

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

На правах рукописи

Савельева Анна Валентиновна

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ РНК ВО ФРАКЦИЯХ ПЛАЗМЫ
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ВЛИЯНИЕ НУКЛЕОФОЗМИНА 1 НА
ПРОНИКНОВЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ТАКИХ РНК В
КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

03.01.03 – молекулярная биология

**Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
к.х.н., доцент Семенов Дмитрий Владимирович**

Новосибирск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ КОМПЛЕКСЫ КРОВИ И ИХ РНК (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	12
1.1 ВВЕДЕНИЕ	12
1.2 ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ РНК-СОДЕРЖАЩИЕ КОМПЛЕКСЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА	12
1.3 БИОГЕНЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ	15
1.3.1 Биогенез экзосом	15
1.3.1.1 Формирование экзосом	15
1.3.1.2 Транспорт белков в экзосомы	17
1.3.1.3 Транспорт РНК в экзосомы	18
1.3.1.4 Секреция экзосом	20
1.3.1.5 Интернализация экзосом клетками-реципиентами	21
1.3.2 Биогенез, секреция и интернализация микровезикул	23
1.3.3 Биогенез, секреция и интернализация апоптотических телец	25
1.3.4 Биогенез, секреция и интернализация белковых РНК-содержащих комплексов	26
1.4 РНК В СОСТАВЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ	27
1.5 УЧАСТИЕ РНК ВНЕКЛЕТОЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ В РАЗВИТИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ	31
1.6 УЧАСТИЕ РНК ВНЕКЛЕТОЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ЧЕЛОВЕКА	33
1.7 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	35
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	36
2.1 ОБОРУДОВАНИЕ	36
2.2 РЕАКТИВЫ	36
2.3 ФЕРМЕНТЫ	37
2.4 ШТАММЫ	37
2.5 КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК	38
2.6 ПЛАЗМИДЫ	38
2.7 ПРОГРАММЫ	38
2.8 РАСТВОРЫ И СРЕДЫ	38

2.9	МЕТОДЫ.....	40
2.9.1	Электрофорез	40
2.9.1.1	Электрофорез в агарозном геле.....	40
2.9.1.2	Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях.....	40
2.9.1.3	Электрофорез в ПААГ в нативных условиях	40
2.9.1.4	Электрофорез в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН)	41
2.9.2	Культивирование клеток человека.....	41
2.9.3	Получение фракций крови и их характеристика	41
2.9.3.1.	Фракционирование крови	41
2.9.3.2.	Просвечивающая электронная микроскопия.....	42
2.9.3.4.	Проточная цитометрия.....	43
2.9.3.5.	Выделение суммарной РНК фракций крови I-V	43
2.9.3.6.	Анализ профилей РНК фракций крови I-V с помощью Agilent Bioanalyzer	44
2.9.4	Конструирование и секвенирование кДНК-библиотек SOLiD.....	44
2.9.5	Биоинформационный анализ данных секвенирования.....	44
2.9.6	Поиск кцРНК в массивах данных секвенирования РНК фракций крови I-V.....	46
2.9.7	Анализ функций РНК крови человека <i>in silico</i>	47
2.9.8	Анализ распределения кцРНК и их мРНК-гомологов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.....	47
2.9.9	Получение экспрессирующего вектора рЕТ23a_NPM1.....	49
2.9.10	Получение компетентных клеток штамма <i>E. coli</i> Top 10.....	50
2.9.11	Трансформация клеток <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	51
2.9.12	Биосинтез нуклеофозмина 1 в клетках штамма <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/рЕТ23a_NPM1	51
2.9.13	Очистка рекомбинантного аналога NPM1-His ₆	51
2.9.14	Анализ структуры NPM1-His ₆	52
2.9.15	Анализ примесной нуклеазной активности в препаратах NPM1-His ₆	52
2.9.16	Анализ влияния NPM1-His ₆ на жизнеспособность клеток MCF-7	52
2.9.17	Получение синтетических аналогов некодирующих РНК человека.....	53
2.9.18	Взаимодействие NPM1-His ₆ с синтетическими РНК	53
2.9.19	Трансфекция клеток MCF-7 комплексами NPM1-His ₆ с синтетическими аналогами AluY-РНК и C/D бокс РНК.....	54
2.9.20	Анализ накопления синтетических РНК в клетках MCF-7 методом обратной транскрипции и амплификации.....	54
	ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	55

3.1 ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ	56
3.2 АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ МЕМБРАННЫХ ЧАСТИЦ ВО ФРАКЦИЯХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДАМИ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ, ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ И ДИНАМИЧЕСКОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ	57
3.3 ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СУММАРНОЙ РНК ФРАКЦИЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА	61
3.4 АНАЛИЗ РНК ФРАКЦИЙ КРОВИ I-V ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ	62
3.4.1 Характеристические РНК фракций крови I-V человека	66
3.4.1.1 Распределение митохондриальных РНК во фракциях крови	66
3.4.1.2 Распределение мажорных клеточных РНК и транскрибируемых геномных повторов во фракциях крови	67
3.4.1.3 Экзоны мРНК и некодирующих РНК, аннотированные в базе данных РНК человека RefSeq	69
3.4.2 Биоинформационный поиск РНК с дифференциальной и инвариабельной экспрессией во фракциях крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ	69
3.4.2.1 Инвариабельные мтРНК и транскрипты геномных повторов фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ	70
3.4.2.2 Инвариабельные мРНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ	70
3.4.2.3 Инвариабельные днРНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ	71
3.4.2.4 Инвариабельные микроРНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ	72
3.4.2.5 Инвариабельные мяоРНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ	73
3.4.2.6 Инвариабельные фрагменты РНК, неаннотированных в базе данных RefSeq (non-RefSeq), фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ	73
3.4.2.7 Дифференциально распределенные фрагменты РНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ	74
3.5 КОЛЬЦЕВЫЕ РНК ФРАКЦИЙ КРОВИ I-V ЧЕЛОВЕКА	75
3.5.1 Поиск индикаторных последовательностей кольцевых транскриптов в массиве данных высокопроизводительного секвенирования РНК форменных элементов, плазмы и субфракций плазмы крови человека	76
3.5.2 Анализ функций кцРНК крови человека in silico	79

3.5.3 Анализ распределения кцРНК во фракциях крови здоровых доноров методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени	80
3.5.4 Анализ относительного распределения кольцевых форм РНК и их линейных мРНК-гомологов во фракциях крови здоровых доноров методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени	83
3.5.5 Анализ экспрессии кольцевых РНК крови в культивируемых клетках человека методом ОТ-ПЦР.....	84
3.6 ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НУКЛЕОФОЗМИНА 1 В КАЧЕСТВЕ ТРАНСПОРТЕРА СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ РНК В КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА	85
3.6.1 Создание штамма-продуцента рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1	86
3.6.2 Выделение и характеристика рекомбинантного аналога NPM1-His ₆	87
3.6.3 Оценка эффективности взаимодействия NPM1-His ₆ с синтетическими РНК.....	89
3.6.4 Оценка влияния NPM1-His ₆ на эффективность трансфекции синтетических РНК в клетки MCF-7 человека.....	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	93
ВЫВОДЫ	95
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	96
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	97
ПРИЛОЖЕНИЕ А	121

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BF – бромфеноловый синий

EiCiRNA – кольцевая рибонуклеиновая кислота с экзон-интронной структурой

EIPA – 5-(N-этил-N-изопропил)амилорид

ESCRT – белковый комплекс, отвечающий за транспорт в процессе эндосомальной сортировки (endosomal sorting complex required for transport)

FPKM – количество прочтений, нормированное на длину экзона в килобазах и на количество прочтений в кДНК-библиотеке в миллионах (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped)

HPRT – гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза

ILV – интралюминальные везикулы мультивезикулярного тельца

LBPA – лизобисфосфатидная кислота

LINE - длинные повторяющиеся генетические элементы (long interspersed elements)

LTR – длинные концевые повторы (long terminal repeats)

MVB – мультивезикулярное тельце

NPM1-His₆ – рекомбинантный аналог нуклеофозмина 1 человека, содержащий полигистидиновый тракт (НННННН) на N-конце

PMSF – фенилметил-сульфонилфторид

SINE – короткие повторяющиеся генетические элементы (short interspersed elements)

AA – акриламид

АКЛ – аденокарцинома легкого

бис-AA – бис-акриламид

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

днРНК – длинная некодирующая РНК

ДСН – додецилсульфат натрия

ДТТ – дитиотреитол

дцРНК - двуцепочечная РНК

дцРНК-ВПЧ – двуцепочечная РНК вирусо-подобных частиц

ДЭПК - диэтилпирокарбонат

е. а. – единицы активности

ИПТГ - изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

кцРНК – кольцевая рибонуклеиновая кислота

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

мА – миллиампер
мРНК – матричные РНК
мтРНК – митохондриальные РНК
МТТ – 3-(4, 5-диметил-2-тиазолил)-2, 5-дифенил-2Н-тетразолия бромид
мцРНК – малые цитоплазматические РНК
мяоРНК – малая ядрышковая РНК
мяРНК – малые ядерные РНК
н. – нуклеотид(ы)
НК – нуклеиновая кислота
нкРНК – некодирующие РНК
НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
о. е. – оптические единицы
ПААГ – полиакриламидный гель
ПКРЛ – плоскоклеточный рак легкого
ПЭГ – полиэтиленгликоль
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
рРНК – рибосомные РНК
т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов
Трис - трис(гидроксиметил)аминометан
тРНК – транспортная РНК
ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор
ФЭУ - фотоэлектронные умножители
ХС – ксиленцианол
ЦКП – центр коллективного пользования
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ВВЕДЕНИЕ

Кровь является одной из самых динамичных тканей человека и отличается повышенной вариабельностью состава не только между индивидуумами, но и в пределах одного организма, отражая его физиологическое состояние. РНК присутствуют в крови человека в форменных элементах, а также во внеклеточных мембранных везикулах (апоптотических тельцах, микровезикулах и экзосомах), внеклеточных комплексах с РНК-связывающими белками и комплексах с липопротеинами высокой плотности [1-3]. Изменение набора РНК периферической крови, в том числе и ее внеклеточных фракций, таких как плазма и сыворотка, отражает протекание различных физиологических и патологических процессов в клетках и тканях организма. Изменения состава РНК циркулирующих везикул крови используют для разработки перспективных подходов к малоинвазивной диагностике заболеваний человека. И хотя в настоящее время структура и свойства внеклеточных РНК человека исследованы лишь частично, данные литературы указывают на то, что внеклеточные мембранные везикулы крови содержат полноразмерные формы всех классов клеточных РНК, таких как рРНК, тРНК, мРНК, микроРНК, коротких и длинных некодирующих РНК, а также их фрагменты [4, 5]. Для внеклеточных микроРНК крови также показана их циркуляция в комплексах с липопротеинами высокой плотности [3] и РНК-связывающими белками, такими как аргонавт 2 (AGO2) [2] и нуклеофозмин 1 (NPM1) [6].

Показано также, что внеклеточные комплексы – везикулы, рибонуклеопротеины и липопротеины – являются медиаторами процессов межклеточного взаимодействия, и вовлечены в развитие иммунного ответа, воспалительных реакций, а также опосредуют процессы, связанные с развитием онкологических заболеваний и вирусных инфекций [1]. В связи с этим огромный интерес вызывает возможность использования циркулирующих комплексов для доставки лекарственных средств и поиска диагностических маркеров.

Несмотря на интенсивные исследования, направленные на описание состава циркулирующих РНК крови, данных о сравнительном анализе распределения клеточных РНК во фракциях плазмы крови человека, обогащенных мембранными везикулами или циркулирующими невезикулярными (немембранными) рибонуклеопротеиновыми комплексами, представлено не было.

Дальнейшие исследования биогенеза, транспортировки и интернализации внеклеточных комплексов позволят расширить представления о потенциале таких комплексов и усовершенствовать существующие подходы к диагностике и терапии заболеваний человека.

Целью данной работы являлось проведение сравнительного анализа состава внеклеточных РНК фракций плазмы крови человека в норме и при развитии онкологического заболевания, а также оценка эффективности проникновения комплексов синтетических аналогов внеклеточных РНК и нуклеофозмина 1 в клетки человека.

В ходе работы необходимо было решить следующие задачи:

- методом последовательного центрифугирования получить фракции крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), обогащенные внеклеточными циркулирующими везикулами, и провести анализ морфологии, антигенного состава и гидродинамических размеров частиц;

- провести высокопроизводительное секвенирование РНК фракций плазмы крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ и охарактеризовать наборы полученных РНК;

- выявить формы РНК, характеризующиеся дифференциальным распределением во фракциях крови;

- выявить формы РНК, характеризующиеся дифференциальной экспрессией в анализируемых фракциях крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ;

- провести поиск кольцевых РНК в составе фракций крови человека и определить распределение их полноразмерных форм во фракциях крови здоровых доноров методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени;

- исследовать влияние рекомбинантного белка нуклеофозмина 1 на эффективность накопления синтетических аналогов внеклеточных РНК в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость. В настоящей работе впервые проведен сравнительный анализ состава РНК внеклеточных комплексов, циркулирующих в крови человека в норме и при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ). Показано, что внеклеточные везикулы плазмы крови, осаждаемые при усилиях 160 000 g, отличаются повышенным содержанием фрагментов малых ядерных РНК U1, U5A/B и U6 и пониженным содержанием фрагментов малых ядрышковых РНК.

В составе РНК фракций крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ выявлено 8 новых форм кольцевых РНК, ранее не аннотированных в базе данных circbase.org. Впервые показано, что полноразмерные кольцевые РНК циркулируют в крови в составе комплексов с мембранными везикулами крови.

Впервые проведен анализ влияния рекомбинантного белка нуклеофозмина 1 на проникновение синтетических аналогов внеклеточных РНК плазмы крови в клетки человека и показано, что протяженные структурированные РНК (> 300 н.) в комплексе с

нуклеофозмином 1 эффективнее накапливаются в клетках по сравнению со свободными РНК.

Полученные в работе данные об относительном содержании фрагментов и полноразмерных РНК в составе различных типов внеклеточных комплексов плазмы крови человека в норме и при раке легкого расширяют и дополняют существующие представления о составе РНК циркулирующих комплексов крови. Выявленные для каждой фракции характеристические РНК, а также РНК, содержание которых во фракциях крови здоровых доноров отличается от онкопациентов, могут быть использованы для разработки ОТ-ПЦР тест-систем для ранней диагностики НМРЛ. Подход, разработанный для доставки аналогов синтетических РНК в клетки, основанный на использовании РНК-связывающих белков, может стать основой для создания РНК-трансфектантов белковой природы.

Положения, выдвигаемые на защиту.

1) Везикулы, осаждаемые из плазмы крови человека при усилиях 16 000 g и 160 000 g, имеют диаметр 40-100 нм и обогащены поверхностными маркерами тромбоцитов, Т-клеток и эндосом;

2) Везикулы плазмы крови человека, осаждаемые при усилиях 160 000 g, отличаются от других внеклеточных комплексов крови повышенным содержанием фрагментов малых ядерных РНК U1, U5A/B и U6;

3) Везикулы плазмы крови человека обеднены фрагментами малых ядрышковых РНК;

4) Наборы РНК внеклеточных комплексов крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого отличаются по содержанию индивидуальных форм РНК классов мРНК, микроРНК и малых ядрышковых РНК;

5) В составе внеклеточных циркулирующих комплексов плазмы крови человека присутствуют кольцевые РНК, при этом показано, что полноразмерные кольцевые РНК циркулируют в крови в составе везикул;

6) Рекомбинантный аналог нуклеофозмина 1 человека образует стабильные комплексы с протяженными структурированными РНК (> 300 н.) и повышает эффективность проникновения таких РНК в клетки человека.

Публикации и апробация результатов. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах. Результаты работы были представлены на II Международной конференции "Физико-химическая биология" (Новосибирск, Россия, 2011), 16-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА" (Пущино, Россия, 2012),

Международной конференции «Постгеномные технологии для биомедицины» (Новосибирск, Россия, 2012), Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские бионанотехнологии» (Москва, Россия, 2012), Международной конференции EMBO|EMBL Symposium «The complex life of mRNA» (Хайдельберг, Германия, 2012), научной конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, Россия, 2013), Международной конференции FEBS EMBO 2014 (Париж, Франция, 2014), Международной конференции «IX Congress CNAPS – Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum» (Берлин, Германия, 2015), VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015), XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова (Москва, Россия, 2016), Международной конференции 15th Annual Meeting of the International Society for Extracellular Vesicles (Роттердам, Нидерланды, 2016), Международной конференции «Химическая биология-2016» (Новосибирск, Россия, 2016), V съезде биохимиков России (Сочи, Россия, 2016).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 135 страницах, включает 17 рисунков, 7 таблиц и 1 приложение. Список литературы содержит 270 источников.

Личный вклад автора. Большинство экспериментов и анализ полученных данных выполнены лично автором. Забор крови из локтевой вены здоровых доноров проведен в ЦНМТ Гладких Л. Ф. Подбор пациентов с НМРЛ и забор крови из локтевой вены у пациентов проведен в торакальном отделении ГБУЗ НСО «НООД» под руководством к.м.н., Козлова В. В. Секвенирование кДНК-библиотек на платформе SOLiD выполнены в ЦКП «Геномика» СО РАН. Масс-спектрометрический анализ подготовленных образцов белков выполнен сотрудниками центра Масс-спектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН. Микроскопические исследования были проведены в группе микроскопического анализа ИХБФМ СО РАН д.б.н. Рябчиковой Е. И. и к.б.н. Разум К. С. Биоинформационный анализ данных высокопроизводительного секвенирования был выполнен совместно с научным руководителем работы, к.х.н., доцентом Семеновым Д. В.

ГЛАВА 1. ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ КОМПЛЕКСЫ КРОВИ И ИХ РНК (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Введение

Кровь человека обеспечивает все системы организма питательными веществами, такими как аминокислоты, сахара, липиды и электролиты. Кроме того кровь опосредует отток метаболитов и углекислого газа, участвует в процессах, связанных с поддержанием гомеостаза (постоянство внутренней среды), а также осуществляет транспорт сигнальных молекул (гормонов, нейромедиаторов) в процессе межклеточной коммуникации [7].

Кровь представляет собой взвесь форменных элементов (клеток крови) в жидкой плазме. Форменные элементы крови подразделяются на эритроциты, лейкоциты и тромбоциты [8]. Плазма крови состоит из воды и растворенных в ней белков (альбумины, иммуноглобулины, фибриноген), электролитов, ферментов, гормонов, питательных органических веществ (глюкоза, липиды, витамины) и метаболитов (мочевина, креатинин) [7, 8]. Недавно было установлено, что в плазме крови человека присутствуют комплексы РНК с белками и липопротеинами, а также РНК-содержащие мембранные везикулы, секретируемые различными клетками организма [2, 3, 9].

Состав белков и РНК мембранных везикул крови меняется при развитии патологических процессов, таких как онкологические и аутоиммунные заболевания [10, 11], а также в зависимости от физиологического состояния человека, например, при беременности [12]. Показано, что везикулы крови участвуют в регуляции процессов свертывания крови [13], иммунного ответа, в частности презентации антигенов [14], воспалительных реакций [15], а также используются патогенами и онкотрансформированными клетками для модуляции патологических процессов [3, 16, 17].

В обзоре представлены данные о биогенезе, составе и функциях известных внеклеточных РНК-содержащих комплексов крови, а также рассмотрены возможности практического применения этих комплексов для диагностики и терапии заболеваний человека.

1.2 Внеклеточные РНК-содержащие комплексы крови человека

Впервые внеклеточные комплексы, а именно везикулы были описаны Питером Вольфом в 1967 году. В своей работе он показал, что в процессе свертывания крови тромбоциты выделяют обогащенные липидами частицы, названные им тромбоцитарная пыль («platelet dust»), которые можно выделить из плазмы крови с помощью ультрацентрифугирования [18]. Несмотря на то, что мембранные везикулы являются

объектом молекулярно-биологических исследований с конца 70-х годов XX века, до сих пор не разработана единая общепринятая номенклатура для их классификации [19].

В современной литературе используют ряд терминов для обозначения секреторных везикул, большинство из которых отражает специфические функциональные особенности таких объектов, либо их происхождение. Так, например, везикулы матрикса, окружающего клетки хряща в районе эпифизарной пластинки большой берцовой кости, были названы в соответствии с их функцией – кальцифицирующие везикулы матрикса («calcifying matrix vesicles») [20]. Термин «толеросомы» («tolerosomes») был предложен для обозначения везикул, секретлируемых эпителиальными клетками кишечника, которые опосредуют развитие толерантности к пищевым антигенам [21].

Наибольшее распространение получили термины «экзосома» и «микровезикула»/«эктотосома». Однако их употребление в литературе неоднозначно. Например, термин «экзосома» используют для обозначения разных типов везикул:

- отпочковывающихся внутрь эндосомы в процессе формирования мультивезикулярных телец (MVB) и высвобождающихся во внеклеточное пространство путем слияния MVB с плазматической мембраной [22, 23];
- выполняющих определенную физиологическую функцию [24, 25];
- осаждающихся при центрифугировании с ускорением ~ 70 000-100 000 g [22, 26].

При этом термин «экзосома» относится и к внутриклеточному белковому комплексу, обладающему 3'-5' экзонуклеазной активностью и участвующему в процессах деградации РНК [27].

Термином «микровезикулы» обозначают:

- везикулы, которые отпочковываются от плазматической мембраны [28, 29];
- все секретлируемые везикулы [30];
- везикулы, осаждающиеся при центрифугировании с ускорением ~ 10 000 g [26, 29].

В данной работе термины «микровезикула» и «экзосома» используются согласно определениям, приведенным далее.

В настоящее время в крови человека, а также в других биологических жидкостях человека и в культуральной среде, конденсированной клетками человека, выявлено пять типов внеклеточных РНК-содержащих комплексов: три из них представляют собой мембранные пузырьки – экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца, а остальные два являются супрамолекулярными комплексами РНК с липопротеинами высокой плотности или с РНК-связывающими белками.

Экзосомы - это мембранные пузырьки размером 30-100 нм, которые отпочковываются во внутреннее пространство мультивезикулярного тельца в процессе созревания эндосомы и секретируются во внеклеточное пространство в результате слияния мембраны мультивезикулярного тельца с плазматической мембраной клетки и выхода ее содержимого во внеклеточное пространство (Рис. 1).

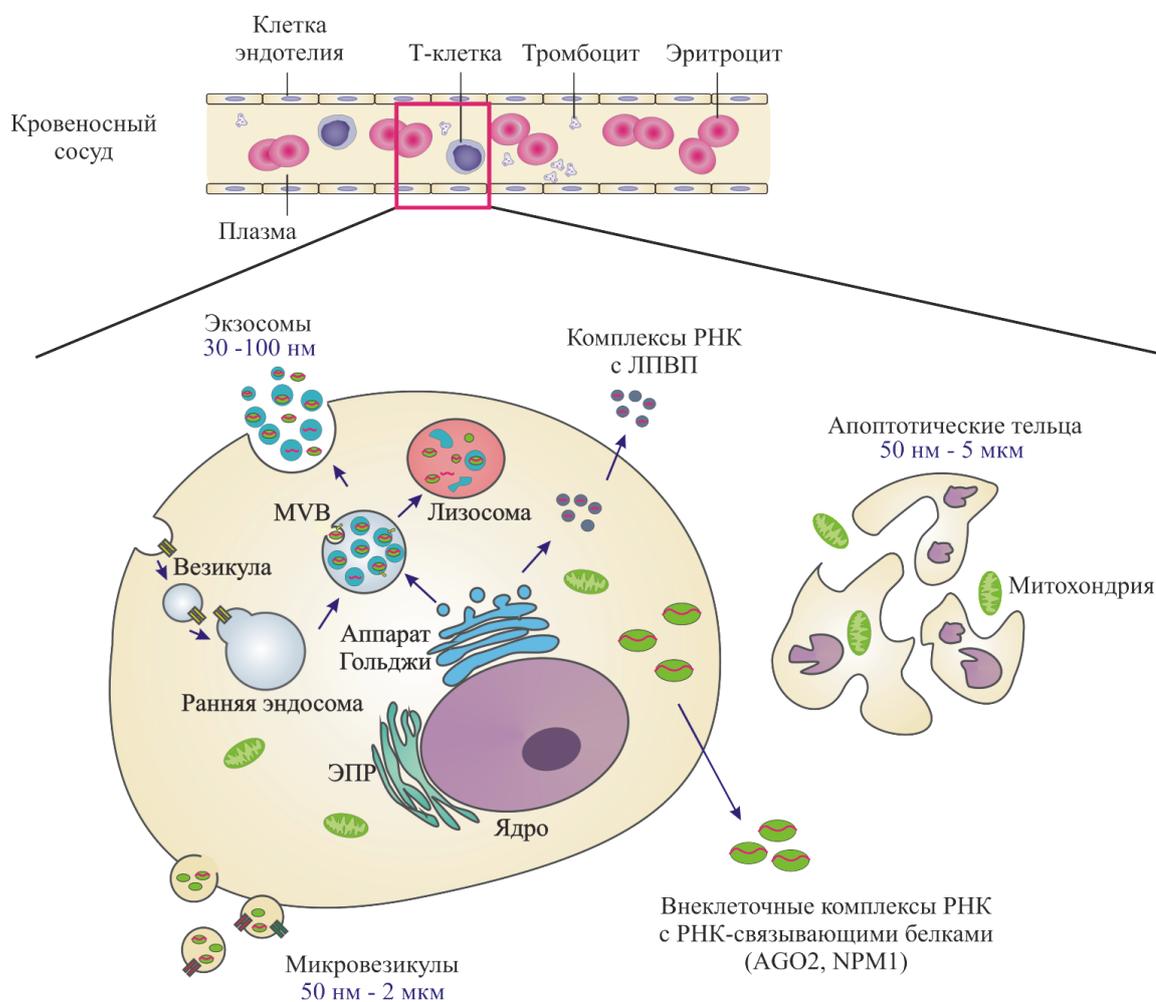


Рис. 1. Типы внеклеточных циркулирующих везикул и частиц крови и их основные источники. MVB – мультивезикулярное тельце; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

Микровезикулы (эктосомы) представляют собой мембранные пузырьки, которые образуются в результате отпочковывания наружной плазматической мембраны клетки и части прилежащего к ней содержимого цитоплазмы [31, 32]. Размер микровезикул частично перекрывается с экзосомами, но отличается большей вариабельностью: 50-2000 нм.

Апоптотические тельца – это везикулы диаметром 50-4000 нм, которые образуются из клеток в результате реализации в последних механизма программируемой клеточной гибели – апоптоза [33, 34].

Несмотря на схожесть функций, главной из которых является участие в процессах межклеточной коммуникации, внеклеточные циркулирующие комплексы крови значительно отличаются по составу и биогенезу.

1.3 Биогенез внеклеточных мембранных везикул

1.3.1 Биогенез экзосом

Экзосомы являются наиболее подробно изученным типом внеклеточных комплексов. Они секретируются большинством типов клеток человека, включая стволовые клетки, клетки эндотелия, гладкой мускулатуры, нервные клетки, а также клетки злокачественных опухолей. При этом экзосомы выявлены практически во всех внеклеточных жидкостях человека, в том числе в крови, моче, слюне, молоке, спинномозговой жидкости и асцитах [1].

1.3.1.1 Формирование экзосом

Экзосомы образуются в результате работы особого мембранного компартмента клетки - эндосомной сети - участвующего в сортировке и транспорте везикул клетки к месту их локализации, например, в лизосомы или к клеточной мембране. Именно эндосомная сеть определяет какие белки или липиды будут гидролизованы, секретированы или использованы повторно [35].

Эндосомы подразделяют на ранние, поздние и рециркулирующие. Ранние эндосомы связываются с эндоцитозными/пиноцитозными пузырьками, захватывают содержимое последних и определяют его дальнейший путь в клетке. Вещества, необходимые для использования в интактном виде, секретированы ранней эндосомой в составе рециркулирующих везикул, а компоненты, которые должны быть подвергнуты гидролизу или секретированы во внеклеточное пространство, упаковываются в небольшие мембранные везикулы, образующиеся за счёт инвагинации мембраны ранней эндосомы и последующего отсоединения пузырька в ее внутреннее пространство. В результате образуется структура диаметром 200-800 нм, внутри которой находится множество мембранных пузырьков диаметром 30-100 нм. Для обозначения такой структуры используют термин «мультивезикулярное тельце» (multivesicular body, MVB) или «поздняя эндосома», а внутренние мембранные пузырьки называют «интралюминальными везикулами» (intraluminal vesicles, ILVs) [36]. Впоследствии MVBs соединяются с лизосомами или плазматической мембраной клетки. В первом случае

происходит гидролиз содержимого поздней эндосомы, а во втором его секрета во внеклеточное пространство, в том числе в виде мембранных везикул, называемых экзосомами [35, 37].

При образовании экзосом, на стадии созревания мультивезикулярного тельца, происходит реорганизация эндосомальной мембраны и образование микродоменов, обогащенных мембранными тетраспанинами (tetraspanin enriched microdomains, TEMs), такими как CD63 и CD9 [38], а также специфическим набором липидов, в том числе холестеролом, сфингомиелинами, церамидами и лизобисфосфатидной кислотой (LBPA) [39, 40].

К настоящему времени описано два основных пути формирования экзосом: ESCRT-зависимый и липид-зависимый (опосредованный церамидами или LBPA).

ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) – это специализированные белковые комплексы, отвечающие за транспорт в процессе эндосомальной сортировки [41-43]. Всего описано четыре типа ESCRT-комплексов: ESCRT-0, -I, -II, -III, каждый из которых функционирует на определенном этапе формирования ILVs.

Сборка ESCRT-комплекса на мембране эндосомы начинается с того, что ESCRT-0 связывается с одним из компонентов мембраны - фосфатидилинозитол-3-фосфатом (PIP3, phosphatidylinositol 3-phosphate). Основной функцией ESCRT-0 является распознавание и загрузка убиквитинилированных белков в ILVs [44, 45]. Затем к месту локализации ESCRT-0 привлекаются комплексы ESCRT-I и II [46]. Показано, что комплексы ESCRT-I и -II запускают процесс почкования мембраны [42], а комплекс ESCRT-III участвует в его завершении [42, 43]. Сборка комплекса ESCRT опосредована адаптерным белком Alix, взаимодействующим с белками TSG101 и CHMP4 - компонентами ESCRT-II и -III, соответственно [47]. Предполагают, что Alix не только играет роль связующего звена при сборке комплекса ESCRT, но и может опосредовать процесс деубиквитинилирования белков ILVs [48]. Белки TSG101 и Alix наряду с тетраспанинами CD63 и CD9 часто выявляют в составе экзосом [49], что активно применяют для идентификации и направленного выделения везикул этого типа [50, 51].

Известно также, что, в ходе созревания мультивезикулярного тельца, часть ILVs образуется по альтернативному липид-зависимому пути. Например, показано, что обработка гигантских однослойных везикул (giant unilamellar vesicles, GUVs), содержащих сфингомиелины (SM), сфингомиелиназой (nSMase) приводит к формированию и накоплению мембранных пузырьков внутри просвета GUVs [52]. Известно, что церамиды, образующиеся под действием сфингомиелиназы из сфингомиелина, способны образовывать водородные связи и тем самым самоорганизовываться в крупные домены,

которые в последствие отпочковываются в виде везикул [53]. В связи с чем предполагают, что часть ILVs (экзосом) образуется по альтернативному пути за счет самоорганизации церамидов [52, 54].

Мембрана поздних эндосом/MVBs содержит уникальный компонент – лизобисфосфатную кислоту, который не встречается в других компартментах клетки и участвует в транспорте холестерина и белков [55, 56]. В экспериментах *in vitro* показано, что мембраны GUVs, содержащие лизобисфосфатную кислоту, способны к спонтанному отпочковыванию везикул в условиях градиента pH (pH 7,4 снаружи мембраны и pH 5,5 внутри GUV) [57]. Механизм везикулообразования, опосредованный LBPA, изучен мало. Однако показано, что одним из его регуляторов является адаптерный белок Alix, поскольку его рекомбинантный аналог ингибирует процесс спонтанного везикулообразования в системе GUVs [57].

В процессе формирования интралюминальных везикул (экзосом) происходит упаковка их содержимого – РНК, белков и низкомолекулярных соединений. Состав экзосом напрямую связан с механизмами, участвующими в формировании этих везикул. Часть РНК и белков, локализованных в экзосомах, попадает в них путем пассивного захвата содержимого цитоплазмы, прилежащей к месту формирования везикулы [58]. Однако показано, что экзосомы содержат специфические наборы РНК и белков, отличные от наборов РНК и белков цитоплазматической фракции клеток-продуцентов [59, 60], что указывает на существование механизмов направленного транспорта РНК/белков в экзосомы.

1.3.1.2 Транспорт белков в экзосомы

К настоящему моменту описано несколько альтернативных путей загрузки специфических белков в экзосомы. Показано, что комплексы ESCRT-0, -I и -II содержат убиквитин-связывающие субъединицы, которые позволяют им контролировать процесс сортировки убиквитинилированных белков в ILVs [61].

Однако часть белков попадает в экзосомы по ESCRT-независимому пути. Важную роль в процессе загрузки экзосом играют тетраспанины CD9, CD63 и CD81 – белки, которыми обогащены мембраны экзосом [62, 63]. С использованием первичной культуры лимфобластов мыши, нокаутированных по гену, кодирующему CD81, было показано, что в отсутствие CD81 происходит снижение накопления в экзосомах 25 белков, часть из которых относится к ГТФамам семейства Ras, рибосомным белкам и компонентам рецептора В-клеток [63]. В тоже время флотиллин-1 и стоматин упаковываются в экзосомы за счет взаимодействия с липидными рафтами, присутствующими на эндосомной мембране [64].

Кроме того показано, что локализованные в экзосомах синдекан (мембранный гепарансульфатпротеогликан) и его цитоплазматический адаптер синтенин-1 также являются медиаторами загрузки белков в экзосомы [65]. Известно, что на N-конце синтенина-1 расположен аминокислотный мотив LYPX_nL, который позволяет ему связываться с белком Alix – компонентом ESCRT-машины [66]. Здесь же расположен PDZ-домен, засчет которого синтенин-1 связывается с цитоплазматическим (C-концевым) доменом синдекана [65]. Засчет межмолекулярных взаимодействий комплекс синтенина-1 с Alix опосредует экзосомную локализацию синдекана и белков, взаимодействующих с гепарансульфатными цепями N-концевого внеклеточного домена синдекана. Одним из примеров таких белков является рецептор фактора роста фибробластов FGFR1, локализующийся на мембране интралюминальных везикул в процессе созревания MVB [65, 66]. При этом показано, что гепараназа – фермент, отвечающий за расщепление гепарансульфатов на поверхности клеток, стимулирует загрузку экзосом соединениями, взаимодействующими с гепарансульфатными цепями синдеканов [67].

1.3.1.3 Транспорт РНК в экзосомы

Экзосомы опосредуют транспорт специфических наборов РНК и белков от клеток-продуцентов к клеткам-реципиентам, тем самым участвуя в межклеточной коммуникации, а также развитию физиологических и патологических процессов [1, 59].

В состав экзосом входит набор тРНК, рРНК, мРНК, малых РНК, таких как микроРНК, мяРНК, мяоРНК, мцРНК, piwi-РНК, а также набор длинных некодирующих РНК (> 200 н.) и их фрагментов [59, 68-71]. Состав РНК экзосом отличается от РНК их клеток-продуцентов [5], однако показано, что экзосомы, секретируемые различными типами клеток, содержат схожие наборы микроРНК [72], что позволяет говорить о существовании общих путей селективного транспорта РНК в экзосомы.

С помощью биоинформатического поиска было установлено, что последовательности некоторых микроРНК экзосом обогащены короткими специфическими мотивами (EXOmotifs). Два таких мотива – GGAG и CCCU – часто встречались в последовательностях микроРНК, накапливающихся в экзосомах, секретируемых первичной культурой Т-лимфоцитов человека. При этом показано, что ядерные белки hnRNPA2B1 и hnRNPA1 обладают большим сродством к последовательностям EXOmotifs [73]. Известно, что hnRNPA2B1 участвует в цитоплазматическом транспорте мРНК олигодендроцитов, взаимодействуя со специфической последовательностью RTS (RNA transport sequence) [74], коровый элемент которой (AGGAG) перекрывается с одним из выявленных EXOmotifs [73, 74]. Поскольку в составе экзосом белки hnRNPA2B1 и hnRNPA1 сумоилированы, предполагают, что

селективная загрузка некоторых форм микроРНК, содержащих EXOmotifs, регулируется с помощью этой посттрансляционной модификации [74].

Поиск специфических мотивов в первичной структуре мРНК, которыми обогащены экзосомы, секретлируемые клетками первичной культуры меланомы и глиобластомы, позволил выявить в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) мРНК экзосом мотивы длиной ~ 25 н., называемые авторами «zipcode» [75]. Было показано, что найденные последовательности «zipcode» содержат коровую часть «CTGCC», которая, по-видимому, участвует в образовании шпильки в структуре 3'-UTR мРНК. Кроме того, некоторые из найденных мотивов «zipcode» содержат сайты узнавания микроРНК miR-1289. Введение мотива «zipcode», содержащего последовательность «CTGCC» и сайт узнавания miR-1289, в 3'-UTR мРНК гена eGFP, экспрессируемого в клетках HEK-293T, приводит к двукратному увеличению эффективности накопления мРНК eGFP в экзосомах HEK-293T. При этом гиперэкспрессия miR-1289 в клетках HEK-293T повышает эффективность накопления мРНК eGFP в экзосомах HEK-293T в шесть раз [75].

При изучении экзосом первичной культуры фибробластов крысы в них было выявлено повышенное содержание 50 микроРНК. Четверть (25,5 %) таких микроРНК относилась к «пассажирской» цепи (passenger strand) дуплекса микроРНК, образующегося в процессе созревания пре-микроРНК [76]. Как правило, «пассажирская» цепь гидролизуется, в то время как комплементарная ей «направляющая» цепь (guide strand) остается в составе RISC-комплекса и опосредует посттранскрипционный сайленсинг генов [77]. Было показано, что «пассажирская» цепь микроРНК miR-21*, секретлируемая в составе экзосом фибробластами сердца, может являться одним из медиаторов гипертрофии кардиомиоцитов [76]. Предполагают, что существует механизм селективного транспорта «пассажирских» цепей микроРНК в MVBs, медиаторами которого являются РНК-связывающие белки [78].

Доступность микроРНК для направленной загрузки в экзосомы также может быть связана с уровнем содержания их мРНК-мишеней в клетках. Показано, что в макрофагах, стимулированных интерлейкином-4, происходит перераспределение микроРНК между экзосомами и Р-тельцами (P-bodies, processing bodies) – цитоплазматическими структурами, участвующими в процессах деградации мРНК, а также посттранскрипционного подавления экспрессии генов, опосредованного микроРНК и siРНК [79]. При этом изменения в составе микроРНК, секретлируемых в экзосомах, напрямую связаны с изменением уровня их экспрессии в клетках-продуцентах под действием интерлейкина-4 [79].

Известно, что структуры некоторых РНК, как и белков, обладают повышенным сродством к компонентам липидных мембран. Так, например, показано, что последовательности РНК, способных связываться с липосомами, состоящими из смеси фосфатидилхолина и холестерина (4:1), обогащены олиго-G и олиго-C мотивами [80]. Другие РНК способны связываться с фосфолипидами, образуя гетерогенные олигомерные структуры, характерной особенностью которых является наличие петель [81].

Таким образом, можно заключить, что существует несколько путей направленной загрузки РНК/белков в экзосомы, основанных на взаимодействии элементов первичной и вторичной структуры загружаемых молекул с компонентами мембран эндосомной сети и специфическими белковыми комплексами, такими как ESCRT. Однако до сих пор не составлено детальное описание существующих механизмов направленной сортировки «грузов» в экзосомы, а также путей взаимодействия этих механизмов.

1.3.1.4 Секреция экзосом

Экзосомы внутри клетки представляют собой интралюминальные везикулы, наблюдаемые в просвете мультивезикулярных телец. В результате слияния мембраны MVB с плазматической мембраной клетки происходит выброс экзосом во внеклеточное пространство.

ГТФазы семейства Rab являются одними из основных регуляторов процессов внутриклеточного транспорта и взаимодействия внутриклеточных компартментов. При изучении механизмов, лежащих в основе секреции экзосом, было показано, что в разных клеточных линиях процесс секреции экзосом контролируется специфическим набором белков семейства Rab. Например, экспрессия *RAB11* необходима для секреции экзосом клетками эритролейкемии K562, индуцируемой ионами Ca^{2+} [82]. Белок олигодендроцитов RAB 35 опосредует секрецию экзосом, обогащенных протеолипидным белком липофилином – одним из основных белков миелина [83]. Показано, что ГТФаза RAB7 тоже участвует в модуляции высвобождения экзосом, поскольку нокаут клеток MCF-7 по гену *RAB7* приводит к появлению в их цитоплазме мультивезикулярных телец, переполненных интралюминальными везикулами. При этом накопление экзосом во внеклеточном пространстве таких клеток значительно снижено [65]. Нокаут генов *RAB2B*, *RAB9A*, *RAB5A*, *RAB27A* и *RAB27B* снижает уровень секреции экзосом клетками HeLa. При этом для гомологов RAB27A и RAB27B показано их непосредственное участие в транспортировке и докинге мультивезикулярных телец с плазматической мембраной [84]. Снижение уровня секреции экзосом было также показано при нокауте генов *RAB27A* и *RAB27B* в дендритных клетках мыши, что свидетельствует о существовании общих для разных линий клеток механизмов секреции экзосом. Кроме того, известно, что изменение

уровня экспрессии *RAB27A* и *RAB27B* в малигнизированных клетках коррелирует с уровнем метастазирования опухоли [85].

Содержимое лизосом тоже может секретироваться во внеклеточное пространство. Например, Ca^{2+} -зависимый экзоцитоз лизосом используется клеткой для восстановления целостности плазматической мембраны [86]. При этом показано, что секреция лизосом опосредована белками NAP-23, VAMP-7 и VAMP-8 семейства SNARE (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) attachment protein receptor), участвующими в процессах слияния клеточных мембран [87]. Предполагают, что слияние мембраны MVB с плазматической мембраной клетки может быть опосредовано SNARE-белками [88]. Так, например, известно, что белок VAMP7 клеток эритролейкемии человека линии K562 участвует в секреции экзосом, несущих ацетилхолинэстеразу [89]. Однако подавление экспрессии *VAMP7* в клетках почки собаки Майдин-Дэрби MDCK приводит к нарушению секреции лизосом, но не экзосом [90]. По-видимому, клетки различного тканевого происхождения используют специфический SNARE-опосредованный механизм секреции экзосом, который отличается от процесса секреции лизосом.

Предполагают, что многообразие путей секреции напрямую связано с наличием нескольких популяций экзосом (ILVs) внутри мультивезикулярного тельца, отличающихся механизмами биогенеза и сортировки «грузов» [91, 92].

1.3.1.5 Интернализация экзосом клетками-реципиентами

Механизмы интернализации экзосом клетками-реципиентами описаны лишь частично. Однако показано, что проникновение экзосом в клетки опосредовано макропиноцитозом [93, 94], эндоцитозом [93, 95], а также фагоцитозом [93, 96]. В результате экзосомы локализуются в просвете эндосом/фагосом, после чего мембрана экзосом может сливаться с мембраной эндосом/фагосом, что приводит к высвобождению содержимого экзосомы в цитоплазму клетки [96]. Предполагают, что содержимое экзосом может напрямую проникать в клетку путем слияния плазматической мембраны экзосом с наружной мембраной клетки-реципиента [93].

Методом просвечивающей электронной микроскопии было показано, что преинкубация дендритных клеток мыши с экзосомами В-лимфоцитов, мечеными конъюгатами антител (anti-IA^d) с 5 нм частицами золота, приводит к локализации меченых экзосом на поверхности внешней мембраны клетки или в просвете/на внутренней мембране фагосомы [96]. Однако авторам не удалось получить изображения, на которых отчетливо виден момент слияния интернализуемой экзосомы с плазматической мембраной клетки или фагосомы, что, предположительно, может быть связано с повышенной скоростью протекания данного процесса [96]. Также было показано, что

обработка дендритных клеток, экспрессирующих ген люциферазы, экзосомами, нагруженными ее субстратом – люцифериним, приводит к появлению биолюминисцентного сигнала в цитоплазме клетки, что подтверждает выход содержимого экзосом в цитоплазму после их проникновения в эндосому [96].

С использованием линии клеток карциномы яичника SCOV3 и ингибиторов путей эндоцитоза: хлорпромазина (ингибитора клатрин-зависимого эндоцитоза [97]), ЕРА (ингибитора макропиноцитоза [98]), цитохалазина D (ингибитора полимеризации актина и, как следствие, фагоцитоза [99] и других путей эндоцитоза [100]) и метил- β -циклодекстрина, используемого для удаления холестерина из мембраны [101], был проведен поиск путей проникновения экзосом в клетку [102]. В результате было показано, что использование любого из перечисленных соединений приводит к снижению накопления экзосом в клетках SCOV3, что свидетельствует о том, что экзосомы проникают в клетки, используя все основные пути эндоцитоза [102]. Авторами также было показано, что предобработка препаратов экзосом или клеток SCOV3 с помощью протеиназы К приводит к снижению эффективности проникновения экзосом в клетки-реципиенты, что говорит о непосредственном участии поверхностных белков мембран экзосом и клеток-реципиентов в процессе интернализации экзосом [102].

