

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Дольский Александр Алексеевич

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

1.5.3 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Юдкин Дмитрий Владимирович

Кольцово – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ	7
Актуальность темы исследования	7
Цели и задачи работы	9
Научная новизна.....	9
Теоретическая и практическая значимость работы.....	10
Методология и методы исследования.....	11
Положения, выносимые на защиту	12
Степень достоверности и апробация результатов	12
Список публикаций по теме диссертации	12
Структура и объем диссертации	12
Личный вклад автора	12
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Этапы изучения заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой .	13
1.2. Клинические проявления заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой.....	17
1.2.1. Синдром ломкой X-хромосомы (FXS).....	17
1.2.2. Первичная овариальная недостаточность, ассоциированная с ломкой X-хромосомой (FXPOI).....	19
1.2.3. Синдром атаксии и тремора, ассоциированный с ломкой X-хромосомой (FXTAS).....	20
1.2.4. Нейропсихиатрические расстройства, ассоциированные с ломкой X-хромосомой.....	21
1.3. Современное представление о механизмах патогенеза заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой.....	21
1.4. Некодирующие РНК: особенности строения и функции.....	25
1.4.1. Общее представление	25
1.4.2. микроРНК	27
1.5. Изучение роли микроРНК в работе центральной нервной системы	33

1.5.1 Роль микроРНК в развитии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой.....	35
1.6. Заключение	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1. Материалы	40
2.1.1. Коммерческие наборы	40
2.1.2. Питательные среды и сыворотки	41
2.1.3. Растворы и буферы	41
2.1.4. Ферменты	43
2.1.5. Эндонуклеазы рестрикции	43
2.1.6. Праймеры	43
2.1.7 Модельные системы, используемые в работе.....	45
2.1.7.1. Клеточные линии	45
2.1.7.2. Мышиная модель FXTAS.....	46
2.2. Методы исследования.....	47
2.2.1. Культивирование перевиваемых клеточных линий В-лимфоцитов.....	47
2.2.2. Культивирование клеточной линии НЕК293	48
2.2.3. Содержание и скрещивание лабораторных мышей	48
2.2.4. Выделение ДНК из биологических образцов	49
2.2.5. ПЦР для GC-обогащенных последовательностей ДНК.....	49
2.2.6. Анализ метилирования промоторной области гена <i>FMRI</i>	50
2.2.7. Выделение РНК из биологического материала	50
2.2.8. Реакция обратной транскрипции для анализа экспрессии мРНК гена <i>FMRI</i>	52
2.2.9. Анализ экспрессии мРНК гена <i>FMRI</i>	52
2.2.10. Реакция обратной транскрипции для анализа экспрессии микроРНК.....	54
2.2.11. ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan системы детекции сигнала.....	55
2.2.12. Анализ уровня белка FMRP	56
2.2.13. Сборка генетических конструкций	58
2.2.14. Нарботка плазмидных конструкций в прокариотической системе	61
2.2.15. Секвенирование фрагментов ДНК по Сэнгеру	62
2.2.16. Анализ флуоресценции белков eGFP и FusionRed	62

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	65
3.1. Выбор микроРНК, потенциально взаимодействующих с мРНК гена <i>FMR1</i>	66
3.2. Исследование активности гена <i>FMR1</i> в клеточных культурах В-лимфоцитов	69
3.3. Экспрессия микроРНК в группах клеточных линий В-лимфоцитов	77
3.4. Анализ взаимодействия микроРНК с 3'-НТО мРНК гена <i>FMR1</i>	81
3.5. Исследование активности гена <i>fmr1</i> в образцах головного мозга модельных мышей FXTAS	90
3.6. Анализ экспрессии микроРНК в образцах головного мозга модельных мышей FXTAS	96
Заключение	107
Выводы	110
Список литературы	111
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Список научных мероприятий, на которых были представлены результаты диссертационной работы.....	136
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Список публикаций в рецензируемых научных журналах по теме диссертации.....	137
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Праймеры, используемые при исследовании экспрессии микроРНК.....	138
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Спектр поглощения/излучения FusionRed и eGFP при анализе взаимодействия микроРНК с 3'-НТО мРНК гена <i>FMR1</i> .	140
Благодарности.....	141

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДТТ – дитиотреитол;

е. а. – единиц активности;

кДНК – комплементарная ДНК;

миРНК – малые интерферирующие РНК;

мРНК – матричная РНК;

мякРНК – малые ядрышковые РНК;

мяРНК – малые ядерные РНК;

ОТ – обратная транскрипция;

Отн. – относительный;

п. н. – пар нуклеотидов;

пиРНК – РНК, взаимодействующие с РІWІ белками;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

рРНК – рибосомные РНК;

тРНК – транспортные РНК;

ур. – уровень;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

Ago – семейство белков аргонавтов;

СрG-островок – участок ДНК, обогащенный последовательно связанным дезоксицитидинмонофосфатом и дезоксигуанозинмонофосфатом;

crasiRNA – короткие РНК, связанные с цетромерными повторами;

dTMP – дезокситимидинмонофосфат;

dUMP – дезоксиуридинмонофосфат;

d6RG – 6-карбоксихлородамин;

FAM – флуоресцентная метка карбоксифлуоресцеин;

FUdR – 5-фтордезоксиуридин;

FXPOI – fragile X-associated primary ovarian insufficiency / синдром первичной овариальной недостаточности, ассоциированной с ломкой X-хромосомой;

FXS – fragile X syndrome / синдром ломкой X-хромосомы;

FXTAS – fragile X-associated tremor and ataxia syndrome / синдром атаксии и тремора, ассоциированный с ломкой X-хромосомой;

PROMPTs – средние РНК, транскрибируемые выше промотора;

RISC – RNA-induced silencing complex / РНК-индуцируемый комплекс подавления активности генов;

RTQ-1 – Real-time quenchers 1 / гаситель флуоресценции 1;

rtTA – reverse tetracycline-controlled transactivator / белок активатор системы Tet-On;

SCA – spinocerebellar ataxia / спиноцеребеллярная атаксия;

SDS – sodium dodecyl sulfate / додецилсульфат натрия;

tel-sRNA – короткие РНК, связанные с теломерным гетерохроматином;

tiRNA – малые РНК, образованные из тРНК;

3’-/5’-НТО – 3’-/5’- нетранслируемая область.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы 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 *FMRI*, продуктом которого является белок FMRP (Richter J.D., Zhao X., 2021). В случае гена *FMRI*, 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 *FMRI* (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). Экспансия CGG повтора свыше 200 единиц приводит к полной мутации гена *FMRI*, что характеризуется полным метилированием промоторной области и гетерохроматинизацией этого участка ДНК, а также отсутствием мРНК и белка FMRP. У носителей такого варианта гена развивается синдром ломкой X-хромосомы (FXS). Частота встречаемости полной мутации гена *FMRI* 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 *FMRI* (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 *FMRI* 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 *FMRI* и в развитии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой на различных моделях: клеточных линиях В-лимфоцитов, которые получены от пациентов с разными вариантами гена *FMRI*, а также мышей моделей FXTAS. 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 FXTAS. Использование этих двух модельных систем позволит получить комплексное представление об участии микроРНК в регуляции активности гена *FMRI* в организме человека.

Цели и задачи работы

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 причины экспансии CGG повторов, а также механизмы развития проявлений этих заболеваний остаются неизвестными. 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). 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

FMRI. 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 *FMRI*.

2. Для экспериментальной оценки взаимодействия микроРНК с 3'-областью мРНК гена *FMRI* 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 *FMRI*;

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

Теоретическая и практическая значимость работы

Данная работа посвящена изучению роли некодирующих РНК в развитии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Главной особенностью премутации гена *FMRI* является то, что только у части его носителей развиваются заболевания FXTAS и FXPOI. Эти проявления напрямую не коррелируют с размером CGG повтора. Поэтому предполагают участие других факторов влияющих на проявление симптомов FXTAS и FXPOI, таких как микроРНК. Данные, полученные при выполнении диссертационной работы, вносят существенный вклад в исследование механизмов регуляции активности гена *FMRI*.

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 *FMRI* 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 делать 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 *FMRI*. 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 FXTAS 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.

Методология и методы исследования

Для достижения поставленных целей и задач были использованы общенаучные и специальные методы исследования. Эксперименты были осуществлены при помощи методов молекулярной биологии и генетической инженерии.

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 апробация 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 международных научных конференциях (Приложение 1).

Список публикаций по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 5 научных публикаций в журналах из перечня ВАК. Также результаты представлены на 6 отечественных и зарубежных конференциях (Приложение 2).

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 страницах, включает 11 рисунков, 7 таблиц, 4 приложения. Список литературы включает 233 источников.

Личный 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Этапы изучения заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой

История изучения заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, насчитывает более 70 лет исследований, однако поиск молекулярных механизмов развития патологий до сих пор продолжается. На первом этапе развития этой области науки происходило накопление знаний о том, как передается заболевание в ряду поколений, путем изучения родословных семей, в которых были обнаружены случаи проявления умственной отсталости (Haldane J., 1938; Johnson G.E., 1895). В процессе переписи населения 1897 года в США было отмечено, что умственная отсталость встречается на 24% чаще среди мужчин по сравнению с женщинами (Johnson G.E., 1895). Данное обстоятельство послужило толчком к поиску причины этого явления. Основываясь на этом факте, в 1969 году было предположено, что X-сцепленные гены отвечают за повышенную частоту умственной отсталости среди мужчин (Lehrke R.G., 1974). В таких исследованиях применялся стандартный подход классической генетики – генеалогический метод, который является фундаментальным при изучении наследственности пациентов (Holmgren G. et al., 1988). Основываясь на этом методе, была написана научная работа, которая считается началом исследования фраксопатий (Martin J.P., Bell J., 1943). Джеймс Мартин и Джулия Белл описали родословную семьи в шести поколениях, где дети, родившиеся от здоровых матерей, демонстрировали тяжелую умственную отсталость, наблюдаемую с раннего детства. Наряду с этими случаями, в этом генеалогическом древе была описана клиническая картина проявлений патологий у двух женщин с менее выраженными психическими отклонениями. С использованием филогенетического анализа родословной данной семьи был сделан вывод, что заболевание сцеплено с X-хромосомой (Martin J.P., Bell J., 1943).

Стоит отметить, что в исследовании, проведенном Джеймсом Мартином и Джулией Белл, не приведена информация о молекулярных причинах этого заболевания и маркерах, которые позволили бы проводить диагностику данной

патологии. Поэтому для их поиска, следующим шагом развития исследований заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, стало применение стандартных цитологических подходов. Таким методом является кариотипирование, которое дает возможность установить структурные особенности каждой хромосомы в отдельной клетке и выявить их патологические изменения при генетических заболеваниях с использованием стандартных процедур фиксации и окрашивания клеточных культур и дальнейшей визуализации метафазных пластин с помощью светового микроскопа (Gartler S.M., 2006). В 1969 году была опубликована статья, использующая данный подход, в которой была описана нестандартная или “маркерная” хромосома (Lubs H.A., 1969). В данной статье описаны результаты анализа кариотипов членов семьи, в которой умственная отсталость проявлялась в трех поколениях. Было показано, что у пациентов с умственной отсталостью присутствовала маркерная X-хромосома с аномальной вторичной перетяжкой на конце длинного q-плеча (Lubs H.A., 1969). К концу 1970 года такая маркерная хромосома была признана важным диагностическим критерием при анализе причин умственной отсталости, однако она возникает не во всех метафазных пластинах при обычном кариотипическом анализе образцов крови пациентов (Bobokova T.S. et al., 2017). В попытке оптимизации и создания воспроизводимого метода диагностики, в 1977 году было показано, что в среде для культивирования клеток, используемых для цитогенетического анализа, должен присутствовать дефицит фолиевой кислоты и тимидина, что индуцирует появление вторичной перетяжки, в последствии названной ломким сайтом на X-хромосоме (Sutherland G.R., 1977). При дальнейших исследованиях механизма возникновения такой структуры было установлено, что наблюдаемая перетяжка в области Xq28 образуется при добавлении 5-фтордезоксипуридина (FUdR), сильного ингибитора фермента тимидилатсинтетазы, катализирующего процесс превращения dUMP в dTMP (Carreras C.W., Santi D. V., 1995). Установлено, что образование этого аномального сайта индуцируется уменьшением концентрации dTMP, доступного для синтеза ДНК (Glover T.W., 1981). Как только были описаны первые методы диагностики и обнаружения

ломкого сайта методами кариотипирования с использованием FUDR, произошло накопление знаний о распространенности умственной отсталости, ассоциированной с ломкой X-хромосомой, а также ее внешних проявлениях у носителей (Loehr J.P. et al., 1986; Opitz J.M. et al., 1984; Turner G., Daniel A., Frost M., 1980). Стоит отметить, что в течение долгого времени основные исследования были посвящены только FXS, поскольку ломкий сайт был характерен только для этого синдрома. Период исследования FXTAS и FXPOI наступил позже, так как они не обладают выраженными особенностями строения X-хромосомы на метафазных пластинах, полученных из образцов крови пациентов с данными синдромами (Hagerman R.J., Hagerman P., 2016; Hipp H.S. et al., 2016; Suthers G.K. et al., 1989).

Следующим этапом изучения FXS стало определение его молекулярных особенностей развития и поиска уже не цитогенетического маркера этого заболевания, который представляет собой более детерминированный ломкий сайт на X-хромосоме. Исследования были направлены на поиск гена, отвечающего за это заболевание, а также изучение корреляций его активности и проявлений патологий. В 1991 году были получены первые убедительные доказательства того, что ген *FMR1* связан с ломким сайтом на X-хромосоме и с умственной отсталостью (Bell M.V. et al., 1991; Vincent A. et al., 1991). Для подтверждения этого факта, был выполнен эксперимент, в котором участок геномной ДНК размером 475000 п. н., соответствующий ломкому сайту и связанный с FXS, был выделен и наработан в бактериальной системе (Verkerk A. et al., 1991). С использованием такого подхода стало возможно провести рестрикционный анализ, который показал молекулярные особенности строения исследуемой последовательности ДНК. Было установлено, что CpG-островок рядом с первым экзоном гена *FMR1* является тем местом, где образуется перетяжка на X-хромосоме (Heitz D. et al., 1991; Verkerk A. et al., 1991). Также было показано, что в данной области ДНК наблюдается увеличение количества CGG триплетов – процесс, известный под общим термином – экспансия CGG повтора (Verkerk A. et al., 1991). Следующим шагом было определено, как активность гена *FMR1* связана с проявлением FXS (Pieretti M. et al., 1991). Впервые

было проведено исследование экспрессии мРНК гена *FMR1*, полученной из постоянной клеточной линии лимфоцитов, трансформированных вирусом Эпштейн-Барр. Используя подход, основанный на ПЦР, было установлено, что у носителей FXS отсутствует мРНК гена *FMR1* (Sutcliffe J.S. et al., 1992). Следующей стадией изучения заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, стало установление молекулярных механизмов патологии FXS. А именно то, как связано отсутствие экспрессии гена *FMR1* с фенотипическими проявлениями заболевания. В это время был открыт продукт гена – белок FMRP, и проведены первые работы по изучению его свойств (Siomi H. et al., 1994). Такие работы стали возможными, когда были использованы новые для этой области методы биотехнологии, такие как клонирование амплифицированного гена *FMR1* и его интеграция в прокариотическую систему, с помощью чего стало возможно наработать интересующий белок и изучить его свойства (Siomi H. et al., 1993). Это привело к переходу на новую стадию развития данной области знаний, в котором происходит накопление информации о механизмах развития этого заболевания. Современные представления о патогенезе фраксопатий будут рассмотрены в следующих главах.

Необходимо также упомянуть периоды начала накопления знаний о FXPOI и FXTAS. Из-за сложности в диагностике данных синдромов, которая связана с изменением экспрессии мРНК гена *FMR1* и другими молекулярными механизмами, выделение их в отдельные нозологические единицы начинается существенно позже начала исследований FXS. Ранняя менопауза у носительниц премутантного аллеля гена *FMR1* без когнитивных патологий была впервые описана в 1991 году (Cronister A. et al., 1991), а эта взаимосвязь подтверждена уже в 1994 году (Schwartz C.E. et al., 1994). Данная патология названа первичной овариальной недостаточностью, ассоциированной с ломкой X-хромосомой (FXPOI). Исследование синдрома тремора и атаксии, ассоциированного с ломкой X-хромосомой (FXTAS), началось с 1990 года. Этому способствовала научная работа, в которой сообщалось о повышенной частоте тремора у взрослого поколения в семьях, где дети обладали выраженными проявлениями FXS (Hagerman R.J. et al., 2001). Подробно проявления заболеваний, ассоциированных с X-хромосомой и современные

представления о механизмах их патогенеза рассмотрены в следующих главах литературного обзора.

1.2. Клинические проявления заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой

1.2.1. Синдром ломкой X-хромосомы (FXS)

FXS (OMIM: 300624, МКБ-10: Q99.2) связан с полной мутацией гена *FMR1*, которая характеризуется экспансией CGG повтора больше 200 триплетов, полным метилированием промоторной области гена и отсутствием его продукта – белка FMRP (Hagerman R.J. et al., 2017). В связи с тем, что этот белок участвует в регуляции трансляции множества других генов, изменение его экспрессии приводит к нарушению регуляции сотен белков, которые связаны с двумя главными характеристиками нейронов: синаптической пластичностью и коннективностью, что приводит к умственной отсталости пациентов и другим фенотипическим проявлениям синдрома (Clifton N.E. et al., 2020; Park E. et al., 2021). Синаптическая пластичность является фундаментальной характеристикой мозга, которая представляет собой способность изменяться в активности и эффективности сигналов при синаптической передаче в зрелых нейронах в ответ на внешние раздражители (Magee J.C., Grienberger C., 2020). Под синаптической коннективностью понимают морфологические структурные особенности нейронов, а именно: количество рецепторов нейромедиаторов, особенности морфологии дендритных шипиков и т.д. (Chia Z., Augustine G.J., Silberberg G., 2020).

FXS является одним из самых распространенных случаев наследственной умственной отсталости и расстройств аутистического спектра. По одним оценкам, распространенность данного заболевания варьируется от 1/3717 до 1/8918 случаев проявления заболевания среди лиц мужского пола в популяции европейского происхождения (Tejada M.I., Ibarluzea N., 2020). Оценка распространенности заболевания варьируется из-за различных практик тестирования, которые использовались на протяжении всей истории исследования болезни, таких как

цитогенетическое тестирование, либо использование методов на основе ПЦР или саузерн-блоттинга. Кроме того, на оценку общей распространенности в мире влияют ее различия у разных групп населения на определенных территориях (Hagerman P.J., 2008; Hunter J. et al., 2014). Метаанализ 54 эпидемиологических исследований, учитывающих локальные изменения частоты встречаемости и метод диагностики, показал среднюю распространенность полной мутации гена *FMR1* как 1 случай на 7143 мужчин и 1 случай на 11111 женщин. Также, согласно данному метаанализу, была установлена предполагаемая частота премутантного аллеля как 1 на 150-300 женщин и 1 на 450-850 мужчин (Hunter J. et al., 2014; Rajaratnam A. et al., 2017).

Часть признаков FXS, такие как гиперактивность, тревожность и социальная замкнутость могут быть характерны для множества других синдромов, что осложняет определение общей картины заболевания (Kaufmann W.E. et al., 2017). Стоит также отметить, что пренатальная и неонатальная диагностика становится невозможной, если не существует данных о случаях проявления этой патологии в семье ранее, так как у новорожденных детей и при ультразвуковом исследовании плода нет выраженных проявлений клинической картины синдрома. При рождении рост, вес и окружность головы у детей с FXS соответствуют нормальным распределениям признаков (Lachiewicz A.M., Dawson D. V, Spiridigliozzi G.A., 2000; Riley C., Wheeler A., 2017). Особенности черт лица возникают не в младенчестве, поэтому примерно у 30% детей раннего возраста с FXS не будет явных фенотипических проявлений. Они начинают проявляться в молодом возрасте до пубертатного периода. Большинство особенностей фенотипа полностью проявляются после полового созревания (Heulens I. et al., 2013). У носителей полной мутации гена *FMR1* наряду с заболеваниями аутистического спектра наблюдается умственная отсталость у 60% мужчин и 20% женщин (Bailey D.V. et al., 2008). К проявлениям этого заболевания также относят характерные фенотипические признаки, такие как удлиненные черты лица с широким лбом и оттопыренными ушами. У пациентов также может присутствовать выступающая челюсть, высокое арочное нёбо, отечность вокруг глаз, длинные глазные щели с

близко расположенными глазами, увеличенные складки верхнего века у внутреннего угла глаза, косоглазие, плоская переносица, широкий нос, широкий продольный желоб между верхней губой и носом и аномальная расслабленность нижней челюсти (Crawford H. et al., 2020; Hersh J.H., Saul R.A., 2011; Heulens I. et al., 2013; Lachiewicz A.M., Dawson D. V, Spiridigliozzi G.A., 2000). Характерные черты лица имеют различия, обусловленные возрастом и этнической принадлежностью. Также во время полового созревания у пациентов мужского пола проявляется макроорхидизм (Lubala T.K. et al., 2018). В дополнение к стандартным проявлениям, у пациентов наблюдается изменение соединительной ткани, которая проявляется в фенотипе как плоскостопие, чрезмерная растяжимость суставов и возможный сколиоз. Также изменение соединительной ткани может привести к пролапсу митрального клапана. Такие проявления связывают с тем, что помимо роли FMRP в регуляции развития и правильного функционирования нейронов, этот белок связан с регуляцией синтеза основных компонентов внеклеточного матрикса, включая эластин (Ramírez-Cheyne J.A. et al., 2019).

1.2.2. Первичная овариальная недостаточность, ассоциированная с ломкой X-хромосомой (FXPOI)

Распространенность первичной овариальной недостаточности в популяции составляет 1-1,9% среди женщин в возрасте около 40 лет и 0,1% среди женщин в возрасте 30 лет (Lagergren K. et al., 2018). Эта патология представляет собой многофакторное заболевание, которое в большинстве случаев является идиопатическим, то есть с неустановленной этиологией. Однако одной из самых распространенных причин из выявленных, является премутация гена *FMR1* (Maclaran K., Panay N., 2015; Rossetti R. et al., 2017). Среди носительниц премутантного аллеля FXPOI (OMIM: 311360, МКБ-10: Q99.2) встречается в 10-20% случаев с развитием первичной дисфункции яичников в возрасте до 40 лет и отсутствием или нерегулярностью овариальных циклов до этого момента (Rodriguez-Revenga L. et al., 2009; Sullivan A.K. et al., 2005). Попытки найти факторы, влияющие на возникновение данного синдрома у носительниц

премутантного аллеля, в основном сосредоточены на поиске корреляций проявлений симптомов и размера CGG повтора. Однако в ряде исследований представлены аналогичные результаты нелинейности связи между количеством повторенных единиц CGG и возникновением FXPOI. Показано, что носительницы премутантного аллеля размером 80-100 повторенных единиц наиболее подвержены риску развития данного заболевания (Ennis S., Ward D., Murray A., 2006; Hipp H.S. et al., 2016; Sullivan A.K. et al., 2005). Другие факторы, такие как родители-носители премутации и инактивация X-хромосомы, не оказывают существенного влияния на риск проявления FXPOI (Murray A. et al., 2000; Sullivan A.K. et al., 2005).

1.2.3. Синдром атаксии и тремора, ассоциированный с ломкой X-хромосомой (FXTAS)

FXTAS (OMIM: 300623, МКБ-10: G11.2) является заболеванием, которое возникает в позднем возрасте у носителей премутации гена *FMRI*. На сегодняшний день не существует полных данных о распространении этого заболевания в популяции. Одно из крупнейших исследований этого расстройства включало в себя 55 мужчин с выявленным проявлением FXTAS, поскольку они были родственниками людей с проявлениями FXS (Leehey M.A. et al., 2007). Женщины не были включены в выборку, поскольку на момент проведения этой работы в 2007 году слишком малому числу женщин был поставлен такой диагноз. Показано, что средний возраст начала атаксии составил $60,6 \pm 8,6$ лет, а тремор возникал в среднем за 2 года до ее начала (Leehey M.A. et al., 2007). Дальнейшие исследования случаев FXTAS помогли установить особенности развития этого заболевания (Fraint A. et al., 2014; Hagerman R.J., Hagerman P., 2016). Так, его основными проявлениями являются: интенционный тремор, что представляет собой нарушение мелкой моторики конечностей при целенаправленном движении, мозжечковая атаксия, которая выражается в нарушении координации движений, а также снижение когнитивных способностей (Goncalves M.R.R. et al., 2007; Sevin M. et al., 2009; Tassone F. et al., 2012). До развития основных проявлений заболевания, у пациентов может наблюдаться невропатия, вестибулярная дисфункция, которая проявляется в виде частых эпизодов головокружения (Juncos J.L. et al., 2011). Также

у пациентов проявляется нарушение слуха и шум в ушах без внешнего акустического стимула, а также может возникать дефицит обоняния (Juncos J.L. et al., 2012; Schneider A. et al., 2012).

1.2.4. Нейропсихиатрические расстройства, ассоциированные с ломкой X-хромосомой

На сегодняшний день в отдельные нозологические единицы выделены только два фраксопатических расстройства: FXTAS и FXPOI. Помимо этих двух патологий, у носителей премутации гена *FMRI* может наблюдаться депрессия, они подвержены риску нарушения сна, развитию хронической боли, заболеваний щитовидной железы, гипертонии, эпилептических припадков, фибромиалгии, мышечных болей и мигрени (Coffey S.M. et al., 2008; Lozano R. et al., 2016; Rodriguez-Revenga L. et al., 2009; Winarni T.I. et al., 2012). Тревожность является распространенной проблемой, с которой сталкиваются носители премутации гена *FMRI* начиная с детства. Так, при анализе 35 носителей премутантного аллеля, обнаружили, что около 70% пациентов соответствовало критериям тревожных расстройств в сравнении с 22,6% из контрольной группы (Cordeiro L. et al., 2015). Среди них, наиболее встречаемым типом, было генерализованное тревожное расстройство, специфические фобии и обсессивно-компульсивное расстройство (Schneider A. et al., 2016). Установлено, что апноэ (нарушение легочной вентиляции) во сне у носителей премутации гена *FMRI* наблюдается в 3,4 раза чаще относительно контрольной группы (Hamlin A. et al., 2011). Данное заболевание приводит к хронической усталости, а также к хронической гипоксемии и увеличивает риск гипертонии, что ускоряет развитие FXTAS (Kim H. et al., 2013). Все эти симптомы часть исследователей выделяет как невропсихиатрические расстройства, ассоциированные с ломкой X-хромосомой.

1.3. Современное представление о механизмах патогенеза заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой

В геноме человека представлено большое разнообразие повторенных последовательностей, которые встречаются по всему геному и различаются

количеством повторенных единиц и нуклеотидной последовательностью. Генетическая нестабильность три-, тетра-, пента-, гекса- и додекануклеотидных повторов, локализованных в различных генах человека, является причиной развития 36 неврологических заболеваний (Grishchenko I. V, Purvinsh Y. V, Yudkin D. V, 2020). Экспансия повторов может происходить в различных областях генов – в 5'- и 3'-НТО, а также в кодирующей области генов, что ведет к отличающейся картине развития соответствующих заболеваний. Например, в случае экспансии нуклеотидов в белок-кодирующей последовательности, могут развиваться такие заболевания как болезнь Гентингтона, где проявления заболеваний напрямую зависят от размера повторенного тракта (Tabrizi S.J. et al., 2020). Для заболеваний, вызванных экспансией в некодирующей области 3'- / 5'-НТО генов, такой выраженной корреляции с проявлениями заболеваний нет.

На сегодняшний день существует ряд гипотез о причинах непосредственно экспансии повторов, которая связана с нарушениями в процессах репарации, репликации, транскрипции и рекомбинации ДНК (Grishchenko I. V, Purvinsh Y. V, Yudkin D. V, 2020). Однако, развитие заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, связано с другими механизмами – влиянием мРНК с увеличенным CGG повтором, а также механизмами регуляции активности генов, включающих участие микроРНК.

В случае FXS развитие заболевания связано с процессами метилирования промоторной области, что приводит к гетерохроматинизации хромосомного локуса, в котором расположен ген *FMRI*, и, как следствие, отсутствию белка FMRP (Hagerman R.J. et al., 2017). В основном он является негативным регулятором синтеза белков в ответ на активацию метаботропного рецептора первого типа (mGluR). Таким образом, развитие FXS, по крайней мере частично, является результатом повышенного ответа на стимуляцию этого рецептора. В частности, отсутствие белка FMRP ведет к повышенной продукции рецептора AMPA в ответ на сигналы от рецептора mGluR, что влияет на синаптическую активность и проявления патологии (Pick J.E., Ziff E.B., 2018).

Для заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, существуют три гипотезы развития. Первая из них связана с доминантно-негативной мутацией мРНК гена *FMRI*. Конкретно с тем, что увеличенный CGG повтор в 3'-области мРНК может связываться с определенными белками, что приводит к образованию внутриклеточных включений и изменению клеточных процессов (Xu K. et al., 2021). Эти структуры содержат такие белки как KHDRBS1 (белок 1 типа, связанный с передачей сигналов и связывающий РНК и содержащий KH домен, ранее известный как Sam68) и DGCR8 (субъединица комплекса процессинга микроРНК), которые участвуют в этапах сплайсинга и транспорте мРНК, а также участвуют в созревании ряда микроРНК (Sellier C. et al., 2013). Также эти включения содержат такие белки как SUMO2 (small ubiquitin like modifier 2, малый модификатор, подобный белку убиквитину), SQSTM1 (sequestosome 1, секвестосома 1, ранее известный как убиквитин, связывающий белок p62), MLL2 (myeloid leukemia factor 2, фактор миелоидного лейкоза 2), MBP (myelin basic protein, основной белок миелина) и убиквитин. Предполагают, что такие клеточные включения могут формироваться в ответ на оксидативный стресс и могут нарушить клеточные механизмы системы репарации ДНК и механизмы направленного разрушения белков, что как раз может привести к токсическому влиянию на клетку и развитию нарушений нейронов у пациентов. Однако конкретные механизмы, которые приводят к появлению внутриклеточных включений, остаются малоизученными.

Вторым предполагаемым механизмом развития заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, является процесс AUG-независимой трансляции. Такой процесс часто встречается при развитии многих заболеваний, связанных с экспансией микросателлитных повторов. Этот механизм, как и при стандартной инициации трансляции, требует Кэп-структуры в 5'-НТО мРНК, белка eIF4A (эукариотический фактор инициации 4A) и процесса сканирования, в котором участвует 40S субъединица рибосомы. Установлено, что эффективность процесса AUG-независимой трансляции, связанной с CGG повтором, составляет 30-40% от эффективности стандартного механизма инициации трансляции. Как

показано в модельных системах, этот механизм строго связан с размером CGG повтора. В случае мРНК гена *FMRI* с увеличенным CGG трактом, помимо трансляции белка FMRP, инициация синтеза которого начинается с триплета AUG, синтезируются дополнительные продукты, матрицей которых является непосредственно повтор (Sellier C. et al., 2017). Теоретически, из-за того, что этот механизм не требует AUG триплета, могут нарабатываться три различных белка, возникающих при смещении рамки трансляции на один нуклеотид. Однако экспериментальные данные показывают, что экспрессируется в основном белок FMRpolyG, обогащенный глутамином (Sellier C. et al., 2017). Этот белок также встречается во внутриклеточных включениях. Предполагают, что этот белок, присутствующий в тельцах включения в цитозоле, далее может транспортироваться в ядро, где он приводит к разрушению белка ядерной ламины LAP2 β (lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta / полипептид 2 изоформы β , ассоциированный с ламиной), что ведет к цитотоксичности. Также показано, что повышение экспрессии LAP2 β белка приводит к снижению цитотоксичности белка FMRpolyG (Sellier C. et al., 2017). Эти данные были получены с использованием мышинных модельных линий. Дальнейшее изучение этого вопроса как на мышинной модели FXTAS, так и с использованием других модельных объектов, также показали наличие этого белка и его цитотоксичность (Hoen G. et al., 2019; Oh S.Y. et al., 2015). Однако, синтезируется ли этот белок непосредственно в тканях мозга человека и является ли этот механизм главным в патогенезе заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, остается неясным. Масс-спектрометрический анализ образцов тканей мозга человека действительно показал наличие этого белка, однако было также показано что он нарабатывается в низкой концентрации и не встречается во внутриклеточных включениях у пациентов с FXTAS, что не согласуется с данными, полученными на модельных объектах (Ma L. et al., 2019).

