

әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті

ӘОЖ 577.21:616-009

Қолжазба құқығында

БЕЛҚОЖАЕВ АЯЗ МАРАТОВИЧ

**Нуклеотидтік қайталымдары бар гендердің мРНҚ мен микроРНҚ-ның
өзара әрекеттесуі**

6D060700- Биология

Философия докторы (PhD)
дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация

Отандық ғылыми кеңесші
Биология ғылымдарының
кандидаты, профессор
Ниязова Р.Е.

Шетелдік ғылыми кеңесші
PhD, Cornelia M. Wilson

Қазақстан Республикасы
Алматы, 2023

МАЗМҰНЫ

	АНЫҚТАМАЛАР	4
	БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР	5
	КІРІСПЕ	7
1	ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ	12
1.1	Нуклеотидті қайталымды бұзылыстар	12
1.1.1	Полиглутаминді (немесе polyQ) аурулар	16
1.1.2	Полиглутаминді емес аурулар	20
1.2	МикроРНК молекуласының жалпы сипаттамасы	22
1.2.1	МикроРНК молекуласының биологиялық функциясы және биогенезі	22
1.2.2	МикроРНК молекуласының адам ауруларындағы рөлі	25
1.2.3	PolyQ ауруларындағы микроРНК молекулалары	27
1.2.3.1	Жұлын церебеллярлы атаксия және микроРНК молекулалары	27
1.2.3.2	Гентингтон ауруындағы микроРНК молекулаларының рөлі	28
1.2.3.3	Дентаторубралды паллидолизиан атрофиясы және жұлын бульбарлы бұлшықет атрофиясындағы микроРНК молекулаларының рөлі	28
1.2.4	Полиглутаминді емес аурулардағы микроРНК молекулаларының рөлі	29
1.2.5	Айналымдағы микроРНК молекулаларын Гентингтон ауруында биомаркер ретінде қолдану	30
1.3	PIWI-мен әрекеттесетін РНК (пиРНК) молекуласы, биологиялық рөлі және биогенезі	32
1.3.1	ПиРНК молекулаларының кейбір ісік және нейродегенеративті ауруларындағы рөлі	34
2	ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ	37
2.1	<i>In silico</i> жағдайында талдау материалдары	37
2.1.1	<i>In silico</i> жағдайында талдау әдісі	37
2.1.1.1	МикроРНК және пиРНК молекулаларының мРНК-мен өзара әрекеттесуін болжайтын MirTarget бағдарламасы	37
2.2	<i>In vitro</i> жағдайында зерттеу материалдары мен әдістері	40
2.2.1	Жасуша культурасы	40
2.2.1.1	Жасуша линиялары	40
2.2.1.2	Трансформация әдісі	43
2.2.1.3	Плазмидалық ДНҚ бөлу әдісі	43
2.2.1.4	Трансфекция әдісі	44
2.2.1.5	Гемоцитометр көмегімен жасушаларды санау	44
2.2.1.6	Жасушаны мұздату әдісі	44
2.3	Ақуызды талдау	45
2.3.1	Ақуызды бөлу әдісі	45
2.3.2	Вестерн-блот талдау әдісі	45
2.3.3	Иммунофлуоресцентті талдау әдісі	46

2.3.4	SDS-PAGE гель хроматографиясын дайындау	46
2.4	Тұтас РНҚ бөлу әдісі	48
2.4.1	МикроРНҚ молекулаларының экспрессиясын талдау әдісі	48
2.4.2	OneTag Hot Start ДНК полимераза және агарозды гель электрофорезі	50
2.5	Комплементарлы ДНҚ синтезі және сандық ПТР әдісі	51
3	ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ	53
3.1	Гендердің негізінде түзілетін мРНҚ-ның CDS аймағындағы тринуклеотидті қайталану тізбектерімен микроРНҚ-ның өзара байланысу ерекшеліктерін зерттеу	53
3.2	Полиглутаминді емес тринуклеотидті бұзылысты гендердің негізінде түзілетін мРНҚ-мен микроРНҚ-ның өзара әрекеттесуін сипаттау	61
3.2.1	Гендердің негізінде түзілетін мРНҚ-ның CDS және UTR аймақтарындағы тринуклеотидті қайталану тізбектерімен жаңа (novel) микроРНҚ-ның өзара әрекеттесу ерекшеліктерін анықтау	65
3.3	Гендердің негізінде түзілетін мРНҚ-ның ди нуклеотидті қайталану тізбектерімен микроРНҚ-ның өзара әрекеттесу ерекшеліктерін анықтау	71
3.4	Гендердің негізінде түзілетін мРНҚ-ның тринуклеотидті қайталану тізбектерімен пиРНҚ-ның байланысу ерекшеліктері	78
3.5	Адамның SH-SY5Y нейробластома жасуша линиясындағы НТТ генінің қалыпты (Q23) және мутантты (Q74) полиглутамин қайталымдарының экспрессиясын талдау	81
3.6	Адамның НТТ-Q23 және НТТ-Q74 жасуша линиясының үлгісіндегі микроРНҚ-ның экспрессиясын талдау	85
3.7	Дифференциалды экспрессияланған микроРНҚ-ның нысана гендерінің экспрессиясын зерттеу	90
3.7.1	Дифференциалды экспрессияланған микроРНҚ-ның адам гендерінің негізінде түзілетін мРНҚ-мен өзара әрекеттесуін <i>in silico</i> жағдайында талдау	90
3.7.2	Дифференциалды экспрессияланған микроРНҚ-ның байланысу нысаны болған гендердің экспрессияларын сандық ПТР көмегімен талдау	97
	ҚОРЫТЫНДЫ	101
	ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ	103
	ҚОСЫМША (А)	127

АНЫҚТАМАЛАР

Ақуыз - аминқышқылдарынан құралған күрделі молекулалар, кейбір жерлерде «белок» деген терминмен де таныс.

Жасуша - тірі организмдердің негізгі құрылымдық және функционалдық бірлігі, кейбір жерлерде «клетка» деп те аталады.

Ген экспрессиясы - гендегі тұқым қуалайтын ақпараттың функционалды өнімге, әдетте РНҚ немесе ақуызға айналу процесі. Геннің экспрессиясы транскрипция және трансляция кезеңдерін қамтиды.

Дифференциалды экспрессия - тәжірбиелік жағдайда организмнің сау және ауру үлгілерінің (ақуыз, ген, микроРНҚ молекулаларының) экспрессия профилдерінің өзгерістері.

МикроРНҚ экспрессиясы - микроРНҚ молекулалары нысана гендерінің мРНҚ-мен байланысу арқылы геннің белсенділігін реттейтін, жасушадағы қысқа кодталмаған РНҚ молекулаларының синтезі. Сонымен қатар, микроРНҚ экспрессиясы жасушадағы немесе ұлпадағы микроРНҚ молекулаларының өндірілуін және деңгейін қамтиды.

Нуклеотидті қайталымды бұзылыстар - белгілі бір гендердегі нуклеотидті қайталымдардың экспансиясынан туындайтын генетикалық бұзылыстар. Бұл бұзылыстар гендік функцияның бұзылуына және әртүрлі клиникалық көріністерге әкелуі мүмкін.

Нуклеотидті қайталымдардың экспансиясы - ДНҚ молекуласында нуклеотидтердің белгілі бір тізбегінің бірнеше рет қайталанып, шамадан тыс артуы. Нуклеотидті қайталым сандарының ұрпақтан ұрпаққа ұлғайып, арту процесі.

Тринуклеотидті бұзылыстар - белгілі бір гендегі үш нуклеотидтердің қайталану тізбек сандарының артуымен сипатталатын, үштік немесе триплетті қайталану бұзылыстары ретінде белгілі. Бұл бұзылыстар әдетте аутосомды-доминантты түрде тұқым қуалайды.

***In silico* әдісі** - ақуыздар, нуклеин қышқылдары сияқты т.б. биологиялық молекулаларды талдау, зерттеу және болжау үшін компьютерлік алгоритмдер мен модельдерді қолдану әдісі.

PolyQ аурулары - полиглутаминдік аурулар деп те аталады, ДНҚ молекуласында CAG (цитозин-аденин-гуанин) тринуклеотидті қайталым тізбек сандарының артуымен сипатталатын генетикалық аурулар тобы.

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

ГА - Гентингтон ауруы
ДПА - Дентаторубралды паллидолизиан атрофиясы
ЖББА - Жұлын бульбарлы бұлшықет атрофиясы
ЖЦА - Жұлын церебеллярлы атаксия
ҚТҚ - Қысқа тандемді қайталымдар
МикроРНК - Микро рибонуклеин қышқылы
мРНК - Матрицалық (немесе ақпараттық) рибонуклеин қышқылы
ПиРНК - РІWI-мен әрекеттесетін рибонуклеин қышқылы
ТҚ - Тринуклеотидті қайталымдар
ТҚБ - Тринуклеотидті қайталымды бұзылыстар
1ХЖББА -1-ші типті Х-тәрізді жұлын бульбарлы бұлшықет атрофиясы
АТСС - (American type culture collection) Американдық типтегі культуралар жинағы
BSA - (Bovine serum albumin) Ірі қара сарысуының альбумині
CAG - (cytosine-adenine-guanine) Цитозин-аденин-гуанин
cDNA - (Complementary DNA) Комплементарлы ДНК
CDS - (Coding sequence) Ақуызды кодтау аймағы
DMEM - (Dulbecco's modified eagle medium) Дулбеконның модификацияланған қоректік ортасы
DM1 - (Myotonic dystrophy type 1) 1-ші типті миотоникалық дистрофия
EDTA - (Ethylenediaminetetraacetic acid) Этилендиаминтетрасірке қышқылы
FBS (Fetal bovine serum) Ірі қараның ұрық сарысуы
FRAXE - (Fragile XE syndrome) Фрагильді ХЕ синдромы
FRDA - (Friedreich's ataxia) Фридрейх атаксия
FXS - (Fragile X syndrome) Фрагильді Х синдромы
FXTAS - (Fragile X - associated tremor/ataxia syndrome) Фрагилді Х ассоцирленген тремор/атаксия синдромы
Htt- (Huntingtin) Гентингтин
mHTT - (Mutant huntingtin) Мутантты гентингтин
ncRNA - (Non-coding RNA) Кодталмаған рибонуклеин қышқылы
PBS - (Phosphate-buffered saline) Фосфат буферлі тұзды ерітінді
PCR (Polymerase chain reaction) Полимеразды тізбекті реакция
PolyQ - (Polyglutamine) Полиглутамин
PIWI - (P-element induced wimpy testis) Р-элементті индукцияланған ұрық безі
qPCR - (quantitative PCR) Сандық ПТР
RPKM - (Reads per kilobase of transcript, per million mapped reads) Транскрипттің килобазасына шаққандағы оқылым, миллионға шаққанда карталанған
SDS - (Sodium dodecyl sulfate) Натрий додецилсульфаты
SDS - PAGE - (Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) Натрий додецил-сульфатты полиакриламидті гель электрофорезі
TAE - (Tris-acetate-EDTA) Трис-ацетат-EDTA
TBS - (Tris-buffered saline) Трис-буферлі тұзды ерітінді

TTBS - (Tween tris-buffered saline) 0,1% Твин трис-буферлі тұзды ерітінді
3' UTR - (3' Untranslated region) 3' трансляцияланбаған аймақ
5' UTR - (5' Untranslated region) 5' трансляцияланбаған аймақ

КІРІСПЕ

Жұмыстың жалпы сипаттамасы

Диссертациялық жұмыс микроРНК және кейбір пиРНК молекулаларының нысана гендерінің мРНК-ның нуклеотидтік қайталымды тізбектерімен өзара әрекеттесуін зерттеуге және жаңа тиімді ассоциацияларын іздеуге бағытталған. Сонымен қатар, тринуклеотидті бұзылысты ауруларға диагностикалық биомаркер ретінде адамның жасуша линиясының үлгісіндегі микроРНК молекулаларының экспрессия профилдерін әзірлеуге арналған.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі

Адам геномында нуклеотидті қайталану тізбектерінің экспансиясы (санының шамадан тыс артуы) кейбір аурулардың дамуына, ең алдымен жүйке жүйесі жұмысының бұзылуына әкелуі мүмкін. Нуклеотидті қайталану сандарының артуы ақуыз қызметінің өзгеруіне және оның токсикалық жинақталуына әкеледі, бұл нейродегенеративті аурулардың дамуына себепші болады [1]. Мысалы, Гентингтон ауруы *HTT* геніндегі цитозин-аденин-гуанин (CAG) тринуклеотидті қайталану сандарының артуынан туындайды. Бұл мутант гентингтин ақуызының N-ұшында полиглутаминді тізбектің түзілуіне әкеледі. Сонымен қатар, нейродегенеративті сипаттағы бірқатар патологиялық процестер кейбір микроРНК молекулаларының реттелуінің бұзылуымен жүретіні анықталған. Нуклеотидтердің (әсіресе тринуклеотидтердің) қайталану экспансиясынан туындаған нейродегенеративті аурулар есте сақтау қабілетінің бұзылуымен және деменциямен сипатталып, тұқым қуалау арқылы мүгедектікке, ақыр соңында өлімге алып келуде [2].

Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының есебіне сәйкес, әлемде миллиардқа жуық адам нейродегенеративті аурулардан зардап шегеді [3]. Бүгінгі күні ақыл-ой кемістігі, миотоникалық дистрофия, жұлын цербеллярлық атаксия, моторлы нейрон ауруы, деменция, Гентингтон хорейасы және т.б. нуклеотидтердің қайталану экспансиясынан туындайтын нейродегенеративті ауруларды зерттеу ғылыми және медициналық тұрғыдан қарағанда өзекті болып табылады. Өйткені, бұл ауруларды ерте диагностикалау және емдеудің тиімді әдістері бүгінгі күнге дейін жоқ. Соңғы жылдары микроРНК және пиРНК молекулаларын нуклеотидтердің қайталану экспансиясынан туындаған нейродегенеративті аурулардың потенциалды биомаркерлері ретінде пайдалану мүмкіндігін көрсететін көптеген ғылыми зерттеулер жүргізілді [4].

МикроРНК және пиРНК - қысқа кодталмаған РНК молекулалары (ұзындығы 17-25 және 24-32 нуклеотидтер) ретінде сипатталады және олар гендердің посттранскрипциялық реттелуінде маңызды рөл атқарады. МикроРНК молекулалары мида жоғары дәрежеде экспрессияланады, сондықтан бұл молекулалар нейрондық даму мен олардың серпімділік қасиетінің негізгі реттеушілері болып саналады. ПиРНК молекулалары ұрық жасушаларының дамуында, эпигенетикалық модификацияларда және геномның тұтастығын сақтауда маңызды рөл атқарады. Сонымен қатар, жаңа зерттеулер олардың нейродегенеративті бұзылыстарда маңызды рөл атқаруы мүмкін екендігін

болжайды [5]. МикроРНК және пиРНК молекулалары нысана гендерінің мРНК-ның қайталанатын тізбектерімен байланысу арқылы, нуклеотидті бұзылысты және оған байланысты патогендік механизмдерді реттеуге қатысуы мүмкін, дегенмен олардың нақты механизмдері күні бүгінге дейін аз зерттелген.

Бүгінгі таңда микроРНК және пиРНК молекулаларының нысана гендерінің нуклеотидтік қайталым тізбектерімен өзара байланысуы туралы деректер базасы жоқ. Сонымен қатар, нуклеотидтердің қайталану экспансиясынан туындаған нейродегенеративті аурулардағы микроРНК молекулаларының экспрессиясы жеткілікті зерттелмеген. Осыған байланысты, микроРНК және пиРНК молекулаларының нысана гендерінің мРНК-ның нуклеотидтік қайталану экспансиясымен өзара әрекеттесуін анықтау, жүйке жүйесінің қалыпты және патологиялық жағдайында аталған молекулалардың экспрессиясын зерттеу нейродегенеративті аурулардың патогенезін зерттеудің өзекті және болашағы зор бағыты болып табылады.

Зерттеу жұмысының мақсаты: микроРНК және кейбір пиРНК молекулаларының нысана гендерінің мРНК-ның нуклеотидтік қайталымдарымен өзара байланысуын және адамның жасуша линиясының үлгісіндегі микроРНК молекулаларының және олардың нысана гендерінің экспрессия деңгейін зерттеу.

Зерттеу жұмысының міндеттері:

1. Гендердің мРНК-ның CDS аймағындағы тринуклеотидті қайталымдарымен микроРНК молекулаларының өзара әрекеттесу ерекшеліктерін анықтау;
2. Гендердің мРНК-ның UTR аймағындағы три және динуклеотидті қайталымдарымен микроРНК молекулаларының өзара әрекеттесу ерекшеліктерін анықтау;
3. Гендердің мРНК-ның CDS және UTR аймақтарындағы тринуклеотидті қайталымдарымен пиРНК молекулаларының өзара әрекеттесу ерекшеліктерін анықтау;
4. МикроРНК молекулаларының және олардың нысана гендерінің экспрессиясын зерттеу үшін Гентингтон ауруына арналған адамның жасуша линиясының үлгісін құру;
5. Құрылған жасуша линиясы үлгілеріндегі қалыпты және патологиялық Htt ақуызының агрегациясын зерттеу;
6. Құрылған жасуша линиясы үлгілерінде қалыпты және патологиялық жағдайындағы микроРНК молекулаларының экспрессиясын анықтау;
7. Құрылған жасуша линиясы үлгілерінде қалыпты және патологиялық жағдайындағы дифференциалды түрде экспрессияланған микроРНК молекулаларының нысана гендерінің экспрессиясын анықтау.

Зерттеу нысандары: адамның микроРНК, пиРНК және мРНК молекулаларының нуклеотидтік тізбектері; SH-SY5Y жасуша линиясы (нейробластома жасуша линиясы); Гентингтон ауруының НТТ-Q23 және НТТ-Q74 жасуша линиялары.

Зерттеу пәні: микроРНК және пиРНК молекулаларының нысана гендерінің мРНК-ның нуклеотидтік қайталымдарымен өзара әрекеттесуінің және адамның

жасуша линиясы үлгісіндегі микроРНК және нысана гендерінің экспрессияларының сипаттамасы.

Зерттеу әдістері: *In silico* әдістері, жасушаны өсіру әдісі, трансформация, трансфекция, Вестерн- және дот-блот әдісі, иммунофлуоресцентті талдау, HTG EdgeSeq miRNA транскриптомды талдауы, HTG EdgeSeq Reveal статистикалық талдау құралы және сандық ПТР әдісі.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы

Зерттеу барысында алғаш рет микроРНК және кейбір пиРНК молекулаларының нуклеотидті қайталанатын аурулардың дамуына жауапты гендердің мРНК-мен 5'UTR, CDS және 3'UTR аймақтарында байланысу сайттарының ассоциациялары анықталды.

Біздің зерттеуімізде рEGFP-Q23 және -Q74 плазмидаларын адамның SH-SY5Y жасуша линиясына трансфекциялау арқылы *in vitro* жағдайында Гентингтон ауруын үлгілеудің жаңа әдісін ұсынады.

НТТ-Q23 және НТТ-Q74 үлгілік жасуша линияларында қалыпты және Гентингтон ауруы арасында 354 микроРНК молекулаларының дифференциалды экспрессиялары анықталды.

Компьютерлік бағдарламаларды пайдалана отырып, 354 дифференциалды түрде экспрессияланған микроРНК молекулалары үшін нейродегенеративті аурулардың дамуына жауапты 18 нысана гендер анықталды.

Осы гендердің ішінен сандық ПТР әдісі арқылы қалыпты (НТТ-Q23) және Гентингтон ауруы (НТТ-Q74) арасында 7 гендердің дифференциалды экспрессиялары анықталды.

Жұмыстың теориялық маңызы

Диссертациялық жұмыс микроРНК және пиРНК молекулаларының нейродегенеративті аурулардың дамуына жауапты гендердің мРНК-ның нуклеотидті қайталымдарымен ассоциацияларын сипаттайды. МикроРНК молекулаларының және олардың нысана гендерінің экспрессиялық профилдері НТТ-Q23 (қалыпты) және НТТ-Q74 (Гентингтон ауруы) жасуша линиясының үлгілерінде зерттелді. Алынған мәліметтер осы саладағы теориялық білімді толықтырады. Жұмыстың нәтижелері нуклеотидті қайталану тізбектерінің қалыптан тыс артуынан туындаған нейродегенеративті аурулардың молекулалық механизмдері туралы түсінік береді.

Зерттеудің практикалық құндылығы

Алынған білім нейродегенеративті аурулардың алдын алудың, ерте диагностиканың және балама емдеудің жаңа әдістерін әзірлеуге негіз бола алады.

Қорғауға ұсынылатын негізгі қағидалар:

- МикроРНК және пиРНК молекулаларының нысана гендерінің мРНК-ның тринуклеотидті қайталымдарымен - 5'UTR, CDS, 3'UTR және динуклеотидті қайталымдарымен - 3'UTR аймақтарында байланысу арқылы олардың экспрессиясын реттеу мүмкіндіктері көрсетілді;

- рEGFP-Q23 және -Q74 плазмидалары адамның SH-SY5Y жасуша линиясына тұрақты түрде трансфекцияланатыны көрсетілді;

- Q74-Htt ақуызы Q23-Htt-ге қарағанда агрегацияға бейім болды. Q74-Htt агрегаттары ядроға жақын орналасқан, ал Q23-Htt ақуызы цитоплазмада біркелкі таралды;

- НТТ-Q23 және НТТ-Q74 жасуша линиялары арасында 354 микроРНК молекулалары дифференциалды түрде экспрессияланғаны анықталды. Олардың көпшілігі Гентингтон ауруы үлгісінің жасуша линиясында экспрессияларының төмендеуі байқалды;

- Компьютерлік талдаудың көмегімен, дифференциалды түрде экспрессияланған 354 микроРНК молекулаларының ішінде 9 микроРНК молекулаларының (miR-3687, miR-612, miR-4417, miR-4261, miR-504-3p, miR-126-5p, miR-411-5p, miR-889-3p және miR-22-5p) нейродегенеративті ауруларда маңызды рөл атқаратын 18 гендердің мРНК-мен 5'UTR, CDS және 3'UTR аймақтарында байланысу сайттары анықталды;

- Сандық ПТР көмегімен 18 гендердің ішінде 7 геннің (*ATN1*, *GEMIN4*, *EFNA5*, *CSMD2*, *CREBBP*, *ATXN1* және *B3GNT2*) Гентингтон ауруының НТТ-Q74 жасуша линиясының үлгісінде дифференциалды түрде экспрессияланғаны анықталды.

Автордың жеке үлесі: Зерттеу тақырыбы бойынша тәжірибелер жүргізу, нәтижелерді талдау және диссертацияны жазу автордың жеке қатысуымен орындалды.

Жұмыстың мемлекеттік бағдарламалар жоспарымен байланыстылығы

Диссертациялық жұмыс Қазақстан Республикасының Ғылым және жоғары білім министрлігінің № AP05132460 «miRNA мен олардың нысана гендерінің ассоциациялары негізінде жүрек-қан тамырлары, онкологиялық және нейродегенеративті ауруларды ерте диагностикалаудың тестілік жүйелерін құру» жобасы аясында жүргізілді (2018-2020). Ғылыми зерттеу жұмысының тәжірбиелік бөлігі Сануидж қаласы, Ұлыбритания елінде, өмір туралы ғылымдар зертханасында (Life Sciences Laboratory), (2020-2023 жж.) ғылыми тағылымдама аясында жүзеге асырылды.

Жұмыстың сыннан өтуі: Диссертациялық жұмыстың материалдары төмендегі ғылыми конференцияларда баяндалды және талқыланды:

1. «Prospects for the development of biology, medicine and pharmacy» Халықаралық ғылыми конференциясында (07-08 желтоқсан 2018 ж. Шымкент, Қазақстан);

2. Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» халықаралық ғылыми конференцияларында (2019-2022 жылдар аралығы. Алматы, Қазақстан);

3. «Biotechnology: state of the art and perspectives» халықаралық ғылыми конференциясында (25-27 ақпан 2019 ж. Мәскеу, Ресей);

4. «Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB)» халықаралық ғылыми конференциясында (27-30 шілде 2019 ж. Мәскеу, Ресей);

5. «Biotechnology: Science and Practice» халықаралық ғылыми конференциясында (16-20 қыркүйек 2019 ж. Севастополь, Ресей);

6. «Fundamental research and innovations in molecular biology, biotechnology, biochemistry» халықаралық ғылыми конференциясында (28-29 қараша 2019 ж. Алматы, Қазақстан);

7. «Innovations in life sciences: collection of materials of the II International Symposium» халықаралық ғылыми конференциясында (19-20 мамыр 2020 ж. Белгород, Ресей);

8. «1st Central Asia Genomics Symposium» халықаралық ғылыми конференциясында (09-10 желтоқсан 2021 ж. Ташкент, Өзбекстан);

9. «UK Society for Extracellular Vesicles» халықаралық ғылыми конференциясында (01-02 желтоқсан 2022 ж. Эдинбург, Шотландия);

10. «Asfen. Forum, new generation-2023» халықаралық ғылыми конференциясында (05-06 маусым 2023 ж. Алматы, Қазақстан).

11. «Молекулалық биология, биохимия, биотехнология саласындағы іргелі және қолданбалы зерттеулер» атты М.А.Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институтының 40 жылдығына арналған жас ғалымдардың халықаралық ғылыми конференциясында (17 қараша 2023 ж. Алматы, Қазақстан).

Басылымдар: Диссертацияның негізгі нәтижелері 20 баспа жұмыстарында, оның ішінде импакт-факторы бар Scopus және Web of Knowledge-де келтірілген халықаралық журналдарда 3 мақала; Ғылым және жоғары білім саласындағы сапаны қамтамасыз ету комитетінің тізімінде 3 мақала; Халықаралық конференциялардың материалдарында 14 тезис жарияланды.

Диссертациялық жұмыстың құрылымы мен көлемі: Диссертациялық жұмыс 130 беттен, анықтамалар, белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері мен талқылаулар және қорытынды бөлімдерінен, 345 пайдаланылған әдебиеттер тізімінен, 31 кестеден, 21 суреттен тұрады.

1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ

1.1 Нуклеотидті қайталымды бұзылыстар

Қайталанатын ДНҚ тізбегі эукариоттық геномдардың негізгі құрамдас бөлігі болып табылады. 1970 жылдары жоғары сатыдағы организмдердің ДНҚ молекуласының көп бөлігі қайталанатын нуклеотидтер тізбегінен тұратыны анықталған [6]. Мұндай қайталанатын тізбектердің тандемді (short tandem repeats) және дисперстік қайталымдар деп аталатын екі түрі белгілі. Тандемді қайталымдар - хромосомада бірнеше рет қайталанатын екі немесе одан да көп ДНҚ фрагменттерінің тізбегі. Адам геномында миллионнан астам қысқа тандемді қайталымдар бар. Көлеміне қарай олар сателитті ДНҚ, минисателлиттер және микросателлиттер деп үш класқа бөлінеді [7].

Сателитті ДНҚ хромосомалардың бөлінуін, геномды ұйымдастыруды және жасушалық процестерде маңызды рөл атқаратын ең көп қайталанатын ДНҚ фрагменттері. Қайталану дәрежесі әр локуста 1000-нан 10 миллионға дейін болады. Сателитті ДНҚ ақуызды кодтамайтын, функционалдық центромерлердің негізгі құрамдас бөлігі болып табылады [6, 8]. Сателитті ДНҚ молекулалары I, II және III сателитті ДНҚ топтарынан тұратыны анықталған. Сонымен қатар, центромерлі альфа (α) сателитті ДНҚ тобы сипатталды, ол көп ұзамай адамның ең қарқынды сателитті ДНҚ тізбектері екендігі анықталды [9].

Келесі минисателлиттерге тоқталатын болсақ, олардың ұзындығы 7-ден 100 нуклеотидке дейінгі қайталанатын ДНҚ фрагменттері болып табылады, және адам геномының көптеген бөлігінде кездеседі. Олар туыстық қатынасты анықтауда, популяциялық генетикалық зерттеулерде белгілі бір популяцияға тиесілілігін анықтауда, будандастыру зерттеулерінде және ДНҚ саусақ іздерін анықтауда молекулалық белгілер ретінде қолданылады [10].

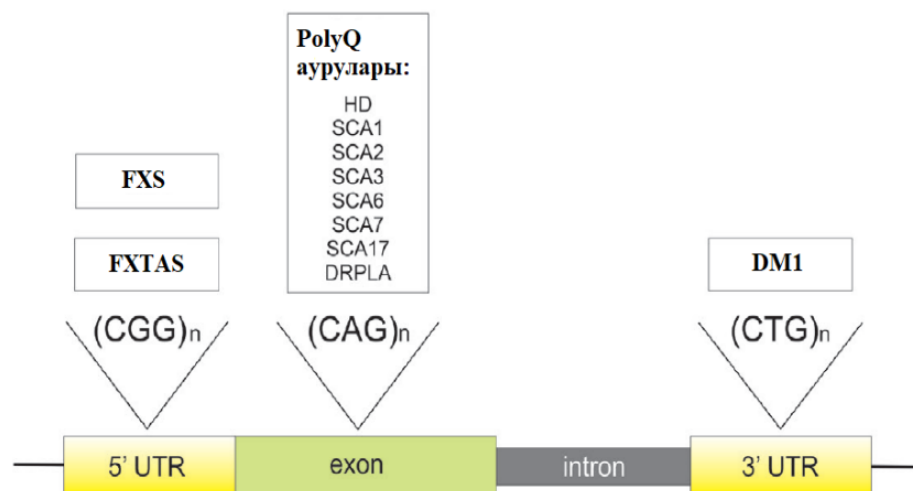
Микросателлиттер ұзындығы 1-6 негізгі жұпқа дейін қысқа қайталану бірлігімен сипатталатын ДНҚ фрагменттері болып табылады. Минисателлиттер сияқты олар популяциялық генетикалық зерттеулерде молекулалық маркерлер ретінде қолданылады [11]. Қарапайым тізбекті қайталану немесе тандемді қайталану деген атпен белгілі микросателлиттер әдетте адам геномында шашыраңқы полиморфты нуклеотидтер тізбегі болып табылады [12].

Нуклеотидті қайталымдардың келесі тобы дисперсті қайталымдар, олар геномдағы нуклеотидтердің қайталанатын тізбегі болып табылады. Бұл қайталымдар бірінен соң бірі рет-ретімен орналаспай, арақашықтықта орналасуымен тандемді қайталаулардан ерекшеленеді [13]. Дисперсті қайталануларға ұзын дисперсті қайталаулар және қысқа дисперсті қайталаулар сияқты ретротранспозондар жатады. Ұзын дисперсті қайталаулар - эукариоттық геномдағы ұзын ДНҚ тізбегі, олар ретротранспозондар болып табылады, оларда ұзақ терминалдық қайталанулар жоқ. Қысқа дисперсті қайталаулар эукариоттық геномдағы қысқа ДНҚ тізбегі РНҚ полимераза III арқылы транскрипцияланған қысқа РНҚ молекулаларының кері транскрипциясы нәтижесінде пайда болады [14-16]. Осы секілді нуклеотидті қайталым сандарының қалыптан тыс

ауытқуынан организмде әр түрлі генетикалық аурулар пайда болатындығы 20-шы ғасырдың соңында белгілі бола бастады.

