию у мышей. Таким образом, эксперименты показали, что именно ДНК является носителем генетической информации в клетке.

Приблизительно через 10 лет Джеймс Уотсон и Френсис Крик расшифровали молекулярную структуру ДНК и показали, каким простым способом ДНК может как наследоваться, так и кодировать последовательность аминокислот в белках [4, 5].

Ещё через 10 лет была опубликована первая статья о действии антисмысловых РНК. В 1963 г. Максин Сингер с коллегами установили, что синтез полифенилаланина на полиуридиловой кислоте в бесклеточной системе трансляции может быть блокирован полирибоадениловой кислотой (которая является антисмысловой по отношению к полиуридиловой) [6]. Эта работа была выполнена «*in vitro*», тогда как доказательства существования механизма регуляции экспрессии генов при помощи антисмысловых РНК в клетках были получены спустя еще 35 лет. Еще больше времени потребовалось для доказательства возможности секреции антисмысловых РНК и передачи их от одних клеток к другим.

Таким образом, идеи о возможности секреции нуклеиновых кислот эукариотическими клетками, а также о роли РНК и ДНК как регуляторных молекул в межклеточном общении, были высказаны задолго до доказательства этих фактов научными методами.

III. СЕКРЕЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Начиная с 1963 г. в научной литературе появились данные о секреции ДНК клетками эукариот (или, как писали тогда, её «высвобождении» из клеток). Эти данные были, как косвенными [7, 8], так и прямыми – в 1972 г. было показано, что сердечные камеры лягушек выделяют небольшие (размером 8–13S) молекулы ДНК [9]. Также было найдено, что человеческие лимфоциты способны выделять близкую по размерам ДНК [10]. Было предположено, что молекулы ДНК были ассоциированы с другими молекулами – возможно, с белками – так как они были нечувствительны к обработке ДНКазой (эта аргументация представляется в настоящее время не очень убедительной, так как не только белки могли защищать нуклеиновые кислоты от нуклеаз, но и какие-то другие молекулы, например, молекулы низкой плотности, такие как липиды или липопротеиды. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что эта секретируемая ДНК оставалась в супернатантной фракции даже после центрифугирования при 165 000 g в течение 12 часов.

Как представляется сейчас с позиций современной молекулярной биологии, эти «высвобождаемые» ДНК (если, конечно, это не было артефактом) находились в составе секретируемых эукариотическими клетками частиц-экзосом. Более подробно о секреции нуклеиновых кислот в составе экзосом речь пойдёт ниже.

В 1975 г. было показано, что молекулы секретируемой ДНК способны передаваться от одной эукариотической клетки к другой [11].

Биологическое значение этих секретируемых, «высвобождаемых» ДНК не было понятным, но было ясно, что в принципе они способны нести генетическую информацию и каким-то образом передавать её другим клеткам.

В начале 70-х годов появились и первые работы по секреции рибонуклеиновых кислот и было установлено, что такие РНК способны переходить в другие клетки [12]. Секретируемая РНК была небольшой (около 5S) и гиперметилированной [13].

Несколько отличающиеся секретируемые РНК были обнаружены в культуральной среде лимфоцитов крови и в спинномозговой жидкости. Такие РНК были частично охарактеризованы: было показано, что они чувствительны к РНКазе, составляют около 0.2% от общей массы клеточных РНК, а их коэффициент седиментации не превышал (24S) [14].

Ещё в 1969 г. было обнаружено, что лимфоциты крови, чувствительные к определённому антигену, выделяют в среду посредник, способный «подарить» эту чувствительность другим, «неприммуни-

зированным» (нечувствительным к данному антигену) лимфоцитам [15]. Позднее было выяснено, что такой посредник, названный «суперантигеном», является олигопептид-олигонуклеотидным комплексом с молекулярным весом около 10 кДа [16]. Также было найдено, что секреция рибонуклеопротеидного комплекса низшим грибом *Allomyces arbuscula* стимулирует его дифференцировку. И наоборот, если создать условия, при которых дифференцировка этого гриба невозможна, то прекращается и секреция данного РНП-комплекса [17, 18]. К сожалению, по разным причинам эти работы не получили дальнейшего развития.

В заключение можно заметить, что долгое время работы по секреции нуклеиновых кислот проводились не систематически и осуществлялись только за счёт энтузиазма отдельных исследователей. Многие другие исследователи, да и научное сообщество в целом, не доверяли полностью выводам, сделанным в работах по секреции нуклеиновых кислот, и относились к этим работам скептически. Негласно считалось, что обнаружение экстраклеточной ДНК обусловлено не секрецией, а попаданием в пробы части содержимого погибших и лизированных клеток. Лишь сейчас, с высоты современных знаний, можно считать доказанной секрецию нуклеиновых кислот эукариотическими клетками.

IV. АНТИСМЫСЛОВЫЕ РНК

Как уже отмечено выше, первой работой по применению антисмысловых РНК была работа Сингера и его коллег [6].

Понимание того, что трансляция мРНК может быть блокирована антисмысловым олигонуклеотидом, было блестяще использовано Патерсоном с коллегами, а также Хастис и Хелдом, в 70-е годы прошлого века. Они показали, что мРНК в комплексе с кДНК не способна к трансляции в бесклеточных системах белкового синтеза. На основании этой идеи они развили известный и довольно широко использовавшийся в те времена метод сканирования клонов, названный «трансляция арестованных гибридов» [19, 20].