Блокировка антителами молекул адгезии CD11a и CD54, или тетраспанинов CD81, CD9 на поверхности экзосом дендритных клеток также приводит к снижению эффективности захвата экзосом дендритными клетками костного мозга. При этом показано, что одновременная блокировка интегринов α_v и β_3 на поверхности клеток-реципиентов приводит к схожему результату [95].

Кроме того, на захват экзосом клетками-реципиентами могут оказывать влияние липидные компоненты мембран. Показано, что в присутствии свободного фосфатидилсерина происходит снижение эффективности захвата экзосом, что говорит об участии фосфатидилсерина мембран экзосом в процессе распознавания их клетками-реципиентами [95].

Экзосомы могут проникать в клетки-реципиенты путем эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами. Так, например, установлено, что предобработка клеток филипином – полиеновым макролидом, способным специфично связывать холестерин, также приводит к снижению эффективности захвата экзосом [96, 103].

К настоящему времени представлено множество прямых доказательств и косвенных данных о том, что экзосомы способны не только проникать в цитоплазму, но и доставлять в клетки-реципиенты мРНК [104], а также микроРНК, в том числе в составе

RISC-комплексов [105]. Однако вопрос о механизмах компартиментализации компонентов экзосом (РНК, а также белков) в клетках-реципиентах до сих пор остается открытым.

1.3.2 Биогенез, секреция и интернализация микровезикул

Микровезикулы (эктосомы, микрочастицы) – это секретируемые клетками мембранные пузырьки диаметром 50-2000 нм, нагруженные специфическим набором липидов, белков и нуклеиновых кислот. Главным отличием микровезикул от экзосом является их сборка на внешней мембране клетки. Основные сведения, представленные в последних обзорах литературы о механизмах формирования, секреции и интернализации микровезикул, носят гипотетический характер [106-109].

Анализ биогенеза и секреции микровезикул, проведенный для ряда клеточных моделей, говорит о наличии общих стадий, а также индивидуальных особенностей, характерных для определенного типа клеток, секретирующих микровезикулы. Стадия инициации формирования микровезикул, по-видимому, является общей для большинства типов клеток: на первом этапе происходит перераспределение фосфолипидов плазматической мембраны, в том числе экспонирование фосатидилсерина на ее внешний слой, в результате чего образуются домены, способствующие отпочковыванию части цитоплазмы, окруженной плазмолеммой клетки [31, 110, 111]. Ранее было показано, что микровезикулы, секретируемые активированными нейтрофилами, содержат большое количество холестерина [112]. В ряде экспериментов было показано, что, как и в случае ILVs, холестерол, сфингомиелин и керамид являются одними из главных модуляторов эктоцитоза – процесса отпочковывания наружной плазматической мембраны клетки. При этом холестеролу – компоненту липидных рафтов – отводится ключевая роль в инициации секреции микровезикул [113, 114].

На завершающей стадии формирования микровезикулы происходит сближение точек перегиба мембраны и отшнуровывание зрелой микровезикулы во внеклеточное пространство, опосредованное работой актин-миозинового комплекса [115, 116]. При этом в литературе описано несколько независимых процессов, связанных с отсоединением сформировавшейся везикулы от поверхностной мембраны клетки. В экспериментах, проведенных на клеточной линии меланомы LOX, было показано, что гиперэкспрессия ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) – малого ГТФ-связывающего белка семейства ARF – приводит к повышенной секреции микровезикул. Увеличение уровня экспрессии ARF6 запускает каскад процессов, активирующих фосфолипазу D (PLD). Активация PLD в свою очередь приводит к мобилизации киназы ERK и локализации последней в плазматической мембране клетки. Последующие фосфорилирование ERK активирует киназу легкой цепи миозина MLCK (myosin light chain kinase), что приводит к фосфорилированию легких

цепей миозина и отсоединению микровезикулы от плазматической мембраны клетки [115].

В экспериментах с линией человеческих эмбриональные клеток почек HEK293T было показано, что процесс отпочковывания везикул от поверхностной мембраны клетки связан с работой ESCRT-комплекса. На первом этапе проходит релокализация белка TSG101 - одного из ключевых компонентов ESCRT комплекса – на внешнюю поверхность клеточной мембраны. Как было описано выше, белок TSG101 участвует в процессе биогенеза и загрузки экзосом при формировании мультивезикулярного тельца. Экспрессия белка ARRDC1 (arrestin domain-containing protein 1) приводит к перераспределению TSG101 и локализации последнего на внешней стороне клеточной мембраны. Показано, что в структуре ARRDC1 содержится аминокислотный мотив PSAP, благодаря которому он взаимодействует с доменом UEV (ubiquitin enzyme variant) белка TSG101, что и приводит к перераспределению последнего в клетке [117]. Однако подавление экспрессии ARRDC1 не приводит к полной блокировке секреции микровезикул, что говорит о существовании альтернативных механизмов их биогенеза и гетерогенности популяции микровезикул, секретируемых клеткой [117].

Для обозначения везикул, секретируемых по TSG101/ARRDC1-зависимому пути, используют термин «ARRDC1-mediated microvesicles» или ARMMs (ARRDC1-опосредованные микровезикулы). В составе данного типа микровезикул присутствуют белки TSG101, ARRDC1, и при этом не выявлено маркеров LAMP1, LAMP3 и CD63, характерных для экзосом. Показано, что высвобождение ARMMs напрямую зависит от АТФазной активности белка VPS4 (vacuolar protein sorting-associated protein 4) [117]. Интересно, что АТФаза VPS4 также участвует в сортировке молекулярных грузов и катализирует процесс отделения везикул от мембраны при формировании мультивезикулярных телец [118], а также мембранных везикул, содержащих вирусные частицы [119]. Таким образом, можно заключить, что механизмы биогенеза по крайней мере некоторых типов экзосом и микровезикул очень схожи, не смотря на разницу их локализации.

Ряд белков присутствует как в составе микровезикул, так и экзосом, однако выявлены белки, специфичные для микровезикул и тесно связанные с их функциями. Так, например, известно, что интегрин Mac-1 содержится в микровезикулах нейтрофилов [120]. Показано, что микровезикулы, секретируемые тромбоцитами, но не мегакариocyтами, содержат мембранные гликопротеины GP1b, GPIIb/IIIa и P-селектин [121]. Также известно, что некоторые линии раковых клеток секретируют в составе микровезикул матриксные металлопротеиназы [122]. Показано, что некоторые

компоненты ESCRT-машины, опосредующей формирование ILVs (экзосом), вовлечены в процессы сборки и секреции микровезикул. При этом показано, что TSG101 – субъединица комплекса ESCRT-I – играет важную роль в процессе отпочковывания и сортировки содержимого в микровезикулы [123].

1.3.3 Биогенез, секреция и интернализация апоптотических телец

Апоптотические тельца – это окруженные мембраной части клетки, которые содержат фрагменты хроматина и органеллы [124]. Апоптотические тельца образуются в ходе программируемой клеточной гибели (апоптоза) – процесса необходимого для некоторых стадий развития организма, поддержания гомеостаза, развития иммунной реакции и регенерации тканей [33]. В отличие от микровезикул и экзосом содержимое апоптотических телец не является продуктом селективного транспорта, а представляет собой случайным образом распределенные участки цитоплазмы, прилегавшие к мембране апоптотической клетки. После завершения апоптоза происходит захват и лизис апоптотических телец фагоцитами [125]. Показано, что клетки-акцепторы поглощают апоптотические тельца путем фагоцитоза, опосредованного взаимодействием специфических лигандов с рецепторами клеток-реципиентов. При этом для запуска данного процесса разные виды клеток используют отличные друг от друга наборы триггеров. Так, например, показано, что запуск фагоцитоза апоптотических телец макрофагами происходит за счет взаимодействия специфических лигандов телец с рецепторами макрофагов, распознающими фосфатидилсерин, рецепторами тромбоспондина CD36 (и ряда других белков, содержащих RGD-мотив), а также рецепторами витронектина VnR. В тоже время показано, что дендритные клетки фагоцитируют апоптотические тельца преимущественно по VnR-зависимому пути, и данный процесс является Ca^{2+} -зависимым [126]. Предполагают, что вышеуказанные отличия непосредственно связаны с последующим процессингом апоптотических телец макрофагами и дендритными клетками и отражают функциональные особенности этих клеток [125].

Однако, часть апоптотических телец не поглощается фагоцитами и присутствует в системной циркуляции, выполняя ряд других функций. Установлено, что апоптотические тельца, наряду с микровезикулами и экзосомами, принимают участие в процессах межклеточного взаимодействия и могут опосредовать горизонтальный перенос ДНК и РНК между клетками [127, 128]. В системе *in vitro* показано, что апоптотические тельца эндотелиоцитов активируют пролиферацию и запускают дифференцировку клеток-предшественниц эндотелиоцитов, тем самым стимулируя регенерацию поврежденного эндотелия [127]. Онкотрансформированные клетки тоже способны продуцировать

апоптотические тельца. При этом их интернализация связана с увеличением туморогенности клеток-реципиентов [129].

В отличие от экзосом, микровезикул и рибонуклеопротеиновых комплексов апоптотические тельца являются продуктами гибели клеток, а не направленной секреции. Однако показано, что апоптотические тельца участвуют в системной циркуляции РНК-комплексов и могут рассматриваться как переносчики регуляторных сигналов между клетками.

1.3.4 Биогенез, секреция и интернализация белковых РНК-содержащих комплексов

Супрамолекулярные комплексы белков и липидов стали рассматривать как самостоятельные внеклеточные циркулирующие РНК-комплексы, когда обнаружили, что некоторые микроРНК физиологических жидкостей стабильны вне мембранных везикул. При анализе плазмы крови было показано, что внеклеточные циркулирующие микроРНК находятся не только в составе мембранных везикул, но и в комплексах с липопротеинами высокой плотности [3] и белком аргонавт 2 (AGO2) - каталитическим компонентом RISC-комплекса [2, 130]. Предполагают также, что не только AGO2, но и другие РНК-связывающие белки секретируются во внеклеточное пространство в комплексах с РНК и опосредуют транспорт последних в клетки-мишени. Например, в экспериментах *in vitro* было показано, что ядрышковый фосфопротеин человека нуклеофозмин 1 (NPM1) присутствует в неэкзосомной фракции среды, конденсированной клетками первичной культуры фибробластов легкого и клетками гепатокарциномы HepG2. При этом синтетические микроРНК в комплексе с NPM1 устойчивы к действию РНКазы А, что позволило авторам предположить участие NPM1 во внеклеточном транспорте регуляторных РНК [6].

В настоящее время обсуждают два основных подхода к пониманию функций внеклеточных рибонуклеопротеиновых комплексов и их фундаментальной физиологической роли. Первый предполагает, что такие комплексы представляют собой внеклеточный «мусор», возникающий как побочный продукт апоптоза и некроза. Вторая теория, напротив, говорит о том, что внеклеточные супрамолекулярные комплексы являются медиаторами межклеточной коммуникации, и они направленно секретируются клетками [131]. Существование двух теорий связано с наличием в литературе ряда противоречивых фактов. С одной стороны, показано, что состав микроРНК внеклеточных комплексов отличается от клеток-продуцентов, т.е. микроРНК селективно загружаются в такие комплексы [2, 129]. При этом *in vitro* показано, что взаимодействие внеклеточных

комплексов с клетками-акцепторами приводит к изменению экспрессии генов в последних [132]. С другой стороны, считают, что содержание микроРНК в составе внеклеточных комплексов слишком мало для того, чтобы вызывать заметные физиологические эффекты [133]. В настоящее время предполагают, что обе гипотезы являются истинными, и часть внеклеточных РНК-содержащих комплексов относится к продуктам клеточной гибели, а часть представляет собой направленно секретируемые регуляторные комплексы [130].

Механизм воздействия внеклеточных супрамолекулярных РНК-комплексов на клетки-акцепторы является предметом современных исследований. Предполагают, что комплексы микроРНК с AGO2 изменяют экспрессию генов в клетках-акцепторах по механизму РНК-интерференции. Однако не ясно как именно такие комплексы обнаруживают свои клетки-мишени и проникают в них. Есть данные о том, что некоторые внеклеточные рибонуклеопротеиновые комплексы микроРНК могут проникать в клетки-мишени через каналы (коннексоны), формируемые коннексинами щелевых контактов [134, 135]. Предполагают также, что часть внеклеточных рибонуклеопротеиновых комплексов взаимодействует со специфическими рецепторами мембраны клеток-акцепторов. Так, например, было показано, что микроРНК miR-16, -21 и -29a связываются с Толл-подобным рецептором TLR8 на мембране периферических мононуклеарных клеток крови, что приводит к активации последних и секреции ими провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 [136]. В другой работе показано, что внеклеточная микроРНК let-7, взаимодействуя с Толл-подобным рецептором TLR7, экспрессируемом на мембране кортикальных нейронов, приводит к их гибели по механизму апоптоза [137]. Кроме того, в литературе описан белок SID-1 - трансмембранный белок-транспортер двуцепочечных РНК, найденный в клетках нематоды *Caenorhabditis elegans*. Показано, что SID-1, экспрессируемый в клетках *Drosophila melanogaster* S2, опосредует транспорт внеклеточных двуцепочечных РНК, а также РНК со структурой шпильки и пре-микроРНК в клетку. Функционирование SID-1-зависимого транспорта в гетерологичных организмах позволяет предполагать существование подобных белков-транспортеров РНК в клетках млекопитающих [138].

1.4. РНК в составе внеклеточных циркулирующих комплексов

С появлением высокопроизводительного секвенирования стало возможным проводить детальный анализ состава внеклеточных РНК, и было показано, что в составе экзосом, микровезикул и апоптотических телец секретируются не только микроРНК, но и другие формы клеточных РНК. При этом основная часть внеклеточных РНК представляет собой интактные или фрагментированные формы некодирующих РНК [5, 139].

Термин «некодирующие РНК» включает в себя все классы РНК, кроме мРНК. Выделяют две основные группы некодирующих РНК: длинные (длиной > 200 н.) и короткие. В свою очередь в состав каждой группы входят РНК различных классов, отличающиеся по структуре и функциям [140].

Группа длинных некодирующих РНК включает в себя: межгенные некодирующие РНК, транскрипты псевдогенов, энхансерные РНК, транскрипты ультраконсервативных участков генома, транскрипты геномных повторов, длинные бессмысловые транскрипты и кольцевые РНК (кцРНК).

К группе коротких некодирующих РНК относят микроРНК, малые ядерные РНК (мяРНК), малые ядрышковые РНК (мяоРНК), малые интерферирующие РНК (siRNA), промотор-ассоциированные РНК, piwi-РНК, а также микроРНК-подобные фрагменты тРНК, мяРНК и мяоРНК [139, 141]. Иногда выделяют промежуточную группу РНК, средняя длина которых находится на границе между длинными и короткими РНК. К ним относят: 7SK РНК, 7SL РНК, Y-РНК, РНК телец Кахаля и транскрипты ретротранспозонов [139].

Весомая часть работ по циркулирующим РНК посвящена микроРНК. МикроРНК - это короткие некодирующие РНК длиной ~ 22 н., которые осуществляют посттрансляционный контроль экспрессии генов за счет комплементарных взаимодействий с мРНК. МикроРНК кодируются независимыми генами, а также последовательностями интронов белок-кодирующих генов [142]. Гены микроРНК транскрибируются РНК полимеразой II, и первичный микроРНК-транскрипт (pri-miRNA) представляет собой протяженную молекулу РНК с кэпом на 5'-конце, последовательностью полиА на 3'-конце и шпильками во вторичной структуре. Затем транскрипт pri-miRNA проходит несколько стадий процессинга. В ядре клетки РНКазы III Drosha вырезает из транскрипта pri-miRNA микроРНК-предшественника длиной ~ 65 н. (пре-микроРНК/ pre-miRNA) [143]. В случае микроРНК, закодированных в интронах, процессинг осуществляют сплайсосома и белок LDBR (lariat debranching enzyme) [144]. Затем белок-переносчик экспортин-5 транспортирует пре-микроРНК в цитоплазму, где РНКазы III Dicer вырезает двуцепочечный дуплекс, одна из цепей которого соответствует зрелой микроРНК. Дуплекс встраивается в RISC-комплекс, «пассажирская» цепь (passenger strand) гидролизуется, а комплементарная ей «направляющая» цепь (guide strand) остается в комплексе с белком из семейства аргонавтов [77, 141]. Комплементарное взаимодействие «направляющей» микроРНК с мРНК-мишенью приводит к деградации мишени или подавлению ее трансляции [139]. Показано, что микроРНК секретируются во внеклеточное пространство в комплексе с аргонавтом 2 (AGO2) как в составе, так и вне

мембранных везикул [2, 145]. При этом микроРНК сохраняют свою первичную структуру и могут изменять уровень экспрессии генов-мишеней после проникновения в клетку-реципиент [146, 147].

Относительно внеклеточных функций РНК других классов, относящихся как к группе коротких РНК, так и длинных некодирующих РНК, известно мало. Предполагают, что, проникая в клетки-реципиенты, полноразмерные формы РНК сохраняют свои исходные функции, а их фрагменты функционируют как микроРНК-подобные формы [148].

К малым ядерным РНК, или U-РНК, относится небольшая группа некодирующих транскриптов, высокопредставленных в клетке и локализованных в ядре: U1, U2, U4, U4_{atac}, U5, U6, U6_{atac}, U7, U11, U12. Малые ядерные РНК являются направляющими компонентами сплайсосомы – рибонуклеопротеинового комплекса, осуществляющего процессинг пре-мРНК в клетках. Основная часть мяРНК модулирует удаление интронов из пре-мРНК. Исключением является мяРНК U7, которая участвует в процессинге 3'-конца гистоновой пре-мРНК [149]. Внутри класса мяРНК выделяют два подкласса мяРНК, отличающихся специфическими структурными элементами и кофакторами.

РНК U1, U2, U4, U4_{atac}, U5, U7, U11, U12 относятся к подклассу Sm мяРНК, для которых характерно наличие 5'-триметилгуанозинового кэпа, шпильки в 3'-концевой области и участка связывания для белков Sm, формирующих гетерогептамерный кор будущей сплайсосомы [150]. Гены мяРНК подкласса Sm транскрибируются РНК полимеразой II, после чего транскрипты таких мяРНК экспортируются из ядра в цитоплазму, где происходит частичная сборка рибонуклеопротеиновых комплексов, представляющих собой основные модули сплайсосомы [149]. Вторым подклассом мяРНК – Lsm мяРНК – включает в себя РНК U6 и U6_{atac}, которые содержат монометилфосфогуанозин в качестве кэпа на 5'-конце и полиуридиновый тракт на 3'-конце, необходимый для взаимодействия с Lsm-белками, формирующими альтернативный гетерогептамерный кор сплайсосомы. Такие мяРНК транскрибируются РНК полимеразой III и, в отличие от мяРНК подкласса Sm, не транспортируются в цитоплазму для посттранскрипционного созревания [149, 151].

Среди внеклеточных малых некодирующих РНК были выявлены и другие РНК с ядерной локализацией – малые ядрышковые РНК, включающие несколько сотен транскриптов [149]. Гены мяоРНК, как правило, транскрибируются РНК полимеразой II и реже РНК полимеразой III. Малые ядрышковые РНК дополнительно подразделяют на C/D бокс и H/ACA бокс РНК, отличающиеся консервативными элементами вторичной структуры. C/D бокс РНК содержат мотивы RUGAUGA (бокс C) и CUGA (бокс D),

разделенные шпилечно-петлевой структурой, в состав которой входят области комплементарного взаимодействия с их РНК-мишенями. С/D бокс РНК входят в состав рибонуклеопротеиновых комплексов, направляющих 2'-О-метилование рибоз в составе рРНК, а также процессинг некоторых рРНК [152, 153]. Н/АСА бокс РНК имеют структуру несовершенных шпилек, в которых вторичная структура по типу «стебель» чередуется с внутренней и апикальной петлями. В последовательности внутренней петли находятся участки распознавания рРНК. За счет комплементарных взаимодействий Н/АСА бокс РНК направляют изомеризацию уридина в псевдоуридин своих рРНК-мишеней, а кроме того участвуют в процессинге рРНК [151, 152]. Показано, что функциональные рибонуклеопротеиновые комплексы канонических мярРНК локализованы в ядрышках – ядерных компартментах, в которых происходит сборка рибосом [154].

Интересно, что есть и другие РНК, в первичной структуре которых содержатся последовательности канонических мотивов С-, D-, Н- и АСА-боксов. Такие РНК также локализованы в особых компартментах ядра - тельцах Кахаля - и обозначаются scaRNAs или РНК телец Кахаля. Помимо канонических мотивов мярРНК в составе РНК телец Кахаля выделяют последовательность САВ, благодаря которой происходит транспорт этих РНК в место их локализации [155]. Показано, что РНК телец Кахаля направляют псевдоуридинилирование и 2'-О-метилование мярРНК-мишеней [156]. После чего происходит окончательная сборка функциональных комплексов мярРНК, которые транспортируются в область ядерных спеклов [157] – транскрипционно-активных компартментов ядра, обогащенных факторами сплайсинга пре-мРНК [158].

Сохранение функциональной активности во внеклеточном пространстве характерно не только для коротких некодирующих РНК, но и для длинных некодирующих РНК. Известно, что при относительно низком содержании в клетках некоторые днРНК присутствуют в большом количестве в экзосомах, секретлируемых этими клетками [159]. Эти данные позволяют предположить, что днРНК, также как микроРНК и мРНК, могут селективно загружаться во внеклеточные комплексы. Клеточные днРНК регулируют процессы трансляции и транскрипции, направляют перестройку хроматина, а также посттранскрипционные модификации [160]. Показано, например, что содержание днРНК HOTAIR – межгенного антисмыслового транскрипта локуса HOXC (12q13.13) – повышено в 38-100 раз в экзосомах, секретлируемых клетками человека линий HeLa и MCF-7 [158]. Известно также, что HOTAIR имеет развитую вторичную структуру с множеством шпилечно-петлевых элементов [161]. Благодаря такой организации внутриклеточный транскрипт HOTAIR связывается с лизин-специфичной деметилазой 1 и комплексом PRC2 (polycomb repressive complex 2), отвечающими за модификацию

гистонов [160]. Предполагают, что внеклеточный транскрипт HOTAIR, проникая в клетку, вызывать перестройки в структуре ее хроматина [158].

Недавно Ли с соавторами показал, что экзосомы сыворотки крови человека содержат в своем составе кольцевые РНК [162]. Кольцевые РНК – это длинные транскрипты с замкнутой структурой, которые образуются в ходе обратного сплайсинга пре-мРНК. Они состоят из экзонов и реже содержат интроны. В последовательностях некоторых кцРНК были обнаружены области комплементарного взаимодействия с микроРНК и было показано, что такие кцРНК могут связывать часть пула клеточных микроРНК по принципу конкурентных эндогенных РНК [163, 164], тем самым регулируя экспрессию генов-мишеней этих микроРНК. Кроме того, были обнаружены кольцевые РНК, которые образуются из экзонов, содержащих стартовый кодон АТG. Вырезание кольцевого АТG-содержащего экзона по механизму обратного сплайсинга приводит к снижению уровня синтеза канонической формы белка, кодируемой данной мРНК. Данный процесс рассматривают как одну из разновидностей альтернативного сплайсинга, регулирующих трансляцию [165, 166]. Предполагают также, что кольцевые РНК, как и некоторые другие формы днРНК, могут конкурентно взаимодействовать с РНК-связывающими белками [164]. Несмотря на то, что до сих пор не было выявлено трансляционно-активных кцРНК человека [167, 168], есть данные о транслируемых в клетках синтетических РНК-конструкциях. Такие конструкции содержат IRES-элементы – внутренние участки посадки рибосом (internal ribosome entry site), необходимые для их трансляции [169].

Таким образом, можно заключить, что совместное проникновение внеклеточных днРНК разных классов может оказывать комплексное регуляторное воздействие на клетки-реципиенты и приводить к значительным изменениям их транскриптома и протеома.

1.5. Участие РНК внеклеточных комплексов в развитии физиологических процессов человека в норме

РНК-содержащие комплексы были обнаружены в большинстве внеклеточных жидкостей человека. Показано, что внеклеточные комплексы связаны с развитием иммунного ответа, клеточной дифференцировкой, апоптозом, гемостазом, проведением нервных импульсов и др. [1]. Вопрос о том, какие именно РНК, белки или липиды в их составе вызывают изменения, наблюдаемые в клетках-реципиентах, в настоящее время является одним из ключевых для понимания фундаментальных процессов, лежащих в основе межклеточных коммуникаций многоклеточного организма.

Несмотря на интенсивные исследования состава РНК внеклеточных комплексов, к настоящему моменту в литературе представлены лишь единичные сведения о их биологической роли в межклеточном пространстве. Например, показано, что микроРНК miR-223, секретируемая в составе мембранных частиц активированными макрофагами, индуцирует дифференцировку наивных моноцитов [170]. Предполагают, что секреторные везикулы макрофагов являются локальными активаторами иммунной системы и медиаторами воспалительных реакций [169].

Известно, что нейроны также используют секрецию внеклеточных комплексов для взаимодействия со своим окружением. Недавно был обнаружен новый механизм нейрон-зависимой регуляции транспорта глутамата в астроцитах. Было показано, что проникновение экзосом нейронов в астроциты приводит к увеличению в них содержания одного из транспортеров глутамата – GLUT1. При этом показано, что данный процесс опосредован miR-124A – микроРНК, высокопредставленной в нейронах и секретируемой в составе экзосом [171].

Есть данные о том, что РНК апоптотических телец тоже принимают участие в регуляции физиологических процессов. Например, показано, что высокопредставленная в апоптотических тельцах эндотелиальных клеток miR-126 индуцирует экспрессию хемокина CXCL12, подавляя экспрессию RGS16 – репрессора его рецептора CXCR4 [172]. Хемокин CXCL12 является хемоаттрактантом клеток-предшественников костного мозга и обладает антиапоптотическим действием. Таким образом, miR-126 в составе апоптотических телец является одним из модуляторов репарации тканей и ангиогенеза [171].

Описано также протективное антиатеросклеротическое действие микроРНК в составе экзосом, секретируемых при механическом стрессе клеток эндотелия. Показано, что воздействие на клетки эндотелия потока жидкости приводит к повышенной экспрессии транскрипционного фактора KLF2 (Krüppel-like factor 2) и, как следствие, miR-143/145. МикроРНК miR-143/145 загружаются в секреторные везикулы эндотелиальных клеток и, проникая в клетки гладкой мускулатуры сосудов, предотвращают их дедифференцировку. В экспериментах *in vivo* было показано, что, благодаря действию miR-143/145 эндотелиальных везикул, уменьшается площадь *de novo* формирующихся атеросклеротических бляшек [173].

Eldh M. с соавторами показали, что после окислительного стресса тучных клеток мыши MC/9 значительно изменяется состав мРНК экзосом, секретируемых этими клетками. При этом преинкубация клеток с экзосомами, секретированными после обработки перекисью водорода, приводит к увеличению выживаемости клеток-

реципиентов. Авторы показали, что выявленные протективные свойства связаны с РНК внеклеточных везикул, использованных для обработки, и предполагают, что ключевыми модуляторами в данном случае выступают мРНК [174].

Стоит отметить, что бóльшая часть РНК, для которых была описана физиологическая роль во внеклеточном пространстве, относится к наиболее представленным индивидуальным формам внеклеточных микроРНК, циркулирующим в составе везикул. Поэтому изучение функций внеклеточных РНК других классов, а также минорных форм микроРНК до сих пор остается актуальным.

1.6. Участие РНК внеклеточных комплексов в развитии патологических процессов человека

Важность процессов, опосредованных внеклеточными комплексами, для функционирования многоклеточных организмов подтверждается тем фактом, что нарушения в их формировании, транспортировке или захвате могут приводить к развитию заболеваний.

Известно, что для роста злокачественных опухолей необходимо взаимодействие онкотрансформированных клеток с клетками микроокружения. В ряде работ показано, что секретируемые онкотрансформированными клетками РНК-содержащие комплексы, в том числе экзосомы, микровезикулы, рибонуклеопротеины и липопротеины высокой плотности, активно участвуют в процессе коммуникации опухоли с ее окружением, тем самым опосредуя процессы перестройки внеклеточного матрикса, ангиогенеза, пролиферации клеток, супрессии иммунного ответа и метастазирования [175, 176]. Так, например, было показано, что перенос микроРНК miR-92a в составе экзосом, секретируемых клетками лейкемии K562, в клетки эндотелия пупочной вены человека HUVEC приводит к активации процессов клеточной миграции и формированию сосудистого фентоипа за счет подавления экспрессии гена интегринa $\alpha 5$ [145]. При сравнительном анализе культур онкотрансформированных клеток с различным метастатическим потенциалом установлено, что наиболее агрессивные формы рака секретируют в составе экзосом повышенное количество микроРНК семейства let-7, способных подавлять рост и метастазирование опухоли. Предполагают, что секреция раковыми клетками микроРНК let-7 во внеклеточное пространство способствует снижению ее содержания внутри клетки. Таким образом онкотрансформированные клетки активируют собственную пролиферацию и метастазирование [146]. Показано также, что экзосомы, секретируемые клетками карциномы печени, содержат набор микроРНК, направленных на мРНК гена TAK1, кодирующего трансформирующий фактор роста β ,

активируемый киназой-1. Захват таких экзосом приводит к повышению пролиферативной активности клеток-реципиентов, что, по-видимому, используется клетками карциномы печени для образования локальных метастазов в соседних нетрансформированных тканях печени [177]. В экспериментах *in vitro* было показано, что экзосомы, секретлируемые опухоль-ассоциированными макрофагами, содержат микроРНК miR-223. МикроРНК miR-223 способна подавлять экспрессию гена Mef2c, кодирующего транскрипционный энхансерный фактор специфичный для миоцитов, что приводит к накоплению β -катенина в ядре раковых клеток и стимуляции опухолевой инвазии [178]. Кроме того, установлено, что секретлируемые опухолевыми клетками микровезикулы участвуют в аутокринной регуляции канцерогенеза, стимулируя пролиферацию собственных клеток [179].

Известно также, что РНК внеклеточных циркулирующих комплексов играют важную роль в процессе развития атеросклероза. Показано, что микроРНК, циркулирующие в крови больных атеросклерозом в комплексах с ЛПВП, изменяют уровень экспрессии генов, связанных с метаболизмом липидов и развитием атеросклероза [3]. При анализе микровезикул, циркулирующих в плазме больных атеросклерозом, было показано повышенное содержание микроРНК miR-150. Обработка культивируемых клеток эндотелия НМЕС-1 микровезикулами, обогащенными miR-150, приводит к снижению уровня экспрессии транскрипционного фактора c-Myc и усилению миграции клеток НМЕС-1 в 2,5 раза [180]. Известно, что одним из ключевых факторов, способствующих развитию атеросклероза, является миграция эндотелиальных клеток, выстилающих кровеносные сосуды. Поэтому предполагают, что при наличии определенной системной дисфункции, например: ожирения, гипергликемии или хронического воспаления, передача miR-150 в составе везикул моноцитов клеткам эндотелия может приводить к повреждениям кровеносных сосудов и развитию патологии [179].

Кроме того, показано, что микроРНК экзосом могут участвовать в регуляции врожденного иммунного ответа. Например, В-клетки крови, зараженные вирусом Эпштейна-Барра, секретлируют экзосомы, содержащие микроРНК вируса. Захват таких экзосом клетками-реципиентами (немалигнизированными В-клетками) приводит к снижению экспрессии генов, опосредованной микроРНК вирусов, в том числе гена, кодирующего лиганд хемокина CXCL, что способствует распространению вирусной инфекции [181].

Можно заключить, что изменения состава РНК внеклеточных комплексов отражают физиологическое состояние организма и при этом могут модулировать развитие патологических процессов.

1.7. Заключение

Имеющиеся к настоящему времени данные показывают, что внеклеточные циркулирующие комплексы биологических жидкостей человека включают в себя мембранные везикулы – экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца, а также комплексы РНК с РНК-связывающими белками (AGO2 и NPM1) и липопротеинами высокой плотности.

Внеклеточные комплексы связаны с протеканием физиологических процессов в норме, а также участвуют в развитии патологий. При этом внеклеточные комплексы содержат специфический, отличный от клеток-продуцентов, набор белков и РНК, изменения в котором могут быть связаны с развитием заболевания.

РНК внеклеточных комплексов биологических жидкостей рассматривают как основу для разработки новых подходов к малоинвазивной диагностики и терапии заболеваний человека. Кроме того, такие разработки актуальны и востребованы в клинической практике для мониторинга эффективности терапевтических препаратов.

Однако в настоящее время имеются лишь отрывочные данные о механизмах и базовых процессах, лежащих в основе формирования, секреции, транспорта и интернализации циркулирующих РНК-содержащих комплексов клетками-реципиентами, что не позволяет сформулировать общую теорию биогенеза внеклеточных комплексов и затрудняет практическое применение таких комплексов для диагностики и терапии заболеваний человека.

Исследование состава внеклеточных РНК является одним из основных подходов для установления механизмов формирования и транспорта, а также для понимания физиологических функций циркулирующих комплексов. Однако до сих пор не было проведено сравнительного анализа распределения индивидуальных форм РНК между внеклеточными комплексами биологических жидкостей человека.

Таким образом, определение структуры РНК внеклеточных циркулирующих комплексов крови человека до сих пор является актуальной научной задачей.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Оборудование

В работе использовано следующее оборудование: проточный цитофлуориметр FACS Canto II (Becton Dickinson, США); высокоэффективный жидкостный хроматограф «Милихром А-02» (ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия); ультрацентрифуга L8-M (Beckman Coulter, США); прибор для проведения ПЦР с детекцией результатов амплификации в режиме реального времени iQ5 RealTime PCR Detection System (Bio-Rad, США) и LightCycler 96 (Roche, США); инвертированный микроскоп Axiovert 40C (Carl Zeiss, Германия); шейкер-инкубатор ES-20/60 («BioSan», Латвия); сканирующий электронный микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония); секвенатор SOLiD 5500xl, секвенатор ABI 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США); система для характеристики наночастиц (лазерный анализатор) Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания); атомно-силовой микроскоп Multimode 8, MALDI-TOF масс-спектрометр REFLEX III (Bruker, Великобритания); хроматографическая система низкого давления BioLogic LP, система документирования гелей GelDoc XR+, экран White Light Conversion Screen (Bio-Rad, США); центрифужный испаритель «Concentrator Plus» (Eppendorf, Германия), микропланшетный фотометр Apollo-8 LB 912 (Berthold Technologies, США); спектрофотометр NanoVue Plus (GE Healthcare, США); Leica EM UC7 (Leica, Германия); цифровая камера Veleta (Olympus Corporation, Япония); Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA).

2.2 Реактивы

В работе использованы следующие реактивы и материалы: антитела CD3-FITC, CD79a-PerCP Cy 5.5, CD41a-FITC, CD34-APC, CD63-PE (eBioscience, США); Epon, уранил-ацетат (Fluka, Швейцария), борная кислота (Gerbu, Германия); уксусная кислота, этанол, изопропанол, гидроксид натрия, хлорид марганца (Реахим, Россия); метанол (Вектон, Россия); ТЕМЕД; ксиленианол; бромфеноловый синий; бромистый этидий, натрия ацетат, хлорид магния, сульфат магния (Helicon, Россия); ДЭПК, хлорид натрия, гуанидин гидрохлорид, мочеви́на, имидазол, персульфат аммония, агароза; акриламид; бис-акриламид, Трис, ЭДТА, ДТТ, 2-меркаптоэтанол, триптон, дрожжевой экстракт, ИПТГ, бактериологический агар (MP Biomedicals, США); ампициллин (ОАО «Биосинтез», Россия); бикарбонат натрия; кумасси R250 (Amresco, США); реагент для окрашивания гелей SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain, реагент для выделения РНК Trizol (Life Technologies, США); глюкоза; глицерин (Panreac, США); лактоза, хлорид никеля, ацетат калия, α -циано-3-гидроксикоричная кислота (Sigma, США), SYBR Green (BioDye, Россия);

Ni-NTA сефароза (GE Healthcare, США); микропробирки с низкой сорбцией нуклеиновых кислот (DNA LoBind) и белков (Protein LoBind) (Eppendorf, США); мембрана для диализа T1 с MWCO 3500 (CelluSep, Канада); наконечники ZipTip C₁₈ (Millipore, США); ингибитор РНКаз Ribolock, маркеры молекулярной массы РНК High Range и Low Range, гликоген, полистереновые частицы диаметром 60 нм (Thermo Scientific, США); трипсин (Promega, США); маркеры молекулярной массы ДНК «Start 250» и «Step100» (ООО «Биолабмикс», Россия), γ -[³²P]АТФ (4000 Ки/ммоль) синтезирован в Лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН к.х.н. Фоминым А.С., фильтры из полиэфирсульфона с размером пор 0,22 мкм или 0,45 мкм (TPP, Швейцария).

Готовые культуральные среды и добавки: IMDM, RPMI, L-15, DMEM/F-12, GlutaMAX, сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота (FBS), антибиотик-антимикотик, ФСБ в таблетках (Life Technologies, США).

В работе использованы следующие наборы реагентов: набор для выделения плазмидной ДНК «QIAprep Spin Miniprep Kit»; набор для выделения ДНК из геля «QIAquick Gel Extraction Kit»; набор для выделения РНК из экзосом «exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit», набор «DyeEx 2.0 Spin Kit» (Qiagen, Германия); набор для выделения ДНК из геля «Gen Elute Gel Extraction Kit», набор для выделения плазмидной ДНК «Gen Elute HP Miniprep Kit» (Sigma, США); набор для проведения ОТ-ПЦР реакций «БиоМастер qОТ-ПЦР» (ООО «Биолабмикс», Россия); набор для проведения секвенирующей реакции «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США); набор для ОТ-ПЦР (Вектор-Бест, Россия); набор для конструирования кДНК-библиотек SOLiD Total RNA-Seq Kit (Life Technologies, США); набор «Cytometer Setup and Tracking Beads Kit», «Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set beads» (Becton Dickinson, США); набор Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, США).

2.3 Ферменты

Эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* и *BamHI*, ДНК-зависимая РНК-полимераза фага T7, термочувствительная щелочная фосфатаза FastAP, ДНКаза I, РНКаза А, ДНК-лигаза бактериофага T4 (Thermo Scientific, США), Т4-полинуклеотидкиназа (ПНК) (Лаборатория биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН), Трипсин-ЭДТА (Life Technologies, США)

2.4 Штаммы

E. coli Top 10 (F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ -) (Life Technologies, США)**

E. coli BL21 (DE3) (B F– *ompT gal dcm lon hsdSB(r_B-m_B-)* λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*]) [*malB+*]_{K-12}(λ^S)) (New England Biolabs, Англия)

2.5 Культуры клеток

Клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7 и клетки аденокарциномы легкого A549 были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт Цитологии РАН, г. Санкт-Петербург). Клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 получены из Американской коллекции клеточных культур (ATCC, США).

2.6 Плазмиды

Экспрессирующий вектор pET23a_NPM1 конструировали на основе плазмиды pET23a (Novagen, США).

2.7 Программы

В работе использованы следующие пакеты программ: ProtParam, Compass Xport SFX (Bruker Daltonics, Германия), Sequence Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems, США), BLAST, IGV, Bowtie, Cufflinks, Cuffdiff, CoreIDRAW X3, LightCycler 96 System Software (Version 1.1.0.1320) (Roche, США), iTEM software (Olympus Corporation, Япония), Zetasizer Software v7.11 (Malvern Instruments Ltd, Великобритания), BD FACSDiva software v6.1.3 (Becton Dickinson, USA), Flowing Software v2.5.1 (Turku University, Finland), Samtools v.1.0 [182], IGV v.2.3 [183], Bowtie v.0.9.6-0.12.6 [184], Cufflinks v.2.2.1 [185].

2.8 Растворы и среды

dfPBS – ФСБ, дважды фильтрованный через мембрану с диаметром пор 0.22 мкм;

50x TAE – 0,040 М трис-ацетата, 0,002 М ЭДТА, pH 8,0;

1x TBE – 0,089 М трис-бората, 0,002 М ЭДТА, pH 8,3;

5x трис-глициновый буфер – 0,125 М трис-НСl, 0,960 М глицина, 0,017 М ДСН, pH 8,3;

4x буфер для концентрирующего геля – 0,5 М трис-НСl, 0,4 % ДСН, pH 6,8, фильтрованный через мембрану с диаметром пор 0,45 мкм;

4x буфер для разделяющего геля – 1,5 М трис-НСl, 0,4 % ДСН, pH 8,8, фильтрованный через мембрану с диаметром пор 0,45 мкм;

6x буфер для нанесения белковых образцов на гель – 7 мл 4x буфера для концентрирующего геля, 3 мл глицерола, 1 г ДСН, 0,93 г ДТТ, 1,2 мг ВФ;

Физиологический раствор – 0,9 % раствор хлорида натрия, дважды фильтровали через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм;

40 % раствор глюкозы – добавляли к навеске глюкозы массой 40 г очищенной воды до объема 100 мл, полученный раствор стерильно фильтровали через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм;

20 % раствор лактозы – добавляли к навеске лактозы массой 20 г очищенной воды до объема 100 мл, полученный раствор стерильно фильтровали через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм;

ССМВ-80 буфер - 10 мМ ацетата калия рН=7,0, 80 мМ хлорида кальция, 20 мМ хлорида марганца, 10 мМ хлорида магния, 10% глицерина. Доводили рН до значения 6,4 при помощи раствора 1 М соляной кислоты. Фильтровали через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм и храним при 4 °С.

2*УТ - к 800 мл воды очищенной добавляли навески: 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г хлорида натрия, растворяли все компоненты и довели рН до 7,5, используя раствор гидроксида натрия концентрацией 10 М, затем доводили общий объем среды до 1 л водой очищенной, стерилизовали автоклавированием под давлением 1,5 кГс/см² (0,15 МПа) при 121 °С, в течение 20 мин. Для приготовления твердой среды на 1 л жидкой среды добавляли 15 г агара перед автоклавированием.

LB - к 800 мл воды очищенной добавляли навески: 16 г триптона, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г хлорида натрия, доводили рН до значения 7,5, используя раствор гидроксида натрия концентрацией 10 М, доводили общий объем среды до 1 л водой очищенной, стерилизовали автоклавированием при давлении 1,5 кГс/см² (0,15 МПа) при 121 °С, в течение 20 мин. Для приготовления твердой среды на 1 л жидкой среды добавляли 15 г агара перед автоклавированием.

SOB – к 800 мл воды очищенной добавляли навески: 20 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 0,5 г хлорида натрия, 1,3 г хлорида калия доводили рН до значения 7,0, используя раствор гидроксида натрия концентрацией 10 М, доводили общий объем среды до 1 л водой очищенной, стерилизовали автоклавированием при давлении 1,5 кГс/см² (0,15 МПа) при 121 °С, в течение 20 мин.

SOC – к проавтоклавированной среде SOB стерильно добавляли 10 мМ хлорида магния, 10 мМ сульфата магния, 20 мМ глюкозы.

Буфер для трансформации TSS – к 80 мл воды очищенной добавляли навески: 1 г триптона, 0,5 г дрожжевого экстракта, 0,5 г хлорида натрия, 0,5 г гептагидрата сульфата магния, 10 г ПЭГ 6000 и перемешивали до полного растворения всех компонентов, доводили рН полученного раствора до значения 6,5 и доводили объем раствора до 100 мл водой очищенной. Раствор стерилизовали фильтрованием через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм и хранили при +4 °С в течение года.

Буфер А - 50 мМ фосфата натрия, 300 мМ хлорида натрия, 10 мМ имидазола, 10 мМ β-меркаптоэтанола, 1 мМ PMSF (pH 8,0).

2.9 Методы

2.9.1 Электрофорез

2.9.1.1 Электрофорез в агарозном геле

Оценку качества препаратов выделенной РНК и плазмидной ДНК, а также анализ ПЦР реакций проводили с помощью электрофореза в 1-2 %-ном агарозном геле в 1х буфере ТАЕ при напряжении электрического поля 20 В/см. Гель окрашивали водным раствором бромистого этидия (1 мкг/мл) или 1xSYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain, фотографировали при визуализации в ультрафиолетовом свете с использованием системы GelDoc XR+.

2.9.1.2 Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях

Для разделения препаратов суммарной РНК субфракций плазмы крови человека использовали электрофорез в 14%-ном ПААГ при соотношении акриламид:N,N'-метилден-бис-акриламид 20:1 в присутствии 6 М мочевины в 1х буфере TBE при напряжении электрического поля 40 В/см. Перед нанесением на гель пробы смешивали с 2х раствором для нанесения (4 М мочевины, 50 % глицерина, 0,0125 % бромфенолового синего и ксиленцианола) в соотношении 1:1. По завершении электрофореза проводили автордиографию РНК в геле.

Для очистки радиоактивно-меченных синтетических аналогов длинных некодирующих РНК использовали электрофорез в 9 % ПААГ.