Нуклеотидті қайталымдар әр түрлі механизмдер себебінен, мысалы ДНҚ жіпшелерінің дұрыс жұптаспауынан (slipped strand mispairing), ДНҚ репликациясы кезінде пайда болатын мутация процесінен болуы мүмкін. Ол ДНҚ тізбектерінің денатурациясын және ығысуын қамтиды, нәтижесінде комплементарлы негіздер дұрыс жұптаспайды. Тізбектелген жіптердің жұптасуы қайталанатын ДНҚ тізбектерінің шығу тегі мен эволюциясының бір түсіндірмесі болып табылады [17].

Тринуклеотидтердің қайталануы (ТҚ) гендегі триплет сандарының қалыпты жағдайдан ауытқып, шамадан тыс қайталанған жағдайда геннің экспрессиясын немесе ген өнімінің қызметін өзгертіп, генетикалық бұзылысты ауруларға алып келеді. Сонымен қатар, өзгеріске ұшыраған гендегі триплеттердің саны тұқым қуалайтындықтан келесі ұрпақтарында триплет қайталымы еселеніп көбейіп отырады [18]. Нуклеотидті қайталымдардың таралу барысындағы аурулардың негізінде жатқан әртүрлі қайталанатын тізбектер олардың гендеріндегі белгілі орындарда сәйкес орналастырылады. Кейбіреулері 5' немесе 3' трансляцияланбаған аймақтарда (UTR-untranslated regions), басқалары ақуызды кодтайтын аймақтарда (CDS-coding sequences), экзондарда және интрондарда орналасады. Мысалы, тринуклеотидті қайталымды бұзылыстарының (ТҚБ) түрлері мен гендік аймақтардағы ТҚ орналасуы 1-ші суретте схема түрінде көрсетілген. Көріп тұрғанымыздай, ТҚБ тобына кіретін Фрагильді Х синдромы (FXS-Fragile X syndrome) және Х-ассоциирленген Фрагильді тремор/атаксия синдромы (FXTAS-Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome) *FMR1* генінің 5'-трансляцияланбаған аймағында, яғни 5'UTR-де CGG тринуклеотидтік қайталым сандарының шамадан тыс артуынан туындайды. Сонымен қатар, бұл топқа *DMPK* генінің 3'-трансляцияланбаған аймағында (3'UTR) CUG тізбек сандарының артуынан туындаған жүйке-бұлшықет бұзылысы және 1-ші типті миотоникалық дистрофия (*DM1*) жатады. Гентингтон ауруы (ГА), жұлын церебеллярлы атаксияның (ЖЦА) алты түрі (1, 2, 3, 6, 7 және 17), дентаторубралды паллидолизиан атрофиясы (ДПА) және жұлын бульбарлы (латынша "bulbus" - термині "шам" тәрізді анатомиялық құрылымды білдіреді және дененің әртүрлі бөліктерімен, соның ішінде сопақша мимен байланысты, мидың бұл бөлігі тыныс алу, жүрек соғысы және жұтыну сияқты көптеген өмірлік маңызды функцияларды реттеуде шешуші рөл атқарады) бұлшықет атрофиясы (ЖББА) сияқты полиглутаминді немесе polyQ аурулар гендердің кодталатын тізбегінде CAG тринуклеотидті қайталымның бұзылыстарынан туындайды. Бұл геннің белгілі бір аймағындағы тұрақсыз триплеттер, яғни үш нуклеотидті қайталану сандарының шамадан тыс артулары жүйке жүйесінің бұзылыстарына алып келеді [19].



(FXS - Фрагильді Х синдромы ; FXTAS - Фрагилді Х ассоцирленген тремор/атаксия синдромы; HD - Гентингтон ауруы; SCA - жұлын-церебеллярлық атаксия; DRLPA - дентаторубральды-паллидолуизиялық атрофия; DM1 - 1-ші типті миотоникалық дистрофия).

Сурет 1 - Тринуклеотидті қайталымды бұзылыстардың гендік аймақтарындағы триплеттердің түрлері мен орналасу аймақтары [14]

Барлық қайталанатын нуклеотид сандарының шамадан тыс артуы популяциядағы қалыпты полиморфты қайталанулардан туындайды. Жалпы алғанда, қалыпты диапазонның жоғарғы жағындағы қайталанулар (өзгермелі қалыпты қайталанулар) патогендік диапазонға өтіп, жоғарыда айтылғандай ұрпақтан ұрпаққа берілу кезінде одан әрі қайталану санының арту үрдісінің артуына ие болып келеді. Нуклеотидті қайталымдардың таралуы табиғи түрде динамикалық болып табылады, сонымен қатар олар келесі ұрпаққа берілгенде өлшемі жиі өзгеріп отырады. Нәтижесінде, бір отбасында зардап шеккен адамдарда аурудың фенотиптік ауқымы айтарлықтай өзгеруі мүмкін [20, 21]. Әдетте, қайталымның ұзындығы (қайталым санының шамадан тыс артуынан пайда болған ұзын тізбектер) аурудың генотиптік және фенотиптік корреляциясын көрсетеді. Қайталану неғұрлым ұзын болса, ауру соғұрлым өте қауіпті болады және белгілер ертерек көрініс табады [22]. Нуклеотидті қайталымдардың таралу барысындағы аурулардың ең таңғаларлық ерекшелігі аурудың фенотиптерінің айтарлықтай әртүрлілігі болып табылады. Негізінен бұл әртүрлі фенотип, қайталанатын өлшемдегі айырмашылықтарды көрсетеді. Мысалы, Гентингтон ауруында науқастардың көпшілігінде когнитивтік және психиатриялық белгілері бар орта жастағы хорей (гректің «*chorea*» сөзінен шыққан, «би» дегенді білдіреді, бет әлпеттің, дене мүшелерінің ретсіз қозғалыстары) дамыса, ең ұзақ қайталанатындар жасөспірімдік шақта немесе одан ертерек жаста хорейға қарағанда брадикинезия (қозғалыстардың баяулауы) және дистония (бұлшықеттердің тұрақты немесе тұрақты емес жиырылуымен сипатталатын қозғалыстың бұзылуы) сияқты белгілер көрінуі мүмкін [23].

Қысқа тандемді қайталымдар (ҚТҚ) немесе микросателлиттер геномның кодтаушы және кодталмаған аймақтарында табылған ДНҚ молекуласының 2-12

жұп нуклеотидті (жн) ұзындықта қайталанатын аймақтарының таралуы болып табылады. ҚТҚ адам геномының шамамен 3% құрайды және түрлер мен адам популяцияларында табиғаты бойынша тұрақсыз болып табылады [24-26]. ҚТҚ санының шамадан тыс артуы ДНҚ молекуласындағы құрылыстық өзгерістерді тудырып, ДНҚ және РНҚ немесе ақуыз деңгейіндегі функцияларының өзгерісі сияқты процестерді тудырады [24, 27].

Көп жағдайларда геномның тұрақсыз қайталану аймақтарында нуклеотидті қайталым сандарының шамадан тыс арту процесі нуклеотидтердің қайталануларының экспансиясынан (экспансия - белгілі бір шекті деңгейден нуклеотидті тізбек сандарының асып кетуі) пайда болатын ауруларға әкелуі мүмкін. Бұл қайталану сандарының қалыптан тыс артуы геномның тұрақсыз аймақтарындағы нуклеотид тізбек сандарының патологиялық өсуіне, кодталған ақуыздың және басқа ақуыздардың дисфункциясына әкеледі. Осы тақырып аясында 1991 жылы нуклеотидті қайталану сандарының артуы барысында жұлын бульбарлы бұлшықет атрофиясы (Кеннеди ауруы) және нәзік Х синдромы (Мартин-Белл синдромы) сияқты алғашқы аурулар алғаш рет сипатталды. Бүгінгі күні нуклеотидтердің қайталануынан туатын 30-дан астам патологиясы сипатталған. Геннің кодтау аймағында қайталанатын нуклеотидтердің қалыптан тыс сандарының артуы, яғни экспансиясы пайда болған кезде ақуыздың құрылымына тікелей әсер етеді [28, 29].

Жалпы алғанда нуклеотидті қайталану сандарының артуындағы ауруларға динамикалық мутациялардан туындаған тұқым қуалайтын аурулар жатады. Динамикалық мутация гендердің маңызды аймақтарында орналасқан микро және минисателлиттік ДНҚ қайталануларының тұрақсыздығына негізделген. Нуклеотидті қайталымды ауруларда динамикалық мутация орнында қайталанатын элементтер санының экспансиясы байқалады. Мұндай нуклеотидті қайталым тізбек сандарының артуы геннің функцияларының бұзылуларымен бірге жүреді және динамикалық мутациялардың түрлері үшін бұл бұзылулардың ерекше механизмдері әртүрлі болып келеді. Олар тұрақсыз қайталану орналасқан ген аймағының функционалдық маңыздылығы және қайталанудың өзінің табиғаты мен функциялары бойынша негізінен екі фактормен анықталады. Динамикалық мутациялардан туындаған барлық аурулар мидың және субкортикалық құрылымдардың зақымдалуымен сипатталады [30]. Сондықтан экспансия аурулары неврология үшін ерекше маңызға ие болып табылады. Нуклеотидті қайталымды аурулардың клиникалық көрінісі әртүрлі болып келеді. Нуклеотидті қайталымды аурулар зақымданудың клиникалық көрінісіне ғана емес, сонымен қатар динамикалық мутациялардың пайда болу механизмдеріне, сондай-ақ, осы аурулардың патогенезінің молекулалық және биохимиялық негіздеріне қатысты көптеген ортақ белгілерге ие. Нуклеотидті қайталымдардың қалыптан тыс сандарының ауытқуынан пайда болатын ауруларды полиглутаминдік (немесе polyQ) және полиглутаминді емес аурулар деп екіге бөліп қарастырады [31, 32].

1.1.1 Полиглутаминді (немесе polyQ) аурулар

PolyQ (polyglutamine) аурулары - глутамин амин қышқылын кодтайтын CAG кодонының ұзартылған тринуклеотидті қайталануының болуымен сипатталатын, полиглутамин аурулары деп те аталатын генетикалық бұзылыстар тобы. Бұл бұзылулар CAG қайталануының қалыптан тыс санының артуына әкелетін нақты гендердегі мутациялардан туындайды. Қалыптан тыс ұзартылған нуклеотидті қайталымдар белгілі бір ақуыздардағы қалыптан тыс ұзын глутаминдік жолдардың түзілуіне әкеледі. Бұл мутантты ақуыздардың агрегациясы (жасушадан тыс ақуыздардың жинақталуы, жабысуы) жасушаларға уытты болуы мүмкін және көптеген polyQ ауруларында байқалатын нейродегенерацияға ықпал етеді [33].

Полиглутаминді (polyQ) ауруларға 1, 2, 6, 7 және 17-ші типті жұлын церебеллярлы атаксиялар (ЖЦА), сондай-ақ 3-ші типті ЖЦА немесе Мачадо-Джозефа ауруы, Гентингтон ауруы (ГА), дентаторубралды паллидолизан атрофиясы (ДПА) және 1-ші типті Х тәрізді жұлын бульбарлы бұлшықет атрофиясы (1ХЖБА) жатады [33, 34]. 1ХЖБА - ауруын қоспағанда, бұл аурулар Х хромосомасында орналасқан андрогендік рецепторлар генінің мутациясымен байланысты аутосомды-доминантты тұқым қуалайды. Осы polyQ бұзылыстарының ішінде Гентингтон және 3-ші типті жұлын церебеллярлы атаксия аурулары дүние жүзінде ең көп таралған ауру түрлерінің бірі болып келеді. Жалпы polyQ ауруларының негізгі себебі - гендердің кодтау аймағында polyQ жолын (polyQ tract) кодтайтын тринуклеотидті CAG қайталым сандарының қалыптан тыс ауытқуы болып табылады [35, 36]. Ақуыз синтезі кезінде экспансияланған CAG қайталымдар polyQ жолын құрайтын үзіліссіз глутамин қалдықтарының сериясына айналады және polyQ ақуыздарының жинақталуы митохондрияларды, шаперонды және убиквитинді (убиквитин - ақуыздардың жасушаішілік ыдырауын реттеуге, сондай-ақ, олардың функцияларын өзгертуге қатысатын шағын эукариоттық ақуыз) протеазома жүйесін нашарлатуы және зақымдауы мүмкін. Нәтижесінде, бұл біріктірілген polyQ ақуыздары ми бағанасы және жұлын жолы сияқты дегенерацияланған нейрондарда кездеседі [37]. Сондықтанда, әртүрлі polyQ жолдары бар ақуыздар белгілі бір нейрондық субпопуляциялардың дисфункциясына және дегенерациясына әкеледі. Бұл ұзартылған CAG қайталымдар тұрақсыз және одан әрі экспансияға бейім болып келеді. PolyQ аурулары тоғыз түрлі нейродегенеративті бұзылыстарды қамтығанымен, polyQ ауруларының әрбір түрінің әртүрлі хромосомаларында өзінің қоздырғыш гені және қайталанулардың шекті саны бар (кесте 1) [38]. PolyQ аурулары көбінесе орта жаста басталады, сонымен қатар CAG қайталануы неғұрлым көп таралса, аурудың басталу жасы соғұрлым ерте байқалады. Бұл аурулардың басталу жасы, белгілері және өршуі әсер ететін нақты генге және CAG қайталымның сандарының артуына байланысты өзгеруі мүмкін. [39].

Кесте 1 - Қалыпты және патологиялық polyQ ауруларының тізімі [33]

PolyQ ауруларының аты	Локус	Ақуыз	Қалыпты CAG қайталым	Патологиялық CAG қайталым
1-ші типті ЖЦА	6p23	Атаксин-1	6–39	41–83
2-ші типті ЖЦА	12q24	Атаксин-2	14–32	34–77
6-шы типті ЖЦА	19p13	CACNA1A	4–18	21–30
7-ші типті ЖЦА	3p21–p12	Атаксин-7	7–18	38–200
17-ші типті ЖЦА	6q27	ТВР (ТАТА байланыстыратын ақуыз)	25–43	45–63
3-ші типті ЖЦА /Мачадо-Джозефа ауруы	14q24–q31	Атаксин-3	12–40	62–86
Гентингтон ауруы	4p16.3	Гентингтин	6–35	36–121
Дентаторубралды паллидолизиан атрофиясы	12p13	Атрофин-1	3–38	49–88
1-ші типті Х-тәрізді жұлын бульбарлы бұлшықет атрофиясы	Xq11–q12	Андрогендік рецептор	6–36	38–62

Осы аталған polyQ аурулардың клиникалық ерекшеліктеріне және патологиясына төменде жалпылама тоқталып өтетін боламыз:

1, 2, 6, 7 және 17-ші типті ЖЦА. ЖЦА ауtosомды-доминантты, нейродегенеративті бұзылысты тұқым қуалайтын аурудың түрі. Бұл аурулар күрделі генотипті және фенотипті спектрі бар бұзылулардың жоғары гетерогенді тобы. Көптеген ЖЦА полиглутаминді кодтайтын CAG нуклеотидтерінің қайталану сандарының қалыптан тыс ауытқуынан туындайды, сондықтан токсинді полиглутаминдік ақуызды қамтиды [40, 41]. Мысалы, 8-ші типті ЖЦА цитозин-тимин-гуанин (CTG) қайталану санының ауытқуынан туындайды, ал 10-шы типті ЖЦА аденин-тимин-тимин-цитозин-тимин (ATTCT) қайталануының шамадан тыс санының артуынан туындайды [42]. ЖЦА белгілерінің негізіне жүрістің қалыптан тыс бұзылу процесі, ұйқының бұзылуы және көрудің нашарлауы жатады [43]. ЖЦА санының молекулалық механизмдері әртүрлі механизмдер арқылы транскрипцияға кедергі жасайды. Оларға ақуыз-ДНҚ әрекеттесуі, ацетилдену, фосфорлану және РНҚ интерференциясы жатады. 1-ші типтегі ЖЦА патогенезіне қатысатын мутантты ақуыз атаксин-1 транскрипция активаторы болып табылады, ал 17-ші типтегі ЖЦА полиглутаминді экспансиясы транскрипцияның маңызды факторы болып табылатын ТАТА байланыстыратын ақуыздың (ТАТА-binding protein) ішінде жүреді [43-45]. Аурудың басталу жасы, өршуі және ауырлығы бойынша тұқым қуалайтын церебеллярлық атаксиялардың клиникалық әртүрлілігі модификациялаушы факторлардың болуын айқын көрсетеді [46]. Қазіргі уақытта ЖЦА үшін ешқандай емдеу әдістері жоқтың қасы, сондықтан бұл ауру жылдам және дәл диагностика жасайтын әдісті қажет етеді. Зақымдалған адамдардың бастарының магниттік резонансты және компьютерлік

томографиясы сияқты ми сканерлері осы аурулардың әдеттегі көрінісі болып табылатын мидың атрофиясының жиырылуын көрсетеді [47-49].

3-ші типті ЖЦА. 3-ші типті ЖЦА ауруы Мачадо-Джозеф деген атпен де белгілі. 3-ші типті ЖЦА - аутосомды тұқым қуалайтын церебеллярлық атаксияның ең көп таралған түрі. 3-ші типті ЖЦА ауруы *ATXN3* геніндегі *CAG* қайталану тізбегінің тұрақсыз сандарының артуынан туындап атаксин-3 ақуызының ішінде қалыптан тыс *polyQ* жолына ауысу салдарынан пайда болады. Мутантты *ATXN3* аллеліндегі қайталымдар саны 3-ші типті ЖЦА пациенттерінде 52-ден 91-ге дейін ауытқиды, бұл *ATXN3* ақуызындағы полиглутаминдік жолының санының артуына әкеледі [50, 51]. 3-ші типті ЖЦА кезінде қозғалыстың, көру жүйесінің, сөйлеудің, және жүрген кездегі тепе-теңдіктің бұзылулары сияқты клиникалық белгілер байқалады. Сонымен қатар, 3-ші типті ЖЦА ауыруымен әртүрлі түрде байланысты клиникалық көріністерге сыртқы прогрессивті офтальмоплегия және дистония, гиперрефлексия, дизартрия және Паркинсон ауруына ұқсайтын паркинсонизм белгілері жатады [52]. Мидың сезімтал аймақтарындағы нейрондардың ядроларында ұзартылған полиглутаминді созулардың жинақталуы және бірігуі нәтижесінде нейрондардың жоғалуына және ми атрофиясына әкелетін тікелей немесе жанама нейротоксикалық әсерлерді тудыруы мүмкін [53]. Нейрондық ядролардағы бұл ауытқулар невропатологиялық және гистопатологиялық зерттеулерде байқалғандай, ми қыртысын, базальды ганглийлерді, таламусты, мишықты және ми бағанасын қоса, кортикальды және субкортикальды аймақтарды қамтиды. Бұл мидың зақымданулары клиникалық және нейрорадиологиялық зерттеулерде 3-ші типті ЖЦА пациенттерінде анықталған моторлық және психикалық дисфункцияларға жауапты болу мүмкіндігі анықталған [54].

Гентингтон ауруы (ГА). ГА - әдетте қалыптан тыс қозғалыстың, есте сақтаудың және ақыл-ойдың төмендеуі сияқты когнитивтік функциялардың өзгеруіне алып келетін аутосомды-доминантты нейродегенеративті аурулардың бір түрі [55]. Бұл аурудың таралуы дүние жүзілік эпидемиологиялық зерттеулер бойынша Еуропа, Солтүстік Америка және Австралия елдерінде Азия елдеріне қарағанда кеңірек таралған [56]. ГА-ның патологиясы Альцгеймер ауруы, Паркинсон ауруы және амиотрофиялық бүйірлік склероз аурулары сияқты, ақуыздардың қалыптан тыс агрегациясымен және оның мидағы таралуымен сипатталады. Бұл ауру гентингтин генінің (*HTT*) *CAG* тринуклеотидті қайталану сандарының (36-дан жоғары) артуынан туындайды [57, 58].

HTT гені - гентингтин ақуызын (*Htt*) кодтайтын ген, 4-ші хромосомада орналасқан (4p16.3). *HTT* гені 180 килобазадан (мың жұп нуклеотид) және 67 экзоннан тұрады. *HTT* гені арқылы кодталған гентингтин ақуызы шамамен 3144 аминқышқылынан тұрады (348 кДа). Бұл ген ең алдымен мида, әсіресе нейрондарда экспрессияланады, нейрондық және глиальды функцияларды реттейді. *HTT* генінің қызметі аз зерттелген, дегенмен оның әртүрлі жасушалық процестерде шешуші рөл атқаратыны белгілі [59, 60]. Гентингтин ақуызы жасушаішілік әртүрлі жасушалық компоненттерді тасымалдауға қатысады. Ол басқа ақуыздармен және органеллаларымен әрекеттеседі, жасуша ішіндегі

везикулалар мен органеллалардың қозғалысын жеңілдетеді [61]. Гентингтин ақуызы белгілі бір гендердің экспрессиясына әсер ететін транскрипциялық реттеуші ретінде әрекет етуі мүмкін. Ол транскрипция факторларымен және генді реттеуге қатысатын басқа ақуыздармен әрекеттесе алады. Нейрондарда гентингтин синаптикалық функцияны сақтауда және нейротрансмиттерлердің босатылуын жеңілдетуде рөл атқарады. Ол нейрондар арасындағы дұрыс байланыс үшін маңызды болып табылатын синаптикалық везикуланың динамикасына қатысады [62]. Мидың дамуы кезінде *HTT* гені функционалды нейрондық желілерді қалыптастыру үшін маңызды болып табылатын нейрогенез, жасуша миграциясы және дифференциация сияқты процестерді реттеуге қатысады. *HTT* геніндегі мутациялар тұқым қуалайтын нейродегенеративті бұзылыс болып табылатын Гентингтон ауруының дамуымен байланысты. Мутантты *Htt* ақуызы әртүрлі жасушалық функцияларды бұзады, бұл мидың белгілі бір аймақтарының дегенерациясына және аурумен байланысты неврологиялық белгілердің көрінісіне әкеледі [63, 64].

ГА кезінде әдетте 30 жастан 50 жасқа дейін үш негізгі белгілер байқалады, оларға қозғалудың нашарлауы, когнитивті белгілер және психиатриялық өзгерістер жатады. Бұл белгілер жиі жасырын түрде басталады және үдемелі болады. ГА-ның негізгі белгілерінің бірі хорей болып табылады, ол жалпы денеге, бетке және қолдарға әсер ететін қысқа, еріксіз қозғалыстар ретінде байқалады. Хорей үдемелі сипатқа ие және ерікті қозғалыстардағы қиындықтарға әкеледі, соның салдарынан, жүруге, сөйлеуге және жұтуға үлкен кері әсерін тигізеді [65]. Мутантты гентингтиннің (*mHTT*) ГА пациенттерінде зиянды әсер ететін бірнеше механизмдері анықталған. Олар соңғы жүргізілген көптеген *in vitro* және *in vivo* зерттеулері арқылы түсіндірілді. Бұл патологиялық процестерге N-метил-D-аспаратат рецепторлары арқылы әсер ететін экситоцитотоксикалық, дофаминергиялық дисфункция, митохондриялық дисфункция, реттелмеген аутофагия және қалыпты емес ақуыз агрегациясы жатады. Дегенмен, осылармен ғана шектеліп қоймай ГА-мен ауырған адамның миында бұл ауытқулар *mHTT* функциясының уытты күшеюімен де, қалыпты *HTT* функциясының жоғалуымен де байланысты деп есептеледі. Сондай-ақ, polyQ агрегаттарында протеасомалар мен убиквитиннің жиналуы polyQ ауруының патогенезіне ақуыздың жеткіліксіз қатпарлануы мен ыдырауына әсер етеді деп болжайды. Бүгінгі күні ГА зерттеу үшін көптеген жануарлармен адамдардың үлгілері жасалу арқылы әр түрлі полиглутаминді қайталымды ауруларға зерттеулер жүргізілуде [66].

Соңғы жылдары ГА прогрессиясын бәсеңдету немесе тоқтату үшін *HTT* геніне бағытталған терапияны әзірлеуге айтарлықтай күш салынуда. Бұл стратегияларға антисенстік олигонуклеотидтермен генді өшіру (silencing with antisense oligonucleotides), РНҚ интерференциясы, микроРНҚ биомаркерлері және CRISPR-Cas9 сияқты генді өңдеу технологиялары жатады [39, 67-69].

Дентаторубралды паллидолизия атрофиясы (ДПА). Бұл ауру ауыспалы миоклония, эпилепсия, атаксия және деменция сияқты белгілермен сипатталатын нейродегенеративті ауру. ДПА - аутосомды-доминантты, тұқым

куалайтын атаксиялар тобының бірі болып табылады және атрофин-1 (*ATN1*) геніндегі CAG тринуклеотидінің қайталану сандарының қалыптан тыс артуынан (≥ 48 тандемдік көшірмелер) туындайды. Сонымен қатар, 12p13.3 хромосомасында *ATN1* генінің 5 және 200 кДа атрофин-1 ақуызын кодтайды. Атрофин-1 белгілі транскрипциялық коррегулятор болып табылады, бірақ әлі де болса нақты зерттелмеген. Аурудың басталу жасы 1 жастан 62 жасқа дейін, орташа басталу жасы 30 жасты құрайды. ДПА ауруы бастапқыда Азиялық популяцияларда танылды, дегенмен кейіннен басқада этникалық топтарда диагноздары күшейе түсті. ДПА ауруының негізгі белгілері әрбір келесі ұрпақта неғұрлым ауыр және ерте көрініс табады [39, 70-72].

1-ші типті X тәрізді жұлын бұлшықет атрофиясы (1ХЖББА). 1ХЖББА ауруы сонымен қатар Кеннеди ауруы деп те аталады. Ол андрогендік рецепторлар (*AR*) генінің бірінші экзонда >35 CAG қайталымның артуынан пайда болатын ауру. Мутантты *AR* жасуша ядросында жинақталады және жасушаға тікелей уыттылыққа әкеледі (көбінесе төменгі моторлы нейрондар мен миофибрилдер), бұл клиникалық түрде ересектердегі төменгі моторлы нейрондардың баяу үдемелі зақымдалуына және аурудың басында бастапқы миопатияға әкеледі [73, 74]. Ген Xq11-q12-де орналасқан андроген рецепторы лигандтармен байланысқаннан кейін әдетте ген экспрессиясын реттейтін ядролық рецептор болып табылады. Қалыпты жағдайда бұл аймақ 9-дан 34-ке дейін қайталанатын, ал 1ХЖББА-мен зардап шеккен адамдарда 36-66 аймақта қайталанатын [39]. 1ХЖББА аурулары бар емделушілерде әдетте негізгі клиникалық белгі ретінде баяу үдемелі бұлшықет әлсіздігі байқалады, ол әдетте төменгі аяқтарда проксимальды түрде басталып, ауру ағымында дамиды, сонымен қатар бұлшық ет және дистальды бұлшықет топтарын қамтиды [75].

1.1.2 Полиглутаминді емес аурулар

Келесі полиглутаминді емес ауруларға Фрагильді X синдромы (FXS-Fragile X syndrome), X ассоциирленген Фрагильді тремор/атаксия синдромы (FXTAS-Fragile X associated tremor/ataxia syndrome), Фридрейх атаксия (FRDA), 1-ші типті миотоникалық дистрофия (DM1) және 8-ші типті ЖЦА жатады. Әрбір ауру бірегей қайталанатын кодонды қамтитындықтан, алты полиглутаминді емес аурулар бір-біріне салыстырмалы түрде аз ұқсастық көрсетеді. Ең бастысы, олардың ешқайсысының Гентингтон ауруы немесе басқа полиглутаминді ауруларға ұқсастығы жоқ. Осы себепті полиглутаминді емес бұзылыстардың төменде қысқаша сипаттамасын ғана береміз [34]:

Фрагильді X синдромы - Даун синдромынан кейінгі ақыл-ой кемістігінің екінші себебі және ер адамдарда ақыл-ой кемістігінің ең көп таралған түрі болып табылады [76]. Фрагильді X синдромы, Мартин-Белл синдромы деп те аталатын тринуклеотидті қайталанатын бұзылыс. FXS жанама түрде цитозин-гуанин-гуанин (CGG) триплет қайталануының X хромосомасында орналасқан Фрагильді X ақыл-ой кемістігінің генінің (*FMR1*) ішінде триплет сандарының артуының нәтижесі болып табылады [77]. Бұл CGG санының артуы *FMR1* генінің экспрессиясын басады, нәтижесінде X ақыл-ойы тежелген ақуызының (*FMRP*)

жойылған немесе айтарлықтай төмендеген экспрессиясы пайда болады. FMRP нейрондық байланыстарды (синапстар) және аналық бездердің кейбір функцияларын дамыту үшін қажет. FMRP болмауы FXS тікелей себебі болып табылады. Бұл ауруды диагностикалау FMR1 геніндегі CGG қайталануларының санын анықтайтын молекулалық-генетикалық тестілеу арқылы жүзеге асырылады. Әдетте, ол 5 пен 40 қайталану арасында болады. 55-200 қайталымдары бар адамдарда FMR1 генінің премутациясы болады. 200-ден астам CGG қайталымдары бар адамдарда FXS үшін тұтас мутация пайда болады [78].

X ассоциирленген Фрагильді тремор/атаксия синдромы - егде жаста басталатын (> 50 жас) нейродегенеративті бұзылыс, бұл ауру X ақыл-ой кемістігі (FMR1) геніндегі премутациялы CGG қайталым сандарының артуының тасымалдаушыларында пайда болады. FXS және FXTAS аурулары екеуі де бір геннің, яғни FMR1 генінің мутацияларынан туындаған, бірақ олар осы гендегі әртүрлі өзгерістерден туындайды. FXS ауруы FMR1 генінің тұтас мутациясынан, ал FXTAS ауруы FMR1 генінің премутациясынан туындайды. Бұл ауруда X хромосомасында орналасқан FMR1 геннің 5'UTR аймағында тринуклеотид (CGG) қайталануы болады [79-82].

Фридрейх атаксиясы - бұл балалар мен жасөспірімде баяу үдемелі жүретін дегенеративті аурудың түрі. Бұл ауру кезінде адамдарда неврологиялық ерекшеліктер (атаксия, үйлестірудің жоғалуы, сенсорлық жоғалту, дизартрия, көру дисфункциясы және есту қабілетінің жоғалуы), сондай-ақ прогрессивті кардиомиопатия, сколиоз және қант диабетінің жоғары қаупі дамиды [83]. Фридрейх атаксия - тек FXN геніндегі мутациялардан туындайтын аутосомды-рецессивті ауру, олардың барлығы функционалды фратаксин ақуызының деңгейінің төмендеуіне әкеледі. Пациенттердің 96% екі мутация геннің бірінші интронында GAA қайталануы ұзартылған болып келеді, мұндай мутациялар фратаксинге арналған мРНК транскрипциясын қалыпты деңгейдің шамамен 10%-ға дейін төмендетеді [84]. 9q21.11 хромосомада орналасқан фратаксин генінде интрондық тринуклеотидті қайталау тізбегі бар (гуанин-аденин-аденин - GAA). Фридрейх атаксия пациенттерінің көпшілігі осы тринуклеотидті GAA қайталым санының артуы үшін гомозиготалы, ал типтік генде 6-36 тринуклеотидті қайталанулары болады. Бұл ауру кезінде әдетте 66-дан жоғары тринуклеотидтердің қайталанулары кездеседі [85].

