

УДК (57.052+57.053+577.25):612.829

МИКРОРНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ТЕРАПИИ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ**Л.Н. Гринкевич***Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

В связи с увеличением продолжительности жизни населения планеты, ухудшением экологии и значительными стрессовыми нагрузками наблюдается рост заболеваний сопровождающихся когнитивными нарушениями. В связи с этим, актуальнейшим направлением научных исследований становится изучение молекулярных механизмов обучения и долговременной памяти. В последние годы в этой области знаний осуществлен значительный прорыв главным образом, связанный с развитием относительно новой области науки – эпигенетики. Показано, что эпигенетические метки (метилование ДНК, посттранскрипционные модификации гистонов, или экспрессия определенных микроРНК) определяют какие гены и в каких структурах будут экспрессироваться, в том числе, и в ответ на изменение окружающей среды. Проведенные широкомасштабные исследования показывают что эпигенетические процессы играют и важную роль в формировании долговременной памяти и их дисфункция приводит к различным когнитивным нарушениям [1]. В данном докладе основное внимание будет уделено роли микроРНК в обучении и памяти и потенциальной возможности улучшения когнитивных функций через воздействие на биогенез микроРНК при нейродегенеративных, неврологических и возрастных дисфункциях.

микроРНК это высоко консервативные, небольшие молекулы РНК (22–24 нуклеотида) каждая из которых может регулировать экспрессию сотен генов через репрессию, или деградацию их матричных РНК (мРНК). Таким образом, нарушение регуляции даже одной микроРНК может оказывать значительный системный эффект. Наиболее высок и разнообразен уровень экспрессии микроРНК в ЦНС (уже идентифицированы сотни). В последние годы было показано что этот регуляторный эпигенетический путь активно вовлекается и в формирование долговременной памяти [2]. Причем нарушение биогенеза отдельных микроРНК может являться причиной когнитивных нарушений [3]. Кроме того, микроРНК выходя во внеклеточное пространство могут служить межклеточными коммуникаторами и потенциально биомаркерами для диагностики болезней [4].

С нарушением экспрессии микроРНК связывают развитие таких психоневрологических расстройств как, шизофрения, расстройства аутистического спектра, синдром дефицита внимания, эпилепсия, и синдром Туретта. Наиболее полно в этой связи изучена шизофрения, которая является генетически сложным заболеванием, включающим несколько генов и часто связана с когнитивными нарушениями, в патогенез которых в значительной мере вовлекаются и микроРНК [5]. Так, психиатрический консорциум GWAS по шизофрении (PGC) идентифицировал полиморфизм rs1625579 в гене MIR137, который кодирует микроРНК miR-137, как самую сильную новую ассоциацию с шизофренией что предполагает ее дальнейшее использование в качестве мишени для терапии [5]. Кроме того, данная микроРНК, а также miR-22–3p, miR-92a–3p детектируется в периферической крови, и их комбинация может служить биомаркером для выявления шизофрении [6]. Биоинформационный анализ их мишеней показал, что комбинация miR-22–3p, miR-92a–3p и miR-137 тесно связана с синаптической структурой и функцией, которые играют важную роль в этиологии и патофизиологии данного заболевания [6]. Однако, точные профили изменений в miRNA у пациентов с шизофренией и их связь с прогнозом остаются в основном неизвестными, тем не менее выражаются надежды что с дальнейшим накоплением знаний и развитием технологий редактирования геномов эти сложности удастся преодолеть [7]. Так, благодаря использованию CRISPR-опосредованных технологий были обнаружены синергетические эффекты распространенных вариантов риска шизофрении [8], что может быть важным для разработки способов терапии.

Важнейшую роль микроРНК играют и в нейродегенеративных патологиях, таких как болезни Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона которые в значительной мере ассоциируются с когнитивными дисфункциями. К настоящему времени уже идентифицированы десятки микроРНК и сотни их генов мишеней в той или иной мере связанными с нейродегенеративными заболеваниями [9–13]. И что важно, обнаружены микроРНК (miR-9–5p, miR-21–5p, семейство miR-29, miR-132–3p, miR-124–3p, miR-146a–5p, miR-155–5p и miR-223–3p), которые чаще всего дисрегулировались при данных патологиях, и вовлеченных в механизмы нейродегенерации.

Полагают, что полученные данные будут способствовать познанию молекулярных механизмов, лежащих в основе нейродегенерации с дальнейшей возможностью ее протекции [9]. В настоящее время также разрабатываются подходы с применением микроРНК для лечения болезни Хантингтона направленные на подавление мутантного гена хантингтина (НТТ) [10]. При этом, генная терапия разрабатывается на основе однократного введения пациенту аденоассоциированного вирусного (AAV) вектора, содержащего предшественник микроРНК, с целью уменьшения общей трансляции НТТ в клетках-мишенях.

В связи с моногенностью болезни Хантингтона ожидается прогресс в его лечении в достаточно обозримое время. В настоящее время проводятся доклинические исследования на животных и клеточных моделях.