2.9.1.3 Электрофорез в ПААГ в нативных условиях

Для разделения препаратов кДНК-библиотек, полученных на основе препаратов суммарных РНК субфракций плазмы крови человека, использовали электрофорез в 6 %-ном ПААГ при соотношении акриламид:N,N'-метилден-бис-акриламид 40:1 в 1х буфере TBE.

Для анализа ПЦР реакций использовали электрофорез в 10 %-ном ПААГ при соотношении акриламид:N,N'-метилден-бис-акриламид 29:1 в 1х буфере TBE.

Электрофорез проводили при напряжении электрического поля 40 В/см. Перед нанесением на гель пробы смешивали с 4х буфером для нанесения образцов на гель (ООО «Биолабмикс», Россия) в соотношении 1:3. Гель окрашивали водным раствором бромистого этидия (1 мкг/мл) или 1x SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain,

фотографировали при визуализации в ультрафиолетовом свете с использованием системы GelDoc XR+.

2.9.1.4 Электрофорез в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН)

Для разделения белков клеточных лизатов штамма *E. coli* BL21 (DE3)/pET23a_NPM1 использовали электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лэммли [186]. Концентрирующий гель содержал 5 %-ный акриламид и 1х буфер для концентрирующего геля, разделяющий гель содержал 13 %-ный акриламид и 1х буфер для разделяющего геля. Соотношение акриламид:N,N'-метилден-бис-акриламид в геле составляло 40:0,8. Концентрирование белков проводили при силе тока 15 мА, разделение при силе тока 30 мА. Перед нанесением на гель пробы смешивали с 6х буфером для нанесения белковых образцов на гель (ООО «Биолабмикс», Россия) в соотношении 1:5.

По окончании электрофореза гель фиксировали и отмывали от избытка ДСН в течение 5-15 мин фиксирующем растворе (50 % метилового спирта, 10 % уксусной кислоты). Гель окрашивали в течение 5-10 мин в фиксирующем растворе, содержащем кумасси R250 в весовой концентрации 0,05 %. После чего гель помещали в раствор для отмывки (5 % метилового спирта, 7 % уксусной кислоты) и инкубировали 1 ч или в течение ночи. Гель фотографировали при визуализации в проходящем свете с использованием системы GelDoc XR+ и экрана White Light Conversion Screen.

2.9.2 Культивирование клеток человека

Клетки MCF-7/MDA-MB-231/A549 культивировали в среде IMDM/L-15/DMEM с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 2 мМ L-аланил-L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина, 0,25 мкг/мл амфотерицина (Life technologies, США) при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева.

2.9.3 Получение фракций крови и их характеристика

2.9.3.1. Фракционирование крови

Забор крови из локтевой вены в вакутейнеры с EDTA (Hongyu Medical, Китай) проводили: у здоровых доноров – в Центре новых медицинских технологий (ЦНМТ, г. Новосибирск); у пациентов с НМРЛ – в торакальном отделении Новосибирского областного онкологического диспансера (ГБУЗ НСО НОКОД, г. Новосибирск).

Подбор здоровых доноров был проведен совместно с сотрудниками Диагностической лаборатории ЦНМТ, г. Новосибирск (зав. лаб., к.м.н. Чикова Е. Д.). Группа здоровых доноров состояла из 3 мужчин без выявленных онкологических,

аутоиммунных и инфекционных заболеваний. Возраст доноров здоровой группы варьировал от 45 до 65 лет. Подбор пациентов с немелкоклеточным раком легкого был проведен сотрудниками торакального отделения Новосибирского областного онкологического диспансера под руководством зав. отделением, врача-онколога первой категории Козлова В.В. В группу пациентов с плоскоклеточным раком легкого входили четверо мужчин со стадиями заболевания T2–3NxM0. В группу пациентов с аденокарциномой легкого входили трое мужчин со стадиями заболевания T2aNxM1, T2bN3M1, T3N3M0. Возраст пациентов с НМРЛ лежал в диапазоне 50 – 60 лет. Забор крови у пациентов торакального отделения Новосибирского областного онкологического диспансера проводили до начала медикаментозного и оперативного лечения. При взятии образцов крови у здоровых доноров и пациентов с НМРЛ было получено добровольное информированное согласие.

Кровь из локтевой вены собирали в вакутейнеры с ЭДТА К3 (Hongyu Medical, Китай) аликвотами по 4 мл. Препараты крови (4 – 10 мл) хранили и транспортировали при 4 °С. Обработку образцов крови проводили не позднее, чем через 3 ч после забора. Для получения препаратов форменных элементов и плазмы кровь центрифугировали при 4 °С, 1 200 g в течение 20 мин. Осадок (форменные элементы крови) пулировали и хранили в аликвотах при -70 °С до использования. Полученные супернатанты, представляющие собой плазму крови, объединяли (пулировали) и центрифугировали при 16 000 g (4 °С, 20 мин). Частицы крови, осаждающиеся при 16 000 g, сохраняли в аликвотах при -70 °С, а супернатант отбирали и центрифугировали при 160 000 g (4 °С, 2 ч). Частицы крови, осаждающиеся при 160 000 g, а также препараты плазмы, обедненной везикулам (супернатант 160 000 g) хранили при -70 °С.

Для ОТ-ПЦР-анализа представленности кольцевых РНК в мембранных частицах крови (16 000 g)-супернатант наносили на колонку с сорбентом eхoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit (Qiagen, Германия). Элюат собирали, а РНК мембранных частиц крови выделяли по протоколу eхoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit.

2.9.3.2. Просвечивающая электронная микроскопия

Образцы частиц плазмы крови, осаждаемые при 16 000 g и 160 000 g, фиксировали в течение ночи в 4 % параформальдегиде при 4 °С. Постфиксацию проводили в забуференном 1 % OsO₄ в течение 1 ч, затем осадки промывали и обезвоживали в серии растворов этанола и ацетона возрастающей концентрации, после чего заливали в смесь смол Epon-Araldit. Ультратонкие срезы (65-75 нм) готовили на ультрамикротоме Leica EM UC7 и окрашивали уранил-ацетатом, а затем лимоннокислым свинцом. Для просмотра

срезов использовали трансмиссионный электронный микроскоп JEM 1400 с цифровой камерой Veleta. Размер частиц оценивали с помощью программы iTEM software.

2.9.3.3. Динамическое светорассеяние

Аликвоты образцов фракций крови ресуспендировали 1/100 в dfPBS. Анализ характеристик динамического светорассеяния компонентов фракций крови проводили на приборе Malvern Zetasizer Nano ZS, оборудованном He-Ne лазером (633 нм) при T = 22 °C и угле детекции 173°. Для каждого образца проводили 11 последовательных съемок длиной 10 с каждая. Данные анализировали с помощью программы Zetasizer Software v7.11.

2.9.3.4. Проточная цитометрия

Аликвоты образцов частиц плазмы крови, осаждаемых при 16 000 g и 160 000 g (фракции III и IV) окрашивали с помощью флуоресцентных конъюгатов мышинных антител к белкам человека: CD3-FITC, CD79a-PerCP Cy 5.5, CD41a-FITC, CD34-APC, CD63-PE согласно рекомендация производителя (eBioscience, США). Частицы промывали dfPBS дважды и анализировали на приборе FACS Canto II. Для анализа мембранных частиц крови (60-1000 нм) настройки фотоэлектронных умножителей (ФЭУ), детектирующих прямое (FSC) и боковое светорассеяние (SSC), были подобраны с использованием стандартных частиц из набора «Cytometer Setup and Tracking Beads Kit» (диаметр 1 и 2 мкм) и полистироновых частиц (диаметр 60 нм). Настройки ФЭУ, детектирующих флуоресценцию в каналах FITC, PE, PerCP-Cy5.5 и APC были подобраны с использованием калибровочных частиц из набора «Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set beads» согласно рекомендациям производителя. Для иммунофенотипирования частиц плазмы крови были использованы следующие настройки ФЭУ: FSC – 615; SSC – 310; FITC – 548; PE – 466; PerCP-Cy 5.5 – 505; APC – 300; порог FSC/SSC – 200/200; компенсация PE-FITC – 18; компенсация PerCP-Cy 5.5/PE – 15. Гейты были выбраны с учетом расположения популяций частиц на гистограммах, полученных для неокрашенных антителами частиц. Анализ данных цитометрии провели с помощью BD FACSDiva software v6.1.3. Перекрывающиеся гистограммы были построены с помощью Flowing Software v2.5.1.

2.9.3.5. Выделение суммарной РНК фракций крови I-V

Выделение РНК из препаратов форменных элементов, плазмы и субфракций плазмы крови проводили с использованием реагента Trizol LS по методике производителя [187]. Перед осаждением РНК в водную фазу вносили 50 мкг/мл гликогена.

Концентрацию РНК в препаратах определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм на приборе NanoVue Plus.

2.9.3.6. Анализ профилей РНК фракций крови I-V с помощью Agilent Bioanalyzer

Концентрацию РНК и распределение по длине РНК в препаратах суммарной РНК фракций крови определяли с использованием анализатора нуклеиновых кислот Bioanalyzer 2100 с помощью набора Agilent RNA 6000 Pico Kit.

2.9.4 Конструирование и секвенирование кДНК-библиотек SOLiD

Конструирование кДНК-библиотек РНК фракций крови проводили с помощью наборов SOLiD Total RNA-Seq Kit с модификациями протокола, описанными нами ранее в работе [4]. Для этого частичный гидролиз и дефосфорилирование РНК проводили в реакционной смеси (10 мкл), содержащей по 1 е.а. РНКазы III, ДНКазы I и щелочной фосфатазы FastAP. Реакционную смесь перемешивали и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали нагреванием при 65 °С в течение 10 мин. Для 5'-фосфорилирования РНК в реакционную смесь добавляли 2 МБк [γ -³²P]АТФ 1 е. а. Т4-полинуклеотидкиназы. Смесь инкубировали при 25 °С, 30 мин. Реакционную смесь разделяли электрофорезом в денатурирующем ПААГ (14 % акриламид 20:1 бис-акриламид, 1x TBE (89 mM Трис, 89 mM борная кислота, 2mM ЭДТА, pH 8,0), 6 M мочевины). Фрагменты геля, содержащие РНК длиной от 20 н. до \approx 250 н., инкубировали в 0,1x TAE (4 mM Трис, 2mM уксусная кислота, 0,1 mM ЭДТА, pH 8,0) 16 ч при 20°C. РНК из элюата осаждали 70 % этанолом. Осадок растворяли в буфере для гибридизации и проводили реакцию лигирования РНК с адаптерами, обратную транскрипцию и амплификацию кДНК по протоколу SOLiD Total RNA-Seq Kit.

Амплификацию ДНК в водно-масляной эмульсии на магнитных микрочастицах, обогащение на полистироловых микрочастицах, иммобилизацию на стеклянных пластинах и циклы лигирования и детекции по технологии SOLiD 5500xL проводили в ЦКП «Геномика» (Новосибирск, Россия).

2.9.5 Биоинформационный анализ данных секвенирования

Выравнивание экспериментальных последовательностей, полученных по результатам высокопроизводительного секвенирования по технологии SOLiD, проводили с помощью пакета программ Bowtie 1.1.0 [184]. Для идентификации последовательности малой РНК, интегрированной в экспериментальную последовательность длиной 50 н., данные о последовательности в формате color space (csfasta) и качестве прочтения последовательности (quality data) идентифицировали путем последовательного

выравнивания, состоящего из 11 шагов. На каждом шаге выравнивания неидентифицированные последовательности укорачивали на 4/3/2 н. с 3'-конца. Минимальная длина экспериментальной последовательности, используемой для выравнивания составляла 19 н.

Общая схема выравнивания включала три последовательных этапа, на каждом из которых в массиве экспериментальных ридов проводили поиск и идентификацию последовательностей, относящихся к референсным последовательностям, объединенным в три группы. Первая группа референсных последовательностей включала последовательности адаптеров и праймеров, используемых в технологии SOLiD, а также последовательности митохондриальной ДНК (NC_012920.1) и геномных повторов человека, аннотированных в базе данных RepBase [188], последовательности тРНК [189], рРНК человека (28S, 18S, 5.8S, 5S), мяРНК (U1-U12) и мцРНК (HY1-HY5) базы данных РНК человека RefSeq (NCBI) [190]. Вторая группа референсных последовательностей содержала последовательности всех NM и NR записей базы данных РНК человека RefSeq [190]. Экспериментальные последовательности, которые не были идентифицированы после выравнивания с референсными последовательностями из первой и второй группы выравнивали с референсными последовательностями генома человека сборки GRCh37/hg19 из аннотаций GoldenPath UCSC [191]. Результаты выравнивания визуализировали с помощью программы IGV [183].

Для анализа распределения РНК различных классов в препаратах фракций крови мы использовали пакет программ Bowtie [184] с параметром "- k 1", позволяющий находить для каждой экспериментальной последовательности не более одного гомолога в списке референсных последовательностей. Для сравнительного анализа распределения индивидуальных форм РНК в препаратах фракций крови с помощью пакета программ Bowtie [184] мы использовали параметр "- k 2", позволяющий находить для каждой экспериментальной последовательности не более двух гомологов в списке референсных последовательностей.

Результаты выравнивания экспериментальных последовательностей с референсными последовательностями (SAM-файлы) сортировали, индексировали и конвертировали в BAM-формат с помощью программного пакета Samtools v.1.0 [192]. Полученные BAM-файлы анализировали с помощью программного пакета Cufflinks v.2.1.1 [193]. Количественные данные о представленности идентифицированных индивидуальных форм РНК во фракциях крови, выраженные в единицах FPKM (Fragments per Kilobase per Million) [194]) объединяли в кумулятивные таблицы с помощью программы CuffCompare из программного пакета Cufflinks. При определении

относительного вклада индивидуальных транскриптов (FPKM) исключали вклад последовательностей, гомологичных P1-, P2-адаптерам SOLiD (опция "-compatible-hits-norm").

Для сравнительного анализа РНК фракций крови, а также для сравнительного анализа внеклеточных РНК здоровых доноров и пациентов с НМРЛ использовали программу Cuffdiff из программного пакета Cufflinks и методы нормировки «quartile library normalization» с дисперсией «blind» или «per-condition» для одной/нескольких реплик, соответственно. Для того чтобы исключить из рассмотрения транскрипты с низким покрытием экспериментальными ридами мы использовали параметр cutoff 100 (min-alignment-count 100), если иное не указано в подписи к таблице.

2.9.6 Поиск кцРНК в массивах данных секвенирования РНК фракций крови I-V

Для составления референсной базы индикаторных последовательностей соединений экзонов кольцевых РНК использовали программу “create_ring_ref.pl” [195] и gtf-таблицу RefSeq-транскриптов для генома человека сборки GRCh37/hg19. Набор референсных соединений экзонов составлен из последовательностей длиной 50 н. 25 н. с 5'-конца референсной последовательности это 25 н. 3'-конца N+n- экзона (где $n \geq 0$), а с 26-ого нуклеотида и до 50-го – 5'-концевая последовательность N-экзона для каждого экзона каждого RefSeq-транскрипта.

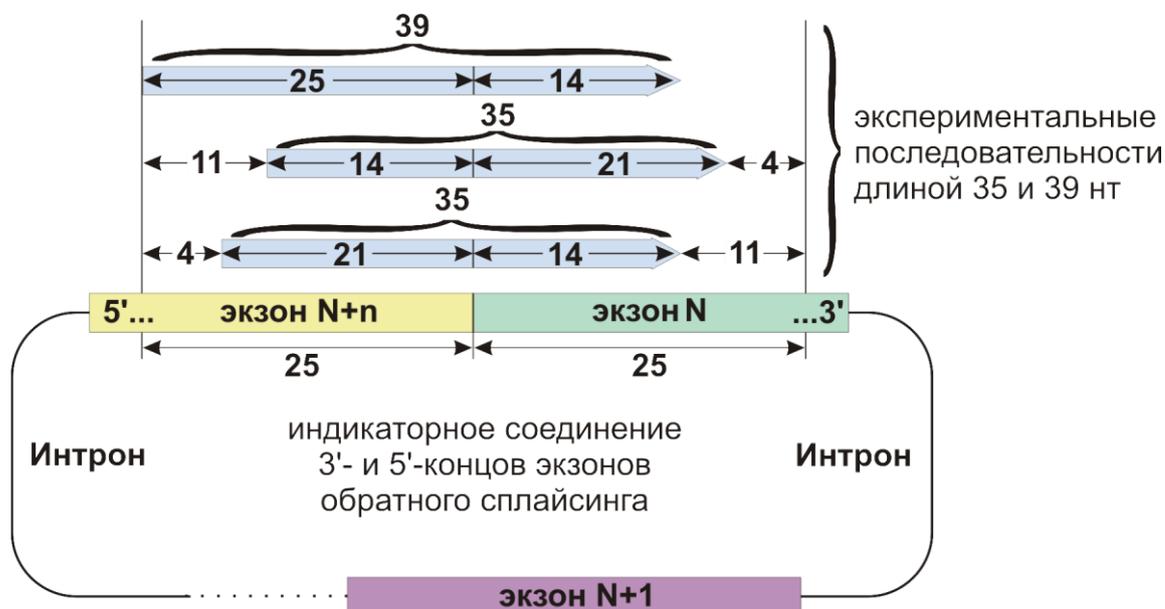


Рис. 2. Схема выравнивания экспериментальных последовательностей, полученных методом высокопроизводительного секвенирования РНК фракций крови человека, с индикаторными продуктами обратного сплайсинга – 3'-5' соединениями экзонов кольцевых РНК.

Для того чтобы выявить индикаторные последовательности кольцевых транскриптов мы использовали данные высокопроизводительного секвенирования РНК крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), полученные в данной работе, а также опубликованные ранее [4].

Всего было проанализировано 17 кДНК-библиотек РНК крови здоровых доноров, из них 8 персонализированных и 9 пулированных, и 18 кДНК-библиотек РНК крови пациентов с НМРЛ, из них 8 персонализированных и 10 пулированных. Полученный массив данных высокопроизводительного секвенирования содержал ~ 1.5 млрд экспериментальных последовательностей.

Выравнивание экспериментальных последовательностей с референсными проводили с помощью программного пакета Bowtie [196] с параметрами `-C (colourspace)` и `-no-cg` (только в `+`-ориентации). Для экспериментальных последовательностей длиной 50 н. 11 н. удаляли с 3'-конца (параметр `--trim3 11`). Выравнивание экспериментальных последовательностей длиной 35 н. проводили без удаления концевых нуклеотидов (`end-to-end`), но с фильтрацией результатов так, чтобы экспериментальная последовательность покрывала не менее 14 н. с 5'- или 3'-стороны соединения экзонов (Рис. 2).

2.9.7 Анализ функций РНК крови человека *in silico*

Предполагают, что кцРНК могут регулировать экспрессию своих генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях [167, 197]. Поэтому для того, чтобы описать многообразие биологических процессов, регуляция которых может быть связана с кцРНК, мы провели анализ генных онтологий (GO-аннотаций) для выявленного набора из 88 генов, кодирующих кцРНК крови человека с помощью программы PANTHER [198].

2.9.8 Анализ распределения кцРНК и их мРНК-гомологов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Для ОТ-ПЦР-анализа представленности кольцевых РНК в мембранных частицах крови схема получения фракций крови была модифицирована: (16 000 g)-супернатант наносили на колонку с сорбентом `exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit`. Элюат собирали, а РНК мембранных частиц крови выделяли по протоколу `exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit`.

Содержание кцРНК в препаратах суммарной РНК клеток и фракций крови человека, а также содержание мРНК-гомологов кцРНК во фракциях крови анализировали методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров, указанных в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Праймеры, использованные для детекции кцРНК в субфракциях плазмы крови и культивируемых клетках человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

ID ⁽¹⁾ мРНК-гомолога кцРНК	Название праймера	Праймер	Ta ⁽²⁾	Длина продукта, п.н.
<i>YYIAP1_1</i>	circYYIAP1_1_F	5'-TTGAGGAACTACTGGCCAAC-3'	62	297
	circYYIAP1_1_R	5'-GAGCTTGAGGGGTGTAAAG-3'	62	
<i>YYIAP1_2</i>	circYYIAP1_2_F	5'-GTTTCAGCTCTTGACACAAATCC-3'	62	175
	circYYIAP1_2_R	5'-GGGTGTAAAGTTAGCTTGAGG-3'	62	
<i>RBM23</i>	circRBM23_F	5'-GGATTATCCTAGCAATACCAC-3'	62	149
	circRBM23_R	5'-TATAGGGAGCTTCCAGCATG-3'	63	
<i>ARHGEF12</i>	circARHGEF12_F	5'-GCATGGAAGTATTTTGAACCGAG-3'	62	110
	circARHGEF12_R	5'-CTTATAGGTTTTTTGAGGGGAAAC-3'	62	
<i>PTPRA</i>	circPTPRA_F	5'-CAACGGCAGAACCAGTTAAAG-3'	62	343
	circPTPRA_R	5'-TGCCGAGCAGAACAAGAA-3'	62	
<i>DNMT1</i>	circDNMT1_F	5'-AAACGGAAACCTCAGGAAGAG-3'	62	174
	circDNMT1_R	5'-AAATGAGATGTGATGGTGGTTTG-3'	62	
<i>NRIP1</i>	circNRIP1_F	5'-ATGCACACTTGAAGGAG-3'	62	200
	circNRIP1_R	5'-CTGGCTGTGTTTCTCCCAA-3'	63	
<i>PICALM</i>	circPICALM_F	5'-CAAGCACTGGTCTATCTCTGAC-3'	62	414
	circPICALM_R	5'-GCTTGCAGCTGTAGAATCTTTG-3'	62	
<i>RUNX1</i>	circRUNX1_F	5'-GACATCGGCAGAACTAGATGA-3'	62	283
	circRUNX1_R	5'-GGCCCATCCACTGTGATTT-3'	62	
<i>SIN3</i>	circSIN3_F	5'-TCCCAACTGCAAGCACATA-3'	62	531
	circSIN3_R	5'-TTGCTGACTTTGGCAGGT-3'	62	
<i>ZFPM2</i>	circZFPM2_F	5'-GATGAAGGAATCCAGGAGACA-3'	61	246
	circZFPM2_R	5'-AAAGTATTCCACTTCTTCGCA-3'	61	
<i>VAMP3</i>	circVAMP3_F	5'-GTGGGCAATCGGGATTACTG-3'	63	201
	circVAMP3_R	5'-TCTTCCACCAATATTCCTCTTCAA-3'	63	
<p>⁽¹⁾ ID – идентификатор гена в базе данных РНК человека NCBI RefSeq.</p> <p>⁽²⁾ Температура отжига праймера.</p>				

Таблица 2. Специфические праймеры, использованные для оценки относительного содержания кцРНК и ее мРНК-гомолога методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

ID ⁽¹⁾ мРНК-гомолога кцРНК	Название праймера	Праймер	Ta ⁽²⁾	Длина продукта, п.н.
YY1AP1	mYY1AP1_F	5'-TCTTCCTCACTTCCCTGTACTC-3'	63	435
	mYY1AP1_R	5'-AGACATATCCTGGTGCTACTGG-3'	63	
RBM23	mRBM23_F	5'-CATACTCAAAGGAACGGAGAGAA-3'	62	409
	mRBM23_R	5'-CAAGTGGAGGACTCCTGTAATG-3'	62	
ARHGEF12	mARHGEF12_F	5'-CGGATGGTCTAGATGACTGAATG-3'	62	372
	mARHGEF12_R	5'-GATTACGCAACGCTGAACAAG-3'	62	
PTPRA	mPTPRA_F	5'-GACACATGTTCAAAGAGCATAA-3'	59	551
	mPTPRA_R	5'-TAAACACGATCACTAGCAGAG-3'	59	

⁽¹⁾ ID – идентификатор гена в базе данных РНК человека NCBI RefSeq.

⁽²⁾ Температура отжига праймера.

Дезоксирибоолигонуклеотиды синтезированы в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск).

Обратную транскрипцию РНК и амплификацию кДНК проводили с использованием наборов «БиоМастер qОТ-ПЦР» по методике производителя. Выход продуктов амплификации анализировали на приборе LightCycler 96 с использованием программы LightCycler 96 System Software.

Соответствие нуклеотидных последовательностей продуктов обратной транскрипции и амплификации кцРНК референсным последовательностям соединений обратного сплайсинга экзонов было подтверждено секвенированием ДНК по Сэнгеру для каждой из 12 выбранных кцРНК. Определение первичной структуры ДНК по методу Сэнгера проводили на автоматическом секвенаторе ABI 3730XL Genetic Analyzer в ЦКП «Геномика» СО РАН.

2.9.9 Получение экспрессирующего вектора pET23a_NPM1

Экспрессирующий вектор конструировали на основе плазмиды pET23a, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность ННННН на С-конце рекомбинантного белка. Для получения кДНК, кодирующей аналог нуклеофозмина 1, проводили обратную транскрипцию суммарной РНК клеток MCF-7 с последующей амплификацией кДНК с использованием специфических праймеров:

NPM1_F: 5'-ATCATCGGATCCATGGAAGATTCGATGGACA-3';

NPM1_R: 5'-ATCATCGAATTCGCAAGAGACTTCCTCCACT-3'.

Для проведения реакции лигирования ДНК вектора рЕТ23а и ДНК гена NPM1 гидролизовали эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *BamHI*. Линеаризованную плазмиду очищали препаративным электрофорезом в 1 % агарозном геле. Вектор выделяли из геля с использованием набора «GenElute Gel Extraction Kit». ДНК гена NPM1 очищали из реакционной смеси спиртовым осаждением [199]. Лигирование нуклеотидной последовательности NPM1 с линеаризованной ДНК рЕТ23а проводили с помощью ДНК-лигазы T4. Клонирование рекомбинантных ДНК осуществляли стандартным методом [199] в клетках штамма *E. coli* Top10.

Отбор клонов проводили методом ПЦР, используя в качестве матрицы ДНК единичных клонов клеток-трансформантов штамма *E. coli* Top10/рЕТ23а_NPM1. Из отобранных клонов выделяли препараты плазмидной ДНК и проводили рестрикционный анализ эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *BamHI*. Препараты плазмидных ДНК выделяли с помощью набора «GenElute HP Miniprep Kit». Анализ первичной структуры ДНК вставки в вектор рЕТ23а_NPM1 проводили методом секвенирования по Сэнгеру с использованием набора реагентов «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» и специфических праймеров (T7_Fseq: 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ-3'; T7_Rseq: 5'-GСТАГТТАТТГСТСАГСГГТ-3'). Продукты реакции Сэнгера очищали из реакционной смеси с использованием колонок «DyeEx 2.0 Spin Kit», образцы высушивали в вакуумном испарителе «Concentrator Plus» и передавали для анализа в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программ Sequence Scanner Software v1.0 и BLAST, а также базы данных RefSeq.

2.9.10 Получение компетентных клеток штамма *E. coli* Top 10

Клетки штамма *E. coli* Top 10 засекали на чашки с агаризованной питательной средой LB методом истощающего штриха [200] и инкубировали при 37 °С в течение 18-20 часов. Брали единичную колонию и засекали в 5 мл среды LB и инкубировали при 37 °С 160-170 об/мин в течение 18-20 часов.

Затем 1 мл клеточной культуры инокулировали в 250 мл среды SOC и выращивали на качалке при 37 °С, 160-170 об/мин. По достижении оптической плотности ОП₆₀₀ ≈ 0,3 о. е. клеточную культуру помещали в лед на 20-30 минут, после чего центрифугировали при 4 °С, 3 000 g в течение 10 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в 80 мл предварительно охлажденного буфера ССМВ-80 и инкубировали в течение 20 мин на льду. Клетки повторно осаждали центрифугированием при 4 °С, 3 000 g, в течение 10 мин, ресуспендировали в 10 мл охлажденного буфера ССМВ-80 и инкубировали 20 мин на льду. Полученную суспензию клеток расфасовывали аликвотами по 50-100 мкл в чистые стерильные микропробирки и хранили при -70 °С.

Трансформацию компетентных клеток штамма *E. coli* Top 10 проводили по стандартной методике [201].

2.9.11 Трансформация клеток *E. coli* BL21 (DE3)

Штамм-продуцент рекомбинантного аналога NPM1 был получен на основе штамма *E. coli* BL21 (DE3).

Клетки штамма *E. coli* BL21 (DE3) засеивали на чашки с агаризованной питательной средой LB методом истощающего штриха [200] и инкубировали при 37 °С в течение 18-20 часов. Брали единичную колонию и засеивали в 2 мл среды LB. Инкубировали при 37 °С 170 об/мин в течение 2-3 часов до оптической плотности культуры $OP_{600} \approx 0,4 - 0,6$ о. е. Затем, 1 мл культуры переносили в стерильную микропробирку и осаждали клетки центрифугированием при 7000 об/мин в течение 5 мин. Тщательно удаляли надосадочную жидкость и добавляли к полученному осадку 100 нг ДНК вектора pET23a_NPM1 и 100 мкл буфера TSS, содержащего 5 % ДМСО, аккуратно пипетировали и инкубировали 15-20 мин на льду. Затем добавляли 1 мл буфера TSS, содержащего 2 % глюкозы и инкубировали в течение 45-60 мин при 37 °С 170 об/мин. Брали 20-30 мкл культуры, засеивали шпателем Дригальского на чашку с агаризованной средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 2 % глюкозы, затем инкубировали культуру на чашке в термостате при 37 °С в течение ночи. Полученные колонии-трансформанты хранили при +4 °С и использовали для работы в течение 2-3 недель.

2.9.12 Биосинтез нуклеофозмина 1 в клетках штамма *E. coli* BL21 (DE3)/pET23a_NPM1

Для наработки рекомбинантного аналога NPM1 использовали модифицированный метод автоиндукции [202]. Клетки *E. coli* BL21 (DE3), трансформированные вектором pET23a_NPM1, засеивали в стеклянную колбу, содержащую 50 мл питательной среды 2*YT и ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Ночную культуру выращивали на качалке при 37 °С 170 об/мин в течение 16-18 часов, и пересевали в колбы 1:100 со средой 2*YT, содержащей 0,1 % глюкозы, 0,5 % лактозы, 0,8 % глицерина и 100 мкг/мл ампициллина. Культуру наращивали при 30 °С в течение 24 часов. Клетки осаждали из культуральной среды центрифугированием при 3 200 g 4 °С в течение 20 мин. Клеточный осадок суспендировали в буфере А и лизировали ультразвуком (20 МГц, 15 мин при 4 °С).

2.9.13 Очистка рекомбинантного аналога NPM1-His₆

Очистку рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1 человека (NPM1-His₆) от примеси белков клеток-продуцентов *E. coli* проводили на хроматографической станции

низкого давления «BioLogic LP», оснащенной спектрофотометрическим детектором поглощения элюата на длине волны 280 нм и проточным кондуктометром. Для выделения NPM1-His₆ лизат клеток *E. coli* BL21 (DE3)/pET23a_NPM1 центрифугировали 20 мин при 10 000 g, 4 °С. Супернатант наносили на Ni-NTA сефарозу, уравновешенную буфером А. Не связавшиеся с сорбентом белки *E. coli* элюировали этим же буфером. Сорбент промывали буфером А, содержащим 50 мМ имидазола. Рекombинантный аналог NPM1-His₆ элюировали буфером А, содержащим 250 мМ имидазола. Белковые фракции диализовали против 10 мМ Трис-НСl буфера (рН 7,5), содержащего 1 мМ PMSF (две смены по 18 часов, 4 °С). Полученные белковые препараты хранили при -70 °С. Концентрацию белка в препаратах определяли по поглощению при 280 нм с использованием коэффициента экстинкции $\epsilon_{280} = 6210 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, рассчитанного с помощью программного пакета ProtParam [203].

2.9.14 Анализ структуры NPM1-His₆

Для анализа первичной структуры NPM1-His₆ очищенные с помощью хроматографии препараты белка разделяли в 13 % ДСН-ПААГ. Полоски геля, содержащие белок, вырезали, белок гидролизовали трипсином с последующей элюцией пептидов из геля согласно [204]. Полученные образцы передавали для анализа с помощью MALDI-TOF REFLEX III в межинститутский ЦКП СО РАН «Протеомика». В качестве матрицы использовали α -циано-3 гидроксикоричную кислоту. Сопоставление продуктов трипсинолиза производили с использованием программы CompassXport SFX.

2.9.15 Анализ примесной нуклеазной активности в препаратах NPM1-His₆

Для определения примеси РНКаз и фосфодиэстераз *E. coli*, NPM1-His₆ инкубировали с 0,1 мкг дцРНК-ВПЧ (ИМБТ ГНЦ ВБ Вектор, г. Бердск, Россия) в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 0,1 мМ хлорида магния в течение 90 мин при 37 °С. Целостность препаратов дцРНК-ВПЧ оценивали электрофорезом в 1% агарозном геле.

2.9.16 Анализ влияния NPM1-His₆ на жизнеспособность клеток MCF-7

Влияние NPM1-His₆ на жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 определяли методом МТТ-теста [205], основанным на ферментативном восстановлении МТТ в живых метаболически активных клетках с образованием голубых кристаллов формазана. Оптическую плотность МТТ-формазана в изопропанолe определяли с помощью микропланшетного фотометра Apollo-8 LB 912.

Анализ морфологии клеток на всех этапах работы проводили с помощью микроскопа Axiovert 40С.

2.9.17 Получение синтетических аналогов некодирующих РНК человека

Синтез аналогов AluY-РНК и C/D бокс РНК проводили *in vitro* транскрипцией ДНК-матриц РНК-полимеразой фага Т7 [206].

Синтетические аналоги C/D бокс РНК получали согласно [207] с использованием праймеров:

U24_F: 5'-ATGCAGCTAATACGACTCACTATAGGGTGCAGATGATGTA AAAATAG-3';

U24_R: 5'-TGCATCAGTTTGGTGAGTTCCTAATTTTCATCACCATCTCTCAG-3' и дезоксирибоолигонуклеотида:

U24_Base: 5'-TGCAGATGATGTA AAAATAGCGACGGGCGGTGCTGAGAGATGGTGATGA-3' в качестве матрицы.

Нуклеотидная последовательность полученного аналога U24 РНК:

5'-GGGUGCAGAUGAUGUAAAAUAGCGACGGGCGGUGCUGAGAGAUGGUGAUGAAAAUUAGGAACUCACCAAACUGAUGCA-3'.

Для получения ДНК-матриц, кодирующих AluY-РНК, ДНК клеток человека амплифицировали со следующими парами праймеров, комплементарных ChrX:80014250-80014637 (hg19):

AluY_F: 5'-ATGCAGCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTAAATTACTAATTAGCTC-3';

AluY_R: 5'-ATCAAATGCATTTTATGTGTATCC-3' (последовательность промотора РНК полимеразы Т7 показана курсивом).

Олигорибонуклеотид: rON1: 5'-GAGAAUUUGCUGACUAAACUUU-3' синтезирован в Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН и любезно предоставлен к.х.н. Веняминой А.Г.

2.9.18 Взаимодействие NPM1-His₆ с синтетическими РНК

Взаимодействие NPM1-His₆ с синтетическими аналогами U24 малой ядрышковой C/D бокс РНК, Alu-РНК и rON1 анализировали методом гель-ретардации [208]. Для получения 5'-[³²P]-меченых аналогов РНК в концентрации 20 мкг/мл инкубировали в реакционной смеси для прямого кинирования, содержащей: 50 мМ Трис-НСl (рН 8,5); 1 мМ MgCl₂; 5 МБк γ-[³²P]АТР (4000 Ки/ммоль) и 20 е. а. полинуклеотидкиназы Т4 в

течение 30 мин при 37 °С. Радиоактивно-меченую РНК очищали препаративным электрофорезом в 9 % ПААГ с последующей элюцией РНК из геля [209].

2.9.19 Трансфекция клеток MCF-7 комплексами NPM1-His₆ с синтетическими аналогами AluY-РНК и C/D бокс РНК

Клетки MCF-7 культивировали в 24-луночной планшете до достижения плотности 60 – 70 % монослоя. Клетки обрабатывали AluY-РНК и C/D бокс РНК в концентрациях 3,5 нМ и 20,8 нМ, соответственно. К среде добавляли РНК или смесь РНК с NPM1-His₆ (1:20). Для этого РНК преинкубировали с NPM1-His₆ в ФСБ (0,1 мМ Mg²⁺, 5 мин, 37 °С). После инкубации среду удаляли, клетки промывали тремя сменами ФСБ. Клетки лизировали с помощью реагента Trizol, РНК из лизата выделяли согласно рекомендациям производителя [210].

2.9.20 Анализ накопления синтетических РНК в клетках MCF-7 методом обратной транскрипции и амплификации

Суммарную РНК трансфицированных и контрольных клеток анализировали ОТ-ПЦР в режиме реального времени с праймерами: AluY_F и AluY_R; U24_F и U24_R.

В качестве референсной РНК использовали мРНК гена гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (HPRT) с праймерами:

HPRT_F: 5'- CATCAAAGCACTGAATAGAAAT -3';

HPRT_R: 5'- TATCTCCACAATCAAGACATT -3'.

Реакцию ОТ-ПЦР проводили с использованием готовых наборов для ОТ-ПЦР и SYBRGreen. Выход продуктов амплификации анализировали на приборе iQ5 RealTime PCR Detection System с использованием программы iQ5 Optical System Software (Version 2.0).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Внеклеточные циркулирующие комплексы, такие как экзосомы, микровезикулы, апоптотические тельца, свободные рибонуклеопротеины и комплексы РНК с липопротеинами высокой плотности участвуют в процессах межклеточного взаимодействия путем передачи регуляторных сигналов в виде РНК и белков от клеток-доноров к клеткам-реципиентам.

Состав внеклеточных РНК отражает физиологическое состояние организма, а его изменения могут быть обусловлены развитием патологических процессов, таких как рак и аутоиммунные заболевания. При этом профиль внеклеточных РНК является уникальным для каждого заболевания, что активно используют для поиска и разработки новых подходов малоинвазивной диагностики и терапии.

Современные исследования, направленные на выявление диагностических форм внеклеточных РНК, посвящены анализу динамики изменения состава РНК экзосом, циркулирующих в физиологических жидкостях человека в норме и при развитии патологии. Лишь в единичных работах представлены комплексные данные о составе РНК известных типов циркулирующих внеклеточных комплексов человека и проведен анализ изменения состава таких комплексов при развитии заболевания.

В данной работе нами проведен сравнительный анализ состава РНК внеклеточных циркулирующих комплексов крови человека в норме и при НМРЛ. Поскольку циркулирующие РНК-содержащие комплексы различного биогенеза отличаются по размерным характеристикам, возможно их разделение с помощью центрифугирования, что наиболее часто используют при выделении таких комплексов [1]. Мы использовали метод последовательного центрифугирования для получения препаратов, обогащенных внеклеточными циркулирующими комплексами разных типов, а именно: микровезикулами и апоптотическими тельцами, экзосомами и свободными рибонуклеопротеиновыми комплексами. В качестве препаратов сравнения использовали препараты плазмы крови, содержащие все вышеперечисленные комплексы, а также препараты форменных элементов крови. Для определения первичной структуры РНК циркулирующих комплексов плазмы крови использовали метод высокопроизводительного секвенирования на платформе SOLiD, позволяющий одновременно проводить анализ всего набора РНК в суммарном препарате, выделенном из биологического образца [211]. Для биоинформационного анализа данных высокопроизводительного секвенирования и сравнительного анализа наборов форм РНК использовали современные программные средства Bowtie [184] и Cufflinks [185], а также актуальные базы данных последовательностей нуклеиновых кислот человека и аннотации

к ним. При этом нами были выявлены кольцевые РНК - представители нового класса длинных некодирующих РНК. Методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени был проведен анализ распределения кцРНК во фракциях крови здоровых доноров.

В настоящее время одним из основных направлений исследований внеклеточных циркулирующих комплексов является анализ возможности их использования в качестве средств доставки терапевтических молекул, в том числе РНК [212, 213]. В данной работе мы провели анализ накопления комплексов рекомбинантного нуклеофозмина 1 человека с синтетическими аналогами малой ядрышковой U24 C/D бокс РНК и AluY РНК в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

3.1 Фракционирование крови человека методом последовательного центрифугирования

Центрифугирование и ультрацентрифугирование широко используют в качестве базовых методов для выделения внеклеточных мембранных частиц, таких как экзосомы и микровезикулы [214, 215]. В данной работе препараты венозной крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) фракционировали методом последовательного центрифугирования согласно схеме представленной на рис. 3. В результате препараты цельной крови разделяли на пять фракций: форменные элементы – фракция I; плазма крови – фракция II; частицы плазмы, осаждаемые при усилиях 16 000 g – фракция III; частицы плазмы, осаждаемые при усилиях 160 000 g – фракция IV и 160 000 g супернатант плазмы, обедненный частицами – фракция V.

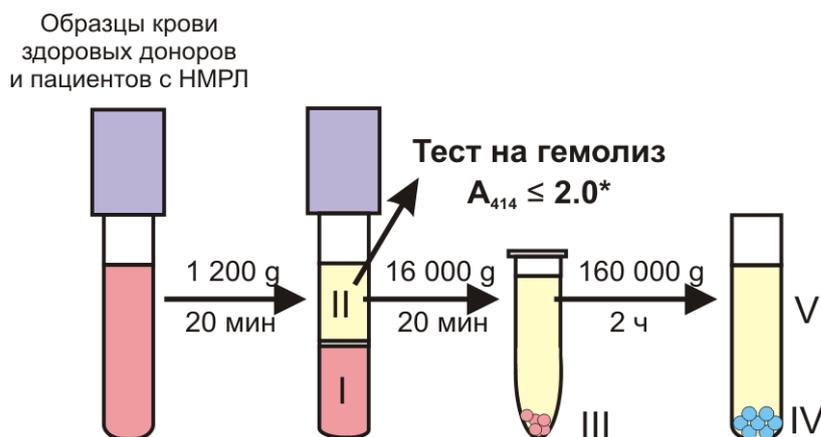


Рис. 3. Схема получения фракций крови человека. Фракции крови: I – форменные элементы; II – плазма; III – мембранные частицы и клеточный дебрис, осаждаемые при 16 000 g; IV – мембранные частицы, осаждаемые при 160 000 g (в том числе экзосомы); V – супернатант плазмы, обедненный мембранными частицами. Звездочка (*) - допустимая

глубина гемолиза в образцах плазмы крови, использованных для получения фракций крови II-V [217].

На первом этапе образцы цельной крови центрифугировали при 1 200 g и получали препараты форменных элементов (осадок) и плазмы, обедненной тромбоцитами (супернатант) [216]. Поскольку известно, что гемолиз – разрушение эритроцитов – в процессе выделения фракций крови приводит к изменению состава РНК плазмы крови, мы оценивали глубину гемолиза в полученных препаратах плазмы согласно [217] и на следующих этапах использовали только препараты, в которых оптическое поглощение образца на длине волны 414 нм, соответствующее поглощению гемоглобина, не превышало 2,0.

Затем мы проводили последовательное центрифугирование отобранных образцов плазмы при 16 000 g и 160 000 g (Рис. 3). Такой подход позволяет на первом этапе провести осаждение микровезикул и апоптотических телец внеклеточной жидкости [215, 218], а затем, на этапе ультрацентрифугирования – экзосом [215, 219, 220].

3.2 Анализ содержания мембранных частиц во фракциях крови человека методами электронной микроскопии, проточной цитофлуориметрии и динамического светорассеяния

Из данных литературы известно, что фракции плазмы крови человека, полученные центрифугированием при 16 000 и 160 000 g, обогащены субмикронными частицами, такими как микровезикулы и экзосомы [215, 219].

Для подтверждения присутствия мембранных частиц в осадках плазмы крови, полученных при усилиях 16 000 g и 160 000 g (фракции III и IV), был проведен анализ их ультратонких срезов с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Было установлено, что фракции III и IV обогащены мембранными пузырьками диаметром ~ 40 - 100 нм (Рис. 4 А, Б), а также содержат клеточный дебрис и макромолекулярные агрегаты биополимеров.

При этом среди частиц плазмы крови, осаждаемых при 16 000 g (фракция III), были обнаружены митохондрии (Рис. 4 А).