1-ші типті миотоникалық дистрофия (DM1) - Миотоникалық дистрофия миопатия ересек жаста басталатын бұлшықет дистрофиясының ең көп таралған түрі болып саналады. Клиникалық және молекулалық көрініс негізінде танылған екі негізгі формалары бар: олар Штайнерт ауруы деп аталатын I типті миотоникалық дистрофия (DM1) және II типті миотоникалық дистрофия (DM2) немесе DM1 жеңіл түрі болып табылатын проксимальды миотоникалық миопатия [86]. DM1 және DM2 екеуі де ДНҚ тандемінің қайталануының ұзаруынан туындайды, бұл функция мутациясының РНҚ артуына әкеледі. DM1 ауруы 19q13.3 хромосомасындағы DM1 протеинкиназа (DMPK) генінің 3' UTR аймағында цитозин-тимин-гуанин (CTG) қайталануының жоғарлауынан

туындайды. Ал DM2 болса 3q21.3 хромосомасындағы CCHC типті нуклеин қышқылын байланыстыратын ақуыз (CNB немесе ZNF9) генінің интронында орналасқан цитозин-цитозин-тимин-гуанин (CCTG) тетрануклеотидті қайталануының артуынан туындайды [87].

8-ші типті ЖЦА - бұл ауру адамның 13q21-21.33 хромосомасындағы атаксин-8 қарама-қарсы тізбекті ATXN8OS деп аталатын геннің 3'UTR аймағында жатқан тринуклеотидті CTG қайталану санының артуынан туындайды [88]. Қалыпты аллельдерде 15-50 қайталау болса, ұзартылған аллельдерде 71-1300 немесе одан да көп қайталанулар болады. ATXN8OS геніндегі CTG қайталымының артуы токсинді болып келеді. Дегенмен, CTG артуы бар барлық субъектілерде церебеллярлық атаксия дамымайды. 8-ші типті ЖЦА фенотипі ЖЦА-ның басқа түрлеріне қарағанда кеңірек өзгереді және оның спектрлік дисперсиясы нақты анықталған жоқ [89, 90].

Бұл бұзылулардың негізгі себептері мен механизмдері әртүрлі және көбінесе генетикалық, қоршаған орта және өмір салты факторлары арасындағы күрделі өзара әрекеттесуді қамтиды. Сонымен қатар, бұл аурулардың ерте диагностикалық әдістері мен емдік жолдары әліде болса толық зерттелмеген. Дегенмен, соңғы зерттеулерде микроРНК молекуласының организмде әртүрлі биологиялық процестерде рөл атқаратындығын ескере отырып, нуклеотидті қайталымды аурулардың диагностикасында және балама емдеу жолдарында биомаркер ретінде ұсыныстар болжануда [91, 92]. МикроРНК молекуласының дисрегуляциясы polyQ ауруларындағы зерттеудің жаңа бағыты болып табылады. МикроРНК молекуласының жалпы құрылысы, қызметімен нуклеотидті қайталымды аурулардағы рөлі бойынша келесі тарауларда қарастырылатын болады.

1.2 МикроРНК молекуласының жалпы сипаттамасы

1.2.1 МикроРНК молекуласының биологиялық функциясы және биогенезі

МикроРНК (microRNA, miRNA) адам организмімен қоса өсімдіктерде, жануарларда және кейбір вирустарда кездесетін, ұзындығы шамамен 18-25 нуклеотидті құрайтын, шағын әрі кодталмайтын РНК молекулалары болып табылады [93]. Көптеген микроРНК молекулалары ДНК тізбегінен бастапқы микроРНК молекуласына (pri-miRNA) транскрипцияланады және алдыңғы микроРНК молекуласына (pre-miRNA), сонымен қатар жетілген микроРНК молекуласына (mature miRNA) өңделеді. Көп жағдайларда микроРНК экспрессияны басу үшін нысана матрицалық немесе ақпараттық РНК молекуласының (messenger RNA, mRNA) 3'UTR аймағымен әрекеттеседі [94]. Дегенмен, соңғы жылдары микроРНК молекуласының геннің басқада аймақтарымен, яғни 5' UTR және CDS аймақтарында өзара әрекеттесулері анықталды [95, 96].

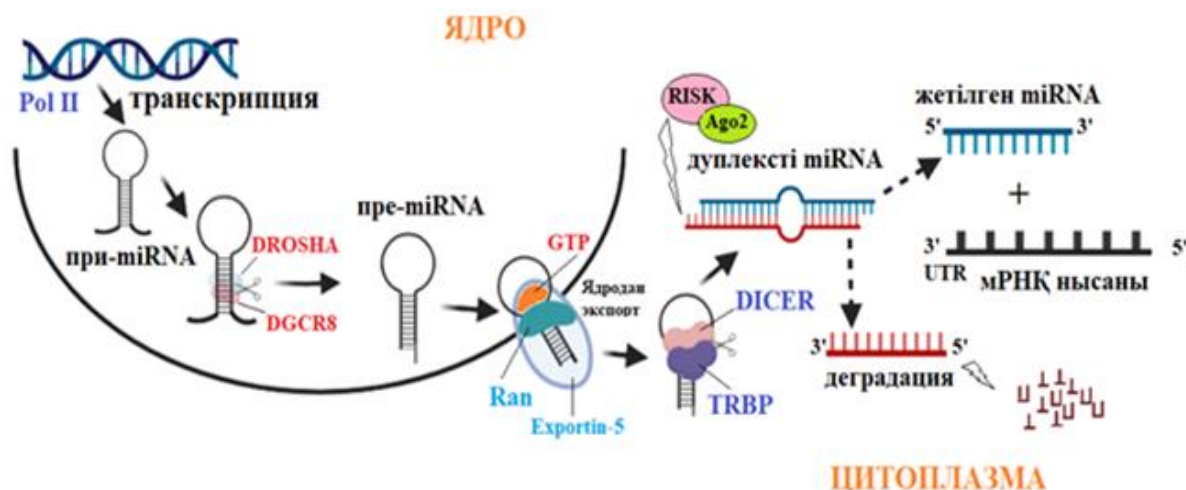
Ең алғашқы микроРНК молекуласы 2001 жылы *Caenorhabditis elegans* - нематодында реттеуші рөлге ие екендігі анықталды [97]. Осы ашылудан кейін көп ұзамай әртүрлі жануарлар мен өсімдіктерде бірнеше микроРНК молекулалары туралы мақалалар жарияланды. МикроРНК молекулаларының

ашылуы ген экспрессиясының транскрипциядан кейінгі реттелуі туралы түсініктермен әлемдік ғылымдарда айтарлықтай өзгеріс жасады және микроРНК молекулалары ғылыми зерттеу топтарының негізгі назарына айналды [98, 99]. Соңғы он жылдықта жаңа буынды секвенирлеу (NGS-next generation sequencing) және *in silico* әдістерінің қарқынды дамуымен микроРНК идентификациялары қарқын алды [100].

МикроРНК молекулалары «mir» атауы және бірегей сәйкестендіру нөмірі арқылы аталады (мысалы, miR-1, miR-2, miR-3 және т.б.) [101]. Сонымен қатар, әрбір «mir» атаудың алдында әр түрге тән үш әріп қойылады. Мысалы, адамдар (*Homo sapiens*) үшін бұл әріптер «hsa» (мысалы, hsa-mir-367), қарапайым егеуқұйрық үшін (*Rattus norvegicus*) «rno» (мысалы, rno-mir-1), ал ggo-mir-155 горилланың (*gorilla*) микроРНК молекуласы атауының мысалы болып табылады [102].

МикроРНК биосинтезінің механизмі эволюциялық түрде сақталған және рибонуклеаза (Rnase), Дроша (Drosha) және Дайсер (Dicer) ферменттері арқылы жүзеге асырылатын эндонуклеолитикалық бөлінулерді қамтиды. МикроРНК молекулаларының жартысына жуығы интрагендік болып табылады және интрондардан, ақуызды кодтайтын гендердің салыстырмалы түрде аз экзондарынан өңделеді, ал қалғандары интергендік, қожайын генінен (host gene) тәуелсіз транскрипцияланады [103, 104].

МикроРНК биогенезі барысында алдымен микроРНК гендері ядрода РНК полимераза II (Pol II) арқылы при-микроРНК ретінде транскрипцияланады. Бұл ұзын при-микроРНК молекулалары кейіннен қос тізбекті Rnase III ферменті Drosha және оның маңызды кофакторы DGCR8 арқылы ыдырап, пре-микроРНК түзеді [105]. Содан кейін пре-микроРНК молекулалары экспортин-5 (exportin-5) және оның кофакторы арқылы ядродан цитоплазмаға экспортталады [106]. Ядродан экспортталғаннан кейін пре-микроРНК молекулалары микроРНК дуплекстерін жасау үшін RNase III ферменті Dicer арқылы үзіледі. Dicer, TRBP (TAR-RNA-binding protein) және Argonaute ақуыздары пре-микроРНК өңдеуін және РНК-индукцияланған дыбыссыздану кешенін (RNA-induced silencing complex) қалыптасуын реттейді. Содан кейін дуплекстің бір тізбегі жетілген микроРНК, Argonaute ақуызы және басқа ко-факторларды қамтитын микроРНК-индукцияланған дыбыссыздану кешеніне (miRISC) жиналады, ал екінші тізбегі ыдырайды. Жетілген микроРНК молекулалары нысана мРНК молекулаларының 3'-UTR-де бастапқы тізбектерді таниды және трансляциялық репрессияны және мРНК деградациясын тудырады (сурет 2) [107, 108].



(Pol II – РНҚ полимераза 2; DROSHA/DGCR8 - микропроцессорлық кешен: RNase III DROSHA DGCR8 (Pasha) ақуыздық серіктесімен; RAN/Exportin-5/GTP - Ran ГТФазалы Exportin-5 кариоферин тасымалдаушысы; DICER/TRBP - РНҚ-мен байланысатын TRBP ақуызы бар III DICER РНҚазасы; RISC - РНҚ-индуцирленген дыбыссыздану кешені; AGO2 – Argonate, RISC каталитикалық суббірлігі және DICER/TRBP серіктесі РНҚаза белсенділігіне ие; pri-miRNA - бастапқы (primary) микроРНҚ; pre-miRNA - алдыңғы (precursor) микроРНҚ).

Сурет 2 - МикроРНҚ молекуласының биогенезі [101]

МикроРНҚ молекуласының функциялары туралы жалпы түсінік болғанымен олардың биогенезінің механикалық бөліктері және RISC процестері жайлы нақты түсінік жоқ. Бұл молекулалық биологияның жаңа және қызықты саласы ғылым саласымен медицинаға терең әсер етіп алға жылжытуда. Анықталған микроРНҚ молекуласының биологиялық қызметі белгісіз болса да, осы молекулалардың экспрессиялық профилдерін зерттеу олардың реттелуі мен қызметі туралы ақпаратты береді [109-112].

МикроРНҚ молекуласы организмде жасушаның дамуына, дифференциацияға, жасушалық циклге, пролиферацияға және апоптозды қоса алғанда, барлық биологиялық жолдарда маңызды рөл атқарады [113]. Көптеген зерттеулер транскрипция мен трансляция процестерін бағалау үшін микроРНҚ молекуласының әртүрлі жасушалық аймақтарда қозғалатынын көрсетеді. Оның транскрипциядан кейінгі генді реттеуде бағыттаушы молекула ретінде әрекет ету мүмкіндігі бар [114, 115]. Гендерді реттеу механизмдерінде бірінші және негізгі механизм трансляциялық репрессия мен мРНҚ деградация процестерін бастайтын мРНҚ ыдырауы болып табылады. РНҚ байланыстыратын ақуыздар тікелей немесе жанама түрде аргонавт тұқымдасының ақуызымен (Ago) байланыса отырып микроРНҚ арқылы трансляциялық репрессия деп аталатын процесте маңызды рөл атқарады [116, 117].

Ғылымның молекулалық биология, генетика және биоинформатика саласында микроРНҚ молекулаларына қызығушылық артқан сәттен бастап

көптеген зерттеулер плазма мен сарысуда, жұлын сұйықтығында, сілекейде, құрсақ сүтінде, несепте, көз жасында және аналық бездің фолликулярлық сұйықтығы сияқты биологиялық сұйықтықтарда жасушадан тыс айналымдағы микроРНК молекулаларын анықтады [118]. МикроРНК молекуласының жоғарыда айтып кеткеніміздей, жасушалық сигналдардың берілуі, метаболизм, жасушалардың дифференциациясы және көбеюі, сонымен қатар гендердің экспрессиясының реттелуінде маңызды рөл атқару сияқты биологиялық маңыздылығына байланысты кейбір микроРНК молекулалары әртүрлі ауруларды диагностикалау, болжау және емдеудің болжамды нысаны болып отыр [119, 120].

1.2.2 МикроРНК молекуласының адам ауруларындағы рөлі

МикроРНК молекуласының транскрипцияға қатысатын нақты механизмдері белгісіз, бірақ геномдағы басқа гендерге жақындығы және олардың кодтаушы гендердің, кодталмаған гендер мен экзондардың интрондарындағы орналасуы олардың экспрессиясына әсер етеді деп хабарланды [121]. Эукариоттық организмдерде геномның барлығы дерлік (97%) рибосомалық РНК (rRNA), тасымалдаушы РНК (tRNA), интрондар, 5' және 3' UTR аймақтарында, транспозициялық элементтерден, интергендік аймақтардан және микроРНК молекуласынан тұратын кодталмаған РНК (ncRNA) ретінде транскрипцияланады [122, 123].

МикроРНК молекулаларының организмде метаболизм, жасуша пролиферациясы, апоптоз, даму сияқты биологиялық процестерде [124] маңызды рөл атқаратындығымен қоса, нейрондық ген экспрессиясында, ми морфогенезінде, бұлшықет дифференциациясы мен тін жасушаларының бөлінуінде ерекше орын алады [125]. МикроРНК молекулаларының қазір барлық эукариоттардың дамуымен байланысты белгілі процестерді реттеуде шешуші рөл атқаратындығы танылып келеді [126]. МикроРНК деңгейінің төмен немесе жоғары болуы миокард инфарктісінен аутоиммундық ауруға дейінгі бірқатар клиникалық маңызды аурулармен байланысты болды [127]. Сонымен қатар, микроРНК молекулаларының деңгейінің өзгерістері адамның әртүрлі қатерлі ісіктеріне әкелуі мүмкін екендігі де анықталды. Шамадан тыс экспрессияланған микроРНК молекулалары онкогендер (ісік-супрессор гендерінің төмендеуі арқылы) немесе жасуша дифференциациясы немесе апоптоз сияқты жасушалық процестердің реттеушісі ретінде қызмет ете алады [128, 129]. Қатерлі ісіктің көптеген түрлері үшін бірегей микроРНК экспрессия профилдері анықталған. Мысалы, сүт безі ісігінде miR-21, miR-155, miR-23 және miR-191 экспрессиясы жоғары болған, ал miR-205, miR-145, miR-10b және miR-125b экспрессиясы төмен деңгейді көрсеткен. Осы сияқты аналық бездерде miR-200a, miR-200c және miR-141 жоғары, miR-199a, miR-140, miR-145 және miR-125b төмен экспрессияланған [130].

Соңғы жылдары микроРНК молекулаларының ашылуы жүрек қызметін және жалпы сүтқоректілердің жүрек қан тамыр жүйесін реттеуде маңызды функциясы бар екені көрсетілуде [131, 132]. Жақында жүргізілген зерттеулер

көрсеткендей, үш микроРНК (miR-1, miR-133 және miR-208) жүректе жоғары экспрессияға ие екендігі және жүрек дамуы мен миоциттердің дифференциациясының маңызды реттеушілері болып табылды [133-136].

Сонымен қатар, жақында жүргізілген тағы бірқатар зерттеулер микроРНК молекулалары қан тамырларының қабынуында және лейкоциттердің белсендірілуіндегі рөлін және олардың тамыр қабырғасына инфильтрациясын зерттеді. Бұл жүргізілген зерттеулер микроРНК молекулалары қан тамырларының қабынуын бақылайтынының алғашқы дәлелдерін берді [135]. Басқа да зерттеулер, miR-181 гемопэтикалық линия дифференциациясын реттеуге қатысатынын көрсетті. В-жасушаларының дифференциациясын реттейтін бірнеше miR-17-92 және miR-150 сияқты микроРНК молекулалары анықталды [137-139].

Ген экспрессиясының профилін құру туралы зерттеулер адам ауруларының кең ауқымында микроРНК экспрессиясының өзгеруін көрсетті. Көптеген жағдайларда функционалдық зерттеулер микроРНК дисрегуляциясын аурудың дамуының себепті факторы ретінде байланыстырды. Сондықтан да бұл бөлімде микроРНК өзгерістерімен байланысты нуклеотидті, әсіресе тринуклеотидті қайталымды бұзылыстары бар ауруларды қарастыратын боламыз.

Адам геномында тринуклеотидті қайталанулар, әсіресе интергендік аймақтарда, гендік интрондарда және трансляцияланбаған аймақтарда және ақуызды кодтайтын гендердің трансляцияланған сегменттерінде көп [140]. Триплет қайталым санының шамадан тыс артуы кеш басталған неврологиялық ауруларға әкеледі. Аурудың ауырлығы мен басталуы негізінен нуклеотидті қайталым санының артуының ұзақтығына байланысты [141].

МикроРНК туралы зерттелген ғылыми жұмыстар микроРНК биогенезі мен қызметіне деген қызығушылықтың тез өсіп келе жатқанын және әртүрлі микрочипті талдауларымен біріктірілген терең секвенирлеу технологиялары микроРНК молекулаларын зерттеуде, соның ішінде тринуклеотидті қайталымды бұзылысты ауруларда микроРНК молекуласының реттелуін зерттеу жүйелі түрде қолданылып келетіндігін көрсетті [142-144]. Биологиялық процестердің көпшілігінде реттеуші микроРНК негізгі рөлді атқарады. МикроРНК молекуласының өзгерген экспрессиясы және микроРНК басқаратын гендердің дерегуляциялары қатерлі ісік және жүрек-қан тамырлары, метаболикалық, неврологиялық бұзылулар, соның ішінде тринуклеотидті қайталымды сияқты көптеген бұзылыстармен байланысты болды [145-147].

Зерттеулер көрсеткендей, микроРНК молекулаларының адам миында 1000-нан астам түрі болуы мүмкін және жүйке жүйесіндегі микроРНК молекуласының экспрессиясы аймақтық, тіндік және кеңістіктік уақыттық ерекшеліктерге ие екендігі анықталды. Атап айтқанда, miR-10b-5p, miR-145-5p, miR-378c және miR-217 негізінен префронтальды қыртыста, miR-205 фронталды қыртысында және miR-21-3p, miR-224 және miR-373-3p негізінен мидың қара субстанциясында (substantia nigra) экспрессияланған [148].

1.2.3 PolyQ ауруларындағы микроРНК молекулалары

1.2.3.1 Жұлын церебеллярлы атаксия және микроРНК молекулалары

МикроРНК молекулаларының жүйке жүйесінің дамуы мен реттелуінде және жүйке жүйесінің бұзылуларындағы рөлі көптеген зерттеулерде дәлелденген. Сондықтан да микроРНК молекулаларының белгілі бір ЖЦА ауруын кодтайтын гендердегі жеке микроРНК молекулалардың белсенділігін анықтаудың маңыздылығы артып отыр [149]. МикроРНК молекулаларының реттеуі мен CAG қайталанатын ЖЦА арасындағы ерекше байланыстар бірнеше зерттеулерде сипатталған [150]. Кейбір микроРНК молекулаларының CAG қайталану санының артуын қамтитын нысана транскрипт мРНК экспрессиясын реттей алатындығы бойынша деректер 1-ші типті ЖЦА бойынша зерттеулер алғашқы болып анықталды. 1-ші типті ЖЦА - атаксин-1 құрамындағы polyQ қайталымның артуынан туындаған тұқым қуалайтын нейродегенеративті ауруларда miR-19a, miR-101 және miR-130a-лар *ATXN1* трансляциясын тежеу арқылы *ATXN1* мен бірге 3'-UTR аймақта реттейтінін анықтады. Репортер талдауы арқылы miR-19a, miR-101 және miR-130a - *ATXN1* экспрессиясын төмендететінін көрсетті [151]. miR-144 геномдық микромассивті талдауда 1-ші типті ЖЦА-мен байланысты деп болжанған. Ол эндогендік *ATXN1* ақуызының деңгейін едәуір төмендетті. Сонымен қатар, miR-144 активтенуі ұзартылған мутантты *ATXN1* цитотоксикалық әсерлерін төмендетті және микроРНК дерегуляциясы 1-ші типті ЖЦА дамуына қатысуы мүмкін екендігі анықталған. Сондай-ақ, miR-150 деңгейлерінің жоғарылауы Rgs8 (G-белок сигнализациясының реттегіші 8) экспрессиясын басу арқылы 1-ші типті ЖЦА патогенезіне әсер еткені және тышқан үлгісінде церебеллярлық Пуркинье нейрондарында тамырлы эндотелий өсу А факторы (VEGFA) төмендеуіне ықпал еткені көрсетілді [152, 153].

Келесі 2-ші типті ЖЦА келетін болсақ, қазіргі уақытта бұл аурудың патогенезіндегі микроРНК рөлі туралы аз зерттеулер жүргізілген. Тек кейбір зерттеулерде атаксин-2 ақуызының *argonaute 1* (Ago1)-мен әрекеттесу арқылы miR-12 репрессиялық белсенділігін төмендететінін және атаксин-2 дрозофиладағы микроРНК молекулаларының жұмыс істеуі үшін қажет болуы мүмкін екендігі айқындалған [154]. Дрозофиланың трансгендік 3-ші типті ЖЦА моделі микроРНК экспрессиясының реттелуін зерттеу үшін пайдаланылды. Патологиялық процестің басында жүргізілген зерттеулер miR-1 деңгейінің төмендеуіне және miR-33, miR-92a және miR-100 деңгейлерінің жоғарылау тенденциясын анықтады, алайда микроРНК экспрессиясында байқалған өзгерістер статистикалық маңызды болып табылмады [155].

17-ші типті ЖЦА ТАТА байланыстыратын ақуызда қайталанатын polyQ экспансиясынан туындайды және ядроішілік ақуыз агрегациясымен және церебеллярлық нейрондардың селективті жоғалуымен сипатталады. miR-29a/b сандық ПТР арқылы 17-ші типті ЖЦА жасушалық моделінде төмен реттелу анықталды. miR-29a/b-BACE1 регуляторлы байланысы 17-ші типті ЖЦА нейрондық жасуша өліміне әкелетін молекулалық механизмнің бөлігі болуы мүмкін [156-158]. Атаксин 2 сияқты кейбір патогендік ақуыздар микроРНК

функциясы үшін қажет болуы мүмкін. Бұл нәтижелер микроРНК жолдары polyQ-индукцияланған нейродегенерацияны модуляциялай алатынын көрсетеді, бірақ polyQ ауруларының патогенезі микроРНК экспрессиясына да әсер етуі мүмкін [159].

1.2.3.2 Гентингтон ауруындағы микроРНК молекулаларының рөлі

Гентингтон ауруында (ГА) нейродегенерацияның нақты механизмі түсіндірілмеген, дегенмен мутант гентингтин (mutHTT) функциясының артуы мен қатар жабайы типтегі HTT (wild HTT) ақуыздың функциясының жоғалуы ГА патологиясына ықпал етеді [160]. Адам миында нейрондар polyQ тізбегі бар mutHTT-қа айтарлықтай сезімталдық көрсетеді, бұл нейродегенеративті аурулардың дамуына әсер етеді [161]. mutHTT, яғни мутантты HTT генінің экспрессиясының, сондай-ақ нейрондық микроРНК деңгейлерінің кең таралған өзгерістері ГА ауыратын адамдарда кеңінен сипатталған. Сондықтан, микроРНК дерегуляциясы ГА және басқада polyQ ауруларының белгісі ретінде танылды [162, 163]. Мутантты HTT ақуызының polyQ ұзаруы немесе экспансиясы репрессорлық элемент-1 (RE-1) үнсіздендіру транскрипциясы (REST repressor element-1 silencing transcription) мен htt ақуызы арасындағы өзара әрекеттесуді тежей алады. Осылайша, ГА пациенттерінің ядросында REST агрегациясына ықпал етеді және сәйкес гендердің экспрессиясын тежейді [164]. Жалпы зерттеулер REST әртүрлі микроРНК, соның ішінде miR-29a, miR-29b, miR-132 және miR-135b арқылы реттелетінін анықтады [165]. Сонымен қатар, miR-9, -29a, -29b, -124a, -132, -135b, -139, -203, -204, -212, -330 және -346 REST экспрессиясымен байланысты екенін көрсетті [166]. Жақында тағы екі miR-137 және miR-153 микроРНК молекулалары - REST тікелей нысаны екендігі анықталды. Осы аталған барлық деректер ГА байланысты микроРНК реттелуінде REST маңыздылығын нақты көрсетеді [167].

miR-218, miR-196a және miR-486 патологиялық аймақтарда, соның ішінде ГА жоғары экспрессияланған, ал miR-132, miR-9, miR-124a, miR-29b және miR-22 ГА пациенттерінде төмен экспрессиясын көрсеткен [168]. Сонымен қатар, miR-100, miR-16, miR-151-3p, miR-219-2-3p, miR-451, miR-27b және miR-92a мидың жолақ және маңдай қыртысында жоғары экспрессиясы анықталған. Соңғы онжылдықтарда көптеген ГА жасушаларының үлгісі мен жануарларды зерттеулерде микроРНК әртүрлі зерттеу жолдар арқылы пациенттердің патогенезіне, прогрессиясына және болжамына әсер етуі мүмкін екенін айқындады [169, 170].

1.2.3.3 Дентаторубралды паллидолизиан атрофиясы және жұлын бульбарлы бұлшықет атрофиясындағы микроРНК молекулаларының рөлі

Дентаторубралды паллидолизиан атрофиясы (ДПА) үшін көптеген зерттеулер микроРНК молекуласының нейродегенерациямен байланысты гендік нысандарға әсерін зерттеу үшін дрозофила сияқты қарапайым модельді организмдерді қолданды. Атрофин-1 ДПА-мен байланысты нейродегенерация патогенезіне қатысады [171]. ДПА нейродегенерация атрофин-1 ақуызындағы

CAG қайталануының тұрақсыз артуынан туындайды [172]. miR-8 мутантты фенотиптерін атрофин активтілігінің жоғарылауымен байланыстыруға болады, бұл ми апоптозының және мінез-құлық ақауларының жоғарылауына әкеледі [173].

Жұлын бульбарлы бұлшықет атрофиясы (ЖББА) - андрогендік рецепторларда polyQ қайталануынан туындаған ересектерде пайда болатын жүйке-бұлшықет ауруы. Бірнеше зерттеулер ЖББА тапшылығына байланысты РНҚ өңдеу ақаулары жүйке-бұлшықет жүйесінің бұзылуына әкелуі мүмкін деген болжам жасады. Жақында miR-196a шамадан тыс экспрессиясының ЖББА үлгілерінде маңызы бар екені көрсетілді, бұл нәтижеге транскрипциядан кейінгі жағдайларды реттеуге қатысатын РНҚ байланыстыратын ақуыз *CELF2* экспрессиясын басу арқылы жанама түрде қол жеткізілді [174, 175]. miR-298 жабайы және мутантты типті *AR* және ЖББА бар емделушілерден алынған фибробласттарды шамадан тыс экспрессиялайтын жасушаларға трансфекцияланған кезде *AR* генінің мРНҚ-мен ақуыз деңгейін төмендетеді. Сонымен қатар, miR-298 адамдағы *AR* транскриптінің 3'-UTR-де тікелей байланысып, *in vitro* жағдайында *AR* уыттылығына қарсы тұра алады [176].

1.2.4 Полиглутаминді емес аурулардағы микроРНҚ молекулаларының рөлі

FMRP ақуызы алғаш рет полиглутаминді емес аурулардағы Фрагильді Х синдромы ауруында сипатталды [177]. FMRP - мРНҚ-мен байланысатын ақуыз болып табылады және спецификалық мРНҚ-мен әрекеттесу арқылы ақуыздың трансляциясын бақылайды. МикроРНҚ жолдарының бұзылуы Фрагильді Х синдромда қалыптан тыс синаптогенезге ықпал ететіндігі туралы дәлелдер бар [178, 179]. Кейбір зерттеулерде miR-125a экспрессиясы тышқандардың миындағы синаптонеуромаларда (нейрондардағы күрделі құрылымды сипаттау үшін қолданылатын термин) төмен болған, бұл miR-125a дисрегуляциясы Фрагильді Х синдромында синапс функциясының бұзылуына қатысатынын көрсетеді [180]. Бірнеше зерттеулер дрозифилада, сүтқоректілерде және Фрагильді Х синдромында микроРНҚ жолдары мен мутант *FMR1* гендер арасындағы байланыстарды анықтады [181, 182]. Сонымен қатар, FMRP ақуызы AGO1, AGO2 және Dicer сияқты РНҚ интерференция компоненттерімен әрекеттесетіні және эндогендік микроРНҚ-мен байланысатыны айқындалған [181, 183-185].

Потенциалды терапиялық стратегиялар ретінде фратаксиннің транскрипциясы мен аудармасына ерекше назар аударылғанына қарамастан, Фридрих атаксиясында дұрыс реттелмеген микроРНҚ немесе мРНҚ арқылы фратаксинді реттеу туралы ақпараттар хабарланбаған.