Кроме того, идентифицирован также целый ряд микроРНК связанных со старением и развитием старческой деменции. Более того, часть этих микроРНК циркулирует во внеклеточных жидкостях и потенциально способна служить биомаркерами для диагностики и прогнозирования когнитивных нарушений [11, 12]. С другой стороны, появились исследования, свидетельствующие о том, что изменение экспрессии некоторых микроРНК при старении могут выполнять и адаптивные функции, в частности miR-29 [13].

В связи со сложностью устройства ЦНС, многообразием клеточных элементов с уникальным спектром микроРНК в них, функции микроРНК изучены еще очень фрагментарно, что затрудняет решение прикладных задач, связанных с воздействием на микроРНК. Оптимизм в данной области определяется появлением технологий редактирования, активации и репрессии генов с применением системы CRISPR/Cas9. CRISPR/Cas9-технологии созданы для разрезания ДНК и удаления или вставки нужных генов в нужном месте. Для чего используется система редактирующая иммунитет у бактерий. Точность доставки обеспечивает молекула РНК-гида, комплементарная нужному участку ДНК. Белок Cas9 обеспечивает разрез ДНК. Более того CRISPR/Cas9 система была приспособлена для эпигенетической регуляции экспрессии генов [14]. Создан каталитически неактивный белок Cas9, не способный делать разрез, но способный доставлять на определенный участок геномной ДНК регуляторные белки, либо ферменты регулирующие эпигенетические модификации ДНК и гистонов. Точность доставки также обеспечивает молекула РНК-гида. Таким образом любой ген, в том числе и кодирующий микроРНК предшественники, может быть обратимо активирован или репрессирован по замыслу экспериментатора [14]. Найдены и аналоги белка Cas9, способные расщеплять вместо ДНК молекулы РНК, что позволяет избирательно выключать любые микроРНК и соответственно изучать их функции, либо манипулировать их содержанием с целью терапии [15, 16].

В последние годы, разработаны также системы CRISPR/Cas9 позволяющие проводить редактирование генома в конкретной клеточной популяции, не затрагивая другие органы и ткани, что особенно важно для использования CRISPR-Cas9 с целью изучения механизмов функционирования ЦНС, или для регуляции экспрессии генов, дисфункция которых наблюдается при когнитивных нарушениях [17, 18]. Причем в этих технологиях использованы данные о дифференциально экспрессирующихся микроРНК в различных клетках и тканях, что позволяет создать специфичный для нужного типа клеток переключатель. Таким образом в ближайшем будущем нас могут ожидать удивительные открытия как в области молекулярных механизмов формирования ДП, так и в разработке подходов к лечению заболеваний, связанных с когнитивными нарушениями.

С другой стороны, накапливается все больше данных о том, что когнитивные процессы, в том числе нарушенные в старости, или вызванные нейродегенеративными и психиатрическими заболеваниями можно улучшить через интенсификацию познавательных процессов, тонкий ручной труд или физические упражнения. Все эти занятия улучшают эпигенетические процессы, в том числе связанные с функционированием микроРНК, вовлекаемые в формирование долговременной памяти и протектирующие нейроны от гибели. Так показано, что применение обогащенной среды (сочетание умственных и физических упражнений) нормализует биогенез микроРНК-miR-134 и соответственно улучшает формирование ДП нарушенное стрессом [19]. Применение обогащенной среды также способно улучшить память в старости, потенциально, через увеличение биогенеза кластера miR-183/96/182, тесно связанного с формированием долговременной памяти в гиппокампе [20], или через индукцию экспрессию miR-137 ассоциированную с нейрогенезом у взрослых [21]. Таким образом, сочетание умственных и физических упражнений и терапии направленной на нормализацию эпигенетического ландшафта, способны улучшить качество жизни через протекцию когнитивных нарушений.

Высокая консервативность микроРНК, позволяет успешно использовать модели обучения на животных, обладающих простыми нервными системами для изучения функций miRNA в механизмах пластичности. С этой целью успешно применяются несколько видов животных в том числе и моллюски, ЦНС которых содержит значительное количество гигантских нейронов с хорошо идентифицированными функциями [22]. В течение многих лет в качестве модели обучения мы используем выработку условных оборонительных рефлексов у моллюска *Helix*. Нами было показано, что при обучении у *Helix*, как и у позвоночных животных, происходят значительные изменения эпигенетических модификаций гистонов [24, 25]. Важную роль в обучении и долговременной памяти играют и микроРНК. Нами показано, что нарушение образования зрелых микроРНК путем введения Poly-L-lysine hydrobromide (PLL) – ингибитора активности фермента Dicer, значительно нарушает формирование долговременной памяти у этого животного. [26].

Для дальнейшего изучения функций микроРНК в формировании механизмов пластичности нами совместно с Институтом цитологии и генетики СО РАН впервые осуществлено секвенирование miRNA из ЦНС *Helix* с использованием метода miRNA-seq и биоинформатического анализа и показано наличие большого количества высоко-консервативных miRNA принимающих участие в когнитивных процессах животных и человека. Данные представлены в NCBI Sequence Read Archive (SRA) [27].