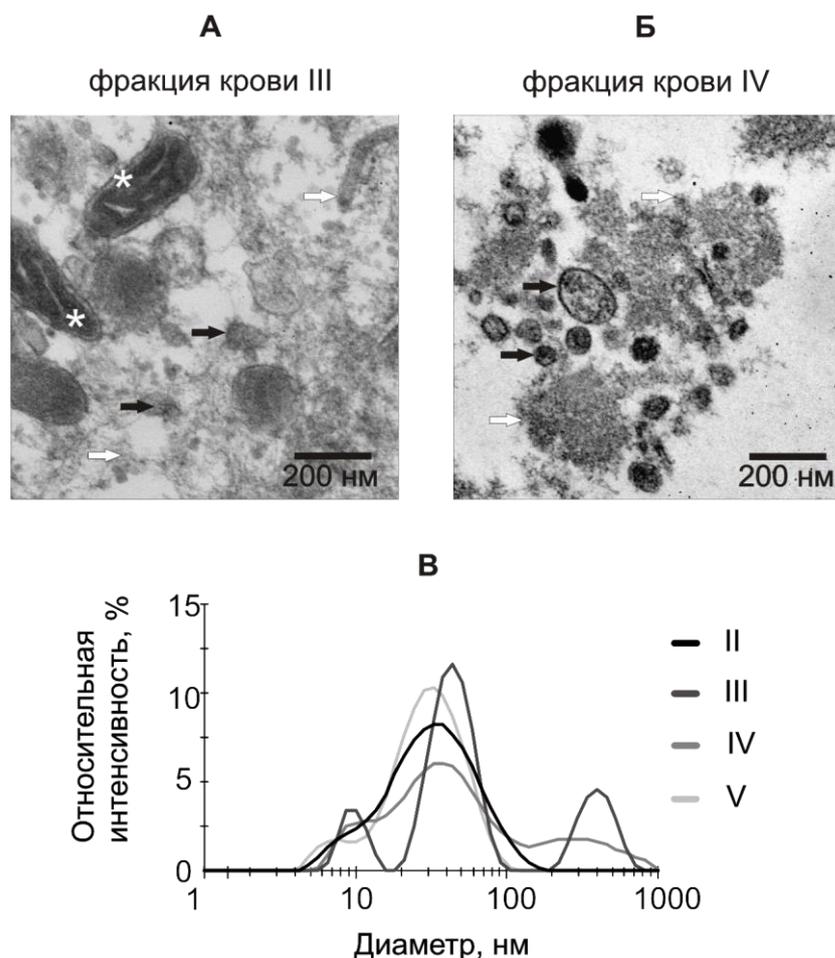


Рис. 4. Морфологический анализ плазмы крови (II) и фракций (III-V). **А, Б.** Морфология частиц плазмы крови, осаждаемых при усилиях 16 000 г (А) и 160 000 г (Б), данные просвечивающей электронной микроскопии ультратонких срезов. Черными стрелками обозначены мембранные частицы, белыми стрелками обозначены клеточный дебрис и макромолекулярные агрегаты биополимеров, звездочками обозначены митохондрии. **В.** Анализ фракций крови II-V методом динамического светорассеяния. II – плазма крови, III – мембранные частицы и клеточный дебрис, осаждаемые при 16 000 г, IV – мембранные частицы, осаждаемые при 160 000 г (в том числе экзосомы), V – супернатант плазмы, обедненный мембранными частицами.

Анализ полученных фракций крови методом динамического светорассеяния показал, что плазма крови (II) и ее фракции (III-V) содержат две схожие популяции частиц с гидродинамическим диаметром 5 - 20 нм и 20 - 100 нм (Рис. 4 В), что по литературным данным соответствует белковым комплексам плазмы крови (2 – 70 нм) и малым внеклеточным везикулам, в том числе экзосомам (30 - 100 нм) [221, 222]. Кроме того, во фракциях плазмы крови III и IV выявлена популяция частиц с гидродинамическим диаметром 150 - 1000 нм, которая, по-видимому, относится к мембранным частицам

плазмы крови, выявленным ПЭМ (Рис. 4 В). Популяция частиц крови с гидродинамическим диаметром 150 - 1 000 нм может содержать микровезикулы (50 - 2 000 нм), апоптотические тельца (50 - 5 000 нм) и митохондрии (750 – 3 000 нм) [221], а также агрегаты мембранных частиц, образующиеся при ультрацентрифугировании [223]. В целом полученные нами результаты анализа динамического светорассеяния компонентов исследуемых внеклеточных фракций крови II - V согласуются с данным Кириченко М.Н., опубликованными ранее для образцов плазмы крови человека [224].

Таким образом, можно заключить, что частицы плазмы крови (фракции III и IV) представляют собой суперпозицию циркулирующих везикул, а также макромолекулярных комплексов и их агрегатов.

Известно, что циркулирующие в крови внеклеточные комплексы, секретируются различными типами клеток человека [9, 225]. В ряде работ для иммунохимического анализа экзосом и микровезикул биологических жидкостей, а также для анализа частиц из культуральной среды, конденсированной клетками млекопитающих, используют метод проточной цитометрии [9, 225]. Не смотря на то, что базовый метод проточной цитофлуориметрии не позволяет детектировать отдельные частицы с диаметром $D < 500$ нм [226], в литературе описаны подходы к анализу субмикронных частиц, в том числе микровезикул и экзосом, где за единичное событие прибор принимает сигнал от агрегатов или скоплений таких частиц [223, 227].

Для того чтобы оценить клеточное происхождение внеклеточных мембранных частиц, выявленных во фракциях крови III и IV, мы провели анализ содержания поверхностных антигенов Т-клеток, В-клеток, тромбоцитов и незрелых гемопоэтических клеток методом проточной цитофлуориметрии, используя флуоресцентно-меченные антитела к CD3, CD79a, CD41a и CD34, соответственно. Было установлено, что мембранные частицы плазмы крови здоровых доноров, осаждаемые при 16 000 g/160 000 g (фракции крови III/IV), обогащены антигенами тромбоцитов/мегакариоцитов ($69,4 \pm 9,0\%$ / $43,6 \pm 21,5\%$) и Т-клеток ($71,7 \pm 15,4\%$ / $51,4 \pm 12,8\%$) (Рис. 5 А). При этом ~ 5 % частиц во фракции IV содержали гликопротеин CD79a – белок, участвующий в формировании антигенного рецептора В-клеток. Антиген CD34, используемый для идентификации незрелых гемопоэтических клеток, не был выявлен в составе частиц фракций крови III и IV (данные не иллюстрированы).

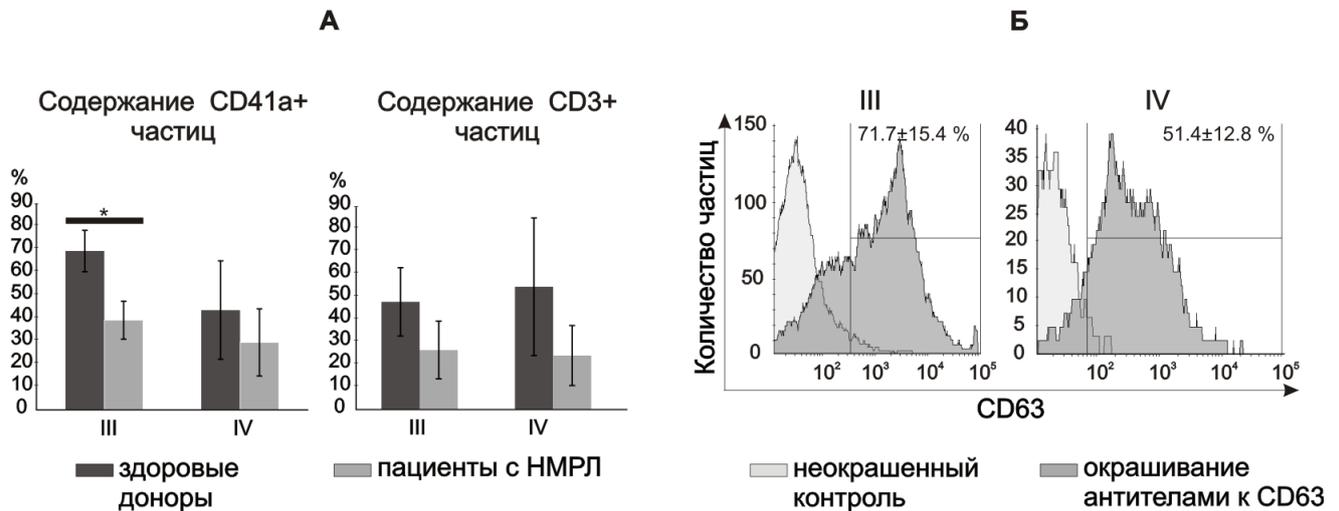


Рис. 5. Иммунохимический анализ мембранных частиц плазмы крови, осаждаемых при 16 000 g (III) и 160 000 g (IV), методом проточной цитометрии. **А.** Сравнительный анализ содержания CD41a⁺- и CD3⁺-частиц в осадках плазмы крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), получаемых при усилиях 16 000 g (III) и 160 000 g (IV). CD41a⁺ - маркер тромбоцитов/мегакариоцитов, CD3⁺ - маркер Т-клеток. **Б.** Анализ содержания CD63⁺-частиц в 16 000 g (III) и 160 000 g (IV) осадках плазмы крови здоровых доноров. Относительное количество CD63⁺-частиц приведено в формате значение среднего ± стандартное отклонение, рассчитанного для трех независимых повторов.

Сравнение осадков плазмы крови (16 000 g и 160 000 g) пациентов с НМРЛ и здоровых доноров показало, что содержание частиц с маркерами тромбоцитов/мегакариоцитов (CD41a⁺) и Т-клеток (CD3⁺) ниже у онкопациентов (Рис. 5 А). Уменьшение популяции CD41a⁺-частиц во фракции крови III пациентов с НМРЛ было статистически значимым (t-критерий, $p < 0,05$).

Трансмембранный белок CD63 применяют для идентификации и выделения экзосом [228, 229], поскольку он преимущественно локализован в центрах их образования - эндосомах клеток [230]. Поэтому мы провели анализ распределения антигена CD63 во фракциях крови III и IV. Было установлено, что везикулы крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, осаждаемые при 16 000 g (III) и 160 000 g (IV), содержат $71,7 \pm 15,4$ % и $51,4 \pm 12,8$ % CD63⁺-частиц, соответственно (Рис. 5 Б).

Анализ полученных результатов и данных литературы [215, 225] позволяет заключить, что осадки плазмы крови 16 000 g и 160 000 g обогащены циркулирующими внеклеточными мембранными частицами - микровезикулами и экзосомами, преимущественно секретируемыми тромбоцитами/мегакариоцитами и Т-клетками.

3.3 Электрофоретический анализ суммарной РНК фракций крови человека

Препараты суммарной РНК крови и плазмы крови человека содержат не только полноразмерные клеточные РНК, но и продукты их частичного гидролиза нуклеазами [4, 231]. При этом относительное содержание индивидуальных форм РНК в таких препаратах имеет ряд различий. Например, показано, что суммарная РНК плазмы крови человека преимущественно состоит из коротких фрагментов клеточных РНК [4]. Известно, что метод, использованный для выделения суммарной РНК, а также характеристики исходного образца влияют на относительное содержание индивидуальных форм РНК (профиль суммарной РНК) в его составе [10-12, 215].

Для того чтобы охарактеризовать РНК фракций I-V, выделенных из крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, мы использовали метод микрокапиллярного электрофореза на платформе Agilent Bioanalyzer. Было показано, что фракции крови I-V содержат набор форм РНК, в которых вклад полноразмерных 18S, 28S рРНК и коротких форм (< 200 н.) существенно отличается у разных доноров. При этом во всех исследованных препаратах суммарной РНК клеток крови (I), а также везикул крови, осаждаемых при 16 000 g и 160 000 g (III и IV), присутствовали полноразмерные 18S и 28S рРНК, в отличие от препаратов РНК плазмы крови (II), а также препаратов РНК плазмы, обедненной везикулами (V) (Рис. 6). Вместе с тем, все рассматриваемые фракции крови содержали РНК, длина которых соответствует малым РНК (< 200 н.), а также фрагментам РНК в диапазоне от 200 н. и ниже, до предела чувствительности метода флуоресцентной детекции, используемого в Agilent Bioanalyzer (Рис. 6).

В целом, наши результаты и данные литературы [5, 218] позволяют заключить, что РНК везикул крови, которыми обогащены фракции III и IV, представлена композицией полноразмерных форм клеточных РНК (в том числе и рРНК) и их фрагментов.

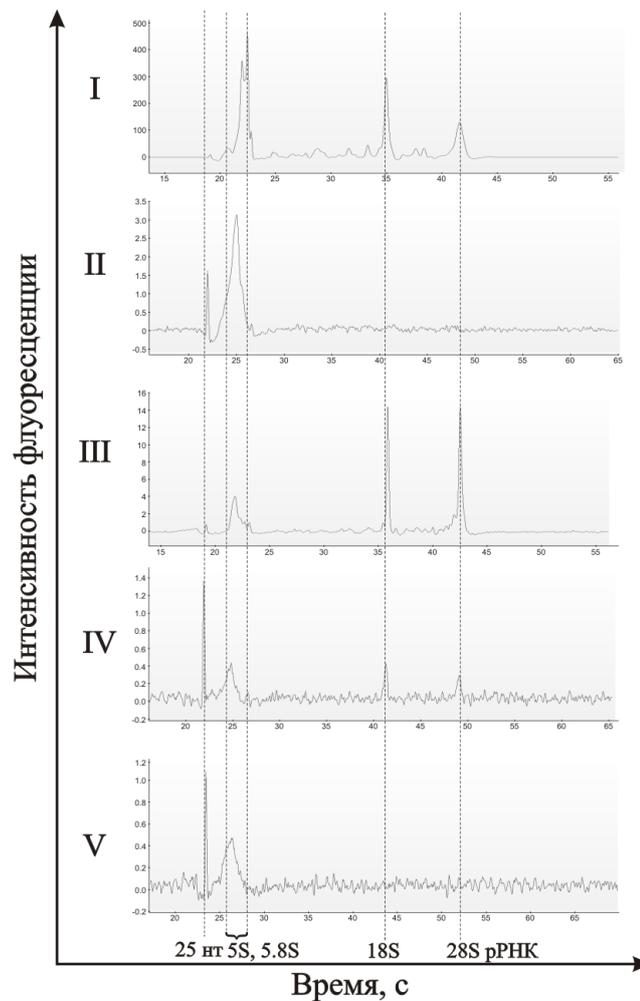


Рис. 6. Электрофоретические профили РНК фракций крови человека. Анализ препаратов суммарной РНК проводили с использованием RNA Pico Chip на Agilent 2100 Bioanalyzer. На рисунке для каждой фракции крови приведено изображение, отражающее типичный для данной фракции профиль РНК. Исследование выполнено в трех независимых повторах. I – форменные элементы крови; II – плазма крови; III – везикулы и клеточный дебрис, осаждаемые при 16 000 g; IV – везикулы, осаждаемые при 160 000 g (в том числе экзосомы); V – супернатант плазмы, обедненный везикулами.

3.4 Анализ РНК фракций крови I-V человека методом высокопроизводительного секвенирования

Для детального анализа РНК клеток крови человека (I), плазмы (II), а также фракций плазмы крови (III-V) мы использовали метод высокопроизводительного секвенирования, в основе которого лежит технология SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection). Данный метод был выбран нами, поскольку анализ профиля внеклеточных РНК крови (РНК фракций II-V) показал, что длина большинства таких РНК < 200 н., а секвенирование по технологии SOLiD является одним из наиболее

производительных методов для определения структуры коротких форм РНК. При этом данный метод позволяет анализировать десятки миллионов последовательностей в каждом индивидуальном образце [232].

Для того чтобы выявить характеристические формы РНК для каждой фракции крови и оценить их вариабельность в норме и при патологии мы использовали образцы крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Для конструирования кДНК-библиотек по технологии SOLiD мы использовали образцы венозной крови трех здоровых доноров – мужчин в возрасте от 45 до 65 лет без выявленных онкологических, аутоиммунных заболеваний и без обострений хронических воспалительных заболеваний. Кроме того, мы использовали образцы крови 3 пациентов с аденокарциномой легкого (АКЛ) со следующими стадиями заболевания: T2aNxM1, T2bN3M1, T3N3M0 и образцы венозной крови 4-х пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ) на стадиях T2–3NxM0 в возрасте от 50 до 60 лет.

Образцы крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ разделяли на фракции как описано в разделе 3.1. Препараты форменных элементов крови и препараты плазмы крови объединяли в группах доноров, пациентов с АКЛ и пациентов с ПКРЛ. Дальнейшее фракционирование плазмы и выделение РНК из фракций проводили с объединенными (пулированными) препаратами. Таким образом, нами было получено по три препарата РНК для каждой из 5 фракций крови – всего 15 препаратов РНК, которые были использованы для конструирования 15 кДНК-библиотек SOLiD.

Для конструирования кДНК-библиотек SOLiD был использован усовершенствованный метод, позволяющий анализировать короткие циркулирующие РНК (19-100 н.) с различным расположением концевых фосфатных групп [4]. Полученные кДНК-библиотеки амплифицировали в водно-масляной эмульсии на магнитных микрочастицах с последующим обогащением на полистироловых микрочастицах и иммобилизацией целевых конструкций на стеклянных пластинах. Циклы лигирования и детекции с длиной прочтения 50 н. проводили по технологии SOLiD в ЦКП «Геномика» СО РАН.

По результатам секвенирования SOLiD было получено ~ 9 - 32 млн прочтений для каждой из 15 кДНК-библиотек. Для классификации выявленных фрагментов РНК фракций крови была использована стратегия выравнивания (маппинга), описанная в работе [4], с некоторыми модификациями (Рис. 7).

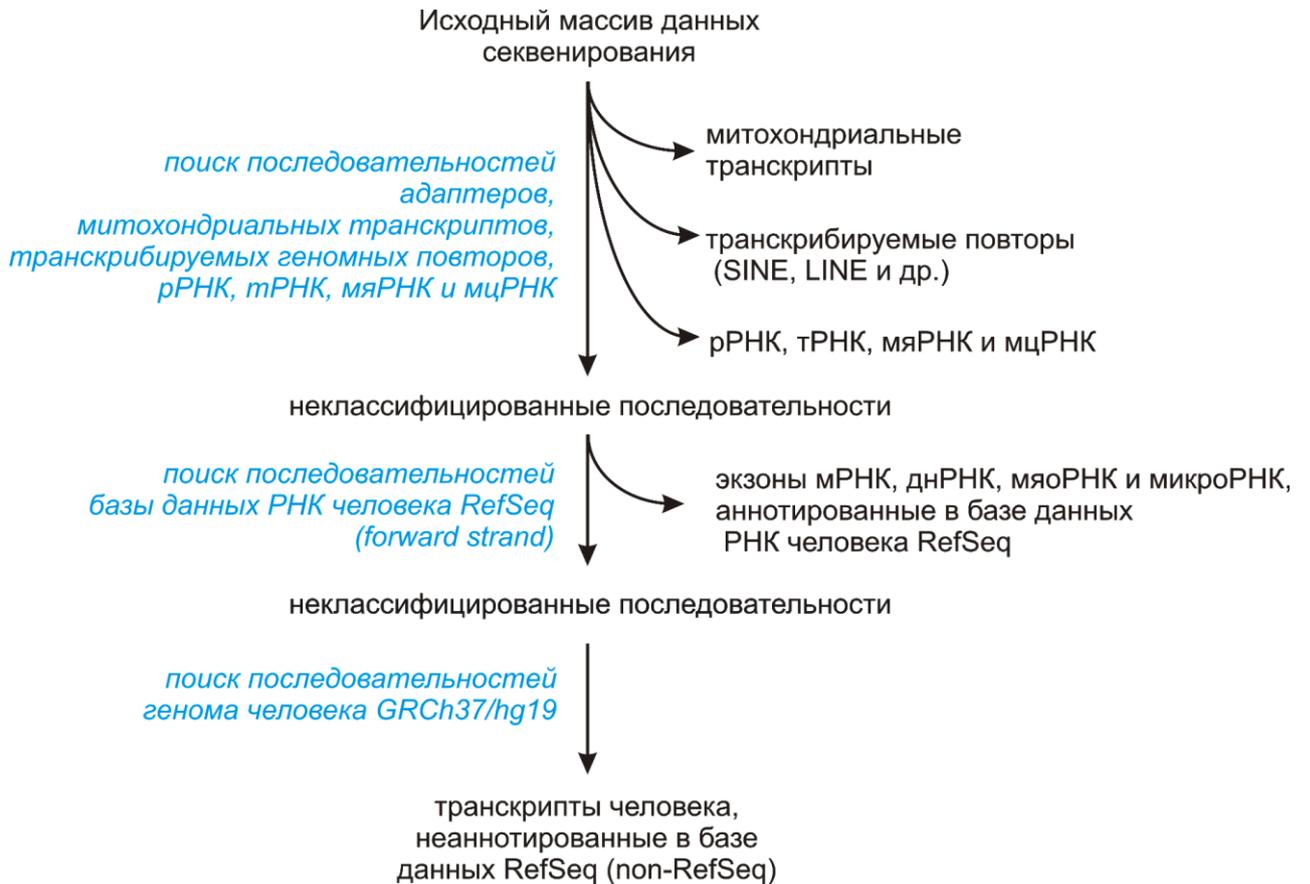


Рис. 7. Стратегия выравнивания экспериментальных последовательностей, использованная для идентификации фрагментов РНК плазмы крови человека. Выравнивание массива данных высокопроизводительного секвенирования SOLiD проводили с использованием последовательностей, аннотированных в базах данных: мтДНК [233], тРНК [189], повторяющихся элементов генома Repbase [188], human RefSeq RNA [190] и генома человека сборки hg19/GRCh37 [191].

В результате выравнивания было идентифицировано ~ от 3 до 15 миллионов экспериментальных последовательностей для каждой кДНК-библиотеки. Фрагменты всех основных классов клеточных РНК - митохондриальные транскрипты, мажорные клеточные РНК (рРНК, тРНК, мяРНК и мцРНК), фрагменты транскриптов геномных повторов человека (LINE, SINE, LTR и др.), фрагменты мРНК и некодирующих РНК человека из базы данных RefSeq, а также фрагменты транскриптов генома человека GRCh37/hg19, неаннотированных в базе данных РНК человека RefSeq (non-RefSeq) – обнаруживались в составе фракций крови I-V (Таблица 3).

Таблица 3. Относительная представленность основных классов РНК в препаратах суммарной РНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ. Данные получены при выравнивании экспериментальных последовательностей, допускающем не более одного совпадения в наборе референсных последовательностей.

Фракции	I. Форменные элементы			II. Плазма			III. 16 000 g осадок			IV. 160 000 g осадок			V. 160 000 g супернатант		
	ЗД	ПКРЛ	АКЛ	ЗД	ПКРЛ	АКЛ	ЗД	ПКРЛ	АКЛ	ЗД	ПКРЛ	АКЛ	ЗД	ПКРЛ	АКЛ
образцы крови ⁽¹⁾	ЗД	ПКРЛ	АКЛ	ЗД	ПКРЛ	АКЛ	ЗД	ПКРЛ	АКЛ	ЗД	ПКРЛ	АКЛ	ЗД	ПКРЛ	АКЛ
Относительное содержание, %															
мтРНК	2,45	5,38	0,72	13,76	8,89	0,33	17,84	12,01	1,01	2,83	1,16	0,12	7,52	0,61	0,09
рРНК	23,69	18,21	27,63	35,01	18,06	4,36	40,39	19,89	1,81	20,60	25,17	51,27	29,61	12,18	2,20
тРНК	0,70	0,36	2,74	2,39	0,70	0,21	0,42	0,23	1,05	0,50	0,57	0,52	1,06	0,86	0,53
У-РНК	1,83	0,88	1,53	1,48	1,31	0,37	5,01	1,29	4,80	1,31	0,79	0,64	1,62	0,25	3,73
U1-U17 мяРНК и 7SK РНК	0,52	0,22	0,56	0,20	0,07	0,07	0,06	0,04	0,02	0,17	0,31	0,70	0,18	0,15	0,12
SINE ⁽²⁾	1,18	0,27	0,79	0,61	0,28	0,16	0,64	0,47	0,08	0,17	0,26	0,14	0,51	0,13	0,06
LINE ⁽²⁾	0,46	0,23	0,17	0,23	0,35	0,15	0,15	0,28	0,14	0,18	0,32	0,17	0,28	0,51	0,18
LTR ⁽²⁾	0,09	0,06	0,04	0,06	0,09	0,02	0,04	0,07	0,05	0,03	0,10	0,08	0,07	0,17	0,05
ДНК-повторы ⁽²⁾	0,04	0,08	0,17	0,03	0,05	0,02	0,02	0,05	0,04	0,08	0,06	0,08	0,05	0,06	0,03
Другие транскрибируемые повторы ⁽³⁾	0,03	0,07	0,03	0,09	0,07	0,02	0,06	0,05	0,03	0,05	0,25	0,13	0,75	3,85	0,03
мРНК	22,50	30,54	26,08	19,80	34,12	30,24	15,21	29,88	31,28	25,16	33,98	20,11	21,09	35,80	31,36
нкРНК	22,71	3,55	2,95	2,84	2,92	4,16	1,62	3,27	16,30	2,25	3,13	2,95	3,60	3,19	17,93
Non-RefSeq РНК ⁽⁴⁾	23,79	40,14	36,60	23,50	33,10	59,89	18,54	32,47	43,39	46,67	33,89	23,08	33,67	42,23	43,69
Количество экспериментальных последовательностей⁽⁵⁾															
Сумма ⁽⁵⁾	8,0E6	2,8E6	4,1E6	6,0E6	4,3E6	3,5E5	5,3E6	5,3E6	1,5E6	3,6E6	4,0E6	4,1E6	6,2E6	3,2E6	2,1E6
<p>⁽¹⁾ Образцы крови здоровых доноров (ЗД), пациентов с плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ) или аденокарциномой легкого (АКЛ).</p> <p>⁽²⁾ Последовательности, классифицированные как фрагменты семейств SINE-, LINE-, LTR- и ДНК-повторов, аннотированных в базе данных G1R1 RepBase [188]. К семейству SINE-повторов отнесены также фрагменты 7SL РНК (NR_002715).</p> <p>⁽³⁾ Группа включает транскрипты сателлитных повторов, простых повторов и ряда других повторов ДНК, аннотированных в G1R1 RepBase [188].</p> <p>⁽⁴⁾ Последовательности, классифицированные как фрагменты транскриптов генома человека (интронов NM/NR записей базы данных РНК человека RefSeq и интронов новых днРНК, не аннотированных в базе РНК человека RefSeq).</p> <p>⁽⁵⁾ Общее число экспериментальных последовательностей, классифицированных для каждой кДНК-библиотеки.</p>															

Для детального анализа данных высокопроизводительного секвенирования РНК фракций крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ мы использовали два основных подхода. На первом этапе для каждой анализируемой фракции крови (I-V) был проведен поиск индивидуальных форм РНК, содержание которых в одной из фракций значительно отличается от их содержания в остальных фракциях. В данной работе для обозначения таких РНК мы используем словосочетание «характеристические РНК» (Раздел 3.4.1). На втором этапе был проведен поиск РНК с дифференциальным и, отдельно, с инвариабельным распределением во фракциях крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ (Раздел 3.4.2).

3.4.1 Характеристические РНК фракций крови I-V человека

Для поиска характеристических РНК фракций крови был проведен попарный сравнительный анализ содержания индивидуальных форм РНК во фракциях крови I-V с использованием наборов РНК, идентифицированных для здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, как независимых реплик. В результате для каждой из пяти рассматриваемых фракций крови были найдены характеристические РНК, содержание которых в рассматриваемой фракции значительно отличалось от фракции сравнения как у здоровых доноров, так и у пациентов с НМРЛ (полученные данные приведены в Таблицах А.1 и А.2 Приложения А).

Характеристические РНК, выявленные для плазмы крови (II) и ее фракций (III-V), обогащенных внеклеточными циркулирующими комплексами, по-видимому, являются РНК, селективно загружаемым во внеклеточные комплексы в процессе сборки последних. Низкая вариабельность относительного вклада таких РНК в препаратах здоровых доноров и пациентов с НМРЛ указывает на то, что выявленные нами характеристические РНК могут быть тесно связаны с фундаментальной функцией внеклеточных циркулирующих комплексов, которыми обогащены рассматриваемые фракции. Полученные данные в дальнейшем могут быть использованы для поиска маркеров фракций крови при разработке новых ПЦР тест-систем.

3.4.1.1 Распределение митохондриальных РНК во фракциях крови

Плазма крови и частицы плазмы, осаждаемые при 16 000 g, обогащены фрагментами мтРНК: $\sim 7,7 \pm 6,8\%$ и $\sim 10,0 \pm 8,5\%$, соответственно (Таблица 3). Сравнительный анализ содержания индивидуальных форм мтРНК во фракциях крови показал, что осадок частиц, получаемый при усилиях 16 000 g, значительно обогащен фрагментами мт-тРНК^{Asp} по сравнению с плазмой крови. При этом по сравнению с супернатантом плазмы, обедненным циркулирующими везикулами, осадок плазмы

(16 000 g) содержал не только повышенное количество фрагментов мт-тРНК^{Asp}, но и митохондриальной 16S рРНК (mt-RNR2) (Приложение А, Таблица А.1).

Известно, что митохондрии осаждаются из лизатов клеток при 7 000 – 8 000 g [234], поэтому обогащение осадков плазмы крови (16 000 g) фрагментами митохондриальных транскриптов по-видимому связано с присутствием митохондрий во фракции, что было установлено нами при анализе осадка плазмы (16 000 g) методом просвечивающей электронной микроскопии (Рис. 4 А).

Недавно было показано, что источником внеклеточных митохондрий в плазме крови являются тромбоциты, которые секретируют активные митохондрии в составе везикул и в свободной форме [235, 236]. Показано, что внеклеточные митохондрии тромбоцитарного происхождения в комплексе с секреторной фосфолипазой А₂ ПА взаимодействуют с нейтрофилами, активируют последние и тем самым участвуют в процессе развития реакции воспаления [236]. Поскольку согласно данным проточной цитометрии (раздел 3.2) $69,4 \pm 9,0$ % частиц, детектируемых в осадке плазмы 16 000 g, несут поверхностный маркер тромбоцитов/мегакариоцитов, мы предполагаем, что часть выявленных нами частиц являются митохондриями тромбоцитарного происхождения. В совокупности наши данные позволяют заключить, что осадки внеклеточных частиц плазмы крови (16 000 g) обогащены митохондриальными транскриптами и содержат в своем составе не только внеклеточные везикулы крови, но и внеклеточные митохондрии.

3.4.1.2 Распределение мажорных клеточных РНК и транскрибируемых геномных повторов во фракциях крови

Сравнительный анализ распределения фрагментов мажорных клеточных РНК во фракциях крови показал, что общий набор форм РНК фракции плазмы, обедненной частицами (V), отличается повышенным вкладом последовательностей с_{28S}_rRNA – фрагментов транскриптов рДНК-повтора, комплементарных последовательности 28S рРНК (Приложение А, Таблица А.1).

Вместе с тем, частицы, осаждаемые при 160 000 g (IV), обогащены фрагментами 28S рРНК и фрагментами транскрипта геномного повтора MER41A (класс ERV1 семейства LTR повторов) по сравнению с клетками крови (I), плазмой (II) и плазмой, обедненной везикулами (V) (Приложение А, Таблица А.1).

Наибольший интерес вызывает тот факт, что частицы плазмы крови (фракция IV) обогащены фрагментами малых ядерных РНК. При этом относительный вклад фрагментов U1, U5A/B и U6 мяРНК в общий набор форм РНК был в 2,6 – 3,9 раз выше в

осадке плазмы, получаемом при усилиях 160 000 g, по сравнению с цельной плазмой и осадком плазмы, получаемом при усилиях 16 000 g (Приложение А, Таблица А.1).

Анализ распределения экспериментальных последовательностей по референсным последовательностям мяРНК показал, что циркулирующие фрагменты U1 мяРНК (но не U5A и U6) относятся к 3'-концевым фрагментам этой мяРНК (Рис. 8).

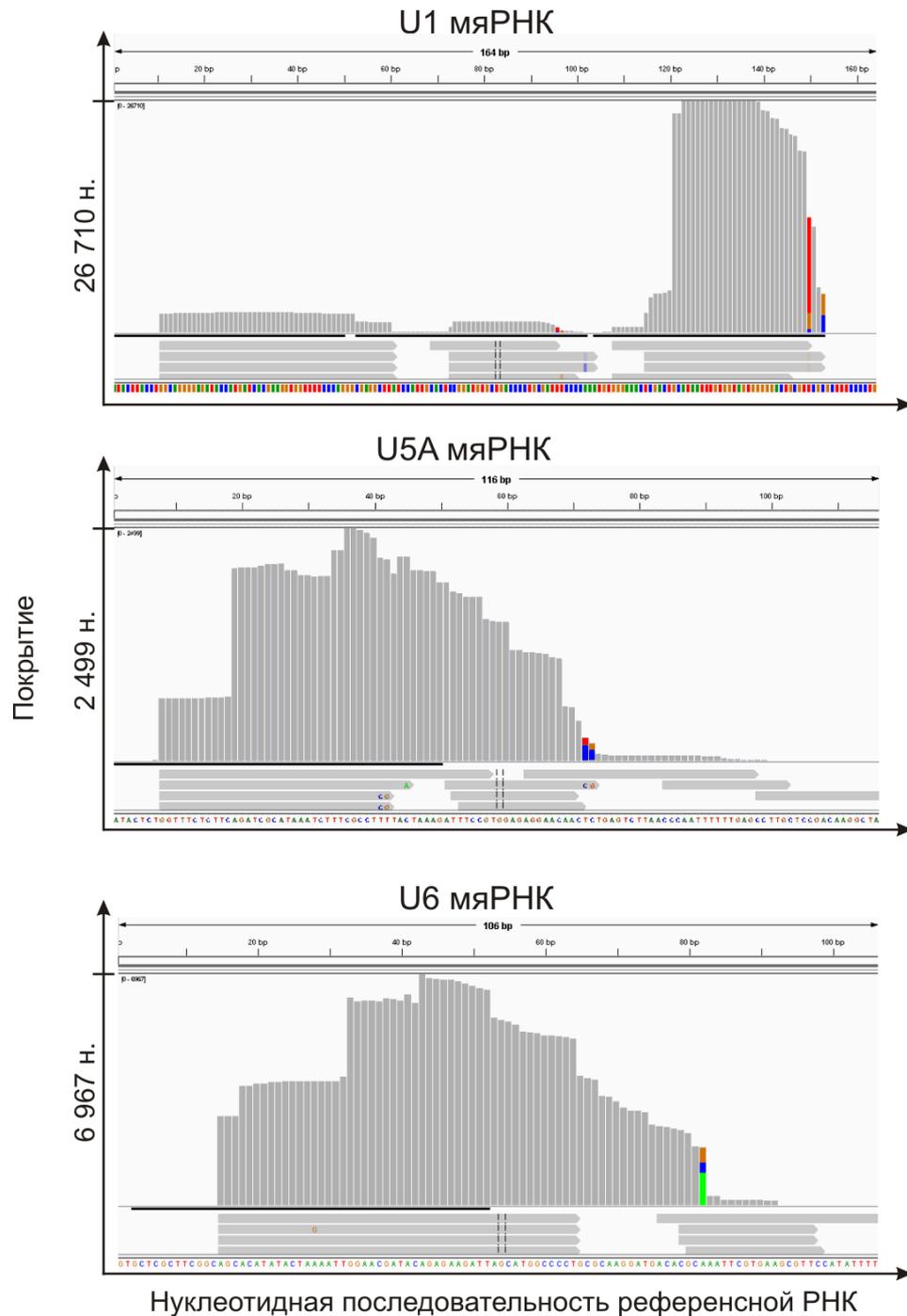


Рис. 8. Покрывтие референсных последовательностей U1, U5A и U6 мяРНК экспериментальными последовательностями циркулирующих РНК, идентифицированных в препаратах РНК частиц плазмы (160 000 g) здоровых доноров и пациентов с НМРЛ. Визуализацию данных проводили с использованием программного пакета IGV v.2.3 [183].

Известно, что некоторые малые некодирующие РНК образуются в результате процессинга рРНК, мяРНК, тРНК и мяоРНК. Предполагают, что такие внутриклеточные РНК участвуют в регуляции экспрессии генов наряду с микроРНК [237, 238]. Однако, при изучении внеклеточных некодирующих РНК основным объектом современных исследований являются микроРНК. Предполагают, что именно микроРНК и микроРНК-подобные формы, секретируемые в составе микровезикул, экзосом и рибонуклеопротеиновых комплексов являются медиаторами процессов межклеточной коммуникации [59]. Наблюдаемое нами обогащение фракции IV плазмы крови (160 000 g) U1, U5A/B и U6 РНК указывает на то, что полноразмерные формы и фрагменты малых ядерных РНК, наряду с микроРНК, могут участвовать в процессах межклеточного взаимодействия и регулировать экспрессию генов в клетках-реципиентах.

3.4.1.3 Экзоны мРНК и некодирующих РНК, аннотированные в базе данных РНК человека RefSeq

Сравнительный анализ фракций крови показал, что частицы плазмы, осаждаемые при 16 000 g и 160 000 g, значительно обеднены фрагментами малых ядрышковых РНК, такими как *SNORD110*, *SNORD65*, *SNORA31*. Так, например, осадок плазмы (160 000 g), также как плазма и супернатант плазмы крови (160 000 g), содержат ~ в 4 – 6 раз меньше фрагментов *SNORD110* в общем наборе форм РНК. Наряду с обеднением по мяоРНК, в составе везикул плазмы крови, осаждаемых при 16 000 g и 160 000 g, отмечено обогащение по ряду мРНК и микроРНК (Приложение А, Таблица А.2).

Наши данные в совокупности позволяют предположить, что не только переменный набор мРНК и микроРНК, но также малых ядерных РНК и их фрагментов секретируется во внеклеточное пространство в составе мембранных комплексов, таких как экзосомы и микровезикулы.

3.4.2 Биоинформационный поиск РНК с дифференциальной и инвариабельной экспрессией во фракциях крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ

Онкотрансформированные клетки, также как и нормальные клетки, секретируют внеклеточные РНК-содержащие комплексы и используют их в качестве медиаторов для поддержания собственного роста и метастазирования [174, 175]. Показано, что внеклеточные комплексы раковых клеток присутствуют в физиологических жидкостях человека, таких как плазма крови, ликвор, слюна [1], что приводит к изменению профиля внеклеточных РНК в последних [239]. Показано также, что развитие НМРЛ

сопровождается значительным изменением профиля внеклеточных микроРНК, мяРНК, мяоРНК и длинных некодирующих РНК крови [240-244].

Мы провели сравнение наборов РНК фракций крови здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ, а также отдельно фракций крови здоровых доноров и пациентов с АКЛ. В результате были выявлены формы РНК, имеющие схожее и переменное распределение во фракциях крови здоровых доноров и онкопациентов. В данной работе для форм РНК с близким относительным вкладом в определенной фракции крови мы используем обозначение «инвариабельные РНК». Мы предполагаем, что инвариабельные РНК внеклеточных комплексов плазмы крови могут участвовать в жизненно-важных процессах организма человека, регулируемых локальными и дистантными межклеточными взаимодействиями. Списки инвариабельных форм РНК приведены в Приложении А (Таблицы А.3-А.10), а списки форм РНК с дифференциальным распределением во фракциях крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ приведены в Приложении А (Таблицы А.11 и А.12).

3.4.2.1 Инвариабельные мтРНК и транскрипты геномных повторов фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ

Известно, что митохондриальная ДНК человека кодирует мт-рРНК, мт-тРНК, мт-мРНК, а также ряд мт-нкРНК (транскрипты D-петли). Из данных Таблицы А.3 (Приложение А) видно, что наименьшей вариабельностью относительного вклада во всех фракциях крови отличаются фрагменты транспортных РНК митохондрий (мт-тРНК). Среди 10 наиболее представленных инвариабельных мтРНК плазмы крови также выявлены фрагменты мт-рРНК (RNR1) и мт-мРНК (ATP8 и ND1).

При сравнительном анализе относительного вклада транскриптов геномных повторов было установлено, что большая часть форм инвариабельных транскриптов кодируется повторами L1-семейства ретротранспозонов (*LINE-1*) (Приложение А, Таблица А.4).

3.4.2.2 Инвариабельные мРНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ

Наборы фрагментов мРНК (записи NM базы данных RefSeq), имеющих близкий относительный вклад в общий набор форм РНК индивидуальных фракций крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, значительно отличались между фракциями. Однако перекрывающиеся между фракциями крови формы (выделены подчеркиванием в Таблице А.6 Приложения А) были выявлены и для класса мРНК.

Так, например, фрагменты мРНК гена *PRKCH* (кодирующего протеин киназу C-eta) входят в список 10 наиболее представленных инвариабельных мРНК всех фракций крови, кроме осадков плазмы (160 000 g). Вместе с тем фрагменты матричных РНК, кодирующих главные комплексы гистосовместимости классов А и Е (транскрипты *HLA-A* и *HLA-E*) встречались в списке 10 инвариабельных форм РНК клеток крови, плазмы и осадков плазмы (16 000 g) (Приложение А, Таблица А.6).

Мы провели анализ генных аннотаций для выявления функциональных групп инвариабельных форм РНК фракций крови, используя пакет программ PANTHER [198]. Было показано, что форменные элементы крови, плазма и частицы плазмы, осаждаемые при 16 000 g и 160 000 g, обогащены фрагментами мРНК, кодирующих гистоны – ядерные белки, участвующие в процессе сборки и организации хроматина (выявлены группы генных онтологий GO:0031497 и GO:0006325, *p*-value с коррекцией по Бонферрони < 2,2E-05). При этом набор инвариабельных мРНК клеток крови представлен фрагментами мРНК, продукты которых участвуют в дифференциации макрофагов (*PRKCH*, *ABCG1* и *NR1H3*, генная онтология GO:0010743, *p* < 9,67E-03).

Интересно, что в списке инвариабельных мРНК частиц плазмы крови, осаждаемых при 160 000 g, выявлено обогащение мРНК, кодирующих белки рибосомного комплекса, участвующие в трансляции, деградации мРНК, транскрибируемых в ядре, а также в процессинге рРНК (генные онтологии GO:0006412, GO:0000184, GO:0006364, *p* < 6,0E-07). При этом для набора из 133 инвариабельных мРНК, выявленных для супернатанта плазмы (160 000 g), мы не обнаружили значимых (*p* < 0,05) обогащений фрагментами мРНК генов, связанных онтологиями (GO groups).

3.4.2.3 Инвариабельные днРНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ

Анализ распределения инвариабельных длинных некодирующих РНК (записи NR в базе данных RefSeq, которым соответствуют транскрипты длиной более 200 н.) показал, что мембранные частицы плазмы, осаждаемые при 160 000 g, а также супернатант плазмы (160 000 g) отличались повышенным содержанием индивидуальных форм инвариабельных днРНК – 20 и 13 видов, соответственно (Приложение А, Таблица А.7) по сравнению с форменными элементами, плазмой и осадком плазмы (16 000 g). Отсутствие перекрывающихся форм в списках инвариабельных днРНК фракций крови IV и V указывает на существующие различия в процессах селективной загрузки РНК во внеклеточные комплексы, которыми обогащены эти фракции - везикулы и рибонуклеопротеиновые комплексы, соответственно.

3.4.2.4 Инвариабельные микроРНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ

Среди инвариабельных форм микроРНК изоформы *MIR103-1/2* были выявлены во всех пяти фракциях крови: клетках, плазме и ее субфракциях (Приложение А, Таблица А.8). При этом микроРНК *MIR16-1/2*, *107*, *126*, *223* и *451* отличались схожим распределением в образцах крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ как минимум в трех фракциях из пяти (Приложение А, Таблица А.8). Схожий набор микроРНК (*MIR451*, *103-1/2*, *16-1/2*, *223* и *126*) входит в топ 20 микроРНК высокопредставленных во фракциях крови I-V (данные не иллюстрированы). Полученные данные указывают на то, что среди вариабельного набора микроРНК фракций крови есть подгруппа микроРНК, имеющих близкий относительный вклад в наборах РНК форменных элементов крови, плазмы и фракций плазмы крови.

Все вышеупомянутые микроРНК были выявлены ранее в работе Чена с соавторами как компоненты клеток крови, сыворотки и плазмы здоровых доноров и пациентов с НМРЛ (данные получены с использованием технологии секвенирования Solexa). При этом присутствие *MIR16-1/2*, *107*, *126*, *223* и *451* во фракциях крови человека было подтверждено также методом ОТ-ПЦР [245]. Интересно, что *MIR16*, *103*, *126* и *223*, выявленные нами в составе набора инвариабельных микроРНК, ранее были обнаружены в составе микровезикул плазмы крови, периферических мононуклеарных клетках крови и тромбоцитах [225]. В тоже время микроРНК *MIR16*, *126* и *223* входят в список 30 микроРНК с наибольшим вкладом в пул РНК экзосом и, совместно с *MIR451*, липопротеинов высокой плотности крови здоровых доноров [3].

Недавно, по результатам гибридизации на микрочипах и с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени было показано, что микроРНК *MIR16*, *103*, *107*, *223* и *451* являются мажорными микроРНК, секретлируемыми тромбоцитами человека в составе микрочастиц [235, 246].

В совокупности с данными литературы наши результаты согласуются с выдвинутым ранее предположением [246] о том, что тромбоциты являются основным источником мембранных микрочастиц и, как следствие, циркулирующих РНК. Однако, наши данные также указывают на то, что не только тромбоциты, но и другие форменные элементы крови, в том числе лимфоциты, вносят значительный вклад в разнообразие микроРНК в составе плазмы крови и ее субфракций.

3.4.2.5 Инвариабельные мяоРНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ

Малые ядрышковые бокс Н/АСА и бокс С/D РНК – это класс регуляторных некодирующих РНК о распределении которых в крови, плазме и ее фракциях, а также об их функциях во внеклеточном пространстве в настоящее время имеются лишь отрывочные данные.