В середине 80-х было показано, что РНК, синтезированные с некодирующих цепочек ДНК, играют важную роль в регуляции экспрессии соответствующих генов в эукариотах, в частности, в дрозофиле и мышах [21, 22].

Наконец, в 1993 г. было показано, что в нематоде *Caenorhabditis elegans* ген *lin-4* кодирует небольшую РНК, антисмысловую по отношению к мРНК гена *lin-14*, и благодаря этому свойству негативно

регулирует уровень белка Lin-14 в процессе дифференцировки нематоды на личиночной стадии [23]. Эта небольшая РНК оказалась эволюционно консервативной и стала впоследствии одной из самых известных РНК класса антисмысловых микроРНК – *lin-4*. Но в то время такой тип регуляции воспринимался скорее как исключение из правил клеточной регуляции.

V. РНК ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Открытие РНК интерференции явилось довольно неожиданным: в 90-е годы при изучении «неменделевской» наследственности нематоды *C. elegans* Эндрю Файр с коллегами, использовали различные искусственно синтезированные антисмысловые РНК к некоторым генам, играющим роль в дифференцировке этого червя, с целью регуляции этих генов практически без особого успеха (как и несколько других групп, пытавшихся использовать идею регуляции по типу *lin-4*). В то же время было известно, что существуют данные о действии антисмысловых и смысловых РНК на экспрессию генов в нематоде – и те и другие вызывали некий специфический эффект ингибирования экспрессии генов, причем приблизительно в равной степени [24, 25]. Поскольку и антисмысловые, и смысловые последовательности производили примерно одинаковый эффект на экспрессию генов, Файр с коллегами решили попробовать использовать двухцепочечные РНК, одна из цепочек которых была антисмысловой. Результат получился ошеломляющим: такие дцРНК обладали сильнейшим ингибирующим действием по отношению к посттранскрипционной экспрессии тех генов, в которых по крайней мере часть кодирующей последовательности была идентична нуклеотидной последовательности дцРНК [26]. В этой статье они пытаются логически обосновать, почему решили применить в своих опытах дцРНК, хотя создаётся впечатление, что действовали они, скорее всего, интуитивно.

В этой работе также было обнаружено, что только сегменты дцРНК, соответствующие последовательности зрелой мРНК, но не последовательностям интронов или промотора данного гена, вызывают ингибирование. Было установлено, что при этом происходит уменьшение количества или полное исчезновение этой мРНК. И наконец, было показано, что достаточно введения всего нескольких молекул дцРНК в клетку, чтобы существенно понизить уровень экспрессии гена-мишени, что подразумевает каталитический, а не стехиометрический механизм ингибирования, либо существование

процесса амплификации дцРНК в клетке (позднее были подтверждены оба предположения).

Вскоре было доказано, что активным элементом в этих ингибиторных дцРНК является небольшой (21–23 нт) антисмысловый олигорибонуклеотид [27–29]. Также было выяснено, что существуют внутриклеточные механизмы генерирования эндогенных антисмысловых РНК. Самая известная популяция РНК, из которых образуются антисмысловые РНК, была названа микроРНК.

К настоящему времени обнаружены тысячи таких эндогенных микроРНК в различных клетках как представителей царства животных, так и представителей царства растений.

Остановимся вкратце на механизмах образования, биогенеза и функции микроРНК. Предшественники этих РНК синтезируются РНК-полимеразой II, хотя часть их может синтезироваться РНК-полимеразой III. Как правило, микроРНК синтезируются в виде длинных транскриптов, названных при-микроРНК, которые в ядре подвергаются процессингу под действием ферментного комплекса, содержащего белки Drosha (РНКазу III 2-го класса) и Pasha (дцРНК-связывающий белок, обеспечивающий корректное расщепление при-микроРНК) (в дрозофиле) или его аналог (в других организмах). В результате этого ядерного процессинга образуются пре-микроРНК, длиной около 70 нуклеотидов, обладающие стебле-петлевой (stem-loop) структурой. При попадании в цитоплазму пре-микроРНК подвергается дальнейшему расщеплению под действием Dicer, эндонуклеазы семейства РНКаз III, расщепляющей пре-микроРНК до коротких двухспиральных фрагментов, названных киРНК, 20–22 нт длиной, как правило с двумя выступающими на 3'-конце нуклеотидами. Dicer способствует включению киРНК в pre-RISC комплекс, содержащий в качестве главного компонента белок «Аргонавт» (название произошло от первого обнаруженного в этом семействе белка AGO1, мутация в котором приводила к тому, что листья растения Резуховидка Таля становились похожи на раковины моллюска Аргонавт из отряда осьминоговых) [30]. Аргонавт в составе такого комплекса выбирает одну из цепочек киРНК и включает ее в RNA-induced silencing complex (RISC). Эта цепочка выбирается на основании большей термодинамической стабильности 5'-конца [31], но всегда оказывается антисмысловой по отношению к определенным мРНК. В результате специфического взаимодействия такой РНК в составе комплекса RISC (в который в случае микроРНК всегда входят белки семейства Аргонавтов) с комплементарной последовательностью (почти всегда в 3'-нетранслируемой области), соответствующей мРНК, происходит её

расщепление и таким образом достигается выключение экспрессии соответствующего гена.