Таким образом, разработка различных моделей обучения с применением разных видов животных, использование различных моделей с когнитивными нарушениями, применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и новейших технологий редактирования генома и эпигенома позволяет надеяться на прогресс в сложнейшей области исследований по выяснению механизмов когнитивных функций и способов их восстановления в случае нарушения.

Работа поддержана программой фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 годы (ГП-14, раздел 63).

ЛИТЕРАТУРА

- Kim S., et al.. Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. *Exp Mol Med*. 2017; 49(1):e281.
- Hu Z., Li Z. miRNAs in synapse development and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 2017; 45:24–31.
- Wu Y.Y., Functional roles and networks of non-coding RNAs in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *J Biomed Sci*. 2020; 27(1):49.
- Smith A.C.W., Kenny P.J. MicroRNAs regulate synaptic plasticity underlying drug addiction. *Genes Brain Behav*. 2018; 17(3):e12424.
- Liu YP, Meng JH, Wu X, Xu FL, Xia X, Zhang XC, Liu Y, Yao J, Wang BJ. Rs1625579 polymorphism in the MIR137 gene is associated with the risk of schizophrenia: updated meta-analysis. *Neurosci Lett*. 2019; 713:134535.
- Ma J, et al. *Psychiatry Res*. Identification of miR-22-3p, miR-92a-3p, and miR-137 in peripheral blood as biomarker for schizophrenia. 2018; 265:70–76.
- Cao T., Zhen X.C. Dysregulation of miRNA and its potential therapeutic application in schizophrenia. *CNS Neurosci Ther*. 2018; 24(7):586–597.
- Schrode N, et al. Synergistic effects of common schizophrenia risk variants. *Nat Genet*. 2019 Oct; 51(10):1475–1485.
- Jużwik CA, et al. microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. *Prog Neurobiol*. 2019; 182:101664.
- Miniarikova J, Evers MM, Konstantinova P. Translation of MicroRNA-Based Huntingtin-Lowering Therapies from Preclinical Studies to the Clinic. *Mol Ther*. 2018; 26(4):947–962.
- Kumar S, Vijayan M, Bhatti JS, Reddy PH. MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017; 146:47–94.
- Paul S., Reyes P.R., Garza B.S., Sharma A. MicroRNAs and Child Neuropsychiatric Disorders: A Brief Review. *Neurochem Res*. 2020; 45(2):232–240.
- Ripa R, et al.. MicroRNA miR-29 controls a compensatory response to limit neuronal iron accumulation during adult life and aging. *BMC Biol*. 2017; 15(1):9.
- Cano-Rodriguez D, Rots MG. Epigenetic Editing: On the Verge of Reprogramming Gene Expression at Will. *Curr Genet Med Rep*. 2016; 4(4):170–179.
- Aquino-Jarquín G. Emerging Role of CRISPR/Cas9 Technology for MicroRNAs Editing in Cancer Research. *Cancer Res*. 2017; 77(24):6812–6817.
- Zhou J, et al. CRISPR-Cas9 Based Genome Editing Reveals New Insights into MicroRNA Function and Regulation in Rice. *Front Plant Sci*. 2017; 8:1598.
- Hirosawa M., et al. Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch. // *Nucleic Acids Res*. 2017; 45(13):e118. doi: 10.1093/nar/gkx309.
- Hoffmann M.D., et al.. Cell-specific CRISPR-Cas9 activation by microRNA-dependent expression of anti-CRISPR protein // *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(13):e75.
- Shen J., et al. The enriched environment ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and cognitive impairment by activating the SIRT1/miR-134 signaling pathway in hippocampus. *J Affect Disord*. 2019; 248:81–90.
- Jawaid A., et al. Memory decline and its reversal in aging and neurodegeneration involve miR-183/96/182 biogenesis. *Mol Neurobiol*. 2019; 56(5):3451–3462.
- Jessop P., Toledo-Rodriguez M. Hippocampal TET1 and TET2 Expression and DNA Hydroxymethylation Are Affected by Physical Exercise in Aged Mice. *Front Cell Dev Biol*. 2018; 6:45.
- Kandel E. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and C/EBP. *Mol. Brain*. 2012; 5 (14): 1–12.
- Гринкевич Л.Н. Эпигенетика и формирование долговременной памяти. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2012; 98(5):553 – 574.
- Danilova AB, et al. Histone H3 Acetylation is Asymmetrically Induced Upon Learning in Identified Neurons of the Food Aversion Network in the Mollusk *Helix Lucorum*. *Front Behav Neurosci*. 2010; 4:180.
- Danilova AB, et al. Inability of juvenile snails for long-term memory formation depends on acetylation status of histone H3 and can be improved by NaB treatment. *PLoS ONE*. 2012; 7(7):e41828.
- Гринкевич Л.Н. Влияние введения ПОЛИ-L-ЛИЗИНА на формирование долговременной памяти у моллюска *Helix* // *Медицинский академический журнал*, 2019; 19(4):87–92.
- Vasiliev GV, et al. Sequencing of *Helix lucorum* central nervous system small RNAs. NCBI Sequence Read Archive (SRA) SRP136226. 2018.