Список инвариабельных мяоРНК, фрагментами которых были обогащены фракции клеток крови и частиц плазмы (160 000 г) здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, включает 11 и 17 индивидуальных форм, соответственно. При этом во фракциях плазмы, мембранных частиц (16 000 г) и супернатанта (160 000 г) выявлено значительно меньшее количество инвариабельных форм микроРНК - всего 16 видов суммарно для вышеперечисленных фракций (Приложение А. Таблица А.9).

Фрагменты *SNORD84* (NR_003065) были обнаружены среди инвариабельных мяоРНК клеток крови, плазмы и частиц плазмы, осаждаемых при 160 000 г. Остальные инвариабельные мяРНК были представлены набором неперекрывающихся форм для каждой фракции (Приложение А. Таблица А.9).

Таким образом, наши данные позволяют заключить, что частицы плазмы крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, осаждаемые при 160 000 г, содержат обширный набор инвариабельных мяРНК (бокс Н/АСА и бокс С/D РНК), непересекающийся с набором мяРНК клеток крови.

3.4.2.6 Инвариабельные фрагменты РНК, неаннотированных в базе данных RefSeq (non-RefSeq), фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ

В настоящее время известно, что бóльшая часть геномной ДНК человека участвует в процессе транскрипции [247], при этом в составе РНК клеток человека кроме канонических транскриптов, таких как рРНК, тРНК, мРНК, мяРНК, мяоРНК, мцРНК, содержатся длинные некодирующие РНК. Единой системы номенклатуры и классификации днРНК до сих пор не выработано. Вместе с тем выделяют несколько основных групп длинных транскриптов ($n > 200$ н.), отличающихся расположением кодирующих их последовательностей по отношению к белок-кодирующим генам. Различают так называемые межгенные днРНК, интронные днРНК, антисмысловые днРНК, энхансер-/промотор-ассоциированные днРНК, кольцевые днРНК и другие [248].

Работы, посвященные анализу структуры и функций днРНК, являются одним из наиболее востребованных направлений современных молекулярно-биологических и

генетических исследований. Показано, что днРНК присутствуют не только в клетках, но и во внеклеточном пространстве. В данной работе для каждой исследуемой фракции крови мы провели поиск инвариабельных фрагментов днРНК, среди идентифицированных фрагментов non-RefSeq РНК (Приложение А. Таблица А.10).

Установлено, что инвариабельная РНК плазмы, кодируемая локусом chr3:857189-857263, представляет собой фрагмент интрона длинной межгенной некодирующей РНК 1266 (*LINC01266*). Фрагменты инвариабельного транскрипта частиц плазмы (16 000 g), кодируемого в chr9:131641128-131641163, относятся к интрону пре-мРНК гена *KYAT1* (kynurenine aminotransferase 1). Фрагменты инвариабельной РНК частиц плазмы (160 000 g) кодируемые локусом chr13:29401239-29401304, для которого нет генетических аннотаций в базах данных UCSC Genes, RefSeq Genes и ENCODE/GENCODE (Приложение А. Таблица А.10).

В совокупности данные Таблицы А.10 (Приложение А) позволяют заключить, что фракции крови человека содержат уникальный для фракции набор фрагментов днРНК, не аннотированных в базе human RefSeq RNA. В наборах фрагментов днРНК встречаются транскрипты интронов известных мРНК, а также новые, не описанные ранее, транскрипты человека. Уникальность набора non-RefSeq РНК фракций крови, обогащенных микровезикулами и экзосомами, указывает на функционирование процессов селективной загрузки днРНК во внеклеточные везикулы.

3.4.2.7 Дифференциально распределенные фрагменты РНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ

Для выявления транскриптов, содержание которых во фракциях крови здоровых доноров достоверно отличается от содержания во фракциях крови пациентов с НМРЛ, мы провели две серии попарных сравнений фракций крови здоровых доноров и пациентов с плоскоклеточным раком легкого, а также здоровых доноров и пациентов с аденокарциномой легкого с помощью пакета программ Cuffdiff (Таблицы А.11 и А.12).

Оба набора дифференциально распределенных транскриптов, выявленных для фракций крови пациентов с ПКРЛ (Таблица А.11) и пациентов с АКЛ (Таблица А.12) были представлены фрагментами транскриптов митохондриальных генов, транскрибируемых геномных повторов, фрагментами vault-РНК, мРНК, днРНК, микроРНК и мяоРНК.

Группы индивидуальных транскриптов с дифференциальным распределением во фракциях крови пациентов с ПКРЛ и АКЛ по сравнению со здоровыми донорами,

значительно отличаются между собой. При этом наибольшее количество различий было выявлено для фрагментов мРНК, микроРНК и мяоРНК (Таблица А.11 и А.12).

Установлено, что наборы дифференциально экспрессированных форм РНК фракций крови пациентов с ПКРЛ представлены в основном индивидуальными формами микроРНК и мРНК. Так, например, для осадка плазмы крови (16 000 g) пациентов с АКЛ было выявлено 367 дифференциально экспрессированных РНК, из них 313 являлись фрагментами мРНК и микроРНК (Таблица А.11).

Среди 63/74 дифференциально экспрессированных форм РНК плазмы/супернатанта плазмы крови (160 000 g) пациентов с АКЛ было выявлено большое количество индивидуальных форм малых ядрышковых РНК (26 и 37, соответственно) (Таблица А.12).

Известно, что изменения в составе циркулирующих микроРНК крови онкологических пациентов связаны с развитием злокачественного новообразования [240, 241], поэтому микроРНК плазмы крови рассматривают как основной объект для разработки тест-систем малоинвазивной диагностики онкологических заболеваний. Однако наши данные указывают на то, что не только состав микроРНК, но также и состав фрагментов малых ядрышковых РНК и матричных РНК плазмы крови существенно изменен в крови онко-пациентов. Таким образом, можно заключить, что не только микроРНК, но и циркулирующие мяоРНК и мРНК являются перспективными объектами для усовершенствования подходов диагностики онкологических заболеваний человека.

3.5 Кольцевые РНК фракций крови I-V человека

Кольцевые РНК (кцРНК) - новый класс некодирующих РНК с замкнутой структурой рибозофосфатного остова, содержащих внутримолекулярную 5'-3'-фосфодиэфирную связь между первым и последним нуклеотидами транскрипта.

В настоящее время функции кольцевых РНК установлены лишь частично. Известно, что кольцевые РНК, состоящие из экзонов пре-мРНК, как правило, экспортируются из ядра в цитоплазму [167]. При этом цитоплазматические кцРНК, содержащие белок-кодирующие экзоны, не входят в состав полисом и не транслируются [162, 167]. Зрелые кцРНК, сохраняющие в своей структуре интроны пре-мРНК (EicRNA), локализуются преимущественно в ядрах клеток [197, 249]. Предполагают, что ядерные кольцевые РНК участвуют в регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции, и при этом они могут активировать транскрипцию в дистантно расположенных геномных локусах [162, 250]. Недавно было установлено, что некоторые кольцевые РНК содержат множественные участки связывания микроРНК и конкурируют с мишенями РНК-интерференции за микроРНК [162, 163]. Кроме того, показано, что кцРНК конкурируют с

линейными пре-мРНК и мРНК за связывание с белками – транскрипционными факторами и факторами сплайсинга [167, 197].

Таким образом, кольцевые РНК рассматривают как одну из форм конкурентных эндогенных РНК (competitive endogenous RNAs, ceRNAs), к которым также относятся линейные длинные некодирующие РНК [251, 252].

Известно, что кольцевые РНК присутствуют как в клетках, так и во внеклеточном пространстве – слюне [253], плазме и сыворотке крови человека [254, 255]. С другой стороны, известно, что внеклеточные РНК (мРНК, микроРНК и др.) секретируются клетками в составе мембранных микро- и наночастиц, в том числе, микровезикул и экзосом [1]. Установлено также, что РНК присутствуют в составе внеклеточных рибонуклеопротеидов, не связанных с циркулирующими мембранными микро- и нановезикулами [129].

Учитывая данные о том, что интернализированные полноразмерные внеклеточные микроРНК и мРНК модулируют экспрессию генов [1, 256], можно предположить, что и внеклеточные кольцевые РНК могут отвечать за передачу регуляторных сигналов от клеток-доноров к клеткам-реципиентам. При этом, в отличие от мРНК, замкнутая структура кцРНК обеспечивает им большую стабильность во внеклеточном пространстве. Поэтому на следующем этапе работы мы провели поиск кольцевых форм РНК во фракциях крови человека.

3.5.1 Поиск индикаторных последовательностей кольцевых транскриптов в массиве данных высокопроизводительного секвенирования РНК форменных элементов, плазмы и субфракций плазмы крови человека

Массив экспериментальных данных высокопроизводительного секвенирования РНК крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) сравнивали с набором референсных последовательностей, составленным из индикаторных соединений экзонов – продуктов обратного сплайсинга пре-мРНК и пре-днРНК (Рис. 2). Набор референсных последовательностей включал все соединения 5'-конца N-ого экзона с 3'-концом этого же и следующих за ним экзонов, для каждого экзона и каждого транскрипта из базы РНК человека RefSeq RNA (NCBI). При этом индикаторная референсная последовательность содержала по 25 н. от 5'- и 3'-концов экзонов, участвующих в образовании неканонической связи «голова к хвосту» при обратном сплайсинге, как это показано на Рис. 2.

В результате выравнивания экспериментальных последовательностей полученных кДНК-библиотек РНК фракций крови здоровых доноров и онкопациентов было выявлено 1134 уникальных соединения экзонов – продуктов обратного сплайсинга пре-мРНК (Таблица 4).

Таблица 4. Количество индикаторных соединений экзонов кольцевых РНК, характерных для обратного сплайсинга, выявленных высокоэффективным секвенированием РНК форменных элементов, плазмы и субфракций плазмы крови человека

Уникальные соединения экзонов обратного сплайсинга – 1134 (всего 2334 экспериментальных последовательности ⁽¹⁾)			
Покрытие⁽²⁾ ≤ 3 – 981	Покрытие⁽²⁾ > 3 – 153		
	Повторы – 65	Без повторов⁽³⁾ – 88	
		Известные⁽⁴⁾ – 80	Новые⁽⁵⁾ – 8
⁽¹⁾ Суммарное количество экспериментальных последовательностей, совпадающих с референсными соединениями экзонов - продуктами обратного сплайсинга.			
⁽²⁾ Покрытие референсных соединений экзонов экспериментальными последовательностями.			
⁽³⁾ Не содержащие последовательностей простых моно- и динуклеотидных повторов типа U _n или (AG) _n .			
⁽⁴⁾ Идентифицированные ранее [166, 250, 257-259], а также ⁽⁵⁾ новые, выявленные в данной работе, индикаторные соединения экзонов, не аннотированные в базе данных circbase.org [260].			

153 индикаторных соединения экзонов совпадало с 4-мя и более экспериментальными последовательностями, а 88 из этих 153 соединений экзонов не содержали простых геномных повторов и были отнесены нами к наиболее достоверным индикаторам кольцевых РНК крови человека (Таблица 5).

Таблица 5. Кольцевые РНК, выявленные высокоэффективным секвенированием суммарных РНК форменных элементов, плазмы и субфракций плазмы крови человека. Подчеркнуты ID кцРНК, выбранных для анализа методом ОТ-ПЦР

NM/NR ⁽¹⁾	ID	E1 ⁽²⁾	E2 ⁽²⁾	N ⁽³⁾	S ⁽⁴⁾	Chr ⁽⁵⁾
Известные кцРНК (Топ 20)						
NM_139121	<u>YYIAP1</u> ⁽⁶⁾	5	3	56	-	chr1:155646339-155649303
NM_018107	<u>RBM23</u>	3	2	54	-	chr14:23378692-23380612
NM_139121	<u>YYIAP1</u>	6	3	48	-	chr1:155644801-155649303
NM_015313	<u>ARHGEF12</u>	3	2	42	+	chr11:120276827-120278532
NM_080841	<u>PTPRA</u>	5	4	36	+	chr20:2944918-2945848
NM_213649	<u>SFXN4</u>	5	3	35	-	chr10:120920427-120921926
NM_001142680	<u>ANO6</u>	13	11	28	+	chr12:45771836-45784281
NM_006540	<u>NCOA2</u>	4	3	25	-	chr8:71126138-71128999
NM_177969	<u>PPM1B</u>	4	2	24	+	chr2:44436349-44445676
NM_019001	<u>XRN1</u>	2	2	22	-	chr3:142151503-142151735
NR_003610	<u>PDXDC2P</u>	3	2	22	-	chr16:70076254-70076906
NM_015646	<u>RAP1B</u>	4	3	22	+	chr12:69044180-69045831
NM_017724	<u>LRRFIP2</u>	4	3	21	-	chr3:37170554-37190529
NM_014325	<u>CORO1C</u>	8	7	19	-	chr12:109046048-109048186
NM_012290	<u>TLK1</u>	12	11	18	-	chr2:171884849-171902872
NR_036627	<u>RBM5</u>	13	12	18	+	chr3:50145503-50145737
NM_014615	<u>GSE1</u>	2	2	18	+	chr16:85667520-85667738
NM_014393	<u>STAU2</u>	5	4	16	-	chr8:74585342-74601048
NR_036535	<u>MATR3</u>	11	8	16	+	chr5:138652742-138655190
NM_033255	<u>EPSTII</u>	6	2	14	-	chr13:43528084-43544806
... известные кцРНК, выбранные для верификации						
NM_003489	<u>NRIP1</u>	3	2	12	-	chr21:16386665-16415895
NM_004781	<u>VAMP3</u>	4	3	11	+	chr1:7837220-7838229
NM_001754	<u>RUNX1</u>	7	6	9	-	chr21:36206707-36231875
NM_015477	<u>SIN3A</u>	6	5	9	-	chr15:75703833-75705386
NM_012082	<u>ZFPM2</u>	3	2	5	+	chr8:106431372-106456609
NM_001379	<u>DNMT1</u>	7	5	4	-	chr19:10284547-10288043
NM_007166	<u>PICALM</u>	12	9	4	-	chr11:85707869-85714494
Новые⁽⁷⁾						
NM_018051	<u>WDR60</u>	5	3	7	+	chr7:158663833-158672680
NM_005548	<u>KARS</u>	7	3	4	-	chr16:75668071-75674247
NM_172373	<u>ELF1</u>	7	6	4	-	chr13:41517088-41518061
NM_014393	<u>STAU2</u>	10	5	4	-	chr8:74507401-74585477
NM_025267	<u>PTGES3L-AARSD1</u>	6	5	4	-	chr17:41122306-41123713
NM_203364	<u>CAPRINI</u>	9	8	4	+	chr11:34104372-34104588
NR_033798	<u>CAST</u>	7	3	4	+	chr5:96083049-96090445
NM_015569	<u>DNM3</u>	16	14	4	+	chr1:172100315-172277979
<p>(1) NM/NR идентификатор линейного транскрипта в базе данных Nucleotide NCBI.</p> <p>(2) Номера экзонов с 5'-и 3'-концов индикаторного соединения обратного сплайсинга.</p> <p>(3) Количество экспериментальных последовательностей, совпадающих с референсным индикаторным соединением экзонов.</p> <p>(4) Ориентация транскрипта в хромосоме.</p> <p>(5) Геномные координаты 5'-конца акцепторного экзона и 3'-конца донорного экзона обратного сплайсинга (GRCh37/hg19).</p> <p>(6) Работы, в которых ранее были выявлены соответствующие кольцевые РНК.</p> <p>(7) Подчеркиванием выделены кцРНК распределение которых во фракциях крови было проанализировано методом ОТ-ПЦР.</p> <p>(7) Выявленные в данной работе индикаторные соединения донорных и акцепторных сайтов обратного сплайсинга кольцевых РНК, не аннотированные в базе данных circbase.org [260].</p>						

Сравнение полученных результатов с данными литературы показало, что 80 из 88 достоверных индикаторных соединений экзонов аннотированы в базе данных circBase [260], а 8 соединений экзонов представляют собой фрагменты новых, не аннотированных ранее, кольцевых РНК человека (Таблица 5).

Необходимо отметить, что мы не проводили обогащения препаратов суммарной РНК кольцевыми формами путем гидролиза линейных РНК экзонуклеазой R. Поэтому, выявление индикаторного соединения экзонов обратного сплайсинга в индивидуальной кДНК-библиотеке зачастую представляет собой единичное событие, а в ряде индивидуальных кДНК-библиотек не выявлено ни одного индикаторного соединения.

В связи с этим в данной работе мы составили общее, кумулятивное описание данных о выявленных индикаторных соединениях экзонов кцРНК крови человека, без количественного сопоставления вклада в отдельных фракциях крови или для групп здоровых доноров и онкопациентов (Таблицы 4 и 5). При этом наше описание кцРНК крови человека построено с использованием препаратов крови не только здоровых доноров, но и пациентов с немелкоклеточным раком легкого, и, таким образом, дополняет опубликованные ранее данные о многообразии изоформ кцРНК человека [261-263].

3.5.2 Анализ функций кцРНК крови человека *in silico*

Для ряда кцРНК показано участие в регуляции экспрессии генов за счет взаимодействия с малыми РНК и белками, модулирующими транскрипцию или трансляцию генов того же геномного локуса, который кодирует эти кцРНК [163, 250, 264]. Поэтому процессы в которых участвуют белки – продукты данного гена, потенциально, регулируются и продуктами обратного сплайсинга пре-мРНК – кольцевыми РНК этого же гена.

Для того чтобы описать многообразие биологических процессов, регуляция которых может быть связана с кцРНК, мы провели анализ генных онтологий (GO-аннотаций) для выявленного набора из 88 генов, кодирующих кцРНК крови человека.

Из данных Таблицы 6 видно, что гены кольцевых РНК крови человека кодируют как ядерные, так и цитоплазматические белки. Набор обогащен ($p < 0,05$) генами транскрипционных регуляторов и кофакторов (*SIN3A*, *ZMYND8*, *NCOA2* и др.), а также генами, продукты которых участвуют в процессах котранскрипционной и посттранскрипционной модификации белков (категория генных онтологий GO:0006464). Кроме того, в наборе достоверно ($p < 0,05$) повышен вклад генов, кодирующих белки мембранных везикул и регуляторов мембранного транспорта – *CLTA*, *SEC31A*, *VAMP3* и др. (Таблица 6).

Таблица 6. Генные онтологии (Gene Ontology) мРНК-гомологов кольцевых РНК форменных элементов и субфракций плазмы крови человека по результатам анализа PANTHER V.10 [198]

GO-аннотации Parent (GO:ID) Child (GO:ID)	Количество генов	P⁽¹⁾	Идентификаторы
PANTHER GO-Slim Molecular Function			
Transcription cofactor activity (0003712) Protein binding transcription factor activity (0000988)	6	2,55E-02	<i>SIN3A, LRRFIP2, ZMYND8, NCOA2, YY1API, URI1</i>
PANTHER GO-Slim Biological Process			
Cellular protein modification process (0006464) Primary metabolic process (0044238)	42	4,69E-02	<i>CAST, HNRNPC, WDR60, PIK3CB, RUNX1, SELL, ORC4, POMT1, NFATC1, SIN3A, MAP3K5, ALG8, LRRFIP2, ELF1, TLK1, NFATC3, PDXDC2P, UXS1, PTPRA, PPM1B, GTF2I, ZFPM2, ZMYND8, TNPO3, NCOA2, ATAD2, RNF216, HECTD1, YY1API, URI1, RBM5, UBE2D2, PDLIM5, MKNK1, ASPH, MARK3, PTPN12, PAIP2, CDC14B, CSNK1G3, SOX6, KARS</i>
PANTHER GO-Slim Cellular Component			
Vesicle coat (0030120) Macromolecular complex (0032991)	11	1,90E-02	<i>HNRNPC, WDR60, PIK3CB, ORC4, SIN3A, CLTA, SEC31A, VAMP3, URI1, PICALM, DNM3</i>
GO cellular component complete			
Nucleus (0005634)	45	1,67E-02	-- ⁽²⁾
Cytoplasm (0005737)	59	2,86E-02	-- ⁽²⁾
⁽¹⁾ Значение <i>p</i> с коррекцией по Бонферрони. ⁽²⁾ Списки идентификаторов для больших групп генов (>45) не приведены.			

В целом эти данные позволяют заключить, что кольцевые РНК форменных элементов и плазмы крови человека могут участвовать в регуляции процессов синтеза РНК в ядре, в процессах модификации белков, а также в процессах сборки везикулярных мембран и регуляции мембранного транспорта.

3.5.3 Анализ распределения кцРНК во фракциях крови здоровых доноров методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Для того чтобы подтвердить данные высокоэффективного секвенирования (Таблица 5) независимым методом мы провели анализ содержания 12 выбранных ранее форм кцРНК в форменных элементах и в субфракциях плазмы крови здоровых доноров с помощью ОТ-ПЦР. В данной части работы для получения фракций крови, обогащенных мембранными везикулами, мы использовали сорбент для выделения экзосом - ExoRNeasy (Qiagen, Германия) (Рис. 9 А).

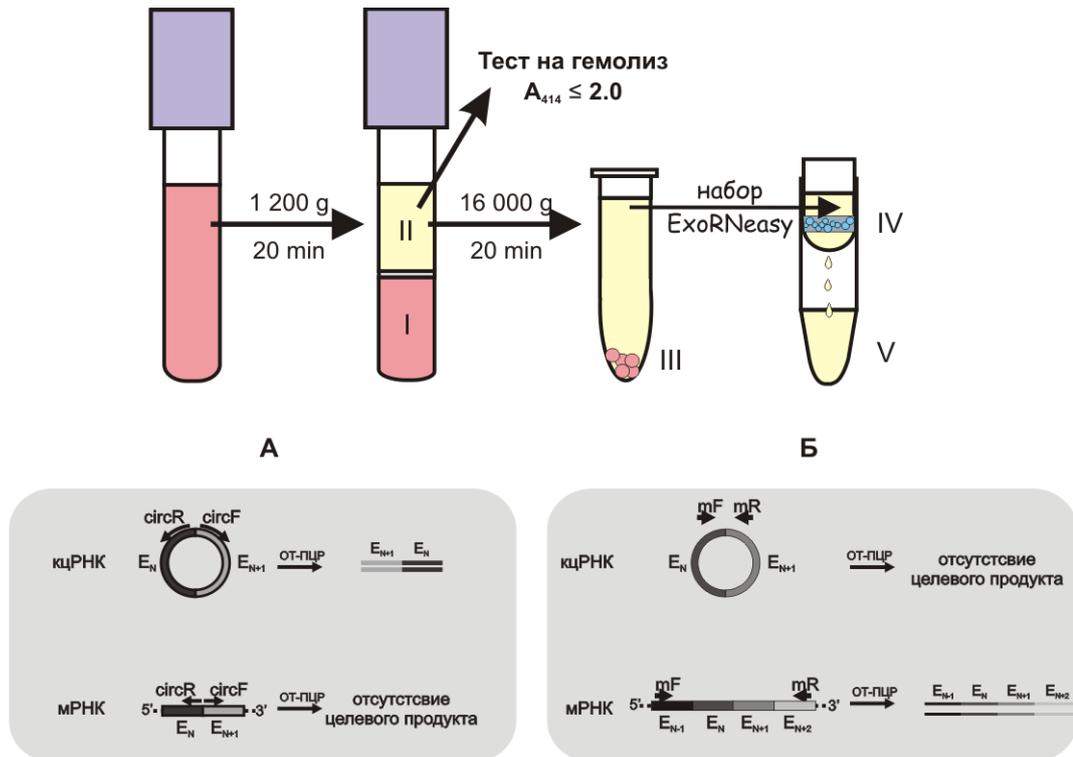


Рис. 9. А. Схема получения фракций крови. **Б.** Схема подбора праймеров для выявления кольцевой формы РНК; *circF* и *circR* – прямой и обратный праймеры, позволяющие идентифицировать *circRNA*; E_N, E_{N+1} – экзоны. **В.** Схема подбора праймеров для выявления линейной формы мРНК; *mF* и *mR* – прямой и обратный праймеры, позволяющие идентифицировать мРНК; E_{N_i} – экзоны.

Для 12 кцРНК крови человека (Таблица 5, выделены подчеркиванием) были подобраны пары праймеров, позволяющие проводить обратную транскрипцию РНК и ПЦР так, чтобы в амплификации участвовали только кДНК кольцевых РНК, но не их линейных гомологов (Рис. 9 Б). Из 12 выбранных кцРНК (таблица 5) 3 формы: *ARHGEF12*, *NRIP1* и *DNMT1* не были выявлены ни в одной из анализируемых фракций крови здоровых доноров.

Для 9 кцРНК было установлено, что относительный вклад таких транскриптов во фракциях крови человека значительно ($p < 0,05$) различается от фракции к фракции. При этом наибольшее относительное содержание кольцевых РНК (кроме *VAMP3*) выявлено в составе частиц крови, осаждающихся при 16 000 г. Ни один из выбранных для анализа полноразмерных кольцевых транскриптов не был выявлен во фракциях плазмы крови, обеденных мембранными везикулами (элюат с сорбента *exoRNeasy*) (Рис. 10).

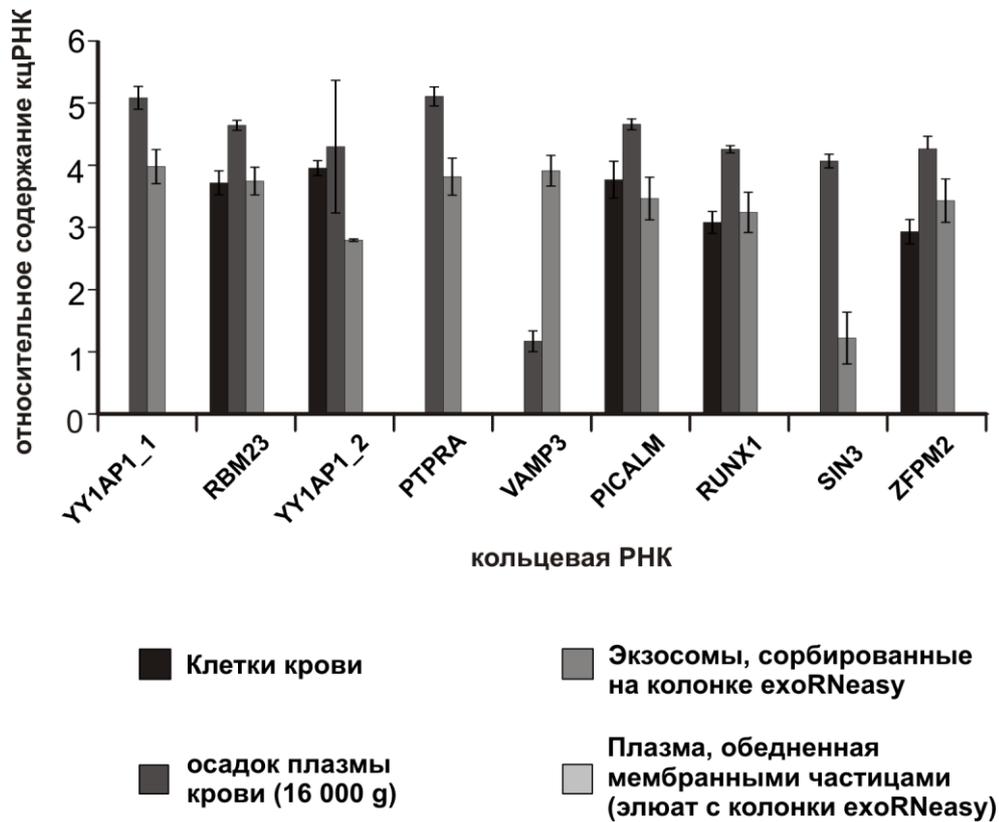


Рис. 10. Анализ содержания кольцевых РНК во фракциях крови методом ОТ-ПЦР. Относительное содержание кольцевых РНК в составе форменных элементов, частиц плазмы крови, осаждаемых при 16 000 g, а также в составе частиц плазмы крови, связывающихся с сорбентом exoRNeasy, и плазмы, обедненной по мембранным везикулам. X – целевой ПЦР-продукт не детектирован.

Ранее Ли с соавт. было показано, что содержание ряда кольцевых РНК в экзосомах, секретируемых онкотрансформированными клетками печени линии МНСС-LM3, повышено по сравнению с содержанием таких транскриптов в клетках-продуцентах. Кроме того, было установлено, что кольцевые РНК сыворотки крови здоровых доноров детектируются преимущественно во фракциях экзосом [261].

Наши результаты и данные литературы позволяют заключить, что полноразмерные кольцевые РНК надежно и воспроизводимо детектируются в крови человека в составе форменных элементов, плазмы и ее фракциях, обогащенных везикулами. При этом содержание полноразмерных кольцевых транскриптов во фракции плазмы крови, обедненной везикулами, ниже предела чувствительности метода ОТ-ПЦР. Таким образом, показано, что внеклеточные кРНК циркулируют в крови преимущественно в составе мембранных комплексов, таких как экзосомы и микровезикулы.

3.5.4 Анализ относительного распределения кольцевых форм РНК и их линейных мРНК-гомологов во фракциях крови здоровых доноров методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Для того чтобы сравнить представленность кольцевых транскриптов и их линейных мРНК-гомологов мы подобрали пары праймеров, которые позволяют проводить обратную транскрипцию и амплификацию кДНК тех же экзонов мРНК, что образуют кольцевые транскрипты (Рис. 9 В).

Для всех проанализированных генов, кроме *ARHGEF12*, установлено, что содержание кольцевых форм РНК сравнимо или превышает содержание линейных мРНК-продуктов в форменных элементах, во фракциях везикул (16 000 g) и в препаратах экзосом крови, взаимодействующих с сорбентом ehoRNAeasy (Рис. 11).

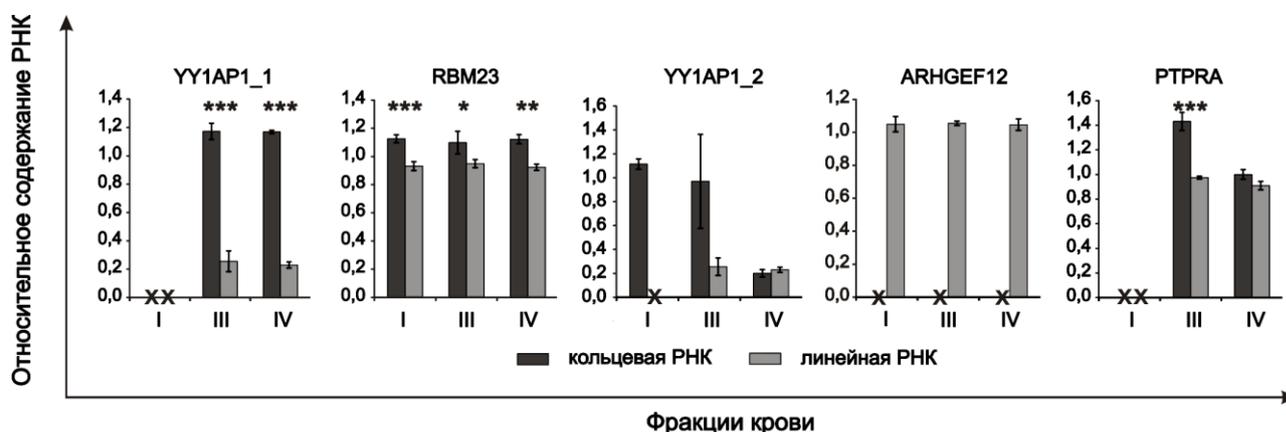


Рис. 11. Анализ относительного содержания кольцевых и линейных транскриптов генов *YY1AP1*, *RBM23*, *ARHGEF12*, *PTPRA* во фракциях крови методом ОТ-ПЦР. Относительное содержание продуктов генов *YY1AP1*, *RBM23*, *ARHGEF12*, *PTPRA* - кольцевых РНК и их линейных мРНК-гомологов - во фракциях крови: I – форменные элементы; III – мембранные частицы плазмы крови, осаждаемые при 16 000 g; IV – мембранные частицы плазмы крови, связывающиеся с сорбентом ehoRNAeasy. X – целевой ПЦР-продукт не детектирован. ***, **, * - $p_{St} \leq 0,001, 0,01, 0,05$, соответственно.

Повышенное содержание кольцевых транскриптов по сравнению с их линейными мРНК-гомологами уже было показано ранее для продуктов целого ряда генов и для различных линий клеток млекопитающих, а также для образцов цельной крови человека [166, 263]. В совокупности с данными литературы наши данные подтверждают предположение о том, что кольцевые РНК могут проявлять свойства конкурентных эндогенных РНК в клетках человека.

3.5.5 Анализ экспрессии кольцевых РНК крови в культивируемых клетках человека методом ОТ-ПЦР

Ранее в работе Salzman с соавт. [166] показано, что экспрессия кцРНК является консервативным процессом, специфичным для клеточной линии. Поэтому мы дополнительно провели качественный анализ экспрессии выявленных кольцевых РНК крови в трех линиях культивируемых клеток человека: аденокарциномы молочной железы – MCF-7 и MDA-MB-231, а также в клетках аденокарциномы легкого A549.

Было установлено, что каждая из 12 выбранных кцРНК крови человека достоверно детектируется по крайней мере в одной из трех линий культивируемых клеток человека (таблица 7). Сравнение полученных результатов с данными литературы показало, что кольцевые РНК – продукты генов *YYIAP1*, *VAMP3*, *ZFPM2* и *DNMT1*, достоверно детектируются в препаратах РНК клеток MCF-7 или A549, однако в работе Salzman с соавт. [166] экспрессия этих кцРНК в соответствующей линии клеток не выявлена (Таблица 7).

Таблица 7. Содержание кольцевых РНК в культивируемых клетках человека: аденокарциномы молочной железы MCF-7; MDA-MB-231 и аденокарциномы легкого A549

ID	Chr ⁽¹⁾	ОТ-ПЦР			[167]	
		MCF-7	MDA-MB-231	A549	MCF-7	A549
<i>YYIAP1</i>	chr21:16386665-16415895	+	+	+	-	-
<i>RBM23</i>	chr1:7837220-7838229	+	+	+	-	+
<i>YYIAP1</i>	chr21:36206707-36231875	+	+	+	-	-
<i>ARHGEF12</i>	chr15:75703833-75705386	+	+	+	-	+
<i>PTPRA</i>	chr8:106431372-106456609	+	+	+	-	+
<i>NRIP1</i>	chr19:10284547-10288043	+	+	+	+	+
<i>VAMP3</i>	chr11:85707869-85714494	+	+	+	-	-
<i>RUNX1</i>	chr21:16386665-16415895	+	+	+	+	+
<i>SIN3A</i>	chr1:7837220-7838229	-	-	+	-	+
<i>ZFPM2</i>	chr21:36206707-36231875	-	+	+	-	-
<i>DNMT1</i>	chr15:75703833-75705386	+	-	+	-	-
<i>PICALM</i>	chr8:106431372-106456609	+	+	+	-	+

⁽¹⁾ Геномные координаты 5'-конца акцепторного экзона и 3'-конца донорного экзона обратного сплайсинга (GRCh37/hg19).

Таким образом, данные позволяют заключить, что кольцевые РНК, выявленные в составе РНК форменных элементов, плазмы или субфракций плазмы крови человека,

экспрессируются не только в клетках, участвующих в процессах гемопоэза, но и в клетках другого тканевого происхождения – эпителиоцитах молочной железы MDA-MB-231, MCF-7, а также и в эпителиоцитах легкого A549.

Кроме того, сопоставление наших результатов с данными литературы [166, 263] позволяет заключить, что экспрессия кцРНК существенно различается между линиями клеток, а также между лабораторными штаммами клеток одной линии (таблица 7).

Обнаруженные качественные различия в данных о детекции кцРНК в препаратах суммарной РНК культивируемых клеток человека указывают на то, что экспрессия отдельных кцРНК представляет собой динамичный и вариабельный процесс, который может модулироваться условиями культивирования клеток, меняться на различных стадиях роста культуры или при пассировании и культивировании клеток. Вместе с тем, процессинг пре-мРНК/днРНК до конкретных изоформ кцРНК (с сохранением этих изоформ из всего возможного многообразия изоформ кцРНК для данного пре-мРНК-транскрипта) в клетках разного происхождения позволяет говорить о фундаментальной роли таких кцРНК в регуляции клеточных процессов, по крайней мере, в качестве медиаторов регуляторных каскадов.

3.6 Оценка возможности использования нуклеофозмина 1 в качестве транспортера синтетических аналогов внеклеточных РНК в клетки человека

Нуклеофозмин 1 (NPM1/B23/нуматрин) – многофункциональный ядрышковый фосфопротеин, имеющий сложное мультидоменное строение (Рис. 12).

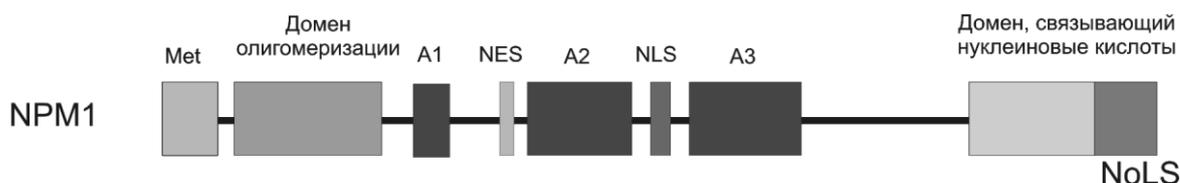


Рис. 12. Строение нуклеофозмина 1 человека (в соответствии с [265]). A1-A3 - домены, обогащенные остатками аспарагиновой и глутаминовой кислот; NES - сигнал экспорта из ядра (nuclear export signal); NLS - сигнал локализации в ядре (nuclear localization signal); NoLS - сигнал ядрышковой локализации (nucleolar localization signal); Met – регион, богатый остатками метионина.

Недавно Wang с соавт. показали, что нуклеофозмин 1 присутствует в неэкзосомной фракции среды, конденсированной клетками первичной культуры фибробластов легкого и клетками гепатокарциномы HepG2, культивируемыми в условиях сывороточного

голодания [6]. Было показано также, что miR-122 в комплексе с NPM1 проявляла повышенную устойчивость к гидролизу РНКазой А *in vitro* [6]. Эти данные позволили предположить, что белок нуклеофозмин 1 является компонентом внеклеточных циркулирующих рибонуклеопротеиновых комплексов и непосредственно участвует в упаковке и экспорте микроРНК клетками млекопитающих. При этом нерешенным оставался вопрос об участии нуклеофозмина 1 в процессах захвата и интернализации внеклеточных РНК клетками-реципиентами.

В данной работе нами был получен и охарактеризован рекомбинантный аналог нуклеофозмина 1 (NPM1-His₆). Проведены анализ взаимодействия генно-инженерного аналога нуклеофозмина 1 с синтетическими некодирующими РНК *in vitro* и оценка влияния нуклеофозмина 1 на эффективность накопления внеклеточных нуклеиновых кислот в клетках аденокарциномы молочной железы MCF-7.

3.6.1 Создание штамма-продуцента рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1

Ген NPM1 (Chr 5 q35) кодирует три изоформы нуклеофозмина: B23.1 (NP_002511), B23.2 (NP_954654) и B23.3 (NP_001032827). В данной работе был получен рекомбинантный аналог изоформы B23.1, экспрессируемой большинством клеток органов и тканей человека [265]. Изоформа B23.1 состоит из 294 аминокислот, формирующих полный набор доменов NPM1 (Рис. 12).

Фрагмент ДНК, кодирующий изоформу B23.1, получали методом ОТ-ПЦР с использованием в качестве матрицы суммарной РНК клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Для подбора праймеров использовали последовательность NPM1 из базы данных GeneBank (NM_002520.6) [266]. В праймеры были введены участки узнавания рестриктазами *EcoRI* и *BamHI*, по которым полученный ген встраивали в линейаризованный вектор pET23a под контроль T7 промотора. Конструирование, анализ и отбор генетических конструкций проводили с помощью штамма *E. coli* Top10. Нуклеотидную последовательность вставки в плазмиду pET23a подтверждали методом секвенирования ДНК по Сэнгеру [267]. В качестве штамма-носителя для полученного экспрессирующего вектора pET23a_NPM1 использовали *E. coli* BL21 (DE3). В результате был создан продуцент *E. coli* BL21 (DE3)/pET23a_NPM1, при индукции которого нарабатывается рекомбинантный аналог белка нуклеофозмин 1, содержащий последовательность His₆ на С-конце (NPM1-His₆).

3.6.2 Выделение и характеристика рекомбинантного аналога NPM1-His₆

При подборе условий культивирования штаммов-продуцентов было установлено, что наибольшего выхода целевого белка (~ 18 мг с 1 литра культуры клеток *E. coli*) удается достичь с использованием метода автоиндукции [268].

При индукции биосинтеза рекомбинантного аналога NPM1-His₆ в клетках штамма *E. coli* BL21 (DE3)/pET23a_NPM1 целевой белок нарабатывался преимущественно в растворимой форме. Очистку целевого белка NPM1-His₆ из супернатанта лизата клеток проводили ступенчатой металл-хелатной хроматографией на Ni-NTA сефарозе. NPM1-His₆ элюировали с сорбента, повышая концентрацию имидазола в буфере до 250 мМ (Рис. 13 А, фракция III).

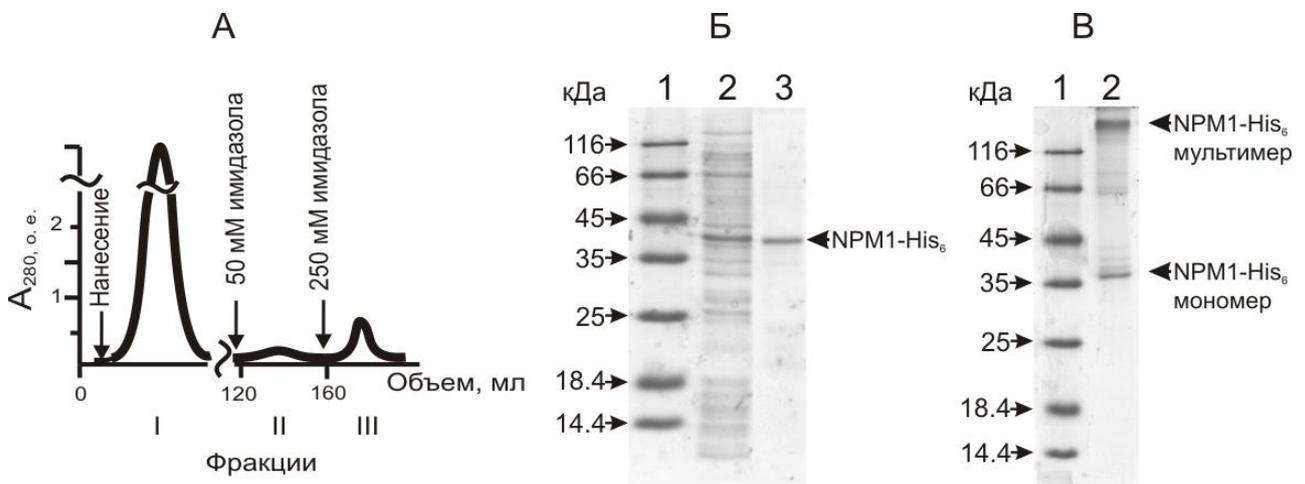


Рис. 13. А. Выделение рекомбинантного аналога NPM1-His₆ аффинной хроматографией на Ni-NTA-сефарозе из лизата клеток продуцентов *E. coli*. Фракции белков: I – не взаимодействующих с сорбентом; II – элюируемых буфером, содержащим 50 мМ имидазола; III – элюируемых буфером, содержащим 250 мМ имидазола. **Б.** Анализ белковых препаратов рекомбинантного аналога NPM1-His₆ денатурирующим электрофорезом в 13% ПААГ. Дорожки: 1 – маркеры молекулярной массы белков; 2 – белки лизата клеток *E. coli* BL21 (DE3), трансформированных вектором pET23a_NPM1; 3 – препарат рекомбинантного NPM1-His₆. Положение в геле рекомбинантного NPM1 показано стрелкой. **В.** Анализ белкового препарата NPM1-His₆ денатурирующим электрофорезом в 13% ПААГ в отсутствие 2-меркаптоэтанола. Дорожки: 1 – маркеры молекулярной массы белков; 2 – препарат рекомбинантного NPM1-His₆, положение в геле мономера и мультимера NPM1-His₆ показаны стрелками. Белки окрашены кумасси G-250.

Электрофоретическая чистота полученных белковых препаратов NPM1-His₆ составляла ~ 92%. Из данных Рис. 13 Б видно, что препараты NPM1-His₆ содержали один

полипептид с электрофоретической подвижностью, соответствующей белку с молекулярной массой $\sim 40 \pm 2$ кДа. Структура полученного рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1 - NPM1-His₆ - была подтверждена методом MALDI-TOF масс-спектрометрии продуктов его трипсинолиза.

Показано, что в невосстанавливающих условиях (в отсутствие β-меркаптоэтанола) рекомбинантный аналог NPM1-His₆ представлен мономерной и мультимерной формами (Рис. 13 В), при этом вклад мультимерной формы белка составлял $\sim 66\%$ (согласно анализу с помощью программы Gel-Pro Analyzer).