В процессе транскрипции 5'-НТО мРНК гена *FMRI*, которая содержит CGG повтор, может комплементарно связываться со своей кодирующей цепью ДНК, в свою очередь содержащей GCC повтор (Loomis E.W. et al., 2014). В этом случае

образуется дуплекс РНК:ДНК, который обозначается как R-петля. Установлено, что его месторасположение связано с накоплением эпигенетической метки повреждения ДНК γ H2AX, которая является одним из вариантов гистона H2A. В связи с этим предполагают, что образование такой структуры может приводить к повреждениям ДНК и быть связано с экспансией CGG повтора через механизм репарации ДНК (McIvor E.I., Polak U., Napierala M., 2010).

Предполагают, что с развитием заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, также связаны некодирующие РНК, такие как микроРНК и длинные некодирующие РНК. Их классификация, механизм действия и современное представление об их влиянии на патогенез детально рассмотрены в следующих главах.

1.4. Некодирующие РНК: особенности строения и функции

1.4.1. Общее представление

В ходе эволюции происходит усложнение систем регуляции клеточных процессов и увеличение роли РНК в них. Так, геном прокариот на 80-90% кодирует белки и большинство их систем регуляции основано на пептидах, тогда как у эукариот повышается роль некодирующих РНК в регуляции активности генов. (Frith M.C., Pheasant M., Mattick J.S., 2005). Установлено, что с повышением разнообразия систем регуляции, увеличивается количество некодирующих межгенных и интронных последовательностей, большая часть которых может транскрибироваться и обладать определенными функциями (Mattick J.S., 2001; Mattick J.S., Makunin I. V, 2006). Такие молекулы не несут информации о первичной последовательности пептидов и обозначаются как некодирующие РНК. Это большая группа молекул с различной структурой, для которых показано участие во множестве клеточных процессах.

Некодирующие РНК, встречающиеся в организмах, можно разделить на два больших класса: структурные некодирующие РНК и регуляторные некодирующие РНК (Рисунок 1) (Dahariya S. et al., 2019).

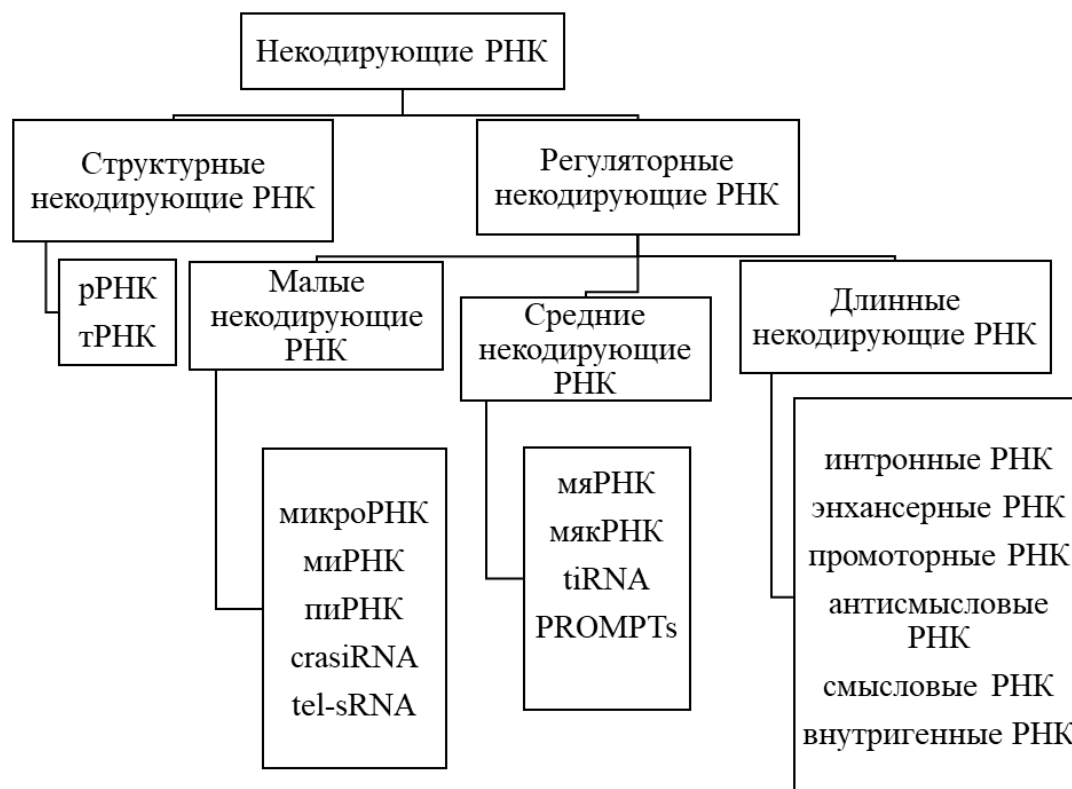


Рисунок 1. Систематика некодирующих РНК (Dahariya S. et al., 2019).

В класс структурных некодирующих РНК входят рРНК и тРНК. Регуляторные некодирующие РНК разделяются на три группы: малые, средние и длинные некодирующие РНК. В класс малых регуляторных некодирующих РНК размером от 20 до 50 пар нуклеотидов входят микроРНК, миРНК, пиРНК, crasiRNA и tel-sRNA (Wright M.W., Bruford E.A., 2011). В группу регуляторных некодирующих средних РНК размером от 50 до 200 пар нуклеотидов входят мяРНК, мякРНК, tiRNA, а также PROMPTs. Некодирующие РНК размером больше 200 пар нуклеотидов считаются длинными транскриптами. Все они могут быть разделены на разные группы в зависимости от их биогенеза на шесть категорий: интронные РНК, энхансерные РНК, промоторные РНК, антисмысловые РНК, смысловые РНК, внутригенные РНК (Gullerova M., 2015; Ma L., Bajic V.B., Zhang Z., 2013).

1.4.2. микроРНК

микроРНК представляют собой РНК размером 20-24 нуклеотида, которые участвуют в процессах регуляции активности экспрессии генов (Bartel D.P., 2018; Valencia-Sanchez M.A. et al., 2006). Эти молекулы эволюционно консервативны, и каждая микроРНК потенциально может связываться со множеством генов-мишеней, поэтому они являются важным звеном в регуляции клеточных процессов. Нарушение их экспрессии может привести ко множеству заболеваний, таких как рак, иммунные патологии, а также к нарушениям, связанным с развитием нейронов (Ali Syeda Z. et al., 2020; Ishikawa M. et al., 2020; Sun J. et al., 2018). Кодированная нуклеотидная последовательность для этих молекул может располагаться в некодирующих областях белок-кодирующих пре-мРНК, либо находиться в структуре длинных некодирующих РНК (Kim Y.-K., Kim V.N., 2007; Rodriguez A. et al., 2004). Также микроРНК могут транскрибироваться как независимые гены. В этом случае, транскрипция большинства таких микроРНК, как и в случае белок-кодирующих мРНК, выполняется с помощью РНК-полимеразы II типа (Lee Y. et al., 2004). В этом процессе образуется одноцепочечная пре-микроРНК, размер которой составляет более 70 пар нуклеотидов и зависит от конкретного гена микроРНК (Bartel D.P., 2018; Lee Y., 2002). В ней образуется шпилька из комплементарной последовательности РНК (Rodriguez A. et al., 2004).

Следующие этапы биогенеза микроРНК (Рисунок 2) не зависят от первичного расположения кодирующей последовательности пре-микроРНК и связаны с распознаванием шпильки на одноцепочечной РНК определенными ферментами. На этом этапе, осуществляется гидролиз двумя эндонуклеазами DROSHA и DICER из класса РНКаз III типа. Эти реакции происходят последовательно в ядре и цитоплазме. При этом, реакция, которая происходит в ядре катализируется комплексом белков, в который входит эндонуклеаза DROSHA и белок DGCR8, который связывает двуцепочечную РНК и ряд других структурных белков (Han J., 2004; Nguyen T.A. et al., 2015). В результате образуется пре-микроРНК размером около 70 пар оснований с характерной структурой петли, состоящей из

комплементарных нуклеотидов. Однако процессинг ряда пре-микроРНК проходит без участия белка DICER. Такие пути являются неканоническими и характерны для особого типа микроРНК, биогенез которых начинается с области интрона участка РНК определенных генов (Ruby J.G., Jan C.H., Bartel D.P., 2007; Wen J. et al., 2015).

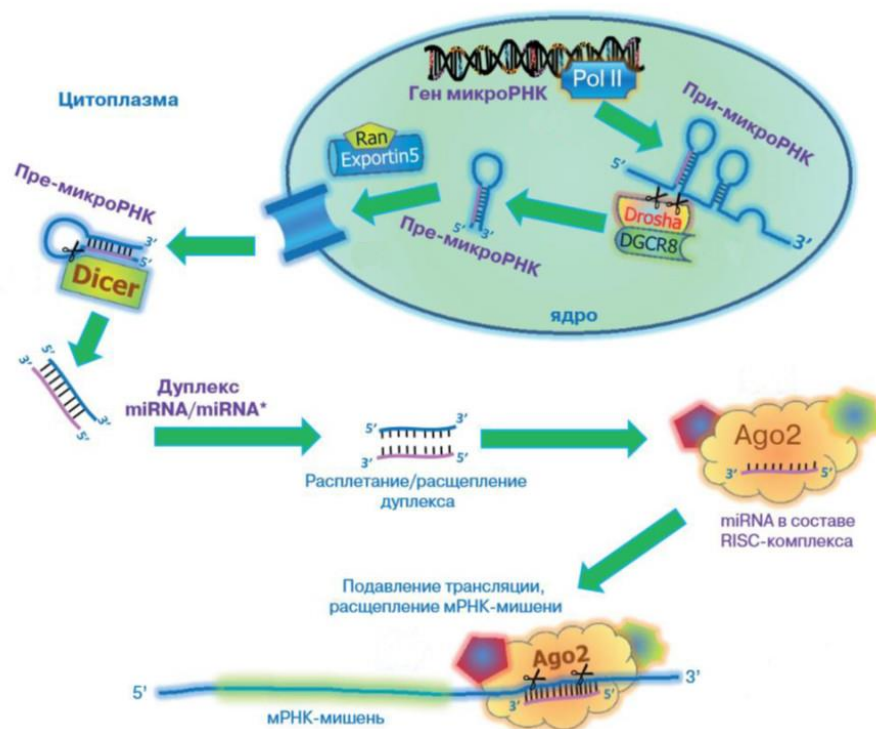


Рисунок 2. Этапы биогенеза микроРНК (Аушев В.Н., 2015). Подробное описание процесса представлено в тексте.

Далее эта молекула экспортируется в цитоплазму с помощью рецептора Exportin-5 и белка RAN (GTP-binding nuclear protein Ran / ГТФ-связывающий ядерный белок), обладающего ГТФ-азной активностью, используя ядерный поровый комплекс (Kim V.N., 2004). В цитоплазме происходит расщепление пре-микроРНК с помощью белка DICER в комплексе с другими белками.

В результате образуется последовательность из двух комплементарных друг другу РНК, одна из которых обозначается “лидирующей”, то есть функциональная микроРНК, другая “пассажирской” (Bartel D.P., 2018; Hutvagner G. et al., 2001). Такой дуплекс связывается с белком Ago2, входящим в семейство аргонавтов, с образованием рибонуклеопротеинового комплекса RISC. Взаимодействии такой РНК и белка семейства аргонавта происходит засчёт белков-шаперонов

(HSC70/HSP90), которые используют энергию АТФ, чтобы помочь Ago2 белку сформировать открытую конформацию, подходящую для связывания с дуплексом (Iwasaki S. et al., 2010). После взаимодействия двух последовательностей микроРНК с белком, происходит обратное изменение его конформации, что, как полагают, способствует вытеснению одной из цепей микроРНК с образованием зрелого комплекса (Kawamata T., Tomari Y., 2010). В этом процессе связывания остается единственная зрелая последовательность микроРНК, тогда как пассажирская цепь диссоциируется и подвергается гидролизу (Wang H.W. et al., 2009). Выбор нужной последовательности не случаен и, вероятно, связан с тем, что у лидирующей последовательности 5'-конец термодинамически менее стабилен. Термодинамические различия важны, когда белки аргонавты раскручивают дуплекс и вытесняют одну из цепей (Bartel D.P., 2018; Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D., 2003).

У человека существуют 4 белка из семейства аргонавтов (Ago 1-4). Эти белки гомологичны и обладают сходными функциями в механизмах подавления активности генов опосредованных микроРНК и имеют сходную специфичность для микроРНК, либо синтетических миРНК (Liu J. et al., 2004; Meister G., 2013). Каждый белок из этого семейства состоит из четырех доменов: N-концевого (N), а также PAZ, MID и PIWI доменов (Swarts D.C. et al., 2014). Комплекс микроРНК/миРНК-Ago представляет собой стабильный фермент, который может выполнять свои функции продолжительное время без изменения своей активности (Hutvagner G., Zamore P.D., 2002; Meister G., 2013). Стоит отметить, что только Ago2 белок обладает эндонуклеазной активностью и может участвовать в механизме направленного расщепления целевых мРНК (Rivas F. V et al., 2005). В свою очередь Ago1, Ago3, Ago4, лишённые экзонуклеазной активности, обеспечивают подавление активности генов опосредованно, изменяя активность белков системы направленной деградации мРНК, либо снижая активность трансляции (Liu J. et al., 2004).

При взаимодействии микроРНК с белком семейства аргонавтов образуется активированный комплекс RISC, в котором микроРНК может взаимодействовать

со своими мишенями. МикроРНК взаимодействует с мРНК с помощью так называемой ядерной последовательности, состоящей из 2-7 нуклеотидов, которые расположены на ее 5'-конце. Такой небольшой размер узнающей последовательности способствует тому, что одна микроРНК может участвовать в регуляции большого количества мишеней (Bartel D.P., 2009; Bartel D.P., 2018). В связи с этим, одна микроРНК может регулировать экспрессию нескольких транскриптов, которые могут выполнять функции в одном клеточном процессе, либо каскаде ферментативных реакций. Так, например, miR-29 служит негативным регулятором нескольких транскриптов, ассоциированных с фиброзом, включая регуляции синтеза коллагенов и белка Mfap5 (microfibril associated protein 5 / белок 5, ассоциированный с микрофибриллами). Показано, что при нарушении экспрессии этой микроРНК в миобластах, которые являются предшественниками мышечных клеток, наблюдается изменение их пути дифференцировки в миофибробласты, что связано с развитием мышечной дистрофии Дюшенна (Bier A. et al., 2018; Wang L. et al., 2012). Помимо того, что одна микроРНК способна регулировать экспрессию множества генов, 3'-НТО одной мРНК обычно содержит сайты связывания для нескольких микроРНК. Например, экспериментально подтверждено, что miR-375, miR-124 и let-7b совместно координируют уровень активности гена *Mtpn* (myotrophin / миотрофин) в клеточной линии Min6, являющейся перевиваемой клеточной линией, полученной из бета-клеток поджелудочной железы мыши (Krek A. et al., 2005; Nathan G. et al., 2015). Это позволяет проводить тонкую регуляцию экспрессии одной мРНК, при этом в случае негативной регуляции экспрессия транскрипта обратно пропорциональна количеству микроРНК, которые его регулируют.

Однако необходимо учитывать каким образом влияет та или иная микроРНК на ген-мишень: на уровень транскрипции или на уровень трансляции. микроРНК обычно взаимодействуют 7-8 нуклеотидами в их ядерной последовательности, однако искусственно можно подобрать такие малые РНК, которые полностью комплементарны последовательности. Такие молекулы называют малыми интерферирующими РНК или миРНК (Golden D.E., Gerbasi V.R., Sontheimer E.J.,

2008; Hu B. et al., 2020). Исследование влияния таких миРНК в эукариотических системах помогло установить механизмы того, каким образом микроРНК и миРНК могут влиять на синтез белков. Существует два принципиально различных механизма влияния малых РНК на мРНК в комплексе RISC: расщепление мРНК и снижение активности этапа трансляции белка (Humphreys D.T. et al., 2005; Rivas F. V et al., 2005). В модельной системе дрозофилы установлено, что в случае полной комплементарности миРНК происходит расщепление ее мРНК мишени за счет экзонуклеазной активности белков Ago (Iwasaki S., Kawamata T., Tomari Y., 2009). При дальнейшем изучении этих механизмов, обнаружено, что в случае млекопитающих и человека, такой эндонуклеазной активностью обладает только белок Ago2 (Li X. et al., 2020). Однако все нарабатываемые микроРНК в организме обладают только частичной комплементарностью (Bartel D.P., 2004; Jonas S., Izaurralde E., 2015). Показано, что неполная комплементарность миРНК/микроРНК с последовательностью мРНК мишени подавляет эндонуклеазную активность Ago белков (Zeng Y., Yi R., Cullen B.R., 2003). Однако в этом случае регуляция активности гена может происходить только в результате снижения стабильности мРНК и ее дальнейшего разрушения, либо за счет снижения активности трансляции белка. Снижение стабильности мРНК происходит в результате того, что связывание микроРНК в комплексе с белком аргонавтом с целевой мРНК привлекает другие белки, такие как TNRC6A (белок гена 6A, содержащий тринуклеотидный повтор, ранее известный как GW182) (Nawalpuri B. et al., 2021; Rehwinkel J., 2005). Они опосредуют взаимодействие белков в комплексе с микроРНК и белков, связывающих полиА-хвост в 3'-области мРНК, что приводит к сокращению количества остатков аденозинмонофосфата, за счет привлечения второй субъединицы комплекса деаденилирования PAN2 (poly(A) specific ribonuclease subunit PAN2 / PAN2 субъединица поли А специфической рибонуклеазы) и комплекса белков CCR4-Not (белковый комплекс, имеющий множество активностей в том числе полиА 3'-5' экзонуклеазу и убиквитин лигазу) (Behm-Ansmant I., 2006; Buschauer R. et al., 2020). В результате происходит удаление кэп-структуры на 5'-НТО мРНК с участием специальных ферментов

DCP1, что приводит к тому, что 5'-3' экзонуклеаза первого типа (XRN1) узнает мРНК (Braun J.E. et al., 2012).

Помимо активации механизмов деградации целевых мРНК, микроРНК также способны ингибировать этап трансляции. Однако к тому моменту, когда наступает полная репрессия трансляции, обычно начинается процесс деаденилирования мРНК и активация ее направленного распада. В исследовании влияния микроРНК на активность трансляции, под которой понимается соотношение количества связанной мРНК с рибосомами к несвязанной мРНК, показано, что микроРНК в большей степени вызывает распад мРНК, чем подавление трансляции (Guo H. et al., 2010). Однако в других экспериментах обнаружено, что подавление трансляции может быть ведущим процессом. Так, в исследованиях проведенных на эмбриональных клеточных культурах данио-рерио показано, что микроРНК индуцирует репрессию трансляции в отсутствие эффекта дестабилизации мРНК (Subtelny A.O. et al., 2014). Подавление активности трансляции может быть связано с влиянием микроРНК в комплексе RISC на фактор инициации eIF4F (Mathonnet G. et al., 2007). При этом мРНК, которые не обладают m7G-кэп структурой на 5'-конце, а вместо нее несут неканоничную структуру А-кэп, либо обладают сайтом внутренней посадки рибосом (IRES), не восприимчивы к подавлению активности опосредованной микроРНК (Ricci E.P. et al., 2013; Thermann R., Hentze M.W., 2007). Показано, что такие факторы как eIF4A1 и eIF4A2 специфически диссоциируют из комплекса с мРНК в присутствии микроРНК (Fukao A. et al., 2014). Таким образом, микроРНК ингибируют связывание рибосом, либо блокируют этап сканирования мРНК их генов-мишеней.

Хотя проведенные исследования механизмов того, как микроРНК влияет на активности генов, раскрыли множество путей их влияния, понимание относительного вклада изменения стабильности мРНК к подавлению активности трансляции до сих пор остается предметом обсуждения. Их относительный вклад может варьироваться в зависимости от количества определенных белков, входящих в RISC, первичной последовательности целевой мРНК, количества сайтов связываний с микроРНК, либо типа клеток, в которых происходят эти процессы

(Eichhorn S.W. et al., 2014). Тем не менее, появляются сведения, что репрессия трансляции мРНК гена-мишени обычно предшествует ее распаду. Однако снижение стабильности мРНК вносит существенный вклад в подавление активности генов (Eichhorn S.W. et al., 2014). С другой стороны, не всегда наблюдается распад мРНК. Это подтверждается тем, что в определенных случаях существует возможность заново активировать этап трансляции, ингибированный микроРНК, путем подавления компонентов комплекса RISC и его диссоциации от целевой мРНК (Bhattacharyya S.N. et al., 2006).

1.5. Изучение роли микроРНК в работе центральной нервной системы

Около 70% всех микроРНК, которые закодированы в геноме, связаны с регуляцией активности нервной системы человека. Показано временное и пространственное распределение экспрессии микроРНК и генов-мишеней в тканях мозга человека (Сао Х. et al., 2006). Однако не существует возможности проводить детальный анализ экспрессии микроРНК и их участия в механизмах регуляции генов непосредственно в организме человека. Следовательно, для этого используются модельные клеточные линии и модельные животные. Например, использование клеточных культур позволило охарактеризовать ряд микроРНК, необходимых для корректного деления клеток предшественников нейронов и их дифференцировки. Так, повышенная экспрессия консервативной микроРНК miR-9 способствовала делению таких клеток и их дифференцировке из эмбриональных стволовых клеток (Coolen M. et al., 2012). Также примером являются miR-124 и miR-125b, которые участвуют в индукции дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека в нейроны (Roese-Koerner V. et al., 2013).

Изменение экспрессии микроРНК было показано при различных заболеваниях, ассоциированных с нарушением развития нейронов, таких как шизофрения, аутизм, синдром Дауна и заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой (Abu-Elneel K. et al., 2008; Edbauer D. et al., 2010; Hansen T. et al., 2007; Salvi A. et al., 2019). Изучение того, является ли такое изменение их экспрессии следствием или причиной развития заболеваний является сложной задачей. Однако

ряд исследований подтвердил непосредственное участие микроРНК в развитии заболеваний. Например, одним из факторов развития шизофрении является изменение функций рецептора N-метил-d-аспартата (NMDA) и регуляции его антагонистов в случае заболеваний схожих с шизофренией. Экспрессия miR-132 у пациентов с такими заболеваниями снижается, что приводит к нарушению функций рецептора NMDA (Qian Y. et al., 2017). Анализ секвенирования полных геномов больных шизофренией выявил однонуклеотидные замены в кодирующей последовательности этой микроРНК (Zhang Y. et al., 2015). Дополнительные исследования также подтвердили, что изменение экспрессии miR-137 влияет на функции головного мозга (Smrt R.D. et al., 2010). В отличие от примеров, когда изменения экспрессии определенных микроРНК вызывают развитие заболеваний, в этом случае предполагают прямую корреляцию между мутациями в ДНК последовательности генов микроРНК и шизофренией (Zhang Y. et al., 2015).

При развитии неврологических заболеваний, связанных с расстройством аутистического спектра, таких как FXS и синдром Ретта, также наблюдаются изменения экспрессии ряда микроРНК (Edbauer D. et al., 2010; Urdinguio R.G. et al., 2010). Помимо этого, мутации в структуре белков комплекса RISC также приводят к развитию таких заболеваний. Например, белок FMRP, отсутствующий у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, взаимодействует с рядом микроРНК и в таком комплексе участвует в регуляции белков, ответственных за развитие нейронов (Edbauer D. et al., 2010). В случае синдрома Ретта, его развитие сопряжено с мутациями в метил-CpG-связывающем белке (MECP2). Этот белок участвует в процессинге микроРНК и регулирует функционирование комплекса белков, связанных с ферментом DRISHA (Wu H. et al., 2010). Описанные исследования проводились с использованием модельных объектов и эти данные помогли установить механизмы развития таких заболеваний.

Также при изучении влияния микроРНК на развитие заболеваний аутистического спектра, применяются подходы, включающие анализ посмертного материала, полученного от пациентов, а также оценку циркулирующих микроРНК в сыворотке, плазме крови и белых клетках крови (Cortez M.A., Calin G.A., 2009).

Этот подход с использованием скрининга экспрессии микроРНК приводит к существенному пониманию их роли в развитии заболеваний и, возможно, может привести к открытию новых генетических маркеров заболеваний. Например, анализ посмертного материала, полученного из коры мозжечка 13 пациентов с аутизмом, выявил 28 микроРНК с нарушенной экспрессией (Abu-Elneel K. et al., 2008). В этом списке присутствуют микроРНК, для которых предполагаемыми мишенями являются белки SHANK3 и NRXN1, приводящие к заболеваниям аутистического спектра (Yasuda Y. et al., 2011). Также при исследовании экспрессии микроРНК в плазме и сыворотке крови обнаружили изменения экспрессии 13 микроРНК в выборке из 55 детей с заболеваниями аутистического спектра (Mundalil Vasu M. et al., 2014).

1.5.1 Роль микроРНК в развитии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой

В развитии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, могут участвовать микроРНК, которые взаимодействуют с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*, а также микроРНК, которые взаимодействуют с белком FMRP. Этот структурно и функционально сложный белок играет существенную роль в синаптической пластичности. FMRP является представителем семейства РНК-связывающих белков с наибольшей экспрессией в головном мозге и семенниках (Devys D. et al., 1993). Он продуцируется как при развитии зародыша, так и во взрослом организме. Этот белок идентичен на 60% по аминокислотной последовательности со своими паралогами FXR1P и FXR2P, закодированными в аутосомах. Ранее предполагали, что эти белки могут частично компенсировать функции белка FMRP, однако было установлено, что их экспрессия не изменяется при его отсутствии у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы (Bontekoe C.J.M., 2002). В его структуре имеются 4 РНК-связывающих домена, необходимых для его функционирования. RGG бокс и три гомологичных домена К (КН0, КН1 и КН2) распознают определенные вторичные структуры РНК (Siomi H. et al., 1993). Также этот белок имеет сигналы ядерной локализации и сигнал экспорта из ядра, что позволяет ему перемещаться между этими двумя компартментами клетки. Однако в основном он локализуется в

цитоплазме. FMRP может фосфорилироваться по множеству сайтов, прежде всего по серину в положении 499 с помощью нескольких клеточных киназ (Tsang B. et al., 2019). Дефосфорилирование происходит с помощью фосфатазы 2А, которое запускается при передаче сигналов метаболитным рецептором глутамата и контролирует разрушение FMRP в синапсах через его убиквитинирование (Narayanan U. et al., 2007). FMRP в основном функционирует как репрессор трансляции, регулируя данный процесс в синапсах нейронов. Например, при его взаимодействии с белком CYFIP (цитоплазматический белок, взаимодействующий с *FMRI*), он может взаимодействовать с эукариотическим фактором инициации трансляции 4E (eIF4E), блокируя кэп-зависимую трансляцию белков (Abekhoukh S. et al., 2017). Также установлено, что FMRP участвует в маршруте подавления активности генов, связанных с мРНК. Например, этот белок совместно с miRNA-125a в комплексе RISC негативно регулирует синтез белка PSD-95, являющегося одним из постсинаптических каркасных белков и необходимого для правильной локализации рецепторов глутамата и правильного функционирования синапсов (Muddashetty R.S. et al., 2011). Показано, что только фосфорилированный FMRP опосредует взаимодействие мРНК PSD-95 с комплексом RISC, тогда как дефосфорилирование этого белка в ответ на синаптические сигналы способствует диссоциации этого комплекса и активации продукции белка PSD-95. Взаимодействуя с последовательностью мРНК, обогащенной гуанином и формирующей вторичные структуры, он способствует возникновению необходимой конформации для посадки miR-125a (DeMarco B. et al., 2019). Также белок FMRP модулирует негативную регуляцию белка NR2A с помощью miR-125b (Edbauer D. et al., 2010). Этот белок является субъединицей рецептора NMDA, который влияет на синаптическую пластичность. Также FMRP совместно с miR-181d негативно регулирует процесс удлинения аксонов, блокируя трансляцию белков *Map1*, ассоциированного с микротрубочками, и *Calm1* — регулятора передачи сигнала кальция. При стимуляции факторами роста нейронов, мРНК этих белков высвобождается из комплекса FMRP и miR-181, что способствует активации их трансляции (Wang B. et al., 2015).

В случае премутации и полной мутации происходит изменение активности гена *FMRI*, поэтому предполагают, что на патогенез фраксопатий могут влиять микроРНК, мишенью которых является мРНК этого гена. Предполагают два пути их возможного влияния. Во-первых, непосредственно сами микроРНК могут изменять свою экспрессию, что сопряжено с изменением уровня мРНК и белка *FMRP*. Во-вторых, изменение активности гена *FMRI* может изменить экспрессию взаимодействующих с ним микроРНК. Такое событие может привести к изменению экспрессии других генов-мишеней и развитию патологии. Так, уже показано изменение экспрессии ряда микроРНК, взаимодействующих с мРНК гена *FMRI*. Установлено, что *miR-130b*, взаимодействующая с 3'-НТО мРНК гена *FMRI*, может негативно регулировать синтез белка *FMRP*. В случае повышенной экспрессии этой микроРНК в клеточной культуре предшественников нейронов при их дифференцировке наблюдается изменение соотношения зрелых нейронов к глиальным клеткам (Gong X. et al., 2013). Роль этой микроРНК в регуляции активности гена *FMRI* подтверждается тем, что аналогичные физиологические изменения были показаны на эмбриональных стволовых клетках с полной мутацией гена *FMRI*, которые проявляют аномалии развития, что ведет их по пути глиальных клеток вместо зрелых нейронов (Castren M. et al., 2005; Teliás M., Segal M., Ben-Yosef D., 2013). Также, ведутся исследования влияния микроРНК, взаимодействующих с 3'-НТО мРНК гена *FMRI* в случае премутантного аллеля, на активность этого гена. Установлено, что изменение его активности в данном случае также приводит к развитию неврологических расстройств и заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Однако, до сих пор существует мало данных о том, как происходит регуляция синтеза белка *FMRP* на транскрипционном и посттранскрипционном уровне. Показано, что *miR-101*, *miR-129-5p* и *miR-221*, взаимодействующие с 3'-НТО мРНК гена *FMRI*, изменяют активность этого гена при их повышенной экспрессии в клеточных культурах фибробластов, нейронах и культуре HeLa. Влияние *miR-101* на экспрессию было незначительно, что говорит, о разной степени влияния микроРНК, взаимодействующих с 3'-НТО мРНК гена *FMRI* (Zongaro S. et al., 2013). Кроме

того, исследования показали, что данная микроРНК снижает количество мРНК гена *FMRI*, однако уровень синтеза белка FMRP не отличался от контрольных образцов. Таким образом, эта микроРНК влияет на уровень транскрипции, а не на посттранскрипционный уровень. Другой пример участия микроРНК в механизмах, связанных с регуляцией функций нейронов, — miR-221 (Zongaro S. et al., 2013). Показано, что у части пациентов с умственной отсталостью наблюдается делеция района Xp11.3, в котором располагаются гены miR-221 и miR-222 (Zhang L. et al., 2006). Это может способствовать проявлению видимых симптомов у таких пациентов. В этом исследовании предполагают, что обнаруженное снижение экспрессии miR-221 может приводить к изменению в строении нейронов, либо к аномальной передаче сигналов рецепторов mGluRI клеток головного мозга у мышей моделей FXTAS. Также в этом исследовании показали, что мРНК 8 генов, важных для корректного функционирования нейронов и являющихся мишенями этих микроРНК, имеют повышенный уровень экспрессии (Zongaro S. et al., 2013).