В некоторых случаях достаточно всего 7–12 комплементарных к мРНК нуклеотидов, но непременно (к настоящему моменту не известно, почему) на 5'-конце такой антисмысловой РНК для эндонуклеотического расщепления мРНК-мишени. Такой относительно короткий специфический сайт связывания для кРНК сопоставим с размером сайтов связывания для многих белковых факторов транскрипции, когда для специфического связывания с регулируемыми ими промоторами генов достаточно последовательности ДНК длиной всего в 5–8 нуклеотидов. То есть, микроРНК выступают в качестве пост-транскрипционных факторов рибонуклеиновой природы, используя механизм, сходный с механизмом распознавания специфических последовательностей ДНК, применяемым белковыми факторами транскрипции. В других случаях все 21–23 нуклеотида микроРНК комплементарны последовательности мРНК-мишени – это зачастую зависит от принадлежности микроРНК к царству животных или растений. Более подробную информацию о биогенезе и функции микроРНК можно найти в обзорах [32, 33].

Также показано, что, кроме эндонуклеолитического расщепления мРНК, в определённых случаях микроРНК оказывают ингибирующее действие на трансляцию мРНК-мишеней. Более того, было показано, что трансляционная репрессия в растениях в подобных ситуациях может осуществляться только в случае, если в комплексе с микроРНК присутствуют белки Ago1, но не другие белки семейства Аргонавт [34].

К настоящему времени показано, что существует несколько тысяч микроРНК в царстве растений и около 10 тысяч генов микроРНК в царстве животных – количества, сопоставимые с количеством генов, кодирующих белки (к примеру, у млекопитающих около 25 тысяч генов кодирует различные белки).

Многие из микроРНК чрезвычайно консервативны. Примером таких консервативных РНК могут служить две микроРНК, обнаруженные первыми (уже упоминавшаяся нами *lin-4* [23] и *let-7*, также обнаруженная в нематодах в 2000 г.) [35]. Они чрезвычайно консервативны, как среди всех видов беспозвоночных, так и среди подтипа позвоночных животных. Это показывает, что сиквенс-специфические посттранскрипционные регуляторные механизмы, опосредованные микроРНК, являются такими же общими как и многие механизмы регуляции трансляции [36].

Сравнительно недавно был открыт новый класс малых антисмысловых РНК – пиРНК, взаимодействующих с белком Piwi [37]. Конеч-

ный размер этих РНК несколько больше, чем у микроРНК – 24–30 нт, вместо 21–23 нт. Другая отличительная особенность пиРНК – то, что для их образования из предшественников не требуются ни Drosha, ни Dicer, ни их аналоги. Ещё одна отличительная особенность пиРНК: эти РНК находятся в комплексе не с белком Аргонавт (исключение – белок Ago3, который принимает участие в «пинг-понговой» амплификации пиРНК), а с белком Piwi (P-element induced wimpy testis в плодовых мушках дрозофила) – продуктом класса генов, которые изначально идентифицировали как гены, кодирующие регуляторные белки, ответственные за незавершённую дифференциацию стволовых клеток и определяющих стабильность скоростей клеточного деления в зародышевых клеточных линиях [38].

В настоящее время белки PIWI также входят (в качестве подсемейства) в состав белков семейства Аргонавт.

ПиРНК – наиболее многочисленный класс малых некодирующих РНК. На данный момент насчитывается несколько десятков миллионов различных пиРНК. Подавляющее большинство этих РНК не имеют каких-либо консервативных последовательностей среди различных видов живого, они могут синтезироваться и реплицироваться в огромных количествах, и их основная известная функция – посттранскрипционное ингибирование экспрессии «эгоистических» генетических элементов (таких как ретротранспозоны) с целью предотвращения создаваемых продуктами генов этих элементов помех в формировании эмбриональных клеток [39]. Учитывая, что различные транспозонные элементы составляют десятки процентов генома млекопитающих (тогда как последовательности ДНК, кодирующие белки, составляют всего лишь несколько процентов от всего генома), очевидно, насколько важной является проблема ограничения массовой рекомбинации при формировании половых клеток для сохранения жизнеспособности и индивидуальности вида. В соматических клетках пиРНК представлены в значительно меньшем количестве и разнообразии.

Третий, самый малочисленный класс малых некодирующих РНК – это эндогенные киРНК. Однако использование внутриклеточного механизма функционирования именно этих РНК привело к революционному скачку в исследовании экспрессии генов. Для эндогенных киРНК нет необходимости во взаимодействии с ядерными белками Drosha и Pasha, достаточно наличие цитоплазматического белка Dicer. В настоящее время при помощи химически-синтезированных экзогенных киРНК легко, недорого и с высокой надёжностью можно

ингибировать экспрессию любого гена в любой эукариотической клетке.

Окончательно существование природных эндогенных киРНК в клетках млекопитающих было доказано только в 2008 г. [40, 41] До выхода этих публикаций создавалось впечатление, что в клетке зачем-то существует сложная многокомпонентная система, обеспечивающая избирательное ингибирование экспрессии генов в присутствии экзогенных дцРНК небольшого размера.