1-ші типті миотоникалық дистрофия (DM1) протеинкиназа генінің (*DMPK*) 3' UTR аймағындағы цитозин-тимин-гуанин (CTG) артуынан туындайды [186, 187]. *DMPK* генінің екі жақты транскрипциясының ашылуы, аберрантты ДНҚ метилденуін, қайталанатын ATG емес трансляция және микроРНҚ дерегуляциясы DM1 патологиясының күрделілігін арттырды [188-190]. DM1 алдымен бұлшықет дистрофиясы және ең көп зардап шеккен тін бұлшықет

болғандықтан, аурудың ықтимал биомаркері ретінде микроРНК реттелуінің бұзылуына алғашқы зерттеулер бұлшықеттерде жүргізілді [191]. Бұл зерттеулерде miR-103 және miR-107 DMPK жабайы типті аллельді 15% басатыны және CTG қайталанатын микроРНК арқылы мРНК репрессиясы 3'UTR-де CTG саны арта түсетіні анықталды. Олар miR-107 және miR-103 сияқты CTG қайталанатын микроРНК мутацияланған DMPK мРНК-мен артықшылықты байланысатын үлгіні ұсынды, бұл микроРНК сілтісіздендіргіш әсерге ие болуы мүмкін және DM1 патологиясына әсер етеді деген болжамға келген [192]. DM1 науқастарының биопсияларында тек miR-206 шамадан тыс экспрессияланғаны анықталды. Алайда miR-206 болжамды нысана гендері өзгерген жоқ [193]. DM1-де табылған микроРНК реттелмейтін үлгілері және олардың клиникалық фенотиппен байланыстары да олардың терапевтикалық потенциалдығын көрсетеді [194]. Полиглютаминді емес аурулардағы микроРНК-молекулаларының рөлі polyQ ауруларындағы микроРНК молекулаларына қарағанда аз зерттелген, сондықтан да бұлардың арасындағы байланыстар туралы мәліметтер толыққанды емес.

1.2.5 Айналымдағы микроРНК молекулаларын Гентингтон ауруында биомаркер ретінде қолдану

Көптеген зерттеулер микроРНК молекулаларының қатерлі ісік, қант диабеті, жүрек-қан тамырлары ауруларында және нейродегенеративті ауруларды қоса алғанда маңызды биомаркерлер болуы мүмкін деп болжайды [195-198]. Организмде гендердің мРНК-ның нуклеотидті қайталымдарының, әсіресе тринуклеотидті қайталым сандарының қалыптан тыс артуы тұқымқуалайтын нейродегенеративті бұзылыстарға әкеледі [199]. Жалпы алғанда, микроРНК молекулалары жүйке жүйесінде жоғары мөлшерде кездеседі және олардың сигналындағы өзгерістер нейродегенеративті бұзылыстардың патофизиологиясымен байланысты барлық нейробиологиялық процестердің эпигенетикасы мен молекулалық генетикасына қатысты [198, 200]. Нейродегенеративті бұзылыстардың микроРНК дисфункциясы және олардың Паркинсон, Альцгеймер, амиотрофиялық бүйірлік склероз және Гентингтон ауруларында патогенезі анықталуда. Сондықтан, микроРНК молекулаларын зерттеу нейродегенеративті аурулардың, әсіресе нуклеотидті қайталымды бұзылыстарды түсінудің жаңа тәсілі болып табылады. Жақында бірқатар зерттеулер белгілі бір микроРНК молекулаларының адам миында дифференциалды түрде экспрессияланатынын және кейбір микроРНК молекулалардың нейродегенеративті бұзылыстармен байланысты гендерді модуляциялайтынын анықтады [191].

Патогенді полиглютаминнің экспансиясынан туындайтын Гентингтон ауруы емделмейтін ауру болса да, биомаркерлер ерте диагностикалауда немесе аурудың дамуын және емдеу реакциясын көрсете алады. Перифериялық айналымдағы микроРНК ерте диагностикалау және аурудың дамуын бақылау үшін биомаркерлер ретінде кеңінен зерттелді [201]. *Diez-Planelles* және т.б. зерттеулерінде *HTT* генінде 40-45 CAG қайталануы бар 15 симптоматикалық

пациенттер мен жеті сау бақылаулар арасындағы микроРНК деңгейлеріндегі айырмашылықтарды зерттеді. Олар симптоматикалық ГА науқастарында 168 өзгерген айналымдағы микроРНК молекулаларын анықтады. Атап айтқанда, miR-22-5p, miR-30d-5p, miR-128, miR-130b-3p, miR-222-3p, miR-223-5p, miR-223-3p, miR-338-3p, miR-361-5p және miR-425-5p бақылау топтарымен салыстырғанда ГА пациенттерінде экспрессиялары айтарлықтай жоғарылаған. Әрі қарай талдау бірыңғай Гентингтон ауруының рейтингтік шкаласы бойынша жалпы көрсеткіштері жоғары емделушілерде miR-122-5p деңгейлері айтарлықтай төмен болғанын көрсетті. miR-100-5p деңгейлерінің жоғарылауы және miR-330-3p және miR-641 деңгейлерінің төмендеуі ГА бар емделушілердің жалпы функционалдық мүмкіндіктерімен байланысты болды. Авторлар айналымдағы микроРНК профилі аурудың өршуіне байланысты өзгертілуі мүмкін екенін және осылайша аурудың күйін бақылау үшін перспективалы биомаркер болуы мүмкін деп болжады [202]. Кейіннен, *Chang* және т.б. ғалымдардың зерттеулерінде 36 ГА пациенттерінің перифериялық лейкоциттеріндегі микроРНК экспрессия деңгейлерін, сегіз симптоматикалық ГА тасымалдаушыларын және 28 сау бақылауларды зерттеді. Олар 13 кандидат микроРНК молекулаларын анықтады және кейіннен miR-9* ГА пациенттерінде сау бақылауларға қарағанда айтарлықтай төмен екенін анықтаған. Бұл зерттеуде miR-9* деңгейлері мен бірыңғай ГА бағалау шкаласы арасында маңызды корреляция таппады, дегенмен, ГА пациенттерінің перифериялық лейкоциттерінде биомаркер ретінде miR-9* ықтимал салдары қосымша зерттеулерді қажет ететіндігі айқындалды [203].

Микромассивті талдау (microarray analysis) технологиясының жетістіктері микроРНК молекулаларын биомаркерлер ретінде болжау мүмкіндіктерін қамтамасыз етті. Мысалы, осы әдіспен зерттелеген miR-34b және miR-1285 mHTT-Exon-1 трансфекцияланған адам тератокарциномасының (аса күрделі және агрессивті қатерлі ісік, көптеген түрлі жасуша түрлерінен құралған) жасушалық линиясында жоғары реттелді, бұл mHtt-индукцияланған транскрипцияның үлгісі болып табылады. Осы екі микроРНК экспрессия деңгейлері ГА бар науқастардың плазмасында зерттелді. Нәтижелер miR-34b деңгейлерінің бақылау тобымен салыстырғанда ауру белгісіне дейінгі ГА пациенттерінің плазмасында айтарлықтай төмендегенін көрсетті. Ал miR-1285 бойынша екі топтың деңгейлері арасында айтарлықтай айырмашылықтар байқалмаған. Осы нәтижелердің негізінде авторлар miR-34b плазмада тұрақты экспрессияланған және клиникалық белгілер айқын болғанға дейін анықталған ГА үшін ықтимал биомаркер болып табылады деген қорытындыға келді [204]. Тағы бір зерттеуде, адамдардың плазмасында төрт микроРНК экспрессия деңгейлері анықталды және ГА биомаркерлері ретінде осы микроРНК молекулаларының ықтимал мәндері бағаланды. miR-10b-5p және miR-486-5p қан плазмасындағы деңгейлері симптоматикалық ГА емделушілерде айтарлықтай жоғарылады, бірақ ауру белгісі жоқ емделушілерде өзгермеген. Бұл нәтижелер қан плазмасындағы miR-10b-5p және miR-486-5p деңгейлерінің жоғарылауы ГА

диагностикасы үшін клиникалық маңызды болуы мүмкін екенін көрсетті [205-207].

ГА-да микроРНК молекулаларын зерттеу саласы әлі де салыстырмалы түрде жаңа екенін және микроРНК дисрегуляциясының негізінде жатқан механизмдерді және олардың терапиялық салдарын толық түсіну үшін қосымша зерттеулер қажет екенін атап өткен жөн. МикроРНК молекулалары болашақ ГА зерттеулері үшін перспективалы бағыт екенін білдіреді және мақсатты терапияны дамыту үшін жаңа мүмкіндіктер ұсына алады деп болжануда.

1.3 PIWI-мен әрекеттесетін РНК (пиРНК) молекуласы, биологиялық рөлі және биогенезі

МикроРНК молекулалары сияқты, PIWI (аргонавт ақуыздар классының бөлігі) мен әрекеттесетін РНК (piwi-interacting RNA, piRNA, piwiRNA), (пиРНК) кодталмаған шағын РНК молекуласының белгілі бір түрі болып табылады [208]. ПиРНК молекулаларының өлшемі 24-32 нуклеотидтерден тұрады және аргонавт ақуыздарының тобына жататын PIWI ақуыздарымен өзара әрекеттеседі [209, 210]. Аргонавт ақуыздары AGO және PIWI топтарына бөлінеді. PIWI ақуыздары негізінен соматикалық және жыныс жасушаларында экспрессияланады. Адамның PIWI ақуызының қосалқы топтары PIWIL1, PIWIL2, PIWIL3 және PIWIL4-тен тұрады [211]. Эукариоттарда, оның ішінде адамның геномында 30 000-нан астам пиРНК молекулалары табылған [212, 213]. ПиРНК молекулалары сперматогенездің көптеген кезеңдерінде маңызды, ал PIWI репродуктивті жүйенің бағаналық жасушаларының қызметін қолдау үшін қажет [214]. Иммунопреципитация және нозерн-блоттинг әдістерінің көмегімен пиРНК молекулалары адамның аталық бездері мен аналық бездерінде анықталды [215]. Адам сперматогенезінде шамамен 1 миллионға жуық пиРНК молекулалары бар екендігі айқындалған. Тышқандарда PIWI ақуыздары сперматогенез кезінде уақытша экспрессияланған, бұл пиРНК молекулалары үшін уақытқа тәуелді экспрессияны көрсетеді [208]. ПиРНК молекулаларының болмауы ұрпақты болу жүйесінде туа біткен ақаулар мен бедеулік сияқты патогендік әсерлерге әкелуі мүмкін [209]. Жетілген бастапқы пиРНК молекулаларының көпшілігінің 5' ұшында уридин бар, ал пиРНК молекулаларының 3' ұштары бірегей метилденген 2-ОН құрылымдары болып табылады [216].

ПиРНК молекулаларының биогенездік жолы дрозофила шыбынынан алынған. ПиРНК биогенезі нысана гендердің экспрессиясының басылуымен байланысты және PIWI, Argonaute-3 (AGO3) және Aubergine (Aub) сияқты PIWI ақуыздарын қажет етеді. PIWI ақуыздары негізінен соматикалық жасушалар мен жыныс жасушаларының ядроларында орналасады, ал AGO3 және AUB жыныс жасушаларының цитоплазмасында байқалған [217, 218]. Бұл пиРНК молекулаларының биогенезінің микроРНК биогенезінен негізгі айырмашылығы пиРНК биогенезі процесінде қос тізбекті прекурсор (precursor) мен Dicer ферментін қажет етпейді [219, 220].

ПиРНК молекулаларының бастапқы синтезі ядро мен цитоплазмада жүреді. Антисенстік транскрипция (antisense transcription) немесе антисенстік РНК

(asRNA) және сенстік транскрипциясы (sense transcription) ядродағы пиРНҚ кластерлерінен транскрипцияланады. Содан кейін, антисенсті транскрипциясы цитоплазмаға тасымалданады да бастапқы транскриптті алдымен цуккини (Zucchini) эндонуклеазасы кеседі. Экзонуклеаза пиРНҚ-PIWI-ны соңғы ұзындығына дейін қысқартады және Hen1 ферменті 3' ұшындағы 2'-гидроксид тобын метилдейді. Осыдан кейін, пиРНҚ-PIWI кешендері қайтадан ядроға ауысады. MTase және HDAC көмегімен ядродағы пиРНҚ-PIWI кешендер өздерінің транспозондық белсенді қызметін жүзеге асырады. Цитоплазмадағы пиРНҚ-PIWI комплекстері пинг-понг (ping-pong) цикліне кіреді. Ал ядродағы сенстік транскрипциясы цитоплазмаға тасымалданып, ол да пинг-понг цикліне енеді [221].

Жақында жүргізілген зерттеулер, пиРНҚ молекулаларының нейродегенеративті бұзылыстарға да әсер етуі мүмкін екенін болжайды [222]. Транспозонды элементтер (transposable elements) геном ішінде қозғалу мүмкіндігі бар ДНҚ тізбегі болып табылады. Олар әдетте әртүрлі механизмдермен, соның ішінде пиРНҚ-мен қатаң бақылауда ұсталады. Транспозонды элементтердің дисрегуляция нәтижесінде олардың қалыптан тыс экспрессиясы Альцгеймер ауруы, Паркинсон ауруы және амиотрофиялық бүйірлік склероз (ALS) сияқты бірнеше нейродегенеративті бұзылыстарда байқалды [223, 224]. Транспозициялық элементтердің реттелуінің бұзылуы нейродегенеративті бұзылулардың сипаттамалары болып табылатын геномдық тұрақсыздық пен нейрондық дисфункцияға ықпал етуі мүмкін [225]. Сонымен қатар пиРНҚ биогенезіндегі немесе өңдеуіндегі бұзылулар жалпы пиРНҚ молекуласының құрылымына әсер етіп, олардың реттеуші функцияларын бұзуы мүмкін. Piwi ақуыздары сияқты пиРНҚ жолына қатысатын ақуыздардың экспрессиясының немесе белсенділігінің өзгеруі функционалды пиРНҚ молекулаларының генерациясына әсер етіп кейіннен нейродегенеративті процестерге ықпал етуі мүмкін [226, 227]. ПиРНҚ молекулалары ДНҚ метилденуі және гистон модификациялары сияқты эпигенетикалық модификацияларды нақты геномдық аймақтарға бағыттау арқылы ген экспрессиясына әсер ете алады. Бұл эпигенетикалық белгілердің реттелуінің бұзылуы нейродегенеративті бұзылуларға қатысты. Аберрантты пиРНҚ арқылы эпигенетикалық реттеу геннің экспрессиялық профильдерінің өзгеруіне, нейрондық функцияның бұзылуына және нейродегенерацияға сезімталдықтың жоғарылауына әкелуі мүмкін [228, 229]. Жақында жүргізілген зерттеулер пиРНҚ молекулаларының аурумен байланысты қайталанатын РНҚ тізбегімен өзара әрекеттесуі және олардың уыттылығына әсер етуі мүмкін деп болжайды. Нейродегенеративті бұзылулардағы аурумен байланысты мРНҚ-мен пиРНҚ молекулалары өзара әрекеттесуінің нақты механизмдері мен салдары әлі де зерттелуде [230, 231].

ПиРНҚ молекулаларының және олардың нейродегенеративті бұзылыстарға қатысуы әлі салыстырмалы түрде жаңа екенін және осы аурулардағы пиРНҚ молекулалардың механизмдері мен функционалдық маңыздылығын толық түсіндіру үшін қосымша зерттеулер қажет екенін атап өту маңызды. Осыған

карамастан, пайда болған дәлелдер пиРНҚ жолдарының реттелуінің бұзылуы әртүрлі молекулалық және жасушалық механизмдер арқылы ісік ауруларының және нейродегенеративті бұзылулардың патогенезіне ықпал етуі мүмкін екенін көрсетеді.

1.3.1 ПиРНҚ молекулаларының кейбір ісік және нейродегенеративті ауруларындағы рөлі

ПиРНҚ молекулалары гендер мен ақуыздардың реттегіші ретінде әрекет ете алады. ПиРНҚ молекулалары сонымен қатар оның өзара әрекеттесетін ақуыздардың тұрақтылығын байланысу арқылы реттейді [221, 232]. ПиРНҚ молекулаларының қатерлі ісік дамуында онкогендік және ісіктерді басатын функциялары бар. МикроРНҚ молекулаларынан айырмашылығы, пиРНҚ нысана гендердің мРНҚ-на жиі комплементарлы емес, пиРНҚ биологиялық функцияларды, соның ішінде қатерлі ісік ауруларын бақылауда эпигенетикалық реттеуші рөл атқарады деп болжайды [233, 234]. Қатерлі ісік ауруындағы эпигенетикалық жаһандық өзгерістерге ДНҚ гипометилиациясы, гистон гипоацетилденуі және генге тән ДНҚ гиперметилиациясы жатады, бұл онкогеннің белсендірілуіне әкеледі [235, 236]. ПиРНҚ молекулаларының аберрантты экспрессиясы қатерлі ісікке тән белгі болып табылады және қатерлі тіндердегі клиникалық белгілермен корреляциялануы мүмкін, бұл қатерлі ісіктердің бірнеше түрлерінде пиРНҚ молекулаларының маңызды рөлін көрсетеді [237].

Сүт безі қатерлі ісігіндегі және сау тіндерге сәйкес пиРНҚ молекулаларының экспрессивті деңгейлерін скринингтеу үшін терең секвенирлеуді қолданатын зерттеулер piR-20365, piR-20485, piR-20582 және piR-4987 сияқты пиРНҚ молекулалардың сүт безі ісігінің тіндерінде жоғары экспрессияланатынын анықталды. Сонымен қатар, бұл пиРНҚ молекулаларының ішінде piR-4987 экспрессиясының жоғарылауы оң лимфа түйіндерімен байланысты болды [238]. ПиРНҚ биогенезі және эффекторлық жолы адамның сүт безі қатерлі ісігінің жасушаларында бар. Сүт безі қатерлі ісігінің тіндерінде 100-ден астам пиРНҚ аберрантты түрде анықталған және шағын RNA-Seq деректерін талдау арқылы жасушалар және олардың арасында сегіз пиРНҚ сүт безі қатерлі ісігінің нысана негізгі жолдарында ерекше экспрессия үлгісін көрсеткен, бұл ісік ауруындағы пиРНҚ молекуласының транскрипциялық және посттранскрипциялық реттеуші рөлін болжайды [239].

Аберрантты пиРНҚ экспрессиясы пролиферация және метастазбен байланысты диагностикалық маркер ретінде және өкпенің қатерлі ісігінде терапевтік мақсаттарды қамтамасыз етеді. piR-55490 *in vitro* және *in vivo* жағдайында өкпе обырының өсуін басуы мүмкін [240]. piR-35127, piR-46545, piR-34871 және piR-52200 қалыпты, сондай-ақ өкпе ісігі жасушаларында пролиферация мен колония түзілуін реттейді, бұл жаңа пиРНҚ молекулалары өкпе жасушаларының трансформациясы мен ісіктің пайда болуын реттеуде потенциалды рөл атқаратынын көрсетеді [241].

Wilcoxon-Mann-Whitney тесті бауыр ауруларының әртүрлі үлгілеріндегі пиРНҚ молекулаларының айырмашылығын бағалау үшін пайдаланылды.

Ісіктерде пиРНҚ молекулаларының ерекше экспрессиялары анықталды. Мысалы, piR-020498 жоғары дәрежелі диспластикалық түйіндерде және дамыған гепатоцеллюлярлық карциномада жоғары реттелді. Сонымен қатар, piR-013306 тек гепатоцеллярлық карциномада шамадан тыс экспрессияланған. Бұл нәтижелер пиРНҚ молекулаларының гепатоцеллюлярлық карциноманың прогрессиясына қатысатынын және әрбір кезеңде нақты экспрессияны көрсететінін айқындады [242].

Көптеген зерттеулер пиРНҚ молекулаларының колоректальды қатерлі ісіктің процесі мен дамуына қатысатынын көрсетті. Мысалы, piR-823 экспрессиясының жоғары деңгейі колоректальды қатерлі ісік жасушаларының пролиферациясымен оң корреляцияланады [243]. Сонымен қатар, piR-1245 колоректальды қатерлі ісік тіндерінде шамадан тыс экспрессияланады және ісіктерді басатын гендердің экспрессиясын модуляциялау арқылы колоректальды қатерлі ісік жасушаларының өмір сүруін реттейді [244].

ПиРНҚ профилдерін зерттеу барысында пиРНҚ молекулаларының адамның асқазанында көп екенін анықтады. Сау асқазан тіндерінің және асқазан ісігі үлгілерінің транскрипттік талдауы асқазан ісігі үлгілерінде пиРНҚ молекулаларының жартысына жуығы жоғарылағаны байқалған [245, 246]. Бұл пиРНҚ асқазан ісігінің патогенезіне әсер етуі мүмкін дегенді білдіреді. piR-651 асқазан қатерлі ісігінің тіндерінде қатерлі емес тіндерге қарағанда көбірек кездеседі және piR-651 деңгейінің төмендеуі асқазан ісігі жасушаларының өсуін тежейді [247]. Асқазан қатерлі ісігінің жасушаларында және асқазан ісігінің тіндерінде piR-823 деңгейі төмендейді, ал piR-823 артық экспрессиясы асқазан ісігі жасушаларының өсуін басады [248].

Ұрықтық жыныс жолдарында пиРНҚ молекулаларының экспрессия деңгейі ең жоғары болғанымен, 30000-ға жуық нейрондық пиРНҚ молекулалары тышқанның миында постнатальдық даму кезінде сипатталған, бұл пиРНҚ молекулаларының мидың дамуы кезінде болатынын және динамикалық реттелетінін көрсетеді [249].

ПиРНҚ жолдарының реттелуінің бұзылуы нейродегенеративті бұзылулардың, соның ішінде амиотрофиялық бүйірлік склероз (ALS) және тауопатиялардың дамуына әкелетін нейрондардың геномдық тұрақсыздығына әкеледі. PIWI қалыптан тыс экспрессиясы ALS патогенезімен байланысты болды, ол негізінен моторлы нейрондарға әсер етеді. FUS (Fused-In-Sarcoma) және TDP-43 (TAR ДНҚ байланыстыратын ақуыз 43) қоса, РНҚ байланыстыратын ақуыздардағы мутациялар ALS ауруының қоздырғышы ретінде анықталды [250]. Тауопатиялар мидағы нейрофибриллярлық түйіндердегі Тау ақуызының патологиялық агрегациясымен байланысты нейродегенеративті ауруларға жатады. Тауопатияның потенциалды патологиялық механизмдерінің бірі PIWI/пиРНҚ реттелуімен байланысты болып келеді [251]. Гетерохроматиннің патогенді Тау агрегациясынан туындаған деконденсациясы және PIWI және пиРНҚ белсенділігінің төмендеуі осы нейрогенеративті тауопатияларда нейрондық жасушалардың өлімін тудыратын

транспозициялық элементтердің реттелуінің бұзылуына әкелетіні көрсетілді [252].

Альцгеймер ауруы бар емделушілерде шамамен 100 пиРНК молекулаларының реттелмеген түрлері анықталды және осы ауруда ассоциацияланған пиРНК молекулаларының көпшілігі геномдық бір нуклеотидті полиморфизммен (SNPs) корреляцияланған [253]. Паркинсон ауруынан туындаған спорадикалық нейрондық жасушаларда пиРНК молекулаларының белсенді дерегуляциясы табылды [254]. Паркинсон ауруына қатысты зерттеуде дрософила және SH-SY5Y жасушаларында α -синуклеиннің шамадан тыс экспрессиясы H3K9me2 арттырады, бұл ген экспрессиясының өзгеруіне және синаптикалық белсенділікке байланысты гендердің реттелуінің бұзылуына әкеледі [255]. Тағы бір зерттеуде жүйке жүйесіндегі гомеостазды қолдауға қатысқан үш пиРНК (piR-38240, piR-34393 және piR-40666) анықталған. Олардың шамадан тыс экспрессиясы жасуша апоптозына және нейродегенерацияға әкелуі мүмкін деп болжанған [256].

Сонымен қатар, бір ген бірнеше пиРНК молекулаларының байланысу нысаны болып табылады, және бір пиРНК бірнеше гендермен өзара байланыса алады. Бұл олардың арасындағы байланысу сайттарының кластерінде байланысу үшін бәсекеге әкеледі. Бірнеше пиРНК молекулаларының және бірнеше гендердің бірігуі нәтижесінде олар физиологиялық процеске өзара реттеуші қатысушылардың өзіндік кешендерін құрайды. *In silico* жағдайындағы зерттеулердің нәтижесінде, пиРНК молекулалары мРНК-ның нуклеотидті қайталымды тізбектерімен байланыса отырып қатерлі ісік, нейродегенеративті аурулар және қант диабеті ауруларында диагностикалық әдістерді әзірлеу үшін болжамды пиРНК молекулалары және кандидат нысана гендердің ассоциациялары ұсынылған [257].

2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

2.1 *In silico* жағдайында талдау материалдары

Зерттеу нысандары: Адамның микроРНК, пиРНК және мРНК молекулаларының нуклеотидтік тізбектері.

Адамның 17494 гендерінің нуклеотидтік тізбектері GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) деректер базасынан, және 2508 микроРНК молекулаларының тізбектері miRBase (www.mirbase.org) базасынан жүктеліп алынды. Сонымен қатар, miRBase базасынан бөлек 3707 микроРНК молекулалары *Londin et al.*, (2015) [258], және 165000 пиРНК молекулаларының нуклеотидтік тізбектері *Wang et al.*, (2021) [259] зерттеу жұмыстарынан алынды.

МикроРНК молекулаларының мРНК-мен өзара байланысы кезінде RPKM (Reads Per Kilobase Million) мәндеріне назар аударылды, ол мәндер Human miRNA tissue atlas (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas/>) және Human protein atlas (<https://www.proteinatlas.org/about>) деректер базасында тексерілді.

Адам гендерінің негізінде түзілген мРНК-мен микроРНК және пиРНК молекулаларының өзара әрекеттесу байланыстары MirTarget бағдарламасында есептелінді. Гендердің негізінде түзілетін мРНК-ның ди және тринуклеотидті қайталым тізбектерімен байланысатын микроРНК және пиРНК молекулалар тобы сарапталды.

2.1.1 *In silico* жағдайында талдау әдісі

2.1.1.1 МикроРНК және пиРНК молекулаларының мРНК-мен өзара әрекеттесуін болжайтын MirTarget бағдарламасы

MirTarget бағдарламасы (авторлық құқықпен қорғалатын объектілерге құқықтардың мемлекеттік тізілімге мәліметтерді енгізу туралы куәлік № 6598, 22.11.2019) Java тілінде жазылған бағдарлама.

MirTarget бағдарламасы гендердің негізінде түзілетін мРНК-мен микроРНК/пиРНК молекулаларының өзара байланыстарының келесідей ерекшеліктерін анықтайды:

- микроРНК/пиРНК молекулаларының мРНК-мен байланысуының басталу аймағын;

- микроРНК/пиРНК молекулаларының 5'UTR, CDS және 3'UTR аймақтарында мРНК-мен байланысу сайттарының орналасуын;

- микроРНК/пиРНК молекулаларымен мРНК арасындағы нуклеотидтердің әрекеттесу схемаларын;

- микроРНК/пиРНК молекулаларының мРНК-мен байланысуының бос энергияларын (ΔG , кДж/моль);

- $\Delta G/\Delta G_m$ (%) қатынасы әрбір сайт үшін анықталады (ΔG_m толық комплементарлы нуклеотидтер тізбегі бар микроРНК/пиРНК молекулаларының бос байланысу энергиясына тең) [260].

Сонымен қатар, аденин (A) мен урацил (U), гуанин (G) мен цитозин (C) арасындағы байланыстарды ғана емес, бір сутегі байланысы арқылы A және C, G және U арасындағы өзара әрекеттесуді де қарастырады. Өзара

әрекеттесулердің бос энергиясына (ΔG) келетін болсақ, G және C жұбы 6.37 кДж/мольге, A және U жұбы 4.25 кДж/мольге, G және U жұбы, A және C жұбы 2.12 кДж/мольге тең. A және C (1.04 нм), G және U (1.02 нм) байланыстарының арасындағы қашықтық G және C, A және U (1.03 нм) арасындағы қашықтыққа ұқсас болды. Сондықтан G–C, A–U, G–U және A–C жұптары қабаттасу әрекеттесуін бұзбай, РНҚ молекуласының қос тізбекті құрылымының қалыптасуына ықпал етеді [261-263].

Екі немесе одан да көп микроРНҚ/пиРНҚ молекулалары бір мРНҚ-мен байланысқанда, немесе екі түрлі микроРНҚ/пиРНҚ молекулаларының байланысу сайттары өзара сәйкес келген жағдайда, бос байланыс энергиясы жоғары болатын микроРНҚ/пиРНҚ молекулаларының байланысатын сайты қолайлы болып саналады. Бұл туралы бағдарламаның байланысу сайттарын табу тұрғысындағы сәйкестігі бірнеше жариялымдарда расталған [263, 264-266].

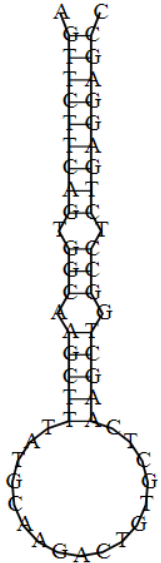
Кандидат гендердің мРНҚ-мен микроРНҚ молекулаларының байланыстарын іздеген кезде, микроРНҚ молекулаларының байланысу сайттары келесі критерийлер негізінде таңдалды: ұзындығы 17 нт. микроРНҚ үшін $\Delta G/\Delta G_m$ мәні 98% немесе одан жоғары, 18 нт.- 96%-дан, 19 нт. - 94%, 20 нт. - 92%, 21 нт. - 91%, 22 нт. - 90%, 23 нт. - 89%, 24 нт.- 88%, 25 нт. - 87% және 26 нуклеотидтер - 86%-дан жоғары мәндер бойынша.

MirTarget бағдарламасы микроРНҚ молекулаларының байланысу нысана гендерін болжайтын miRWalk, miRDB, MiRanda және TargetScan сияқты бағдарламалардан: микроРНҚ молекулаларының бүкіл тізбегі бойынша мРНҚ-мен микроРНҚ молекулаларының әрекеттесуін есепке алуымен; канондық емес G-U және A-C жұптарын қарастырумен; микроРНҚ молекулаларының мРНҚ-мен өзара әрекеттесуінің бос энергиясын есептеу бойынша ерекшеленеді (кесте 2 (А, Ә)). Сонымен қатар бұл бағдарлама өзара әрекеттесетін нуклеотидтер арасындағы сутегі байланыстарын көрсететін микроРНҚ молекулаларымен мРНҚ молекулалардың байланысу схемаларын құрады [260].

miRWalk, miRDB, MiRanda және TargetScan сияқты бағдарламалар $\Delta G/\Delta G_m$ мәнін ескермеуіне, микроРНҚ молекулаларының байланысу сайттарын көбінесе 3'UTR-де табуына және микроРНҚ молекулаларының байланысу нысандарының толық таба алмауына байланысты көптеген жалған оң нәтижелер беруі мүмкін. Ал MirTarget бағдарламасының компьютерлік талдау нәтижелері мРНҚ гендерінде табылған микроРНҚ молекулаларының байланысу сайттарының сипаттамалары бар Microsoft Excel электрондық кестелерді және осы сайттардың схемалары бар мәтіндік файлдарды қоса береді.