1.6. Заключение

Фраксопатии являются социально значимыми заболеваниями в популяции человека, однако на сегодняшний день не существует полной картины механизмов патогенеза этих синдромов. Важно отметить высокую распространенность премутационного аллеля гена *FMRI*, который встречается с частотой 1:150-300 у женщин и 1:450-850 у мужчин (Hunter J. et al., 2014; Rajaratnam A. et al., 2017). Однако проявления заболеваний выражено только в определенном проценте случаев. Более того, эти проявления напрямую не коррелируют с размером CGG повтора — основным диагностическим критерием этих патологий. Кроме того, FXTAS и FXPOI развиваются в позднем возрасте, в связи с этим изучение механизмов их патогенеза и создание новых диагностических критериев может помочь носителям премутационного аллеля с повышенным риском развития заболеваний начать раннюю медикаментозную терапию, влияющую на проявления заболеваний.

Важным шагом в создании диагностических критериев и терапии заболеваний является изучение механизмов их патогенеза. В случае фраксопатий до сих пор невыясненными остаются факторы, влияющие на тяжесть проявлений синдромов. Появляются доказательства того, что определенные микроРНК, взаимодействующие с мРНК, участвуют в регуляции активности гена *FMR1*. МикроРНК имеют множество генов-мишеней ввиду их структурных особенностей. Изменение их активности может привести к нарушению регуляции множества генов, что может повлиять на развитие заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой (Gong X. et al., 2013). Также они обладают синергическим эффектом, поэтому сразу несколько микроРНК могут регулировать активность гена *FMR1* (Krek A. et al., 2005). До сих пор существует мало данных о том, как происходит регуляция синтеза белка FMRP на транскрипционном и посттранскрипционном уровне. Причем, данные получены либо на клеточных линиях, либо отдельно на мышинных моделях, что не позволяет соотнести эти результаты. Необходимо учитывать то, что клеточные линии, полученные от пациентов не в полной мере отражают паттерн экспрессии микроРНК человека, так как он отличается в разных органах, а также изменяется в процессе развития организма (Lee C., Risom T., Strauss W.M., 2006). Тем не менее, при использовании ряда клеточных линий с различными аллелями гена *FMR1*, можно установить связь экспрессии микроРНК с активностью этого гена. 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 FXTAS. Для корректного анализа участия микроРНК в регуляции активности гена *FMR1* у человека, требуется проводить совместный анализ с использованием клеточных линий пациентов, модельных животных, а также проводить анализ взаимодействия с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*. Анализируя результаты такого исследования, станет возможным установить, какие микроРНК участвуют в регуляции активности гена *FMR1* с учетом особенностей используемых модельных объектов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Коммерческие наборы

- Набор для выделения ДНК «DNeasy Blood & Tissue Kit» (Qiagen, Германия);
- Электрокомпетентные бактерии *E. coli* штамма NEB Stable (New England Biolabs, США);
- Набор для выделения плазмидной ДНК «QIAprep Spin Miniprep Kit» (Qiagen, Германия);
- Набор для выделения плазмидной ДНК «Plasmid Maxi Kit» (Qiagen, Германия);
- Набор для очистки фрагментов ДНК «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen, Германия);
- Набор для очистки ПЦР фрагментов из агарозного геля «QIAquick Gel Extraction Kit» (Qiagen, Германия);
- Набор для секвенирования по Сэнгеру «BrilliantDye Terminator (v3,1) Cycle Sequencing kit» (NimaGen, Нидерланды);
- Набор для выделения РНК «TRIzol™ Reagent and RNeasy Lysis Tubes Complete System» (Thermo Fisher Scientific, США);
- Обратная транскриптаза М-MuLV-RH (Биолабмикс, Россия);
- Набор для проведения реакции обратной транскрипции «ОТ-М-MuLV-RH» (Биолабмикс, Россия);
- Набор для проведения ПЦР-РВ с использованием меченых зондов «БиоМастер HS-qPCR (2×)» (Биолабмикс, Россия);
- Набор для проведения ПЦР-РВ с использованием системы детекции SYBR «БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×)» (Биолабмикс, Россия);
- Набор для ПЦР с использованием Q5 ДНК-полимеразы «Q5 High-Fidelity DNA Polymerase» (New England BioLabs, США);
- Набор для определения концентрации белка «Pierce BCA Protein Assay kit» (Thermo Fisher Scientific, США);

- Субстрат для проявки хемилюминесцентного сигнала пероксидазы хрена «Pierce ECL Western Blotting Substrate» (Thermo Fisher Scientific, США);
- Реагенты для трансфекции эукариотических клеток Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.1.2. Питательные среды и сыворотки

- Питательная среда RPMI-1640 с L-глутамином (БиолоТ, Россия);
- Питательная среда DMEM/F12 (1:1) с L-глутамином (БиолоТ, Россия);
- Эмбриональная телячья сыворотка, инактивированная температурой (Gibco, США);
- Бактериальная среда LB: 1% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl;
- Бактериальная среда LB-агар: 1% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 1,5% бактоагар.

2.1.3. Растворы и буферы

- Раствор Трипсина-Версена (1:1) (БиолоТ, Россия);
- Раствор DPBS 1-кратный полный (БиолоТ, Россия);
- Стерильный раствор трипанового синего 0,4% (БиолоТ, Россия);
- Смесь антибиотиков для культивирования эукариотических клеток: пенициллин G, стрептомицин (БиолоТ, Россия);
- Селективный антибиотик для бактериальных культур ампициллин натриевая соль (Panreac, Испания);
- Доксициклина гидрохлорид (Sigma-Aldrich, США);
- ДМСО (BioFroxx, Германия);
- Раствор заменителя трипсина TrypLE Express Enzyme 1X без фенолового красного (Thermo Fisher Scientific, США);
- Вода для молекулярных работ (Invitrogen, США);
- Буфер для Taq-ДНК-полимеразы As x10: 670 mM Трис-HCl pH 8,8; 166 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1% Твин-20;

- Буфер для амплификации GC-обогащенных матриц: 750 мМ Tris-HCl pH 8,8, 200 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% Tween 20, 20 мМ MgCl_2 ;
- TAE буфер x50: 2 М Трис-ацетат, 0,05 М ЭДТА, pH 7,6;
- Маркер молекулярного веса 1 т. п. н. (Сибэнзим, Россия);
- Маркер молекулярного веса 100 п. н. (Сибэнзим, Россия);
- Буфер для выделения тотального белка: 150 мМ NaCl, 1% TritonX-100, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS, 5 мМ ЭДТА, 50 мМ Трис-HCl pH 8,0;
- Смесь ингибиторов протеаз Pierce Protease Inhibitor Mini Tablets без EDTA (Thermo Fisher Scientific, США);
- Буфер для загрузки образцов белка в акриламидный гель: 12% SDS, 0,06% бромфенолового синего, 47% глицерина, 60 мМ Tris-HCl pH 6,8, 6 М DTT;
- Буфер для электрофореза белков: 25 мМ Трис-основание, 190 мМ глицин, 0,1% SDS, pH 8,3;
- Буфер для переноса белков на PVDF мембрану: 25 мМ Трис-основание, 190 мМ глицин, 20% метанол, pH 8,3;
- Раствор пунцового S: 0,1 % пунцовый S, 1% уксусной кислоты;
- Буфер PBSTx1: 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 1,8 мМ KH_2PO_4 , 0,1% Твин 20;
- Блокирующий буфер для вестерн-блоттинга: 5% бычьего сывороточного альбумина в PBSTx1;
- Моноклональные антитела IgG кролика к FMRP человека и Fmrp мыши (ab130165, Abcam, США);
- Поликлональные антитела IgG мыши к GAPDH человека и Gapdh мыши (ab9485, Abcam, США);
- Поликлональные антитела IgG козы к Fc-фрагментам IgG мыши, меченные пероксидазой хрена (A16084, Life Technologies, США);
- Поликлональные антитела IgG козы против Fc-фрагментов IgG кролика, меченные пероксидазой хрена (AP187P, Sigma-Aldrich, США);
- Высоко-деионизированный формаид Hi-Di (Thermo Fisher Scientific, США);

- Стандарт для фрагментного анализа 1200LIZ (Applied Biosystems, США).

2.1.4. Ферменты

- ДНКаза I (New England Biolabs, США);
- ДНК-лигаза фага Т4 (Сибэнзим, Россия);
- ДНК-полимераза фага Т4 (Сибэнзим, Россия);
- Полинуклеотидкиназа фага Т4 (Сибэнзим, Россия);
- Протеиназа К (Сибэнзим, Россия);
- РНКаза А (Thermo Fisher Scientific, США);
- Щелочная фосфатаза (Сибэнзим, Россия);
- Phusion ДНК-полимераза (Thermo Fisher Scientific, США);
- Q5 ДНК-полимераза (New England BioLabs, США);
- Таq ДНК-полимераза (Сибэнзим, Россия).

2.1.5. Эндонуклеазы рестрикции

Для создания генно-инженерных конструкций в данной работе был использован следующий список эндонуклеаз рестрикции (Сибэнзим, Россия): EcoRI (G↑AATTC), HpaI (GTT↑AAC), XbaI (T↑CTAGA), BstSNI (TAC↑GTA), AsuNHI (G↑CTAGC), CciNI (G↑CTAGC), Bme18I (G↑GWCC), PstI (CTGCA↑G), Bpu14I (TT↑CGAA), SmiI (ATTT↑AAAT), PciI (A↑CATGT), AspA2I (C↑CTAGG), AspLEI (GCG↑C).

2.1.6. Праймеры

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе. Для ранее опубликованных последовательностей праймеров приведены ссылки на источники литературы.

Праймеры для анализа экспрессии мРНК гена <i>FMRI</i> (Раздел 2.2.8.)		
Название праймера	Последовательность 5' → 3'	Референс
FMR1-F	GCTAAAGTGAGGATGATAAAG	NM_001185075 .1; (Brendel C. et al., 2013)
FMR1-R	ATCCTTATGTGCCGCCTCTTTGG	
EIF4A2-F	AGGGTCAAGTCGTGTTCTGAT	NM_001967.4
EIF4A2-R	CCACACCTTTCCTCCCAAATC	

GAPDH-F	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	NM_001289745 .3; (Brendel C. et al., 2013)
GAPDH-R	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	
mmus-fmr1-F	TCACCTCAAAGCGAGCCCAC	NM_008031.3
mmus-fmr1-R	AAGCTGCCTTGAACCTCCAGT	
mmus-Eef2-F	CACTTACCATCCCCGTCAC	NM_007907.2
mmus-Eef2-R	GGTCGCAGCTCTTAATACCCAT	
mmus-Psm4-F	CTCGGATGACGCCCTACTGA	NM_001282017 .1
mmus-Psm4-R	GGACATCTGCATGGCGTAGG	
Mmus-DNA(+)-qPCR-F	AGGACAAAGAACACCTTCCCCTT	NC_000086.8
Mmus-DNA(+)-qPCR-R	TGTATCATGCGTCCAGTGTGCT	
Chr3-F	GTGACTTCCCAACCTGGATTCT	NC_000003.12
Chr3-R	GATCATCCCAAAGGACATCAACT	
Праймеры для амплификации GC-обогащенных фрагментов и анализа наличия AGG-вставок (Раздел 2.2.10.)		
Название праймера	Последовательность 5' → 3'	Референс
NotFraxR4	CAAGTCGCGGCCGCCTTGTAGAAAGCGCCATTGGAGC CCCGCA	NC_000023.1; (Hayward B.E., Usdin K., 2017)
NotFraxC	d6RG- AGTTCAGCGGCCGCGCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACT TCCGGT	
CGG - праймер	AGCGTCTACTGTCTCGGCACTTGCCCGCCGCCGCCG G	
Праймеры, необходимые для сборки генетических конструкций (Раздел 2.2.12.)		
Название праймера	Последовательность 5' → 3'	Референс
pre-miR-182-gene-F	TAAGCATTCGAAATGGGCGCCTCTGTCCTG	NC_000007.14
pre-miR-182-gene-R	TAAGCATTCGAAACCCAGCAGTCCGGGACC	
pre-miR-23a-gene-F	TAAGCATTCGAAACCTCCTTTGCTCTCTCTCTC	NW_021160022 .1

pre-miR-23a-gene-R	TAAGCATTCGAAGGCTTCGGGGCCTCTCTG	
pre-miR-25-gene-F	TAAGCATTCGAAGCTCCCCAAGCTCCATCTG	NC_000007.14
pre-miR-25-gene-R	TAAGCATTCGAAGACACCCTTGTTCTGGCTTTA	
pre-miR-410-gene-F	TAAGCATTCGAACTCACSTTTGATGTCCCATCC	NC_000014.9
pre-miR-410-gene-R	TAAGCATTCGAATCAGGGGAAAGGATGACAAATG	
pre-miR-139-gene-F	TAAGCATTCGAACGGAGCTGGTTGTGGGCG	NC_000011.10
pre-miR-139-gene-R	TAAGCATTCGAACTCCTCCCTCTTTCTCTTCCT	
pre-miR-221-gene-F	TAAGCATTCGAACTGTTGGTTTTCTTTTCCTTGTGG	NC_000023.11
pre-miR-221-gene-R	TAAGCATTCGAACCTTTCTCTGCACTCTATTCAATG	
pre-miR-302a-gene-F	TAAGCATTCGAACAAGCCAGCACACSTTTTGTTAC	NC_000004.12
pre-miR-302a-gene-R	TAAGCATTCGAAGCTTAAATATATGAGCTGCGGTC	
3'-UTR-FMR1-F	ACTGCATAATTCTGAAGT	NC_000023.11
3'-UTR-FMR1-R	GCAGAGGAAGATCAAAC	
Праймеры для анализа метилирования промоторной области гена <i>FMR1</i> (Раздел 2.2.13.)		
Название праймера	Последовательность 5' → 3'	
FMR1_Met-F	CCCGCCCTCCACCAAGCCCGC	NC_000023.11; (Galanina E.M. et al., 2017)
FMR1_Met-R	CTCCGTCACCGCCGCGCCCG	

2.1.7 Модельные системы, используемые в работе

2.1.7.1. Клеточные линии

Для исследования изменения уровня микроРНК, взаимодействующих с мРНК гена *FMR1*, в зависимости от активности гена *FMR1* в работе использовались перевиваемые клеточные культуры В-лимфоцитов, которые получены от пациентов с разным вариантом этого гена. Часть линий получены из коллекции

Института медицинских исследований Кориелла (США) (GM04025, GM06865, GM06891, GM06891E, GM06895, GM06897) и являются коммерчески доступными. Другие культуры получены из коллекции отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия) (CPG7, CPG8, CPG18, CPG166) и получены ранее от пациентов с соблюдением всех этических протоколов. Выбранные клеточные линии обладают одним из вариантов гена *FMR1*: премутацией (от 55 до 200 CGG триплетов), полной мутацией (более 200 CGG триплетов и метилированием промоторной области гена *FMR1*), неметирированной полной мутацией (более 200 CGG триплетов без метилирования промоторной области гена *FMR1*), либо нормой гена *FMR1* (менее 55 CGG триплетов). Подробное описание генотипа и анализа активности гена *FMR1* представлены в разделе 3.2. «Исследование активности гена *FMR1* в клеточных культурах В-лимфоцитов».

Также в исследовании взаимодействия микроРНК с 3'-НТО мРНК гена *FMR1* с использованием созданных плазмидных конструкций (Раздел 3.4. Анализ взаимодействия микроРНК с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*), была использована постоянная клеточная линия НЕК293 из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

2.1.7.2. Мышиная модель FXTAS

Для исследования паттерна экспрессии микроРНК в зависимости от пола и возраста использована мышиная модель FXTAS (Kong H.E. et al., 2017). Линия мышей *Fmr1*^{tm2Cgr/DlnJ} (*Fmr1* CGG KI) была получена с помощью замены нуклеотидной последовательности по методу гомологичной рекомбинации исходного повтора из 8 триплетов на повтор, полученный от пациента с премутационным аллелем гена *FMR1* размером 98 CGG триплетов. Линия предоставлена PhD Ренатой Хукема из университета прикладных наук Роттердама, Нидерланды.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Культивирование перевиваемых клеточных линий В-лимфоцитов

Культивирование В-лимфоцитов проводили на питательной среде RPMI-1640, содержащей L-глутамин (0,3 мг/мл), 15% эмбриональную телячью сыворотку, инактивированную температурой, а также антибиотики пенициллин G (100 е. а./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл), в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С и содержании 5% CO₂. При культивировании поддерживали оптимальную концентрацию – 400000 клеток на 1 мл среды. Подсчет количества клеток осуществлялся с помощью автоматического счетчика клеток LUNA-II (Logos Biosystems, Южная Корея). Для оценки жизнеспособности, клетки окрашивали 0,4% раствором трипанового синего. Подсчет клеток осуществлялся с использованием стандартной программы, оптимизированной производителем.

При пересадке линий В-лимфоцитов, а также сборе образцов, культуры переносили в пробирки и измеряли их концентрацию. После этого часть культуры центрифугировали при 1000 g при комнатной температуре, удаляли супернатант, затем необходимую часть осадка для поддержания культуры переносили в культуральный флакон с новой средой. 1×10^6 клеток замораживали при –80 °С для последующего выделения РНК, ДНК и белка.

Для долговременного хранения жизнеспособной клеточной линии в криохранилище, содержащем азот, 5 млн клеток после центрифугирования ресуспендировали в стандартной для культуры ростовой среде без антибиотика с добавлением 40% эмбриональной телячьей сыворотки, инактивированной температурой, а также 10% ДМСО. Суспензию клеток переносили в стерильные 1 мл криопробирки, помещали в криоконтейнер CoolCell 5LX (Corning, США) и инкубировали при –70 °С в течение суток. На следующий день пробирки перемещали в криохранилище, наполненное жидким азотом.

Размораживание криопробирки, содержащей клеточную культуру, проводили при 37 °С. Далее 1 мл суспензии переносили в стерильную центрифужную пробирку. К размороженным клеткам добавляли 5 мл

культуральной среды, перемешивали и центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Осадок клеток ресуспендировали в оптимальном количестве ростовой среды и переносили в культуральный флакон.

2.2.2. Культивирование клеточной линии НЕК293

Клеточную линию НЕК293 культивировали на среде DMEM/F12, содержащей L-глутамин (0,3 мг/мл) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки, инактивированной температурой, а также содержащей антибиотики (пенициллин G (100 е. а./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл)) в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С и содержании CO₂ 5%.

Пересадку клеточных линий осуществляли при достижении 90% конfluenceности клеточного слоя. Из культурального флакона площадью 75 см² удаляли культуральную среду. Клетки трижды промывали 1-кратным раствором DPBS. После этого, на монослой клеток наносили 5 мл раствора Трипсина-Версена и инкубировали 10 минут при 37 °С. Далее клетки переносили в 15 мл пробирки и центрифугировали на скорости 1000 g при комнатной температуре с последующим удалением надосадочной жидкости. Клетки ресуспендировали в 10 мл ростовой среды. Подсчет клеток осуществляли с использованием автоматического счетчика клеток LUNA-II (Logos Biosystems, Южная Корея). Для продолжения роста, клетки рассаживали в количестве 2,1x10⁶ в 75 см² культуральном флаконе.

Длительное хранение клеточной линии в криохранилище, а также этапы разморозки проводили по методике, описанной выше (Раздел 2.2.1.).

2.2.3. Содержание и скрещивание лабораторных мышей

Проведение экспериментов на лабораторных животных было одобрено протоколом № 5 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора от 01.10.2020.

Мышей линии Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ} (Fmr1 CGG KI) содержали в вентилируемом звуконепроницаемом помещении при температуре 20-23 °С и влажности воздуха 50-60%. Животные получали стерилизованный гранулированный корм, свежие крупы и воду. Лабораторные животные находились в клетках прямого контакта с подстилкой, в качестве подстилки использовали опилки.

Мышей скрещивали в возрасте 2 месяцев путем ссаживания самца и самки в отдельную клетку. Через 3-4 недели после ссаживания получали потомство животных в количестве 6-8 особей. Присвоение идентификационного номера мышам осуществляли на 7 день после рождения путем удаления дистальных фаланг пальцев согласно ранее опубликованному методу (Schaefer D.C. et al., 2010).

Для проведения экспериментов животные, достигшие определенного возраста, подвергались эвтаназии методом цервикальной дислокации. Альтернативы выбранному методу эвтаназии не существует, так как использование анестетиков приведет к изменению экспрессии РНК у модельных животных (Staib-Lasarik I. et al., 2014), что искажает данные о их роли в патогенезе заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. После этого проводился забор образцов головного мозга животных для дальнейшего анализа экспрессии мРНК, микроРНК и уровня белка.

2.2.4. Выделение ДНК из биологических образцов

Выделение ДНК осуществлялось из 1×10^6 клеток В-лимфоцитов, фаланг пальцев мышей, собранных в процессе присвоения идентификационного номера, либо образцов головного мозга с использованием набора «DNeasy Blood & Tissue Kits» по стандартному протоколу, согласно рекомендациям производителя. Концентрацию образцов определяли спектрофотометрическим методом с использованием прибора NanoDrop One C (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.5. ПЦР для GC-обогащенных последовательностей ДНК

Для определения размера CGG повтора в клеточных линиях В-лимфоцитов, и мышей линии $Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}$ ($Fmr1$ CGG KI), проводили ПЦР с прямым (NotFraxR4) и обратным (NotFraxC) праймерами (Таблица 1) по стандартному протоколу (Kononenko A. V, Ebersole T., Mirkin S.M., 2020).

Для определения размера CGG повторов, проводили капиллярный электрофорез на генетическом анализаторе ABI 3130XL (Applied Biosystems, США) с использованием стандарта длин фрагментов 1200LIZ. Обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения

PeakScanner 2.0 (Applied Biosystems, США). Размер CGG повтора определяли по формуле:

$$X = \frac{N - 269}{3}$$

где X – количество единиц тринуклеотидного CGG повтора, N – размер ПЦР продукта амплификации, 269 – размер области, которая окружает CGG повтор.

2.2.6. Анализ метилирования промоторной области гена *FMRI*

Анализ метилирования промоторной области гена *FMRI* выполнен с использованием метил-чувствительной эндонуклеазы рестрикции AspLEI, имеющей сайт гидролиза на участке ДНК, фланкированный праймерами для наработки фрагмента в ПЦР. При полном метилировании промоторной области гена *FMRI* не происходит гидролиз образца ДНК ферментом AspLEI в локусе, фланкированном праймерами. Таким образом, в реакции амплификации при использовании этой матрицы, будет синтезироваться продукт реакции. В случае частичного метилирования промоторной области, либо его полного отсутствия, образец ДНК подвергается ферментативному гидролизу. При этом ПЦР продукт будет отсутствовать.

Выделение ДНК из культур клеток выполняли по методу, описанному ранее (Раздел 2.2.4.). Праймеры для проведения данного исследования (Таблица 1, раздел 2.1.6.), так же как состав реакционной смеси и программа амплификации выполнены согласно ранее опубликованной работе (Strelnikov V. et al., 2000).

2.2.7. Выделение РНК из биологического материала

Выделение образцов РНК проводили с использованием “TRIzol Reagent” из трех различных типов образцов: перевиваемых клеточных линий В-лимфоцитов, постоянных клеточных линий НЕК293 и образцов органов лабораторных мышей.

При выделении РНК из постоянных клеточных линий В-лимфоцитов использовали 1×10^6 клеток, предварительно промытых три раза раствором DPBS. Все этапы выделения РНК независимо от типа образцов проводили на льду, если

не сказано обратное. Далее к осадку клеток в пробирку “Phasemaker Tubes” добавляли 1 мл раствора “TRIzol Reagent”.

При выделении РНК из линии НЕК293 использовали 3×10^5 клеток. К осадку клеток в пробирку “Phasemaker™ Tubes” добавляли 1 мл раствора “TRIzol Reagent”. Как для выделения образцов РНК из В-лимфоцитов, так и для НЕК293, клетки тщательно гомогенизировали с использованием автоматической пипетки объемом 1 мл.

При выделении РНК из образцов головного мозга мышей использовали 150 мг материала. К образцу ткани добавляли 2,2 мл “TRIzol Reagent”. Образец измельчали механически с помощью стеклянного гомогенизатора. Для удаления дебриса образцы центрифугировали на скорости 1000 g при 4 °C 10 минут. Затем образец разделяли на две части для различных типов работ (изучение экспрессии микроРНК и экспрессии мРНК гена *FMRI*) по 1 мл в пробирки “Phasemaker Tubes”.

Следующие этапы выделения РНК аналогичны для всех типов образцов. К образцу в 1 мл “TRIzol Reagent” добавляли 200 мкл хлороформа. Пробирки встряхивали в течение 15 секунд. После 3 минутной инкубации на льду, образцы центрифугировали на скорости 12000 g при 4 °C 15 минут. После этого водную фазу переносили в 1,5 мл пробирки и добавляли равный объем изопропанола. После тщательного перемешивания переворачиванием пробирок 15 раз, их инкубировали при –20 °C 4 часа. После этого образцы центрифугировали 15 минут при 12000 g при температуре 4 °C, с последующим удалением надосадочной жидкости. Осадок РНК промывали 1 мл 75% этанола с последующим центрифугированием при 10000 g 10 минут при 4 °C. Осадок РНК сушили при 40 °C 5 минут. Далее РНК растворяли в воде без содержания РНКаз и ДНКаз. Образцы, полученные из органов мышей моделей FXTAS, В-лимфоцитов и клеточной линии НЕК293, растворяли в 300, 100 и 50 мкл, соответственно. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием прибора NanoDrop One C (Thermo Fisher Scientific, США).

При необходимости проводили ДНКазную обработку: реакционная смесь объемом 100 мкл содержала 2,5 мкг образца тотальной РНК, 1 кратного буфера для ДНКазы I, 1 е.а ДНКазы I. Смесь тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали при 37 °С в течение 15 минут. После этого к образцам добавляли 1 мкл 0,5 М ЭДТА рН 8,0 для инактивации фермента и тщательно перемешивали. Далее вносили 1 мл “TRIzol Reagent”. Затем проводили повторное выделение РНК по описанной выше схеме.

2.2.8. Реакция обратной транскрипции для анализа экспрессии мРНК гена *FMRI*

Для анализа уровня экспрессии мРНК гена *FMRI* использовали «Набор реактивов ОТ-М-MuLV-RH». Реакцию ОТ, содержащую смесь 1 мкг РНК, обработанной ДНКазой I, и другие компоненты, проводили с применением случайного гексамерного праймера согласно инструкции производителя.

2.2.9. Анализ экспрессии мРНК гена *FMRI*

ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора «БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×)». Реакция содержала 0,25 мкМ прямого и обратного праймера (Таблица 1, раздел 2.1.6.), а также 2 мкл продукта обратной транскрипции. Остальные компоненты были добавлены согласно стандартному протоколу производителя. Реакции были выполнены в трех технических повторах. Отрицательными контролями служили 2 реакции, которые проводили в двух повторах: безматричный отрицательный контроль обратной транскрипции, а также безматричный отрицательный контроль ПЦР в реальном времени. Реакции амплификации и детекцию сигналов осуществляли с использованием амплификатора QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США) по следующей программе: 1) 95 °С – 5 минут; 2) 95 °С – 15 секунд; 3) 54 °С – 15 секунд (на этом шаге происходила детекция сигнала); 4) 72 °С – 30 секунд (пункт 2-4 повторяли 35 циклов). При работе с образцами органов мышей дополнительно в ПЦР в реальном времени замешивали реакцию с использованием праймеров Mmus-DNA(+)-qPCR-

F и Mmus-DNA(+)-qPCR-R (Таблица 1, раздел 2.1.6.) – амплификация продукта происходит только при наличии ДНК контаминации.

При работе с клеточными культурами человека и образцами кДНК для определения возможной контаминации геномной ДНК добавляли отдельную реакцию с использованием праймеров Chr3-F и Chr3-R (Таблица 1, раздел 2.1.6.). Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала однократный AS-буфер для Taq-полимеразы, 0,25 мкМ прямого и обратного праймера, 0,25 mM 4dNTP, 2,5 е. а. Taq-полимеразы, 2 мкл продукта обратной транскрипции. Реакцию проводили в амплификаторе C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, США) по следующей программе: 1) 95 °C – пауза (образцы загружаются в амплификатор); 2) 95 °C – 5 минут; 3) 95 °C – 30 секунд; 4) 55 °C – 30 секунд; 5) 72 °C – 1 минуту (шаги 3-5 повторяли 25 циклов); 6) 72 °C – 10 минут. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Обсчет результатов ПЦР в реальном времени проводили по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Brendel C. et al., 2013) согласно формуле:

$$x = 2^{-((Ct1-Ct2)-(Ct3-Ct4))}$$

В случае анализа экспрессии мРНК гена *FMRI* в постоянных клеточных линиях В-лимфоцитов: C_{t1} – величина порогового цикла флуоресценции мРНК гена *FMRI* (Таблица 1, раздел 2.1.6.) в исследуемой клеточной линии; C_{t2} – среднее значение порогового цикла флуоресценции мРНК двух генов *GAPDH* и *EIF4A2* в исследуемой клеточной линии (Таблица 1, раздел 2.1.6.); C_{t3} – величина порогового цикла флуоресценции мРНК гена *FMRI* в клеточной линии GM06895; и C_{t4} – среднее значение пороговых циклов флуоресценции двух генов *GAPDH* и *EIF4A2* в клеточной линии GM06895.

В случае анализа экспрессии мРНК гена *fmr1* в мышцах линии Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ} также использовался метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$, где C_{t1} – величина порогового цикла флуоресценции мРНК гена *fmr1* (Таблица 1, раздел 2.1.6.) в исследуемой группе мышей – носителей премутации гена; C_{t2} – среднее значение порогового цикла флуоресценции мРНК двух генов *Eef2* и *Psm4* (Таблица 1, раздел 2.1.6.) в группе

мышей – носителей премутации гена; C_{13} – величина порогового цикла флуоресценции мРНК гена *fmr1* в контрольной группе мышей с нормальным аллелем гена *fmr1* – носителей нормального аллеля гена; и C_{14} – среднее значение пороговых циклов флуоресценции двух генов *Eef2* и *Psmc4* в контрольной группе мышей с нормальным аллелем гена *fmr1*. В исследовании использовали две контрольные группы мышей с нормальным аллелем гена *fmr1* – самцов или самок для анализа экспрессии микроРНК у носителей премутации гена *fmr1* аналогичного пола.

Анализ экспрессии мРНК гена *FMR1* в клеточных линиях В-лимфоцитов, а также мРНК гена *fmr1* в образцах головного мозга мышей выполнены в трех биологических повторах для исследования микроРНК, взаимодействующих с мРНК этого гена. Для проверки значимости различий между группами использовался двухвыборочный t-критерий для независимых выборок. Различия между экспериментами считали достоверными при $P < 0,05$.

2.2.10. Реакция обратной транскрипции для анализа экспрессии микроРНК

Для оценки уровня экспрессии изучаемых микроРНК использовался метод на основе stem-loop праймеров (Chen C., 2005). Для этого созданы специфические праймеры для обратной транскрипции, а также праймеры и зонды (олигонуклеотиды, содержащие флуоресцентную метку на 5'-конце и гаситель сигнала флуоресценции на 3'-конце), необходимые для проведения реакции ПЦР в реальном времени (Приложение 3).