Как уже упоминалось выше, малые антисмысловые РНК могут действовать каталитически – одна молекула киРНК в комплексе с белком Аргонавт может служить причиной деградации многих молекул мРНК. Было показано, что время полужизни некоторых микроРНК составляет до 220 часов [42], тогда как для эукариотической мРНК, в среднем, около 10 часов. Подробнее с данными по стабильности и деградации микроРНК можно ознакомиться в обзоре [43].

Стабильность микроРНК – один из факторов, ответственных за высокую эффективность их действия на мРНК-мишени. Другим фактором является их способность к размножению и образованию вторичных киРНК при помощи специальных РНК-зависимых РНК-полимераз (RdRP) [44]. Анализ коротких клеточных РНК показал, что короткие антисмысловые РНК, синтезированные РНК-зависимой РНК-полимеразой на мРНК-матрицах могут играть ключевую роль в клеточной регуляции [45].

К настоящему времени изучение механизмов РНК интерференции и регуляции пост-транскрипционной экспрессии генов в клетках эукариот является одной из наиболее быстро прогрессирующих областей молекулярной биологии. Вот основные, с моей точки зрения, её вехи (о некоторых из них уже упоминалось выше, все эти вехи были важными кирпичиками при строительстве этой новой области знаний):

В 1993 г. была обнаружена первая антисмысловая микроРНК lin-4 [23].

В 1998 г. вышла статья Эндрю Файра с соавторами, в которой было показано, что дцРНК могут регулировать экспрессию генов [26]. Эта статья стала краеугольным камнем в представлениях о посттранскрипционной регуляции экспрессии генов с участием небольших некодирующих РНК.

В 1999 г. было обнаружено, что экспрессия гена Аргонавт необходима для действия киРНК [46]. Чуть позже был выделен белок Аргонавт (Ago2), который оказался рибонуклеазой, специфически активируемой киРНК [47]. Более того, было показано, что рекомбинантный

человеческий белок Ago2, ассоциированный с киРНК, необходим и достаточен для нуклеолитической активности [48, 49].

В 2000 г. было выяснено, что киРНК является специфическим компонентом РНК-белкового комплекса RISC, ответственного за эндонуклеолитическую деградацию мРНК-мишеней [29].

В 2001 г. было установлено, что белок Dicer является дцРНК-специфической рибонуклеазой, который превращает длинные дцРНК в короткие (21–23 нт) киРНК [50, 51].

В том же году была идентифицирована другая, отличная от ки- и микроРНК, малая РНК – пиРНК [52]; позже этой же группой учёных было доказано существование пиРНК как группы малых РНК длиной 24–30 нт, специфически экспрессирующихся в зародышевых линиях в процессе развития дрозофилы [37].

Наконец, в том же 2001 г. вышла революционная статья Элбашира с соавторами, в которой было показано, что экзогенные киРНК могут быть использованы для получения фенотипа генетических мутаций в клетках млекопитающих по типу «потеря функции». Таким образом, была доказана принципиальная возможность для неограниченного использования синтетических киРНК с целью ингибирования экспрессии любых генов [53].

В 2003 г. было найдено, что для образования специфического комплекса между дцРНК и Аргонавтом в дрозофиле кроме белка Dicer необходим и белок R2D2 [54].

В том же году было обнаружено, что белок Drosha необходим для превращения длинных первичных пре-микроРНК в более короткие пре-микроРНК. Было показано, что этот процесс происходит в ядре, и образующиеся пре-микроРНК идут из ядра в цитоплазму для дальнейшего процессинга [55].

В 2004 г. было выяснено, что в клетках человека только белок семейства Аргонавтов Ago2, ассоциированный с микроРНК, способен к нуклеазной активности, тогда как другие белки этого семейства (Ago1, Ago3 и Ago4) способны только к связыванию микроРНК [56, 57].

В 2005 г. было обнаружено, что киРНК подвергаются ковалентной модификации РНК-метилованию, и было высказано предположение, что пост-транскрипционные модификации малых антисмысловых РНК могут регулировать их стабильность и функцию [58]. Двумя годами позже было показано, что и в царстве животных (на примере дрозофилы), киРНК могут быть метилированы [59].

В 2006 г. было доказано, что пиРНК принципиально отличаются от микроРНК : они образуются из одноцепочечных предшественников,

не нуждаются в Drosha и Dicer, модифицированы с 3'-конца, функционируют в ассоциации с белками семейства Piwi (родственным, но отличным от белков Аргонавтов, хотя у Дрозофилы в их семейство, наряду с белками Piwi и Aub, входит и белок Ago3) и являются самой многочисленной группой малых антисмысловых РНК, ингибируя исключительно экспрессию ретротранспозонов [39].

На следующий год была предложена «пинг-понговая» модель биогенеза пиРНК, – возможность амплификации пиРНК при помощи РНК-зависимой РНК полимеразы как на смысловых, так и на антисмысловых цепочках РНК [60, 61].

В том же 2007 г. было продемонстрировано, что эндогенные некодирующие РНК могут регулировать активность микроРНК, то есть было установлено существование антисмысловых РНК-регуляторов [62].

В 2008 г. было найдено, что и микро-, и пиРНК возникли в ранней эволюции ещё до отделения подцарства Эуметазои (настоящие многоклеточные) в царстве животных [63].

В том же году было доказано существование природных внутриклеточных киРНК и предположена роль псевдогенов, как матриц для этих РНК, связанная с ингибированием родительских генов [33, 34].