Кесте 2 - Гендердің негізінде түзілетін мРНҚ-мен микроРНҚ-ның байланысу сайттарын табуға арналған бағдарламалардың салыстырмалы сипаттамалары

(А) miR-22-5p және *ATXN10* генінің мРНҚ-ның арасындағы байланыс

Бағдарлама	Байланысу орнының басталуы	Байланысу аймағы	ΔG , кДж/моль	$\Delta G / \Delta G_m$, %	микроРНҚ-ның мРНҚ-мен байланысу схемасы
miRWalk	1076	CDS	-25.9	1.0	тек 2D құрылымы берілген 
miRDB	-	-	-	-	-
MiRanda	-	-	-	-	-
TargetScan	-	-	-	-	-
MirTarget	1126	CDS	-93	83	5' -UCAAGCUGGCCUCUGAGGAGCC-3' 3' -AUUUCGAACGGUGACUUCUUGA-5'

(Ә) ID00436.3p-miR және *ADCYAP1R1* генінің мРНҚ-ның арасындағы байланыс

Бағдарлама	Байланысу орнының басталуы	Байланысу аймағы	ΔG , кДж/моль	$\Delta G / \Delta G_m$, %	микроРНҚ-ның мРНҚ-мен байланысу схемасы
miRWalk	-	-	-	-	-
miRDB	-	-	-	-	-
MiRanda	-	-	-	-	-
TargetScan	-	-	-	-	-
MirTarget	3844	3'UTR	-104	89	5' -GUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUG-3' 3' -CACACACGCAUUAUUAUACACACAU-5'

Жоғарыдағы 2-ші кестеден (А) көріп тұрғанымыздай miR-22-5p және *ATXN10* генінің мРНҚ-мен байланыс кезінде тек miRWalk бағдарламасы микроРНҚ-ның мРНҚ-мен байланысу сайты тапты. Дегенмен, miRWalk бағдарламасы MirTarget бағдарламасымен салыстырғанда $\Delta G/\Delta G_m$ мәнін және байланысу схемаларын көрсетпеді, сонымен қатар өзара әрекеттесу ΔG , кДж/моль бос энергиясы едәуір төмен мәнде болды.

Ал, ID00436.3p-miR және *ADCYAP1R1* генінің мРНҚ-мен байланысу сайты бойынша miRWalk, miRDB, MiRanda және TargetScan сияқты бағдарламалардың ешқайсысы нәтиже бермеді (кесте 2 (Ә)).

MirTarget бағдарламасының нәтижесі микроРНҚ молекуласының толық тізбегі бойынша мРНҚ-мен микроРНҚ молекуласының әрекеттесуін есепке алуымен, канондық емес G-U және A-C жұптарын қарастырумен, микроРНҚ-молекуласының мРНҚ-мен өзара әрекеттесуінің бос энергиясын есептеу бойынша ерекшеленді.

MirTarget бағдарламасының есептеу нәтижесі бойынша микроРНҚ және пиРНҚ молекулаларының мРНҚ-мен әрекеттесуінің сандық сипаттамаларының схемаларын (бос энергияның өзара әрекеттесуі және $\Delta G/\Delta G_m$ мәндерінің қатынасы) тәжірибелік жұмыстарда алу мүмкін емес. Сондықтан біздің зерттеу жұмысымызда MirTarget бағдарламасының көмегімен микроРНҚ/пиРНҚ молекулаларының гендердің негізінде түзілетін мРНҚ-ның нуклеотидті қайталымдарымен өзара байланысу сайттарын анықтау маңызды болып табылады.

2.2 *In vitro* жағдайында зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу нысандары: SH-SY5Y жасуша линиясы, pEGFP-Q23 және pEGFP-Q74 плазмидалары, адамның микроРНҚ және мРНҚ молекулаларының нуклеотидтік тізбектері.

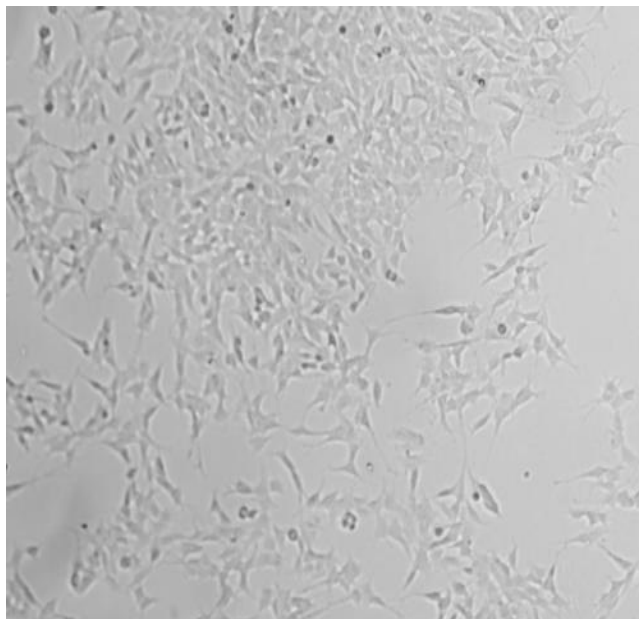
2.2.1 Жасуша культурасы

2.2.1.1 Жасуша линиялары

Адамның нейробластома жасушасының SH-SY5Y линиясы American type culture collection (#ATCC HTB-11, АҚШ) жинағынан алынды. Жасушалар 5% CO₂ бар атмосферада 37°C температурада 10% ірі қараның эмбриондық сарысуы (FBS-fetal bovine serum) және 1% пенициллин/стрептомицин қосылған DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) қоректік ортада ылғалдандырылған инкубаторда (Thermo Scientific, HERAcell 150i Cell incubator, АҚШ) өсірілді. Жасушалардың қоректік ортасы әр 3-5 күн сайын жаңартылып отырды, бұл жасушалар нейрон тәрізді фенотипті көрсетеді (кесте-3, сурет 3). SH-SY5Y жасуша линиясы адамның нейробластомасынан алынған және жетілмеген нейрондардың сипаттамаларына ие.

Кесте 3 - SH-SY5Y жасуша линиясының сипаттамасы

Организм	Метастаздық	Тін	Ауру	Ерекшелігі	Қоректік ортасы
Homo sapiens	Сүйек кемігі	Ми	Нейробластома	Дофамин бета-гидроксилаза ның жоғары деңгейлерімен ерекшеленеді	DMEM (Gibco) +10% FBS +1% Пенициллин-стрептомицин



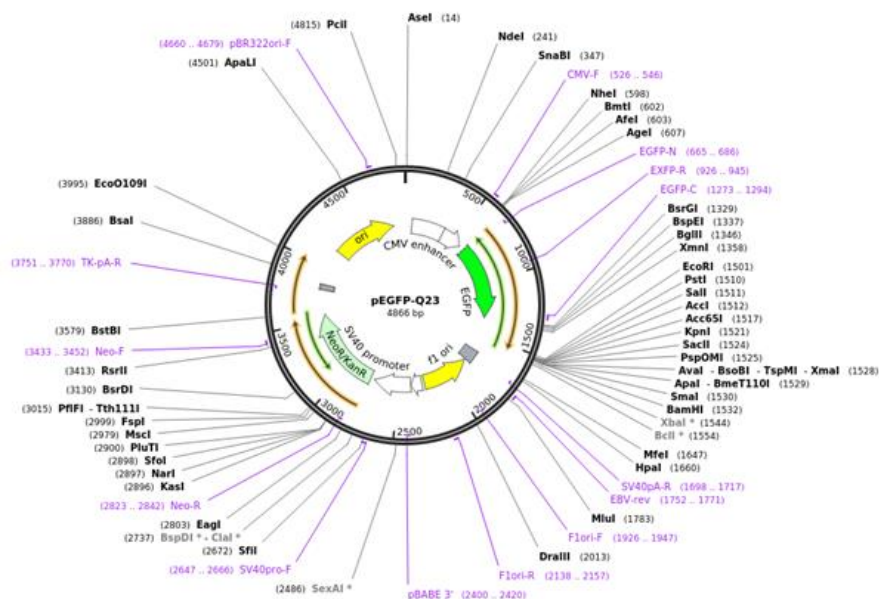
Сурет 3 - SH-SY5Y жасуша линиясының жоғары Leica DMI3000 В микроскопындағы бейнесі (масштаб жолағы =100 μ m, 48 сағаттық инкубациядан кейінгі көрінісі)

HTT генінде қалыпты және ұзартылған поли-Q жолдары бар pEGFP-Q23 және pEGFP-Q74 (Cat.No. #40261; #40262; Addgene, АҚШ) плазмидалары Addgene (www.addgene.org/) компаниясынан алынды (кесте 4, сурет 4 (А), (Ә)).

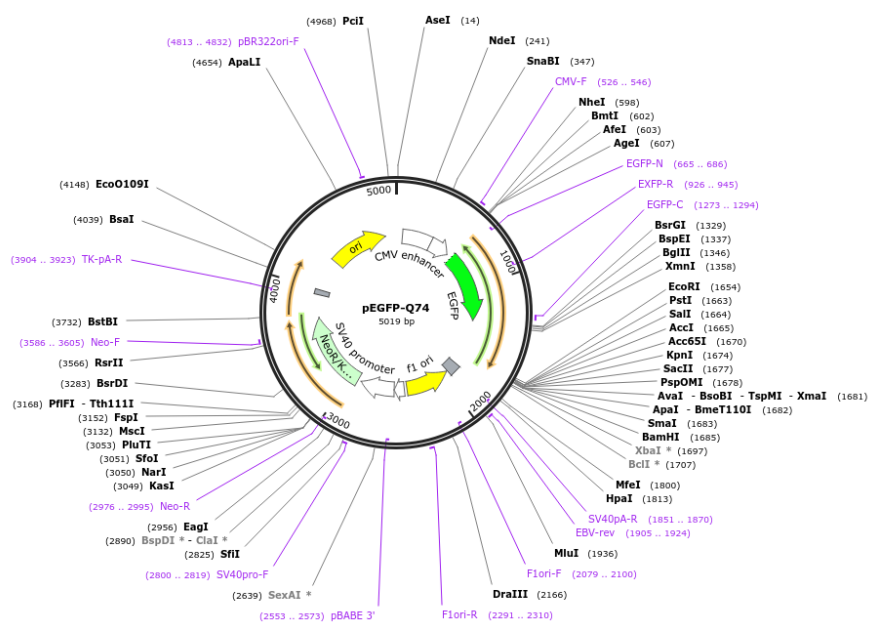
Кесте - 4. pEGFP-Q23 және pEGFP-Q74 плазмидалық линияларына сипаттама

Плазмида	Векторлық тип	Ген	Өсу штаммдары	Мутация
pEGFP-Q23	Сүтқоректілердің экспрессиясы	<i>HTT</i> экзон 1 Q23	DH5alpha	Ұзартылған поли-Q
pEGFP-Q74	Сүтқоректілердің экспрессиясы	<i>HTT</i> экзон 1 Q74	Stbl2	Ұзартылған поли-Q

(A)



(Ә)



Тізбек карта рестрикциялық ферменттер, плазмидтердің қасиеттері, және праймерлермен белгіленген нуклеотидтер тізбегі деректеріне негізделген графикалық картаны көрсетеді (сурет Addgene-нен алынды).

CMV, (Cytomegalovirus) цитомегаловирус; NeoR/KanR, (Neomycin/Kanamycin Resistant) Неомицин/канамицинге төзімділігі; f1 ori, (origin of replication and plasmid replication) репликация және плазмидтік репликацияның шығу тегі.

Сурет 4 - pEGFP-Q23 (A) және pEGFP-Q74 (Ә) плазмидалары үшін Addgene тұтас тізбек картасы

2.2.1.2 Трансформация әдісі

Трансформация әдісі төмендегі нұсқаулықта көрсетілген стандартты хаттамаға (Sigma-Aldrich, АҚШ) сай орындалды:

1. Компонентті жасушалар -80°C алынып, мұздың үстінде ерітілді (шамамен 20-30 мин).

- Бақылау үшін: бір пробиркаға 1 мкл (10 нг) pUC19 бақылау ДНҚ қосылды. Баяу шайқау арқылы мұз үстіне қойылды.

- Қалған пробиркалардағы жасушаларға 1 нг - 50 нг тазартылған плазмидті ДНҚ қосылды. Баяу шайқау арқылы мұз үстіне қойылды.

- Пробиркалар мұзда 30 мин. инкубацияланды.

2. Пробиркаларды 37°C су моншасына 45 сек. қою арқылы жылумен әсер етілді (heat shock).

3. Пробиркалар қайтадан мұзға 2 мин. қойылды.

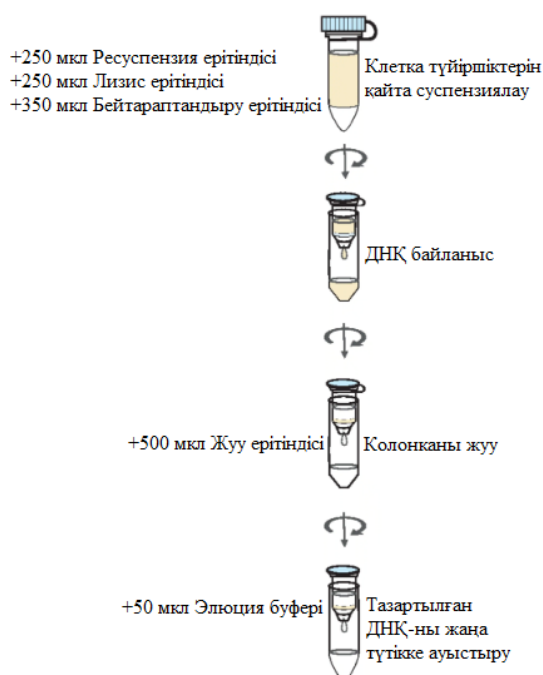
4. Пробиркаларға 250-1000 мкл SOC (Super Optimal Broth) қоректік ортаны (антибиотиксіз) қосып, 37°C шайқау инкубаторында 45 мин. бойы шайқатылды.

5. Әрбір трансформацияланған жасуша суспензиясының 10-100 мкл пипеткалау арқылы LB агар (канамицин антибиотигі қосылған) табақшаларына салынды.

6. Табақшалар 37°C температурада 12 сағат инкубацияланды.

2.2.1.3 Плазмидалық ДНҚ бөлу әдісі

Агар қоректік орталарына (LB agar) енгізілген плазмидалық ДНҚ молекулалары GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher, АҚШ) әдісінің нұсқаулығымен бөлінді (сурет 5).



Сурет 5 - Плазмидалық ДНҚ молекулаларын бөліп алу сатылары

2.2.1.4 Трансфекция әдісі

Трансфекция әдісі TurboFect (Thermo Fisher, АҚШ) өндірушінің нұсқаулығына сәйкес келесідей кезеңдерді қамти отырып жүзеге асырылды:

- 0.5 мкг ДНҚ молекуласы 100 мкл сарысусыз DMEM қоректік ортасында сұйытылды.
- Трансфекция реагентін аздап вортексте араластырып, сұйытылған ДНҚ молекуласына 2 мкл қосылды. Ары қарай, пипетканың көмегімен баяу араластырылды.
- Бөлме температурасында 15-20 мин. инкубацияланды.
- Әрбір ұяшықта 100 мкл трансфекциялық реагент/ДНҚ қоспасын тамшылатып қосылды.
- Трансфекция реагентін қосқаннан кейін бірден кешендердің біркелкі таралуына қол жеткізу үшін пластина баяу шайқалды.
- 37°C температурада CO₂ инкубаторында өсірілді.

Жасушалардың PBS-пен жуылуы, трипсинизациясы (трипсин жасушалардың бетіндегі ақуыздық байланыстарды бұзады, бұл олардың субстраттан немесе бір-бірінен бөлініп шығуына мүмкіндік береді) және DMEM қоректік орталарының жаңаруы MSC-Advantage биобокстың астында жүзеге асты. Жасушалар 24-48 сағаттан кейін Leica DMI 300B микроскоптың көмегімен қаралды.

2.2.1.5 Гемоцитометр көмегімен жасушаларды санау

HERAcell 150i инкубаторында өсірілген жасушаларға гемоцитометр көмегімен санау жүргізілді (Neubauer improved depth 0.1 mm, Мариенфельд, Германия).

Шамамен 10 мкл жасуша суспензиясы 10 мкл 0.4% трипан көк ерітіндісімен (12 мкл 1x PBS және 8 мкл трипан көк, Gibco, Ұлыбритания) араластырылды. Дайын болған 20 мкл жасуша қоспасын гемоцитометрдің әр жағына құйылды. Жасуша нөмірлері гемоцитометр торының төрт бұрышында инверттелген микроскоптың (Leica DMI3000 B, Германия) көмегімен саналды және жасушаның орташа мәні төмендегідей есептелді:

$$\text{Жасушалар/мл} = \text{орташа жасуша саны (саналған)} \times 2 \times 10^4$$

$$\text{Жалпы жасуша саны} = \text{жасушалар/мл} \times \text{ресуспензия көлемі}$$

2.2.1.6 Жасушаны мұздату әдісі

Трипсинизациядан кейінгі жасуша суспензиясы T75cm² жасуша культурасының колбасынан 15 мл центрифугалық пробиркаға құйылды. Содан кейін, пробиркалар 5 мин. бойы 1500 айналымда центрифугаланды (MEGAFUGE 8 центрифугасы (TX-150 роторы), ThermoScientific, АҚШ). Центрифугадан кейін пайда болған пробирка түбіндегі жасуша түйіршіктеріне диметилсульфоксид (DMSO) қосылып криогенді пробиркаларда -80°C мұздатқышта сақталды.

Бірнеше күн өткеннен кейін пробиркаларды -80°C мұздатқыштан шығарып, ұзақ уақыт сақтау мақсатында сұйық азоты бар арнайы контейнерге ауыстырылды.

2.3 Ақуызды талдау

2.3.1 Ақуызды бөлу әдісі

Тәжірбие барысында 1.5 мл пробиркадағы жасуша түйіршіктеріне 200 мкл PBS қосып жуып алынды. Келесі 3000 x g жылдамдықта 5 мин. бойы центрифугаланды. Пробирка бетінде пайда болған супернатант төгілді. Жасуша түйіршіктеріне 100 мкл RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer: 25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % sodium deoxycholate, 0.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS), Sigma-Aldrich, АҚШ) буфері қосылды. Содан кейін 30 мин. бойы мұзда ұсталды (әрбір 10 мин. сайын вортесте шайқап отырдық). Келесі 13000 x g жылдамдықта 10 мин. бойы центрифугаланды. Пробирка бетінде пайда болған супернатантты 1.5 мл эпендорф пробиркасына құйылды. Бөлініп алынған ақуызды -20°C температурада келесі тәжірбиеде қолданғанша сақталды. Ақуыз үлгілерінің концентрациясы NanoDrop спектрофотометрдің (DeNovix, DS-11 АҚШ) көмегімен 260 нм толқын ұзындығында өлшенді.

2.3.2 Вестерн-блот талдау әдісі

Ақуызды бөлу үшін SH-SY5Y жасуша линиялары фосфатты буферлі тұзды ерітіндімен (PBS, pH=7.4) жуылды және адгезияланған жасушаларды (бұл жасушалардың өзара әрекеттесуі және арнайы жасуша бетіндегі молекулалар арқылы көрші жасушаларға қосылу процесі) жинау мақсатында трипсин/ЭДТА (0.025% концентрациялы) ерітіндісі қолданылды. Содан кейін өсірілген жасушалардан бөлініп алынған ақуыз үлгілерінің концентрациялары NanoDrop спектрофотометрдің (DeNovix, DS-11 АҚШ) көмегімен өлшенді. Әрбір үлгі 50 мкг *Laemmli* буферімен, 50 mM дитиотреитол (DTT) және 0.01% бромофенол көгімен сұйытылды. Ақуыз 95°C температурада 5 мин. бойы қыздырылды. Үлгілер 1x Tris-Glycine-SDS буферімен (25 mM Tris 192 mM глицин, 0.1% SDS) 150 V кернеуінде 80 мин. бойы жүргізілді. Содан кейін, ақуыздар Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad, Ұлыбритания) аппаратында 25V кернеуінде 60 мин. бойы иммобилді PVDF мембраналарына (Immobilon-P, transfer membrane millipore, Sigma, Ұлыбритания) тасымалданды. Ақуыздар мембранаға тасымалданғаннан кейін, бұл мембраналар 60 мин. бойы арнайы пробиркада айналғыш роликтің үстінде 50 мл TTBS (құрамында 0.1% Tween 20 бар 10x Tris-буферлі тұз, pH=7.4) арқылы сұйытылған 5% майсыз құрғақ Marvel сүтімен (Marvel, Tesco, Ұлыбритания) блокталды. Бір сағат өткеннен кейін, мембраналар TTBS буферімен екі қайталанып жуылды. Мембрана 12 сағат 4°C температурада бастапқы антиденелермен (mouse monoclonal anti-GFP, BD Bioscience, және TBST-мен сүтте сұйытылған anti-mouse β -actin, Sigma, Ұлыбритания) блоктаушы ерітіндіде инкубацияланды. Бақылау ретінде анти- β -актин қолданылды. Келесі күні мембрана TTBS 5 мин. 4 рет қайталанып жуылды және екінші реттік антиденемен (goat anti-mouse HRP) 1 сағат бойы инкубацияланды (кесте 5). TTBS буфердің көмегімен жуылғаннан кейін мембранаға хемилюминесцентті субстрат

қосылды және жолақтар ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, АҚШ) кескіндеу жүйесінде бейнеленді.

Кесте 5 - Вестерн-блот әдісінде қолданылған бастапқы және екіншілік антиденелер

Қолданылуы	Антиденелер	Жануар иесі	Сұйыту	Компания
Бастапқы	Mouse monoclonal anti-GFP	Тінтуір	1:500	Bioscience, Ұлыбритания
	Anti-mouse β -actin antibody	Тінтуір	1:2000	Sigma, Ұлыбритания
Екіншілік	Goat anti-mouse	Ешкі	1:5000	Sigma, Ұлыбритания

2.3.3 Иммунофлуоресцентті талдау әдісі

Иммунофлуоресцент талдауы үшін жасушалар 24 сағат бойы 2×10^5 жасушаның тығыздығында, 16 мм шыны жабындары салынған 12 ұяшықты культуралық планшеттерге құйылды. Келесі күні шыны жабындар үш рет PBS (pH=7.4) көмегімен жуылып, -20°C температурада 100% метанолмен 10 мин. бойы бекітілді (fixed). Содан кейін өсірілген жасушалар спецификалық емес антиденелердің байланысуын блоктау үшін 0.5% ірі қара сарысуы альбумині (BSA) бар PBS-пен бөлме температурасында 1 сағат бойы инкубацияланды. Әрі қарай, жабындар сұйытылған бастапқы антиденеде (mouse monoclonal anti- α -tubulin; R&D Systems, MAB1195, 1:500 сұйыту) PBS буфері қосылған 1% BSA-мен бөлме температурасында 1 сағат инкубацияланды. Содан кейін жасушалар PBS-пен 5 мин. қайталанып үш рет жуылды. Әрі қарай жасушалар екіншілік антиденемен (anti-mouse Alexa Fluor 647; 1:1000; ThermoFisher, Ұлыбритания) 1% BSA-да қараңғы жерде 1 сағат бойы бөлме температурасында инкубацияланды. Үлгілер қараңғыда әрқайсысы 5 мин. бойы PBS көмегімен қайтадан үш рет жуылды, содан кейін 30 nM DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole. Sigma, Ұлыбритания) арқылы инкубациялау жүргізілді және тағы үш рет PBS көмегімен 5 мин. бойы жуылды. Келесі кезекте шыны жабындар Mowiol-4-88-ге (Mowiol 4-88-оптикалық айқындықты, үлгі тұрақтылығын және биологиялық үлгілердің ұзақ уақыт сақталуын қамтамасыз ететін микроскопияда әмбебап және кеңінен қолданылатын орнату ортасы болып табылды) орнатпас бұрын дистильденген сумен (dH_2O) бір рет жуылды. Бейнелер сканерлеуші дискідегі иммунофлуоресцентті микроскоптың (CellVivo, Olympus inverted microscope IX83. Жапония) көмегімен қаралды.

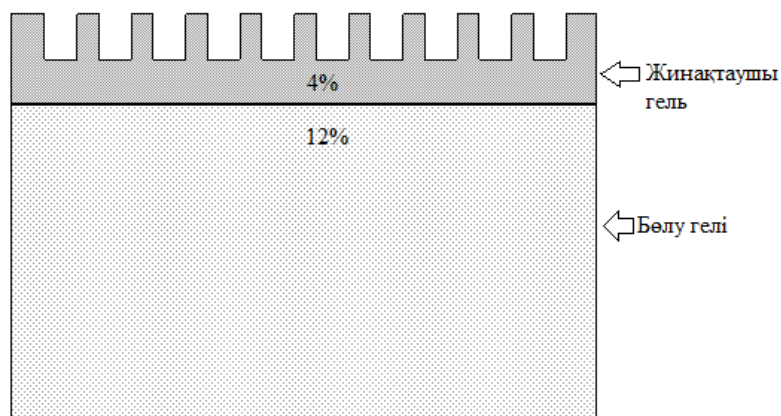
2.3.4 SDS-PAGE гель хроматографиясын дайындау

12% натрий додецилсульфат-полиакриламидті (SDS-PAGE) гельдері төмендегі 6-шы кестеде көрсетілген құрамда дайындалды. Жинақтаушы гель (stacking gel) мен бөлу гелі (resolving gel) - бұл әр үлгідегі ақуыздарды сапалы бөлу үшін қолданылатын полиакриламидті гельдердің екі түрі. Екі гель бір-

бірінен рН, және полиакриламид құрамы бойынша ерекшеленеді. Жинақтаушы гель жүктелген барлық ақуыз үлгілерін бір мезетте бөлу геліне енуіне мүмкіндік жасайды. Ал, бөлу гелінде ақуыздар өздерінің молекулалық салмағына қарай белгілі ретпен бөлінеді (сурет 6). Ең алдымен 12% астыңғы қабатқы бөлу гелін дайындап, гель камерасына құйып 15-20 мин. қалдырамыз. Дайын болған гелдің үстіңгі қабатына 70% изопропил спиртін тамшылатып құю арқылы ауа көпіршіктерін жоямыз. Келесі, 4% үстіңгі қабатқы жинақтаушы гелді құйып, бірден гель тарақшаларын кигіземіз. 15-20 мин. өткеннен кейін гель тарақшасын гелден шығарып, дистилденген сумен баяу шаямыз (ақуызда қолданылған маркер: PageRuler Prestained Protein Ladder, 10-180 кДа. Каталог нөмірі: 26616. Thermo fisher, Ұлыбритания).

Кесте 6 - Жинақтаушы және бөлу гелдерінің құрамы

4% үстіңгі қабатқы жинақтаушы гел	
Акриламид/Бис акриламид - 30% ерітінді (National Diagnostics, АҚШ)	1.3 мл
0,5М Трис (рН 6,8), (Tris-Base, Fisher Bioreagents)	2.5 мл
Натрий додецилсульфат (10%), (Fisher Bioreagents, Ұлыбритания)	100 мл
Аммоний персульфаты (10%), (Sigma-Aldrich, Ұлыбритания)	100 мл
dH ₂ O	6.1 мл
Тетраметилэтилендиамин (TEMED, Sigma-Aldrich, Ұлыбритания)	10 мл
12% астыңғы қабатқы бөлу гелі	
Акриламид/Бис акриламид - 30% ерітінді (National Diagnostics, АҚШ)	4 мл
1,5М Трис (рН 6,8), (Tris-Base, Fisher Bioreagents)	2.5 мл
Натрий додецилсульфат (10%), (Fisher Bioreagents, Ұлыбритания)	100 мл
Аммоний персульфаты (10%), (APS, Sigma-Aldrich, Ұлыбритания)	100 мл
dH ₂ O	3.3 мл
Тетраметилэтилендиамин (TEMED, Sigma-Aldrich, Ұлыбритания)	10 мл



Сурет 6 - Жинақтаушы және бөлу гелінің гель камерасындағы орналасу аймақтары

2.4 Тұтас РНҚ бөлу әдісі

Тұтас РНҚ (total RNA) ReliaPrep RNA Cell Miniprep жүйесі (Promega, АҚШ) өндірушінің хаттамасына сәйкес өсіп келе жатқан жасуша үлгілерінен бөлінді. Тұтас РНҚ бөлу барысы төмендегідей кезеңдерді қамтыды:

- Жасуша ортасы бар пробирканы центрифугалағаннан кейін пробирка түбінде пайда болған жасуша түйіршіктеріне 500 мкл BL+TG буфері қосылды.

- Содан кейін 170 мкл изопропанол қосылып, колонкасы бар түтіктерге ауыстырылды.

- Келесі 20-25°C температурада 12000-14000 x g жылдамдықта 30 сек. бойы центрифугаланды.

- 500 мкл РНҚ жуу ерітіндісімен жуылды және 12000-14000 x g жылдамдықта 30 сек. бойы қайта центрифугаланды.

- 30 мкл жаңа дайындалған DNase I (24 μ l yellow core buffer; 3 мкл 0.09M MnCl₂; 3 мкл DNase I ферменті) қолданылды және бөлме температурасында 15 мин. бойы инкубацияланды.

- Инкубациядан кейін 200 мкл коллоналық жуу ерітіндісін қосып, 12000-14000 x g жылдамдықта 15 сек. бойы центрифугаланды.

- Содан кейін 500 мкл РНҚ жуу ерітіндісін (95% этанол қосылған) қосып, 30 сек. бойы 12000-14000 x g жылдамдықта центрифугаланды.

- Әрі қарай 300 мкл РНҚ жуу ерітіндісін (95% этанол қосылған) қосып 14 000 жылдамдықта 2 мин. центрифугаланды.

- Шағын бағаналы түтіктер эпендорф түтіктеріне (1.5 мл) ауыстырылды және оған 50 мкл ddH₂O қосылды, содан кейін 1 мин. бойы 12000-14000 x g жылдамдықта центрифугаланды.

- Соңында РНҚ үлгілерінің концентрациясы NanoDrop спектрофотометрдің (DeNovix, DS-11 АҚШ) көмегімен 260 нм толқын ұзындығында өлшенді.

- Тұтас РНҚ үлгілерін келесі пайдаланылғанға дейін -80°C температурада сақталды.

2.4.1 МикроРНҚ молекулаларының экспрессиясын талдау әдісі

Жасушалық линиялардағы микроРНҚ молекулаларының экспрессия деңгейлері адамның 2083 жетілген микроРНҚ экспрессиясын өлшейтін HTG EdgeSeq miRNA тұтас транскриптомды талдау (Tucson, АҚШ) (<https://www.htgmolecular.com/assays/mirna-wta>) көмегімен анықталды.

HTG EdgeSeq жүйесінде микроРНҚ молекулаларының экспрессия деңгейлерін анықтау барысы төмендегі кезеңдерді қамтиды (7-сурет):

Үлгіні дайындау (1). Ең алдымен Q23 және Q74 плазмидалық линиялары трансфекцияланған жасуша үлгілері центрифугаланды, содан кейін пробирка түбіндегі жасуша түйіршіктері PBS (pH=7.4) арқылы жуылып жасушалар саны гемоцитометр (орт. жасуша саны $\times 2 \times 10^4$) көмегімен саналды.

Алдын ала арнайы HTG лизис буфері (LB) 50°C температурада 20 минут бойы қыздырылды. Келесі 10 мкл өлшемде жасуша тығыздығына байланысты 4000 жасуша/мкл HTG LB қосылды (80 мың жасушаға 200 мкл). Q23 және Q74

жасуша линияларының әрқайсысынан 4 аликвотадан алынып, HTG Molecular Diagnostics (Tucson, АҚШ) жүйесіне жіберілді.