Праймеры для проведения реакции ОТ предварительно подвергали ренатурации для формирования необходимой структуры петли в амплификаторе MiniAmp Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, США) по программе: 1) 95 °C – 5 минуты; 2) 65 °C – 7 минут; 3) 4 °C – 4 минуты. ОТ реакцию проводили с помощью фермента M-MuLV-RN. ОТ реакционная смесь содержала 150 нг тотальной РНК и 50 нМ специфического stem-loop праймера. Остальные компоненты реакционной смеси добавлены по стандартному протоколу согласно рекомендации производителя. Реакцию проводили в амплификаторе MiniAmp Plus

Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу: 1) 16 °C – 30 минут; 2) 42 °C – 1 час; 3) 70 °C – 10 минут.

2.2.11. ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan системы детекции сигнала

Анализ уровня экспрессии микроРНК проводили с использованием набора «БиоМастер HS-qPCR (2×)». Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала однократный буфер для ПЦР в реальном времени, 1,5 мкМ прямого праймера, 0,7 мкМ универсального обратного праймера, 0,2 мкМ меченого зонда (Приложение 3), 2 мкл продукта реакции обратной транскрипции. Каждую реакцию проводили в трех биологических и трех технических повторах. Амплификацию и детекцию сигналов осуществляли с использованием амплификатора QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США) по следующей программе: 1) 95 °C – 10 минут; 2) 95 °C – 15 секунд; 3) 60 °C – 1 минуту – на этом цикле происходила детекция сигнала флуоресценции (пункт 2-3 повторяли 39 циклов). Исходные данные обрабатывали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ по формуле:

$$x = 2^{-((C_{t1}-C_{t2})-(C_{t3}-C_{t4}))}$$

В случае анализа экспрессии микроРНК в постоянных клеточных линиях В-лимфоцитов: C_{t1} – величина порогового цикла флуоресценции изучаемой микроРНК в исследуемой клеточной линии; C_{t2} – среднее значение порогового цикла флуоресценции двух малых ядрышковых РНК (SNORD48 и SNORD44) в исследуемой клеточной линии; C_{t3} – величина порогового цикла флуоресценции исследуемой микроРНК в клеточной линии GM06895; и C_{t4} – среднее значение пороговых циклов флуоресценции для SNORD48 и SNORD44 в клеточной линии GM06895.

В случае анализа уровня микроРНК при индукции их экспрессии в созданной модельной системе, позволяющей оценить их взаимодействие с 3'-НТО мРНК гена *FMRI*, нормализация результатов проводилась по аналогичной формуле $2^{-\Delta\Delta C_t}$. В качестве нормализации использовались значения уровня экспрессии трансгенной клеточной линии НЕК293 содержащей конструкцию со всеми функциональными

элементами без последовательности микроРНК (Раздел 2.2.13.). Уровень экспрессии микроРНК нормировали на уровень экспрессии конститутивно экспрессирующейся мРНК белка FusionRed.

В случае исследования уровня экспрессии микроРНК в образцах органов мышей, данные обрабатывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, где C_{11} – величина порогового цикла флуоресценции исследуемой микроРНК в головном мозге; C_{12} – среднее значение порогового цикла флуоресценции малой ядрышковой РНК *mmus-SNORD70* в головном мозге; C_{13} – величина порогового цикла флуоресценции исследуемой микроРНК в головном мозге животного с нормальным аллелем гена *fmr1*; C_{14} – среднее значение порогового цикла флуоресценции для *mmus-SNORD70* в образце головного мозга мыши с нормальным аллелем гена *fmr1*. В исследовании использовали две контрольные группы мышей с нормальным аллелем гена *fmr1* – самцов или самок для анализа экспрессии микроРНК у носителей премутации гена *fmr1* аналогичного пола.

Все исследования проведены в трех биологических повторах и трех технических повторах. Для проверки значимости различий между группами использовался двухвыборочный t-критерий для независимых выборок. Различия между экспериментами считали достоверными при $P < 0,05$.

Для анализа достоверности различий также применялся коэффициент линейной корреляции Пирсона (r) (Wang L., Mo Q., Wang J., 2015). Значения этого коэффициента находятся в диапазоне от -1 до +1, где -1 – максимальная отрицательная корреляция и +1 – максимальная положительная корреляция. Для анализа достоверности также применялся критерий P .

2.2.12. Анализ уровня белка FMRP

Каждый образец клеточных культур В-лимфоцитов (1×10^6 клеток) суспендировали в 100 мкл буфера для выделения тотального белка с добавлением ингибитора протеаз. При работе с органами животных, к образцам добавляли 500 мкл лизис буфера, после этого образцы тщательно измельчали в стеклянном гомогенизаторе. Далее образцы перемешивали каждые 15 минут с инкубацией на

льду в течение 1 часа. Полученные гомогенаты центрифугировали 30 минут на скорости 14000 g при 4 °C для удаления нерастворимых осадков. Концентрацию белка в образцах определяли с использованием набора «Pierce BCA Protein Assay kit» согласно рекомендациям производителя. Анализ колориметрической плотности раствора проводили на планшетном анализаторе Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США).

Электрофоретическое разделение белков проводили в акриламидном геле, который состоял из 5%-го формирующего и 10%-го разделяющего слоев. В карман геля вносили предварительно прогретую в течение 5 минут при 95 °C, а затем охлажденную на льду смесь, состоящую из 30 мкг белка и однократной краски для белкового электрофореза. Электрофоретическое разделение проводили по программе: 90 V – 30 минут; 140 V – 1 час 10 минут.

После электрофоретического разделения образцы белка переносили на мембрану PVDF (Thermo Fisher Scientific, США) методом мокрого блоттинга в буфере для переноса при 120 V в течение 1 часа. Мембраны окрашивали раствором пунцового S для проверки эффективности переноса. Мембрану трижды промывали по 5 минут 0,1 N NaOH для удаления красителя. Затем трижды проводили отмывку однократным буфером PBST по 5 минут. Далее мембрану инкубировали в блокирующем буфере в течение 1 часа при комнатной температуре.

На следующем этапе мембрану инкубировали ночь при 4 °C с моноклональными антителами IgG кролика к FMRP человека и Fmrp мыши, а также поликлональными антителами IgG мыши к GAPDH человека и Gapdh мыши, которые были разбавлены в блокирующем буфере в 2000 и 2500 раз, соответственно. На следующий день трижды проводили отмывку однократным буфером PBST по 5 минут с последующей инкубацией в течение часа при комнатной температуре с поликлональными антителами IgG козы против Fc-фрагментов IgG мыши, а также поликлональными антителами IgG козы против Fc-фрагментов IgG кролика, которые мечены пероксидазой хрена. Оба антитела разводили в 10000 раз.

Проявку хемилюминесцентного сигнала проводили с помощью специфичного субстрата пероксидазы хрена. Детекцию сигнала проводили с использованием системы гель-документации ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, США). Уровень хемилюминесцентного сигнала был переведен в численные значения с помощью программного обеспечения Image Lab Software v6.1 (Bio-Rad, США). Уровень белка FMRP (*Fmrp*) был нормирован относительно уровня сигнала белка GAPDH (*Gapdh*) в аналогичном образце. Результаты анализа представлены как изменение соотношения уровней сигнала FMRP (*Fmrp*) к GAPDH (*Gapdh*) относительно контрольного образца. В случае клеточных линий В-лимфоцитов контрольным образцом служила клеточная линия GM06895; в случае образцов головного мозга лабораторных мышей линии *Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}* контрольной группой служили животные с нормальным аллелем гена *fmr1* аналогичного пола и возраста.

2.2.13. Сборка генетических конструкций

Для подтверждения взаимодействия выбранных микроРНК с мРНК гена *FMR1* была создана модельная система на основе плазмидной конструкции, которая содержит следующие функциональные элементы (Рисунок 3):

- Функциональные элементы, необходимые для доксициклин активируемой экспрессии микроРНК системы Tet-On (Das A., Tenenbaum L., Berkhout B., 2016) (Рисунок 3, А): первый элемент состоит из открытой рамки считывания белка *rtTA*, который расположен между конститутивным промотором CMV и сигналом полиадинилирования (Рисунок 3, А1). Второй элемент последовательно состоит из промотора системы Tet-On, активируемого белком *rtTA* в присутствии доксициклина; транскрибируемой последовательности, содержащей стоп кодон; нуклеотидной последовательности, которая кодирует одну определенную микроРНК; сигнал полиадинилирования (Рисунок 3, А2). Такое расположение гена микроРНК между стоп кодоном и сайтом полиадинилирования описано ранее в литературе (Yi Y.-H. et al., 2010) и является оптимальным, поскольку в таком случае в данном участке РНК отсутствует трансляция, что облегчает формирование

вторичной структуры в последовательности пре-микроРНК и правильному процессингу зрелой формы микроРНК.

- Функциональный элемент, необходимый для синтеза флуоресцентного красного белка FusionRed, состоит последовательно из следующих частей: конститутивного промотора CMV с дополнительным энхансером транскрипции; открытой рамки считывания белка FusionRed; сигнала полиаденилирования (Рисунок 3, Б).

- Функциональный элемент, необходимый для синтеза флуоресцентного зеленого белка eGFP, состоит последовательно из следующих частей: конститутивного промотора hPGK; открытой рамки считывания флуоресцентного зеленого белка eGFP; последовательности 3'-НТО мРНК гена *FMR1* и сигнала полиаденилирования (Рисунок 3, В).

- Функциональные элементы, необходимые для репликации в прокариотической системе: ориджин репликации Col E1 и ген устойчивости к ампициллину под контролем прокариотического промотора (Рисунок 3, Г).

Полная нуклеотидная последовательность контрольной плазмиды без генов микроРНК была депонирована в GenBank под номером MT921016 (Dolskiy A.A. et al., 2021).

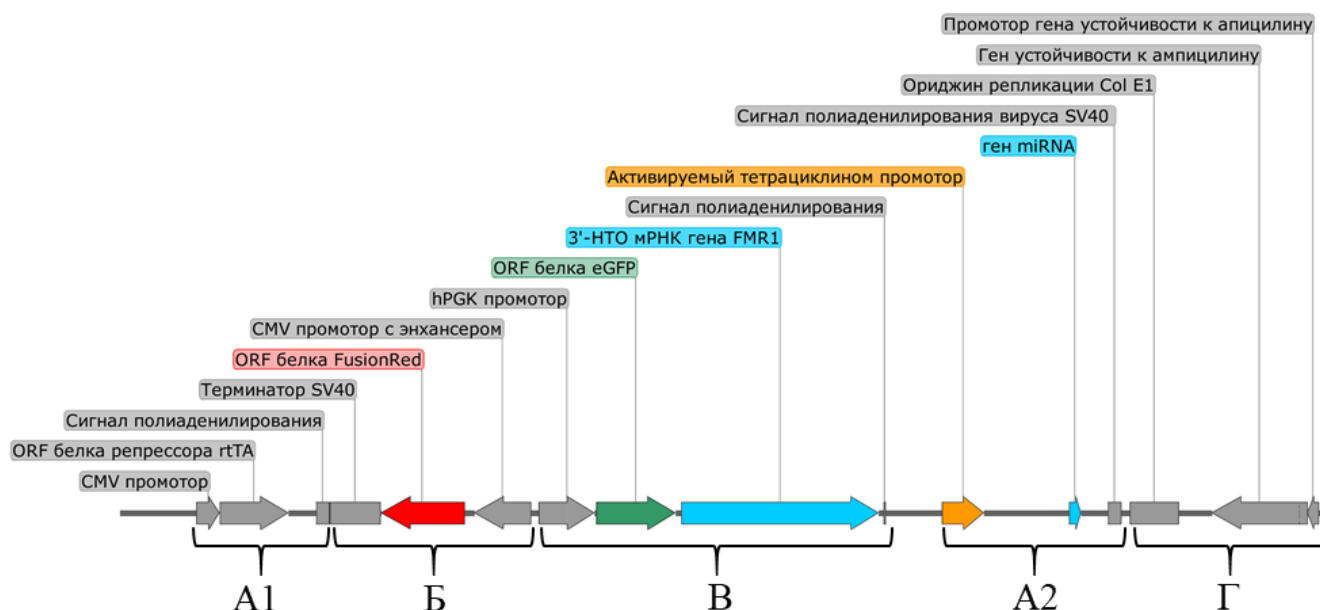


Рисунок 3. Схема генно-инженерной конструкции для анализа взаимодействия микроРНК с 3'-областью мРНК гена *FMR1*. Подробное описание представлено в тексте.

Плазмида со всеми функциональными элементами, но без последовательности микроРНК, служила контролем при анализе уровня флуоресцентного белка eGFP и FusionRed. Каждая плазмида для анализа влияния определенных микроРНК содержала один ген микроРНК, интегрированный по сайту рестрикции *Vru14I*. Последовательности генов микроРНК, а также ДНК последовательность 3'-НТО мРНК гена *FMR1* амплифицировали из ДНК клеточной линии GM06895 с помощью специфических праймеров (Таблица 1, раздел 2.1.6.) и ДНК-полимеразы Q5. Реакция амплификации проведена согласно рекомендациям производителя. Размер ПЦР продуктов определяли с помощью электрофореза, затем фрагменты вырезали из агарозного геля и очищали с помощью набора «QIAquick Gel Extraction Kit» согласно инструкции производителя.

В процессе создания генно-инженерных конструкций использовали стандартные методы, такие как реакция рестрикции фрагментов ДНК, лигирование, фосфорилирование и дефосфорилирование, которые выполнены согласно инструкции производителя (Сибэнзим, Россия). В определенных случаях после эндонуклеазного расщепления требовалось достраивание возникших выступающих липких концов до тупых концов. Для этого смесь фрагментов рестрикции очищали набором «QIAquick PCR Purification Kit». Реакция достройки липких выступающих концов выполнена с использованием ДНК-полимеразы фага T4 согласно инструкции производителя. Полученные продукты очищали набором «QIAquick PCR Purification Kit».

При необходимости продукты реакции эндонуклеазного гидролиза разделяли при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле при 80 V. Участок с нужным фрагментом вырезали из агарозного геля и очищали с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit согласно рекомендациям производителя.

Стандартная реакция лигирования содержала фрагмент вектора и вставки в соотношении 1 к 3 в пересчете на количество реакционноспособных концов ДНК. Реакции выполнены с использованием ДНК-лигазы фага T4 согласно инструкции

производителя с последующей электротрансформацией бактерий лигазной смесью (Раздел 2.2.14.).

2.2.14. Нарботка плазмидных конструкций в прокариотической системе

Нарботку созданных плазмидных конструкций проводили с помощью электрокомпетентных бактерий штамма NEB Stable Competent *E. Coli*. Для этого к 50 мкл клеточной культуры в 10% глицерине добавляли 2 мкл лигазной смеси с дальнейшей инкубацией в течение 5 минут на льду. При необходимости наработать ранее собранную конструкцию – к клеткам добавляли 0,5 нг плазмидной ДНК. Далее полученную смесь переносили в охлажденную на льду кювету с зазором в 0,1 мм и проводили импульсную электротрансформацию при 1800 V длительностью 1 мс. После трансформации, клетки инкубировали в 1 мл жидкой среды LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) при 37 °С в течение 1 часа на шейкере. Далее культуру бактериальных клеток центрифугировали при 2000 g 5 минут и переносили осадок равномерным слоем на поверхность чашки Петри с агаризованной средой LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл). Инкубацию осуществляли в течение 14-16 часов при 37 °С.

Плазмиды, необходимые для дальнейших этапов клонирования и сборки целевых конструкций выделяли набором QIAprep Spin Miniprep Kit, согласно инструкции производителя.

Плазмиды, необходимые для трансформации эукариотических клеток очищали, используя набор Plasmid Maxi Kit, согласно инструкции производителя.

Концентрацию образцов определяли спектрофотометрическим методом с использованием прибора NanoDrop One C (Thermo Fisher Scientific, США). Нарботанные плазмидные конструкции анализировали с помощью мелкощепящей эндонуклеазы Bme18I согласно рекомендациям производителя и последующего электрофоретического разделения фрагментов в агарозном геле (Раздел 2.2.13.). Корректность сборки функциональных элементов итоговых плазмидных конструкции анализировали с помощью секвенирования по Сэнгеру (Раздел 2.2.15.).

2.2.15. Секвенирование фрагментов ДНК по Сэнгеру

Реакцию секвенирования проводили с использованием набора BrilliantDye v3.1 (NimaGen, Нидерланды) по стандартному протоколу согласно рекомендациям производителя. Очистку полученных фрагментов проводили на сорбенте сефадекс G-50 (GE Healthcare, США). На многоразовые колонки для очистки наносили 800 мкл 7% раствора сефадекса, колонки центрифугировали 3 минуты на скорости 2800 g. Затем колонки переносили в чистые 1,5 мл пробирки и полный объем реакционной смеси наносили на осевший сефадекс. Повторно центрифугировали аналогично предыдущему шагу. На следующем этапе полученный раствор высушивали в концентраторе Concentrator Plus в течение 1 часа при 60 °C. Высушенный образец растворяли в 10 мкл высоко деионизированного формамида Hi-Di (Thermo Fisher Scientific, США). Капиллярный электрофорез проводили на генетическом анализаторе ABI 3130XL (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Анализ секвенирования выполнен с помощью программного обеспечения Mega-7 (Институт молекулярной эволюционной генетики, США) и Snapgene v3.2.1 (Северо-Западный университет, США).

2.2.16. Анализ флуоресценции белков eGFP и FusionRed

Культуру НЕК293 в количестве 5×10^4 клеток пересаживали в 24-луночный планшет (Раздел 2.2.2.), и на следующий день при достижении монослоем клеток 80% конфлюентности проводили трансфекцию реагентом Lipofectamine 3000. В каждую лунку вносили смесь объемом 25 мкл, которая содержала 250 нг необходимой плазмидной конструкции, 1 мкл реагента Lipofectamine 3000, 1 мкл реагента P3000. Эффективность трансфекции оценивали на следующий день с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS XL Core (Thermo Fisher Scientific, США). Трансфекцию каждой созданной конструкции для оценки взаимодействия микроРНК с 3'-НТО мРНК гена *FMRI* проводили в трех биологических повторах для анализа сигналов флуоресценции на следующий день после липофекции и в трех биологических повторах для анализа сигналов флуоресценции после индукции экспрессии микроРНК через двое суток после добавления доксициклина

(48 часов). Доксициклин был добавлен в концентрации 1 мкг/мл. Данная концентрация и период инкубации оптимальна для индукции синтеза микроРНК (Chtarto A. et al., 2007; Sheikh S., Coutts A.S., La Thangue N.B., 2017). Клетки через день после трансфектирования созданными конструкциями, а также клетки через двое суток после добавления доксициклина промывали DPBS, удаляли супернатант и добавляли 350 мкл TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific). В каждой лунке 24-луночного планшета клетки ресуспендировали и переносили по 100 мкл в три лунки 96-луночного планшета из темного пластика с круглым дном (три технических повтора для каждого биологического образца). Детекцию флуоресцентного сигнала eGFP и FusionRed проводили с помощью многомодового считывателя планшетов EnVision 2105 (PerkinElmer, США). Анализ флуоресценции белка FusionRed проводился при длине поглощения 488 нм и длине излучения 507 нм. Анализ флуоресценции белка eGFP проводился при длине поглощения 570 нм и длине излучения 615 нм (Приложение 4).

Фоновую флуоресценцию определяли путем измерения сигнала и в клетках без липофекции плазмидной ДНК – полученное значение вычиталось из первичных данных флуоресцентных сигналов. Для каждой созданной конструкции флуоресценцию анализировали в трех биологических и трех технических повторах. Изменение флуоресценции eGFP представлено в виде значений безразмерного коэффициента (K), рассчитанного по следующей формуле:

$$K = \frac{FR_{dox}}{FR}$$

где FR_{dox} – отношение уровня флуоресценции eGFP к уровню флуоресценции FusionRed через 48 часов после добавления доксициклина, FR – аналогичное соотношение на следующий день после трансфекции перед добавлением доксициклина. Результаты флуоресцентного анализа для каждой плазмиды с определенной микроРНК представлены как кратное изменение значений флуоресценции в контрольной плазмиде, рассчитанное следующим образом:

$$X = \frac{Kn}{Kcont}$$

где Kn – значение для плазмиды, содержащей определенную микроРНК, $Kcont$ – значение для контрольной плазмиды без интеграции гена микроРНК. Для проверки значимости различий между группами использовался двухвыборочный t-критерий для независимых выборок. Различия между экспериментами считали достоверными при $P < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Каждая микроРНК ввиду структурных особенностей может иметь несколько генов-мишеней. Также микроРНК обладают синергическим эффектом, поэтому сразу несколько микроРНК могут регулировать активность одного гена (Krek A. et al., 2005). На сегодняшний день на основе обширного биоинформатического анализа с использованием методов секвенирования нового поколения установлена последовательность множества микроРНК и их возможные гены-мишени (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). На основе полученных результатов были созданы открытые базы данных, такие как mirbase.org, targetscan.org, mirdb.org, позволяющие проводить поиск последовательностей микроРНК и их гены-мишени. Выбрав микроРНК, мишенью которых является гена *FMRI*, необходимо провести анализ их экспрессии в клеточных линиях пациентов с разными вариантами аллеля гена *FMRI*, 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 лишь 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 *FMRI* (Landthaler M. et al., 2008). При взаимодействии микроРНК с 3'-НТО мРНК гена, расположенной после открытой рамки считывания репортерного белка, происходит снижение уровня экспрессии белка, связанного с этой регуляторной последовательностью.

В результате исследования уровня экспрессии микроРНК в культурах клеток и анализа их взаимодействия с мРНК гена *FMRI* на первом этапе будут отобраны те микроРНК, которые с наибольшей вероятностью связаны с регуляцией гена *FMRI* и развитием фраксопатий. На следующем этапе, выбранные микроРНК

будут исследованы в мышинной модели FXTAS, обладающей премутантным аллелем гена *fmr1*. Поскольку у мышей проявления заболевания возникают в возрасте 7,5 месяцев, что соответствует позднему развитию синдрома у пациентов, можно предположить, что участие микроРНК может быть важно только на определенных этапах развития организма. Поэтому особое внимание будет уделено исследованию паттерна экспрессии микроРНК в зависимости от пола и возраста, что поможет установить их вовлеченность в патогенез заболеваний.

3.1. Выбор микроРНК, потенциально взаимодействующих с мРНК гена

FMRI

Для исследования взаимосвязи активности гена *FMRI* и экспрессии микроРНК, взаимодействующих с мРНК этого гена, необходимо выбрать те из них, которые будут соответствовать определенным критериям. Поиск микроРНК осуществлялся с использованием референсной последовательности 3'-НТО мРНК гена *FMRI* (UCSC: ENST00000370471.3) с применением открытых баз данных mirbase.org, targetscan.org, mirdb.org. Основными критериями выбора определенной микроРНК служили тип комплементарного связывания с 3'-НТО мРНК гена *FMRI* и значение Target Score (значение величины вероятности взаимодействия микроРНК с целевой мРНК). В результате, было выбрано 7 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 (Таблица 2).

Таблица 2. Выбранные микроРНК с сайтами взаимодействия на 3'-НТО мРНК гена *FMR1*.

№	микроРНК	Последовательность микроРНК	Расположение сайта связывания на 3'-НТО мРНК гена <i>FMR1</i>	Тип связи с 3' - НТО гена <i>FMR1</i> (target scan)	Наличие в базах данных mirbase, targetscan, mirDB	Target Score (mirDB)
1	hsa-miR-182-5p (ID: MIMAT0000259)	UUUGGCAAUG GUAGAACUCA CACU	1524-1531	8mer	+	89
2	hsa-miR-23a-3p (ID: MIMAT0000078)	AUCACAUUGC CAGGGAUUUC C	2078-2085; 1287-1293	8mer; 7mer-A1	+	89
3	hsa-miR-25-3p (ID: MIMAT0000081)	CAUUGCACUU GUCUCGGUCU GA	1752-1759	8mer	+	77
4	hsa-miR-148a-3p (ID: MIMAT0000243)	UCAGUGCACU ACAGAACUUU GU	770-777	8mer	+	89
5	hsa-miR-139-5p (ID: MIMAT0000250)	UCUACAGUGC ACGUGUCUCC AGU	1635-1642	8mer	+	96
6	hsa-miR-221-3p (ID: MIMAT0000278)	AGCUACAUUG UCUGCUGGGU UUC	645-652	8mer	+	91
7	hsa-miR-302a-3p (ID: MIMAT0000684)	UAAGUGCUUC CAUGUUUUGG UGA	244-250; 2274-2280	7mer-m8; 7mer-A1	+	88

На сегодняшний день выделяют 4 канонических типов взаимодействия, которые обозначаются как 6mer, 7mer-A1, 7mer-m8 и 8mer, расположенные по степени увеличения их эффективности (Grimson A. et al., 2007). Под 6mer понимают комплементарное взаимодействие подряд расположенных нуклеотидов в положении 2-7 на 5'-конце микроРНК с мРНК гена-мишени. Под 7mer-A1 понимают аналогичное взаимодействие с дополнительным комплементарным аденином в первом положении микроРНК с геном мишенью. Под 7mer-m8 понимается аналогичное 6mer взаимодействие, но с любым дополнительным комплементарным нуклеотидом в восьмом положении микроРНК. Под 8mer понимается наиболее точный вариант взаимодействия, который включает в себя все предыдущие типы комплементарного связывания микроРНК и гена-мишени. При выборе микроРНК, взаимодействующих с мРНК гена *FMRI*, одним из критериев отбора служило наличие хотя бы одного 8mer взаимодействия. Такие микроРНК наиболее вероятно взаимодействуют с геном *FMRI*. Также была выбрана hsa-miR-302a-3p с двумя сайтами канонического взаимодействия: 7mer-m8, 7mer-A1.

Следующим важным критерием выбора микроРНК, взаимодействующих с геном *FMRI*, является величина Target Score, которая определяется на основе математического алгоритма (Chen Y., Wang X., 2020) и ее значение лежит в основе ранжирования возможности взаимодействия микроРНК с определенным геном-мишенью. Данный критерий – безразмерная величина от 0 до 100. Чем больше оценка, тем выше достоверность вероятности взаимодействия микроРНК с геном-мишенью. При оценке ниже 50 – вероятность взаимодействия считается недостоверной. Начиная от 60 баллов, существует достоверная вероятность их взаимодействия (Chen Y., Wang X., 2020). Все 7 отобранных микроРНК соответствуют данному критерию.

3.2. Исследование активности гена *FMR1* в клеточных культурах В-лимфоцитов

В исследовании экспрессии выбранных микроРНК в зависимости от активности гена *FMR1* использованы постоянные клеточные культуры В-лимфоцитов с различным генотипом. Четыре клеточные линии (GM06895, GM06865, CPG166, CPG8) охарактеризованы как норма. Размер повтора гена *FMR1* в двух клеточных линиях (GM06891, GM06891E) соответствует премутации. Стоит отметить, что в линии GM06891E наблюдалась соматическая нестабильность CGG повтора, тогда как в остальных клеточных культурах он не изменялся в процессе их культивирования. В культуре GM06897 размер повтора соответствует аллелю полной мутации, однако промоторная область гена *FMR1* не метилирована. Аллель гена *FMR1* в трех клеточных линиях (GM04025, CPG18, CPG7) охарактеризован как полная мутация с наличием метилирования промоторной области. Все клеточные линии за исключением CPG8 получены от пациентов мужского пола. 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. Однако для некоторых из клеточных линий активность гена *FMR1* не была известна, другие культивировались в течение многих пассажей и уровень экспрессии мРНК и белка FMRP мог измениться вследствие длительного культивирования. В связи с этим во всех клеточных линиях было необходимо установить две характеристики, определяющие активность гена *FMR1*, – уровень экспрессии мРНК и уровень белка FMRP.

Для нормировки результатов анализа уровня экспрессии мРНК *FMR1* и белка FMRP, на основе ранее опубликованных данных, решено использовать клеточную линию GM06895 с нормой гена *FMR1*, как стандартную культуру для нормировки результатов в случае исследования заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой (Biacsi R., Kumari D., Usdin K., 2008; Kumari D., Usdin K., 2014). Для анализа данных ПЦР в реальном времени решено взять *GAPDH* в качестве гена домашнего хозяйства, применяемый в работах по исследованию заболеваний,

ассоциированных с синдромом ломкой X-хромосомы с использованием В-лимфоцитов (Brendel C. et al., 2013; Tabolacci E. et al., 2016). Показано, что *GAPDH* является стабильно экспрессирующимся геном (Annese A. et al., 2018; Li P. et al., 2021). Однако существует информация о том, что использование только одного гена *GAPDH* может привести к некорректной интерпретации результатов в связи с его возможным изменением экспрессии в разных типах образцов и в ответ на изменения условий культивирования клеточных линий (Hruz T. et al., 2011; Schmittgen T.D., Zakrajsek V.A., 2000). Для того чтобы избежать ошибок, связанных с возможными изменениями его экспрессии – применяется метод нормировки с использованием двух генов (Fischer M., Skowron M., Berthold F., 2005). В качестве второго гена домашнего хозяйства был использован *EIF4A2*, для которого показана стабильная экспрессия (Annese A. et al., 2018; Li P. et al., 2021). Нормировка уровня сигнала белка FMRP выполнена относительно уровня сигнала *GAPDH*. Использование этого белка для контроля загрузки образца широко применяемая методика. Тем не менее, уровень *GAPDH* может изменяться в разных типах клеточных линий, либо типов тканей, что осложняет их сравнение друг с другом (Hruz T. et al., 2011; Schmittgen T.D., Zakrajsek V.A., 2000). Однако в работе используется только один тип образцов – постоянные клеточные линии В-лимфоцитов, культивируемые в постоянных условиях, что делает нормализацию с использованием белка *GAPDH* корректной. Таким образом, при исследовании экспрессии мРНК гена *FMRI* и белка FMRP их нормированный уровень в клеточной линии GM06895 был принят за единицу. Значения экспрессии мРНК и белка в остальных клеточных культурах представлены как безразмерные величины, которые отражают во сколько раз отличается то или иное значение относительно аналогичных показателей в контрольной клеточной линии (Раздел 2.2.9. – анализ экспрессии мРНК гена *FMRI*; раздел 2.2.12. – анализ экспрессии белка FMRP). В таблице 3 приведены показатели уровня экспрессии мРНК гена *FMRI* и белка FMRP в 10 клеточных линиях, нормированных на аналогичные показатели в линии GM06895, а также результаты анализа размера CGG повтора и наличия метилирования промоторной области гена *FMRI*.

Таблица 3. Характеристика используемых клеточных культур. Зеленый цвет – достоверное повышение уровня экспрессии мРНК гена *FMRI* или белка FMRP. Оранжевый цвет – достоверное снижение уровня экспрессии уровня мРНК гена *FMRI* или белка FMRP.

Клеточная культура	Наличие метилирования	Размер CGG повтора	Аллель гена <i>FMRI</i>	Отн. ур. мРНК гена <i>FMRI</i> *	Отн. ур. белка FMRP*
GM06895	–	23	Норма	1	1
GM06865	–	30	Норма	1,17	0,3
CPG166	–	38	Норма	0,85	1,27
CPG8**	–	27; 37	Норма	0,64	0,87
GM06891	–	167	Премутация	2,07	0,71
GM06891E	–	194	Премутация	0,89	0,95
GM06897	–	240	Неметилированная полная мутация	0,7	4,56
GM04025	+	645	Полная мутация	Не обнаружен	Не обнаружен
CPG18	+	200	Полная мутация	Не обнаружен	Не обнаружен
CPG7	+	400	Полная мутация	Не обнаружен	Не обнаружен

* Уровень экспрессии мРНК гена *FMRI* и белка FMRP нормирован на аналогичные показатели в линии GM06895; ** Клеточная линия CPG8 получена от пациента женского пола, в связи с этим является носителем двух аллелей гена *FMRI*.