Также в 2008 г. было найдено, что микроРНК в высоких концентрациях представлены в сыворотке и плазме крови человека [64]. Они отличаются необычно высокой стабильностью и поэтому могут быть использованы как маркеры для детекции раковых заболеваний.

До последнего времени считалось, что эти секретируемые РНК большей частью находятся в составе экзосом [65], но в 2011 г. была обнаружена популяция секретируемых («циркулирующих») микроРНК, не зависящая от экзосом и представляющая собой олиго-рибонуклеопротеидные комплексы Аргонавт2-микроРНК [66].

VI. СЕКРЕТИРУЕМЫЕ «ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ» МАЛЫЕ РНК

Несколько лет назад в крови и других жидкостях организма человека были обнаружены внеклеточные микроРНК и другие малые РНК, названные циркулирующими РНК. Эти РНК с током крови могут быть доставлены клеткам любого органа или ткани. До недавнего времени считалось, что все эти циркулирующие РНК находятся в крови в составе экзосом, небольших мембранных частиц размером от 40 до 100 нм, обнаруживаемых как в питательной среде для клеточных культур, так и во многих биологических жидкостях, включая плазму,

слюну, мочу, желчь и грудное молоко. Физиологическая функция экзосом до сих пор до конца не выяснена, однако некоторые недавние результаты, полученные в различных экспериментальных системах позволяют предположить, что экзосомы вовлечены в межклеточную коммуникацию. Так, экзосомы, секретируемые различными клетками, являются посредниками во многих биологических процессах, в частности, индуцируют апоптоз и стимулируют рост раковых клеток и ангиогенез, доставляя регуляторные белки и РНК от одних клеток к другим.

Впервые секретируемые мембранные пузырьки были описаны в 1983 г. при исследовании процесса освобождения овечьих ретикулоцитов от трансферринового рецептора при их созревании [67]. Этот процесс включает, во-первых, сортировку и накопление трансферринового рецептора в небольших (40–100 нм) мембранных пузырьках внутри эндосом – более крупных мембранных органелл (до 500 нм в диаметре), и во-вторых, слияние эндосом с клеточной мембраной, приводящее к высвобождению пузырьков-частиц, содержащих рецептор, во внеклеточное пространство. В 1987 г. эти небольшие частицы-пузырьки были названы экзосомами – это название подчеркивало их высвобождение из клетки в окружающее пространство [68].

Позднее было показано, что не только ретикулоциты, но и другие клетки, такие, как клетки, представляющие антиген, в том числе, В-лимфоциты и дендрциты, секретируют экзосомы [69, 70]. Более того, в этих случаях удалось выявить и некоторые регуляторные функции экзосом: экзосомы В-лимфоцитов обладали способностью стимулировать пролиферацию Т-клеток [69], в то время, как экзосомы дендрцитов индуцировали противоопухолевый иммунный ответ *in vivo* [70], что является первым случаем применения экзосом в терапии раковых заболеваний. Дендрциты играют важную роль в поддержании иммунной толерантности, в частности, ауто толерантности [71], выводящей собственные антигены из-под контроля иммунной системы. Экзосомы, секретируемые незрелыми дендрцитами, являются важными посредниками в этом процессе, возможно потому, что несут МНС-аутоантигенный комплекс, лишённый белка CD86, ответственного за активацию Т-лимфоцитов. Такие экзосомы также играют важную роль в поддержании периферийной иммуноустойчивости и контроле аутоиммунного ответа реактивных Т-клеток [72, 73].

В то время были известны лишь несколько типов клеток, способных секретировать экзосомы: ретикулоциты, В-лимфоциты, дендро-

циты, несколько трансформированных клеточных линий, мастоциты, а также клетки эпителия кишечника, экзосомы которых содержали МНС class II и были способны индуцировать гуморальный иммунный ответ [74]. При этом были известны не более 50-ти различных белковых молекул, обнаруживаемых в составе экзосом:

1. Антиген-представляющие молекулы – МНС class I и МНС class II, совместно с ко-стимулятором CD86,
2. Адгезионные молекулы типа CD63 и другие белки семейств тетраспанинов и альфа- и бета-интегринов,
3. Несколько белков (шаперонов) теплового шока,
4. Белки эндосомального сортирующего комплекса, вовлечённого в транспорт, а также,
5. Рафт-ассоциированные белки и гликолипиды.

Как видно, все эти группы белков достаточно функциональны, чтобы представить их как в качестве сортирующих и структурных элементов экзосом, так и в качестве регуляторов клеток-реципиентов в процессе межклеточных коммуникаций.

Присутствие перечисленных белков в составе экзосом было обнаружено с использованием специфических антител к этим белкам («western blot») и при помощи иммуноэлектронной микроскопии [75]. Также было показано, что клетки высвобождают прионы (белковый инфекционный агент, в отличие от остальных известных инфекционных агентов, не имеющий нуклеиновой кислоты в своём составе) в ассоциации с экзосомами [76].

Но вскоре пришло время широкомасштабной идентификации клеточных компонентов с использованием масс-спектрологии и высоких технологий протеомики. Уже к 2009 г. в 64 проведённых исследованиях с использованием экзосом из 26-ти различных типов клеток и 9-ти биологических жидкостей было обнаружено 2399 разных белков [77]. К 2012 г. число белков, обнаруженных в экзосомах, достигло 4563 [78].