Үлгілерді HTG EdgeSeq miRNA тұтас транскриптомды талдау хаттамасы келесідей кезеңдерді қамтиды:

Кітапханаға дайындық процесі (library preparation) (2). Үлгілер арнайы планшетке жүктеліп, HTG EdgeSeq процессорына орналастырылады. Бұл процесс 4 сатыда жүреді:

1. Лизистенген үлгіге HTG нуклеазадан қорғау зондтары қосылады. Зондтың бүйіріндегі қанаттар (wings) секвенирлеу адаптерлері мен молекулалық штрих-кодтарын қосу үшін пайдаланылады.

2. Зонд, транскрипт және екі қанаттың (wingman) молекуласы гетеродуплекс жасайды. S1 нуклеаза гибридтелмеген зондтарды және нысана емес РНҚ молекуласын деградациялау үшін қосылады.

3. S1 белсенді емес қадамынан, РНҚ молекуласын жылумен және жоғары рН-пен жоюдан кейін қорғаныс зонды белгілеуге дайын болады.

4. Нуклеазаны қорғау реакциясы аяқталғаннан кейін үлгілер секвенирлеуге дайындалады. Секвенирлеу адаптерлері мен үлгі штрих-кодтары бар ПТР праймерлері қарапайым ПТР реакциясын пайдалана отырып, әрбір үлгіні жеке белгілеу үшін пайдаланады.

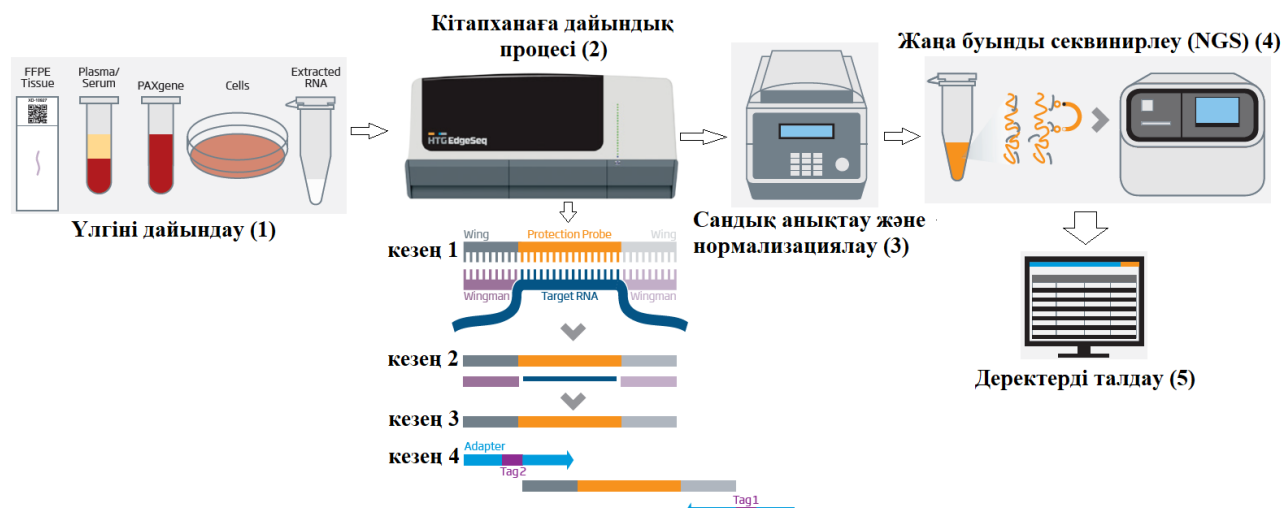
Сандық анықтау және қалыпқа келтіру (3). Амплификациядан кейін алынған ПТР өнімдері артық праймерлерді жою үшін кітапхананы тазалаудан өтеді, содан кейін секвенирлеу кітапханасын жасау үшін сандық түрде анықталып біріктіріледі.

Жаңа буынды секвенирлеу (NGS) (4). HTG edgeseq талдаулары жалпы NGS құралдарымен үйлесімді. Экспрессия деректері секвенсердегі FASTQ файлдары мен HTG Edge host компьютеріндегі үлгі парағының көмегімен жасалады. Орнату процесі Illumina MiSeq секвенсерінде іске қосылады және оны стандартты ноутбук немесе жұмыс үстелі компьютерінің көмегімен орындайды.

Деректерді талдау (5). HTG Edge host бағдарламалық құралы қарапайым, интуитивті графикалық пайдаланушы интерфейсімен деректерді талдайды.

МикроРНҚ молекуласы экспрессиясының сандық көрсеткіші миллионға шаққандағы санға (CPM - counts per million) негізделген. CPM log2 түрлендіруі әрбір үлгідегі жалпы оқулар үшін стандарттау және түзету ретінде пайдаланылды.

Алынған дерек көздері Excel файлында өңделмеген түрде жіберілді. Деректерді ары қарай өңдеу үшін HTG Molecular Diagnostics платформасының HTG EdgeSeq Reveal (<https://reveal.htgmolecular.com/>) статистикалық талдау жүйесінде түрлендірілді (HTG EdgeSeq Reveal - тек HTG Molecular Diagnostics компаниясының тұтынушыларына арнайы логин және парольмен ғана қол жетімді жүйе болып табылады).



Сурет 7 - HTG EdgeSeq жүйесінің жұмыс процесі
(сурет HTG EdgeSeq сайтынан алынды)

2.4.2 OneTag Hot Start ДНК полимераза және агарозды гель электрофорезі
ДНҚ молекуласын амплификациялау, сондай-ақ жобаланған праймерлерді сынау үшін басқа компоненттермен бірге ДНҚ үлгісінің концентрациясы (10 нг/мкл) бар OneTag Hot Start ДНК-полимераза жинағы қолданылды (кесте 7).

ПТР амплификаторда (MJ Research PTC-200 Thermal Cycler, Ұлыбритания) температура шарттары келесідей болды: бастапқы денатурация 94°C - 30 сек; 30 циклда 94°C - 30 сек. 60°C - 60 сек. 72°C - 1 мин; соңғы кезең 72°C - 5 мин.

ПТР реакцияларынан кейін жүктеу бояуы (loading dye) түтіктерге қосылды және 2% агарозды геле 80V 60 мин. бойы жүктелді, сосын гель ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, АҚШ) арқылы визуализация жасалды.

Кесте 7 - OneTag Hot Start ДНК полимераза жиынтық компоненттері

Компоненттер	25 мкл реакцияға
5x OneTaq стандартты реакция буфері	5 мкл
10 mM дезоксирибонуклеотидтрифосфат	0.5 мкл
10 μ M F праймер	0.5 мкл
10 μ M R праймер	0.5 мкл
OneTag Hot Start ДНК-полимераза	0.125 мкл
ДНҚ үлгісі	2 мкл
dH ₂ O	16.375 мкл

Агарозды гелді дайындау барысы: 100 мл трис-ацетат-EDTA (TAE) буферіне 2 гр агароза ұнтағы қосылып, арнайы микротолқынды пеште 2-3 минут қыздырылды. Дайын болған геле 10 мкл ДНҚ үлгілерінің жылдам, ыңғайлы және қауіпсіз электрофорезіне арналған SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher, Ұлыбритания) қосып гель камерасына құйылды (маркер: GeneRuler Low Range DNA Ladder. Каталог нөмірі: SM1191. Thermo Fisher, Ұлыбритания).

2.5 Комплементарлы ДНҚ синтезі және сандық ПТР әдісі

Кері транскрипция арқылы РНҚ үлгісінен ДНҚ синтезі жүргізілді, нәтижесінде комплементарлы ДНҚ (кДНҚ) түзілді. кДНҚ өндірушінің хаттамасына сәйкес First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, Ұлыбритания) арқылы 600 нг/мкл ДНҚ 10 мкл дайындалды.

Үлгілер ПТР аппаратының (3Prime, TECNE, Ұлыбритания) көмегімен 25°C температурада 5 мин., 37°C температурада 60 мин. және 70°C температурада 5 мин. инкубацияланды, содан кейін пробиркалар мұзға салынып, микрофугада айналдырылды және кейінгі талдау үшін -20°C температурада сақталады. Бір тізбекті ДНҚ концентрациясы NanoDrop спектрофотометрдің (DeNovix, DS-11 АҚШ) көмегімен 260 нм толқын ұзындығында өлшенді және келесі эксперименттер үшін 10 нг/мкл дейін қалыпқа келтірілді.

Гендердің экспрессиясы нақты уақыттағы ПТР реакциялары арқылы үш рет қайталау арқылы сандық түрде анықталды. SYBR Green SuperMix (SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix; Bio-Rad Laboratories Ltd. Ұлыбритания) көмегімен 1 мкл кДНҚ үлгісін пайдаланып орындалды (кесте 8). Қалыпқа келтіруші ген ретінді 18S рРНҚ гені қолданды. Жалпы реакция қоспасы 96 ұяшықты ПТР пластинасында келесі стандартты термоциклді бағдарлама (Bio-Rad, АҚШ) арқылы жүргізілді: 10 мин. бойы 95°C денатурация, содан кейін 15 сек. бойы 95°C және 30 сек. бойы 60°C 40 циклде өтті.

Кесте 8 - Сандық ПТР реакциясының компоненттері

Компоненттер	10 мкл реакцияға
SYBR Green	5
F праймер	0.3
R праймер	0.3
ddH ₂ O	3.4
ДНҚ үлгісі	1

Барлық праймер жұптары Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) бағдарламасы көмегімен жасалды және Eurofins Genomics (Ebersberg, Германия) компаниясынан алынды (кесте 9). Праймерлер 1:10 қатынасында сұйытылды (10 µL праймер + 90 µL ddH₂O).

Экспрессия деңгейлері $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ct (Cycle threshold) әдісі арқылы үш қайталымда өлшенді. Сандық ПТР статистикалық нәтижелері Студенттің t-тестімен талданды және $p < 0.05$ мәні статистикалық тұрғыдан маңызды деп есептелді. Барлық гендердің экспрессиялары бойынша графиктерін (fold change) талдау GraphPad Prism 9 (<https://www.graphpad.com/updates/prism-900-release-notes>) статистикалық бағдарламалық құралы арқылы орындалды.

Кесте 9 - Сандық ПТР-де гендердің экспрессия деңгейін анықтауда қолданылған праймерлердің тізбектері

Ген	Тура тізбек (5'-3')	Кері тізбек (5'-3')
<i>B3GNT2</i>	CAACAAGTGCCGGAGGCTA	ATATCTTGTCCGGGAGCAGC
<i>CSMD2</i>	AACACTGTCTGTCTACGGGG	AGTGGAGCTTGGTCTGAGTG
<i>GNAO1</i>	GGGGCTGGAGAATCAGGAAAA	GCGTCAGCCTTTCTCTCCTT
<i>ATXN2</i>	AGCCAAGACATATAGAGCAGGT	AACTGCTGAGGACTGTAGGC
<i>DUSP15</i>	GGGCAATGGCATGACCAAG	AGCTGATCCAGGTCTTTGGC
<i>EPN3</i>	CCCCTAGTTCGCTCATGTCC	CCCGTCTTGAGCAGGTAGTC
<i>GLIS1</i>	GACTACGGTCCATCCAAGGC	GTCCAGCAGGCTCTTCTCTG
<i>CREBBP</i>	CTCAGAGCCAGTTTCTGCCA	GGTTAGGAAGAGCAGCACCA
<i>ATN1</i>	CCTGCACCAGCAAGATGCTA	TAGGGGATCCGGGTAAGGTG
<i>HAP1</i>	GATGCAGCTCCAGGAAGAGG	ACCTGCTCTCGATCCTCACT
<i>ATXN1</i>	GATCGACTCCAGCACCGTAG	GATGACCAGCCCTGTCCAAA
<i>DNM1L</i>	AATCGTCGTAGTGGAACGC	TCTGCTTCCACCCCATTTTCT
<i>GEMIN4</i>	TTGCTGGCTTATGTGGAGGG	AACTTGTGGGTGCCGAGATT
<i>NOS3</i>	CCGGAAGGCTTTTGATCCCC	AACTCTTGTGCTGTTCCGGC
<i>EFNA5</i>	GTTGACGCTGGTGTCTTCTGG	TGGTAGTCACCCCTCTGGAA
<i>CNPY1</i>	TGGACGAGATAGAGCACGAC	TCCTTCGTCACAGGGTCTTC
<i>KIAA1324L</i>	GGGTTTCCGAGCAGCCTTAT	TTTGGCTTGGTGGAAGTGGG
<i>ATXN10</i>	CGTGAGAGCAGAAGGTGACA	CACTGGGTCAGAAAGGGGTT
<i>18S</i>	GTGGAGCGATTTGTCTG GTT	AACGCCACTTGTCCCTCTAA

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ

3.1 Гендердің негізінде түзілетін мРНҚ-ның CDS аймағындағы тринуклеотидті қайталану тізбектерімен микроРНҚ-ның өзара байланысу ерекшеліктерін зерттеу

Көп жағдайда микроРНҚ молекулалары ген экспрессиясын реттеуде нысана мРНҚ-ның 3'UTR аймағымен өзара әрекеттесуі туралы зерттеулер мен болжамдар жиі кездеседі [267]. Дегенмен, соңғы жылдары микроРНҚ молекуласының басқа да, яғни 5' UTR және CDS аймақтарында өзара әрекеттесулеріне байланысты ғылыми зерттеу жұмыстары жариялануда [87]. Сондықтан зерттеуіміздің осы бөлімінде микроРНҚ молекулаларының нысана мРНҚ-ның CDS аймағындағы тринуклеотидті қайталамдарымен өзара байланысу ерекшеліктері сипатталды.

Ең алдымен GenBank мәліметтер базасындағы 17494 адам гендерінің мРНҚ-мен miRBase базасынан жүктеп алынған 2567 микроРНҚ-ның байланысу сайттары MirTarget бағдарламасы арқылы есептелді. Алынған нәтижелерді талдау барысында 36 гендердің мРНҚ-ның CDS аймағындағы тринуклеотидті қайталамдарымен 14 микроРНҚ молекулаларының $\Delta G/\Delta G_m$ мәндері 85% және одан да жоғары мәндерде байланысу сайттары анықталды.

Тринуклеотидті қайталам сандарының шамадан тыс артуы организмде жүйке жүйесіне әсер етіп, тұқымқуалайтын нейродегенеративті ауруларға алып келетіндігі туралы зерттеу жұмыстары жүргізілген [268]. Зерттеу жұмысымызда микроРНҚ-ның байланысу нысаны болған 36 гендердің нейродегенеративті аурулардағы рөлі туралы мәліметтер 10-шы кесте әрбір генге берілген сілтемедегі мақалаларда сипатталған.

Кесте 10 - МикроРНҚ-ның байланысу нысаны болған гендердің сипаттамалары және қызметтері

Ген	Сипаттамасы мен қызметі	Ауру аты	PMID
ANK3	Нейрондық дамуда, жасуша қозғалғыштығы, пролиферация, байланыс және арнайы мембраналық домендерді қолдау сияқты әрекеттерде маңызды рөл атқарады	Аутизм, шизофрения, интеллектуалдық бұзылыстар	34218362
ATN1	ATN1 ядролық сигнализацияға қатысатын эволюциялық сақталған транскрипциялық корпрессорлар класының мүшесі болып табылатын атрофин-1 (ATN1) ақуызын кодтайды	Дентаторубральды паллидолуйзиялық атрофия, церебеллярлық атаксия	36809552; 36007104
ATXN1	Атаксин-1 деп аталатын ақуызды құруға нұсқау береді, бүкіл денеде кездеседі, бірақ оның қызметі белгісіз. Жасушалардың ішінде атаксин-1 ядрода орналасқан	Аутосомды доминантты церебеллярлық атаксиялар	32878998
ATXN2	Жүйке-бұлшықет процесі, нейрондық дифференциация процестерінде, ақуыздарды өндіру үшін генетикалық ақпаратты аударуда маңызды рөл атқарады	Паркинсон, 2-ші типті спиноцеллярлы атаксия	34010218

<i>ATXN7</i>	Гистонның ацетилденуі және деубиквитинациясы деңгейінде хроматинді қайта құру үшін өте маңызды болып көрінетін транскрипция факторы	Аутосомды доминантты церебеллярлық атаксиялар	35422034; 34870541
<i>ARX</i>	Ұйқы безінің, ұрықтың және бұлшықеттердің дамуына, орталық жүйке жүйесіндегі белгілі бір нейрондық жасушалар түрлерін дифференциациялауға қатысады	Даму және эпилептикалық энцефалопатия	18835247; 14631200
<i>BRD4</i>	Хроматинді ұйымдастыруға, гистондарды ацетилденуге, транскрипцияны бақылауға және ДНҚ зақымдануын қалпына келтіруге қатысады	Альцгеймер ауруы	35248531; 34765643
<i>CACNA1I</i>	Кальций арнасы деп аталатын құрылымның негізгі бөлігін (субъектісін) жасау үшін нұсқаулар береді	Жүйке дамуының бұзылыстары	33704440
<i>CELF3</i>	Бұл генде әртүрлі изоформаларды кодтайтын бірнеше альтернативті қосылатын транскрипт нұсқалары анықталды, РНҚ өндеуде әртүрлі рөл атқарады	Неврологиялық аурулар	20622515
<i>DIP2B</i>	Ақуыз кодтаушы ген болып табылады. Аксональды өсу үшін маңызды болып табылатын тубулиннің ацетилденуін реттейді	Интеллектуалдық дамудың бұзылуы	17236128
<i>EGR1</i>	Бұл генмен кодталған ақуыз C2H2 типті мырыш-саусақ ақуыздарының EGR тобына жатады. Бұл ядролық ақуыз және транскрипциялық реттеуші қызметін атқарады	Альцгеймер ауруы	24269917
<i>EP400</i>	АТФ тәуелді хроматинді қалпына келтіру белсенділігі және ақуыз антигендерін байланыстыру белсенділігі сияқты маңызды рөл атқарады	Шизофрения ауруы	33602898
<i>FOXP2</i>	Ұрықтың және ересек адамның миында, сондай-ақ, өкпе мен ішек сияқты бірнеше басқа органдарда экспрессияланады	Нейродегенеративті аурулар	28798667
<i>GIGYF2</i>	Құрамында CAG тринуклеотидті қайталанулары бар және полиглутамин қалдықтарының бірнеше бөлігі бар ақуызды кодтайды	Паркинсон ауруы	26134514
<i>HTT</i>	Геннтингтин деп аталатын ақуызды жасауға нұсқау береді	Геннтингтон ауруы	27069383
<i>HRC</i>	Ақуыз қаңқа бұлшықетінің түйсетін саркоплазмалық ретикулумының (SR) негізгі трансмембраналық ақуызы триадиннің цитоплазмалық доменімен әрекеттеседі	Нейродегенеративті аурулар	31283791
<i>HOXA13</i>	ДНҚ-ның белгілі бір аймақтарына қосылатын (байланыстыратын) және басқа гендердің белсенділігін реттейтін ақуызды өндіруге арналған нұсқауларды береді	Нейродегенеративті аурулар	29550519; 24586208
<i>IRS1</i>	Бұл ген инсулин рецепторларының тирозинкиназасымен фосфорланатын ақуызды кодтайды. Бұл гендегі мутациялар II	2-ші типті қант диабеті; Альцгеймер ауруы	14633864; 33927970

	типті қант диабетімен және инсулинге төзімділікке бейімділікпен байланысты		
<i>MAML3</i>	Транскрипция коактиваторының белсенділігін қосады. Notch сигналдық жолына және РНҚ полимераза II арқылы транскрипцияның оң реттелуіне қатысады	Нейроэндокриндік ісік	33986121
<i>MAPK1</i>	Пролиферация, дифференциация, транскрипцияны реттеу және дамыту сияқты көптеген жасушалық процестерге қатысады	Нейродамудың бұзылуы	32721402
<i>MN1</i>	Менингиома 1 (MN1) CAG қайталануының екі жиынтығын қамтиды	Нейродегенеративті аурулар	34975401
<i>MLL2</i>	Организмнің көптеген мүшелері мен тіндерінде кездесетін лизин-спецификалық метилтрансфераза 2D деп аталатын ферментті жасауға нұсқаулар береді	Нейродегенеративті бұзылыстар	35794091
<i>MEF2A</i>	Бұлшықеттерге тән, өсу факторы тудыратын және стресс-индукцияланған гендерді белсендіретін ДНҚ байланыстыратын транскрипция факторы болып табылады	Нейродегенеративті аурулар	21741404
<i>NGFR</i>	Нейрондық жасушалардың өлімі мен өмір сүруі, невриттердің өсуі және нейрондық дифференциация сияқты биологиялық функцияларда әрекет етеді	Альцгеймер ауруы	36834612
<i>NCOR2</i>	Бұл ақуыз мақсатты гендердің базальды транскрипциялық белсенділігін болдырмайтын хроматин құрылымын өзгерту үшін гистон деацетилазаларын қамтитын көпсубъектілік кешеннің бөлігі ретінде әрекет етеді	Нейродегенеративті аурулар	24874548
<i>PABPN1</i>	Ақуыздарды жасау үшін генетикалық схема ретінде қызмет ететін хабаршы РНҚ (мРНҚ) деп аталатын молекулаларды өңдеуде маңызды рөл атқарады	Амиотрофиялық бүйірлік склероз	26130692
<i>PVRL1</i>	Эпителий мен эндотелий жасушаларында адгезиялы байланыстар мен тығыз байланыстарды ұйымдастыруда рөл атқаратын адгезия ақуызын кодтайды	Нейродегенеративті бұзылыстар	27981441
<i>RHOX2B</i>	Туылғанға дейін даму кезінде маңызды болып табылатын ақуызды жасауға нұсқаулар береді. RHOX2B ақуызы жүйке жасушаларының (нейрондардың) түзілуін қолдауға көмектеседі және нейрондардың белгілі бір функцияларды (дифференциация) орындау үшін жетілетін процесін реттейді	Моторлы нейрондық ауру	34048688
<i>RUNX2</i>	Тістердің, сүйектердің және шеміршектің дамуы мен сақталуына қатысатын ақуызды жасау нұсқауларын береді	Альцгеймер ауруы	36764297
<i>SOX3</i>	Эмбрионалды дамуды реттеуге және транскрипция факторларының SOX (SRY-байланысты HMG-box) тобының мүшесін кодтайды	Нейродегенеративті аурулар	33867936

<i>SMARCA2</i>	Зақымдалған ДНҚ-ны қалпына келтіру, ДНҚ-ны көшіру (репликациялау) және жасушалардың өсуінде маңызды рөл атқарады	Полиглутаминдік бұзылулар	15368101
<i>TOX3</i>	Фибробласт өсу факторы 2 рецепторының генетикалық полиморфизмі және қайталанатын тринуклеотидті құрайтын 9 HCV индукцияланған гепатоцеллюлярлық карциномаға бейімділікке әсер етеді	Неврологиялық ауру	27080130
<i>TNRC6A</i>	Бұл ген құрамында 6 ақуыз тобы бар тринуклеотидті қайталым мүшесін кодтайды. Ақуыз РНҚ интерференциясы (RNAi) және микроРНҚ жолдары арқылы транскрипциядан кейінгі геннің дыбысын өшіруде қызмет етеді	Тринуклеотидті аурулар	23224974
<i>TNRC6B</i>	РНҚ байланыстыру белсенділігін қосады	Дамудың кешігуі, интеллектуалдық бұзылыстар	32152250
<i>ZIC2</i>	Неврологиялық дамуда бірнеше рөл атқаратын транскрипция факторын кодтайды	Нейродегенеративті аурулар	19955556
<i>ZNF384</i>	Глутамин қалдықтарын кодтайтын CAG тринуклеотидтерінің ұзақ қайталануларын қамтиды. Ақуыз MMP1, MMP3, MMP7 және COL1A1 жасушадан тыс матрицалық гендердің промоторларын байланыстырады және реттейді	Альцгеймер ауруы	35669784
Ескерту: PMID әрбір басылымға берілген бірегей сәйкестендіру нөмірі.			

MirTarget бағдарламасының есептеу нәтижесі бойынша, 36 гендердің ішінен ең азы *MAPK1* гені төрт микроРНҚ молекулаларынан бастап, ең көбі *MLL2* гені 173 микроРНҚ молекулаларының байланысу нысаны болды. Дегенмен, микроРНҚ молекулаларының барлығы дерлік мРНҚ-ның CDS аймағында тринуклеотидті қайталым тізбектерімен байланысқан жоқ. Сондықтан, бұл бөлімде гендердің мРНҚ-ның CDS аймағындағы тринуклеотидті қайталымды тізбектерімен байланысқан 14 микроРНҚ молекулаларын қарастырдық.

Адамның 36 гендерінің мРНҚ-ның CDS аймағындағы тринуклеотидті қайталымды тізбектерімен өзара байланысу сайттары miR-1273f, miR-1322, miR-1181, miR-4258, miR-1281, miR-6833-5p, miR-877-3p, miR-3960, miR-4458, miR-1910-5p, miR-4302, miR-1260a, miR-8083 және miR-1908-3p арасында анықталды (кесте 11).

Зерттеу нәтижесі бойынша, бір микроРНҚ молекуласы бірнеше гендердің мРНҚ-мен, бір геннің мРНҚ тізбектері бірнеше микроРНҚ молекулалардың байланысу нысаны бола алатындығы анықталды. Мысалы: miR-1322 - *ATN1*, *ATXN1*, *ATXN2*, *BRD4*, *CELF3*, *EP400*, *FOXP2*, *GIGYF2*, *HTT*, *MAML3*, *MN1*, *MEF2A*, *NCOR2*, *SMARCA2*, *TNRC6B*, *TOX3*, *TNRC6A*, *RUNX2*, *ZNF384* және *MLL2* гендерінің мРНҚ-мен өзара байланысу сайттары табылды. Ал, miR-1281 - *CACNA1I*, *PVRL1* және *EGR1* гендерінің мРНҚ-мен өзара байланысу сайттары анықталды. Сонымен қатар, *ARX* және *PHOX2B* гендерінің мРНҚ тізбектері miR-4258 молекуласының байланысу нысаны екені анықталды.

Кесте 11 - Гендердің негізінде түзілетін мРНК-ның CDS аймағындағы тринуклеотидті қайталанатын тізбектерімен микроРНК-ның өзара байланысу сайттарының схемалары

Ген; микроРНК; байланысу сайтының басталуы; бос энергияның өзгерісі (ΔG , кДж/моль); $\Delta G/\Delta G$ м (%) мәні; микроРНК ұзындығы (нт)	
<i>ANK3</i> ; miR-1273f; 12230; -89; 85; 19 5' -CACUGCC ACCACCACCACC -3' 3' -GUGACGUUGGAGGUAGAGG-5'	<i>MAML3</i> ; miR-1322; 2220; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAGC -3' 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'
<i>ATN1</i> ; miR-1322; 1693; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAGC -3' 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'	<i>MAPK1</i> ; miR-1910-5p; 254; -104; 85; 21 5' - CGGCGGCGGGCGGGCGGG CCCCG-3' 3' -UCCGCCGUCGUGUCCUGACC-5'
<i>ATXN1</i> ; miR-1322; 1569; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAGC -3' 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'	<i>MN1</i> ; miR-1322; 2534; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAGC -3' 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'
<i>ATXN2</i> ; miR-1322; 658; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAGC -3' 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'	<i>MLL2</i> ; miR-1322; 9820; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAACAGC -3' 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'
<i>ATXN7</i> ; miR-1181; 593; -112; 88; 21 5' -CGCCGCG CGGCGGCGGCGGCGG -3' 3' -GCCGAGC-CCACCGCCGCGUGCC-5'	<i>MEF2A</i> ; miR-1322; 1852; -91; 89; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAGC CC-3' 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGU-AG-5'
<i>ARX</i> ; miR-4258; 513; -87; 85; 17 5' -CAG CGGCGGCGGCGGCGGCGG -3' 3' -GGUCCGCCACCGCC-CC-5'	<i>NGFR</i> ; miR-4302; 667; -87; 85; 18 5' -CACGCUGGG CCGACGCCGA -3' 3' -GAGCGACUCGG-UGUGACC-5'
<i>BRD4</i> ; miR-1322; 2533; -87; 85; 19 5' - CAGCAGCAACAGCAG CCGCC-3' 3' -GUCGUAGUCGUCGU-AGUAG-5'	<i>NCOR2</i> ; miR-1322; 1813; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAGC -3' 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'
<i>CACNA1I</i> ; miR-1281; 1820; -84; 86; 17 5' - AGGAGGAGGAGGAGGAGG -3' 3' -CCCUC-UCCUCCUCCGCU-5'	<i>PABPN1</i> ; miR-1260a; 1284; -84; 85; 18 5' -UGG CGGCGGCGGCGGCGGCGG -3' 3' -ACCACCGUCUCCACC-CUA-5'
<i>CELF3</i> ; miR-1322; 1872; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAGC -3' 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'	<i>PVRL1</i> ; miR-1281; 1482; -84; 86; 17 5' - AGGAGGAGGAGGAGGAGG -3' 3' -CCCUC-UCCUCCUCCGCU-5'
<i>DIP2B</i> ; miR-6833-5p; 837; -99; 85; 22 5' -UCCUCCU CAUCAUCUCCUCA A-3' 3' -AAAGAGGAG-GGUAGAAGGUGUG-5'	<i>PHOX2B</i> ; miR-4258; 1100; -89; 87; 17 5' - CCGCGGCAGCGGCGGCGGCGG -3' 3' -GGUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>EGR1</i> ; miR-1281; 474; -84; 86; 17 5' -GGCGGUGG AGGCGGCGG -3' 3' -CCCUCU-CCUCCUCCGCU-5'	<i>RUNX2</i> ; miR-1322; 512; -89; 87; 19 5' - CAGCAACAGCAGCAGCAGC -3' 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'
<i>EP400</i> ; miR-1322; 8313; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAAC -3' 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'	<i>SOX3</i> ; miR-8083; 1080; -97; 85; 21 5' -GGCCGCAGCCGCCAUGAGCCUG-3' 3' -UCAACGUCGGCAGUUCA-GGAC-5'
<i>FOXP2</i> ; miR-1322; 912; -89; 87; 19 5' - CAGCAACAGCAGCAGCAGC -3' 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'	<i>SMARCA2</i> ; miR-1322; 766; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAGC -3' 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'
<i>GIGYF2</i> ; miR-1322; 3068; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAACAAC -3'	<i>TOX3</i> ; miR-1322; 1509; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAGC -3'

 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'	 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'
<i>HTT</i> ; miR-1322; 197; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAGC -3'	<i>TNRC6A</i> ; miR-1322; 400; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAACAGC -3'
 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'	 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'
<i>HRC</i> ; miR-877-3p; 777; -99; 85; 21 5' -AG GAGGAGGAGGAG GAAGAGGA-3'	<i>TNRC6B</i> ; miR-1322; 4172; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAGC - 3'
 3' -GAC-CCUCCUCCUCCUCCUCCU-5'	 3' - GUCGUAGUCGUCGUAGUAG - 5'
<i>HOXA13</i> ; miR-3960; 405; -108; 86; 20 5' -GCA GCCGCCGCCGCCGCCGCC -3'	<i>ZIC2</i> ; miR-1908-3p; 1787; -116; 88; 23 5' - CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG -3'
 3' -GGG-GGCGGAGGCGGCGGCGGCGG-5'	 3' -GCC-CCGCCUCGGCCGCCGCCGCC-5'
<i>IRS1</i> ; miR-4458; 3654; -84; 85; 19 5' -CU CCCCCACCCCCACCCCU -3'	<i>ZNF384</i> ; miR-1322; 1780; -89; 87; 19 5' - CAGCAGCAGCAGCAGCAGC -3'
 3' -AGAAGGUGUGGAUGGA-GA-5'	 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'

11 - кестеде берілген гендердің негізінде түзілетін мРНҚ-ның CDS аймағындағы тринуклеотидті қайталанатын тізбектерімен микроРНҚ молекулаларының байланысу сайттарының орташа бос энергиясы -113 кДж/мольге тең болды.

miR-1181 және miR-1908-3p - *ATXN7* және *ZIC2* гендерінің мРНҚ-мен -112 және -116 кДж/моль жоғары бос энергияда өзара байланысу сайттарына ие болды. miR-1181-мен *ATXN7* генінің мРНҚ-ның байланысу сайты 593 нт-тен басталады, және 599 бен 670 нт арасында орналасқан CGG тринуклеотидті қайталанатын аймақпен де байланысу сайтын қамтиды. Сонымен қатар, *ZIC2* генінің мРНҚ-ның 1787-1816 нт аймағында CGG қайталану тізбектерімен miR-1908-3p байланысу сайттары анықталды. miR-1181 және miR-1908-3p нысаны болған *ATXN7* және *ZIC2* гендерінің нейродегенеративті аурулардың дамуында маңызды рөл атқаратынын ескере отырып, өзара әрекеттесу ассоциацияларын адамның жүйке жүйесінің ауруларын диагностикалауда биомаркерлер ретінде пайдалану мүмкін екендігін болжаймыз.