В результате анализа экспрессии гена *FMRI* установлено, что между его уровнем в клеточной линии GM06865, которая также обладает нормальным генотипом, и в культуре GM06895 нет достоверных различий. В клеточных линиях CPG166 и CPG8, которые также обладают нормальным аллелем гена *FMRI*, уровень экспрессии мРНК этого гена достоверно снижен и составляет 0,85 и 0,64 относительно аналогичных значений клеточной линии GM06895 ($P < 0,05$).

Уровень экспрессии мРНК гена *FMRI* в клеточной линии GM06891, несущей премутантный аллель, достоверно превышает уровень экспрессии в клеточной линии GM06895 в 2,07. В клеточной линии – GM06891E с премутантным аллелем

гена *FMR1*, в которой размер CGG повтора увеличен относительно клеточной линии GM06891, уровень экспрессии мРНК составил 0,89 относительно уровня экспрессии в нормальной клеточной линии GM06895 ($P < 0,05$). В ранее опубликованных работах существуют данные о повышенной экспрессии гена *FMR1* (Ноем G. et al., 2011) с использованием гена-нормировки *GUS*. Тем не менее, для этого гена показана нестабильность уровня мРНК в иммортализованных линиях клеток лимфобластоидного ряда и во фракциях В-лимфоцитов в разных временных точках в течение эксперимента (Lossos I.S. et al., 2003), что может привести к различиям в результатах уровня экспрессии относительно исследований, использующих другие гены домашнего хозяйства.

В клеточной линии GM06897 с неметирированной полной мутацией уровень экспрессии мРНК гена *FMR1* составил 0,7, что достоверно ($P < 0,05$) ниже уровня экспрессии в клеточной линии GM06895. В ранее опубликованных работах показан повышенный уровень экспрессии мРНК этого гена у пациентов (Tassone F. et al., 2000). Однако, аналогично исследованиям пациентов с премутационным аллелем, в работе использован один ген нормировки *GUS*, что может изменить интерпретацию данных.

В трех линиях клеток, полученных от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы (GM04025, CPG18 и CPG7), обнаружено отсутствие мРНК гена *FMR1*, что является характерным признаком клеточных линий с полной мутацией гена *FMR1* за счет метилирования его промоторной области (Hagerman R.J. et al., 2017).

В результате анализа уровня белка FMRP показано, что в клеточной линии GM06865 уровень белка FMRP составил 0,3 относительно клеточной линии GM06895, однако уровень экспрессии мРНК гена *FMR1* не изменен относительно контроля. В клеточных линиях CPG166 и CPG8 с нормальным аллелем гена *FMR1* и сниженной экспрессией мРНК, уровень белка FMRP – 1,27 и 0,87, соответственно и достоверно не отличается от аналогичных значений в клеточной линии GM06895. В клеточной линии GM06891 с премутантным аллелем гена *FMR1* и повышенной экспрессии мРНК уровень FMRP достоверно снижен и составил 0,71 относительно

клеточной линии GM06895. В клеточной линии GM06897 с неметилованной полной мутацией гена *FMR1* и сниженной экспрессией мРНК уровень белка FMRP достоверно выше значений клеточной линии GM06895 и составил 4,45. В линиях GM04025, CPG7 и CPG18 белок FMRP отсутствует, что характерно для полной мутации в связи с полным метилированием промоторной области гена *FMR1* и отсутствием его мРНК (Hagerman R.J. et al., 2017).

Таким образом показано, что в линиях, которые обладают полной мутацией гена *FMR1* с присутствием метилирования промоторной области – мРНК и белок FMRP отсутствуют, что является характерным признаком этого варианта гена у пациентов (Hagerman R.J. et al., 2017). В результате анализа полученных данных, уровень экспрессии мРНК и белка FMRP напрямую не связан с нормой и премутацией гена *FMR1* в постоянных клеточных линиях В-лимфоцитов. (Таблица 3). Вероятно, это связано с выбором генов нормировки *GAPDH* и *EIF4A2*, что отличается от работ, в которых использован ген *GUS* с выявленной нестабильной экспрессией (Ноем G. et al., 2011). Для нормировки результатов анализа экспрессии мРНК и белка FMRP использовались значения клеточной линии GM06895, аналогично ранее опубликованным литературным данным (Kumari D., Usdin K., 2014). Для нормировки значений уровня белка FMRP в каждой линии клеток использовали контроль *GAPDH* (Tabolacci E. et al., 2016). Также для всех постоянных клеточных линий существует вероятность изменения экспрессии генов в процессе их культивирования (Neumann E. et al., 2010). Тем не менее, использование одной клеточной линии GM06895, относительно которой нормированы значения экспрессии мРНК гена *FMR1* и уровень FMRP во всех используемых линиях, позволяет корректно сравнивать результаты. К тому же, 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). Поэтому для исследования корреляций между уровнем экспрессии микроРНК и активностью гена *FMR1*, главным показателем является соотношение значений уровня экспрессии мРНК этого гена и белка FMRP. Таким образом, проведение исследования уровня

экспрессии выбранных микроРНК в зависимости от активности гена *FMRI* в используемых клеточных культурах позволит экспериментально установить возможные корреляции. Критерием при изучении уровней экспрессии микроРНК в зависимости от активности гена *FMRI* 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 4).

Таблица 4. 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, не вошедшая в группы. ** 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* с отсутствием синтеза мРНК и белка FMRP. В группу 1 вошли клеточные линии GM06865 и GM06891 с коэффициентом меньше единицы. Его значения для этих линий составляют 0,26 и 0,34, соответственно.

Клеточная группа характеризуется нормальным или повышенным уровнем экспрессии мРНК гена *FMR1* и сниженным уровнем белка FMRP относительно аналогичных значений в клеточной линии GM06895. В группу 2 вошли клеточные культуры GM06891E, CPG8 и CPG166 с коэффициентом больше единицы. Его значения для этих линий клеток составили 1,07, 1,36 и 1,49, соответственно. Эта группа клеточных линий характеризуется сниженной экспрессией мРНК гена *FMR1* при отсутствии изменения уровня белка FMRP относительно аналогичных значений в клеточной линии GM06895. В культуре GM06897 с неметирированной полной мутацией нами показана сниженная экспрессия мРНК при наибольшем количестве белка FMRP среди всех клеточных линиях, используемых в работе. В мире, было зафиксировано всего несколько таких случаев. Пациент, обладающий данным вариантом гена проявлял признаки FXTAS, связанного с премутантным аллелем гена *FMR1* (Loesch D.Z. et al., 2012; Smeets H.J.M. et al., 1995). Данная культура клеток отличается повышенным количеством белка FMRP при пониженной экспрессии мРНК гена *FMR1*, что не позволяет включить ее в группу 2 и далее она 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.

3.3. Экспрессия микроРНК в группах клеточных линий В-лимфоцитов

Уровень экспрессии микроРНК, выбранных на основе определенного типа связывания с мРНК гена *FMR1* и значения Target Score, был исследован в пяти группах клеточных линий В-лимфоцитов с различной активностью гена *FMR1*. Нормировка уровня микроРНК выполнена относительно уровня экспрессии двух малых ядрышковых РНК SNORD48 и SNORD44 в культуре GM06895. Таким образом, нормированный уровень экспрессии каждой из семи микроРНК в данной линии клеток был принят за единицу. 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 контрольной клеточной линии (Рисунок 4).

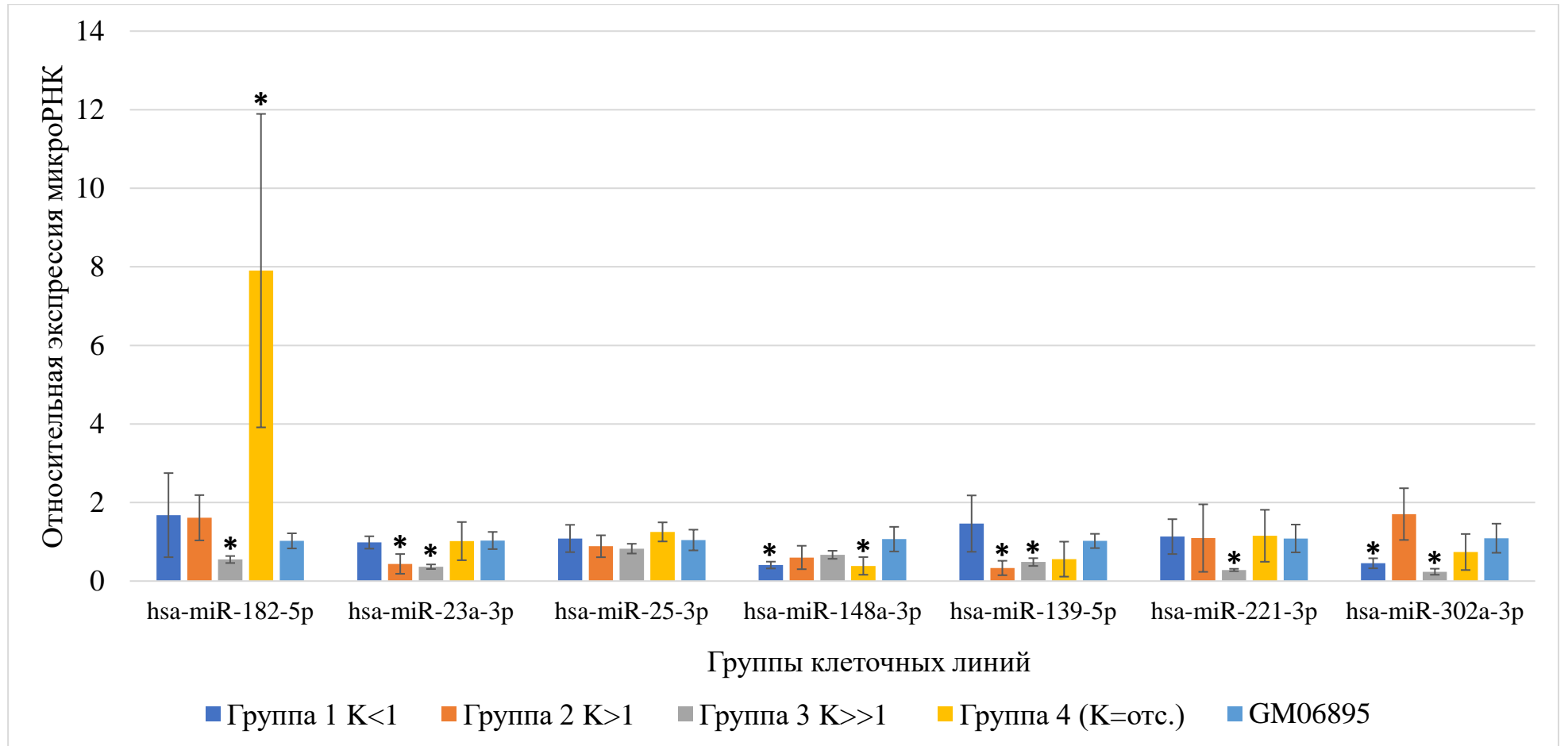


Рисунок 4. Относительный уровень экспрессии исследуемых микроРНК в группах клеточных линий с различной активностью гена *FMRI*. (*) Достоверное изменение уровня экспрессии определенной микроРНК относительно контрольной клеточной линии GM06895, $P < 0,05$; K = отс. – клеточные линии с полной мутацией и отсутствием активности гена *FMRI*.

В результате анализа микроРНК в группах клеточных линий выявлено:

hsa-miR-182-5p: не обнаружено достоверных различий экспрессии этой микроРНК в группах 1 и 2 в сравнении с аналогичными показателями в клеточной линии GM06895, тогда как уровень экспрессии, наблюдаемый в группе 3, составил 0,55 ($P < 0,05$). Экспрессия в группе 4 составляла 7,9 ($P < 0,05$).

hsa-miR-23a-3p: не обнаружено достоверных различий в значениях экспрессии данной микроРНК в группах 1 и 4 относительно клеточной линии GM06895, в то время как уровень экспрессии, наблюдаемый в группе 2, 3 составил 0,44, 0,36, соответственно ($P < 0,05$).

hsa-miR-25-3p: уровень экспрессии данной микроРНК во всех группах клеток достоверно не отличается.

hsa-miR-148a-3p: в группах 1 и 4 уровень экспрессии данной микроРНК составил 0,41 и 0,39, соответственно, в сравнении с аналогичным значением в культуре GM06895 ($P < 0,05$), тогда как в группе 2 и 3 нет достоверных различий.

hsa-miR-139-5p: в группе 1 и 4 нет достоверных отличий относительно клеточной линии GM06895. В группах 2 и 3 экспрессия hsa-miR-139-5p составила 0,33, 0,48 соответственно относительно уровня экспрессии в линии GM06895 ($P < 0,05$).

hsa-miR-221-3p: различий в уровне экспрессии данной микроРНК между группами 1, 2, 4 и контрольной линии клеток не обнаружено, тогда как в группе 3 уровень экспрессии составил 0,28 относительно контрольных значений экспрессии в линии GM06895 ($P < 0,05$).

hsa-miR-302a-3p: в группах 1, 3 значения экспрессии данной микроРНК – 0,45, 0,24, соответственно ($P < 0,05$). В группах 2 и 4 нет различий в уровне микроРНК в сравнении с контрольной линией.

Можно предположить, что увеличение экспрессии микроРНК может быть связано со снижением активности гена *FMR1* и наоборот – уменьшение экспрессии микроРНК может влиять на увеличение активности этого гена. В данной работе все используемые клеточные линии были разделены на группы в зависимости от

коэффициента – соотношения уровня белка FMRP к уровню экспрессии мРНК гена *FMR1*. 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. 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*. Аналогичная картина была уже показана для ряда микроРНК. Так, для miR-125a, которая участвует в пути передачи сигналов метаболитных рецепторов глутамата первого типа и связана с белком FMRP, показано, что ее уровень повышен в образцах мочи в выборке из 19 детей с синдромом ломкой X-хромосомы (Putkonen N. et al., 2020). Тогда как в другом исследовании miR-125a в образцах крови пациентов ее уровень достоверно не изменялся у пациентов с синдромом тремора и атаксии, ассоциированного с ломкой X-хромосомой (Alvarez-Mora M.I. et al., 2013). Таким образом, hsa-miR-182-5p может быть исследована как новый дополнительный диагностический маркер при синдроме ломкой X-хромосомы.

3.4. Анализ взаимодействия микроРНК с 3'-НТО мРНК гена *FMRI*

Помимо анализа экспрессии микроРНК в группах клеточных линий с разной активностью гена *FMRI*, необходимо экспериментально подтвердить их взаимодействие с 3'-НТО мРНК этого гена. В результате этого, возможно установить, какие микроРНК напрямую могут быть связаны с нарушением регуляции гена *FMRI*. Такие микроРНК в дальнейшем будут исследованы в мышинной модели FXTAS в зависимости от возраста для определения паттерна их экспрессии. Для анализа взаимодействия 3'-НТО мРНК гена *FMRI* с исследуемыми микроРНК необходимо провести индукцию экспрессии микроРНК с использованием плазмидных конструкций (Рисунок 5).

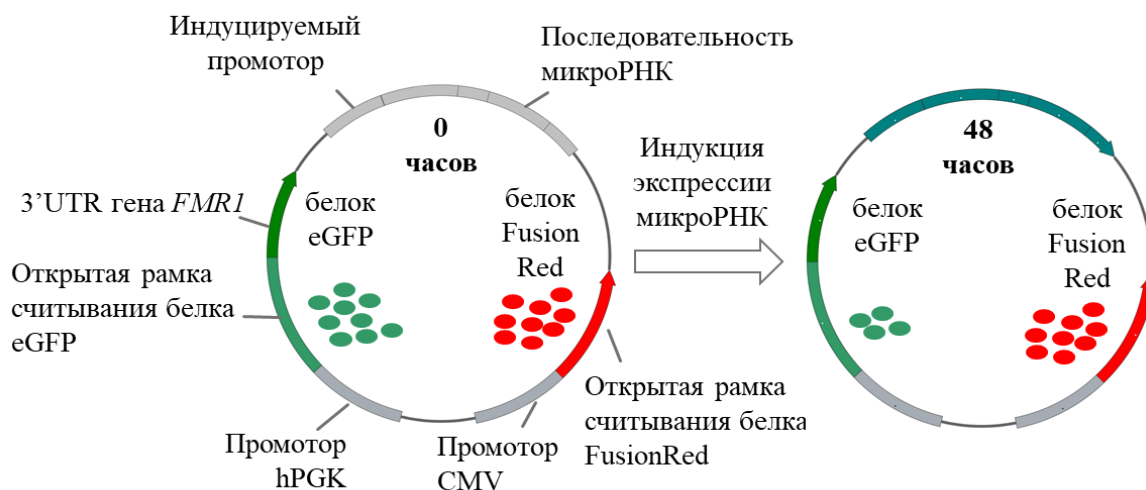


Рисунок 5. Схема эксперимента по определению взаимодействия 3'-НТО мРНК гена *FMRI* с исследуемыми микроРНК.

Экспрессия созданных плазмид происходила в клеточной культуре НЕК293, так как она соответствует клеточной системе человека с аналогичными механизмами процессинга микроРНК (Landthaler M. et al., 2008). В начальный момент времени после липофекции этой линии 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 *FMRI*. Также эта конструкция содержит последовательность микроРНК под регуляцией индуцируемого доксициклином промотора. В случае, если происходит связывание зрелой микроРНК с последовательностью 3'-НТО мРНК гена *FMRI*, которая расположена в мРНК белка eGFP, снижается количество этого репортерного белка.

Для проверки работоспособности созданных генетических конструкций был проанализирован уровень экспрессии зрелых форм исследуемых микроРНК в начальный момент времени и через 48 часов после индукции их экспрессии доксициклином (Раздел 2.2.16). Использование в клеточных линиях таких промоторов, как hPGK и CMV может повлиять на экспрессию генов домашнего хозяйства (Bäck S. et al., 2019; Marcinowski L. et al., 2012), на которые происходит нормировка экспрессии исследуемых микроРНК, причем степень влияния будет зависеть от эффективности липофекции. Также необходимо учитывать, что клеточная линия НЕК293 получена из эмбриональной почки человека и в ней может присутствовать экспрессия микроРНК, характерных для генома человека, включая 7 выбранных нами микроРНК. Для исключения этих эффектов и корректной оценки уровня экспрессии экзогенных микроРНК, закодированных в плазмидных конструкциях, нормировка уровня экспрессии выполнена относительно уровня экспрессии мРНК флуоресцентного белка FusionRed. Отношение уровня экспрессии микроРНК к мРНК FusionRed при транзientной экспрессии плазмиды, не содержащей экзогенную последовательность микроРНК в клеточной линии НЕК293, в начальный момент времени принят за единицу. Уровни экспрессии каждой микроРНК представлены как безразмерные величины, которые отражают во сколько раз отличается среднее нормированное значение

экспрессии определенной микроРНК относительно аналогичных показателей в клеточной линии с контрольной плазмидной конструкцией без экзогенной микроРНК через 48 часов после добавления доксициклина. Исследование проведено в трех биологических повторах. В результате показано, что уровень 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 и hsa-miR-302a-3p достоверно увеличивался в 24,11, 6,71, 3,09, 5,11, 5,32, 13,52 и 5,02 раза, соответственно ($P < 0,05$), после индукции доксициклином (Рисунок 6). В связи с этим, становится возможным изучить их взаимодействие с 3'-НТО мРНК гена *FMRI* с использованием данных плазмидных конструкций в трансгенных клеточных линиях НЕК293.

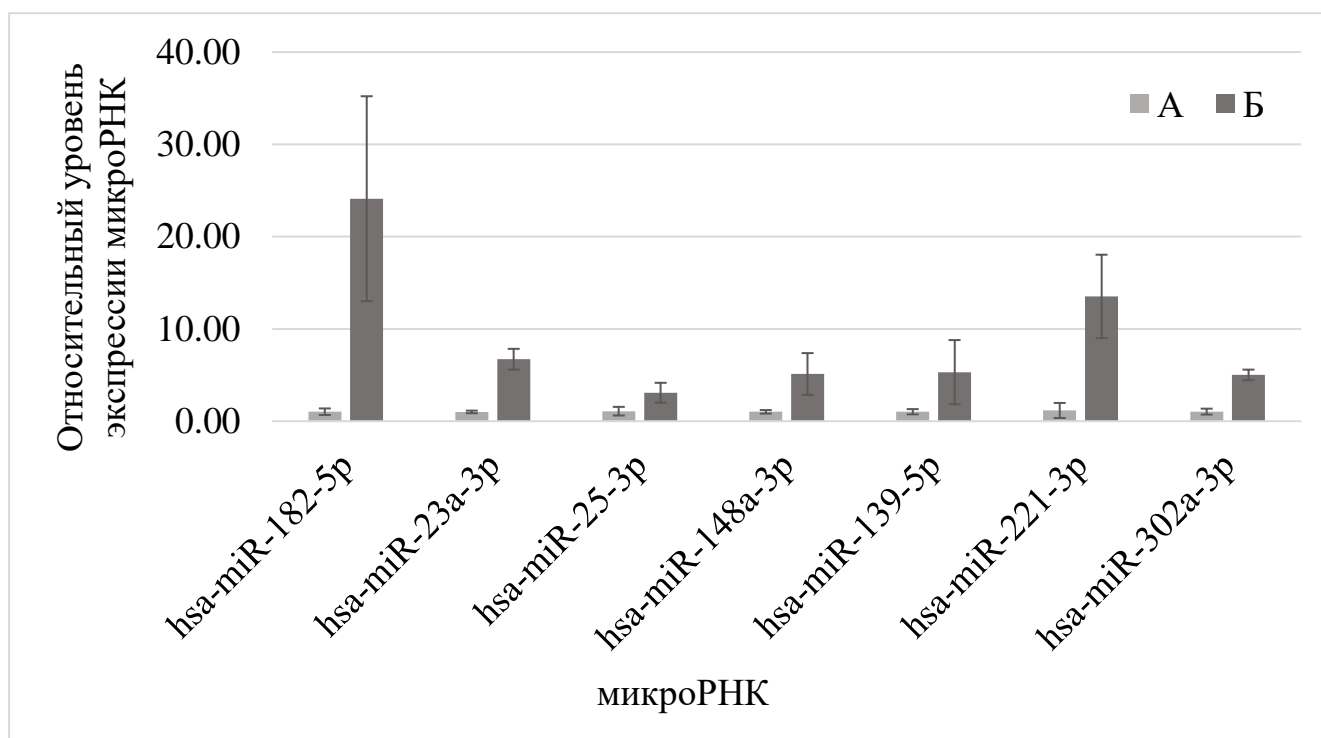


Рисунок 6. Изменение уровня экспрессии микроРНК в клеточной линии НЕК293. А – уровень экспрессии микроРНК после трансфекции созданными плазмидными конструкциями перед добавлением доксициклина; Б – уровень экспрессии микроРНК через 48 часов после добавления доксициклина. Все изменения экспрессии достоверно отличаются от аналогичных значений в начальный момент времени $P < 0,05$.

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*. Однако на уровень флуоресцентного сигнала могут влиять дополнительные факторы, такие как эффективность липофекции, то есть количество клеток экспрессирующих созданные плазмидные конструкции. Поэтому 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 в остальных трансгенных клеточных культурах, содержащих плазмидную конструкцию с определенной микроРНК, 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 7).

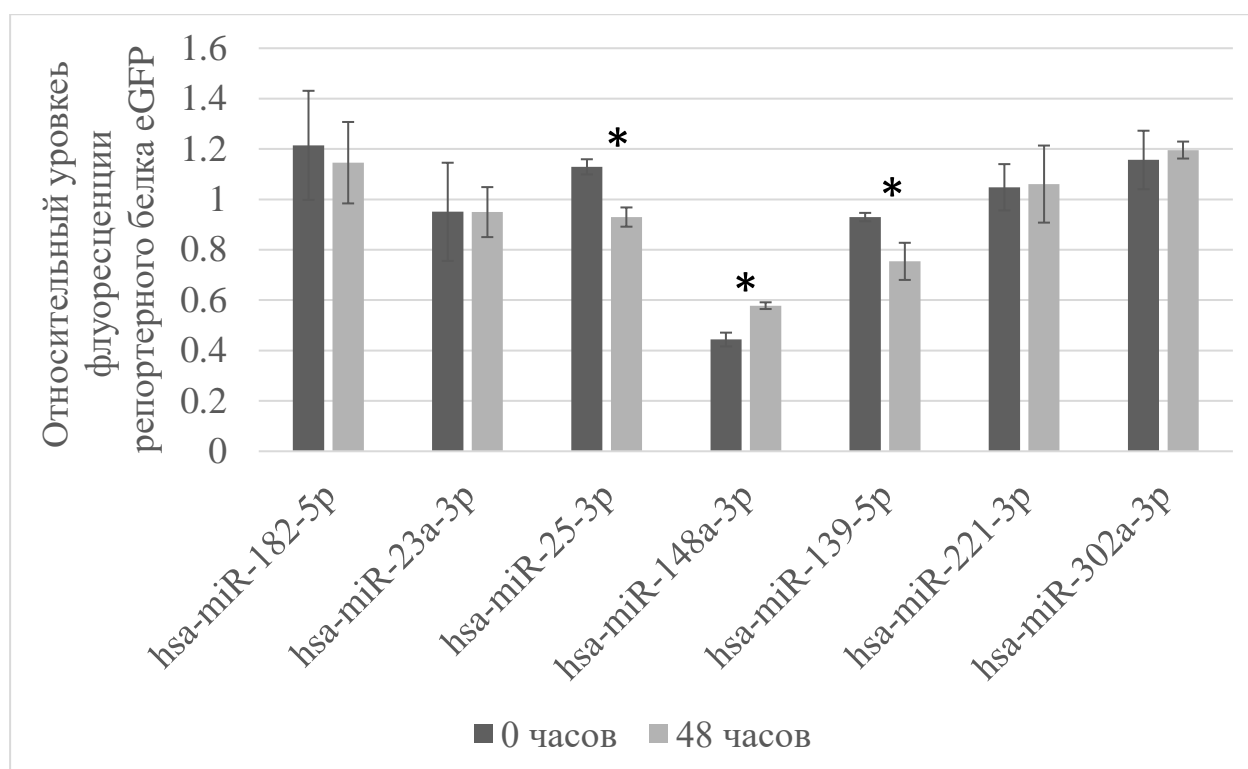


Рисунок 7. Анализ взаимодействия микроРНК с 3'-НТО мРНК гена *FMRI*. Относительный уровень экспрессии белка eGFP до (0 часов) и после (48 часов) индукции экспрессии микроРНК после активации доксициклином. (*) Значимые различия, $P < 0,05$.

Для микроРНК hsa-miR-182-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-221-3p и hsa-miR-302a-3p достоверного изменения уровня экспрессии не обнаружено. В случае hsa-miR-148a-3p – уровень флуоресценции репортерного белка увеличился с 0,44 до 0,58 после 48 часов индукции ($P < 0,05$). В клеточных линиях, трансфицированных плазмидами, несущими гены hsa-miR-25-3p и hsa-miR-139-5p, сигнал зеленого белка снизился после индукции доксициклином с 1,13 до 0,93 и с 0,93 до 0,75 ($P < 0,05$), соответственно (Рисунок 7). Так как при экспрессии hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-25-3p и hsa-miR-139-5p в трансгенных клеточных линиях, уровень флуоресцентного сигнала eGFP изменен, они могут потенциально участвовать в регуляции активности гена *FMRI* и в развитии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, непосредственно взаимодействуя с мРНК этого гена.

В таблице 5 представлены данные результатов анализа экспрессии микроРНК в группах клеточных линий, а также анализа их взаимодействия с 3'-областью мРНК гена *FMRI*.

Таблица 5. Общие данные по результатам анализа уровня микроРНК в клеточных группах В-лимфоцитов и исследования их взаимодействия с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*. Жирным шрифтом отмечены микроРНК, которые выбраны для анализа их экспрессии в линии мышей *Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}*; $K = \frac{\text{уровень белка FMRP}}{\text{уровень мРНК гена } FMR1}$; 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>FMR1</i>		НЕТ	НЕТ	ДА	ДА	ДА	НЕТ	НЕТ
Группы клеток								
Группа 1 K<1	Клеточные линии, несущие норму и премутацию гена <i>FMR1</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>FMR1</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>FMR1</i>	7,90	1,02	1,25	0,39	0,56	1,15	0,7

Таким образом, с использованием открытых 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 оценкой вероятности 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).

Для исследования связи экспрессии микроРНК с активностью гена *FMR1* выбраны клеточные линии В-лимфоцитов с различным размером CGG повтора. В результате оценки активности этого гена в выбранных линиях, показано, что размер повторенной последовательности не всегда связан с активностью гена *FMR1*. Увеличение экспрессии микроРНК может привести к уменьшению количества мРНК гена-мишени, а также может приводить к снижению этапа трансляции без снижения уровня мРНК. Итогом этого становится изменение количества белка – при снижении экспрессии микроРНК, уровень белка должен возрасти (Huang J. et al., 2010). Таким образом, при использовании клеточных линий В-лимфоцитов важен не только генотип, но и активность гена *FMR1* – уровень экспрессии мРНК и белка, что позволит определить связь с экспрессией микроРНК, которые взаимодействуют с 3'-НТО мРНК. 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*.

Помимо анализа экспрессии микроРНК в группах клеточных линий с разной активностью гена *FMR1*, было необходимо экспериментально подтвердить их взаимодействие с 3'-НТО мРНК этого гена. Основной недостаток программ, которые предсказывают мишени для определенных микроРНК в том, что разные подходы создают неодинаковые списки потенциальных генов-мишеней (Sethupathy P., Megraw M., Hatzigeorgiou A.G., 2006), что предполагает наличие

ложноположительных и ложноотрицательных результатов в дальнейших экспериментах. Тем не менее, такие способы поиска микроРНК, которые взаимодействуют с 3'-НТО мРНК генов, полезны для выявления потенциальных мишеней, которые впоследствии могут быть подтверждены экспериментально (Lewis B.P. et al., 2003). Существуют разные подходы, которые позволяют экспериментально подтвердить влияние микроРНК на гены-мишени. К ним можно отнести выделение комплекса RISC с использованием антител к Ago-2 с последующей очисткой и секвенированием нуклеотидных последовательностей, находящихся в комплексе с ним (Beitzinger M. et al., 2007); сверхэкспрессия гомологичных микроРНК – экзогенных миРНК с последующим секвенированием транскриптома (Lim L.P. et al., 2005), а также другие подходы по подтверждению функций определенных микроРНК (Elmen J. et al., 2008). В основном эти методы выявляют кандидатные гены-мишени, активность которых меняется при изменении экспрессии микроРНК. Однако в этом случае не известно, связаны ли эти изменения напрямую, или изменение экспрессии гена-мишени вызвано другими процессами, на которые влияет исследуемая микроРНК. Поэтому эффективной стратегией, при которой наиболее вероятно можно доказать то, что микроРНК влияет на изменение активности гена-мишени, является определение активности и детекция сигнала от репортерного белка, который непосредственно связан с последовательностью-мишенью для определенной микроРНК. Такие системы, в которых экспрессия эндогенной микроРНК влияет на детектируемый сигнал, используются в плазмидных конструкциях с 3'-НТО мРНК гена-мишени, связанной с люциферазой. Люцифераза светлячка (*Photinus pyralis*) катализирует АТФ-зависимое окислительное декарбоксилирование люциферина, производя световое излучение на длине волны 562 нм (Muthukumaran T. et al., 2014). Тем не менее, данная детекция сигнала является непрямой с длительной пробоподготовкой, которая включает в себя лизис клеточной культуры и добавление субстратов. Кроме того, на ее эффективность может влиять качество пробоподготовки на всех этих этапах. Чтобы избежать этих недостатков, была создана плазмидная конструкция, главными функциональными элементами

которой являются последовательности, необходимые для доксициклин-активируемой экспрессии микроРНК, а также для постоянной экспрессии репортерного белка eGFP, открытая рамка считывания которого связана с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*. Если микроРНК взаимодействует с 3'-НТО мРНК, ее экспрессия должна снижать уровень флуоресцентного белка. В отличие от системы, использующей люциферазу, детекция флуоресцентного сигнала является прямой, не зависит от добавления субстрата и выполняется непосредственно с использованием клеточных культур без их лизиса. 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). Так, при повышенной экспрессии miR-424-5p было обнаружено увеличение белкового продукта Endophilin-1, в мРНК которого присутствует сайт связывания этой микроРНК (Lin M. et al., 2019). Аналогичным образом может действовать hsa-miR-148a-3p в случае мРНК гена *FMR1*. Однако при исследовании ее экспрессии в клеточных культурах В-лимфоцитов не было показано корреляций между ее экспрессией и активностью гена *FMR1* в разных группах клеточных линий.