В 2007 г. в экзосомах из мышинных и человеческих клеточных линий мастоцитов, а также в первичных мастоцитах костного мозга, были обнаружены молекулы РНК [79].

Используя гибридационные микрочипы, авторы выявили наличие в этих экзосомах около тысячи различных последовательностей мРНК, часть из которых даже не присутствовала в цитоплазме клеток-доноров экзосом.

Используя бесклеточные системы трансляции, авторы доказали функциональность этих мРНК, транслировав их в соответствующие полноразмерные белки.

Оказалось, что мРНК в составе экзосом мастоцитов могут передаваться другим мышинным либо человеческим клеткам. При этом в результате передачи мышинных эндосомальных мРНК человеческим мастоцитам в цитоплазме последних были обнаружены новые, мышинные белки, что свидетельствует о том, что переданная из чужеродных экзосом мРНК может быть транслирована в цитоплазме клетки-реципиента.

Анализ экзосомальных РНК выявил, что, помимо мРНК, в них содержатся малые РНК, включая микроРНК. Авторы назвали эти РНК «экзосомными челночными (shuttle) РНК» или эчРНК, а соответствующую статью озаглавили: «Экзосома-опосредованный перенос мРНК и микроРНК как новый механизм генетического обмена между клетками» [79].

К началу 2009 г. в составе экзосом было охарактеризовано 900 молекул различных мРНК и 274 молекулы различных микроРНК [77]. К настоящему времени их число достигло 1634 и 764 молекул, соответственно [78].

По-прежнему, большая часть работ по экзосомам связана с исследованиями в области иммунологии. В этих работах, в частности, утверждается, что экзосомоподобные частицы являются конвейерным передатчиком иммунного ответа [80], и что микроРНК способны регулировать генную экспрессию в клетках-реципиентах при однонаправленном переносе экзосом, наполненных микроРНК, от Т-клеток к антиген представляющим клеткам (АРС) [81].

Поскольку упаковка РНК в экзосомы происходит с высокой селективностью, о чём свидетельствует нередкое полное отсутствие подобных РНК в цитоплазме донорских клеток, были предприняты попытки выяснения механизма такой селективности в виде специфических мотивов-секреторных сигналов в последовательностях экзосомных РНК, отличающих их от других РНК, и было обнаружено несколько таких потенциальных мотивов [82].

В настоящее время экзосомные микроРНК представляют огромный интерес для медицины в связи с их диагностическим потенциалом как биомаркеров и возможностью их использования в качестве фармакологических агентов, в частности, при лечении онкологических заболеваний [83, 84]. В связи с разнообразием, сложностью и многокомпонентностью секретлируемых белков, липидов, ДНК и РНК компонентов, для них был предложен обобщающий термин «флюидом» [84].

Но вернёмся к секретируемым микроРНК. До последнего времени их секреция связывалась почти исключительно с экзосомами. Однако, недавно появилось несколько исследований, в которых было показано, что эти РНК находятся не в составе экзосом, а секретируются в виде комплекса с РНК-связывающими белками. Так, в одной статье было показано, что секретируемые микроРНК ассоциированы с белком нуклеофосмином 1 (NMP1) [85], многофункциональным РНК-шапероном, участвующим в биогенезе рибосом, и обычно локализованным в клеточном ядрышке [86]. В двух других работах было показано, что существует популяция циркулирующих микроРНК, не входящих в состав экзосом, а ассоциированных с белком Ago2, являющимся основным компонентом комплекса RISC, ответственного за киРНК-зависимую деградацию мРНК в клетке [87, 66]. В другом исследовании было показано, что группа липопротеинов, называемая липопротеинами высокой плотности (HDL), известная как один из главных транспортёров холестерина и триглицеридов, способна также транспортировать микроРНК в кровотоке с последующей доставкой к клеткам-реципиентам [88].

Таким образом, показано, что микроРНК могут быть секретируются клеткой четырьмя разными способами:

1. Посредством экзосом или других мембранных частиц (наиболее хорошо изученный способ);
2. В ассоциации с РНК-связывающими белками а) Ago2 или б) нуклеофосмином 1;
3. В составе комплекса с липопротеидом высокой плотности (HDL).

Возможно, Ago2 и нуклеофосмин 1 взаимодействуют с микроРНК совместно и представляют общий путь секреции микроРНК [89].

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени совершенно очевидно, что механизм подавления экспрессии генов малыми антисмысловыми РНК является одним из важнейших элементов клеточной регуляции. Таким образом, одна часть проблемы регуляции клеточных процессов при участии секретируемых антисмысловых РНК решена: если такая молекула попадёт внутрь клетки, то она будет способна регулировать внутриклеточную экспрессию генов. Пока нет данных, что это может происходить на транскрипционном и, тем более, претранскрипционном уровне, но, очевидно, что это может осуществляться на уровне посттранскрипционной регуляции экспрессии генов посредством

механизмов РНК интерференции. Не вызывает сомнений и перенос от клетки к клетке различных секретируемых РНК. Большая часть работ по этой теме посвящена экзосомам как специальным транспортным средствам межклеточной коммуникации. К сожалению, до сих пор неясны принципы избирательности процесса и селективности регуляторных элементов в состав экзосом. Непонятно, при помощи каких сигналов экзосомы со своими пассажирами находят конечную точку назначения. Пока эти вопросы не будут полностью выяснены, рассуждать об экзосомах, как доставщиках различных регуляторных молекул от одних клеток к другим, преждевременно. Так что работы в этой области непочатый край, и одними только (даже высокотехнологичными) методами детекции различных молекул в циркулирующих жидкостях организма серьёзного прогресса добиться сложно. Необходимо применение традиционных, как биохимических, так и генетических, методов исследований.