MirTarget бағдарламасының есептеу нәтижесі бойынша, *ARX* генінің мРНҚ тізбектері miR-4258-бен өзара байланысу нысаны болғанын анықтадық. Бұл геннің CGG тринуклеотидті қайталану тізбектерінде miR-4258 - 513-ші нт бастап 528-ші нт дейін алты кластерлік байланысу сайттары анықталды. Аталған микроРНҚ молекуласының *ARX* геннің мРНҚ-ның CDS аймағында байланысу бос энергиясы -87ΔG, кДж/моль мәнде болды. Әдебиет көздеріне сүйенетін болсақ, *ARX* гені - мидың, ұйқы безінің, ұрықтың және қаңқа бұлшықеттерінің дамуында маңызды рөл атқарады. *ARX* геніндегі мутациялар жүйке жүйесінің бұзылуларының кең спектрімен байланысты психикалық дамудың тежелуін тудыратыны анықталған және ми морфогенезінде маңызды рөл атқарады деп санайды [269-271]. Ал, miR-1281 молекуласының *CACNA1I* және *PVRL1* гендерінің 1820-1830, 1482-1504 нуклеотидті тізбектер аймақтарында AGG тринуклеотидті қайталымдарымен байланысу сайттары анықталды.

Сонымен қатар, *ATN1*, *ATXN1*, *ATXN2*, *BRD4*, *CELF3*, *EP400*, *FOXP2*, *GIGYF2*, *HTT*, *MAML3*, *MN1*, *MLL2*, *MEF2A*, *NCOR2*, *RUNX2*, *SMARCA2*, *TOX3*,

TNRC6A, *TNRC6B* және *ZNF384* гендерінің мРНК-ның CDS аймағында CAG тринуклеотидті қайталымдарымен miR-1322 $\Delta G/\Delta G_m$ мәні 85%-дан асатын байланысу сайттары табылды. Бұл нәтижелерден көріп тұрғанымыздай, miR-1322 басқа микроРНК молекулаларымен салыстырғанда бірнеше гендердің мРНК-мен өзара байланысу сайттары бар екендігі анықталды.

Адам гендерінің кодтау аймақтарындағы CAG тринуклеотидті қайталымдарының экспансиясы ұзартылған полиглутаминді (polyQ) созылулары бар ақуыздарды генерациялау арқылы нейродегенеративті бұзылыстарды тудырады. Бұл бұзылыстар тобына Гентингтон ауруы, дентаторубральды паллидолий атрофиясы, жұлынның бұлшықет атрофиясы және 1, 2, 3, 6 және 7-ші типті жұлын церебеллярлы атаксиялар жатады [272, 273]. Бұл анықталған микроРНК молекулалары мен нысана гендердің экспрессияларының мәндері (human miRNA tissue atlas/human protein atlas) келесі 12-ші кестеде (А және Ә) көрсетілгендей RPKM (Reads Per Kilobase of transcript, per Million mapped reads; транскрипттің килобазасына шаққандағы оқылым, миллионға шаққанда карталанған) мәндеріне ие болды.

Кесте 12 - МикроРНК-ның және олардың байланысу нысаны болаған гендердің организмдегі экспрессия көрсеткіштері

(А) МикроРНК молекулаларының адам тініндегі, миындағы және жүйке жүйесіндегі экспрессия көрсеткіштері (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas/>)

МикроРНК	Мида (RPKM)	Жүйке жүйесінде (RPKM)	МикроРНК	Мида (RPKM)	Жүйке жүйесінде (RPKM)
miR-3960	24855.21	41799.15	miR-4258	-1.06	-3.85
miR-1260a	307.54	298.59	miR-1322	-0.76	-1.17
miR-1273f	151.99	136.05	miR-6833-5p	-	-
miR-1181	36.60	79.20	miR-877-3p	-	-
miR-1281	22.31	25.44	miR-4302	-	-
miR-4458	20.47	9.76	miR-8083	-	-
miR-1910-5p	1.26	2.24	miR-1908-3p	-	-

(Ә) Адам ақуызының атласы бойынша микроРНК-ның байланысу нысаны болған гендердің ми бөлігіндегі экспрессия көрсеткіштері (<https://www.proteinatlas.org/about>)

Ген	Ми қыртысы (nTPM)	Гипоталамус (nTPM)	Мишық (nTPM)	Жұлын миы (nTPM)
<i>PABPN1</i>	249.3	196.6	193.4	175.6
<i>ANK3</i>	82.3	86.1	144.9	21.2
<i>EGR1</i>	70.1	30.4	133.1	4.4
<i>ZIC2</i>	16.2	10.4	123.4	8.8
<i>ATN1</i>	120	41.2	94.2	75.7
<i>SMARCA2</i>	81.7	53.7	87.4	40.3
<i>MAPK1</i>	80.9	46.4	37.3	43.8
<i>CELF3</i>	70.7	37.5	22.1	5.2
<i>NGFR</i>	63.6	25.1	17.3	10.9
<i>NCOR2</i>	45.6	12.1	27.2	5.4
<i>DIP2B</i>	28.2	31	35	26.4
<i>BRD4</i>	34	17.13	8.5	2.8
<i>PVRL1</i>	32.3	15.3	17.4	16.3
<i>ATXN2</i>	30.3	29.9	22.8	18.6
<i>MEF2A</i>	27.6	12.1	16.4	18.4
<i>ZNF384</i>	26.4	23.8	26.9	20.8
<i>GIGYF2</i>	14.6	18.5	23.5	11.4
<i>MLL2</i>	22.9	14.8	17.2	12.4
<i>TNRC6B</i>	7.6	1.1	22	1.1
<i>EP400</i>	18.1	14.6	15	8.7
<i>ARX</i>	17.4	6	0	0
<i>MAML3</i>	2.1	2.8	16.8	2.4
<i>ATXN1</i>	14.4	0	0	0
<i>HTT</i>	14.2	3.5	7.8	3
<i>TNRC6A</i>	7.1	6.6	10.8	2.2
<i>FOXP2</i>	10	0.9	0	0
<i>CACNA1I</i>	9.7	1.3	1.5	0.7
<i>MN1</i>	9.5	5.3	6.4	2.1
<i>TOX3</i>	6	4.4	1.2	5.1
<i>IRS1</i>	3.1	1	5.2	2
<i>ATXN7</i>	4.4	3.7	4.9	0.7
<i>SOX3</i>	1	4.9	0.8	1.1
<i>HRC</i>	4	2.3	3.1	2.2
<i>RUNX2</i>	1.4	1.5	1.2	1.6
<i>PHOX2B</i>	0	0	0	0.2
<i>HOXA13</i>	0	0	0	0
Ескерту: nTPM= (normalized transcripts per million), миллионға нормаланған транскрипт.				

miRNA Tissue Atlas бойынша miR-1273f (мида 151.99; жүйке жүйесінде 136.05), miR-3960 (мида 24855.21; жүйке жүйесінде 41799.15), miR-1260a (мида 307.54; жүйке жүйесінде 298.59) РПКМ мәні басқа микроРНК молекулаларына қарағанда жоғары экспрессиялатыны анықталды. Ал, miR-6833-5p, miR-877-3p, miR-4302, miR-8083 және miR-1908-3p бойынша мәндер Human miRNA tissue

atlas веб-ресурсында табылмады. Дегенмен, miR-1908-3p бойынша зерттеулер әдебиет көздерінде адамның сперматогенезінде жоғары деңгейде экспрессияланып, сперматогенездік бағаналы жасушаларының ДНҚ синтезін ынталандыратындығы анықталған [274].

Сонымен қатар, адам ақуызының атласы бойынша miR-1273f, miR-1322, miR-1281, miR-1260a және miR-1908-3p байланысатын нысана гендер ми бөліктерінде, оның ішінде ми қыртысы, гипоталамус, мишық және жұлын миында экспрессия деңгейлері жоғары nTPM мәнде болды (*ANK3* мишықта: 144.9; *ATN1* ми қыртысында: 120; *EGR1* мишықта: 133.1; *PABPN1* ми қыртысында: 249.3; гипоталамуста: 196.6; мишықта: 193.4; жұлын миында: 175.6; *ZIC2* мишықта: 123.4).

Осы аталған гендердің кодтау аймақтарында тринуклеотидті қайталымдардың кездесуін, олардың шамадан тыс қайталым сандары тұқым қуалайтын нейродегенеративті аурулардың пайда болу мүмкіндігіне алып келетіндігін және ми бөліктерінде жоғары экспрессияланатынын ескере отырып, miR-1273f, miR-1281 және miR-1260a-ның нысана гендерімен ассоциацияларын тұқым қуалайтын нейродегенеративті ауруларды ерте диагностикалау үшін биомаркерлер ретінде пайдаланылуы мүмкін екені болжанып отыр.

3.2 Полиглутаминді емес тринуклеотидті бұзылысты гендердің негізінде түзілетін мРНҚ-мен микроРНҚ-ның өзара әрекеттесуін сипаттау

MirTarget бағдарламасының есептеу нәтижесінде miR-4258, miR-3960, miR-211-3p және miR-3155b - 34 гендердің мРНҚ-ның UTR аймақтарында тринуклеотидті CGG, GCC және CUG қайталымдарымен өзара байланысу сайттары анықталды. Келесі 13-15-ші кестелерде miR-4258, miR-3960 miR-211-3p және miR-3155b молекулаларының гендердің мРНҚ-ның 5'-UTR және 3'-UTR аймақтарында тринуклеотидті қайталым тізбектерімен өзара байланысу сайттары көрсетілген.

Алынған нәтижелер бойынша *ABL2*, *ACVR1B*, *ADARB1*, *ADRBK1*, *APBA1*, *ARHGEF7*, *FMR1*, *B4GALT2*, *BCL11B*, *BCR*, *BRSK2*, *BRWD1*, *BTBD7*, *C11orf87*, *C9orf91*, *CACNA1A*, *CADM4*, *CAMK4*, *CARM1*, *CBFB*, *CBL* және *CCDC93* гендердің мРНҚ-ның 5'-UTR-де CGG қайталанатын тринуклеотидті тізбектерімен miR-4258 арасында байланысу сайттары табылды.

Кесте 13 - Гендердің негізінде түзілетін мРНҚ-ның 5'-UTR аймақтарындағы CGG тринуклеотидті қайталанатын тізбектерімен miR-4258 молекуласының байланысу сайттары

Ген	Байланысу сайтының басталуы	ΔG , кДж/моль	$\Delta G/\Delta G_m$, %	МикроРНҚ-ның мРНҚ-мен байланысу схемалары
<i>ABL2</i>	21	-89	87	5' - CGGCGGCGGUGGCGGCGG - 3' 3' - GGUUCCGCCACCGCC - CC - 5'
<i>ACVR1B</i>	46	-89	87	5' - CUGCGGCGGCGGCGGCGG - 3'

				 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>ADARB1</i>	18	-93	91	5'-CCGUGG CGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>ADRBK1</i>	7	-87	85	5'-CGCGGG CGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>APBA1</i>	50	-87	85	5'-UCC CGGCGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>ARHGEF7</i>	155	-91	89	5'-GCGAGG CGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>FMR1</i>	98	-87	85	5'-GCG CGGCGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>B4GALT2</i>	133	-87	85	5'-CCCG CGGCGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUU-CCGCCACCGCCCC-5'
<i>BCL11B</i>	150	-87	85	5'- CGGCGGCGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>BCR</i>	200	-91	89	5'-CCGAGGAGG CGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>BRSK2</i>	100	-91	89	5'-CCU CGGCGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>BRWD1</i>	175	-87	85	5'- CGGCGGCGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>BTBD7</i>	87	-87	85	5'- CGGCGGCGGCGGCGG UGG-3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>C11orf87</i>	11	-93	91	5'-CGAAGG CGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>C9orf91</i>	10)	-91	89	5'-CCGGGGUGG CGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>CACNA1A</i>	158	-87	85	5'-UCAG CGGCGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUU-CCGCCACCGCCCC-5'
<i>CADM4</i>	27	-87	85	5'- CGGCGGCGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>CAMK4</i>	90	-87	85	5'-CGCGGG CGGCGGCGG UGG-3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>CARM1</i>	12	-87	85	5'-CAG CGGCGGCGGCGGCGG -3'

				3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>CBFB</i>	39	-93	91	5'-CUGAGG CGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'
<i>CBL</i>	14	-89	87	5'-CCGG CGGCGGCGGCGG CG-3' 3'-GGUU-CCGCCACCGCCCC-5'
<i>CCDC93</i>	33	-87	85	5'- CGGCGGCGGCGGCGGCGG -3' 3'-GGUUCCGCCACCGCC-CC-5'

Зерттеу нәтижелері бойынша, miR-4258 микроРНК молекуласының *ADARB1*, *C11orf87* және *CBFB* гендерінің CGG қайталану тізбектерімен байланысу сайттарының бос энергиясы -93 кДж/мольға тең болды. *ADARB1* генінде CGG тринуклеотидті қайталымдары 15 және 62 қайталанатын нт тізбегі арасында орналасқан және miR-4258-ның осы аралықта байланысатын сайттары анықталды. Адамдарда ADAR (adenosine deaminase acting on RNA) ферменттерінің үш түрі, яғни *ADAR1*, *ADAR2* және *ADAR3* анықталған. Қос тізбекті РНК-ға тән аденозиндеаминаза ферменттерінің тобы ADAR тұқымдасының гендерімен кодталған. Барлық ADAR деаминаза домені және бірнеше қос тізбекті РНК байланыстырушы домендер бар. *ADARB1* гені негізінен орталық жүйке жүйесінде экспрессияланатын, нейротрансмиттердің төменгі ағынын реттеуге қатысатын РНК өңдеуші ферментті кодтайды [275, 276]. *C11orf87* және *CBFB* гендерінің мРНК тізбектерімен miR-4258 байланысу орындары CGG қайталанатын тринуклеотидтер тізбегінде 11 және 39 нт-тен басталады және олардың бос байланыс энергиясы -93 кДж/мольге тең. *C11orf87* генінің экспрессиясы адамның миында басқа мүшелерге қарағанда жоғары экспрессиялатыны анықталған (RPKM 7.9). Ал, *CBFB* генінің экспрессиясы бірнеше құрылымдарда, соның ішінде ас қорыту жүйесінде, мида, несеп-жыныс жүйесінде байқалған (the human protein atlas). Сонымен қатар, *ARHGEF7*, *BCR*, *BRSK2* және *C9orf91* гендерінің мРНК тізбектерімен miR-4258 молекуласының байланысу сайттарының бос байланыс энергиясы -91 кДж/моль және $\Delta G/\Delta G_m$ мәндері 89%-ға тең болғанын көрсетті.

Кесте 14 - Гендердің негізінде түзілетін мРНК-ның 5'-UTR аймақтарындағы GCC тринуклеотидті қайталанатын тізбектерімен miR-3960 молекуласының байланысу сайттары

Ген	Байланысу сайтының басталуы	ΔG , кДж/моль	$\Delta G/\Delta G_m$, %	МикроРНК-ның мРНК-мен байланысу схемалары
<i>ABCC1</i>	31	-116	93	5'-CCCUGC GCCGCCGCCGCCGCC -3' 3'-GGGG-GCGGAGGCGGCGGCGG-5'
<i>ABCD3</i>	46	-114	91	5'- GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC -3'

				3'-GGG-GGCGGAGGCGGCGGCGG-5'
<i>AFF2</i>	14	-110	88	5'-GCCGCU GCCGCCGCCGCCGCC -3' 3'-GGG-GGCGGAGGCGGCGGCGG-5'
<i>ANKH</i>	34	-112	89	5'-CCUUCU GCCGCCGCCGCCGCC -3' 3'-GGG-GGCGGAGGCGGCGGCGG-5'
<i>ANKRD13D</i>	19	-108	86	5'-CCU GCCGCC GC GCU GCCGCC -3' 3'-GGG-GGCGGAGGCGGCGGCGG-5'
<i>BCL11A</i>	177	-112	89	5'-CGUCCGCC GCCGCCGCCGCC -3' 3'-GGGGGCGGA-GGCGGCGGCGG-5'
<i>BCL2L11</i>	61	-110	88	5'-GCCGCU GCCGCCGCCGCCGCC -3' 3'-GGG-GGCGGAGGCGGCGGCGG-5'
<i>BLMH</i>	182	-116	93	5'-CUCCCC GCCGCCGCCGCCGCC -3' 3'-GGGGG-CGGAGGCGGCGGCGG-5'
<i>C4orf19</i>	73	-108	86	5'-GACCCC GCCGCCGCCGCCGCC -3' 3'-GGGGG-CGGAGGCGGCGGCGG-5'
<i>CA10</i>	772	-110	88	5'-GCUGCC GCCGCCGCCGCCGCC -3' 3'-GGG-GGCGGAGGCGGCGGCGG-5'

14-ші кестеден miR-3960 микроРНК молекуласының *ABCC1*, *ABCD3*, *AFF2*, *ANKH*, *ANKRD13D*, *BCL11A*, *BCL2L11*, *BLMH*, *C4orf19* және *CA10* гендерінің мРНК-мен байланысу сайттарының бос энергиясы -108 кДж/мольден жоғары екенін және $\Delta G/\Delta G_m$ мәндері 86-91%-ға тең болғанын көруімізге болады. miR-3960 - *ABCC1* және *BLMH* гендерінің мРНК-ның GCC тринуклеотидті қайталым тізбектерімен -116 кДж/моль мәнде байланысу арқылы ең жоғарғы көрсеткішке ие болды. Ал miR-3960 және *ABCC1* генінің байланысу орындары 31-57 нт, және *BLMH* генімен байланысу орындары 182-211 нт тізбектері аралығында болды. Алдыңғы зерттеулерде *ABCC1* гені бойынша, *ABCC1* ақуызымен мидағы амилоидты бета (А β) арасындағы ықтимал байланыс бар екенін көрсеткен [277]. *ABCC1* тасымалдаушысы А β тасымалдауға және *in vivo* жинақтауға әсер ететінін анықтаған және мидағы А β протеостазды реттеудің жаңа нысаны деп санаған. Дегенмен, нейрондардағы *ABCC1* генінің ролі нақты белгісіз [278]. *BLMH* гені Альцгеймер және ГА байланысты болды [279], яғни *BLMH* амилоидты прекурсорлық ақуызды амилоидты бетаға (А β) өңдеуге және одан әрі А β өңдеуге қабілетті екені анықталған [280]. *BLMH* гені ГА патогенезінің маңызды медиаторлары болып саналатын гентингтиннің N-терминалды фрагменттерін генерациялау мүмкіндігіне ие. Сонымен қатар, *BLMH* гені адам миының қыртыстарында да табылған [281].

Келесі, miR-3960 және *ABCD3* генінің мРНК-мен әрекеттесу энергиясының $\Delta G/\Delta G_m$ мәндері 91%, байланысу бос энергиясы -114 кДж/моль мәнін көрсетті [282]. *ABCD3* генінің мутациясы мидағы нейрондық миграцияның ақауларымен

байланысты Зеллвегер синдромын тудырады. Дегенмен, кейбір зерттеулер *ABCD3* пероксисомалық биогенезбен байланысы жоқ екенін және бұл синдроммен мүлдем байланысты емес екені де жариялаған [283].

Кесте 15 - Гендердің негізінде түзілетін мРНК-ның 5'-UTR және 3'-UTR аймақтарындағы CUG тринуклеотидті қайталанатын тізбектерімен miR-211-3p және miR-3155b молекулаларының байланысу сайттары

Ген	МикроРНК	Байланысу сайтының басталуы	ΔG , кДж/моль	$\Delta G/\Delta G_m$, %	МикроРНК-ның мРНК-мен байланысу схемалары
<i>ACACA</i>	miR-211-3p	61	-101	85	5' - GCGCGC CUGCUGCUG UCCCCGU - 3' 3' - CGUGGGGA - AACGACAGGGACG - 5'
<i>ANKRD13D</i>	miR-3155b	2056	-87	85	5' - UCU CUGCUGCUG AGCUUGG - 3' 3' - AGGG - UGACGUCUCGGACC - 5'

Зерттеу нәтижесі бойынша, miR-211-3p және miR-3155b молекулаларының *ACACA*, *ANKRD13D* гендерінің мРНК-мен 5' және 3' UTR аймақтарында -101 және -87 кДж/моль бос энергияда байланысу сайттарын анықталды (кесте 15).

miR-4258 молекуласының 22 гендердің мРНК-мен өзара байланыстары арасында -87 кДж/мольден -93 кДж/мольге дейін, $\Delta G/\Delta G_m$ мәні 85%-дан 91%-ға дейінгі мәнде байланысу сайттары анықталды. Сонымен қатар, 10 гендердің мРНК-мен miR-3960 микроРНК молекуласының байланысу сайттары -108 кДж/мольден -116 кДж/мольге дейін, $\Delta G/\Delta G_m$ мәні 86% - 93%, miR-211-3p және miR-3155b молекуласымен байланысқан гендердің бос байланысу энергиясы - 101 кДж/моль/-87 кДж/моль, $\Delta G/\Delta G_m$ мәні 85% құрады.

Қорытындылай келе, MirTarget бағдарламасы арқылы алынған микроРНК молекулаларының полиглутаминді емес тринуклеотидті бұзылысты гендердің мРНК-мен өзара байланысу сайттарының нәтижелері кейбір жүйке жүйесі ауруларының молекулалық әдістерін жасау үшін, алдағы зерттеу жұмыстарында маңызды өз үлесін тигізуі мүмкін екендігін аңғартады.

3.2.1 Гендердің негізінде түзілетін мРНК-ның CDS және UTR аймақтарындағы тринуклеотидті қайталану тізбектерімен жаңа (novel) микроРНК-ның өзара әрекеттесу ерекшеліктерін анықтау

Ғылыми зерттеулерде маңызды ресурс ретінде пайдаланылатын miRBase биологиялық деректер базасында қазіргі таңда 3000-ға жуық микроРНК молекулалары белгілі. Адам геномында микроРНК молекулаларының нақты саны әліде болса белгісіз. Осы мақсатта көптеген зерттеу жұмыстары жүргізілуде; мысалы *Londin et al., (2015)* [258] зерттеу жұмыстарында адамның

ұлпаларына тән 3707 микроРНК молекулаларын анықтады. Бұл микроРНК молекулалары miRBase базасына енгізілмегендіктен, және олардың гендердің мРНК-мен өзара байланысуы туралы аз мәліметтер болуына сәйкес, зерттеу нәтижелеріміздің осы тарауында оларды жаңа (novel) микроРНК молекулалары деп қарастырдық. MirTarget бағдарламасын пайдалана отырып, 3707 жаңа микроРНК молекулаларының нуклеотидті қайталымдары бар адам гендерінің мРНК-мен өзара байланысу сайттарын анықтадық.

Компьютерлік бағдарламаның есептеу нәтижесі бойынша, *ATXN2*, *FMN2*, *IRS1*, *MN1* гендерінің мРНК-ның CDS аймақтарындағы CAG, және *ADRBK1*, *B4GALT2*, *BRSK2*, *C11orf87*, *CARM1*, *CBL*, *CCDC93* және *FMR1* гендерінің мРНК-ның 5'UTR-дегі CGG тринуклеотидті қайталымдары -121-ден -123 кДж/мольге дейінгі бос энергия мәнінде ID00372.5p-miR мен ID01508.5p-miR байланысу нысандары болды. Сондай-ақ, ID00296.3p-miR және ID01702.3p-miR - *BLMH* және *C4orf19* гендерінің мРНК-ның 5'UTR-де CCG тринуклеотидті қайталымдарымен жоғары -148 кДж/моль бос энергия мәнінде байланысты. Ал, ID00930.3p-miR, ID00457.3p-miR және ID00522.5p-miR - *ATP6V0B*, *C15orf39* және *DMPK* гендерінің мРНК-ның 3'UTR аймақтарында CUG қайталым тізбектерімен -118 кДж/мольден -123 кДж/мольге дейінгі байланысу сайттары табылды (кесте 16).

Кесте 16 - МикроРНК-ның гендердің негізінде түзілетін мРНК-ның тринуклеотидті қайталымдарымен өзара байланысу сайттарының сипаттамалары

МикроРНК	Ген	Байланысу сайтының басталуы	Байланысу аймағы	ΔG , кДж/моль	$\Delta G/\Delta G_m$, %	МикроРНК ұзындығы, нт	Нт қайталым
ID00372.5p-miR	<i>ATXN2</i>	654	CDS	-121	89	24	CAG
	<i>FMN2</i>	836	CDS	-123	90	24	CAG
	<i>IRS1</i>	2085	CDS	-121	89	24	CAG
	<i>MN1</i>	1861	CDS	-121	89	24	CAG
ID01508.5p-miR	<i>ADRBK1</i>	220	5'UTR	-123	85	23	CGG
	<i>B4GALT2</i>	137	5'UTR	-123	85	23	CGG
	<i>BRSK2</i>	103	5'UTR	-123	85	23	CGG
	<i>C11orf87</i>	17	5'UTR	-123	85	23	CGG
	<i>CARM1</i>	15	5'UTR	-123	85	23	CGG
	<i>CBL</i>	15	5'UTR	-123	85	23	CGG
	<i>CCDC93</i>	33	5'UTR	-123	85	23	CGG
	<i>FMR1</i>	101	5'UTR	-123	85	23	CGG
ID00296.3p-miR	<i>BLMH</i>	184	5'UTR	-148	94	25	CCG
	<i>C4orf19</i>	75	5'UTR	-148	94	25	CCG
ID01702.3p-miR	<i>BLMH</i>	184	5'UTR	-148	98	24	CCG
	<i>C4orf19</i>	75	5'UTR	-148	98	24	CCG
ID00930.3p-miR	<i>ATP6V0B</i>	901	3'UTR	-118	86	22	CUG
ID00457.3p-miR	<i>C15orf39</i>	4049	3'UTR	-118	87	22	CUG
ID00522.5p-miR	<i>DMPK</i>	2310	3'UTR	-123	87	23	CUG

Бұл гендердің ішінде *ATXN2*, *FMN2*, *MN1*, *ADRBK1*, *BRSK2*, *C11orf87*, *FMR1*, *BLMH* және *DMPK* гендерінің жүйке жүйесі бұзылыстарымен ассоциациялары туралы деректер табылды (кесте 17). Мысалы, *ATXN2* генінің

кодтау аймақтарындағы CAG қайталымының шамадан тыс санының артуы 2-ші типті жұлын церебеллярлы атаксияның және амиотрофиялық бүйірлік склероз сияқты аурулардың дамуына себепші болады [54].

Кесте 17 - *ATXN2*, *FMN2*, *MN1*, *ADRBK1*, *BRSK2*, *C11orf87*, *FMR1*, *BLMH* және *DMPK* гендерінің организмдегі функциялары және олардың жүйке жүйесі ауруларымен байланысы

Ген	Функциясы	Ауру аты	PMID
<i>ATXN2</i>	Атаксин-2 әртүрлі жасушалық жолдарда, соның ішінде мРНҚ-ның жетілуінде, трансляциясында және эндоцитозда маңызды рөл атқарады	2-ші типті жұлын церебеллярлы атаксия, амиотрофиялық бүйірлік склероз	27531668 25148523
<i>FMN2</i>	Нейрондардың қозғалысы немесе дифференциациясында маңызды рөл атқарады	Ақыл-ой кемістігі, Альцгеймер ауруы	3022716828 768717
<i>MN1</i>	Эмбриогенез кезінде <i>MN1</i> бас сүйекте қабықшалы сүйектердің түзілуінде негізгі рөл атқарады	Ақыл-ой кемістігі, С-терминалды синдромы	1587029231 834374
<i>ADRBK1</i>	Жасушалық функцияларда шешуші рөл атқарады, соның ішінде жасуша пролиферациясы, дифференциациясы және миграциясы	Жүрек ауруы және Альцгеймер ауруы	2527997030 463058
<i>BRSK2</i>	Синапстық көпіршіктердің таралуында, синапс пен нейрондық поляризацияның дамуында үлкен рөл атқарады	Аутизм, туберозды склероз, дамудың кешігуі және ақыл-ой кемістігі	3448725 30879638
<i>C11orf87</i>	Ми тінінде экспрессияланады, сонымен қатар нейрондық интегралдық мембраналық ақуыз 1 деп те аталады	Шизофрения	31959813 31959813
<i>FMR1</i>	<i>FMR1</i> гені FMRP-құрылымдық модульдерден тұратын амин терминалды доменімен, Agenes/Tudor екі доменінің тандемдік тізбегін кодтайды	Фрагиль-Х синдромы	29178241 28176767
<i>BLMH</i>	Жаңа туған нәрестелердің өмір сүруінде және эпидермистің тұтастығын сақтауда маңызды рөл атқарады	Альцгеймер ауруы	10200322 28781776
<i>DMPK</i>	Бұлшықет, жүрек және ми жасушаларында үлкен рөл атқарады	Қаңқа бұлшықеттерінің жүйке-бұлшықет және миотендинозды түйіндері, миотоникалық дистрофия	20301344 8036515
Ескерту: [PMID] - әрбір басылымға берілген бірегей сәйкестендіру нөмірі.			