В случае микроРНК, которые являются негативными регуляторами активности генов, увеличение их экспрессии должно быть связано со снижением активности гена *FMR1*, 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 *FMR1* 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*. Вероятно, она может участвовать в путях, связанных с белком FMRP, и при его отсутствии в случае полной мутации наблюдается повышение ее экспрессии. Аналогичная картина была ранее показана для некоторых микроРНК (Putkonen N. et al., 2020) и, вероятно, mmi-miR-182-5p может служить маркером синдрома ломкой X-хромосомы. 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.

3.5. 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 мышьяная 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 мышьяной 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).

В начале эксперимента животные были генотипированы – установлен точный размер CGG повтора премутантного аллеля гена *fmr1* в образцах фаланг пальцев (Рисунок 8).

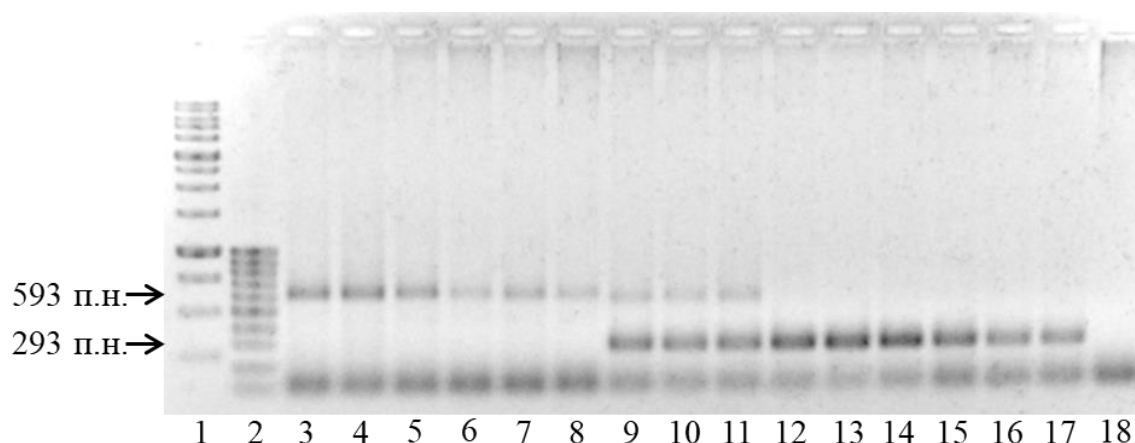


Рисунок 8. Пример определения генотипа мышьяных моделей FXTAS. 1 – маркер молекулярного веса ДНК 1000 п. н.; 2 – маркер молекулярного веса ДНК 100 п. н.; 3-5 – самки гомозиготы, обладающие двумя премутантными аллелями; 6-8 – самцы гемизиготы, носители премутации гена *fmr1*; 9-11 – самки гетерозиготы, носители аллелей нормы и премутации гена *fmr1*; 12-14 – самки, обладающие двумя нормальными аллелями гена *fmr1*; 15-17 – самцы, обладающие нормальным аллелем гена *fmr1*; 18 – отрицательный контроль ПЦР.

В линии $Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}$ ранее описана нестабильность CGG повтора в гене *fmr1* (Bontekoe C.J.M. et al., 2001). Неоднородность размера повтора премутантного аллеля в исследуемых группах животных может привести к тому, что будет наблюдаться разная активность гена *fmr1*. Это повлияет на дальнейшее исследование взаимосвязи уровня мРНК и белка этого гена с уровнем экспрессии микроРНК, взаимодействующих с мРНК гена *FMR1*. В результате анализа установлено, что нормальный аллель гена *fmr1* несет 8 триплетов CGG. Также показано, что премутантный аллель имеет 108 CGG повторов. Размер CGG повтора в премутантном аллеле не отличается у всех исследуемых животных, однако увеличен относительно описанного в литературе (Berman R., Willemsen R., 2009). Эти мыши получены от одного предка, у которого, вероятно, произошла экспансия CGG повтора. 108 CGG триплетов соответствуют премутантному аллелю и размер повтора одинаков у всех животных обладающих этим аллелем, что позволяет провести дальнейшее исследование активности гена *fmr1* на уровне мРНК и белка *Fmrp*.

В исследовании экспрессии микроРНК, а также мРНК гена *fmr1* и уровня белка *Fmrp* в головном мозге модельных животных использовано 12 самцов и 18 самок, разделенных на группы в зависимости от генотипа:

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). Нормировка результатов уровня экспрессии мРНК гена *FMR1* выполнена относительно среднего значения уровня экспрессии мРНК двух генов домашнего хозяйства *Eef2* и *Psmc4*, как наиболее стабильно экспрессирующихся (Kouadjo K.E. et al., 2007). Среднее значение отношения уровня экспрессии мРНК гена *fmr1* к уровню экспрессии мРНК *Eef2* и *Psmc4* трех животных в контрольных группах самцов и самок приняты за единицы. 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 (Раздел 2.2.9.) (Рисунок 9).

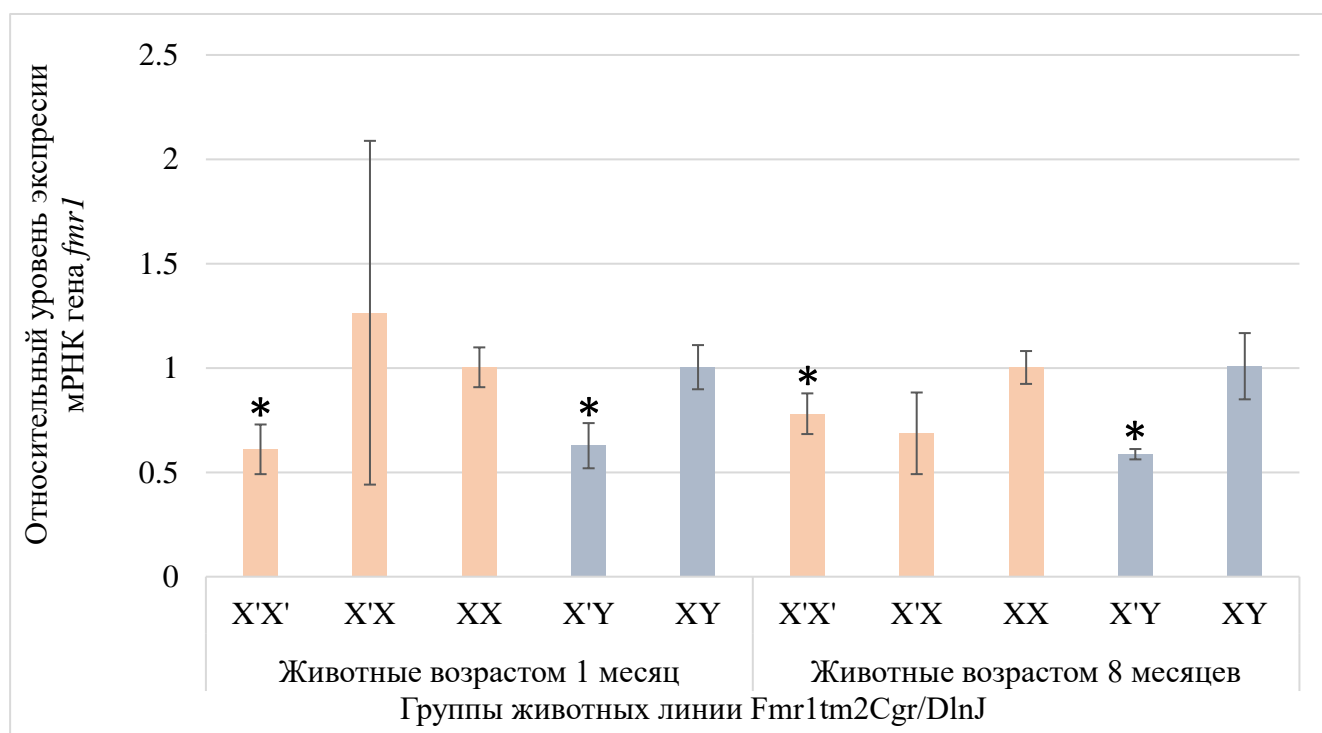


Рисунок 9. Относительный уровень экспрессии мРНК гена *fmr1* у животных линии *Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}* возрастом 1 месяц и 8 месяцев в образцах головного мозга, где X'X' – самки гомозиготы по премутантному аллелю гена *fmr1*; X'X – самки гетерозиготы по премутантному аллелю гена *fmr1*; XX – самки контрольной группы, обладающие двумя нормальными аллелями гена *fmr1*; X'Y – самцы гемизиготы по премутантному аллелю гена *fmr1*; XY – самцы контрольной группы, носители нормального аллеля гена *fmr1*. (*) Значимые различия, $P < 0,05$.

У самок гомозигот по премутации гена *fmr1* в возрасте 1 месяц уровень экспрессии мРНК составил 0,61, тогда как в возрасте 8 месяцев составил 0,78 относительно значений в контрольной группе самок аналогичного возраста ($P < 0,05$) (Рисунок 9). Уровень экспрессии мРНК в группе самок гетерозигот достоверно не отличается относительно значения уровня экспрессии в контрольной группе как в возрасте 1, так и 8 месяцев. Это, вероятно, связано с механизмом инактивации одной случайной X-хромосомы на первых стадиях развития организма (Wutz A., Gribnau J., 2007), что приводит к экспрессии гена *fmr1* аллеля нормы у животных. Предполагается, что у женщин, обладающих как нормой, так и премутацией гена *FMRI*, признаки заболеваний проявляются меньше, чем у мужчин носителей премутантного аллеля из-за протективного эффекта, связанного с экспрессией нормального аллеля гена *FMRI* в части нейронов (Hagerman R.J. et al., 2004). В группе самцов гемизигот по премутантному аллелю гена *fmr1* в возрасте 1 месяц уровень экспрессии составил 0,63, в возрасте 8 месяцев 0,59, относительно значений в контрольной группе самцов аналогичного возраста ($P < 0,05$).

Нормировка результатов уровня белка Fmгr выполнена относительно уровня сигнала белка Gapdh. Среднее значение отношения уровня сигнала белка Fmгr к Gapdh у трех животных в контрольных группах самцов и самок был принят за единицу. Уровни белка Fmгr в группах животных представлены как безразмерные величины, которые отражают то, во сколько раз отличается то или иное среднее значение уровня белка Fmгr, нормированное на уровень белка Gapdh относительно показателей в контрольной группе животных аналогичного пола и возраста (Рисунок 10).

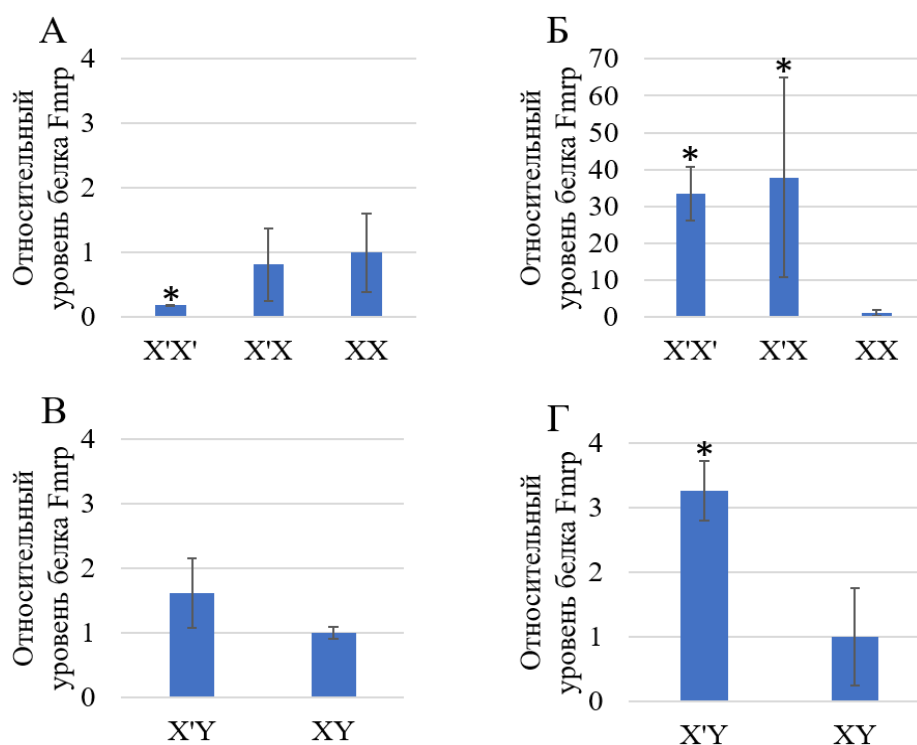


Рисунок 10. Относительный уровень белка Fmr у животных линии $Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}$ в образцах головного мозга. А) Самки возрастом 1 месяц; Б) Самки возрастом 8 месяцев; В) Самцы возрастом 1 месяц; Г) Самцы возрастом 8 месяцев, где X'X' – самки гомозиготы по премутантному аллелю гена *fmr1*; X'X – самки гетерозиготы по премутантному аллелю гена *fmr1*; XX – самки контрольной группы, обладающие двумя нормальными аллелями гена *fmr1*; X'Y – самцы гемизиготы по премутантному аллелю гена *fmr1*; XY – самцы контрольной группы, носители нормального аллеля гена *fmr1*. (*) Значимые различия, $P < 0,05$.

Уровень белка Fmr у самок гомозигот по премутантному аллелю гена *fmr1* в возрасте 1 месяц составил 0,18, тогда как в возрасте 8 месяцев он составил 33,47 относительно значений в контрольных группах самок аналогичного возраста.

Уровень белка Fmr у самок гетерозигот по премутантному аллелю гена *fmr1* в возрасте 1 месяц достоверно не отличается от контрольной группы, тогда как в возрасте 8 месяцев он составил 37,80 относительно значений в контрольных группах самок аналогичного возраста.

Уровень белка Fmr у самцов гемизигот в возрасте 1 месяц не отличается от контрольной группы, тогда как в возрасте 8 месяцев он составил 3,27 относительно значений в контрольной группе самцов аналогичного возраста.

В результате анализа уровня белка Fmrp показано, что в возрасте 8 месяцев уровень белка становится выше контроля в группах гомозигот, гетерозигот и гемизигот по премутантному аллелю гена *fmr1*. 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. В таких включениях присутствуют белки FXR1P и FXR2P. Показано, что эти белки совместно с FMRP агрегируют и претерпевают конформационный переход к β -обогащенным структурам, что является типичным для таких амилоидных заболеваний как Альцгеймер, Паркинсон и Гентингтон. Наличие белка FMRP в таких включениях до конца не установлено. Хотя существуют работы, в которых наличие этого белка не установлено, в других предполагают, что это связано с особенностью методологии выполняемых исследований (Sjekloća L., Pauwels K., Pastore A., 2011).

3.6. 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. Однако, чтобы экстраполировать результаты экспрессии микроРНК, полученные при исследовании клеточных линий человека, на модельных мышцах, необходимо, чтобы последовательности и эффективность взаимодействия с мРНК гомологичных микроРНК были соразмерны (Таблица 6).

Таблица 6. Характеристики выбранных микроРНК для анализа экспрессии в линии мышей *Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}*.

микроРНК мыши				микроРНК человека					
микроРНК	5'→3'	Target Score (mirDB)	Тип связи с 3'-НТО гена мРНК <i>FMR1</i> (target scan)	микроРНК	5'→3'	Target Score (mirDB)	Тип связи с 3'-НТО мРНК гена <i>FMR1</i> (target scan)	Взаимодействие с 3'-НТО мРНК гена <i>FMR1</i>	Изменение уровня микроРНК в ответ на изменение активности гена <i>FMR1</i>
mmu-miR-139-5p (ID: MIMAT0000656)	UCUAC AGUGC ACGUG UCUCC AG	95	8mer	hsa-miR-139-5p (ID: MIMAT0000250)	UCUAC AGUGC ACGUG UCUCC <u>AGU</u>	96	8mer	+	Уменьшение экспрессии при повышении уровня белка FMRP
mmu-miR-25-3p (ID: MIMAT0000652)	CAUUG CACUU GUCUC GGUCU GA	77	8mer	hsa-miR-25-3p (ID: MIMAT0000081)	CAUUG CACUU GUCUC GGUCU GA	77	8mer	+	Уровень экспрессии не изменен во всех группах клеточных линий
mmu-miR-182-5p (ID: MIMAT0000211)	UUUGG CAAUG GUAGA ACUCA <u>CACCG</u>	86	8mer	hsa-miR-182-5p (ID: MIMAT0000259)	UUUGG CAAUG GUAGA ACUCA <u>CACU</u>	89	8mer	–	Уровень экспрессии повышен в группе клеточных линий с полной мутацией гена <i>FMR1</i>
Различия между микроРНК у двух видов выделены жирным шрифтом									

Анализ сходства выбранных микроРНК человека и гомологичных микроРНК, обнаруженных в организме мышей, проведен на основе данных targetscan.org. Этот электронный ресурс отображает различия гомологичных последовательностей 3'-НТО мРНК гена *FMR1* человека и мыши, а также последовательности гомологичных микроРНК, что лежит в основе определения их возможных отличий во взаимодействии с мРНК гена *FMR1* человека и *fmr1* лабораторной мыши. Обнаружено, что *mmus-miR-139-5p* и *hsa-miR-139-5p* отличаются делецией урацила на 5'-конце первой микроРНК. При этом баллы Target Score составили 95 и 96, соответственно. Показано, что *mmu-miR-25-3p* и *hsa-miR-25-3p* идентичны. *mmu-miR-182-5p* и *hsa-miR-182-5p* отличаются на 3'-конце заменой одного урацила на цитозин и дополнительным гуанином с количеством баллов Target Score 86 и 89, соответственно. Тем не менее, 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.

Нормировка уровня экспрессии определенной микроРНК в образце головного мозга выполнена относительно уровня экспрессии *Snord70*, экспрессия которой стабильна в организме мышей. Среднее значение уровня определенной микроРНК, нормированное на уровень экспрессии *mmus-SNORD70* у трех животных в контрольных группах самцов и самок, было принято за единицу. Уровни определенной микроРНК в группах животных представлены как безразмерные величины, которые отражают во сколько раз отличается то или иное среднее значение уровня микроРНК, нормированное на уровень *Snord70* относительно показателей в контрольной группе животных аналогичного пола и возраста (Раздел 2.2.11.) (Рисунок 11).

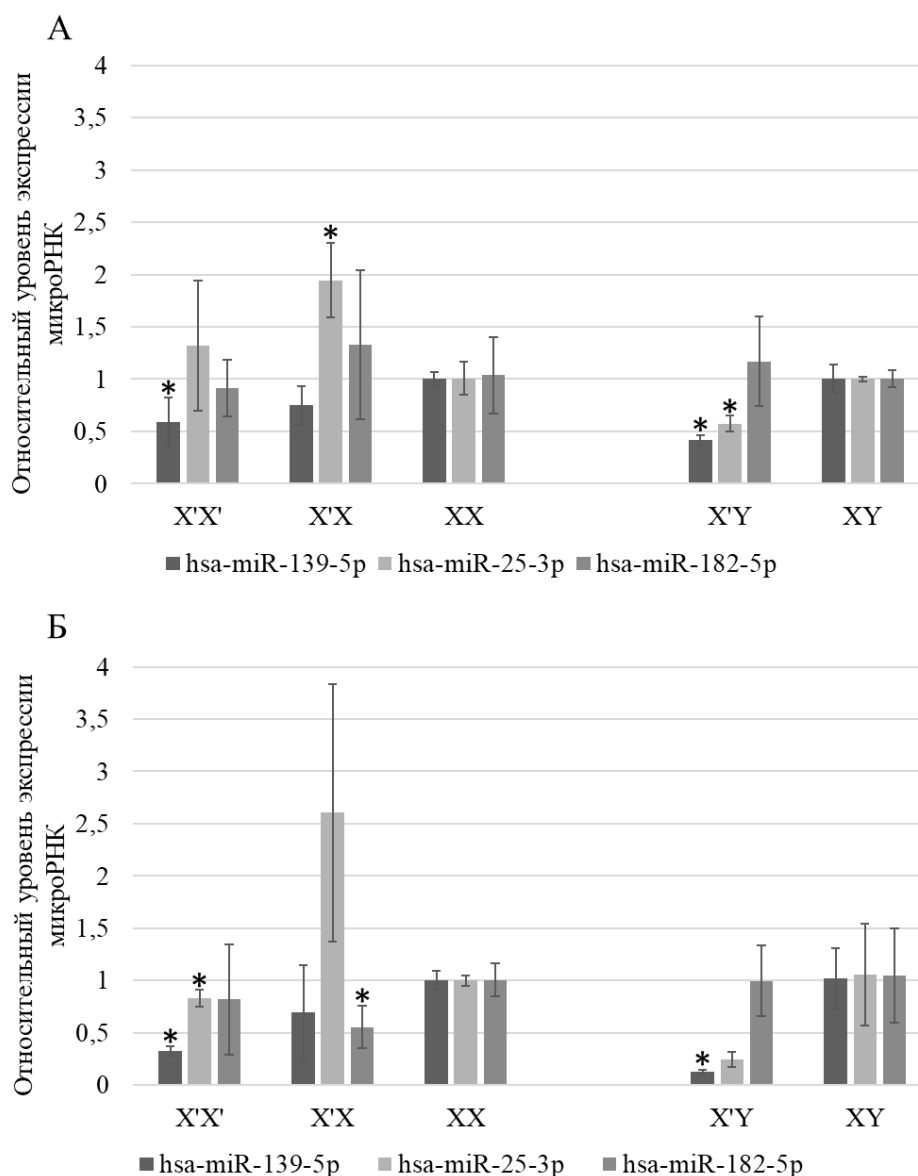


Рисунок 11. Относительный уровень экспрессии микроРНК у животных линии $Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}$ в образцах головного мозга. Возраст животных 1 месяц (А); возраст животных 8 месяцев (Б), где X'X' – самки гомозиготы по премутантному аллелю гена *fmr1*; X'X – самки гетерозиготы по премутантному аллелю гена *fmr1*; XX – самки контрольной группы, обладающие двумя нормальными аллелями гена *fmr1*; X'Y – самцы гемизиготы по премутантному аллелю гена *fmr1*; XY – самцы контрольной группы, носители нормального аллеля гена *fmr1*. Значимые различия, $P < 0,05$.

В группе самок гомозигот по премутации гена *fmr1*: уровень экспрессии *mmi-miR-139-5p* в возрасте 1 месяц и 8 месяцев составил 0,59 и 0,33, соответственно, относительно аналогичных значений в группе XX того же возраста. Уровень экспрессии *mmi-miR-25-3p* в возрасте 1 месяц достоверно не

отличался от уровня экспрессии в контрольной группе XX. В возрасте 8 месяцев уровень этой микроРНК составил 0,83. Уровень *mmi-miR-182-5p* достоверно не отличался от аналогичных значений в контрольных группах XX в возрасте 1 и 8 месяцев.

В группе самок гетерозигот, обладающих аллелем нормы и премутации гена *fmr1*: уровень *mmi-miR-139-5p* достоверно не отличался от аналогичных значений в контрольных группах самок в возрасте 1 и 8 месяцев. Уровень *mmi-miR-25-3p* у животных возрастом 1 месяц составил 1,94. В возрасте 8 месяцев уровень этой микроРНК достоверно не отличается от контроля. Уровень *mmi-miR-182-5p* достоверно не отличался от аналогичных значений в контрольной группе самок в возрасте 1 месяц. В возрасте 8 месяцев уровень данной микроРНК составил 0,56.

В группе самцов гемизигот по премутации гена *fmr1*: Уровень экспрессии *mmi-miR-139-5p* в возрасте 1 месяц и 8 месяцев составил 0,41 и 0,13 относительно аналогичных значений в контрольной группе самцов аналогичного возраста. Уровень экспрессии *mmi-miR-25-3p* в возрасте 1 месяц – 0,58, однако в возрасте 8 месяцев не было достоверных различий относительно контрольной группы. Уровень *mmi-miR-182-5p* как в возрасте 1 месяц, так и 8 месяцев достоверно не отличался от контрольной группы самцов аналогичного возраста.

В таблице 7 представлены общие данные результатов анализа активности гена *fmr1* и уровня экспрессии микроРНК в головном мозге мышей моделей FXTAS.

Таблица 7. 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 <i>fmrp</i>	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

Для исследования уровня экспрессии выбранных микроРНК использована мышинная модель FXTAS ($Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}$), животные в которой обладают премутантным аллелем гена *fmr1*. Проявления этого заболевания у модельных мышей возникают в возрасте 7,5 месяцев (Berman R., Willemsen R., 2009). Нами 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).

Для того чтобы экстраполировать результаты экспрессии микроРНК, полученные при исследовании клеточных линий человека на модельных мышях, необходимо, чтобы последовательности и эффективность взаимодействия с мРНК гомологичных микроРНК человека и мыши были сопоставимы. Это будет указывать на идентичные функции микроРНК в двух организмах (Suh M.-R. et al., 2004). 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 гемозигот 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 *FMRI*, 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 *FMRI*, 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 *mmu-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 *mmu-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 *mmu-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 *mmu-miR-182-5p* на активность премутантного аллеля гена *fmr1*. Это наблюдение подтверждает данные об отсутствии взаимодействия этой микроРНК с 3'-НТО мРНК гена *FMRI*. Аналогичная картина повышения экспрессии определенных микроРНК без взаимодействия с мРНК гена *FMRI* в случае полной мутации была ранее показана в литературе (Putkonen N. et al., 2020). Таким образом, *mmu-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 *mmu-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 *FMRI* > 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 гемизигот, 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 *FMRI* 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. Такое событие может привести к изменению других его генов-мишеней. Однако поиск причинно-следственных связей между этими двумя событиями потребует дальнейших исследований. Можно предположить следующий механизм: первоначальной причиной, приводящей к возникновению премутантного аллеля гена *FMRI*, является экспансия CGG повтора. В свою очередь, мРНК с увеличенным CGG повтором обладает новыми свойствами, отличающими ее от нормального аллеля. Увеличенный повторенный участок мРНК способен привлекать CGG связывающие белки и приводить к образованию убиквитин-положительных включений в клетках (Tassone F., Iwahashi C., Hagerman P.J., 2004). Вероятно, включения могут нарушать множество каскадов ферментативных процессов в клетках, что вызывает изменение процессов созревания микроРНК, изменению экспрессии miR-139-5p, а также сбоя регуляции белка FMRP. Возможно, miR-139-5p может служить диагностическим маркером развития патологий. По литературным данным при исследовании уровня экспрессии белка Fmrp в мышцах линии AKR/J использовали три временные точки, в которых мыши возрастом 1,5 месяца обозначены как молодые, 5 месяцев - взрослые, а 15 месяцев – старые (Prasad S., Singh K., 2008). При исследовании мышей линии *Fmr1^{tm2Cgr/DlnJ}* выбран возраст 1 месяц – что соответствует молодому возрасту и 8 месяцев, так как с 7,5 месяцев появляются первые признаки FXTAS у мышей – что соответствует взрослому состоянию людей до 50 лет. Однако у пациентов данный синдром наблюдается после 50 лет. Вероятно, уровень miR-139-5p у мужчин может быть

снижен до начала проявлений FXTAS, что будет служить диагностическим признаком тяжести проявления симптомов. 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

Фраксопатии являются социально значимыми заболеваниями в популяции человека, однако на сегодняшний день не существует полной картины механизмов их патогенеза. У пациентов – носителей премутантного аллеля гена *FMRI* проявления заболеваний FXPOI и FXTAS выражено только в определенном проценте случаев. Более того, эти проявления напрямую не коррелируют с размером CGG повтора, а других диагностических критериев, которые могут определить степень выраженности синдромов не существует. Так как FXTAS и FXPOI развиваются в позднем возрасте – изучение механизмов их развития и поиск новых диагностических маркеров поможет носителям премутантного аллеля с повышенным риском развития заболеваний начать раннюю медикаментозную терапию, влияющую на проявления заболеваний. Для того чтобы пролить свет на патогенез фраксопатий, а также приблизиться к разработке методов терапии и диагностики, в данной работе проведены детальные исследования участия некодирующих РНК с использованием клеточных линий, полученных от пациентов с фраксопатиями, а также и на модельных животных.

С использованием открытых баз данных mirbase.org, targetscan.org, mirdb.org нами были выбраны 7 микроРНК с потенциальным взаимодействием с мРНК гена *FMRI* – 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 *FMRI* выбраны постоянные культуры В-лимфоцитов пациентов с различным размером CGG повтора. В результате анализа активности гена *FMRI* все используемые клеточные линии были разделены на группы в зависимости от коэффициента – соотношения уровня белка FMRP к уровню экспрессии мРНК гена *FMRI*. 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 *FMRI* не позволяют включить линию GM06897 в группы, описанные выше. Клеточная

линия GM06897 с редким вариантом неметилированной 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 targets.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 мышьяная 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 мышьях 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 мышьях, 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*.

Список литературы

1. Аушев В.Н. МикроРНК: малые молекулы с большим значением // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2015. – V. 8. – № 1. – P. 1–12.
2. Li X., Wang X., Cheng Z., Zhu Q. AGO2 and its partners: a silencing complex, a chromatin modulator, and new features // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2020. – V. 55. – № 1. – P. 33–53.
3. Abekhoukh S., Sahin H.B., Grossi M., Zongaro S., Maurin T., Madrigal I., Kazue-Sugioka D., Raas-Rothschild A., Doulazmi M., Carrera P., Stachon A., Scherer S., Nascimento M.R.D. Do, Trembleau A., Arroyo I., Peter S., Smith I.M., Milà M., Smith A.C., Giangrande A., Caillé I., Bardoni B. New insights into the regulatory function of CYFIP1 in the context of WAVE- and FMRP-containing complexes // *Dis. Model. Mech.* – 2017. – V. 10. – № 4. – P. 463–474.
4. Abu-Elneel K., Liu T., Gazzaniga F.S., Nishimura Y., Wall D.P., Geschwind D.H., Lao K., Kosik K.S. Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum // *Neurogenetics.* – 2008. – V. 9. – № 3. – P. 153–161.
5. Agarwal V., Bell G.W., Nam J.W., Bartel D.P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs // *Elife.* – 2015. – V. 4. – P. e05005.
6. Ali Syeda Z., Langden S., Munkhzul C., Lee M., Song S.J. Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – № 5. – P. 1723.
7. Alvarez-Mora M.I., Rodriguez-Revenga L., Madrigal I., Torres-Silva F., Mateu-Huertas E., Lizano E., Friedländer M.R., Marti E., Estivill X., Mila M. MicroRNA expression profiling in blood from fragile X-associated tremor/ataxia syndrome patients // *Genes, Brain Behav.* – 2013. – V. 12. – № 6. – P. 595–603.
8. Annese A., Manzari C., Lionetti C., Picardi E., Horner D.S., Chiara M., Caratozzolo M.F., Tullo A., Fosso B., Pesole G., D'Erchia A.M. Whole transcriptome profiling of Late-Onset Alzheimer's Disease patients provides insights into the molecular changes involved in the disease // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 4282.
9. Bäck S., Dossat A., Parkkinen I., Koivula P., Airavaara M., Richie C.T., Chen Y.-H., Wang Y., Harvey B.K. Neuronal activation stimulates cytomegalovirus promoter-

driven transgene expression // *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* – 2019. – V. 14. – P. 180–188.