Известно, что нуклеофозмин 1 присутствует в клетках человека в форме мономера и в форме декамера, а олигомеризация происходит благодаря межмолекулярным взаимодействиям гидрофобных аминокислотных остатков N-домена белка (Рис. 12). Поэтому формирование рекомбинантным аналогом мультимерных форм (Рис. 13 В) указывает на наличие у NPM1-His₆ структурно-функциональных характеристик, сходных с нуклеофозмином 1 (В23.1) человека.

В ряде работ показано, что нуклеофозмин 1 связывает нуклеиновые кислоты и проявляет РНКазную активность. При этом, белок катализирует неспецифический гидролиз одноцепочечных олиго-А, -С и -U РНК и практически неактивен в реакции гидролиза двуцепочечных РНК [269]. Поэтому, использование двуцепочечных РНК позволяет оценить возможное присутствие примесей неспецифических РНКаз и фосфодиэстераз *E. coli* в препаратах рекомбинантного аналога NPM1-His₆. Из данных Рис. 14 (дорожки 3-5) видно, что препараты NPM1-His₆ не вызывают гидролиза дцРНК-ВПЧ даже при длительной инкубации (90 мин, 37 °С).

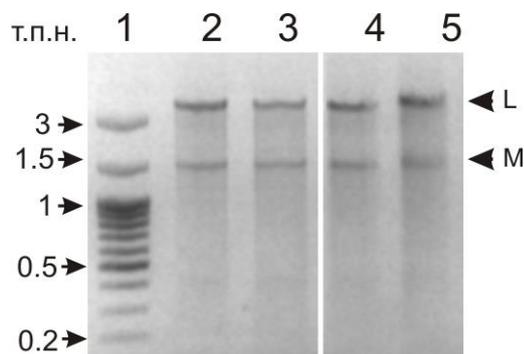


Рис. 14. Анализ РНКазной активности препарата NPM1-His₆. дцРНК-ВПЧ (5 мг/л) инкубировали с 2,6, 6,8 и 14,9 мкг/мл NPM1-His₆ в течение 90 мин при 37 °С (дорожки 3-5), или без NPM1-His₆ (дорожка 2) и анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле. Дорожка 1 - маркеры молекулярной массы НК. L и M - формы дцРНК вирусоподобных частиц киллерных дрожжей *S. cerevisiae*. РНК в геле окрашена бромистым этидием.

Эти результаты подтверждают данные литературы о том, что нуклеофозмин 1 не проявляет заметной РНКазной активности по отношению к дцРНК, и показывают, что препарат рекомбинантного аналога NPM1-His₆ уже на стадии очистки аффинной хроматографией на никель-хелатном сорбенте не содержит примесей фосфодиэстераз и РНКаз *E. coli*.

Таким образом, нами был получен очищенный от нуклеаз *E. coli* рекомбинантный аналог нуклеофозмина 1 человека, проявляющий структурно-функциональные характеристики, сходные с природным нуклеофозмином 1 человека.

3.6.3 Оценка эффективности взаимодействия NPM1-His₆ с синтетическими РНК

На первом этапе мы оценили способность рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1 связывать РНК. В качестве модельных РНК были использованы синтетические аналоги Alu РНК и C/D бокс РНК.

Известно, что Alu РНК формирует двудоменную структуру, в которой "левый" и "правый" Alu-мономер представлены набором компактных частично-комплементарных участков (Рис. 15 Б) [270]. Аналоги U24 C/D бокс РНК были сконструированы ранее для анализа влияния синтетических C/D бокс РНК на процессинг рРНК клеток человека [207]. В отличие от Alu РНК, аналоги C/D бокс РНК содержат лишь небольшие (5-6 н.) области комплементарности на 5'- и 3'-концах (Рис. 15 А).

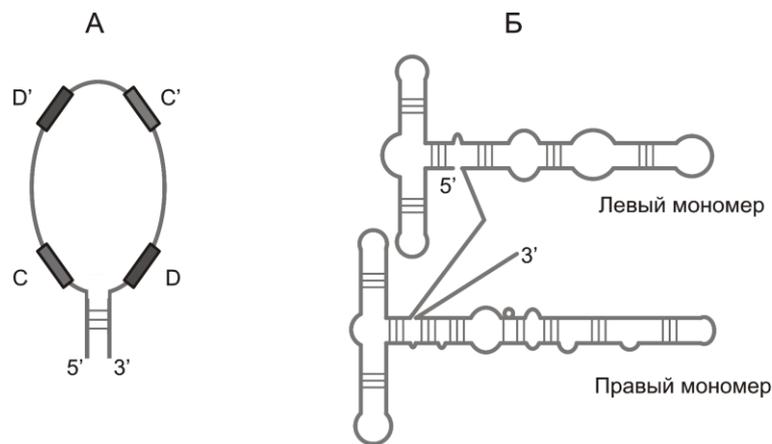


Рис. 15. Вторичная структура аналогов U24 C/D бокс РНК (А) и AluY-РНК (Б). Вторичная структура AluY-РНК с двудоменной организацией мономеров приведена в соответствии с [270].

NPM1-His₆ инкубировали с синтетическими аналогами AluY РНК и C/D бокс РНК, а также с одноцепочечным олигорибонуклеотидом rON1. Продукты комплексообразования анализировали методом гель-ретардации в нативном 5% ПААГ.

Было установлено, что NPM1-His₆ способен взаимодействовать с синтетическими аналогами AluY РНК и аналогами C/D бокс РНК человека (Рис. 16 А, дорожки 2 и 4, соответственно). Полная задержка AluY РНК (60 нМ) в геле происходила в присутствии 0,1 мМ Mg²⁺, при 20-кратном избытке нуклеофозмина по отношению к РНК (Рис. 16 А, дорожка 2). В тех же условиях лишь ~ 30% аналога U24 мяоРНК (70 нМ) находилось в комплексе с NPM1-His₆ (Рис. 16 А, дорожка 4). Связывания гON1 аналогом нуклеофозмина 1 методом гель-ретардации зарегистрировано не было (Рис. 16 Б, дорожка 2).

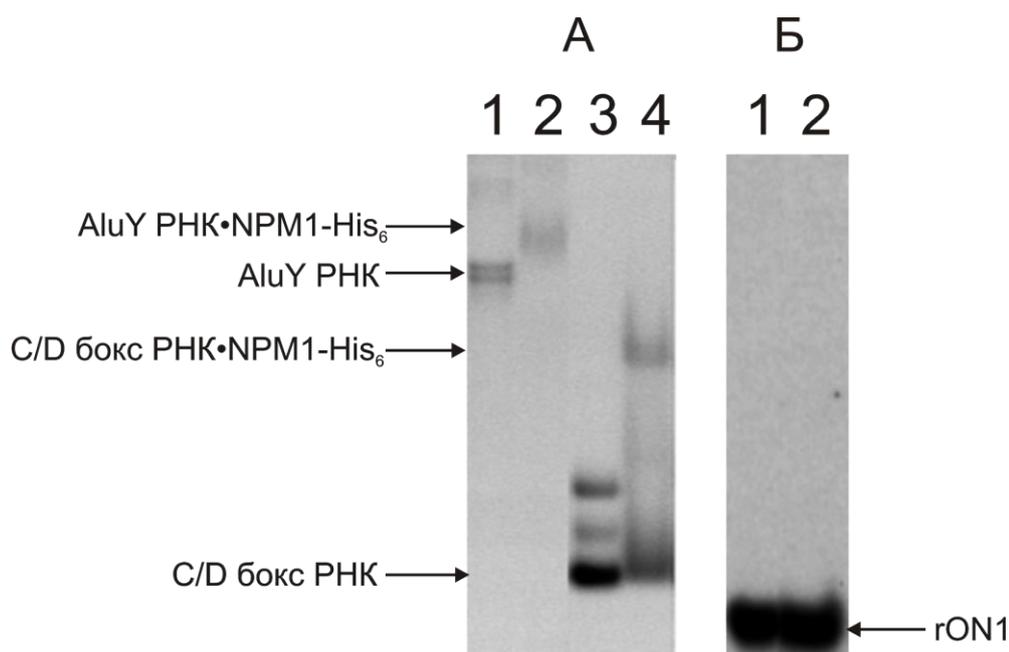


Рис. 16. Анализ взаимодействия NPM1-His₆ с РНК методом гель-ретардации. 5'-[³²P]-меченые: А – AluY РНК (60 нМ) (1,2); аналог C/D бокс РНК (70 нМ) (3,4); Б - гON1 (1,3 мкМ) (1,2) преинкубировали 10 мин при 37 °С в реакционной смеси, содержащей 12 мкМ NPM1-His₆ (дорожки с четными номерами), или без белка (дорожки с нечетными номерами). Реакционные смеси разделяли электрофорезом в нативном 5% ПААГ. На рисунке представлен радиоавтограф геля.

Полученные данные указывают на то, что способность рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1 взаимодействовать с РНК убывает в ряду: протяженные структурированные РНК (n > 300 н., для аналогов AluY РНК) > одноцепочечные РНК (n ~ 80 н.) > короткие олигорибонуклеотиды (n ~ 22 н. для гON1).

3.6.4 Оценка влияния NPM1-His₆ на эффективность трансфекции синтетических РНК в клетки MCF-7 человека

Для того чтобы оценить воздействие препаратов рекомбинантного нуклеофозмина 1 на клетки человека был проведен анализ влияния препаратов NPM1-His₆ на жизнеспособность клеток MCF-7. В серии независимых экспериментов было установлено, что после 24 часов инкубации в среде, содержащей NPM1-His₆ (0,1 – 25 мкг/мл), не происходило снижения жизнеспособности клеток MCF-7 ($p > 0,5$). Кроме того, при анализе световой и люминисцентной микроскопией не было выявлено существенных морфологических изменений клеток MCF-7 при инкубации с NPM1-His₆.

Клетки MCF-7 инкубировали в среде с синтетическими аналогами AluY РНК и U24 C/D бокс РНК, а также их комплексами с NPM1-His₆. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени было установлено, что содержание синтетической AluY РНК в препарате суммарной РНК клеток MCF-7, преинкубированных с комплексами AluY РНК• NPM1-His₆ в течение 1 часа, достоверно не отличается от содержания этой РНК, захваченной клетками в отсутствие NPM1-His₆ (Рис. 17 А, II и III). При увеличении времени инкубации клеток с РНК-белковыми комплексами до 3 часов разница в эффективности трансфекции AluY РНК• NPM1-His₆ по сравнению со свободной РНК возрастает до 25 раз ($p_{St} < 0,01$) (Рис. 17 А, IV и V). Преинкубация C/D бокс РНК с рекомбинантным аналогом NPM1-His₆ приводила к частичному снижению эффективности трансфекции клеток MCF-7 этой РНК (Рис. 17 Б).

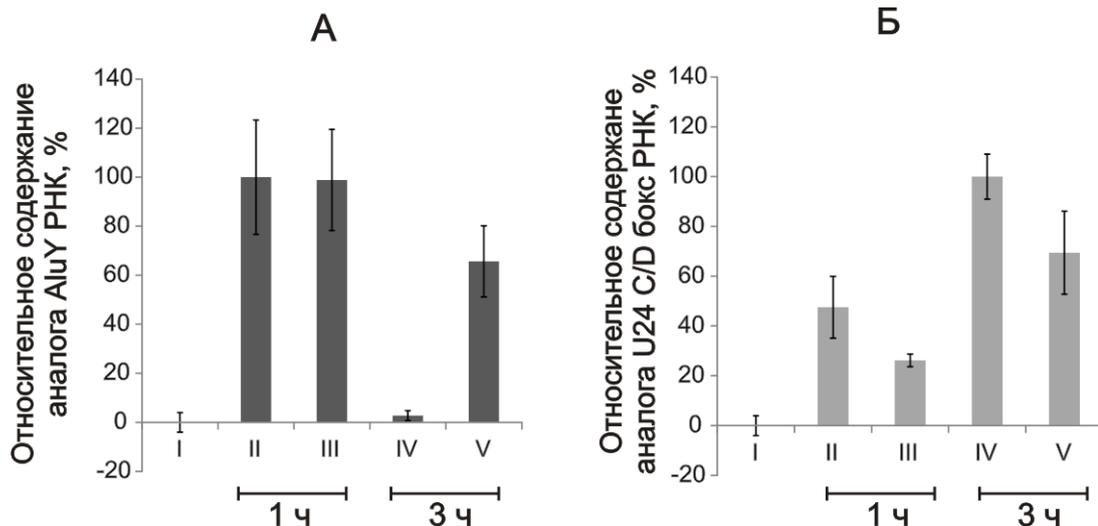


Рис. 17. Влияние NPM1-His₆ на эффективность накопления аналогов AluY-РНК (А) и C/D бокс РНК (Б) в клетках MCF-7. Клетки инкубировали в среде, содержащей: 3,5 нМ AluY РНК (А, II - V) и 20,8 нМ C/D бокс РНК (Б, II - V); (А, Б) РНК в комплексе с NPM1-His₆ (III, V) или без белка (II, IV). Контрольные клетки MCF-7 инкубировали в среде без

РНК (I) (А, Б). Суммарную РНК клеток анализировали ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к синтетическим аналогам, в качестве нормировочной РНК использовали мРНК HPRT. За 100% принято максимальное значение относительного содержания аналогов AluY-РНК или C/D бокс РНК в клетках.

Полученные данные о влиянии NPM1-His₆ на захват и интернализацию РНК клетками человека согласуются с данными об образовании NPM1-His₆ более прочных нековалентных комплексов с AluY РНК, обладающими сложной вторичной структурой (Рис. 16), в сравнении с C/D бокс РНК.

Следует отметить, что на Рис. 17 приведены значения относительного содержания синтетических РНК в клетках MCF-7, отражающие эффективность трансфекции синтетических РНК и их комплексов с NPM1-His₆ в клетки человека. Абсолютное количество синтетического аналога C/D бокс РНК, захваченного клетками, приблизительно в 15 раз превышало количество захваченного аналога AluY РНК. Эти данные позволяют предположить, что при увеличении длины и повышении уровня организации вторичной структуры РНК эффективность ее проникновения в клетки снижается.

В совокупности наши данные позволяют заключить, что нуклеофозмин 1, не образуя прочных комплексов с одноцепочечными слабоструктурированными РНК ($n \leq 80$ н.), не оказывает существенного влияния на эффективность интернализации таких РНК клетками человека. Взаимодействие нуклеофозмина 1 с протяженными (300 н.) РНК с развитой вторичной структурой существенно повышает эффективность трансфекции таких РНК в клетки человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внеклеточные РНК-содержащие комплексы биологических жидкостей человека являются одним из самых востребованных объектов современных исследований. Однако до сих пор нет комплексного описания базовых процессов, лежащих в основе их формирования, секреции, транспорта и интернализации клетками-реципиентами. Отсутствие исчерпывающей информации об экзосомах, микровезикулах и рибонуклеопротеинах крови не позволяет в полной мере использовать потенциал внеклеточных комплексов для создания новых средств диагностики и терапии заболеваний человека. Одним из основных подходов к установлению механизмов, лежащих в основе биогенеза и функционирования внеклеточных РНК-комплексов биологических жидкостей человека является анализ состава их РНК и его динамики. В данной работе было проведено сравнение состава РНК фракций крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), обогащенных внеклеточными комплексами.

С использованием метода последовательного центрифугирования было получено пять фракций крови, содержащих: форменные элементы, плазму крови, частицы плазмы крови, осаждаемые при усилиях 16 000 g и 160 000 g, а также обедненный везикулами супернатант плазмы (160 000 g).

Методами динамического светорассеяния, просвечивающей электронной микроскопии и проточной цитометрии было установлено, что осадки плазмы, получаемые при усилиях 16 000 g и 160 000 g, содержат циркулирующие мембранные частицы - экзосомы и микровезикулы. При этом в осадке плазмы (16 000 g) были выявлены не связанные с клетками митохондрии. Показано, что частицы осадков плазмы (16 000 g и 160 000 g) обогащены индикаторными маркерами тромбоцитов/мегакариоцитов, Т-клеток и экзосом - CD41a, CD3 и CD63, соответственно.

С помощью высокопроизводительного секвенирования по технологии SOLiD была проведена идентификация, классификация и оценка содержания фрагментов клеточных РНК во фракциях крови. Сравнительный анализ состава РНК анализируемых фракций крови показал, что осадки плазмы (160 000 g), выделенные из цельной крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, обогащены фрагментами малых ядерных РНК – U1, U5 и U6, а также фрагментами специфического набора мРНК и микроРНК. Вместе с тем, в наборе фрагментов РНК, идентифицированном для осадков плазмы крови (160 000 g), было отмечено значительное снижение вклада малых ядрышковых РНК.

Ранее для микроРНК микровезикул, экзосом и рибонуклеопротеиновых комплексов было показано их регуляторное влияние на экспрессию генов клеточ-

реципиентов. Наши результаты в совокупности с данными литературы позволяют предположить, что фрагменты мяРНК, мяоРНК, а также их полноразмерные формы, которые присутствуют в мембранных частицах плазмы крови, являются внеклеточными регуляторными РНК, участвующими в процессах межклеточной коммуникации вместе с микроРНК.

Кроме того, в данной работе был проведен поиск и анализ распределения длинных некодирующих кольцевых РНК. Было показано, что полноразмерные кольцевые РНК присутствуют в крови человека не только в форменных элементах, но и в составе микровезикул и экзосом плазмы. При этом установлено, что относительное содержание ряда кольцевых РНК в форменных элементах и в микровезикулах/экзосомах крови превышает содержание их линейных мРНК-гомологов. Эти данные подтверждают предположение о том, что кольцевые РНК являются конкурентными эндогенными РНК и являются одними из медиаторов межклеточного взаимодействия, опосредованного внеклеточными везикулами.

Выявленное нами обогащение мембранных комплексов плазмы крови малыми ядерными и кольцевыми РНК позволяет предположить, что микровезикулы и экзосомы являются основной формой межклеточного транспорта таких РНК.

Аналоги внеклеточных циркулирующих комплексов активно используют для разработки новых подходов для таргетной доставки терапевтических средств. В данной работе было изучено влияние РНК/ДНК связывающего белка нуклеофозмин 1 на эффективность проникновения синтетических аналогов циркулирующих РНК крови в клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Было установлено, что нуклеофозмин 1 человека предпочтительно связывает РНК с развитой вторичной структурой и повышает эффективность проникновения таких РНК в клетки человека.

Таким образом, полученные результаты являются основанием для детализации молекулярных механизмов формирования внеклеточных комплексов, связанных с биогенезом мяРНК, мяоРНК и кцРНК, а также расширяют представление о внеклеточных маркерах рака легкого, циркулирующих в крови онкопациентов.

Кроме того, данные о влиянии рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1 на проникновение синтетических аналогов РНК в клетки человека, могут быть использованы при разработке новых средств доставки терапевтических РНК-конструкций.

ВЫВОДЫ

1. Из крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) получены препараты форменных элементов, плазмы крови, частиц плазмы, осаждаемых при усилиях 16 000 g и 160 000 g, а также плазмы, обедненной частицами (супернатант 160 000 g). Установлено, что осадки плазмы, полученные при 16 000 g и 160 000 g, содержат частицы, несущие маркеры CD41a, CD3 и CD63, и обогащены везикулами крови диаметром 40-100 нм.

2. Установлено, что РНК исследуемых фракций крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ содержат фрагменты клеточных РНК: мтРНК, рРНК, тРНК, мРНК, микроРНК, мяРНК, мяоРНК, мцРНК и днРНК. Установлено, что фракции крови существенно различаются содержанием фрагментов малых ядрышковых РНК и малых ядерных РНК, а именно:

- вклад фрагментов малых ядерных РНК U1, U5A/B и U6 в общий набор РНК частиц плазмы крови, осаждаемых при 160 000 g, в 6-15 раз выше по сравнению с цельной плазмой и осадком частиц плазмы (16 000 g);

- частицы плазмы, осаждаемые при 16 000 g и 160 000 g, обеднены фрагментами малых ядрышковых РНК.

3. Сравнение наборов РНК фракций плазмы крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого и здоровых доноров выявило отличия в представленности микроРНК, фрагментов мРНК и малых ядрышковых РНК:

- образцы плазмы и частиц плазмы, осаждаемых при 16 000 g, из крови пациентов с плоскоклеточным раком легкого содержат повышенное количество микроРНК и мРНК;

- наборы РНК плазмы крови и супернатанта плазмы крови (160 000 g) пациентов с аденокарциномой легкого обеднены фрагментами малых ядрышковых РНК.

4. В массивах данных высокопроизводительного секвенирования РНК исследуемых фракций крови идентифицировано 88 кольцевых транскриптов, 8 из которых являются новыми, не аннотированными ранее, формами кольцевых РНК человека. Установлено, что полноразмерные кольцевые РНК присутствуют не только в форменных элементах, но и во фракциях плазмы крови, обогащенных мембранными частицами.

5. Показано, что стабильность комплекса рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1 (NPM1-His₆) с РНК убывает в ряду: протяженные структурированные РНК (n > 300 н., для аналогов AluY РНК) > однопочечные РНК (n ~ 80 н.) > короткие олигорибонуклеотиды (n ~ 22 н. для rON1). Установлено, что преинкубация синтетической AluY РНК с NPM1-His₆ повышает эффективность проникновения AluY РНК в клетки человека MCF-7 ~ в 25 раз ($p_{St} < 0,01$).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Савельева, А. В., Семенов, Д. В., Кулигина, Е. В., Рабинов, И. В., Степанов, Г. А., Коваль, О. А., Рихтер, В. А. Влияние рекомбинантного аналога белка человека нуклеофозмин 1 на проникновение синтетических РНК в клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 // «Биоорганическая химия». - 2014. - Т. 40. - № 1. - С. 55–63.
2. Savelyeva, A. V., Baryakin, D. N., Chikova, E. D., Kuligina, E. V., Richter, V. A., Semenov, D. V. Vesicular and Extra-Vesicular RNAs of Human Blood Plasma // Adv. Exp. Med. Biol. 2016. V. 924. P. 117-119.
3. Савельева, А. В., Барякин, Д. Н., Морозов, В. В., Кулигина, Е. В., Рихтер, В. А., Семенов, Д. В. Кольцевые РНК форменных элементов, плазмы и субфракций плазмы крови человека // «Биоорганическая химия». - 2017. – Т. 43. - № 2. – С. 133-145.
4. Savelyeva, A. V., Kuligina, E. V., Bariakin, D. N., Kozlov, V. V., Ryabchikova E. I., Richter, V. A., Semenov, D. V. Variety of RNAs in Peripheral Blood Cells, Plasma, and Plasma Fractions // BioMedResearch International. - 2017. – V. 2017. – doi: 10.1155/2017/7404912

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions // *Journal of extracellular vesicles*. – 2015. – V. 4.
2. Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., Tait, J.F. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – V. 108. – N. 12. – P. 5003-5008.
3. Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., Remaley, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins // *Nature cell biology*. – 2011. – V. 13. – N. 4. – P. 423-433.
4. Semenov, D. V., Baryakin, D. N., Brenner, E. V., Kurilshikov, A. M., Vasiliev, G. V., Bryzgalov, L. A., Chikova, E. D., Filippova, J. A., Kuligina, E. V., Richter, V. A. Unbiased approach to profile the variety of small non-coding RNA of human blood plasma with massively parallel sequencing technology // *Expert opinion on biological therapy*. – 2012. – V. 12. – N. sup1. – P. S43-S51.
5. Nolte-'t Hoen, E. N. M., Buermans, H. P. J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H. M., Hoen, P. A. C. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions // *Nucleic acids research*. – 2012. – V.40. – P. 9272–9285.
6. Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., Galas, D. J. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells // *Nucleic acids research*. – 2010. – doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkq601>.
7. Saladin, K. S. *Anatomy and physiology*. – McGraw-Hill Education; 7 edition, 2014.- 1248 P.
8. Pappano, A. J., Wier, W. G. *Cardiovascular physiology: mosby physiology monograph series*. – Elsevier Health Sciences, 2012. – 304 P.
9. Caby, M. P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., Bonnerot, C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma // *International immunology*. – 2005. – V. 17. – N. 7. – P. 879-887.
10. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer // *Journal of Clinical Investigation*. – 2016. – V. 126. – N. 4. – P. 1208-1215.

11. Turpin, D., Truchetet, M.E., Faustin, B., Augusto, J.F., Contin-Bordes, C., Brisson, A., Blanco, P., Duffau, P. Role of extracellular vesicles in autoimmune diseases // *Autoimmunity reviews*. – 2016. – V. 15. – N. 2. – P. 174-183.
12. Mitchell, M.D., Peiris, H.N., Kobayashi, M., Koh, Y.Q., Duncombe, G., Illanes, S.E., Rice, G.E., Salomon, C. Placental exosomes in normal and complicated pregnancy // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2015. – V. 213. – N. 4. – P. S173-S181.
13. Aleman, M. M., Gardiner, C., Harrison, P., Wolberg, A. S. Differential contributions of monocyte-and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2011. – V. 9. – N. 11. – P. 2251-2261.
14. Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., Geuze, H. J. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles // *The Journal of experimental medicine*. – 1996. – V. 183. – N. 3. – P. 1161-1172.
15. McDonald, M.K., Tian, Y., Qureshi, R.A., Gormley, M., Ertel, A., Gao, R., Lopez, E.A., Alexander, G.M., Sacan, A., Fortina, P., Ajit, S.K. Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain // *PAIN*. – 2014. – V. 155. – N. 8. – P. 1527-1539.
16. Kahlert C., Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis // *Journal of molecular medicine*. – 2013. – V. 91. – N. 4. – P. 431-437.
17. Grigorov, B., Arcanger, F., Roingeard, P., Darlix, J. L., Muriaux, D. Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines // *Journal of molecular biology*. – 2006. – V. 359. – N. 4. – P. 848-862.
18. Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma // *British journal of haematology*. – 1967. – V. 13. – N. 3. – P. 269-288.
19. Gould, S. J., Raposo, G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles // *Journal of extracellular vesicles*. – 2013. – V. 2. – doi: 10.3402/jev.v2i0.20389.
20. Anderson, H. C. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage // *The Journal of cell biology*. – 1969. – V. 41. – N. 1. – P. 59-72.
21. Karlsson, M., Lundin, S., Dahlgren, U., Kahu, H., Pettersson, I., Telemo, E. "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells // *European journal of immunology*. – 2001. – V. 31. – N. 10. – P. 2892-2900.
22. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr L., Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) // *Journal of Biological Chemistry*. – 1987. – V. 262. – N. 19. – P. 9412-9420.

23. Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., Geuze, H.J. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles // *The Journal of experimental medicine*. – 1996. – V. 183. – N. 3. – P. 1161-1172.
24. Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, J. N., Heine, U. Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 1981. – V. 645. – N. 1. – P. 63-70.
25. Booth, A. M., Fang, Y., Fallon, J. K., Yang, J. M., Hildreth, J. E., Gould, S. J. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane // *The Journal of cell biology*. – 2006. – V. 172. – N. 6. – P. 923-935.
26. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids // *Current protocols in cell biology*. – 2006. – P. 3.22.1-3.22.29.
27. Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., Tollervey, D. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→ 5' exoribonucleases // *Cell*. – 1997. – V. 91. – N. 4. – P. 457-466.
28. Simons, M., Raposo, G. Exosomes–vesicular carriers for intercellular communication // *Current opinion in cell biology*. – 2009. – V. 21. – N. 4. – P. 575-581.
29. Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses // *Nature Reviews Immunology*. – 2009. – V. 9. – N. 8. – P. 581-593.
30. Bess, J. W., Gorelick, R. J., Bosche, W. J., Henderson, L. E., Arthur, L. O. Microvesicles are a source of contaminating cellular proteins found in purified HIV-1 preparations // *Virology*. – 1997. – V. 230. – N. 1. – P. 134-144.
31. Cocucci, E., Racchetti, G., Meldolesi, J. Shedding microvesicles: artefacts no more // *Trends in cell biology*. – 2009. – V. 19. – N. 2. – P. 43-51.
32. Hess, C., Sadallah, S., Hefti, A., Landmann, R., Schifferli, J.A. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units // *The Journal of Immunology*. – 1999. – V. 163. – N. 8. – P. 4564-4573.
33. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death // *Toxicologic pathology*. – 2007. – V. 35. – N. 4. – P. 495-516.
34. Simpson, R. J., Mathivanan, S. Extracellular microvesicles: the need for internationally recognised nomenclature and stringent purification criteria // *Journal of Proteomics and Bioinformatics*. – 2012. – V. 2012. – doi: 10.4172/jpb.10000e10.
35. Huotari, J., Helenius, A. Endosome maturation // *The EMBO journal*. – 2011. – V. 30. – N. 17. – P. 3481-3500.

36. Piper, R. C., Katzmann, D. J. Biogenesis and function of multivesicular bodies // *Annual review of cell and developmental biology*. – 2007. – V. 23. – P. 519-547.
37. Scott, C. C., Vacca, F., Gruenberg J. Endosome maturation, transport and functions // *Seminars in cell and developmental biology*. – Academic Press, 2014. – V. 31. – P. 2-10.
38. Pols, M. S., Klumperman, J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63 // *Experimental cell research*. – 2009. – V. 315. – N. 9. – P. 1584-1592.
39. Kobayashi, T., Gu, F., Gruenberg, J. Lipids, lipid domains and lipid–protein interactions in endocytic membrane traffic // *Seminars in cell & developmental biology*. – Academic Press, 1998. – V. 9. – N. 5. – P. 517-526.
40. Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., Record, M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies // *Biochimie*. – 2007. – V. 89. – N. 2. – P. 205-212.
41. Wollert, T., Hurley, J. H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes // *Nature*. – 2010. – V. 464. – N. 7290. – P. 864-869.
42. Hurley, J. H., Hanson, P. I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2010. – V. 11. – N. 8. – P. 556-566.
43. Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T., Emr, S.D. ESCRT-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting // *Developmental cell*. – 2002. – V. 3. – N. 2. – P. 271-282.
44. Ren, X., Hurley, J. H. VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo // *The EMBO journal*. – 2010. – V. 29. – N. 6. – P. 1045-1054
45. Mayers, J. R., Fyfe, I., Schuh, A. L., Chapman, E. R., Edwardson, J. M., Audhya, A. ESCRT-0 assembles as a heterotetrameric complex on membranes and binds multiple ubiquitinated cargoes simultaneously // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – V. 286. – N. 11. – P. 9636-9645.
46. Babst M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between // *Current opinion in cell biology*. – 2011. – V. 23. – N. 4. – P. 452-457.
47. McCullough, J., Fisher, R. D., Whitby, F. G., Sundquist, W. I., Hill, C. P. ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – V. 105. – N. 22. – P. 7687-7691.
48. Odorizzi, G. The multiple personalities of Alix // *Journal of cell science*. – 2006. – V. 119. – N. 15. – P. 3025-3032.
49. Mathivanan, S., Simpson, R. J. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA // *Proteomics*. – 2009. – V. 9. – N. 21. – P. 4997-5000.

50. Jansen, F. H., Krijgsveld, J., van Rijswijk, A., van den Bemd, G. J., van den Berg, M. S., van Weerden, W. M., Willemsen, R., Dekker, L. J., Luider, T. M., Jenster, G. Exosomal secretion of cytoplasmic prostate cancer xenograft-derived proteins // *Molecular and Cellular Proteomics*. – 2009. – V. 8. – N. 6. – P. 1192-1205.
51. Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., Ochiya, T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – V. 285. – N. 23. – P. 17442-17452.
52. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., Simons, M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes // *Science*. – 2008. – V. 319. – N. 5867. – P. 1244-1247.
53. Gulbins, E., Kolesnick, R. Raft ceramide in molecular medicine // *Oncogene*. – 2003. – V. 22. – N. 45. – P. 7070-7077.
54. Guo, B. B., Bellingham, S. A., Hill, A. F. The neutral sphingomyelinase pathway regulates packaging of the prion protein into exosomes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – V. 290. – N. 6. – P. 3455-3467.
55. Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K. S., de Moerloose, P., Parton, R. G., Gruenberg, J. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function // *Nature*. – 1998. – V. 392. – N. 6672. – P. 193-197.
56. Kobayashi, T., Beuchat, M. H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R. D., Sakuraba, H., Parton, R. G., Gruenberg, J. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport // *Nature cell biology*. – 1999. – V. 1. – N. 2. – P. 113-118.
57. Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Fauré, J., Blanc, N. S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R. and Parton, R. G. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization // *Science*. – 2004. – V. 303. – N. 5657. – P. 531-534.
58. Mizrak, A., Bolukbasi, M.F., Ozdener, G.B., Brenner, G.J., Madlener, S., Erkan, E.P., Ströbel, T., Breakefield, X.O., Saydam, O. Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth // *Molecular Therapy*. – 2013. – V. 21. – N. 1. – P. 101-108.
59. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., Lötvall, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // *Nature cell biology*. – 2007. – V. 9. – N. 6. – P. 654-659.
60. Buschow, S. I., Liefhebber, J. M., Wubbolts, R., Stoorvogel, W. Exosomes contain ubiquitinated proteins // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. – 2005. – V. 35. – N. 3. – P. 398-403.

61. Henne, W. M., Buchkovich, N. J., Emr, S. D. The ESCRT pathway // *Developmental cell*. – 2011. – V. 21. – N. 1. – P. 77-91.
62. Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., Geuze, H. J. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – V. 273. – N. 32. – P. 20121-20127.
63. Perez-Hernandez, D., Gutiérrez-Vázquez, C., Jorge, I., López-Martín, S., Ursa, A., Sánchez-Madrid, F., Vázquez, J., Yáñez-Mó, M. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – V. 288. – N. 17. – P. 11649-11661.
64. de Gassart, A., Géminard, C., Février, B., Raposo, G., Vidal, M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes // *Blood*. – 2003. – V. 102. – N. 13. – P. 4336-4344.
65. Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes // *Nature cell biology*. – 2012. – V. 14. – N. 7. – P. 677-685.
66. Hurley J. H., Odorizzi G. Get on the exosome bus with ALIX // *Nature cell biology*. – 2012. – V. 14. – N. 7. – P. 654-655.
67. Roucourt, B., Meeussen, S., Bao, J., Zimmermann, P., David, G. Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway // *Cell research*. – 2015. – V. 25. – N. 4. – P. 412-428.
68. Batagov, A. O., Kurochkin, I. V. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions // *Biology direct*. – 2013. – V. 8. – N. 1. – P. 1.
69. Manterola, L., Guruceaga, E., Pérez-Larraya, J. G., González-Huarriz, M., Jauregui, P., Tejada, S., Diez-Valle, R., Segura, V., Samprón, N., Barrena, C., Ruiz, I. A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool // *Neuro-oncology*. – 2014. – doi: 10.1093/neuonc/not218.
70. Vojtech, L., Woo, S., Hughes, S., Levy, C., Ballweber, L., Sauteraud, R. P., Strobl, J., Westerberg, K., Gottardo, R., Tewari, M., Hladik, F. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions // *Nucleic acids research*. – 2014. – doi: 10.1093/nar/gku347.
71. Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A., Vlassov, A. V. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as

biomarkers // *Philosophical Transactions of the Royal Society B* – 2014. – V. 369. – N. 1652. – doi: 0.1098/rstb.2013.0502.

72. Guduric-Fuchs, J., O'Connor, A., Camp, B., O'Neill, C. L., Medina, R. J., Simpson, D. A. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types // *BMC genomics*. – 2012. – V. 13. – N. 1. – doi: 10.1186/1471-2164-13-357.

73. Villarroja-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D. J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., Sánchez-Madrid, F. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs // *Nature communications*. – 2013. – V. 4. – doi: 10.1038/ncomms3980.

74. Munro, T. P., Magee, R. J., Kidd, G. J., Carson, J. H., Barbarese, E., Smith, L. M., Smith, R. Mutational analysis of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 response element for RNA trafficking // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274. – N. 48. – P. 34389-34395.

75. Bolukbasi, M.F., Mizrak, A., Ozdener, G.B., Madlener, S., Ströbel, T., Erkan, E.P., Fan, J.B., Breakefield, X.O., Saydam, O. miR-1289 and “Zipcode”-like sequence enrich mRNAs in microvesicles // *Molecular Therapy—Nucleic Acids*. – 2012. – V. 1. – N. 2. – doi: 10.1038/mtna.2011.2.

76. Bang, C., Batkai, S., Dangwal, S., Gupta, S.K., Foinquinos, A., Holzmann, A., Just, A., Remke, J., Zimmer, K., Zeug, A., Ponimaskin, E. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy // *The Journal of clinical investigation*. – 2014. – V. 124. – N. 5. – P. 2136-2146.

77. Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., Shiekhattar, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing // *Cell*. – 2005. – V. 123. – N. 4. – P. 631-640.

78. Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., & Mi, S. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function // *Genomics, proteomics & bioinformatics*. – 2015. – V. 13. – N. 1. – P. 17-24.

79. Squadrito, M.L., Baer, C., Burdet, F., Maderna, C., Gilfillan, G.D., Lyle, R., Ibberson, M., De Palma, M. Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells // *Cell reports*. – 2014. – V. 8. – N. 5. – P. 1432-1446.

80. Khvorova, A., Kwak, Y. G., Tamkun, M., Majerfeld, I., Yarus, M. RNAs that bind and change the permeability of phospholipid membranes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – V. 96. – N. 19. – P. 10649-10654.

81. Vlassov, A., Khvorova, A., Yarus, M. Binding and disruption of phospholipid bilayers by supramolecular RNA complexes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – V. 98. – N. 14. – P. 7706-7711.
82. Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T., Colombo, M. I. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner // *Traffic*. – 2005. – V. 6. – N. 2. – P. 131-143.
83. Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S. I., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M. A., Bakhti, M., Grønborg, M., Möbius, W., Rhee, J., Barr, F.A Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C // *The Journal of cell biology*. – 2010. – V. 189. – N. 2. – P. 223-232.
84. Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway // *Nature cell biology*. – 2010. – V. 12. – N. 1. – P. 19-30.
85. Dong, W., Cui, J. T., Yang, J., Li, W. M., Lu, Y. Y., Xiao, W. Decreased Expression of Rab27A and Rab27B Correlates with Metastasis and Poor Prognosis in Colorectal Cancer // *Discovery medicine*. – 2015. – V. 20. – N. 112. – P. 357-367.
86. Jaiswal J. K., Andrews N. W., Simon S. M. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells // *The Journal of cell biology*. – 2002. – V. 159. – N. 4. – P. 625-635.
87. Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., Jahn, R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 1998. – V. 95. – N. 26. – P. 15781-15786.
88. Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., Théry, C Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses // *Traffic*. – 2011. – V. 12. – N. 12. – P. 1659-1668.
89. Fader, C. M., Sánchez, D. G., Mestre, M. B., Colombo, M. I. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. – 2009. – V. 1793. – N. 12. – P. 1901-1916.
90. Proux-Gillardeaux, V., Raposo, G., Irinopoulou, T., Galli, T. Expression of the Longin domain of TI-VAMP impairs lysosomal secretion and epithelial cell migration // *Biology of the Cell*. – 2007. – V. 99. – N. 5. – P. 261-271.
91. Kowal, J., Tkach, M., They, C. Biogenesis and secretion of exosomes // *Current opinion in cell biology*. – 2014. – V. 29. – P. 116-125.

92. Willms, E., Johansson, H. J., Mäger, I., Lee, Y., Blomberg, K.E.M., Sadik, M., Alaarg, A., Smith, C.E., Lehtiö, J., Andaloussi, S. E., Wood, M. J. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties // *Scientific reports*. - 2016. – V. 6. – doi: 10.1038/srep2251.
93. Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P. and Costa, J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells // *BMC cancer*. – 2011. – V. 11. – N. 1. – doi: 10.1186/1471-2407-11-108.
94. Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U. K., Simons, M. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis // *Journal of Cell Science*. – 2011. – V. 124. – N. 3. – P. 447-458.
95. Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L., Stolz, D. B., Papworth, G. D., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells // *Blood*. – 2004. – V. 104. – N. 10. – P. 3257-3266.
96. Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Stolz, D. B., Sullivan, M. L., Karlsson, J. M., Baty, C. J., Gibson, G. A., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes // *Blood*. – 2012. – V. 119. – N. 3. – P. 756-766.
97. Wang, L. H., Rothberg, K. G., Anderson, R. G. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation // *The Journal of cell biology*. – 1993. – V. 123. – N. 5. – P. 1107-1117.
98. Comisso, C., Davidson, S. M., Soydaner-Azeloglu, R. G., Parker, S. J., Kamphorst, J. J., Hackett, S., Grabocka, E., Nofal, M., Drebin, J. A., Thompson, C. B., Rabinowitz, J. D. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells // *Nature*. – 2013. – V. 497. – N. 7451. – P. 633-637.
99. De Fife, K. M., Jenney, C. R., Colton, E., Anderson, J. M. Disruption of filamentous actin inhibits human macrophage fusion // *The FASEB journal*. – 1999. – V. 13. – N. 8. – P. 823-832.
100. Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z., Xiao, Z. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy // *Journal of cellular biochemistry*. – 2010. – V. 111. – N. 2. – P. 488-496.
101. Rodal, S. K., Skretting, G., Garred, Ø., Vilhardt, F., Van Deurs, B., Sandvig, K. Extraction of cholesterol with methyl- β -cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles // *Molecular biology of the cell*. – 1999. – V. 10. – N. 4. – P. 961-974.

102. Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P., Costa, J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells // *BMC cancer*. – 2011. – V. 11. – N. 1. – P. 1.
103. Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – V. 284. – N. 49. – P. 34211-34222.
104. Tomasoni, S., Longaretti, L., Rota, C., Morigi, M., Conti, S., Gotti, E., Capelli, C., Introna, M., Remuzzi, G., Benigni, A., Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells // *Stem cells and development*. – 2012. – V. 22. – N. 5. – P. 772-780.
105. Stoorvogel, W. Functional transfer of microRNA by exosomes // *Blood*. – 2012. – V. 119. – N. 3. – P. 646-648.
106. Tricarico, C., Clancy, J., D'Souza-Schorey, C. Biology and biogenesis of shed microvesicles // *Small GTPases*. – 2016. – doi: 10.1080/21541248.2016.1215283.
107. Dreyer, F., Baur, A. Biogenesis and functions of exosomes and extracellular vesicles // *Lentiviral Vectors and Exosomes as Gene and Protein Delivery Tools*. – 2016. – P. 201-216.
108. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A., D'Souza-Schorey, C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression // *Journal of Cell Science* – 2010. – V. 123. – N. 10. – P. 1603-1611.
109. Abels, E. R., Breakefield, X. O. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake // *Cellular and molecular neurobiology*. – 2016. – V. 36. – N. 3. – P. 301-312.
110. Zwaal, R. F. A., Schroit, A. J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells // *Blood*. – 1997. – V. 89. – N. 4. – P. 1121-1132.
111. Hugel, B., Martínez, M. C., Kunzelmann, C., Freyssinet, J. M. Membrane microparticles: two sides of the coin // *Physiology*. – 2005. – V. 20. – N. 1. – P. 22-27.
112. Pilzer, D., Gasser, O., Moskovich, O., Schifferli, J. A., Fishelson, Z. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer // *Springer seminars in immunopathology*. – Springer-Verlag, 2005. – V. 27. – N. 3. – P. 375-387.
113. Antonucci, F., Turola, E., Riganti, L., Caleo, M., Gabrielli, M., Perrotta, C., Novellino, L., Clementi, E., Giussani, P., Viani, P. and Matteoli, M. Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism // *The EMBO journal*. – 2012. – V. 31. – N. 5. – P. 1231-1240.
114. Bianco, F., Perrotta, C., Novellino, L., Francolini, M., Riganti, L., Menna, E., Saglietti, L., Schuchman, E.H., Furlan, R., Clementi, E., Matteoli, M. Acid sphingomyelinase

activity triggers microparticle release from glial cells // *The EMBO journal*. – 2009. – V. 28. – N. 8. – P. 1043-1054.

115. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., D'Souza-Schorey, C. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles // *Current Biology*. – 2009. – V. 19. – N. 22. – P. 1875-1885.

116. McConnell, R. E., Higginbotham, J. N., Shifrin, D. A., Tabb, D. L., Coffey, R. J., Tyska, M. J. The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle // *The Journal of cell biology*. – 2009. – V. 185. – N. 7. – P. 1285-1298.

117. Nabhan, J. F., Hu, R., Oh, R. S., Cohen, S. N., Lu, Q. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – V. 109. – N. 11. P. 4146-4151.

118. Babst, M. A protein's final ESCRT // *Traffic*. – 2005. – V. 6. – N. 1. – P. 2-9.

119. Scott, A., Chung, H. Y., Gonciarz-Swiatek, M., Hill, G. C., Whitby, F. G., Gaspar, J., Holton, J. M., Viswanathan, R., Ghaffarian, S., Hill, C. P. Sundquist, W. I. Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins // *The EMBO journal*. – 2005. – V. 24. – N. 20. – P. 3658-3669.

120. Pluskota, E., Woody, N. M., Szpak, D., Ballantyne, C. M., Soloviev, D. A., Simon, D. I., Plow, E. F. Expression, activation, and function of integrin $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles // *Blood*. – 2008. – V. 112. – N. 6. – P. 2327-2335.

121. Heijnen H. F. G. et al. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules // *Blood*. – 1999. – V. 94. – N. 11. – P. 3791-3799.