Обнаружение циркулирующих рибонуклеопротеидных комплексов микроРНК-белок в крови человека, независимых от экзосом или любых подобных образований, открывает перспективы обнаружения целой системы секретируемых регуляторных рибонуклеопротеидных частиц (срРНП), в которых регуляторным компонентом служит РНК, а РНК-связывающие белки в таких частицах выполняют функцию шаперонов, доставляя РНК неповреждённой в нужный пункт назначения. Пока известны два кандидата на роль таких белков в срРНП – Ago2 и нуклеофосмин 1, но в ближайшем будущем могут быть обнаружены и другие участники переноса РНК от клетки к клетке в процессе не зависящего от экзосом межклеточного общения.

Таким образом, по-прежнему сохраняется надежда, что высказанная нами 20 лет назад гипотеза о существовании регуляторных секретируемых РНК, антисмысловых по отношению к варибельным участкам иммуноглобулиновых мРНК, будет подтверждена в недалёком будущем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ситиков А.С., Мунишкин А.В. (1991) Докл. АН СССР, **318**, 1486–1488.
2. Griffith, F. (1928) J. Hyg. (Lond.), **27**, 113–159.
3. Avery, O.T., Macleod, C.M., McCarty, M. (1994) J. Exp. Med., **79**, 137–158.
4. Watson, J.D., Crick, F.H. (1953) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., **18**, 123–131.
5. Watson, J.D., Crick, F.H. (1953) Nature, **171**, 964–967.
6. Singer, M.F., Jones, O.W., Nirenberg, M.W. (1963) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **49**, 392–399.
7. Stroun, M., Anker, P., Ledoux, L. (1966) Arch. Int. Physiol. Biochim., **74**, 935–937.

8. Bendich, A., Wilczok, T., Borenfreund, E. (1965) *Science*, **148**, 374–376.
9. Stroun, M., Anker, P. (1972) *Biochem. J.*, **128**, 100–101.
10. Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Gahan, P.B. (1977) *Int. Rev. Cytol.*, **51**, 1–48.
11. Politis, G., Plassara, M.G., Thomou-Politi, H. (1975) *Nature*, **257**, 485–486.
12. Kolodny, G.M. (1971) *Exp. Cell Res.*, **65**, 313–324.
13. Kolodny, G.M. (1977) *Nucleic Acids Res.*, **4**, 271–284.
14. Stroun, M., Anker, P., Beljanski, M., Henri, J., Lederrey, C., Ojha, M., Maurice, P.A. (1969) *Cancer Res.*, **38**, 3546–3554.
15. Valentine, F.T., Lawrence, H.S. (1969) *Science*, **165**, 1014–1016.
16. Graybill, J.R., Silva, J. Jr., Alford, R.H., Thor, D.E. (1973) *Cell Immunol.*, **8**, 120–135.
17. Khandjian, E.W., Turian, G. (1976) *Cell Differ.*, **5**, 171–188.
18. Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Gahan, P.B. (1977) *Int. Rev. Cytol.*, **51**, 1–48.
19. Paterson, B.M., Roberts, B.E., Kuff, E.L. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4370–4374.
20. Hastie, N.D., Held, W.A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1217–1221.
21. Spencer, C.A., Gietz, R.D., Hodgetts, R.B. (1986) *Nature*, **322**, 279–281.
22. Williams, G.T., Kingston, R., Owen, M.J., Jenkinson, E.J., Owen, J.J. (1986) *Nature*, **324**, 63–64.
23. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. (1993) *Cell*, **75**, 843–854.
24. Fire, A., Albertson, D., Harrison, S., and Moerman, D. (1991) *Development*, **113**, 503–514.
25. Guo, S., and Kempthues, K. (1995) *Cell*, **81**, 611–620.
26. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998) *Nature*, **391**, 806–811.
27. Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C. (1999) *Science*, **286**, 950–952.
28. Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J. (2000) *Nature*, **404**, 293–296.
29. Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P. (2000) *Cell*, **101**, 25–33.
30. Hutvagner, G., Simard, M.J. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 22–32.
31. Preall, J.B., He, Z., Gorra, J.M., Sontheimer, E.J. (2006) *Curr. Biol.*, **16**, 530–535.
32. Kim, V.N., Han, J., Siomi, M.C. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 126–139.
33. Pritchard, C.C., Cheng, H.H., Tewari, M. (2012) *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 358–369.
34. Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., Voinnet, O. (2008) *Science*, **320**, 1185–1190.
35. Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G. (2000) *Nature*, **403**, 901–906.
36. Lagos-Quintana, M. (2001) *Science*, **294**, 853–858.
37. Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., Tuschl, T. (2003) *Dev. Cell*, **5**, 337–350.
38. Cox, D.N., Chao, A., Lin, H. (2000). *Development*, **127**, 503–514.
39. Vagin, V.V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V., Zamore, P.D. (2006) *Science*, **313**, 320–324.

40. Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., Surani, M.A., Sakaki, Y., Sasaki, H. (2008) *Nature*, **453**, 539–543.
41. Tam, O.H., Aravin, A.A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E.P., Che-loufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R.M., Hannon, G.J. (2008) *Nature*, **453**, 534–538.
42. Gantier, M.P., McCoy, C.E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A.T., Behlke, M.A., Hertzog, P.J., Mackay, F., Williams, B.R. (2011) *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5692–5703.
43. Zhang, Z., Qin, Y.W., Brewer, G., Jing, Q. (2012) *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **3**, 593–600.
44. Sijen, T., Steiner, F.A., Thijssen, K.L., Plasterk, R.H. (2007) *Science*, **315**, 244–247.
45. Pak, J., Fire, A. (2007) *Science*, **315**, 241–244.
46. Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., Mello, C.C. (1999) *Cell*, **99**, 123–132.
47. Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., Hannon, G.J. (2001) *Science*, **293**, 1146–1150.
48. Miyoshi, K., Tsukumo, H., Nagami, T., Siomi, H., Siomi, M.C. (2005) *Genes Dev.*, **19**, 2837–2848.
49. Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 340–349.
50. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J. (2001) *Nature*, **409**, 363–366.
51. Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, E., Tuschl, T., Zamore, P.D. (2001) *Science*, **293**, 834–838.
52. Aravin, A.A., Naumova, N.M., Tulin, A.V., Vagin, V.V., Rozovsky, Y.M., Gvozdev, V.A. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, 1017–1027.
53. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001) *Nature*, **411**, 494–498.
54. Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.E., Smith, D.P., Wang, X. (2003) *Science*, **301**, 1921–1925.
55. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, V.N. (2003) *Nature*, **425**, 415–419.
56. Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., Tuschl, T. (2004) *Mol. Cell*, **15**, 185–197.
57. Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., Hannon, G.J. (2004) *Science*, **305**, 1437–1441.
58. Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., Chen, X. (2005) *Science*, **307**, 932–935.
59. Pélisson, A., Sarot, E., Payen-Groschêne, G., Bucheton, A. (2007) *J. Virol.*, **81**, 1951–1960.
60. Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., Hannon, G.J. (2007) *Cell*, **128**, 1089–1103.
61. Gunawardane, L.S., Saito, K., Nishida, K.M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., Siomi, M.C. (2007) *Science*, **315**, 1587–1590.
62. Franco-Zorrilla, J.M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M.I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., García, J.A., Paz-Ares, J. (2007) *Nat Genet.*, **39**, 1033–1037.

63. Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B.J., Chiang, H.R., King, N., Degan, B.M., Rokhsar, D.S., Bartel, D.P. (2008) *Nature*, **455**, 1193–1197.
64. Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10513–10518.
65. Pritchard, C.C., Cheng, H.H., Tewari, M. (2012) *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 358–369.
66. Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., Tait, J.F., Tewari, M. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 5003–5008.
67. Pan, B.T., Johnstone, R.M. (1983) *Cell*, **33**, 967–978.
68. Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., Turbide, C. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 9412–9420.
69. Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., Geuze, H.J. (1996) *J. Exp. Med.*, **183**, 1161–1172.
70. Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Amigorena, S. (1998) *Nat. Med.*, **4**, 594–600.
71. Lutz, M.B., Schuler, G. (2002) *Trends Immunol.*, **23**, 445–449.
72. Pêche, H., Heslan, M., Usal, C., Amigorena, S., Cuturi, M.C. (2003) *Transplantation*, **76**, 1503–1510.
73. Quah, B.J., O'Neill, H.C. (2005) *J. Cell Mol. Med.*, **9**, 643–654.
74. Van Niel, G., Mallegol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugière, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J.K., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M. (2003) *Gut*, **52**, 1690–1697.
75. Février, B., Raposo, G. (2004) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 415–421.
76. Février, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., Raposo, G. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9683–9688.
77. Mathivanan, S., Simpson, R.J. (2009) *Proteomics*, **9**, 4997–5000.
78. Mathivanan, S., Fahner, C.J., Reid, G.E., Simpson, R.J. (2012) *Nucleic Acids Res.*, **40**, D1241–D1244.
79. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 654–659.
80. Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E. (2009) *Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 581–593.
81. Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M.A., Bernad, A., Sánchez-Madrid, F. (2011) *Nat. Commun.*, **2**, 282.
82. Batagov, A.O., Kuznetsov, V.A., Kurochkin, I.V. *BMC Genomics*, **12**, Suppl. 3, S18.
83. Hu, G., Drescher, K.M., Chen, X.M. (2012) *Front Genet.*, **3**, 56.
84. Pant, S., Hilton, H., Burczynski, M.E. (2012) *Biochemical pharmacology*, **83**, 1484–1494.
85. Wang, K., Zhang, Z., Weber, J., Baxter, D., and Galas, D.J. (2010) *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7248–7259.
86. Lindström, M.S. (2011) *Biochem. Res. Int.*, **2011** (195209), 1–16.
87. Turchinovich, A., Weiz, L., Langhein, A., Burwinkel, B. (2011) *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7223–7233.

88. *Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., Remaley, A.T.* (2011) *Nat. Cell Biol.*, **13**, 423–334
89. *Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C.Y.* (2012) *Protein Cell*, **3**, 28–37.