10. Bailey D.B., Raspa M., Olmsted M., Holiday D.B. Co-occurring conditions associated with FMR1 gene variations: Findings from a national parent survey // *Am. J. Med. Genet. Part A.* – 2008. – V. 146. – № 16. – P. 2060–2069.

11. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell.* – 2004. – V. 116. – № 2. – P. 281–297.

12. Bartel D.P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions // *Cell.* – 2009. – V. 136. – № 2. – P. 215–233.

13. Bartel D.P. Metazoan MicroRNAs // *Cell.* 2018. – V. 173. – № 1. – P. 20–51.

14. Behm-Ansmant I. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes // *Genes Dev.* – 2006. – V. 20. – № 14. – P. 1885–1898.

15. Beitzinger M., Peters L., Zhu J.Y., Kremmer E., Meister G. Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes // *RNA Biol.* – 2007. – V. 4. – № 2. – P. 76–84.

16. Bell M.V., Hirst M.C., Nakahori Y., MacKinnon R.N., Roche A., Flint T.J., Jacobs P.A., Tommerup N., Tranebjaerg L., Froster-Iskenius U., Kerr B., Turner G., Lindenbaum R.H., Winter R., Prembrej M., Thibodeau S., Davies K.E. Physical mapping across the fragile X: Hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome // *Cell.* – 1991. – V. 64. – № 4. – P. 861–866.

17. Berman R., Willemsen R. Mouse models of fragile X-associated tremor ataxia // *J. Investig. Med.* – 2009. – V. 57. – № 8. – P. 837–841.

18. Bhattacharyya S.N., Habermacher R., Martine U., Closs E.I., Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress // *Cell.* – 2006. – V. 125. – № 6. – P. 1111–1124.

19. Biacsi R., Kumari D., Usdin K. SIRT1 inhibition alleviates gene silencing in Fragile X mental retardation syndrome // *PLoS Genet.* – 2008. – V. 4. – № 3. – P. e1000017.

20. Bier A., Berenstein P., Kronfeld N., Morgoulis D., Ziv-Av A., Goldstein H., Kazimirsky G., Cazacu S., Meir R., Popovtzer R. Placenta-derived mesenchymal stromal cells and their exosomes exert therapeutic effects in Duchenne muscular dystrophy // *Biomaterials*. – 2018. – V. 174. – P. 67–78.
21. Bobokova T.S., Lemskaya N.A., Kolesnikova I.S., Yudkin D. V. Method for the molecular cytogenetic visualization of fragile site FRAXA // *Mol. Biol.* – 2017. – V. 51. – № 4. – P. 621–626.
22. Bontekoe C.J.M. Knockout mouse model for Fxr2: a model for mental retardation // *Hum. Mol. Genet.* – 2002. – V. 11. – № 5. – P. 487–498.
23. Bontekoe C.J.M., Bakker C.E., Nieuwenhuizen I.M., Van Der Linde H., Lans H., De Lange D., Hirst M.C., Oostra B.A. Instability of a (CGG)₉₈ repeat in the Fmr1 promoter // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – V. 10. – № 16. – P. 1693–1699.
24. Braun J.E., Truffault V., Boland A., Huntzinger E., Chang C.-T., Haas G., Weichenrieder O., Coles M., Izaurralde E. A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2012. – V. 19. – № 12. – P. 1324–1331.
25. Brendel C., Mielke B., Hillebrand M., Gärtner J., Huppke P. Methotrexate treatment of FraX fibroblasts results in FMR1 transcription but not in detectable FMR1 protein levels // *J. Neurodev. Disord.* – 2013. – V. 5. – № 1. – P. 23.
26. Buschauer R., Matsuo Y., Sugiyama T., Chen Y.-H., Alhusaini N., Sweet T., Ikeuchi K., Cheng J., Matsuki Y., Nobuta R. The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality // *Science*. – 2020. – V. 368. – № 6488. – P. eaay6912.
27. Cao X., Yeo G., Muotri A.R., Kuwabara T., Gage F.H. Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2006. – V. 29. – № 1. – P. 77–103.
28. Carreras C.W., Santi D. V. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase // *Annu. Rev. Biochem.* – 1995. – V. 64. – № 1. – P. 721–762.

29. Castren M., Tervonen T., Karkkainen V., Heinonen S., Castren E., Larsson K., Bakker C.E., Oostra B.A., Akerman K. Altered differentiation of neural stem cells in fragile X syndrome // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. – V. 102. – № 49. – P. 17834–17839.
30. Chen C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. – № 20. – P. e179.
31. Chen Y., Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – V. 48. – № D1. – P. D127–D131.
32. Chia Z., Augustine G.J., Silberberg G. Synaptic connectivity between the cortex and claustrum is organized into functional modules // *Curr. Biol.* – 2020. – V. 30. – № 14. – P. 2777–2790.
33. Chtarto A., Yang X., Bockstael O., Melas C., Blum D., Lehtonen E., Abeloos L., Jaspard J.-M., Levivier M., Brotchi J., Velu T., Tenenbaum L. Controlled delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by a single tetracycline-inducible AAV vector // *Exp. Neurol.* – 2007. – V. 204. – № 1. – P. 387–399.
34. Clifton N.E., Thomas K.L., Wilkinson L.S., Hall J., Trent S. FMRP and CYFIP1 at the synapse and their role in psychiatric vulnerability // *Complex Psychiatry.* – 2020. – V. 6. – № 1–2. – P. 5–19.
35. Coffey S.M., Cook K., Tartaglia N., Tassone F., Nguyen D. V., Pan R., Bronsky H.E., Yuhas J., Borodyanskaya M., Grigsby J., Doerflinger M., Hagerman P.J., Hagerman R.J. Expanded clinical phenotype of women with the FMR1 premutation // *Am. J. Med. Genet. Part A.* – 2008. – V. 146. – № 8. – P. 1009–1016.
36. Coolen M., Thieffry D., Drivenes Ø., Becker T.S., Bally-Cuif L. miR-9 controls the timing of neurogenesis through the direct inhibition of antagonistic factors // *Dev. Cell.* – 2012. – V. 22. – № 5. – P. 1052–1064.
37. Cordeiro L., Abucayan F., Hagerman R., Tassone F., Hessl D. Anxiety disorders in fragile X premutation carriers: Preliminary characterization of probands and non-probands // *Intractable Rare Dis. Res.* – 2015. – V. 4. – № 3. – P. 123–130.
38. Cortez M.A., Calin G.A. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2009. – V. 9. – № 6. – P. 703–711.

39. Crawford H., Abbeduto L., Hall S.S., Hardiman R., Hessler D., Roberts J.E., Scerif G., Stanfield A.C., Turk J., Oliver C. Fragile X syndrome: an overview of cause, characteristics, assessment and management // *Paediatr. Child Health (Oxford)*. – 2020. – V. 30. – № 11. – P. 400–403.
40. Cronister A., Schreiner R., Wittenberger M., Amiri K., Harris K., Hagerman R.J. Heterozygous fragile X female: Historical, physical, cognitive, and cytogenetic features // *Am. J. Med. Genet.* – 1991. – V. 38. – № 2–3. – P. 269–274.
41. Dahariya S., Paddibhatla I., Kumar S., Raghuwanshi S., Palapati A., Gutti R.K. Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells // *Mol. Immunol.* – 2019. – V. 112. – P. 82–92.
42. Das A., Tenenbaum L., Berkhout B. Tet-On systems for doxycycline-inducible gene expression // *Curr. Gene Ther.* – 2016. – V. 16. – № 3. – P. 156–167.
43. DeMarco B., Stefanovic S., Williams A., Moss K.R., Anderson B.R., Bassell G.J., Mihailescu M.R. FMRP - G-quadruplex mRNA - miR-125a interactions: Implications for miR-125a mediated translation regulation of PSD-95 mRNA // *PLoS One*. – 2019. – V. 14. – № 5. – P. e0217275.
44. Devys D., Lutz Y., Rouyer N., Bellocq J.-P., Mandel J.-L. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation // *Nat. Genet.* – 1993. – V. 4. – № 4. – P. 335–340.
45. Doloskiy A.A., Yarushkin A.A., Grishchenko I. V, Lemskaya N.A., Pindyurin A. V, Boldyreva L. V, Pustyl'nyak V.O., Yudkin D. V. miRNA expression and interaction with the 3'UTR of FMR1 in FRAXopathy pathogenesis // *Non-coding RNA Res.* – 2021. – V. 6. – № 1. – P. 1–7.
46. Edbauer D., Neilson J.R., Foster K.A., Wang C.-F., Seeburg D.P., Batterton M.N., Tada T., Dolan B.M., Sharp P.A., Sheng M. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132 // *Neuron*. – 2010. – V. 65. – № 3. – P. 373–384.
47. Eichhorn S.W., Guo H., McGeary S.E., Rodriguez-Mias R.A., Shin C., Baek D., Hsu S., Ghoshal K., Villén J., Bartel D.P. mRNA destabilization is the dominant effect

of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues // *Mol. Cell.* – 2014. – V. 56. – № 1. – P. 104–115.

48. Elmen J., Lindow M., Silaharoglu A., Bak M., Christensen M., Lind-Thomsen A., Hedtjörn M., Hansen J.B., Hansen H.F., Straarup E.M. Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – V. 36. – № 4. – P. 1153–1162.

49. Ennis S., Ward D., Murray A. Nonlinear association between CGG repeat number and age of menopause in FMR1 premutation carriers // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2006. – V. 14. – № 2. – P. 253–255.

50. Fischer M., Skowron M., Berthold F. Reliable transcript quantification by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction in primary neuroblastoma using normalization to averaged expression levels of the control genes HPRT1 and SDHA // *J. Mol. Diagnostics.* – 2005. – V. 7. – № 1. – P. 89–96.

51. Frait A., Vittal P., Szewka A., Bernard B., Berry-Kravis E., Hall D.A. New observations in the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) phenotype // *Front. Genet.* – 2014. – V. 5. – P. 365.

52. Friedman R.C., Farh K.K.-H., Burge C.B., Bartel D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs // *Genome Res.* – 2009. – V. 19. – № 1. – P. 92–105.

53. Frith M.C., Pheasant M., Mattick J.S. Genomics: The amazing complexity of the human transcriptome // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2005. – V. 13. – № 8. – P. 894–897.

54. Fukao A., Mishima Y., Takizawa N., Oka S., Imataka H., Pelletier J., Sonenberg N., Thoma C., Fujiwara T. MicroRNAs trigger dissociation of eIF4AI and eIF4AII from target mRNAs in humans // *Mol. Cell.* – 2014. – V. 56. – № 1. – P. 79–89.

55. Galanina E.M., Tulupov A.A., Lemskaya N.A., Korostyshevskaya A.M., Maksimova Y. V., Shorina A.R., Savelov A.A., Sergeeva I.G., Isanova E.R., Grishchenko I. V., Yudkin D. V. A Female patient with FMR1 premutation and mosaic X chromosome aneuploidy and two sons with intellectual disability // *Mol. Syndromol.* – 2017. – V. 8. – № 2. – P. 110–114.

56. Gartler S.M. The chromosome number in humans: a brief history // *Nat. Rev. Genet.* – 2006. – V. 7. – № 8. – P. 655–660.
57. Glover T.W. FUdR induction of the X chromosome fragile site: evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition // *Am. J. Hum. Genet.* – 1981. – V. 33. – № 2. – P. 234–42.
58. Golden D.E., Gerbasi V.R., Sontheimer E.J. An inside job for siRNAs // *Mol. Cell.* – 2008. – V. 31. – № 3. – P. 309–312.
59. Goncalves M.R.R., Capelli L.P., Nitrini R., Barbosa E.R., Porto C.S., Lucato L.T., Vianna-Morgante A.M. Atypical clinical course of FXTAS: rapidly progressive dementia as the major symptom // *Neurology.* – 2007. – V. 68. – № 21. – P. 1864–1866.
60. Gong X., Zhang K., Wang Y., Wang J., Cui Y., Li S., Luo Y. MicroRNA-130b targets *Fmr1* and regulates embryonic neural progenitor cell proliferation and differentiation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – V. 439. – № 4. – P. 493–500.
61. Grimson A., Farh K.K.-H., Johnston W.K., Garrett-Engele P., Lim L.P., Bartel D.P. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing // *Mol. Cell.* – 2007. – V. 27. – № 1. – P. 91–105.
62. Grishchenko I. V, Purvinsh Y. V, Yudkin D. V. Mystery of expansion: DNA metabolism and unstable repeats / Ed by. D.O. Zharkov. Cham: Springer International Publishing, – 2020. – P. 101–124.
63. Gullerova M. Long Non-coding RNA // *Genomic elements in health, disease and evolution* / Ed by. K. Felekis, K. Voskarides. New York, NY, NY: Springer New York, – 2015. P. 83–108.
64. Guo D., Ye Y., Qi J., Tan X., Zhang Y., Ma Y., Li Y. Age and sex differences in microRNAs expression during the process of thymus aging // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* – 2017. – V. 49. – № 5. – P. 409–419.
65. Guo H., Ingolia N.T., Weissman J.S., Bartel D.P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels // *Nature.* – 2010. – V. 466. – № 7308. – P. 835–840.

66. Hagerman P.J. The fragile X prevalence paradox // *J. Med. Genet.* – 2008. – V. 45. – № 8. – P. 498–499.
67. Hagerman R.J., Berry-Kravis E., Hazlett H.C., Bailey D.B., Moine H., Kooy R.F., Tassone F., Gantois I., Sonenberg N., Mandel J.L., Hagerman P.J. Fragile X syndrome // *Nat. Rev. Dis. Prim.* – 2017. – V. 3. – № 1. – P. 17065.
68. Hagerman R.J., Hagerman P. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome — features, mechanisms and management // *Nat. Rev. Neurol.* – 2016. – V. 12. – № 7. – P. 403–412.
69. Hagerman R.J., Leavitt B.R., Farzin F., Jacquemont S., Greco C.M., Brunberg J.A., Tassone F., Hessler D., Harris S.W., Zhang L., Jardini T., Gane L.W., Ferranti J., Ruiz L., Leehey M.A., Grigsby J., Hagerman P.J. Fragile-X–Associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the FMR1 premutation // *Am. J. Hum. Genet.* – 2004. – V. 74. – № 5. – P. 1051–1056.
70. Hagerman R.J., Leehey M., Heinrichs W., Tassone F., Wilson R., Hills J., Grigsby J., Gage B., Hagerman P.J. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X // *Neurology*. 2001. – V. 57. – № 1. – P. 127–130.
71. Haldane J. A Clinical and Genetic Study of 1280 Cases of mental defect // *Nature*. – 1938. – V. 141. – № 3570. – P. 575–576.
72. Hamlin A., Liu Y., Nguyen D. V, Tassone F., Zhang L., Hagerman R.J. Sleep apnea in fragile X premutation carriers with and without FXTAS // *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* – 2011. – V. 156. – № 8. – P. 923–928.
73. Han J. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing // *Genes Dev.* – 2004. – V. 18. – № 24. – P. 3016–3027.
74. Hansen T., Olsen L., Lindow M., Jakobsen K.D., Ullum H., Jonsson E., Andreassen O.A., Djurovic S., Melle I., Agartz I., Hall H., Timm S., Wang A.G., Werge T. Brain expressed microRNAs implicated in schizophrenia etiology // *PLoS One*. – 2007. – V. 2. – № 9. – P. e873.
75. Hayward B.E., Usdin K. Improved assays for AGG interruptions in fragile X premutation carriers // *J. Mol. Diagnostics*. – 2017. – V. 19. – № 6. – P. 828–835.

76. Heitz D., Rousseau F., Devys D., Saccone S., Abderrahim H., Le Paslier D., Cohen D., Vincent A., Toniolo D., Della Valle G. Isolation of sequences that span the fragile X and identification of a fragile X-related CpG island // *Science*. – 1991. – V. 251. – № 4998. – P. 1236–1239.

77. Hersh J.H., Saul R.A. Health supervision for children with fragile X syndrome // *Pediatrics*. – 2011. – V. 127. – № 5. – P. 994–1006.

78. Heulens I., Suttie M., Postnov A., De Clerck N., Perrotta C.S., Mattina T., Faravelli F., Forzano F., Frank Kooy R., Hammond P. Craniofacial characteristics of fragile X syndrome in mouse and man // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2013. – V. 21. – № 8. – P. 816–823.

79. Hipp H.S., Charen K.H., Spencer J.B., Allen E.G., Sherman S.L. Reproductive and gynecologic care of women with fragile X primary ovarian insufficiency (FXPOI) // *Menopause*. – 2016. – V. 23. – № 9. – P. 993–999.

80. Hoem G., Bowitz Larsen K., Øvervatn A., Brech A., Lamark T., Sjøttem E., Johansen T. The FMRpolyGlycine protein mediates aggregate formation and toxicity independent of the CGG mRNA hairpin in a cellular model for FXTAS // *Front. Genet.* – 2019. – V. 10. – P. 249.

81. Hoem G., Raske C.R., Garcia-Arocena D., Tassone F., Sanchez E., Ludwig A.L., Iwahashi C.K., Kumar M., Yang J.E., Hagerman P.J. CGG-repeat length threshold for FMR1 RNA pathogenesis in a cellular model for FXTAS // *Hum. Mol. Genet.* – 2011. – V. 20. – № 11. – P. 2161–2170.

82. Holmgren G., Son Blomquist H.K., Drugge U., Gustavson K.-H. Fragile X families in a Northern Swedish county - a genealogical study demonstrating apparent paternal transmission from the 18th century // *Am. J. Med. Genet.* – 1988. – V. 30. – № 1–2. – P. 673–679.

83. Hruz T., Wyss M., Docquier M., Pfaffl M.W., Masanetz S., Borghi L., Verbrugge P., Kalaydjieva L., Bleuler S., Laule O., Descombes P., Gruissem W., Zimmermann P. RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization // *BMC Genomics*. – 2011. – V. 12. – № 1. – P. 156.

84. Hu B., Zhong L., Weng Y., Peng L., Huang Y., Zhao Y., Liang X.-J. Therapeutic siRNA: state of the art // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020. – V. 5. – № 1. – P. 1–25.
85. Huang J., Zhao L., Xing L., Chen D. MicroRNA-204 Regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation // *Stem Cells.* – 2010. – V. 28. – № 2. – P. 357–364.
86. Humphreys D.T., Westman B.J., Martin D.I.K., Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2005. – V. 102. – № 47. – P. 16961–16966.
87. Hunter J., Rivero-Arias O., Angelov A., Kim E., Fotheringham I., Leal J. Epidemiology of fragile X syndrome: A systematic review and meta-analysis // *Am. J. Med. Genet. Part A.* – 2014. – V. 164. – № 7. – P. 1648–1658.
88. Hutvágner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E., Bálint E., Tuschl T., Zamore P.D. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA // *Science.* – 2001. – V. 293. – № 5531. – P. 834–838.
89. Hutvágner G., Zamore P.D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex // *Science.* – 2002. – V. 297. – № 5589. – P. 2056–2060.
90. Ishikawa M., Aoyama T., Shibata S., Sone T., Miyoshi H., Watanabe H., Nakamura M., Morota S., Uchino H., Yoo A.S. miRNA-based rapid differentiation of purified neurons from hPSCs advances towards quick screening for neuronal disease phenotypes in vitro // *Cells.* – 2020. – V. 9. – № 3. – P. 532.
91. Iwasaki S., Kawamata T., Tomari Y. *Drosophila* Argonaute1 and Argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression // *Mol. Cell.* – 2009. – V. 34. – № 1. – P. 58–67.
92. Iwasaki S., Kobayashi M., Yoda M., Sakaguchi Y., Katsuma S., Suzuki T., Tomari Y. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes // *Mol. Cell.* – 2010. – V. 39. – № 2. – P. 292–299.
93. Johnson G.E. Contribution to the psychology and pedagogy of feeble-minded children // *Pedagog. Semin.* – 1895. – V. 3. – № 2. – P. 246–290.
94. Jonas S., Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing // *Nat. Rev. Genet.* – 2015. – V. 16. – № 7. – P. 421–433.

95. Juncos J.L., Lazarus J.T., Graves-Allen E., Shubeck L., Rusin M., Novak G., Hamilton D., Rohr J., Sherman S.L. New clinical findings in the fragile X-associated tremor ataxia syndrome (FXTAS) // *Neurogenetics*. – 2011. – V. 12. – № 2. – P. 123–135.
96. Juncos J.L., Lazarus J.T., Rohr J., Allen E.G., Shubeck L., Hamilton D., Novak G., Sherman S.L. Olfactory dysfunction in fragile X tremor ataxia syndrome // *Mov. Disord.* – 2012. – V. 27. – № 12. – P. 1556–1559.
97. Kaufmann W.E., Kidd S.A., Andrews H.F., Budimirovic D.B., Esler A., Haas-Givler B., Stackhouse T., Riley C., Peacock G., Sherman S.L. Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: cooccurring conditions and current treatment // *Pediatrics*. – 2017. – V. 139. – № Supplement_3. – P. S194–S206.
98. Kawamata T., Tomari Y. Making risc // *Trends Biochem. Sci.* – 2010. – V. 35. – № 7. – P. 368–376.
99. Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias // *Cell*. – 2003. – V. 115. – № 2. – P. 209–216.
100. Kim H., Yun C.-H., Thomas R.J., Lee S.H., Seo H.S., Cho E.R., Lee S.K., Yoon D.W., Suh S., Shin C. Obstructive sleep apnea as a risk factor for cerebral white matter change in a middle-aged and older general population // *Sleep*. – 2013. – V. 36. – № 5. – P. 709–715.
101. Kim V.N. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export // *Trends Cell Biol.* – 2004. – V. 14. – № 4. – P. 156–159.
102. Kim Y.-K., Kim V.N. Processing of intronic microRNAs // *EMBO J.* – 2007. – V. 26. – № 3. – P. 775–783.
103. Kong H.E., Zhao J., Xu S., Jin P., Jin Y. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: from molecular pathogenesis to development of therapeutics // *Front. Cell. Neurosci.* – 2017. – V. 11. – P. 128.
104. Kononenko A. V, Ebersole T., Mirkin S.M. Experimental system to study instability of (CGG)_n repeats in cultured mammalian cells / Ed by. G.-F. Richard. New York, NY: Springer New York, – 2020. – P. 137–150.

105. Kouadjo K.E., Nishida Y., Cadrin-Girard J.F., Yoshioka M., St-Amand J. Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues // *BMC Genomics*. – 2007. – V. 8. – № 1. – P. 127.
106. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – № suppl_1. – P. D152–D157.
107. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – № D1. – P. D68–D73.
108. Krek A., Grün D., Poy M.N., Wolf R., Rosenberg L., Epstein E.J., MacMenamin P., da Piedade I., Gunsalus K.C., Stoffel M., Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions // *Nat. Genet.* – 2005. – V. 37. – № 5. – P. 495–500.
109. Kumari D., Usdin K. Polycomb group complexes are recruited to reactivated FMR1 alleles in Fragile X syndrome in response to FMR1 transcription // *Hum. Mol. Genet.* – 2014. – V. 23. – № 24. – P. 6575–6583.
110. Lachiewicz A.M., Dawson D. V, Spiridigliozzi G.A. Physical characteristics of young boys with fragile X syndrome: Reasons for difficulties in making a diagnosis in young males // *Am. J. Med. Genet.* – 2000. – V. 92. – № 4. – P. 229–236.
111. Lagergren K., Hammar M., Nedstrand E., Bladh M., Sydsjö G. The prevalence of primary ovarian insufficiency in Sweden; a national register study // *BMC Womens. Health.* – 2018. – V. 18. – № 1. – P. 175.
112. Landthaler M., Gaidatzis D., Rothballer A., Chen P.Y., Soll S.J., Dinic L., Ojo T., Hafner M., Zavolan M., Tuschl T. Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs // *RNA*. – 2008. – V. 14. – № 12. – P. 2580–2596.
113. Lee C., Risom T., Strauss W.M. MicroRNAs in mammalian development // *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* – 2006. – V. 78. – № 2. – P. 129–139.
114. Lee Y. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization // *EMBO J.* – 2002. – V. 21. – № 17. – P. 4663–4670.

115. Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K., Lee S., Baek S.H., Kim V.N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II // *EMBO J.* – 2004. – V. 23. – № 20. – P. 4051–4060.
116. Leehey M.A., Berry-Kravis E., Min S., Hall D.A., Rice C.D., Zhang L., Grigsby J., Greco C.M., Reynolds A., Lara R., Cogswell J., Jacquemont S., Hessler D.R., Tassone F., Hagerman R., Hagerman P.J. Progression of tremor and ataxia in male carriers of the FMR1 premutation // *Mov. Disord.* – 2007. – V. 22. – № 2. – P. 203–206.
117. Lehrke R.G. X-linked mental retardation and verbal disability // *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* – 1974. – V. 10. – № 1. – P. 1–100.
118. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets // *Cell.* – 2005. – V. 120. – № 1. – P. 15–20.
119. Lewis B.P., Shih I., Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P., Burge C.B. Prediction of mammalian microRNA targets // *Cell.* – 2003. – V. 115. – № 7. – P. 787–798.
120. Li P., Zhu Y., Kang X., Dan X., Ma Y., Shi Y. An integrated approach in gene-expression landscape profiling to identify housekeeping and tissue-specific genes in cattle // *Anim. Prod. Sci.* – 2021. – V. 61. – № 16. – P. 1643–1651.
121. Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engle P., Grimson A., Schelter J.M., Castle J., Bartel D.P., Linsley P.S., Johnson J.M. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs // *Nature.* – 2005. – V. 433. – № 7027. – P. 769–773.
122. Lin M., Zhu L., Wang J., Xue Y., Shang X. miR-424–5p maybe regulate blood-brain barrier permeability in a model in vitro with Aβ_{1–42} incubated endothelial cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2019. – V. 517. – № 3. – P. 525–531.
123. 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. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi // *Science.* – 2004. – V. 305. – № 5689. – P. 1437–1441.
124. Loehr J.P., Synhorst D.P., Wolfe R.R., Hagerman R.J., Opitz J.M., Reynolds J.F. Aortic root dilatation and mitral valve prolapse in the fragile X syndrome // *Am. J. Med. Genet.* – 1986. – V. 23. – № 1–2. – P. 189–194.

125. Loesch D.Z., Sherwell S., Kinsella G., Tassone F., Taylor A., Amor D., Sung S., Evans A. Fragile X-associated tremor/ataxia phenotype in a male carrier of unmethylated full mutation in the FMR1 gene // *Clin. Genet.* – 2012. – V. 82. – № 1. – P. 88–92.
126. Loomis E.W., Sanz L.A., Chédin F., Hagerman P.J. Transcription-associated R-loop formation across the human FMR1 CGG-repeat region // *PLoS Genet.* – 2014. – V. 10. – № 4. – P. e1004294.
127. Lossos I.S., Czerwinski D.K., Wechser M.A., Levy R. Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies // *Leukemia.* – 2003. – V. 17. – № 4. – P. 789–795.
128. Lozano R., Saito N., Reed D., Eldeeb M., Schneider A., Hessl D., Tassone F., Beckett L., Hagerman R. Aging in fragile X premutation carriers // *The Cerebellum.* – 2016. – V. 15. – № 5. – P. 587–594.
129. Lubala T.K., Lumaka A., Kanteng G., Mutesa L., Mukuku O., Wembonyama S., Hagerman R., Luboya O.N., Lukusa Tshilobo P. Fragile X checklists: A meta-analysis and development of a simplified universal clinical checklist // *Mol. Genet. Genomic Med.* – 2018. – V. 6. – № 4. – P. 526–532.
130. Lubs H.A. A marker X chromosome // *Am. J. Hum. Genet.* – 1969. – V. 21. – № 3. – P. 231–44.
131. Ma L., Bajic V.B., Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs // *RNA Biol.* – 2013. – V. 10. – № 6. – P. 924–933.
132. Ma L., Herren A.W., Espinal G., Randol J., McLaughlin B., Martinez-Cerdeño V., Pessah I.N., Hagerman R.J., Hagerman P.J. Composition of the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome // *Acta Neuropathol. Commun.* – 2019. – V. 7. – № 1. – P. 143.
133. Maclaran K., Panay N. Current concepts in premature ovarian insufficiency // *Women's Heal.* – 2015. – V. 11. – № 2. – P. 169–182.
134. Magee J.C., Grienberger C. Synaptic plasticity forms and functions // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2020. – V. 43. – P. 95–117.

135. Marcinowski L., Lidschreiber M., Windhager L., Rieder M., Bosse J.B., Rädle B., Bonfert T., Györy I., de Graaf M., da Costa O.P., Rosenstiel P., Friedel C.C., Zimmer R., Ruzsics Z., Dölken L. Real-time transcriptional profiling of cellular and viral gene expression during lytic cytomegalovirus infection // *PLoS Pathog.* – 2012. – V. 8. – № 9. – P. e1002908.
136. Martin J.P., Bell J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 1943. – V. 6. – № 3–4. – P. 154–157.
137. Mathonnet G., Fabian M.R., Svitkin Y. V, Parsyan A., Huck L., Murata T., Biffo S., Merrick W.C., Darzynkiewicz E., Pillai R.S. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F // *Science.* – 2007. – V. 317. – № 5845. – P. 1764–1767.
138. Mattick J.S. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity // *EMBO Rep.* – 2001. – V. 2. – № 11. – P. 986–991.
139. Mattick J.S., Makunin I. V. Non-coding RNA // *Hum. Mol. Genet.* – 2006. – V. 15. – № suppl_1. – P. R17–R29.
140. McIvor E.I., Polak U., Napierala M. New insights into repeat instability // *RNA Biol.* – 2010. – V. 7. – № 5. – P. 551–558.
141. Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles // *Nat. Rev. Genet.* – 2013. – V. 14. – № 7. – P. 447–459.
142. Muddashetty R.S., Nalavadi V.C., Gross C., Yao X., Xing L., Laur O., Warren S.T., Bassell G.J. Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling // *Mol. Cell.* – 2011. – V. 42. – № 5. – P. 673–688.
143. Mundalil Vasu M., Anitha A., Thanseem I., Suzuki K., Yamada K., Takahashi T., Wakuda T., Iwata K., Tsujii M., Sugiyama T., Mori N. Serum microRNA profiles in children with autism // *Mol. Autism.* – 2014. – V. 5. – № 1. – P. 40.
144. Murray A., Ennis S., MacSwiney F., Webb J., Morton N.E. Reproductive and menstrual history of females with fragile X expansions // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2000. – V. 8. – № 4. – P. 247–252.