122. Dolo, V., Ginestra, A., Cassarà, D., Violini, S., Lucania, G., Torrisi, M.R., Nagase, H., Canevari, S., Pavan, A., Vittorelli, M.L. Selective localization of matrix metalloproteinase 9, β_1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells // *Cancer research*. – 1998. – V. 58. – N. 19. – P. 4468-4474.

123. Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., Chen, C. C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies // *Journal of neuro-oncology*. – 2013. – V. 113. – N. 1. – P. 1-11.

124. Ihara, T., Yamamoto, T., Sugamata, M., Okumura, H., Ueno, Y. The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body // *Virchows Archiv*. – 1998. – V. 433. – N. 5. – P. 443-447.

125. Erwig, L. P., Henson, P. M. Clearance of apoptotic cells by phagocytes // *Cell Death and Differentiation*. – 2008. – V. 15. – N. 2. – P. 243-250.

126. Rubartelli, A., Poggi, A., Zocchi, M. R. The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the $\alpha\beta 3$ integrin and requires intracellular and extracellular calcium // *European journal of immunology*. – 1997. – V. 27. – N. 8. – P. 1893-1900.

127. Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavölgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I., Falk, K. I. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies // *Blood*. – 1999. – V. 93. – N. 11. – P. 3956-3963.

128. Hristov, M., Erl, W., Linder, S., and Weber, P.C. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro // *Blood*. – 2004. – V. 104. – N. 9. – P. 2761-2766.

129. Bergsmedh, A., Szeles, A., Henriksson, M., Bratt, A., Folkman, M. J., Spetz, A. L., Holmgren, L. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – V. 98. – N. 11. – P. 6407-6411.

130. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., Burwinkel, B. Characterization of extracellular circulating microRNA // *Nucleic acids research*. – 2011. – doi: 10.1093/nar/gkr254.

131. Turchinovich, A., Tonevitsky, A. G., Burwinkel, B. Extracellular miRNA: A collision of two paradigms // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2016. – V. 41. – N. 10. – P. 883-892.

132. Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C. Y Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication // *Trends in cell biology*. – 2012. – V. 22. – N. 3. – P. 125-132.

133. Williams, Z., Ben-Dov, I. Z., Elias, R., Mihailovic, A., Brown, M., Rosenwaks, Z., Tuschl, T. Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – V. 110. – N. 11. – P. 4255-4260.

134. Aucher, A., Rudnicka, D., Davis, D. M. MicroRNAs transfer from human macrophages to hepato-carcinoma cells and inhibit proliferation // *The Journal of Immunology*. – 2013. – V. 191. – N. 12. – P. 6250-6260.

135. Lim, P. K., Bliss, S. A., Patel, S. A., Taborga, M., Dave, M. A., Gregory, L. A., Greco, S. J., Bryan, M., Patel, P. S., Rameshwar, P. Gap junction-mediated import of MicroRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells // *Cancer research*. – 2011. – V. 71. – N. 5. – P. 1550-1560.

136. Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G. J., Zanesi, N. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce

prometastatic inflammatory response // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – V. 109. – N. 31. – P. E2110-E2116.

137. Lehmann, S. M., Krüger, C., Park, B., Derkow, K., Rosenberger, K., Baumgart, J., Trimbuch, T., Eom, G., Hinz, M., Kaul, D., Habel, P., An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration // *Nature neuroscience*. – 2012. – V. 15. – N. 6. – P. 827-835.

138. Shih, J. D., Hunter, C. P. SID-1 is a dsRNA-selective dsRNA-gated channel // *RNA*. – 2011. – V. 17. – N. 6. – P. 1057-1065.

139. Semenov, D. V., Baryakin, D. N., Brenner, E. V., Kurilshikov, A. M., Vasiliev, G. V., Bryzgalov, L. A., Chikova, E. D., Filippova, J. A., Kuligina, E. V., Richter, V. A. Unbiased approach to profile the variety of small non-coding RNA of human blood plasma with massively parallel sequencing technology // *Expert opinion on biological therapy*. – 2012. – V. 12. – N. sup1. – P. S43-S51.

140. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease // *Nature Reviews Genetics*. – 2011. – V. 12. – N. 12. – P. 861-874.

141. Макарова, Ю. А., Крамеров, Д. А. Некодирующие РНК (обзор) // *Биохимия*. – 2007. – V. 72. – N 11. – P. 1427-1448.

142. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell*. – 2004. – V. 116. – N. 2. – P. 281-297.

143. Lee, Y., Han, J., Yeom, K. H., Jin, H., Kim, V. N. Drosha in primary microRNA processing // *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006. – V. 71. – P. 51-57.

144. Ruby J. G., Jan C. H., Bartel D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing // *Nature*. – 2007. – V. 448. – N. 7149. – P. 83-86.

145. Li, L., Zhu, D., Huang, L., Zhang, J., Bian, Z., Chen, X., Liu, Y., Zhang, C.Y., Zen, K. Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles // *PloS one*. – 2012. – V. 7. – N. 10. – doi: 10.1371/journal.pone.0046957

146. Umezu, T., Ohyashiki, K., Kuroda, M., Ohyashiki, J. H. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs // *Oncogene* – 2013. – V. 32. – N. 22. – P. 2747-55.

147. Ohshima, K., Inoue, K., Fujiwara, A., Hatakeyama, K., Kanto, K., Watanabe, Y., Muramatsu, K., Fukuda, Y., Ogura, S., Yamaguchi, K., Mochizuki, T. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line // *PLoS ONE* – 2010. – V. 5. – doi: 10.1371/journal.pone.0013247.

148. Fritz, J. V., Heintz-Buschart, A., Ghosal, A., Wampach, L., Etheridge, A., Galas, D., Wilmes, P. Sources and functions of extracellular small RNAs in human circulation // *Annual review of nutrition*. – 2016. – V. 36. – P. 301-336.
149. Valadkhan, S. snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2005. – V. 9. – P. 603-608.
150. Matera, G. A., Terns, R. M., Terns, M. P. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs // *Molecular Cell Biology*. – 2007. – V. 8. – P. 209-220.
151. Schramm, L., Hernandez, N. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters // *Genes and development*. – 2002. – V. 16. – P. 2593–2620.
152. Bratkovič, T., Rogelj, B. Biology and applications of small nucleolar RNAs // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2011. – V. 68. – N. 23. – P. 3843-3851.
153. Martens-Uzunova, E. S., Olvedy, M., Jenster, G. Beyond microRNA—novel RNAs derived from small non-coding RNA and their implication in cancer // *Cancer letters*. – 2013. – V. 340. – N. 2. – P. 201-211.
154. McStay, B. Nucleolar organizer regions: genomic ‘dark matter’ requiring illumination // *Genes & Development*. – 2016. – V. 30. – N. 14. – P. 1598-1610.
155. Richard, P., Darzacq, X., Bertrand, E., Jady, B. E., Verheggen, C., Kiss, T. A common sequence motif determines the Cajal bodyspecific localization of box H/ACA scaRNAs // *EMBO Journal*. – 2003. – N. 22. – P. 4283-4293.
156. Matera, A. G., Shpargel, K. B. Pumping RNA: nuclear bodybuilding along the RNP pipeline // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2006. – V. 18. – P. 317-324.
157. Sleeman, J. E., Lamond, A. I. Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway // *Current Biology*. – 1999. – V. 9. – P. 1065-1074.
158. Spector, D. L., Lamond, A. I. Nuclear speckles // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2011. – V. 3. – N. 2. – doi: 10.1101/cshperspect.a000646.
159. Gezer, U., Özgür, E., Cetinkaya, M., Isin, M., Dalay, N. Long non-coding RNAs with low expression levels in cells are enriched in secreted exosomes // *Cell biology international*. – 2014. – V. 38. – N. 9. – P. 1076-1079.
160. Yarmishyn, A. A, Kurochkin, I. V. Long noncoding RNAs: a potential novel class of cancer biomarkers. // *Frontiers in Genetics* – 2015. – V. 6. – doi: 10.3389/fgene.2015.00145.
161. Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., Tsai, M. C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L., Wang, Y. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis // *Nature*. – 2010. – V. 464. – P. 1071-1076.

162. Li, Y., Zheng, Q., Bao, C., Li, S., Guo, W., Zhao, J., Chen, D., Gu, J., He, X., Huang, S. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis // *Cell research*. – 2015. – V. 25. – N. 8. – P. 981-984.
163. Guo, J. U., Agarwal, V., Guo, H., Bartel, D. P. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs // *Genome biology*. – 2014. – V. 15. – N. 7. – P. 1-14.
164. Hansen, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Finsen, B., Damgaard, C. K., Kjems, J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges // *Nature*. – 2013. – V. 495. – N. 7441. – P. 384-388.
165. Jeck, W. R., Sharpless, N. E. Detecting and characterizing circular RNAs // *Nature biotechnology*. – 2014. – V. 32. – N. 5. – P. 453-461.
166. Salzman, J., Chen, R. E., Olsen, M. N., Wang, P. L., Brown, P. O. Cell-type specific features of circular RNA expression // *PLoS Genet*. – 2013. – V. 9. – N. 9. – doi: 10.1371/journal.pgen.1003777.
167. Chao, C. W., Chan, D. C., Kuo, A., Leder, P. The mouse formin (Fmn) gene: abundant circular RNA transcripts and gene-targeted deletion analysis // *Molecular Medicine*. – 1998. – V. 4. – N. 9. – P. 614-628.
168. Jeck, W. R., Sorrentino, J. A., Wang, K., Slevin, M. K., Burd, C. E., Liu, J., Marzluff, W. F., Sharpless, N. E. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats // *RNA*. – 2013. – V. 19. – N. 2. – P. 141-157.
169. Chen, C.Y., Sarnow, P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs // *Science*. – 1995. – V. 268. – P. 415-417.
170. Ismail, N., Wang, Y., Dakhallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer // *Blood*. – 2013. – V. 121. – N. 6. – P. 984-995.
171. Morel, L., Regan, M., Higashimori, H., Ng, S.K., Esau, C., Vidensky, S., Rothstein, J. and Yang, Y., Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – V. 288. – N. 10. – P. 7105-7116.
172. Zerneck, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Köppel, T., Jahantigh, M.N., Lutgens, E., Wang, S. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection // *Science Signalling* – 2009. – V. 2. – I. 100. – doi: 10.1126/scisignal.2000610.
173. Hergenreider, E., Heydt, S., Tréguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A.J., Zeiher, A.M., Scheffer, M.P., Frangakis, A.S., Yin, X., Mayr, M., Braun, T. Atheroprotective

communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs // *Nature cell biology*. – 2012. – V. 14. – N. 3. – P. 249-256.

174. Eldh, M., Ekström, K., Valadi, H., Sjöstrand, M., Olsson, B., Jernås, M., Lötvall, J. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA // *PloS one*. – 2010. – V. 5. – N. 12. – doi: 10.1371/journal.pone.0015353.

175. Mazzocca, A., Coppari, R., De Franco, R., Cho, J. Y., Libermann, T. A., Pinzani, M., Toker, A. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions // *Cancer research* – 2005. – V. 65. – P. 4728–4738.

176. Singer, C. F., Gschwantler-Kaulich, D., Fink-Retter, A., Haas, C., Hudelist, G., Czerwenka, K., Kubista, E. Differential gene expression profile in breast cancer-derived stromal fibroblasts // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2008. – V. 110. – N. 2. – P. 273-81.

177. Kogure, T., Lin, W. L., Yan, I. K., Braconi, C., Patel, T. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth // *Hepatology* – 2011. – V. 54. – P. 1237–1248.

178. Yang, M., Chen, J., Su, F., Yu, B., Su, F., Lin, L., Liu, Y., Huang, J. D., Song, E. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells // *Molecular Cancer* – 2011. – V. 10. – P. 117-130.

179. Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T. Jr., Carter, B. S., Krichevsky, A. M., Breakefield, X. O. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers // *Nature Cell Biology*. – 2008. – V. 10. – P. 1470–1476.

180. Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., Sun, Q., Wang, K., Ba, Y., Wang, Q., Wang, D., Yang, J., Liu, P., Xu, T., Yan, Q., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C. Y. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration // *Mol. Cell*. – 2010. – V. 39. – P. 133–144.

181. Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. A., van Eijndhoven, M. A., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., de Gruijl, T. D., Würdinger, T., Middeldorp, J. M. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – V. 107. – P. 6328–6333.

182. <http://www.htslib.org>

183. <http://www.broadinstitute.org/igv/>

184. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S.L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome // *Genome Biol.* – 2009. – V.10. – N. 3. – doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.

185. <http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>

186. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227. – N. 5259. – P. 680-685.
187. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on // *Nature protocols*. – 2006. – V. 1. – N. 2. – P. 581-585.
188. Jurka, J., Kapitonov, V. V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O., Walichiewicz, J. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2005. – V. 110. – P. 462-467.
189. Chan, P. P., Lowe, T. M. GtRNAdb: A database of transfer RNA genes detected in genomic sequence // *Nucleic Acids Research*. – 2009. – V. 37. (Database issue) – P. D93-97.
190. ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Homo_sapiens/RNA/
191. <ftp://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/chromosomes>
192. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R. The sequence alignment/map format and SAMtools // *Bioinformatics*. – 2009. – V. 25. – N. 16. – P. 2078-2079.
193. <http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>
194. Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J., Pachter, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation // *Nature Biotechnology*. – 2010. – V. 28. – N. 5. – P. 511-515.
195. https://github.com/alexakur/transcript2genome/blob/master/create_ring_ref.pl
196. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome // *Genome biology*. – 2009. – V. 10. – N. 3. – P. 1-10.
197. Li, Z., Huang, C., Bao, C., Chen, L., Lin, M., Wang, X., Zhong, G., Yu, B., Hu, W., Dai, L., Zhu, P. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus // *Nature structural & molecular biology*. – 2015. – V. 22. – N. 3. – P. 256-264.
198. Mi, H., Poudel, S., Muruganujan, A., Casagrande, J. T., Thomas, P. D. PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools // *Nucleic acids research*. – 2016. – V. 44. – N. D1. – P. D336-D342.
199. Sambrook J., Russell D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd edition // Coldspring-Harbour Laboratory Press, UK., 2001. – 2100 P.
200. Практикум по микробиологическим методам исследования / А. С. Лабинская. – М. : Государственное издательство медицинской литературы, 1963. – 464 С.

201. Мазин, А. В., Кузнецов, К. Д., Краев, А. С. Методы молекулярной генетики и геной инженерии. - Новосибирск: Наука, 1990. – 248 С.
202. Blommel, P. G., Becker, K. J., Duvnjak, P., Fox, B. G. Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of lac repressor dosage and medium composition // *Biotechnology progress*. – 2007. – V. 23. – N. 3. – P. 585-598.
203. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. E., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. – Humana Press, 2005. – С. 571-607.
204. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes // *Nature protocols*. – 2006. – V. 1. – N. 6. – P. 2856-2860.
205. Хабриев, Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Издательство "Медицина", 2005. – 832 С.
206. Milligan, J. F., Groebe, D. R., Witherell, G. W., Uhlenbeck, O. C. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates // *Nucleic acids research*. – 1987. – V. 15. – N. 21. – P. 8783-8798.
207. Степанов, Г. А., Семенов, Д. В., Кулигина, Е. В., Коваль, О. А., Рабинов, И. В., Кит, Ю. Я., Рихтер, В. А. Аналоги малых ядрышковых С/D-боксов-РНК человека как регуляторы альтернативного сплайсинга пре-мРНК-мишени // *Acta Naturae* (русскаяязычная версия). – 2012. – Т. 4. – №. 1. - С. 34-43.
208. Cutts, S. M., Masta, A., Panousis, C., Parsons, P. G., Sturm, R. A., Phillips, D. R. A Gel Mobility Shift Assay for Probing the Effect of Drug–DNA Adducts on DNA-Binding Proteins // *Drug-DNA Interaction Protocols*. – 1997. – P. 95-106.
209. Маниатис, Т., Фрич, Э., Сэмбрук, Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Издательство "Мир", 1984. – 478 С
210. Chomczynski, P., Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on // *Nature protocols*. – 2006. – V. 1. – N. 2. – P. 581-585.
211. Kircher, M., Kelso, J. High-throughput DNA sequencing–concepts and limitations // *Bioessays*. – 2010. – V. 32. – N. 6. – P. 524-536.
212. Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., Conrad, R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2012. – V. 1820. – N. 7. – P. 940-948.

213. Pitt, J. M., Kroemer, G., Zitvogel, L. Extracellular vesicles: masters of intercellular communication and potential clinical interventions // *Journal of Clinical Investigation*. – 2016. – V. 126. – N. 4. – P. 1139-1143.

214. Zeringer, E., Barta, T., Li, M., Vlassov, A. V. Strategies for isolation of exosomes // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2015. – V. 2015. – N. 4. – doi: 10.1101/pdb.top074476

215. Witwer, K. W., Buzas, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., Nolte, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research // *Journal of extracellular vesicles*. – 2013. – V. 2. – doi: 10.3402/jev.v2i0.20360.

216. Cattaneo, M., Lecchi, A., Zighetti, M. L., Lussana, F. Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count // *Haematologica*. – 2007. – V. 92. – N. 5. – P. 694-697.

217. Kirschner, M. B., Kao, S. C., Edelman, J. J., Armstrong, N. J., Vallely, M. P., van Zandwijk, N., Reid, G. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma // *PloS one*. – 2011. – V. 6. – N. 9. – doi: 10.1371/journal.pone.0024145.

218. Crescitelli, R., Lässer, C., Szabo, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., Buzás, E. I., Lötvall, J. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes // *Journal of extracellular vesicles*. – 2013. – V. 2 – doi: 10.3402/jev.v2i0.20677.

219. Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Trachtenberg, A. J., Hochberg, F. H., Skog, J., Kuo, W. P. Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles // *Frontiers in physiology*. – 2012. – V. 3. – doi: 10.3389/fphys.2012.00162.

220. Moldovan, L., Batte, K., Wang, Y., Wisler, J., Piper, M. Analyzing the circulating microRNAs in exosomes/extracellular vesicles from serum or plasma by qRT-PCR // *Circulating MicroRNAs: Methods and Protocols*. – 2013. – P. 129-145.

221. Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., Chen, C. C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies // *Journal of neuro-oncology*. – 2013. – V. 113. – N. 1. – P. 1-11.

222. Luik, A. I., Naboka, Y. N., Mogilevich, S. E., Hushcha, T. O., Mischenko, N. I. Study of human serum albumin structure by dynamic light scattering: two types of reactions under different pH and interaction with physiologically active compounds // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 1998. – V. 54. – N. 10. – P. 1503-1507.

223. Pol, E., Böing, A. N., Gool, E. L., Nieuwland, R. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2016. – V. 14. – N. 1. – P. 48-56.

224. Кириченко, М. Н. Динамика размеров и концентраций белков и их комплексов в плазме крови *in vitro* по данным светорассеяния : дис. ... физ.-мат. наук : 01.04.05/ Кириченко Марина Николаевна. – М., 2015. – 135 с.

225. Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M. L., Schmittgen, T. D., Nana-Sinkam, S. P. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles // *PloS one*. – 2008. – V. 3. – N. 11. – doi: 10.1371/journal.pone.0003694.

226. Van Der Pol, E., Van Gemert, M. J. C., Sturk, A., Nieuwland, R., Van Leeuwen, T. G. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2012. – V. 10. – N. 5. – P. 919-930.

227. Pospichalova, V., Svoboda, J., Dave, Z., Kotrbova, A., Kaiser, K., Klemova, D., Ilkovic, L., Hampl, A., Crha, I., Jandakova, E., Minar, L. Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer // *Journal of extracellular vesicles*. – 2015. – V. 4. – doi: 10.3402/jev.v4.25530.

228. Jansen, F. H., Krijgsveld, J., van Rijswijk, A., van den Bemd, G. J., van den Berg, M. S., van Weerden, W. M., Willemsen, R., Dekker, L. J., Luidert, T. M., Jenster, G. Exosomal secretion of cytoplasmic prostate cancer xenograft-derived proteins // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2009. – V. 8. – N. 6. – P. 1192-1205.

229. Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., Ochiya, T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – V. 285. – N. 23. – P. 17442-17452.

230. Metzelaar, M. J., Wijngaard, P. L., Peters, P. J., Sixma, J. J., Nieuwenhuis, H. K., Clevers, H. C. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells // *Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – V. 266. – N. 5. – P. 3239-3245.

231. Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agdjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – V. 105. – N. 30. – P. 10513-10518.

232. Mardis, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics // *Trends in genetics*. – 2008. – V. 24. – N. 3. – P. 133-141.

233. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/251831106>

234. Frezza, C., Cipolat, S., Scorrano, L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts // *Nature protocols*. – 2007. – V. 2. – N. 2. – P. 287-295.

235. Duchez, A. C., Boudreau, L. H., Bollinger, J., Belleannée, C., Cloutier, N., Laffont, B., Mendoza-Villarreal, R. E., Lévesque, T., Rollet-Labelle, E., Rousseau, M., Allaeys, I. Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A2-IIA // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – V. 112. – N. 27. – P. E3564-E3573.

236. Boudreau, L. H., Duchez, A. C., Cloutier, N., Soulet, D., Martin, N., Bollinger, J., Paré, A., Rousseau, M., Naika, G. S., Lévesque, T., Laflamme, C. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation // *Blood*. – 2014. – V. 124. – N. 14. – P. 2173-2183.

237. Röther S., Meister G. Small RNAs derived from longer non-coding RNAs // *Biochimie*. – 2011. – V. 93. – N. 11. – P. 1905-1915.

238. Wei, H., Zhou, B., Zhang, F., Tu, Y., Hu, Y., Zhang, B., Zhai, Q. Profiling and identification of small rDNA-derived RNAs and their potential biological functions // *PloS one*. – 2013. – V. 8. – N. 2. – doi: 10.1371/journal.pone.0056842.

239. Taylor, D. D., Gercel-Taylor, C. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids // *Frontiers in Genetics*. – 2013. – V. 4. – P. 1-12.

240. Hu, Z., Chen, J., Tian, T., Zhou, X., Gu, H., Xu, L., Zeng, Y., Miao, R., Jin, G., Ma, H., Chen, Y. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival // *The Journal of clinical investigation*. – 2008. – V. 118. – N. 7. – P. 2600-2608.

241. Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases // *Cell research*. – 2008. – V. 18. – N. 10. – P. 997-1006.

242. Heegaard, N. H., Schetter, A. J., Welsh, J. A., Yoneda, M., Bowman, E. D., Harris, C. C. Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer // *International journal of cancer*. – 2012. – V. 130. – N. 6. – P. 1378-1386.

243. Köhler, J., Schuler, M., Gauler, T. C., Nöpel-Dünnebacke, S., Ahrens, M., Hoffmann, A. C., Kasper, S., Nensa, F., Gomez, B., Hahnemann, M., Breitenbuecher, F. Circulating U2 small nuclear RNA fragments as a diagnostic and prognostic biomarker in lung cancer patients // *Journal of cancer research and clinical oncology*. – 2016. - V. 142. – N. 4. – P. 795-805.

244. Hu, X., Bao, J., Wang, Z., Zhang, Z., Gu, P., Tao, F., Cui, D., Jiang, W. The plasma lncRNA acting as fingerprint in non-small-cell lung cancer // *Tumor Biology*. – 2016. – V. 37. – N. 3. – P. 3497-3504.
245. Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases // *Cell research*. – 2008. – V. 18. – N. 10. – P. 997-1006.
246. Laffont, B., Corduan, A., Plé, H., Duchez, A. C., Cloutier, N., Boilard, E., Provost, P. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2• microRNA complexes to endothelial cells via microparticles // *Blood*. – 2013. – V. 122. – N. 2. – P. 253-261.
247. Wong, G. K. S., Passey, D. A., Yu, J. Most of the human genome is transcribed // *Genome Research*. – 2001. – V. 11. – N. 12. – P. 1975-1977.
248. Laurent, G. S., Wahlestedt, C., Kapranov, P. The Landscape of long noncoding RNA classification // *Trends in Genetics*. – 2015. – V. 31. – N. 5. – P. 239-251.
249. Zhang, Y., Zhang, X. O., Chen, T., Xiang, J. F., Yin, Q. F., Xing, Y. H., Zhu, S., Yang, L., Chen, L. L. Circular intronic long noncoding RNAs // *Molecular cell*. – 2013. – V. 51. – N. 6. – P. 792-806.
250. Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S. D., Gregersen, L. H., Munschauer, M., Loewer, A. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency // *Nature*. – 2013. – V. 495. – N. 7441. – P. 333-338.
251. Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., Pandolfi, P.P., A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? // *Cell*. – 2011. – V. 146. – N. 3. – P. 353-358.
252. Qu, S., Yang, X., Li, X., Wang, J., Gao, Y., Shang, R., Sun, W., Dou, K., Li, H. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs // *Cancer letters*. – 2015. – V. 365. – N. 2. – P. 141-148.
253. Bahn, J.H., Zhang, Q., Li, F., Chan, T.M., Lin, X., Kim, Y., Wong, D.T., Xiao, X. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva // *Clinical chemistry*. – 2015. – V. 61. – N. 1. – P. 221-230.
254. Conn, S.J., Pillman, K.A., Toubia, J., Conn, V.M., Salmanidis, M., Phillips, C.A., Roslan, S., Schreiber, A.W., Gregory, P.A., Goodall, G.J. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs // *Cell*. – 2015. – V. 160. – N. 6. – P. 1125-1134.
255. Koh, W., Pan, W., Gawad, C., Fan, H.C., Kerchner, G.A., Wyss-Coray, T., Blumenfeld, Y.J., El-Sayed, Y.Y., Quake, S.R. Noninvasive in vivo monitoring of tissue-specific global gene expression in humans // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – V. 111. – N. 20. – P. 7361-7366.

256. Muller, L., Mitsuhashi, M., Simms, P., Gooding, W.E., Whiteside, T.L. Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets // *Scientific reports*. – 2016. – V. 6. – doi: 10.1038/srep20254.

257. Ebbesen, K. K., Kjems, J., Hansen, T. B. Circular RNAs: Identification, biogenesis and function // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. – 2016. – V. 1859. – N. 1. – P. 163-168.

258. Zhang, Y., Zhang, X. O., Chen, T., Xiang, J. F., Yin, Q. F., Xing, Y. H., Zhu, S., Yang, L., Chen, L. L. Circular intronic long noncoding RNAs // *Molecular cell*. – 2013. – V. 51. – N. 6. – P. 792-806.

259. Salzman, J., Gawad, C., Wang, P. L., Lacayo, N., Brown, P. O. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types // *PloS one*. – 2012. – V. 7. – N. 2. – doi: 10.1371/journal.pone.0030733.

260. Glažar, P., Papavasileiou, P., Rajewsky, N. circBase: a database for circular RNAs // *RNA*. – 2014. – V. 20. – N. 11. – P. 1666-1670.

261. Li, Y., Zheng, Q., Bao, C., Li, S., Guo, W., Zhao, J., Chen, D., Gu, J., He, X., Huang, S. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis // *Cell research*. – 2015. – V. 25. – N. 8. – P. 981-984.

262. Koh, W., Pan, W., Gawad, C., Fan, H.C., Kerchner, G.A., Wyss-Coray, T., Blumenfeld, Y. J., El-Sayed, Y. Y., Quake, S. R. Noninvasive in vivo monitoring of tissue-specific global gene expression in humans // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – V. 111. – N. 20. – P. 7361-7366.

263. Memczak, S., Papavasileiou, P., Peters, O., Rajewsky, N. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in human blood // *PloS one*. – 2015. – V. 10. – N. 10. – doi: 10.1371/journal.pone.0141214.

264. Zhang, Y., Zhang, X. O., Chen, T., Xiang, J. F., Yin, Q. F., Xing, Y. H., Zhu, S., Yang, L., Chen, L. L. Circular intronic long noncoding RNAs // *Molecular cell*. – 2013. – V. 51. – N. 6. – P. 792-806.

265. Lindström, M. S. NPM1/B23: a multifunctional chaperone in ribosome biogenesis and chromatin remodeling // *Biochemistry research international*. – 2010. – V. 2011. – doi: 10.1155/2011/195209.

266. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

267. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1977. – V. 74. – №. 12. – P. 5463-5467.

268. Blommel, P. G., Becker, K. J., Duvnjak, P., Fox, B. G. Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of lac repressor dosage and medium composition // *Biotechnology progress*. – 2007. – V. 23. – N. 3. – P. 585-598.

269. Savkur, R. S., Olson, M. O. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease // *Nucleic acids research*. – 1998. – V. 26. – N. 19. – P. 4508-4515.

270. Sinnett, D., Richer, C., Deragon, J. M., Labuda, D. Alu RNA secondary structure consists of two independent 7 SL RNA-like folding units // *Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – V. 266. – N. 14. – P. 8675-8678.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1. Характеристические формы мтРНК, мажорных клеточных РНК и транскриптов геномных повторов клеток крови (I), плазмы (II) и фракций плазмы крови (III-V)

Объект сравнения 1	Объект сравнения 2	ID транскрипта	FPKM1	FPKM2	log2	q ⁽¹⁾
I. Клетки крови	II. Плазма	mt-TRNP	4,1E6	6,0E5	-2,8	0,05
	III. 16 000 g осадок плазмы	18S_rRNA	1,3E5	3,5E5	1,4	0,005
		TRNI-ATC	4,6E3	2,6E5	5,8	0,003
	IV. 160 000 g осадок плазмы	28S_rRNA ⁽²⁾	8,4E4	2,4E5	1,5	0,003
		U13_snRNA	3,4E4	2,4E3	-3,8	0,003
		TRNI-ATC	4,6E3	9,5E4	4,4	0,026
	V. 160 000 g супернатант плазмы	MER41A ⁽³⁾	1,1E3	2,5E4	4,5	0,039
		mt-RNR2	4,3E5	2,1E5	-1,0	0,02
		TRNI-ATC	4,6E3	3,6E5	6,3	0,003
	II. Плазма	III. 16 000 g осадок плазмы	c_28S_rRNA ⁽²⁾	3,3E3	1,6E5	5,6
mt-TRND			2,6E5	3,1E6		0,01
18S_rRNA			1,7E5	3,5E5	1,1	0,003
IV. 160 000 g осадок плазмы		28S_rRNA	5,8E4	1,5E5	1,4	0,003
		mt-D-loop	8,5E2	7,9E3	3,2	0,01
		28S_rRNA	5,8E4	2,4E5	2,1	0,003
		U5A_snRNA	1,7E4	1,1E5	2,6	0,038
		U5B_snRNA	1,3E4	1,1E5	3,1	0,003
V. 160 000 g супернатант плазмы		U6_snRNA	2,7E4	3,9E5	3,9	0,003
		MER41A ⁽³⁾	9,8E2	2,5E4	4,7	0,039
III. 16 000 g осадок плазмы	IV. 160 000 g осадок плазмы	c_28S_rRNA ⁽²⁾	6,1E3	1,6E5	4,7	0,049
		U1_snRNA	5,7E4	5,7E5	3,3	0,003
		U5A_snRNA	1,3E4	1,1E5	3,1	0,015
		U5B_snRNA	1,5E4	1,1E5	2,9	0,045
	V. 160 000 g супернатант плазмы	28S_rRNA	1,5E5	5,6E4	-1,4	0,003
		mt-RNR2	6,3E5	2,1E5	-1,6	0,01
		mt-TRND	3,1E6	5,0E5	-2,7	0,05
IV. 160 000 g осадок плазмы	V. 160 000 g супернатант плазмы	c_28S_rRNA ⁽²⁾	6,4E3	1,6E5	4,6	0,049
		mt-RNR2	4,5E5	2,1E5	-1,1	0,02
		28S_rRNA	2,4E5	5,6E4	-2,1	0,003
		U1_snRNA	5,7E5	6,8E4	-3,1	0,005
		TRNW-TGG	4,7E4	5,0E5	3,4	0,019
		c_28S_rRNA ⁽²⁾	2,3E4	1,6E5	2,8	0,039
MER41A ⁽³⁾	2,5E4	1,3E3	-4,3	0,039		

⁽¹⁾ P-value с поправкой Бенджамини-Хохберга для пары сравнений наборов значений FPKM каждой фракции крови с помощью CuffDiff.

⁽²⁾ Транскрипты, комплементарные 28S рРНК, фрагментами которых обогащена фракция крови V (160 000 g супернатант).

⁽³⁾ MER41A транскрибируемый геномный повтор, фрагментами которого обогащена фракция крови IV (160 000 g осадок).

Таблица А.2. Характеристические РНК фракций крови человека, выявленные среди фрагментов РНК, аннотированных в базе данных RefSeq RNA человека (мРНК, микроРНК, мяоРНК и другие некодирующие РНК, включая днРНК)

Объект сравнения 1 ⁽¹⁾	Объект сравнения 2 ⁽¹⁾	ID транскрипта	FPKM1	FPKM2	log2	q ⁽²⁾	Total Number ⁽³⁾ NM/miR/sno/others ⁽⁴⁾
I. Клетки крови	II. Плазма	<i>RBBP8</i> ⁽⁵⁾	1,3E1	2,3E3	7,0	0,04	5 5/0/0/0
		<i>AURKAIP1</i>	5,0E0	3,7E1	3,0	0,04	
		<i>IFNA7</i>	3,0E0	1,7E1	2,0	0,04	
		<i>SNORD110</i>	5,7E4	4,7E3	-4,0	0,04	
		<i>SNORA66</i>	3,4E3	2,7E2	-4,0	0,04	
	III. 16 000 g осадок плазмы	<i>MIR210</i>	1,1E4	7,3E2	-4,0	0,04	8 0/3/5/0
		<i>MIR3182</i>	4,2E3	1,6E5	5,2	0,04	
		<i>MIR744</i>	3,7E2	1,2E4	5,0	0,04	
		<i>MIR10A</i>	2,2E2	4,3E3	4,3	0,04	
		<i>SNORA8</i>	3,5E3	1,5E2	-4,5	0,04	
	IV. 160 000 g осадок плазмы	<i>SNORA7A</i>	3,1E3	1,3E2	-4,6	0,04	39 8/2/23/6
		<i>SNORD94</i>	4,4E3	1,2E2	-5,2	0,04	
		<i>FAM187B</i>	6,4E0	1,7E2	4,7	0,04	
		<i>KCNIP4</i>	6,4E0	1,0E2	4,0	0,04	
		<i>C2orf7</i>	6,3E0	7,9E1	3,7	0,04	
	V. 160 000 g осадок плазмы	<i>SNORD56</i>	8,0E4	9,6E2	-6,4	0,04	82 7/18/49/8
		<i>SNORD65</i>	5,5E4	6,4E2	-6,4	0,04	
		<i>SNORD110</i>	5,7E4	6,7E2	-6,4	0,04	
		<i>TMEM91</i>	3,7E0	4,7E1	3,7	0,04	
		<i>MIR10A</i>	2,2E2	2,4E3	3,4	0,04	
V. 160 000 g супернатант плазмы	<i>OSTN</i>	7,4E0	5,7E1	2,9	0,04	28 24/1/0/3	
	<i>SNORD1B</i>	7,8E3	5,0E2	-4,0	0,04		
	<i>SNORA31</i>	3,5E3	1,8E2	-4,3	0,04		
	<i>SNORD110</i>	5,7E4	2,8E3	-4,3	0,04		
	<i>MIR421</i>	1,4E3	2,0E4	3,8	0,04		
II. Плазма	III. 16 000 g осадок плазмы	<i>MIR139</i>	3,2E3	3,6E4	3,5	0,04	4 0/4/0/0
		<i>MIR199B</i>	1,5E3	1,5E4	3,2	0,04	
		--	--	--	--	--	
	IV. 160 000 g осадок плазмы	<i>FAM187B</i>	1,4E1	1,7E2	3,6	0,04	17 16/0/0/1
		<i>FAM185A</i>	8,9E0	1,1E2	3,6	0,04	
		<i>PRNP</i>	3,1E0	2,5E1	3,0	0,04	
		<i>C1D</i>	3,2E1	2,5E0	-3,7	0,04	
		<i>METT5D1</i>	3,4E3	3,1E1	-6,8	0,04	
		<i>RBBP8</i>	2,3E3	9,7E0	-7,9	0,04	
	V. 160 000 g супернатант плазмы	<i>TMEM91</i>	5,4E0	4,0E1	2,9	0,04	5 3/1/0/1
		<i>FLJ41278</i>	3,9E3	2,5E4	2,7	0,04	
		<i>MIR451</i>	1,8E7	9,0E7	2,3	0,04	
		--	--	--	--	--	
III. 16 000 g осадок плазмы	IV. 160 000 g осадок плазмы	<i>MIR449B</i>	6,7E2	1,1E4	4,0	0,04	22 17/1/2/2
		<i>RNU11</i>	7,1E2	7,2E3	3,3	0,04	
		<i>KRTAP10-5</i>	1,0E1	9,5E1	3,2	0,04	
		<i>SNORD110</i>	1,7E4	6,7E2	-4,6	0,04	
		<i>MIR744</i>	1,2E4	3,5E2	-5,1	0,04	
	<i>SNORD96A</i>	3,2E4	6,8E2	-5,6	0,04	33 2/21/9/1	
	V. 160 000 g супернатант плазмы	<i>SNORD94</i>	1,2E2	1,4E3	3,5		0,04
		<i>SNORD38A</i>	5,5E3	3,5E4	2,7		0,04
		<i>CHI3L2</i>	3,7E0	1,8E1	2,2		0,04
		<i>MYL6</i>	7,4E1	1,4E1	-2,4		0,04
<i>C1D</i>		2,5E0	5,1E1	4,4	0,04		
IV. 160 000 g осадок плазмы	V. 160 000 g супернатант плазмы	<i>MIR4306</i>	1,0E3	1,5E4	3,9	0,04	15 4/6/5/0
		<i>SNORD20</i>	7,1E2	9,0E3	3,7	0,04	
		<i>ATP5G2</i>	3,8E1	6,5E0	-2,6	0,04	
		<i>ADAM29</i>	2,3E1	3,4E0	-2,8	0,04	
		<i>CELA2B</i>	4,3E1	4,1E0	-3,4	0,04	

⁽¹⁾ Было проведено сравнение представленности фрагментов РНК, аннотированных в базе данных RefSeq RNA человека, во фракциях крови с использованием пакета программ Cuffdiff (параметр cutoff 100). В таблице указаны по 3 формы РНК, фрагментами которых были обогащены/обеднены фракции крови относительно друг друга.

Продолжение Таблицы А.2

- (²) P-value с поправкой Бенджамини-Хохберга для пары сравнений наборов значений FPKM каждой фракции крови с помощью CuffDiff.
- (³) Общее количество выявленных для каждой фракции характеристических транскриптов, идентифицированных как фрагменты РНК человека базы данных RefSeq.
- (⁴) Общее количество выявленных для каждой фракции характеристических транскриптов, идентифицированных как зрелые формы микроРНК и фрагменты мРНК/мяоРНК/других некодирующих РНК (в том числе днРНК).
- (⁵) Для мРНК с несколькими сплайс-изоформами указана форма с наибольшим значением \log_2 , рассчитанном при сравнении значений FPKM.

Таблица А.3. Наиболее представленные митохондриальные транскрипты с инварибельным распределением во фракция крови здоровых доноров и пациентов с НКРЛ

I. Клетки крови				II. Плазма				III. 16 000 g осадок плазмы				IV. 160 000 g осадок плазмы				V. 160 000 g супернатант плазмы			
ID ⁽¹⁾	FPKM ⁽²⁾	Std ⁽²⁾	q ⁽³⁾	ID	FPKM	Std	q	ID	FPKM	Std	q	ID	FPKM	Std	q	ID	FPKM	Std	q
<i>TRNV</i>	7,2E7	6,8E6	0,91	<i>TRNM</i>	1,2E7	4,8E6	0,55	<i>TRNM</i>	1,2E8	1,8E8	0,69	<i>TRNS2</i>	3,7E7	1,8E7	0,55	<i>TRNV</i>	9,9E7	7,1E7	0,65
<i>TRNM</i>	4,2E7	2,1E7	0,57	<i>TRNK</i>	9,4E6	5,5E6	0,53	<i>TRNV</i>	6,5E7	3,1E6	0,99	<i>TRNM</i>	2,8E7	8,6E6	0,80	<i>TRNT</i>	4,9E7	3,7E7	0,51
<i>TRNT</i>	1,9E7	5,6E6	0,78	<i>TRNI</i>	2,6E6	1,8E6	0,59	<i>TRNS2</i>	4,7E7	3,6E7	0,69	<i>TRNH</i>	1,5E7	7,0E6	0,61	<i>TRNM</i>	4,0E7	3,1E7	0,54
<i>TRNK</i>	1,1E7	8,3E6	0,50	<i>TRNE</i>	2,1E6	9,3E5	0,70	<i>TRNH</i>	2,4E7	1,1E7	0,76	<i>TRNL2</i>	5,6E6	3,3E6	0,51	<i>TRNH</i>	3,2E7	2,3E7	0,68
<i>TRNI</i>	5,1E6	3,0E6	0,51	<i>TRNW</i>	1,6E6	6,7E5	0,60	<i>TRNL1</i>	1,2E7	5,2E6	0,76	<i>TRNC</i>	4,7E6	1,9E6	0,73	<i>TRNK</i>	3,1E7	2,6E7	0,62
<i>TRNL2</i>	5,1E6	2,8E6	0,57	<i>TRNA</i>	1,1E6	5,5E5	0,51	<i>TRNT</i>	1,2E7	4,0E6	0,81	<i>TRNN</i>	3,2E6	1,4E6	0,69	<i>TRNS2</i>	2,5E7	4,5E6	0,88
<i>TRNC</i>	3,0E6	3,6E5	0,91	<i>TRNP</i>	6,0E5	1,6E5	0,60	<i>TRNK</i>	9,6E6	4,2E6	0,81	<i>TRNE</i>	2,6E6	3,7E5	0,96	<i>TRNL1</i>	1,8E7	1,8E7	0,51
<i>TRNW</i>	2,3E6	1,5E6	0,55	<i>RNR1</i>	1,4E5	5,9E4	0,53	<i>TRNC</i>	5,9E6	4,7E6	0,69	<i>TRNI</i>	2,0E6	4,6E5	0,90	<i>TRNC</i>	1,2E7	7,6E6	0,51
<i>TRNF</i>	1,3E6	9,1E5	0,51	<i>ATP8</i>	8,1E4	1,3E5	0,55	<i>TRNL2</i>	5,6E6	3,9E6	0,81	<i>TRNW</i>	2,0E6	6,1E5	0,74	<i>TRNN</i>	1,1E7	3,5E6	0,72
<i>TRNY</i>	9,5E5	6,1E5	0,78	<i>ND1</i>	6,2E3	3,6E3	0,51	<i>TRNR</i>	5,1E6	3,6E6	0,81	<i>TRNS1</i>	1,4E6	6,5E5	0,51	<i>TRNQ</i>	4,2E6	1,9E6	0,72
Коэффициент корреляции Пирсона (r)																			
ЗД:ПКРЛ		0,97		0,93		0,90		0,93		0,80									
ЗД:АКЛ		0,86		0,73		0,41		0,98		0,47									
ПКРЛ:АКЛ		0,90		0,86		0,41		0,85		0,48									
<p>⁽¹⁾ ID – идентификаторы генов согласно референсной последовательности NC_012920.1 (кембриджская референсная последовательность митохондриального генома <i>Homo sapiens</i>), депонированной в базе данных NCBI. В таблице представлены топ 10 генов с максимальными значениями <i>p</i>-value, определенными по результатам сравнительного анализа паттерна распределения транскриптов фракций крови с помощью пакета программ Cuffdiff.</p> <p>⁽²⁾ Среднее значение FPKM и стандартное отклонение (Std) среднего FPKM для фракций крови здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ, рассматриваемых как реплики. Данные отсортированы в порядке убывания значения средних значений FPKM, указанных для фракции.</p> <p>⁽³⁾ Минимальные значения <i>q</i>-value - <i>p</i>-value с поправкой Бенджамини-Хохберга для сравнений наборов значений FPKM здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ для каждой фракции крови с помощью CuffDiff.</p>																			

Таблица А.4. Транскрибируемые геномные повторы, фрагменты которых имеют инвариабельный паттерн распределения во фракциях крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ

Фракция крови	I. Клетки крови		II. Плазма		III. 16 000 g осадок плазмы		IV. 160 000 g осадок плазмы		V. 160 000 g супернатант плазмы	
Репрезентативная выборка из списка повторов										
LINE	8 ⁽¹⁾	L1PB2, L1MA10, L1MA4A, L1MA9, L1MB1, L1ME3A	14	L1, L1HS, L1M3A, L1M3DE, L1MD2, L1PA14, L1PA2	10	L1, L1M1, L1M3A, L1ME4, L1ME, L1PA14	11	L1, L1M2C, L1MA4, L1MA4A, L1MA5, L1ME4A	14	L1, L1M3B, L1MA9, L1ME3, L1PA7, L1MB1
SINE ⁽²⁾	1	FAM	0	--	0	--	2	AluYb3a2, AluYbc3a	1	FAM
LTR	6	MLT1A2, LTR5, MER11B, MER11C, MLT2A1, MLT2B2	4	LTR10A, MER21A, MSTB, THE1A	9	MER39B, MLT1E, MER4B, MLT2B3, THE1A	4	LTR7, MLT1, MLT1A2, THE1-INTERNAL	0	-
DNA	1	Tigger4a	0	--	0	--	3	Tigger1, Tigger3b, Tigger2	2	Tigger3b, Tigger2
Satellite	0	--	0	--	0	--	0	--	1	ALR10
Другие	4	c_U2-2 ⁽³⁾ , c_TRNA, c_TRNV, c_TRNK	2	c_TRNY, c_5.8S_rRNA	1	c_HY3_scRNA	0	--	2	c_TRNP, c_tRNW
<p>⁽¹⁾ Количество повторов в списке топ 20 наиболее инвариантных классов РНК. Селекция: Cuffdiff p-value > 0,68, p-value с поправкой Бенджамини-Хохберга > 0,84).</p> <p>⁽²⁾ SINE – короткие диспергированные геномные повторы, к которым относятся Alu, FAM, FLAM, FRAM (консенсусные последовательности GIRI RepBase) и малая цитоплазматическая 7SL РНК (референсная последовательность NR_002715).</p> <p>⁽³⁾ Указанные в этой группе РНК относятся к последовательностям комплементарным мажорным клеточным рРНК, тРНК, U1-U12 мяРНК, 7SK РНК и hY1-hY5 мцРНК.</p>										

Таблица А.5. Наиболее представленные мажорные клеточные РНК (рРНК, тРНК, U1-U6, U12, U17 мяРНК, Y мцРНК и 7SK РНК) с инвариабельным распределением во фракциях крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ

I. Клетки крови				II. Плазма				III. 16 000 g осадок плазмы				IV. 160 000 g осадок плазмы				V. 160 000 g супернатант плазмы			
ID ⁽¹⁾	FPKM ⁽²⁾	Std ⁽²⁾	q ⁽³⁾	ID	FPKM	Std	q	ID	FPKM	Std	q	ID	FPKM	Std	q	ID	FPKM	Std	q
5S	1,3E7	5,5E6	0,76	TRNV	5,5E6	2,3E6	0,85	HY4	3,8E7	1,7E7	0,76	TRNQ	4,8E5	2,6E4	0,94	TRND	1,4E7	5,0E6	0,74
HY4	1,2E7	2,8E6	0,87	5S	5,1E6	2,3E6	0,77	TRNG	1,5E6	4,9E5	0,73	TRNG	4,3E5	6,6E4	0,85	TRNK	3,9E6	1,3E6	0,73
TRNV ⁽⁴⁾	2,6E6	1,1E6	0,71	TRNG	1,9E6	6,7E5	0,88	HY5	1,0E6	3,5E5	0,73	TRNR	1,7E5	2,1E4	0,88	HY5	3,7E6	1,0E6	0,75
TRNQ	1,3E6	7,0E5	0,71	HY5	1,7E6	8,4E5	0,77	TRNV	6,6E5	2,2E5	0,76	TRNM	1,1E5	2,5E4	0,80	TRNG	2,8E6	2,7E5	0,94
TRNR	4,7E5	2,5E5	0,71	5,8S	1,3E6	5,1E5	0,85	TRNM	1,9E5	5,5E4	0,81	TRNT	1,0E5	1,6E4	0,85	TRNQ	1,3E6	4,0E5	0,73
TRNT	2,5E5	8,3E4	0,83	TRNI	3,8E5	1,5E5	0,85	TRNR	1,5E5	3,2E4	0,85	18S	7,7E4	1,8E4	0,85	TRNM	8,5E5	1,8E4	0,98
TRNM	2,1E5	1,1E5	0,72	TRNP	2,0E5	6,4E4	0,83	TRNT	1,4E5	4,5E4	0,78	TRNA	7,6E4	2,1E4	0,72	TRNI	8,0E5	4,5E5	0,72
U6	1,4E5	4,1E4	0,83	TRNW	1,9E5	2,2E4	0,95	TRNW	4,9E4	2,2E4	0,73	TRNN	3,3E4	4,7E3	0,85	U1	1,4E5	6,8E4	0,72
TRNW	1,3E5	9,3E4	0,71	TRNR	5,6E4	5,3E3	0,97	TRNL	4,3E4	3,5E4	0,73	USE	7,5E3	2,1E3	0,70	U2	9,9E4	3,9E4	0,73
TRNP	7,2E4	1,1E4	0,92	TRNY	4,6E4	1,7E4	0,80	U2	1,6E4	7,6E3	0,76	7SK	3,3E2	9,9E0	0,96	USF	1,6E3	7,9E2	0,73
Коэффициент корреляции Пирсона (r)																			
ЗД:ПКРЛ	0,93			0,87				1,00				0,96				0,94			
ЗД:АКЛ	0,96			0,98				1,00				0,99				0,93			
ПКРЛ:АКЛ	0,80			0,93				1,00				0,95				0,99			
<p>⁽¹⁾ В таблице представлены топ 10 генов с максимальными значениями FPKM, выбранные по результатам сравнения наборов РНК фракций крови здоровых доноров (ЗД) и пациентов с плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ) и аденокарциномой легкого. Для сравнительного анализа использовали пакет программ Cuffdiff, для выбора инвариабельных форм РНК использовали критерий $q < 0,7$.</p> <p>⁽²⁾ Средние значения FPKM и стандартное отклонение (Std) среднего значения FPKM для фракций крови здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ, рассматриваемых как реплики. Данные отсортированы в порядке убывания значения средних значений FPKM, указанных для фракции.</p> <p>⁽³⁾ Минимальные значения q-value - p-value с поправкой Бенджамини-Хохберга для сравнений наборов значений FPKM здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ для каждой фракции крови с помощью CuffDiff.</p> <p>⁽⁴⁾ В таблице представлена наиболее репрезентативная изоформа тРНК.</p>																			

Таблица А.6. Наиболее представленные мРНК, отличающиеся инвариабельным распределением во фракциях крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ

I. Клетки крови				II. Плазма				III. 16 000 g осадок плазмы				IV. 160 000 g осадок плазмы				V. 160 000 g супернатант плазмы			
ID ⁽¹⁾	FPKM ⁽²⁾	Std ⁽²⁾	q ⁽³⁾	ID	FPKM	Std	q	ID	FPKM	Std	q	ID	FPKM	Std	q	ID	FPKM	Std	q
<i>PRKCH</i> ⁽⁴⁾	1,5E3	1,4E3	0,55	<i>PRKCH</i>	1,6E2	3,9E1	0,64	<i>PRKCH</i>	8,2E2	7,9E2	0,59	<i>CLIC2</i>	5,0E2	3,3E2	0,51	<i>TRIM41</i>	7,1E2	9,1E2	0,56
<i>ABCG1</i>	9,1E1	2,6E1	0,72	<i>TIGD6</i>	7,9E1	6,2E1	0,50	<i>HLA-A</i>	2,9E1	3,8E0	0,71	<i>MDH1</i>	4,4E2	3,2E2	0,56	<i>PRKCH</i>	4,1E2	4,2E2	0,55
<i>KLRC4</i>	6,7E1	1,3E1	0,59	<i>OAZ1</i>	4,3E1	1,1E1	0,54	<i>PIP4K2A</i>	2,6E1	8,1E0	0,66	<i>RPL10L</i>	4,1E2	1,8E2	0,57	<i>ZNF367</i>	4,1E2	2,1E2	0,65
<i>CLIC2</i>	6,2E1	2,1E1	0,66	<i>HLA-E</i>	3,2E1	8,1E0	0,66	<i>CALCR</i>	2,6E1	8,2E0	0,51	<i>TMEFF2</i>	3,0E2	1,7E2	0,55	<i>UQCRQ</i>	1,2E2	3,6E1	0,70
<i>RPL39</i>	6,0E1	1,1E1	0,56	<i>CHN2</i> ⁽⁵⁾	2,8E1	9,0E0	0,51	<i>PCMTD1</i>	2,5E1	6,2E0	0,63	<i>PPP1R15B</i>	2,8E2	1,3E2	0,72	<i>C19orf24</i>	7,1E1	1,8E1	0,55
<i>NR1H3</i> ⁽⁵⁾	5,9E1	1,7E1	0,57	<i>F13A1</i>	2,7E1	9,6E0	0,53	<i>ARPC2</i>	2,4E1	4,9E0	0,57	<i>CHRNA3</i>	2,8E2	1,2E2	0,58	<i>ZFR2</i>	6,8E1	4,1E1	0,51
<i>ZNF131</i>	5,5E1	1,2E1	0,64	<i>EIF1</i>	2,7E1	4,6E0	0,61	<i>FOXR1</i>	2,2E1	3,9E0	0,53	<i>C9orf100</i>	1,9E2	9,9E1	0,57	<i>OBSCN</i>	6,7E1	3,6E1	0,66
<i>CCNDBP1</i>	5,4E1	1,8E1	0,57	<i>HIST1H4H</i>	2,5E1	2,4E0	0,84	<i>HIST1H2BI</i>	2,1E1	2,8E0	0,71	<i>NCOA3</i>	1,7E2	6,2E1	0,69	<i>LRRC56</i>	5,9E1	5,0E0	0,92
<i>HLA-A</i>	4,8E1	1,2E1	0,60	<i>ZNF212</i>	2,4E1	4,1E0	0,74	<i>HIST1H2BD</i>	1,9E1	3,5E0	0,60	<i>UCHL3</i>	1,5E2	4,8E1	0,52	<i>HS3ST6</i>	5,1E1	1,6E1	0,50
<i>HLA-E</i>	4,6E1	2,0E1	0,51	<i>UCHL3</i>	2,3E1	3,9E0	0,59	<i>IGFL3</i>	1,9E1	3,7E0	0,55	<i>NHP2</i>	1,4E2	1,9E1	0,74	<i>MARVELD3</i>	4,7E1	2,0E1	0,55
Коэффициент корреляции Пирсона (r)																			
ЗД:ПКРЛ		0,97		0,97		1,00		0,56		0,55									
ЗД:АКЛ		0,96		0,75		1,00		0,55		0,19									
ПКРЛ:АКЛ		1,00		0,77		1,00		0,55		0,28									

⁽¹⁾ Для каждой фракции выбраны топ 10 мРНК по среднему значению FPKM.

⁽²⁾ Средние значения FPKM и стандартное отклонение (Std) среднего значения FPKM для фракций крови здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ, рассматриваемых как реплики. Данные отсортированы в порядке убывания значения средних значений FPKM, указанных для фракции.

⁽³⁾ Минимальные значения q -value - p -value с поправкой Бенджамини-Хохберга для сравнений наборов значений FPKM здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ для каждой фракции крови с помощью CuffDiff.

⁽⁴⁾ Подчеркиванием выделены мРНК, фрагменты которых встречаются в топ 10 инвариабельных мРНК, выявленных для двух и более фракций крови.

⁽⁵⁾ В таблице приведены данные для сплайс-изоформы мРНК с максимальным значением FPKM.

Таблица А.7. Инвариабельные длинные некодирующие РНК фракций крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ. Длинные некодирующие РНК - транскрипты с идентификатором NR в базе данных РНК RefSeq, длина которых > 200 н.

NR	ID	ФПКМ ⁽¹⁾	Std ⁽¹⁾	q ⁽²⁾
I. Клетки крови				
NR_003365	<i>SUGTIP3</i>	2,6E+02	1,2E+02	0,50
NR_027513	<i>CCNDBP1</i>	5,6E+01	1,9E+01	0,59
NR_027487	<i>LOC146880</i>	2,3E+01	5,8E+00	0,57
NR_001434	<i>HLA-H</i>	2,2E+01	2,5E+00	0,76
II. Плазма				
NR_003008	<i>SCARNA5</i>	5,2E+01	3,3E+00	0,89
NR_003674	<i>KGFLP1</i>	1,9E+01	3,2E+00	0,73
III. 16 000 g осадок плазмы				
NR_024058	<i>YWHAЕ</i>	3,7E+01	8,6E+00	0,56
IV. 160 000 g осадок плазмы				
NR_003051	<i>RMRP</i>	3,6E+03	8,7E+02	0,82
NR_002312	<i>RPPH1</i>	3,0E+03	1,5E+03	0,52
NR_015376	<i>NCRNA00200</i>	5,3E+02	3,9E+02	0,53
NR_027336	<i>LOC100130015</i>	4,9E+01	1,0E+01	0,66
NR_003034	<i>LOC441601</i>	4,6E+01	9,4E-01	0,95
NR_027232	<i>NCRNA00107</i>	4,5E+01	1,1E+01	0,52
NR_001593	<i>RPL18AP3</i>	4,3E+01	5,1E-01	0,97
NR_001560	<i>CYCSP52</i>	4,3E+01	7,2E+00	0,65
NR_003586	<i>EEF1A1P9</i>	4,3E+01	9,7E+00	0,58
NR_033902	<i>KIAA1967</i>	3,2E+01	1,1E+01	0,55
NR_003003	<i>SCARNA17</i>	3,1E+01	6,5E+00	0,54
NR_024391	<i>LOC647946</i>	3,1E+01	8,2E+00	0,55
NR_026877	<i>MGC2889</i>	3,1E+01	6,0E+00	0,64
NR_024444	<i>LOC100133985</i>	2,8E+01	2,4E+00	0,77
NR_029455	<i>LOC440335</i>	2,7E+01	6,3E+00	0,52
NR_027322	<i>LOC283070</i>	2,5E+01	1,8E+00	0,85
NR_027097	<i>LOC100271832</i>	2,4E+01	9,5E-01	0,89
NR_034140	<i>C12orf33</i>	2,2E+01	3,7E+00	0,63
NR_024531	<i>RPL23AP7</i>	2,2E+01	1,9E+00	0,81
NR_026911	<i>RPL21P28</i>	2,1E+01	4,4E+00	0,52
V. 160 000 g супернатант плазмы				
NR_003674	<i>KGFLP1</i>	2,7E+01	2,8E+00	0,86
NR_033425	<i>TSLP</i>	2,5E+01	4,8E+00	0,68
NR_003670	<i>KGFLP2</i>	2,2E+01	2,0E+00	0,90
NR_024020	<i>NOL8</i>	2,0E+01	9,9E+00	0,52
NR_033370	<i>LOC63930</i>	1,9E+01	1,6E+00	0,88
NR_003505	<i>PPP4R1L</i>	1,8E+01	4,4E+00	0,59
NR_034010	<i>SNHG8</i>	1,5E+01	2,8E+00	0,63
NR_033789	<i>SPRNPI</i>	1,3E+01	2,5E+00	0,57
NR_024618	<i>LOC100129550</i>	1,2E+01	2,0E+00	0,75
NR_026877	<i>MGC2889</i>	1,2E+01	2,4E+00	0,56
NR_024567	<i>LOC100130557</i>	1,2E+01	3,0E+00	0,52
NR_026863	<i>C21orf84</i>	1,2E+01	2,9E+00	0,51
NR_002837	<i>UBE2MP1</i>	1,1E+01	2,3E+00	0,55

⁽¹⁾ Средние значения ФПКМ и стандартное отклонение (Std) среднего значения ФПКМ для фракций крови здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ, рассматриваемых как реплики. Данные отсортированы в порядке убывания значения средних значений ФПКМ, указанных для фракции.

⁽²⁾ Минимальные значения q -value - p -value с поправкой Бенджамини-Хохберга для сравнений наборов значений ФПКМ здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ для каждой фракции крови с помощью CuffDiff.

Таблица А.8. Наиболее представленные инвариабельные микроРНК фракций крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ

I. Клетки крови				II. Плазма				III. 16 000 g осадок плазмы				IV. 160 000 g осадок плазмы				V. 160 000 g супернатант плазмы			
ID ⁽¹⁾	FPKM ⁽²⁾	Std ⁽²⁾	q ⁽³⁾	ID	FPKM	Std	q	ID	FPKM	Std	q	ID	FPKM	Std	q	ID	FPKM	Std	q
<u>MIR451</u> ⁽⁴⁾	9,8E7	1,6E8	0,35	<u>MIR16-2</u>	6,3E5	7,5E5	0,34	<u>MIR103-1</u>	5,9E6	6,4E6	0,55	<u>MIR451</u>	1,2E7	1,7E7	0,39	<u>MIR451</u>	7,7E7	1,2E8	0,34
<u>MIR16-1</u>	5,2E6	6,7E6	0,33	<u>MIR103-1</u>	5,8E5	2,6E5	0,68	<u>MIR103-2</u>	5,9E6	6,4E6	0,55	<u>MIR103-1</u>	4,2E5	2,5E5	0,37	<u>MIR103-1</u>	1,1E6	9,3E5	0,36
<u>MIR16-2</u>	4,5E6	4,9E6	0,35	<u>MIR103-2</u>	5,7E5	2,6E5	0,68	<u>MIR126</u>	1,2E6	1,7E6	0,45	<u>MIR103-2</u>	4,2E5	2,5E5	0,37	<u>MIR103-2</u>	1,1E6	9,2E5	0,36
<u>MIR103-2</u>	3,8E6	2,9E6	0,66	<u>MIR16-1</u>	5,0E5	4,9E5	0,34	<u>MIR26A1</u>	7,9E5	1,1E6	0,34	<u>MIR223</u>	3,1E5	1,7E5	0,63	<u>MIR223</u>	1,0E6	1,2E6	0,35
<u>MIR103-1</u>	3,8E6	2,9E6	0,66	<u>MIR223</u>	2,6E5	2,2E5	0,63	<u>MIR26A2</u>	6,1E5	8,7E5	0,34	<u>MIR126</u>	2,1E5	9,6E4	0,43	<u>MIR16-1</u>	1,0E6	1,1E6	0,35
<u>MIR126</u>	1,4E6	1,1E6	0,51	<u>MIR107</u>	1,2E5	1,1E5	0,33	<u>MIR24-1</u>	5,7E5	6,7E5	0,36	<u>MIR425</u>	3,7E4	1,5E4	0,45	<u>MIR16-2</u>	9,1E5	1,1E6	0,35
<u>MIR144</u>	1,2E6	2,0E6	0,34	<u>MIR140</u>	1,1E5	1,4E5	0,35	<u>MIR107</u>	5,4E5	6,6E5	0,33	<u>MIR122</u>	2,3E4	8,9E3	0,33	<u>MIR126</u>	5,2E5	4,4E5	0,37
<u>MIR486</u>	7,3E5	6,7E5	0,45	<u>MIR191</u>	9,8E4	1,1E5	0,35	<u>MIRLET7F2</u>	4,8E5	4,2E5	0,34	<u>MIR130B</u>	6,2E3	1,2E3	0,52	<u>MIR19B1</u>	2,6E5	2,6E5	0,34
<u>MIR19A</u>	7,2E5	1,2E6	0,35	<u>MIR20B</u>	1,1E4	1,1E4	0,32	<u>MIR21</u>	3,0E5	2,1E5	0,54	<u>MIR197</u>	5,1E3	1,4E3	0,47	<u>MIR101-1</u>	4,1E4	3,6E4	0,31
<u>MIR107</u>	5,0E5	4,5E5	0,46	<u>MIR23B</u>	1,0E4	2,8E3	0,39	<u>MIR24-2</u>	2,8E5	3,3E5	0,35	<u>MIR30E</u>	4,8E3	1,4E3	0,33	<u>MIR106B</u>	3,9E4	4,2E4	0,31
<u>MIR17</u>	4,0E5	6,2E5	0,34	<u>MIR320C1</u>	3,1E3	2,7E3	0,30	<u>MIR142</u>	2,7E5	4,1E5	0,33	<u>MIR551B</u>	1,9E3	1,9E2	0,77	<u>MIR101-2</u>	3,5E4	3,1E4	0,31
<u>MIR223</u>	3,9E5	4,8E5	0,39	<u>MIR146A</u>	2,9E3	8,3E2	0,42	<u>MIR23A</u>	2,7E5	2,6E5	0,38					<u>MIR221</u>	2,2E4	2,4E4	0,35
<u>MIR185</u>	3,3E5	3,2E5	0,34	<u>MIR199B</u>	1,5E3	3,2E2	0,59	<u>MIRLET7F1</u>	2,6E5	2,4E5	0,32					<u>MIRLET7I</u>	1,4E4	1,3E4	0,33
<u>MIR142</u>	2,7E5	2,6E5	0,33	<u>MIR766</u>	1,1E3	5,4E2	0,31	<u>MIR17</u>	2,0E5	2,9E5	0,31					<u>MIR106A</u>	7,1E3	6,6E3	0,33
<u>MIR29B2</u>	2,5E5	3,9E5	0,31	<u>MIR320B2</u>	5,1E2	2,3E2	0,36	<u>MIR425</u>	1,7E5	2,4E5	0,33					<u>MIR194-1</u>	4,3E3	3,7E3	0,35
<u>MIR29B1</u>	2,4E5	3,8E5	0,31					<u>MIR130A</u>	1,6E5	2,3E5	0,31					<u>MIR96</u>	2,9E3	2,7E3	0,31
<u>MIR130A</u>	1,9E5	3,1E5	0,32					<u>MIR19B1</u>	1,6E5	2,1E5	0,34					<u>MIR744</u>	1,4E3	1,2E3	0,31
<u>MIR320A</u>	3,6E4	1,1E4	0,53					<u>MIR23B</u>	1,4E5	1,6E5	0,35					<u>MIR148B</u>	1,2E3	1,0E3	0,31
<u>MIR339</u>	8,1E3	7,2E3	0,33					<u>MIR192</u>	3,7E4	6,1E4	0,30								
<u>MIR145</u>	2,7E3	2,3E3	0,33																
<u>MIR326</u>	1,4E3	2,1E2	0,67																
Коэффициент корреляции Пирсона (r)																			
ЗД:ПКРЛ	0,68			0,68				0,73				0,98				0,99			
ЗД:АКЛ	0,94			0,91				0,76				0,96				0,99			
ПКРЛ:АКЛ	0,72			0,47				0,99				0,99				0,97			

⁽¹⁾ Список инвариабельных микроРНК фракций крови I-V, выбранных как формы РНК со значением Cuffdiff q -value > 0,3 и общим количеством идентифицированных ридов не менее 50.

⁽²⁾ Средние значения FPKM и стандартное отклонение (Std) среднего значения FPKM для фракций крови здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ, рассматриваемых как реплики. Данные отсортированы в порядке убывания значения средних значений FPKM, указанных для фракции.

⁽³⁾ Минимальные значения q -value - p -value с поправкой Бенджамини-Хохберга для сравнений наборов значений FPKM здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ для каждой фракции крови с помощью CuffDiff.

⁽⁴⁾ Подчеркиванием выделены микроРНК, присутствующие в топ инвариабельных микроРНК как минимум трех фракций крови.

Таблица А.9. Наиболее представленные С/Д бокс и Н/АСА бокс малые ядрышковые РНК с инвариабельным распределением во фракциях крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ

I. Клетки крови				II. Плазма				III. 16 000 g осадок плазмы				IV. 160 000 g осадок плазмы				V. 160 000 g супернатант плазмы			
ID ⁽¹⁾	ФПКМ ⁽²⁾	Std ⁽²⁾	q ⁽³⁾	ID	ФПКМ	Std	q	ID	ФПКМ	Std	q	ID	ФПКМ	Std	q	ID	ФПКМ	Std	q
SNORD34	1,3E6	2,2E6	0,34	SNORD84	2,8E+04	1,3E+04	0,32	SNORD33	5,1E3	4,5E3	0,31	SNORD84	5,3E4	3,1E4	0,35	SNORD31	3,7E5	6,0E5	0,36
SNORD27	5,1E5	8,6E5	0,33	SNORD80	1,2E+04	1,0E+04	0,30	SNORA14B	5,7E2	1,9E2	0,42	SNORD38A	2,9E4	1,9E3	0,84	SNORD25	2,5E5	4,4E5	0,35
SNORD84 ⁽⁴⁾	2,9E5	1,3E5	0,44	SNORD32A	7,6E+03	6,6E+03	0,33					SNORD100	1,8E4	1,9E3	0,77	SNORD27	2,2E5	3,8E5	0,35
SNORD46	1,5E4	1,4E4	0,33	SNORD21	2,3E+03	1,1E+03	0,35					SNORD34	1,8E4	5,7E3	0,55	SNORD22	1,1E4	1,0E4	0,34
SNORA54	6,7E3	6,2E3	0,33	SNORD15A	8,0E+02	1,2E+02	0,66					SNORD22	1,2E4	4,5E3	0,34	SNORD67	1,3E3	2,7E2	0,54
SNORD114	4,8E3	8,2E2	0,57	SNORA75	6,8E+02	1,1E+02	0,73					SNORD104	8,3E3	3,8E3	0,39	SNORD94	1,2E3	3,3E2	0,39
SNORA61	2,9E3	2,6E3	0,33									SNORD29	5,4E3	8,1E2	0,74	SNORA14A	4,0E2	8,7E1	0,73
SNORA19	2,6E3	6,2E2	0,40									SNORD38B	4,3E3	1,0E3	0,56	SNORD15A	2,2E2	1,3E2	0,30
SNORA62	2,0E3	1,9E3	0,33									SNORD35A	2,3E3	4,1E2	0,63				
SNORA52	1,8E3	1,5E3	0,33									SNORA63	1,2E3	4,0E2	0,37				
SNORA9	7,3E2	6,2E2	0,33									SNORD67	9,8E2	3,7E2	0,32				
												SNORA17	4,7E2	1,9E2	0,30				
												SNORA48	4,6E2	1,3E2	0,51				
												SNORA71A	4,4E2	1,2E2	0,63				
												SNORA57	3,5E2	1,8E2	0,34				
												SNORA6	3,3E2	1,2E2	0,35				
												SNORA53	5,6E1	1,7E1	0,44				
Коэффициент корреляции Пирсона (r)																			
ЗД:ПКРЛ	1,00			0,53				--				0,98				0,65			
ЗД:АКЛ	1,00			0,83				--				0,96				0,85			
ПКРЛ:АКЛ	0,99			0,91				--				0,99				0,94			
<p>⁽¹⁾ Список инвариабельных мяоРНК фракций крови здоровых доноров (ЗД) и пациентов с плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ) и аденокарциномой легкого (АКЛ), выбранных как формы РНК со значением Cuffdiff q-value > 0,3 и общим количеством идентифицированных ридов не менее 100.</p> <p>⁽²⁾ Средние значения ФПКМ и стандартное отклонение (Std) среднего значения ФПКМ для фракций крови здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ, рассматриваемых как реплики. Данные отсортированы в порядке убывания значения средних значений ФПКМ, указанных для фракции.</p> <p>⁽³⁾ Минимальные значения q-value - p-value с поправкой Бенджамини-Хохберга для сравнений наборов значений ФПКМ здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ для каждой фракции крови с помощью CuffDiff.</p> <p>⁽⁴⁾ SNORD84 представлена в топ инвариабельных мяоРНК клеток крови, плазмы и частиц плазмы, осаждаемых при 160 000 g.</p>																			

Таблица А.10. Наиболее представленные инварибельные РНК, неаннотированные в базе данных РНК человека RefSeq (non-RefSeq), идентифицированные для фракций крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ (фрагменты интронов пре-мРНК, днРНК и новых транскриптов).

I. Клетки крови			II. Плазма			III. 16 000 g осадок плазмы			IV. 160 000 g осадок плазмы			V. 160 000 g супернатант плазмы		
Chr ⁽¹⁾	FPKM ⁽²⁾	Std ⁽²⁾	Chr	FPKM	Std	Chr	FPKM	Std	Chr	FPKM	Std	Chr	FPKM	Std
chr8[+]12751238-12751281	8,2E7	2,9E7	chrX[+]120612032-120612062	1,8E7	1,1E7	chr4[+]186518885-186518942	6,8E7	3,2E7	chr2[-]28688454-28688543	7,5E8	5,0E8	chr7[+]106008992-106009055	1,9E8	1,2E8
chr4[-]190968942-190968967	6,9E7	2,9E7	chr1[-]8053517-8053562	1,7E7	4,4E6	chr9[-]131641128-131641163	6,2E7	4,1E7	chr13[-]29401239-29401304	2,3E8	1,1E8	chr10[-]129916968-129917004	1,9E8	1,3E8
chr10[-]135460779-135460804	6,4E7	2,6E7	chr3[+]857189-857263	1,7E7	1,0E7	chrX[-]131244850-131244874	6,0E7	3,5E7	chr19[-]24187279-24187313	1,8E8	6,3E7	chr8[-]104001494-104001575	1,8E8	1,1E8
chr2[-]224644694-224644813	4,5E7	1,9E7	chr7[+]34253855-34253942	1,6E7	8,9E6	chr7[-]24224242-24224292	5,5E7	8,0E6	chr17[-]3989516-3989581	1,8E8	1,0E8	chr12[+]123449033-123449056	1,6E8	6,1E7
chr10[-]60691390-60691418	4,3E7	2,5E7	chr12[-]5022311-5022331	1,6E7	5,4E6	chrY[-]25833919-25833969	5,5E7	8,0E6	chr4[+]134994298-134994322	1,6E8	3,9E7	chr12[+]78353818-78353840	1,2E8	5,3E7
chr1[-]183949763-183949807	3,8E7	2,2E7	chr20[-]41004960-41005077	1,2E7	4,8E6	chr21[-]24341920-24341947	4,6E7	1,7E7	chr12[+]78353818-78353840 ⁽³⁾	1,3E8	3,7E7	chr5[-]155785942-155785993	9,2E7	5,3E7
chr16[-]16982934-16982961	3,6E7	1,4E7	chr15[+]58251879-58251992	1,1E7	1,4E6	chr6[-]144210182-144210221	4,4E7	1,4E7	chr18[-]21707456-21707476	1,1E8	7,4E7	chr12[-]126701820-126701923	9,0E7	3,9E7
chr5[-]74063376-74063516	3,5E7	1,5E7	chr1[-]111708389-111708411	1,1E7	5,7E6	chr9[+]129123637-129123704	4,3E7	1,4E7	chr1[-]87222201-87222238	1,1E8	6,0E7	chr6[+]132015523-132015683	8,7E7	1,1E7
chr22[-]36301696-36301718	3,4E7	1,6E7	chr18[-]7745099-7745133	1,1E7	6,6E6	chr3[-]25177183-25177216	3,4E7	1,4E7	chr16[-]32696379-32696407	1,1E8	6,8E7	chr19[+]45361161-45361250	7,7E7	4,7E7
chr1[-]215515108-215515196	3,2E7	1,3E7	chr7[-]65637753-65637775	8,5E6	2,8E6	chr7[-]146153014-146153086	3,0E7	1,9E7	chr13[+]113415433-113415464	1,1E8	2,7E7	chr1[+]193231400-193231565	6,3E7	4,1E7

⁽¹⁾ Для каждой фракции крови в списке представлены топ 10 инварибельных форм non-RefSeq РНК, для которых соотношение среднего значения FPKM к стандартному отклонению (Std) составляет > 1,5.

⁽²⁾ Средние значения FPKM и Std среднего значения FPKM для фракций крови здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ, рассматриваемых как реплики. Данные отсортированы в порядке убывания значения средних значений FPKM, указанных для фракции.

⁽³⁾ Подчеркиванием выделены перекрывающиеся формы.

Таблица А.11. Наиболее представленные дифференциально распределенные транскрипты фракций крови пациентов с плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ)

Фракция	Изменение	ID	ФПКМ1 ⁽¹⁾ ЗД	ФПКМ2 ⁽¹⁾ ПКРЛ	log ₂	q ⁽²⁾	Общее количество ⁽³⁾ NM/miR/sno/другие ⁽⁴⁾
I. Клетки крови	Повышение	MIR214	4,4E2	1,3E4	4,9	0,050	38 29/7/0/1
		MIR766	6,8E2	1,5E4	4,4	0,020	
		MRPS33	9,1E0	1,3E2	3,9	0,048	
		MIB2 NR_033183	2,0E0	2,7E1	3,8	0,013	
		SNCB ⁽⁵⁾	5,5E0	7,6E1	3,8	0,038	
		NIT1	3,1E0	3,7E1	3,6	0,043	
		TRAPPC2L	7,4E0	8,9E1	3,6	0,040	
		ARHGAP11B	3,5E0	3,9E1	3,5	0,040	
		HCFC1R1	5,4E0	6,0E1	3,5	0,036	
	MIR197	4,4E3	4,7E4	3,4	0,043		
	Понижение	IFNA17	5,9E1	3,3E0	-4,2	0,032	97 27/21/40/9
		SNORD82	4,8E4	2,3E3	-4,4	0,032	
		SNORD42A	1,2E5	5,5E3	-4,4	0,040	
		IFNA10	6,2E1	2,7E0	-4,5	0,027	
		RPL17	1,8E2	7,7E0	-4,5	0,040	
		C17orf91	1,0E2	3,6E0	-4,8	0,035	
		SNORA31	8,9E3	2,6E2	-5,1	0,044	
		SCARNA9	4,7E2	1,2E1	-5,3	0,046	
		MIR106A	5,6E4	1,3E3	-5,4	0,044	
C17orf91	1,1E2	2,4E0	-5,5	0,032			
II. Плазма	Повышение	SLAMF9	7,0E0	5,0E1	2,8	0,038	15 10/2/1/2
		TBC1D17	6,9E0	3,2E1	2,2	0,028	
		OVCA2	1,2E1	5,1E1	2,1	0,025	
		SSBP4	6,4E0	2,7E1	2,1	0,029	
		CCNB3	8,5E0	3,5E1	2,0	0,045	
		ACSM3	1,0E1	4,0E1	2,0	0,035	
		GIMAP5	1,1E1	4,6E1	2,0	0,048	
		LOC285074	7,9E0	2,7E1	1,8	0,039	
	Понижение	MIR26B	4,2E4	1,9E3	-4,5	0,039	147 96/23/5/23
		MIR29B2	4,5E4	1,9E3	-4,5	0,033	
		MIR17	1,0E5	4,0E3	-4,7	0,019	
		MIR25	4,4E4	1,7E3	-4,7	0,033	
		NPY	4,2E2	1,3E1	-5,0	0,025	
		MIR15B	6,2E4	1,8E3	-5,1	0,009	
		MIR101-2	6,5E4	1,7E3	-5,2	0,035	
SNORD34		2,4E5	3,3E3	-6,2	0,032		
MIR15A	1,2E5	1,5E3	-6,3	0,041			
MIR451	1,6E7	1,6E5	-6,7	0,009			
III. 16 000 g осадок плазмы	Повышение	SLC26A5	4,5E0	7,4E1	4,0	0,004	94 54/24/3/13
		LOC340357	9,6E0	1,0E2	3,4	0,004	
		MIR620	1,2E3	1,1E4	3,2	0,032	
		KDM4C	6,1E0	5,2E1	3,1	0,029	
		LOC284412	8,1E0	6,8E1	3,1	0,024	
		MIR421	3,5E3	2,9E4	3,0	0,005	
		RAB4B	1,5E1	1,0E2	2,8	0,010	
		TXNDC11	8,0E0	5,5E1	2,8	0,028	
		CCNB3	9,0E0	6,1E1	2,8	0,004	
		IL18	5,8E0	3,9E1	2,7	0,017	
	Понижение	VTRNA1-2	2,6E4	2,1E3	-3,6	0,013	273 221/14/7/31
		MIR144	6,3E4	4,9E3	-3,7	0,004	
		MIRLET7A3	1,6E5	1,2E4	-3,7	0,013	
		NCRNA00173	2,0E2	1,4E1	-3,8	0,016	
		SF1	4,2E1	2,8E0	-3,9	0,004	

Продолжение Таблицы А.11

Фракция	Изменение	ID	ФРКМ1 ⁽¹⁾ ЗД	ФРКМ2 ⁽¹⁾ ПКРЛ	log ₂	q ⁽²⁾	Общее количество ⁽³⁾ NM/miR/sno/другие ⁽⁴⁾
		<i>NCRNA00114</i>	1,7E2	1,1E1	-3,9	0,010	
		<i>SNORD31</i>	1,6E5	9,7E3	-4,0	0,004	
		<i>CGB1</i>	2,0E2	1,1E1	-4,1	0,004	
		<i>RPL9</i>	5,2E2	2,9E1	-4,2	0,046	
		<i>CSN3</i>	2,9E2	1,4E1	-4,3	0,004	
V. 160,000 g супернатант плазмы	Повышение	<i>MIR524</i>	0,0E0	5,2E4	n/d ⁽⁶⁾	0,028	1 0/1/0/0
	Понижение	<i>EPPK1</i>	1,4E3	1,3E1	-6,8	0,028	13 1/3/9/0
		<i>MIR1306</i>	2,0E3	0,0E0	n/d	0,028	
		<i>SNORD103B</i>	3,7E3	0,0E0	n/d	0,028	
		<i>SNORD49A</i>	5,5E3	0,0E0	n/d	0,028	
		<i>SNORD36C</i>	7,6E3	0,0E0	n/d	0,028	
		<i>MIR369</i>	1,3E4	0,0E0	n/d	0,028	
		<i>SNORD28</i>	1,3E4	0,0E0	n/d	0,028	
		<i>MIR3182</i>	3,1E4	0,0E0	n/d	0,028	
<i>SNORD48</i>	4,8E4	0,0E0	n/d	0,028			

⁽¹⁾ В данной таблице представлены результаты попарного сравнения профилей РНК фракций крови здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ. Для сравнения использовали пакет программ Cuffdiff с параметром «cutoff 100». Для каждой фракции представлены транскрипты, отличающиеся повышенным и пониженным содержанием. Данные сортированы в порядке убывания log₂.

⁽²⁾ Минимальные значения *q*-value - *p*-value с поправкой Бенджамини-Хохберга для сравнений наборов значений ФРКМ здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ для каждой фракции крови с помощью CuffDiff.

⁽³⁾ Суммарное количество дифференциальных форм РНК (с увеличенным и пониженным вкладом), выявленных для каждой фракции при сравнении образцов здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ.

⁽⁴⁾ Общее количество мРНК/микроРНК/мяРНК/других нкРНК (включая днРНК, мтРНК, транскрибируемые геномные повторы рРНК, тРНК, мяРНК, мцРНК), отличавшихся повышенным или повышенным содержанием во фракциях крови здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ.

⁽⁵⁾ Для мРНК, имеющих несколько сплайс-изоформ, в таблице представлена изоформа с наибольшим значением log₂ разницы сравнения ФРКМ.

⁽⁶⁾ В случае низкой представленности индивидуальной формы РНК во фракции (нулевого значения ФРКМ), значение log₂ не определяли (n/d). Данные сортированы по ненулевым значениям ФРКМ.

Таблица А.12. Наиболее представленные дифференциально распределенные транскрипты фракций крови пациентов с аденокарциномой легкого (АКЛ)

Фракция	Изменение	ID	ФПКМ1 ⁽¹⁾ ЗД	ФПКМ2 ⁽¹⁾ АКЛ	log ₂	q ⁽²⁾	Общее количество ⁽³⁾ NM/miR/sno/другие ⁽⁴⁾
I. Клетки крови	Повышение	MIR517A	0,0E0	3,6E3	n/d ⁽⁵⁾	0,020	1 0/1/0/0
		Понижение	CCL24 ⁽⁶⁾	5,8E1	0,0E0	n/d	0,020
	SNORA49		1,1E3	0,0E0	n/d	0,020	
	SNORD116-24		1,4E3	0,0E0	n/d	0,020	
	SNORD72		6,4E3	0,0E0	n/d	0,020	
	MIR301B		7,5E3	0,0E0	n/d	0,020	
	MIRLET7E		9,2E3	0,0E0	n/d	0,020	
	SNORD78		1,0E4	0,0E0	n/d	0,020	
	MIR32	6,4E4	0,0E0	n/d	0,020		
TRNR ⁽⁷⁾	1,0E7	1,8E5	-5,7	0,002			
II. Плазма	Повышение	MIR296	0,0E0	6,9E3	n/d	0,006	2 1/1/0/0
		METT5D1	3,4E1	8,3E3	7,9	0,041	
	Понижение	TRND ⁽⁷⁾	3,0E5	0,0E0	n/d	0,027	61 17/3/26/15
		VTRNA1-1	5,3E4	0,0E0	n/d	0,006	
		SNORD81	5,2E4	0,0E0	n/d	0,018	
		SNORD38B	3,2E4	0,0E0	n/d	0,006	
		SNORD75	3,1E4	0,0E0	n/d	0,008	
		MIR3607	2,9E4	0,0E0	n/d	0,008	
		MIR3182	2,7E4	0,0E0	n/d	0,006	
		SNORD73A	2,7E4	0,0E0	n/d	0,016	
		SNORD2	2,4E4	0,0E0	n/d	0,006	
SNORD38A	1,8E4	0,0E0	n/d	0,006			
SNORD58B	1,8E4	0,0E0	n/d	0,006			
III. 16 000 g осадок плазмы	Повышение	MIR194-1	0,0E0	1,1E4	n/d	0,029	4 0/3/0/3
		MIR933	0,0E0	2,1E4	n/d	0,029	
		MIR4270	0,0E0	4,4E4	n/d	0,029	
		D-loop ⁽⁷⁾	4,5E2	1,2E4	4,7	0,006	
	Понижение	RPS15A	4,7E1	0,0E0	n/d	0,046	4 1/1/0/2
		AluYc1	1,0E4	0,0E0	n/d	0,008	
IV. 160 000 g осадок плазмы	Повышение	SNORD113	0,0E0	2,7E3	n/d	0,041	4 0/1/2/1
		SNORD78	0,0E0	1,2E4	n/d	0,041	
		MIR520A	0,0E0	2,5E3	n/d	0,041	
		D-loop ⁽⁷⁾	5,6E2	5,9E3	3,4	0,049	
	Понижение	DEFB109P1	2,0E2	0,0E0	n/d	0,019	12 1/7/2/2
		SNORA33	1,4E3	0,0E0	n/d	0,019	
		SNORD1B	2,8E3	0,0E0	n/d	0,019	
		MIR596	2,8E3	0,0E0	n/d	0,035	
		MIR3154	4,6E3	0,0E0	n/d	0,019	
		MIR134	5,4E3	0,0E0	n/d	0,019	
MIR3124	6,9E3	0,0E0	n/d	0,019			
MIR510	9,7E3	0,0E0	n/d	0,019			
MIR409	9,8E3	0,0E0	n/d	0,019			
MIR449B	3,8E4	0,0E0	n/d	0,019			
c_tRNA-Pro ⁽⁸⁾	4,0E5	0,0E0	n/d	0,016			
V. 160 000 g супернатант плазмы	Повышение	SNORD113	0,0E0	2,4E3	n/d	0,035	5 0/3/1/1
		MIR598	0,0E0	1,2E3	n/d	0,020	
		MIR642A	0,0E0	1,2E3	n/d	0,020	
		MIR1301	0,0E0	2,6E3	n/d	0,009	
		FLJ41278	3,1E1	5,3E4	10,7	0,04	
	Понижение	MIR374C	9,5E3	0,0E0	n/d	0,009	69 7/19/37/6
		SNORD50A	9,6E3	0,0E0	n/d	0,005	
		SNORD18A	1,0E4	0,0E0	n/d	0,012	

Продолжение Таблицы А.12

Фракция	Изменение	ID	ФРКМ1 ⁽¹⁾ ЗД	ФРКМ2 ⁽¹⁾ АКЛ	log ₂	q ⁽²⁾	Общее количество ⁽³⁾ NM/miR/sno/другие ⁽⁴⁾
		<i>MIR409</i>	1,3E4	0,0E0	n/d	0,005	
		<i>MIR376C</i>	1,3E4	0,0E0	n/d	0,005	
		<i>SNORD59B</i>	2,0E4	0,0E0	n/d	0,005	
		<i>SNORD48</i>	2,6E4	0,0E0	n/d	0,005	
		<i>SNORD81</i>	4,9E4	0,0E0	n/d	0,012	
		<i>SNORD29</i>	5,9E4	0,0E0	n/d	0,005	
		<i>TRND⁽⁷⁾</i>	1,3E6	0,0E0	n/d	0,021	

⁽¹⁾ В данной таблице представлены результаты попарного сравнения профилей РНК полученных для фракций крови здоровых доноров и пациентов с АКЛ. Для сравнения использовали пакет программ Cuffdiff с параметром «cutoff 100». Для каждой фракции представлены транскрипты, отличающиеся повышенным и пониженным содержанием. Данные сортированы в порядке убывания log₂.

⁽²⁾ Минимальные значения q -value - p -value с поправкой Бенджамини-Хохберга для сравнений наборов значений ФРКМ здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ и АКЛ для каждой фракции крови с помощью CuffDiff.

⁽³⁾ Суммарное количество дифференциальных форм РНК (с увеличенным и пониженным вкладом), выявленных для каждой фракции при сравнении образцов здоровых доноров и пациентов с АКЛ.

⁽⁴⁾ Общее количество мРНК/микроРНК/мяоРНК/других нкРНК (включая днРНК, мтРНК, транскрибируемые геномные повторы рРНК, тРНК, мяРНК, мцРНК), отличавшихся повышенным или повышенным содержанием во фракциях крови здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ.

⁽⁵⁾ Для мРНК, имеющих несколько сплайс-изоформ, в таблице представлена изоформа с наибольшим значением log₂ разницы сравнения ФРКМ.

⁽⁶⁾ В случае низкой представленности индивидуальной формы РНК во фракции (нулевого значения ФРКМ), значение log₂ не определяли (n/d). Данные сортированы по ненулевым значениям ФРКМ.

⁽⁷⁾ Митохондриальные транскрипты.

⁽⁸⁾ Транскрибируемые геномные повторы.