145. Muthukumaran T., KrishnaMurthy N. V., Sivaprasad N., Sudhakaran T. Isolation and characterization of luciferase from Indian firefly, *Luciola praeusta* // *Luminescence*. – 2014. – V. 29. – № 1. – P. 20–28.
146. Narayanan U., Nalavadi V., Nakamoto M., Pallas D.C., Ceman S., Bassell G.J., Warren S.T. FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27. – № 52. – P. 14349–14357.
147. Nathan G., Kredo-Russo S., Geiger T., Lenz A., Kaspi H., Hornstein E., Efrat S. MiR-375 promotes redifferentiation of adult human β cells expanded in vitro // *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – № 4. – P. e0122108.
148. Nawalpuri B., Sharma A., Chattarji S., Muddashetty R.S. Distinct temporal expression of the GW182 paralog TNRC6A in neurons regulates dendritic arborization // *J. Cell Sci.* – 2021. – V. 134. – № 16. – P. jcs258465.
149. Neumann E., Riepl B., Knedla A., Lefèvre S., Tarner I.H., Grifka J., Steinmeyer J., Schölmerich J., Gay S., Müller-Ladner U. Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts // *Arthritis Res. Ther.* – 2010. – V. 12. – № 3. – P. R83.
150. Nguyen T.A., Jo M.H., Choi Y.-G., Park J., Kwon S.C., Hohng S., Kim V.N., Woo J.-S. Functional anatomy of the human microprocessor // *Cell*. – 2015. – V. 161. – № 6. – P. 1374–1387.
151. Nielsen C.B., Shomron N., Sandberg R., Hornstein E., Kitzman J., Burge C.B. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs // *Rna*. – 2007. – V. 13. – № 11. – P. 1894–1910.
152. Nyayanit D., Gadgil C.J. Mathematical modeling of combinatorial regulation suggests that apparent positive regulation of targets by miRNA could be an artifact resulting from competition for mRNA // *Rna*. – 2015. – V. 21. – № 3. – P. 307–319.
153. Oh S.Y., He F., Krans A., Frazer M., Taylor J.P., Paulson H.L., Todd P.K. RAN translation at CGG repeats induces ubiquitin proteasome system impairment in models of fragile X-associated tremor ataxia syndrome // *Hum. Mol. Genet.* – 2015. – V. 24. – № 15. – P. 4317–4326.

154. Opitz J.M., Westphal J.M., Daniel A., Opitz J.M. Discovery of a connective tissue dysplasia in the Martin-Bell syndrome // *Am. J. Med. Genet.* – 1984. – V. 17. – № 1. – P. 101–109.
155. Park E., Lau A.G., Arendt K.L., Chen L. FMRP Interacts with RAR α in synaptic retinoic acid signaling and homeostatic synaptic plasticity // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – № 12. – P. 6579.
156. Pick J.E., Ziff E.B. Regulation of AMPA receptor trafficking and exit from the endoplasmic reticulum // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2018. – V. 91. – P. 3–9.
157. Pieretti M., Zhang F., Fu Y.-H., Warren S.T., Oostra B.A., Caskey C.T., Nelson D.L. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome // *Cell.* – 1991. – V. 66. – № 4. – P. 817–822.
158. Pirozzi F., Tabolacci E., Neri G. The FRAXopathies: Definition, overview, and update // *Am. J. Med. Genet. Part A.* – 2011. – V. 155. – № 8. – P. 1803–1816.
159. Prasad S., Singh K. Age- and sex-dependent differential interaction of nuclear trans-acting factors with Fmr-1 promoter in mice brain // *Neurochem. Res.* – 2008. – V. 33. – № 6. – P. 1028–1035.
160. Putkonen N., Laiho A., Ethell D., Pursiheimo J., Anttonen A.-K., Pitkonen J., Gentile A.M., de Diego-Otero Y., Castrén M.L. Urine microRNA Profiling Displays miR-125a dysregulation in children with fragile X syndrome // *Cells.* – 2020. – V. 9. – № 2. – P. 289.
161. Qian Y., Song J., Ouyang Y., Han Q., Chen W., Zhao X., Xie Y., Chen Y., Yuan W., Fan C. Advances in roles of miR-132 in the nervous system // *Front. Pharmacol.* – 2017. – V. 8. – P. 770.
162. Rajaratnam A., Shergill J., Salcedo-Arellano M., Saldarriaga W., Duan X., Hagerman R. Fragile X syndrome and fragile X-associated disorders // *F1000Research.* – 2017. – V. 6. – P. 2112.
163. Ramírez-Cheyne J.A., Duque G.A., Ayala-Zapata S., Saldarriaga-Gil W., Hagerman P., Hagerman R., Payán-Gómez C. Fragile X syndrome and connective tissue dysregulation // *Clin. Genet.* – 2019. – V. 95. – № 2. – P. 262–267.

164. Rehwinkel J. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing // *RNA*. – 2005. – V. 11. – № 11. – P. 1640–1647.
165. Ricci E.P., Limousin T., Soto-Rifo R., Rubilar P.S., Decimo D., Ohlmann T. miRNA repression of translation in vitro takes place during 43S ribosomal scanning // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – V. 41. – № 1. – P. 586–598.
166. Richter J.D., Zhao X. The molecular biology of FMRP: new insights into fragile X syndrome // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2021. – V. 22. – № 4. – P. 209–222.
167. Riley C., Wheeler A. Assessing the fragile X syndrome newborn screening landscape // *Pediatrics*. – 2017. – V. 139. – № Supplement_3. – P. S207–S215.
168. Rivas F. V, Tolia N.H., Song J.-J., Aragon J.P., Liu J., Hannon G.J., Joshua-Tor L. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2005. – V. 12. – № 4. – P. 340–349.
169. Rodriguez-Revenge L., Madrigal I., Pagonabarraga J., Xunclà M., Badenas C., Kulisevsky J., Gomez B., Milà M. Penetrance of FMR1 premutation associated pathologies in fragile X syndrome families // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2009. – V. 17. – № 10. – P. 1359–1362.
170. Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J.L., Bradley A. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units // *Genome Res.* – 2004. – V. 14. – № 10a. – P. 1902–1910.
171. Roese-Koerner B., Stappert L., Koch P., Brustle O., Borghese L. Pluripotent stem cell-derived somatic stem cells as tool to study the role of microRNAs in early human neural development // *Curr. Mol. Med.* – 2013. – V. 13. – № 5. – P. 707–722.
172. Rossetti R., Ferrari I., Bonomi M., Persani L. Genetics of primary ovarian insufficiency // *Clin. Genet.* – 2017. – V. 91. – № 2. – P. 183–198.
173. Ruby J.G., Jan C.H., Bartel D.P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing // *Nature*. – 2007. – V. 448. – № 7149. – P. 83–86.
174. Saldarriaga W., Tassone F., González-Teshima L.Y., Forero-Forero J.V., Ayala-Zapata S., Hagerman R. Fragile X syndrome // *Colomb. Med.* – 2014. – V. 45. – № 4. – P. 190–198.

175. Salvi A., Vezzoli M., Busatto S., Paolini L., Faranda T., Abeni E., Caracausi M., Antonaros F., Piovesan A., Locatelli C., Cocchi G., Alvisi G., De Petro G., Ricotta D., Bergese P., Radeghieri A. Analysis of a nanoparticle-enriched fraction of plasma reveals miRNA candidates for Down syndrome pathogenesis // *Int. J. Mol. Med.* – 2019. – V. 43. – № 6. – P. 2303–2318.

176. Schaefer D.C., Asner I.N., Seifert B., BÜRki K., Cinelli P. Analysis of physiological and behavioural parameters in mice after toe clipping as newborns // *Lab. Anim.* – 2010. – V. 44. – № 1. – P. 7–13.

177. Schmittgen T.D., Zakrajsek B.A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2000. – V. 46. – № 1. – P. 69–81.

178. Schneider A., Ballinger E., Chavez A., Tassone F., Hagerman R.J., Hessler D. Prepulse inhibition in patients with fragile X-associated tremor ataxia syndrome // *Neurobiol. Aging.* – 2012. – V. 33. – № 6. – P. 1045–1053.

179. Schneider A., Johnston C., Tassone F., Sansone S., Hagerman R.J., Ferrer E., Rivera S.M., Hessler D. Broad autism spectrum and obsessive–compulsive symptoms in adults with the fragile X premutation // *Clin. Neuropsychol.* – 2016. – V. 30. – № 6. – P. 929–943.

180. Schwartz C.E., Dean J., Howard-Peebles P.N., Bugge M., Mikkelsen M., Tommerup N., Hull C., Hagerman R., Holden J.J.A., Stevenson R.E. Obstetrical and gynecological complications in fragile X carriers: A multicenter study // *Am. J. Med. Genet.* – 1994. – V. 51. – № 4. – P. 400–402.

181. Sellier C., Buijsen R.A.M., He F., Natla S., Jung L., Tropel P., Gaucherot A., Jacobs H., Meziane H., Vincent A., Champy M.-F., Sorg T., Pavlovic G., Wattenhofer-Donze M., Birling M.-C., Oulad-Abdelghani M., Eberling P., Ruffenach F., Joint M., Anheim M., Martinez-Cerdeno V., Tassone F., Willemsen R., Hukema R.K., Viville S., Martinat C., Todd P.K., Charlet-Berguerand N. Translation of expanded CGG repeats into FMRpolyG is pathogenic and may contribute to fragile X tremor ataxia syndrome // *Neuron.* – 2017. – V. 93. – № 2. – P. 331–347.

182. Sellier C., Freyermuth F., Tabet R., Tran T., He F., Ruffenach F., Alunni V., Moine H., Thibault C., Page A., Tassone F., Willemsen R., Disney M.D., Hagerman P.J., Todd P.K., Charlet-Berguerand N. Sequestration of DROSHA and DGCR8 by expanded CGG RNA repeats alters microRNA processing in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome // *Cell Rep.* – 2013. – V. 3. – № 3. – P. 869–880.

183. Sethupathy P., Megraw M., Hatzigeorgiou A.G. A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets // *Nat. Methods.* – 2006. – V. 3. – № 11. – P. 881–886.

184. Sevin M., Kutalik Z., Bergman S., Vercelletto M., Renou P., Lamy E., Vingerhoets F.J., Di Virgilio G., Boisseau P., Bezieau S., Pasquier L., Rival J.-M., Beckmann J.S., Damier P., Jacquemont S. Penetrance of marked cognitive impairment in older male carriers of the FMR1 gene premutation // *J. Med. Genet.* – 2009. – V. 46. – № 12. – P. 818–824.

185. Sheikh S., Coutts A.S., La Thangue N.B. Transfection // *Basic science methods for clinical researchers* / Ed by. J. Morteza, S. Francesca, J. Mehdi. Boston: Elsevier, – 2017. – P. 191–209.

186. Siomi H., Choi M., Siomi M.C., Nussbaum R.L., Dreyfuss G. Essential role for KH domains in RNA binding: Impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome // *Cell.* – 1994. – V. 77. – № 1. – P. 33–39.

187. Siomi H., Siomi M.C., Nussbaum R.L., Dreyfuss G. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein // *Cell.* – 1993. – V. 74. – № 2. – P. 291–298.

188. Sjekloća L., Pauwels K., Pastore A. On the aggregation properties of FMRP – a link with the FXTAS syndrome? // *FEBS J.* – 2011. – V. 278. – № 11. – P. 1912–1921.

189. Smeets H.J.M., Smits A.P.T., Verheij C.E., Theelen J.P.G., Willemsen R., Burgt I. van De, Hoogeveen A.T., Oosterwijk J.C., Oostra B.A. Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation // *Hum. Mol. Genet.* – 1995. – V. 4. – № 11. – P. 2103–2108.

190. Smrt R.D., Szulwach K.E., Pfeiffer R.L., Li X., Guo W., Pathania M., Teng Z., Luo Y., Peng J., Bordey A. MicroRNA miR-137 regulates neuronal maturation by

targeting ubiquitin ligase mind bomb-1 // *Stem Cells*. – 2010. – V. 28. – № 6. – P. 1060–1070.

191. Sohrabji F., Selvamani A. Sex differences in miRNA as therapies for ischemic stroke // *Neurochem. Int.* – 2019. – V. 127. – P. 56–63.

192. Staib-Lasarezik I., Kriege O., Timaru-Kast R., Pieter D., Werner C., Engelhard K., Thal S.C. Anesthesia for euthanasia influences mRNA expression in healthy mice and after traumatic brain injury // *J. Neurotrauma*. – 2014. – V. 31. – № 19. – P. 1664–1671.

193. Strel'nikov V., Nemtsova M., Blinnikova O., Chesnokova G., Kuleshov N., Zaletaev D. Modern methods for DNA-diagnostics of Martin-Bell syndrome // *Pediatr.* – 2000. – V. 4. – P. 21–25.

194. Subtelny A.O., Eichhorn S.W., Chen G.R., Sive H., Bartel D.P. Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control // *Nature*. – 2014. – V. 508. – № 7494. – P. 66–71.

195. Suh M.-R., Lee Y., Kim J.Y., Kim S.-K., Moon S.-H., Lee J.Y., Cha K.-Y., Chung H.M., Yoon H.S., Moon S.Y., Kim V.N., Kim K.-S. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs // *Dev. Biol.* – 2004. – V. 270. – № 2. – P. 488–498.

196. Sullivan A.K., Marcus M., Epstein M.P., Allen E.G., Anido A.E., Paquin J.J., Yadav-Shah M., Sherman S.L. Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction // *Hum. Reprod.* – 2005. – V. 20. – № 2. – P. 402–412.

197. Sun J., Huang Q., Li S., Meng F., Li X., Gong X. miR-330-5p/Tim-3 axis regulates macrophage M2 polarization and insulin resistance in diabetes mice // *Mol. Immunol.* – 2018. – V. 95. – P. 107–113.

198. Sutcliffe J.S., Nelson D.L., Zhang F., Pieretti M., Caskey C.T., Saxe D., Warren S.T. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome // *Hum. Mol. Genet.* – 1992. – V. 1. – № 6. – P. 397–400.

199. Sutherland G.R. Fragile sites on human chromosomes: Demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium // *Science*. – 1977. – V. 197. – № 4300. – P. 265–266.

200. Suthers G.K., Callen D.F., Hyland V.J., Kozman H.M., Baker E., Eyre H., Harper P.S., Roberts S.H., Hors-Cayla M.C., Davies K.E. A new DNA marker tightly

linked to the fragile X locus (FRAXA) // *Science*. – 1989. – V. 246. – № 4935. – P. 1298–1300.

201. Swarts D.C., Makarova K., Wang Y., Nakanishi K., Ketting R.F., Koonin E. V, Patel D.J., van der Oost J. The evolutionary journey of Argonaute proteins // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2014. – V. 21. – № 9. – P. 743–753.

202. Tabolacci E., Mancano G., Lanni S., Palumbo F., Goracci M., Ferrè F., Helmer-Citterich M., Neri G. Genome-wide methylation analysis demonstrates that 5-aza-2-deoxycytidine treatment does not cause random DNA demethylation in fragile X syndrome cells // *Epigenetics Chromatin*. – 2016. – V. 9. – № 1. – P. 1–15.

203. Tabrizi S.J., Flower M.D., Ross C.A., Wild E.J. Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities // *Nat. Rev. Neurol.* – 2020. – V. 16. – № 10. – P. 529–546.

204. Tassone F., Beilina A., Carosi C., Albertosi S., Bagni C., Li L., Glover K., Bentley D., Hagerman P.J. Elevated FMR1 mRNA in premutation carriers is due to increased transcription // *RNA*. – 2007. – V. 13. – № 4. – P. 555–562.

205. Tassone F., Greco C.M., Hunsaker M.R., Seritan A.L., Berman R.F., Gane L.W., Jacquemont S., Basuta K., Jin L.-W., Hagerman P.J., Hagerman R.J. Neuropathological, clinical and molecular pathology in female fragile X premutation carriers with and without FXTAS // *Genes, Brain Behav.* – 2012. – V. 11. – № 5. – P. 577–585.

206. Tassone F., Hagerman R.J., Loesch D.Z., Lachiewicz A., Taylor A.K., Hagerman P.J. Fragile X males with unmethylated, full mutation trinucleotide repeat expansions have elevated levels of FMR1 messenger RNA // *Am. J. Med. Genet.* – 2000. – V. 94. – № 3. – P. 232–236.

207. Tassone F., Iwahashi C., Hagerman P.J. FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) // *RNA Biol.* – 2004. – V. 1. – № 2. – P. 103–105.

208. Tejada M.I., Ibarluzea N. Non-syndromic X linked intellectual disability: Current knowledge in light of the recent advances in molecular and functional studies // *Clin. Genet.* – 2020. – V. 97. – № 5. – P. 677–687.

209. Telias M., Segal M., Ben-Yosef D. Neural differentiation of fragile X human embryonic stem cells reveals abnormal patterns of development despite successful neurogenesis // *Dev. Biol.* – 2013. – V. 374. – № 1. – P. 32–45.

210. Terrile M., Bryan K., Vaughan L., Hallsworth A., Webber H., Chesler L., Stallings R.L. miRNA expression profiling of the murine TH-MYCN neuroblastoma model reveals similarities with human tumors and identifies novel candidate miRNAs // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – № 12. – P. e28356.

211. Thermann R., Hentze M.W. *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation // *Nature.* – 2007. – V. 447. – № 7146. – P. 875–878.

212. Tsang B., Arsenault J., Vernon R.M., Lin H., Sonenberg N., Wang L.-Y., Bah A., Forman-Kay J.D. Phosphoregulated FMRP phase separation models activity-dependent translation through bidirectional control of mRNA granule formation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2019. – V. 116. – № 10. – P. 4218–4227.

213. Turner G., Daniel A., Frost M. X-linked mental retardation, macro-orchidism, and the Xq27 fragile site // *J. Pediatr.* – 1980. – V. 96. – № 5. – P. 837–841.

214. Urduingio R.G., Fernández A.F., Lopez-Nieva P., Rossi S., Huertas D., Kulis M., Liu C.-G., Croce C.M., Calin G.A., Esteller M. Disrupted microRNA expression caused by *Mecp2* loss in a mouse model of Rett syndrome // *Epigenetics.* – 2010. – V. 5. – № 7. – P. 656–663.

215. Valencia-Sanchez M.A., Liu J., Hannon G.J., Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs: Table 1. // *Genes Dev.* – 2006. – V. 20. – № 5. – P. 515–524.

216. Verkerk A., Pieretti M., Sutcliffe J.S., Fu Y.-H., Kuhl D.P.A., Pizzuti A., Reiner O., Richards S., Victoria M.F., Zhang F., Eussen B.E., van Ommen G.-J.B., Blonden L.A.J., Riggins G.J., Chastain J.L., Kunst C.B., Galjaard H., Thomas Caskey C., Nelson D.L., Oostra B.A., Warren S.T. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome // *Cell.* – 1991. – V. 65. – № 5. – P. 905–914.

217. Vincent A., Hertz D., Petit C., Kretz C., Oberlé I., Mandel J.-L. Abnormal pattern detected in fragile-X patients by pulsed-field gel electrophoresis // *Nature*. – 1991. – V. 349. – № 6310. – P. 624–626.
218. Wang B., Pan L., Wei M., Wang Q., Liu W.-W., Wang N., Jiang X.-Y., Zhang X., Bao L. FMRP-mediated axonal delivery of miR-181d regulates axon elongation by locally targeting Map1b and Calm1 // *Cell Rep*. – 2015. – V. 13. – № 12. – P. 2794–2807.
219. Wang H.W., Noland C., Siridechadilok B., Taylor D.W., Ma E., Felderer K., Doudna J.A., Nogales E. Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex // *Nat. Struct. Mol. Biol*. – 2009. – V. 16. – № 11. – P. 1148–1153.
220. Wang L., Mo Q., Wang J. MiRExpress: A database for gene coexpression correlation in immune cells based on mutual information and pearson correlation // *J. Immunol. Res*. – 2015. – V. 2015. – P. 1–10.
221. Wang L., Zhou L., Jiang P., Lu L., Chen X., Lan H., Guttridge D.C., Sun H., Wang H. Loss of miR-29 in myoblasts contributes to dystrophic muscle pathogenesis // *Mol. Ther*. – 2012. – V. 20. – № 6. – P. 1222–1233.
222. Wen J., Ladewig E., Shenker S., Mohammed J., Lai E.C. Analysis of nearly one thousand mammalian mirtrons reveals novel features of dicer substrates // *PLoS Comput. Biol*. – 2015. – V. 11. – № 9. – P. e1004441.
223. Winarni T.I., Chonchaiya W., Sumekar T.A., Ashwood P., Morales G.M., Tassone F., Nguyen D. V, Faradz S.M.H., Van de Water J., Cook K., Hamlin A., Mu Y., Hagerman P.J., Hagerman R.J. Immune-mediated disorders among women carriers of fragile X premutation alleles // *Am. J. Med. Genet. Part A*. – 2012. – V. 158A. – № 10. – P. 2473–2481.
224. Wright M.W., Bruford E.A. Naming «junk»: Human non-protein coding RNA (ncRNA) gene nomenclature // *Hum. Genomics*. – 2011. – V. 5. – № 2. – P. 90.
225. Wu H., Tao J., Chen P.J., Shahab A., Ge W., Hart R.P., Ruan X., Ruan Y., Sun Y.E. Genome-wide analysis reveals methyl-CpG-binding protein 2-dependent regulation of microRNAs in a mouse model of Rett syndrome // *Proc. Natl. Acad. Sci*. – 2010. – V. 107. – № 42. – P. 18161–18166.

226. Wutz A., Gribnau J. X inactivation Xplained // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2007. – V. 17. – № 5. – P. 387–393.
227. Xu K., Li Y., Allen E.G., Jin P. Therapeutic Development for CGG Repeat Expansion-Associated Neurodegeneration // *Front. Cell. Neurosci.* – 2021. – V. 15. – P. 157.
228. Yasuda Y., Hashimoto R., Yamamori H., Ohi K., Fukumoto M., Umeda-Yano S., Mohri I., Ito A., Taniike M., Takeda M. Gene expression analysis in lymphoblasts derived from patients with autism spectrum disorder // *Mol. Autism.* – 2011. – V. 2. – № 1. – P. 9.
229. Yi Y.-H.H., Sun X.-S.S., Qin J.-M.M., Zhao Q.-H.H., Liao W.-P.P., Long Y.-S.S. Experimental identification of microRNA targets on the 3' untranslated region of human FMR1 gene // *J. Neurosci. Methods.* – 2010. – V. 190. – № 1. – P. 34–38.
230. Zeng Y., Yi R., Cullen B.R. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2003. – V. 100. – № 17. – P. 9779–9784.
231. Zhang L., Wang T., Wright A.F., Suri M., Schwartz C.E., Stevenson R.E., Valle D. A microdeletion in Xp11.3 accounts for co-segregation of retinitis pigmentosa and mental retardation in a large kindred // *Am. J. Med. Genet.* – 2006. – V. 140 A. – № 4. – P. 349–357.
232. Zhang Y., Fan M., Wang Q., He G., Fu Y., Li H., Yu S. Polymorphisms in microRNA genes and genes involving in NMDAR signaling and schizophrenia: a case-control study in chinese han population // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5. – № 1. – P. 12984.
233. Zongaro S., Hukema R., D'Antoni S., Davidovic L., Barbry P., Catania M.V., Willemsen R., Mari B., Bardoni B. The 3' UTR of FMR1 mRNA is a target of miR-101, miR-129-5p and miR-221: implications for the molecular pathology of FXTAS at the synapse // *Hum. Mol. Genet.* – 2013. – V. 22. – № 10. – P. 1971–1982.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Список научных мероприятий, на которых были представлены результаты диссертационной работы

1. Международная научная конференция: European Human Genetics Virtual Conference (ESHG 2020), 6-9 июня, 2020 «Human FMR1 gene expression regulation by microRNA in a cellular model».
2. Международная научная конференция: European Human Genetics Conference (ESHG 2019), Июнь 15-18, 2019 Гетеборг, Швеция «New insights on the role of noncoding RNAs in the pathology of Fragile X-associated disorders»;
3. Конференция с международным участием: OpenBio-2018, Кольцово, 23-25 октября 2018 «Исследование участия некодирующих РНК в развитии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой»;
4. Международная научная конференция: EMBO Conference «Chromatin and Epigenetics», Май 3-6, 2017, Хайдельберг, Германия «The histone deacetylase inhibitors effect on the FMR1 gene expression in the cell lines of patients with Fragile X syndrome»;
5. Международная научная конференция: 12th International Congress of Cell Biology, Июль 21 - 25, 2016, Прага, Чехия «Inhibitors of Histone Deacetylases are Weak Activators of FMR1 Gene in Fragile X Syndrome Cell Lines»;
6. Международная научная студенческая конференция: МНСК-2016, Апрель 16-20, 2016, Новосибирск, Россия «Реактивация экспрессии гена *fmr1* в культурах клеток пациентов с синдромом ломкой x-хромосомы».

**ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Список публикаций в рецензируемых научных журналах
по теме диссертации**

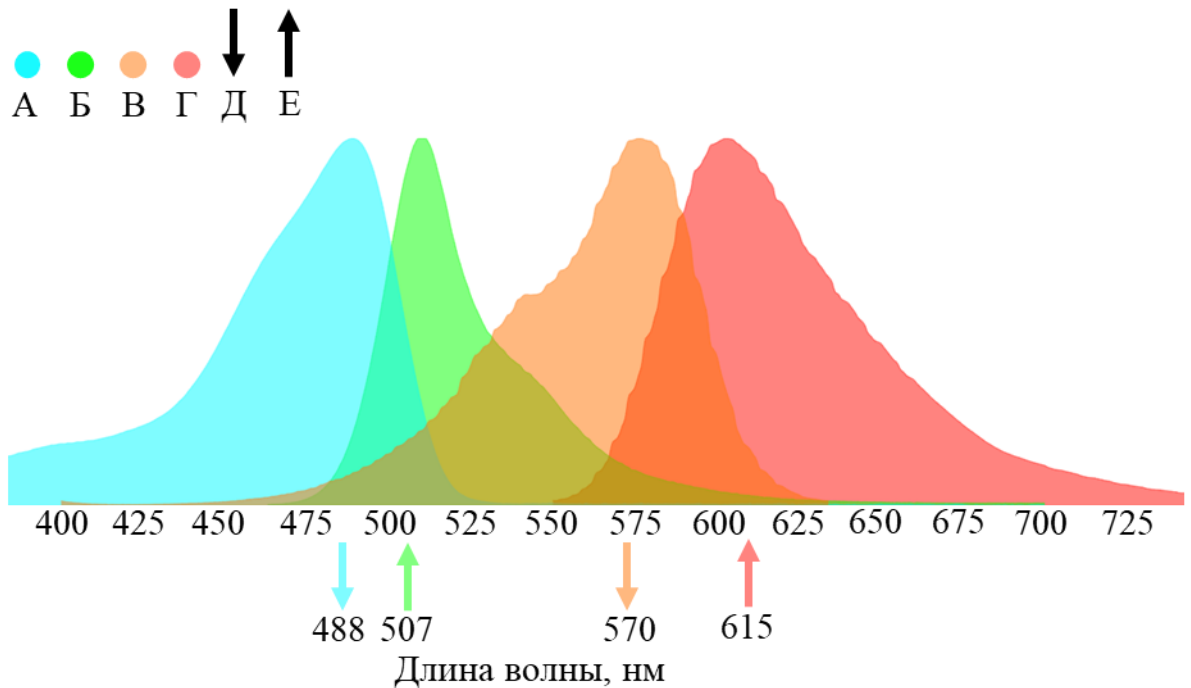
1. **Dolskiy A. A.**, Yarushkin A. A., Grishchenko I. V., Lemskaya N. A., Pindyurin A. V., Boldyreva L. V., Pustyl'nyak V. O., Yudkin D. V. miRNA expression and interaction with the 3' UTR of FMR1 in FRA_Xopathy pathogenesis // Non-coding RNA Res. – 2021. – V. 6. – № 1. – P. 1–7. (Scopus, WoS, РИНЦ)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

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Праймеры, используемые при исследовании экспрессии микроРНК.

микроРНК	Праймеры для ОТ 5'→3'	Праймеры для ПЦР в реальном времени	
		Прямой праймер 5'→3'	Зонд 5'→3'
hsa-miR-182-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACTGGATACGACa gtgtg	CAGCGGTTTGGCAATG GTAGA	(FAM)-CTGGATACGACAGTGTGAGTTC- (BHQ-1)
hsa-miR-23a-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACTGGATACGACg gaaat	TCCGGATCACATTGCCA GGG	(FAM)-ACTGGATACGACGGAAATCCC- (BHQ-1)
hsa-miR-25-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACTGGATACGACt cagac	ATGCGGCATTGCACTTG TCTC	(FAM)-ACTGGATACGACTCAGACCGA- (BHQ-1)
hsa-miR-148a-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACTGGATACGACa caaag	TTGCGGTCAGTGCACТА CAGA	(FAM)- CACTGGATACGACACAAAGTTCT- (BHQ-1)
hsa-miR-139-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACTGGATACGACa ctgga	GCGGTCTACAGTGAC GTG	(FAM)-ACTGGATACGACACTGGAGAC- (BHQ-1)
hsa-miR-221-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACTGGATACGACg aaacc	CGCGGAGCTACATTGT CTGC	(FAM)-ACTGGATACGACGAAACCCAG- (BHQ-1)
hsa-miR-302a-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACTGGATACGACt cacca	TGGCGGTAAGTGCTTCC ATGT	(FAM)- ACTGGATACGACTCACCAAAACA- (BHQ-1)

mmu-miR-139-5p		GCGCGTCTACAGTGCA CG	
mmu-miR-182-5p		GCAGCGTTTGGCAATG GTAGA	
mmus-SNORD68	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACTGGATACGAC CATCAG	CTGTA CTGACTTGATGA AAGTACTT	(FAM)- CTGGATACGACCATCAGATGGAA- (BHQ-1)
mmus-SNORD70	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACTGGATACGAC TCTCAG	TTTGGA ACTGAATCTAA GTGATTAAAC	(FAM)-CGACTCTCAGTGGTAGTGACG- (BHQ-1)
SNORD48 (U48)	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACTGGATACGACg gtcag	GCGGAGTGATGATGAC CCC	(FAM)-ACTGGATACGACGGTCAGAG- (BHQ-1)
SNORD44 (U44)	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACTGGATACGAC Agtcagt	TCGGCCTGGATGATGA TAAGC	(FAM)- ACTGGATACGACAGTCAGTTAGA- (BHQ-1)
Универсальный обратный праймер (Uni)	TCGTATCCAGTGCAGGGTCC		
FusionRed	Прямой праймер 5'→3'	Обратный праймер 5'→3'	Зонд 5'→3'
	CCCTCGGATGTGCACTTGAA	GGTGAGCGAGCTGATT AAGG	(FAM)-TGCCCTCCATGTACAGCTTCAT- (BHQ-1)

ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Спектр поглощения/излучения FusionRed и eGFP при анализе взаимодействия микроРНК с 3'-НТО мРНК гена *FMRI*.



Спектр поглощения/излучения FusionRed и eGFP при анализе взаимодействия микроРНК мРНК гена *FMRI*. А) диапазон спектра поглощения FusionRed; Б) диапазон спектра поглощения eGFP; В) диапазон спектра излучения FusionRed; Г) диапазон спектра излучения eGFP; Д) спектр поглощения при анализе флуоресцентных белков; Е) спектр излучения (детекции) при анализе флуоресцентных белков.

Благодарности

Работа выполнена в отделе геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Автор глубоко признателен коллегам, без участия которых выполнение настоящей работы было бы невозможно:

Грищенко И.В. (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) за помощь в работе по генотипированию использованных в работе клеточных культур и модельных животных с использованием подхода оптимизированной ПЦР для CGG обогащенных последовательностей, а также за помощь в подготовке диссертации и полезные советы по ее написанию.

Канд. биол. наук Пиндюрину А.В. (ИМКБ СО РАН) за предоставление плазмидных конструкций, которые были использованы в работе.

Канд. биол. наук Ярушкину А.А. (НИИМББ структурное подразделение ФИЦ ФТМ) за помощь в постановке методики анализа уровня белка FMRP, а также анализа уровня флуоресценции репортерных белков с использованием флуориметра.

Работа поддержана грантами Российского научного фонда № 15-15-10001 и № 18-15-00099.