ATXN2 генінің мРНҚ-ның 654 нт пен 677 нт аралығында CAG қайталымдары бар тізбектерімен ID00372.5p-miR микроРНҚ молекуласының $\Delta G/\Delta G_m$ 89% өзара байланысу сайттары табылды. Ал, *FMN2* және *MN1* гендерінің мРНҚ-ның CDS аймағында CAG қайталымды тізбектерімен ID00372.5p-miR микроРНҚ молекуласы арасында 836 және 1861 нт-те байланысу сайттары басталады (сурет 8). *FMN2* гені нейрондардың қозғалысы немесе дифференциациясында маңызды рөл атқарады, және оның бұзылысы ақыл-ой кемістігі, есте сақтау қызметі және Альцгеймер ауруларымен байланысты [284, 285]. Сондай-ақ, жақында жүргізілген зерттеулер *FMN2* гені адамның және тышқандардың гиппокамптық нейрондарында жоғары деңгейде экспрессияларын анықтаған [286]. Адамның 22 хромосомасында орналасқан *MN1* гені алғаш рет 1995 жылы t(4;22) (p16;q11) транслокациялық менингиомасы бар науқастан клондалған, бұл геннің генетикалық модификациясы ақыл-ой кемістігімен байланысты болған [287, 288].



Сурет 8 - *ATXN2*, *FMN2* және *MN1* гендерінің мРНҚ-ның CDS аймақтарында ID00372.5p-miR-мен байланысу сайттарының кодталған олигопептидтері мен схемалары.

Келесі 9-шы суреттен төрт гендердің мРНҚ-ның (*ADRBK1*, *BRSK2*, *C11orf87* және *FMR1*) 5'UTR-де CGG тринуклеотидті қайталанатын аймақтарында ID01508.5p-miR микроРНҚ молекуласы үшін байланысу нысаны болып табылатынын көруге болады. *ADRBK1* - G ақуызымен байланысқан рецепторлық киназа тобының мүшесін кодтайды. Кодталған ақуыз бета-адренергиялық рецепторды, сондай-ақ басқа субстраттардың кең ауқымын, соның ішінде GPCR емес жасуша бетінің рецепторларын, цитоскелеттік,

бойынша, ID00372.5p-miR, ID01508.5p-miR, ID00296.3p-miR, ID01702.3p-miR және ID00522.5p-miR микроРНК молекулаларының *ATXN2*, *FMN2*, *MN1*, *ADRBK1*, *BRSK2*, *C11orf87*, *FMR1*, *BLMH* және *DMPK* гендернің тринуклеотидті қайталанатын тізбектерімен жоғары бос энергияда (-121 кДж/мольден -148 кДж/мольге дейін) ассоциациялары анықталды. Бұл анықталған жаңа микроРНК молекулалары және олардың нысана гендерімен өзара ассоциациялары тринуклеотидті қайталымды ауруларды зерттеуде бірыңғай деректер базасы ретінде жаңа зерттеулерге жол ашады.

3.3 Гендердің негізінде түзілетін мРНК-ның ди нуклеотидті қайталану тізбектерімен микроРНК-ның өзара әрекеттесу ерекшеліктерін анықтау

Организмде динуклеотидті қайталым (ДҚ) сандарының шамадан тыс артуы тринуклеотидті қайталымдардың артуынан пайда болатын аурулар сияқты кейбір әлеуметтік маңызы бар ауруларға алып келуі мүмкін. Сондықтан, бұл бөлімде біз микроРНК молекулаларының нейродегенеративті, онкологиялық және диабеттік аурулармен байланысы бар гендердің мРНК-ның ДҚ тізбектерімен байланысын сипаттадық.

Нейродегенеративті бұзылыстармен байланысы бар гендердің мРНК-ның GU және AC динуклеотидті қайталанатын тізбектерімен микроРНК-ның өзара әрекеттесуі

Зерттеу барысында miR-466, ID00436.3p-miR, miR-574-5p және ID00470.5p-miR нейродегенеративті бұзылысты аурулардың дамуымен байланысы бар 15 геннің мРНК-ның 3'UTR аймақтардағы GU және AC динуклеотидті қайталанатын тізбектерімен байланысу сайттары анықталды (кесте 18).

Кесте 18 - Нейродегенеративті аурулармен байланысы бар гендердің мРНК-ның 3'UTR аймақтарындағы GU және AC динуклеотидті қайталымдарымен микроРНК-ның өзара әрекеттесу сипаттамалары

Ген	МикроРНК	Байланысу сайтының басталуы	ΔG , кДж/моль	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Нт қайталым	Ауру аты [PMID]
<i>ADCYAP1R1</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	3844÷3854 (6) 3844÷3854 (6)	-106 -104	91 89	GU	Аутизм спектрінің бұзылуы [30556326]; Паркинсон ауруы [29230633]; Шизофрения [28125634]; Депрессиялық бұзылулар [23280952]
<i>BACH1</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	4257÷4267 (6) 4257÷4267 (6)	-106 -104	91 89	GU	Альцгеймер ауруы [15068237]
<i>CACNG8</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	6808÷6818 (6) 6808÷6818 (6)	-106 -104	91 89	GU	Шизофрения [27102562]
<i>CD2AP</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	2830÷2848 (10) 2830÷2848 (10)	-106 -104	91 89	GU	Психикалық депрессия [28630404]; Шизофрения, Альцгеймер ауруы [30126816]
<i>CD36</i>	miR-466	3533÷3539 (4)	-106	91	GU	Шизофрения [22765916]

	ID00436.3p-miR	3533÷3541 (5)	-104	89		
<i>HPS4</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	3985÷3999 (8) 3985÷4001 (9)	-106 -104	91 89	GU	Шизофрения [24168225]
<i>PCK1</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	2391÷2401 (6) 2391÷2403 (7)	-106 -104	91 89	GU	Шизофрения [18460190]
<i>SAMD4A</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	4192÷4202 (6) 4192÷4204 (7)	-106 -104	91 89	GU	Шизофрения [27846195]
<i>SH3PXD2A</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	8610÷8616 (4) 8610÷8616 (4)	-106 -104	91 89	GU	Шизофрения [24936775]
<i>VAPB</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	2524÷2536 (7) 2524÷2536 (7)	-106 -104	91 89	GU	Амиотрофиялық бүйірлік склероз [29628370]; Шизофрения [19165527]
<i>AMOTL1</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	6023÷6037 (8) 6023÷6037 (8)	-113 -108	93 89	AC	Шизофрения [22440650]; Альцгеймер ауруы [27075728]
<i>BTBD9</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	5797÷5821 (13) 5797÷5821 (13)	-113 -108	93 89	AC	Шизофрения [23361623]
<i>C10orf71</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	4719÷4733 (8) 4719÷4733 (8)	-113 -108	93 89	AC	Альцгеймер ауруы [26830138]
<i>DPYSL5</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	2933÷2945 (7) 2933÷2945 (7)	-113 -108	93 89	AC	Альцгеймер ауруы [31233825]; Жүйке дамуының бұзылыстары [31446906];
<i>FOXN3</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	2428÷2444 (9) 2428÷2444 (9)	-113 -108	93 89	AC	Шизофрения [21926974]
Ескерту: () - жақша ішінде микроРНК-ның байланысу сайтының санын көрсетеді; [PMID] - әрбір басылымға берілген бірегей сәйкестендіру нөмірі.						

Зерттеу нәтижелері бойынша, miR-466, ID00436.3p-miR, miR-574-5p және ID00470.5p-miR микроРНК молекулалары *ADCYAP1R1*, *BACH1*, *CACNG8*, *CD2AP*, *CD36*, *HPS4*, *PCK1*, *SAMD4A*, *SH3PXD2A*, *VAPB*, *AMOTL1*, *BTBD9*, *C10orf71*, *DPYSL5* және *FOXN3* гендерінің мРНК-ның AC және GU динуклеотидті қайталанатын тізбектерімен $\Delta G/\Delta G_m$ 89%-дан 93%-ға дейінгі мәндерде өзара әрекеттесті.

ADCYAP1R1, *BACH1*, *CACNG8*, *CD2AP*, *CD36*, *HPS4*, *PCK1*, *SAMD4A*, *SH3PXD2A* және *VAPB* гендердің мРНК-мен miR-466 және ID00436.3p-miR ассоциациялары арасындағы бос энергияларының мәндері -106 және -104 кДж/мольге тең болды. Бұл көрсеткіштер олардың микроРНК-мен тығыз байланыста екендігін және зерттеудің келесі кезеңдерінде бұл ассоциациялардың молекулалық механизмдерін, нейродегенеративті ауруларға қатысты рөлін терең зерттеуге мүмкіндік береді. Жоғарыда сипатталған кестеден байланысу сайттар (кластерлер) саны 4-тен 10-ға дейін өзгергенін көруге болады. Бұл ген экспрессиясының микроРНК молекуласына тәуелділігінің жоғарылауын көрсетеді.

miR-574-5p және ID00470.5p-miR микроРНК молекулалары *AMOTL1*, *BTBD9*, *C10orf71*, *DPYSL5* және *FOXN3* гендерінің мРНК-мен 3'UTR аймағында AC динуклеотидті қайталым тізбектерімен байланысады. Олардың өзара әрекеттесулерінің бос энергия мәндері -111 ± 3 кДж/мольге тең болды. Осы микроРНК кластерлеріндегі байланысу сайттарының саны 7-ден 13-ке дейінгі

аралықты қамтыды. Келесі 19-шы кестеде берілген схемалар микроРНК молекулаларының канондық (A-U, G-C) және канондық емес (A-C, G-U) нуклеотидтері мен олардың байланысу сайттары арасындағы толық комплементарлықты көрсетеді.

Кесте 19 - ID00436.3p-miR және ID00470.5p-miR микроРНК молекулаларының гендердің мРНК-ның 3'UTR аймақтарындағы GU және AC динуклеотидті қайталымдарымен байланысу схемалары

[illegible]

Бұл әрекеттесу сипаттамалары микроРНК молекулаларымен байланысатын мРНК арасындағы бәсекелестікті қарастыру кезінде маңызды. Зерттеу жұмысымыздың нәтижелері көрсеткендей, ID00436.3p-miR және miR-466, сондай-ақ ID00470.5p-miR және miR-574-5p микроРНК молекулалары бір кластерде байланысу үшін бәсекелеседі. Мысалы, miR-466 және ID00436.3p-miR бір геннің мРНК-мен байланысқанда miR-466 жоғары дәрежеде байланысады, өйткені, miR-466 байланысуының бос энергиясы ID00436.3p-miR микроРНК молекуласынан жоғары (-106). Сол сияқты, miR-574-5p микроРНК молекуласы нысана генінің мРНК-мен ID00470.5p-miR-ге қарағанда жақсы байланысады, өйткені мРНК-мен әрекеттесудің бос энергиясы miR-574-5p-де жоғары (-113).

Онкологиялық аурулармен байланысы бар гендердің мРНК-ның GU және AC динуклеотидті қайталанатын тізбектерімен микроРНК-ның өзара әрекеттесуі

MirTarget бағдарламасының нәтижесі бойынша, miR-466, ID00436.3p-miR, miR-574-5p және ID00470.5p-miR микроРНК молекулаларының 18 геннің мРНК-ның динуклеотидті GU және AC қайталанатын тізбектерімен байланысу сайттары анықталды. Ал, miR-574-5p және ID00470.5p-miR микроРНК молекулалары 12 геннің мРНК-мен 3'UTR аймақтарында байланысу $\Delta G/\Delta G_m$ мәндері 89-93%-ға тең болды. Бұл нысана гендер бүйрек үсті қыртысының аденомасы, нейробластома, тік ішек карциномасы, сүт безінің қатерлі ісігі, терінің қатерлі ісігі, бауыр карциномасы, ми ісіктері сияқты онкологиялық аурулардың дамуына жауапты гендер (20-шы кестенің PMID бөлігінде көрсетілген). Келесі, miR-466 және ID00436.3p-miR микроРНК молекулаларының *ABLIM1*, *BAZ2A*, *CBX3*, *CD3EAP*, *CDK6* және *REEP3* гендердің мРНК-ның 3'UTR аймақтарында GU қайталым тізбектерімен -105 ± 1 кДж/моль бос энергияда байланысу сайттары анықталды. Сонымен қатар, miR-574-5p және ID00470.5p-miR микроРНК молекулаларының *ANO8*, *ARHGAP35*, *ARRB1*, *BDH1*, *DOK6*, *E2F8*, *EHD3*, *FAM163A*, *GLI2*, *MNT*, *WNT4* және *ZRANB1* гендердің мРНК-ның 3'UTR аймақтарында AC қайталым тізбектерімен -111 ± 3 кДж/моль бос энергияда байланысу сайттары табылды (кесте 20).

Кесте 20 - Онкологиялық аурулармен байланысы бар гендердің мРНК-ның 3'UTR аймақтарындағы GU және AC динуклеотидті қайталымдарымен микроРНК-ның өзара әрекеттесу сипаттамалары

Ген	МикроРНК	Байланысу сайтының басталуы	ΔG , кДж/моль	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Нт қайталым	Ауру аты [PMID]
<i>ABLIM1</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	4473÷4499 (14) 4473÷4499 (14)	-106 -104	91 89	GU	Бүйрек үсті безінің қыртысының аденомасы [19218281]
<i>BAZ2A</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	6857÷6869 (7) 6857÷6869 (7)	-106 -104	91 89	GU	Нейробластома [30064522]
<i>CBX3</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	1307÷1313 (4) 1307÷1313 (4)	-106 -104	91 89	GU	Қатерлі ісіктер [30942427]
<i>CD3EAP</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	3087÷3093 (4) 3087÷3095 (6)	-106 -104	91 89	GU	Қатерлі ісіктер [23624123]
<i>CDK6</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	1910÷1918 (5) 1910÷1918 (5)	-106 -104	91 89	GU	Нейробластома [29073265]
<i>REEP3</i>	miR-466 ID00436.3p-miR	3839÷3857 (10) 3839÷3857 (10)	-106 -104	91 89	GU	Нейробластома [29042551]
<i>ANO8</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	4031÷4041 (6) 4031÷4041 (6)	-113 -108	93 89	AC	Сүт безінің қатерлі ісігі [20852631]
<i>ARHGAP35</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	7732÷7740 (5) 7732÷7740 (5)	-113 -108	93 89	AC	Қатерлі ісіктер [29934311]; Колоректальды карцинома [31332286]
<i>ARRB1</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	6399÷6415 (9) 6399÷6415 (9)	-113 -108	93 89	AC	Неоплазмалар [28442265]; Сүт безінің қатерлі ісігі [21497294]
<i>BDH1</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	2611÷2621 (6) 2611÷2621 (6)	-113 -108	93 89	AC	Сүт безінің қатерлі ісігі [23082721]; Қатерлі ісіктер [28025230]
<i>DOK6</i>	miR-574-5p	7831÷7851 (11)	-113	93	AC	Қатерлі ісіктер [31486300]

	ID00470.5p-miR	7831÷7851 (11)	-108	89		
<i>E2F8</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	3286÷3292 (4) 3286÷3292 (4)	-113 -108	93 89	AC	Терінің қатерлі ісігі [27452520]; Бауыр карциномасы [28284560]
<i>EHD3</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	2274÷2284 (6) 2274÷2284 (6)	-113 -108	93 89	AC	Мидың ісіктері [24306026]; Қатерлі ісіктер [31646426]; Бауыр карциномасы [28284560]
<i>FAM163A</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	2108÷2122 (8) 2108÷2122 (8)	-113 -108	93 89	AC	Қатерлі ісіктер [19671756]; Неоплазмалар, нейробластома [31496741]
<i>GLI2</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	6124÷6144 (11) 6124÷6144 (11)	-113 -108	93 89	AC	Сүт безінің қатерлі ісігі [31535669]
<i>MNT</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	4275÷4281 (4) 4275÷4281 (4)	-113 -108	93 89	AC	Сүт безінің қатерлі ісігі [16928695]; Қатерлі ісіктер [17577784]
<i>WNT4</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	1981÷1999 (10) 1981÷1999 (10)	-113 -108	93 89	AC	Сүт безінің қатерлі ісігі [30194396]; Қатерлі ісіктер, карцинома [29429512]
<i>ZRANB1</i>	miR-574-5p ID00470.5p-miR	3799÷3807 (5) 3799÷3807 (5)	-113 -108	93 89	AC	Сүт безінің қатерлі ісігі [29669287]; Бауыр карциномасы [30686098]

Ескерту: () - жақша ішінде микроРНК-ның байланысу сайтының санын көрсетеді;
[PMID] - әрбір басылымға берілген бірегей сәйкестендіру нөмірі.

Кесте 21 - ID00436.3p-miR және ID00470.5p-miR микроРНК молекулаларының гендердің мРНК-ның 3'UTR аймақтарындағы GU және AC динуклеотидті қайталымдарымен байланысу схемалары

Зерттеу нәтижесі бойынша әлеуметтік маңызы бар аурулармен, яғни нейродегенеративті, онкологиялық аурулармен қатар қант диабетімен байланысты адам гендерінің мРНК-ның динуклеотидті қайталымдарымен байланысатын микроРНК молекулаларының *in silico* болжамын көрсеттік. Алынған нәтижелердің қорытындысы бойынша микроРНК және олардың кандидат нысана гендерінің ассоциациялары нейродегенеративті, онкологиялық ауруларды және қант диабетін диагностикалау әдістерін әзірлеу үшін ұсынылуы мүмкін.

3.4 Гендердің негізінде түзілетін мРНК-ның тринуклеотидті қайталану тізбектерімен пиРНК-ның байланысу ерекшеліктері

ПиРНК молекулалары нуклеотидті қайталану сандарының артуынан және онымен байланысты патогендік механизмдерді реттеуге қатысуы мүмкін. ПиРНК молекулаларының нуклеотидті қайталымдардың бұзылысына әсер ететін нақты механизмдер туралы түсініктер аз. Сондықтан зерттеу жұмысымыздың бұл бөлігінде, пиРНК молекулаларының микроРНК қызметтерінің ұқсастығына сүйене отырып, гендердің мРНК-ның тринуклеотидті қайталым тізбектерімен байланысу сайттары анықталды.

MirTarget бағдарламасының нәтижесі бойынша, piR-32860 - *AR*, *ATN1*, *BCL6B*, *DLX6*, *E2F4*, *GLS*, *HTT*, *IRF2BPL*, *MAB21L1*, *MAML3*, *RAI1*, *SMARCA2*, *TBP*, *ZNF384* және *ZNF703* гендердің мРНК-ның CAG және CGG тізбектерімен өзара байланысу сайттары табылды (кесте 24).

Кесте 24 - piR-32860 пиРНК молекуласының гендердің мРНК-ның CAG және CGG тринуклеотидті қайталым тізбектерімен әрекеттесу схемалары

Ген, пиРНК; байланысу сайтының басталуы; бос энергияның өзгерісі (ΔG , кДж/моль); $\Delta G/\Delta G_m$, % мәні; пиРНК ұзындығы, нт	
<i>AR</i> , piR-32860, 1290**, -127, 92, 24 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' 3'-GUCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-5'	<i>AR</i> , piR-32860, 2486**, -123, 89, 24 5'-CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG-3' 3'-GUCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-5'
<i>ATN1</i> , piR-32860, 1699**, -127, 92, 24 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' 3'-GUCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-5'	<i>BCL6B</i> , piR-32860, 770**, -127, 92, 24 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' 3'-GUCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-5'
<i>DLX6</i> , piR-32860, 76**, -123, 89, 24 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAA-3' 3'-GUCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAA-5'	<i>E2F4</i> , piR-32860, 984**, -127, 92, 24 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' 3'-GUCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-5'
<i>GLS</i> , piR-32860, 57*, -127, 92, 24 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' 3'-GUCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-5'	<i>HTT</i> , piR-32860, 203**, -127, 92, 24 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' 3'-GUCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-5'
<i>IRF2BPL</i> , piR-32860, 1173**, -121, 87, 24 5'-CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG-3' 3'-GUCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-5'	<i>MAB21L1</i> , piR-32860, 343*, -127, 92, 24 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' 3'-GUCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-5'
<i>MAML3</i> , piR-32860, 2214**, -123, 89, 24 5'-CAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' 3'-GUCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-5'	<i>RAI1</i> , piR-32860, 1301**, -127, 92, 24 5'-CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' 3'-GUCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-5'

<i>SMARCA2</i> , piR-32860,754**, -123,89,24 5'-CAGCAGCAGCA ACAGCAGCAGCAG -3' 3'-GUC AUCGUCGUCGUCGCGCCGUC -5'	<i>TBP</i> , piR-32860,469**, -127,92,24 5'-CAGCAGCAGCAGCAGC AGCAGCAGCAG -3' 3'-GUC AUCGUCGUCGUCGCGCCGUC -5'
<i>ZNF384</i> , piR-32860,1667**, -118,86,24 5'-CAGCAGCAGCAGC GGCAGCAGUGG -3' 3'-GUC AUCGUCGUCGUCGCGCCGUC -5'	<i>ZNF703</i> , piR-32860,242**, -129,93,24 5'-CAG CGGCAGCGGCAGCGCGCGCGG -3' 3'-GUC AUCGUCGUCGUCGCGCGCGUC -5'
Ескерту: Қалың кара шрифт канондық емес А және С, G және U жұптарының нуклеотидтерін көрсетеді; Байланысу аймағы бойынша: * - 5'UTR, ** - CDS аймағында	

Сонымен қатар, *BCL11A*, *BCL2L11*, *CASKIN1*, *DLX6*, *DMRTA2*, *FOXE1*, *FOXF2*, *GNB2*, *HTT*, *IRF2BPL*, *KIF3B*, *MNX1*, *NDRG3*, *NKX2*, *SBF1*, *SMAD9*, *WBP4*, *ZIC5*, *ZNF703* және *ZSWIM6* гендердің мРНК-ның 5'UTR және CDS аймақтарында GCC тринуклеотидті қайталанатын тізбектерімен piR-28515 өзара байланысу сайттарын келесі 25-ші кестеде берілген схемалардан көруімізге болады.

Кесте 25 - piR-28515 пиРНК молекуласының гендердің мРНК-ның GCC тринуклеотидті қайталаым тізбектерімен әрекеттесу схемалары

Ген, пиРНК; байланысу сайтының басталуы; бос энергияның өзгерісі (ΔG , кДж/моль); $\Delta G/\Delta G_m$, % мәні; пиРНК ұзындығы, нт	
<i>BCL11A</i> , piR-28515,186*, -138,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'	<i>BCL2L11</i> , piR-28515,91*, -140,90,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCACUACCACC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'
<i>CASKIN1</i> , piR-28515,4068**, -138,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'	<i>DLX6</i> , piR-28515,132**, -138,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'
<i>DMRTA2</i> , piR-28515,1505**, -138,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'	<i>FOXE1</i> , piR-28515,1165**, -138,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'
<i>FOXF2</i> , piR-28515,211**, -138,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'	<i>GNB2</i> , piR-28515,81*, -138,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'
<i>HTT</i> , piR-28515,262**, -140,90,27 5'-GCCACCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'	<i>IRF2BPL</i> , piR-28515,1367**, -137,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'
<i>KIF3B</i> , piR-28515,65*, -138,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'	<i>MNX1</i> , piR-28515,679**, -133,29,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCU-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'
<i>NDRG3</i> , piR-28515,25*, -138,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'	<i>NKX2</i> , piR-28515,1016**, -138,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'
<i>SBF1</i> , piR-28515,42*, -138,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'	<i>SMAD9</i> , piR-28515,57*, -138,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'
<i>WBP4</i> , piR-28515,79*, -138,89,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC-3'	<i>ZIC5</i> , piR-28515,1488**, -140,90,27 5'-GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCACC-3'

 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'	 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'
ZNF703, piR-28515,1713 **, -138,89,27 5'-GCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'	ZSWIM6, piR-28515,508**, -133,86,27 5'-GCCCGCCCGCCCGUGCCGCCCGCCCGCC-3' 3'-UGGUGGUGGUGGCGGUGGUGGUGGUGG-5'
Ескерту: Қалың қара шрифт канондық емес А және С, G және U жұптарының нуклеотидтерін көрсетеді; Байланысу аймағы бойынша: * - 5'UTR, ** - CDS аймағында	

Кесте 26 - piR-65782 пиРНҚ молекуласының гендердің мРНҚ-ның GCC тринуклеотидті қайталым тізбектерімен әрекеттесу схемалары

Ген, пиРНҚ; байланысу сайтының басталуы; бос энергияның өзгерісі (ΔG, кДж/моль); ΔG/ΔGm, % мәні; пиРНҚ ұзындығы, нт	
BCL11A, piR-65782,185*, -140,95,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'	BCL2L11, piR-65782,54*, -131,89,24 5'-CGCCGCGUGCCGCGUGCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'
CASKIN1, piR-65782,4070**, -140,96,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'	DLX6, piR-65782,134**, -140,96,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'
DMRTA2, piR-65782,1504**, -140,95,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'	FOXEL1, piR-65782,1173**, -140,96,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'
FOXF2, piR-65782,210**, -140,96,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'	GNB2, piR-65782,77*, -140,96,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'
HTT, piR-65782,261**, -142,97,24 5'-CGCCACCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'	IRF2BPL, piR-65782,1363**, -135,92,24 5'-CGUGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'
KIF3B, piR-65782,67*, -140,96,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'	MNX1, piR-65782,678**, -140,96,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'
NDRG3, piR-65782,18*, -140,95,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'	SBF1, piR-65782,44*, -140,96,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'
SMAD9, piR-65782,59*, -140,95,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'	WBP4, piR-65782,75*, -131,89,24 5'-UGCUGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'
ZIC5, piR-65782,1487**, -140,96,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'	ZNF703, piR-65782,1715**, -140,96,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'
ZSWIM6, piR-65782,522**, -140,96,24 5'-CGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGC-3' 3'-GUGGUGGCGGUGGCGGCGGCGGCG-5'	
Ескерту: Қалың қара шрифт канондық емес А және С, G және U жұптарының нуклеотидтерін көрсетеді; Байланысу аймағы бойынша: * - 5'UTR, ** - CDS аймағында	

Жоғарыдағы кестеден көріп тұрғанымыздай piR-65782 пиРНҚ молекуласы *BCL11A*, *BCL2L11*, *CASKIN1*, *DLX6*, *DMRTA2*, *FOXE1*, *FOXF2*, *GNB2*, *HTT*, *IRF2BPL*, *KIF3B*, *MNX1*, *NDRG3*, *SBF1*, *SMAD9*, *WBP4*, *ZIC5*, *ZNF703* және *ZSWIM6* гендерінің мРНҚ-ның CGC тринуклеотидті қайталымдарымен байланысу сайттары анықталды (кесте 26).

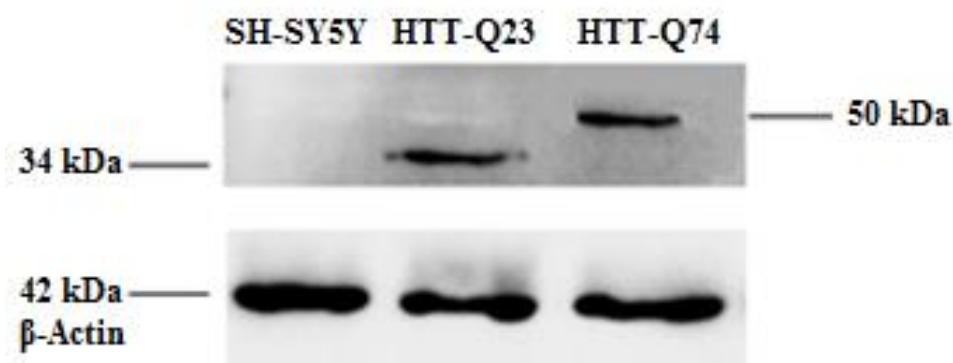
MirTarget бағдарламасының есептеу нәтижелері бойынша, бір пиРНҚ молекуласының бірнеше гендермен байланысу сайттары табылды. Сонымен қатар, бір ген бірнеше пиРНҚ молекулаларының байланысу нысаны бола алды, нәтижесінде олардың арасында байланысу сайттары бір кластерінде байланысу үшін бәсекелестік туындайды. Көптеген пиРНҚ молекулалары үшін маңызды қасиет олардың кейбір гендермен байланысуы болып табылады. Бұл бөлімнің нәтижелері пиРНҚ молекулаларының нейродегенеративті бұзылыстардың дамуына байланысты гендердің экспрессиясын реттей алатындығын болжайды.

Нейродегенеративті аурулардың көпшілігі тұқымқуалайтын ауру болғандықтан олар адамның эмбриондық даму сатыларында жасырын басталуы мүмкін. Мысалы, қазіргі уақытта Гентингтон ауруының молекулалық механизмі түсініксіз болғанымен, негізгі екі болжамдар кездеседі, біріншісі жабайы түрдегі Htt функциясының өзгеру салдарынан, екінші мутантты Htt уыттылығының әсерінен ауру дамиды деген болжамдар бар. Өз кезегінде, жабайы түрдегі Htt эмбриональды дамуда маңызды рөл атқарады, ол антиапоптотикалық, нейрондардағы гендердің транскрипциясын және синаптикалық тасымалдануларды реттей отырып, везикулаларды тасымалдау функциясына ықпал етеді [301]. Ал, пиРНҚ молекулалары эмбриогенездің басында синтезделіп, олардың синтезі тек репродуктивті және бағаналы жасушаларда сақталады [302, 303]. Содан кейін, жасушалардың дифференциациясы кезінде пиРНҚ синтезінің төмендеуі және микроРНҚ синтезінің жоғарылауы байқалады. Сондықтан, экспрессияның пиРНҚ-ға әлсіз тәуелділігі және дифференциалданған жасушалардағы гендер үшін экспрессияның микроРНҚ -ға тәуелділігінің жоғарылауы байқалады. Бұл келтіріліп отырған болжамымыз нуклеотидті қайталымдардан туындайтын бұзылысты ауруларды зерттеуде микроРНҚ-мен қатар пиРНҚ молекулаларының қызметі эмбриондық сатыда маңызды рөл атқаруы мүмкін деген тұжырымға алып келеді.

3.5 Адамның SH-SY5Y нейробластома жасуша линиясындағы НТТ генінің қалыпты (Q23) және мутантты (Q74) полиглутамин қайталымдарының экспрессиясын талдау

SH-SY5Y жасуша линиясы нейрондарға ұқсас қасиеттерге ие, сондықтан ғылыми зерттеулерде, әсіресе нейродегенеративті ауруларды зерттеуде кеңінен қолданылатын адамның нейробластома жасушаларының линиясы болып табылады. Бұл жасушалар бастапқыда нейробластомасы бар 4 жасар қыздың сүйек кемігінің биопсиясынан алынған. SH-SY5Y жасуша линиясы Паркинсон, Альцгеймер сонымен қатар Гентингтон ауруларының патологиясының негізінде жатқан молекулалық механизмдерді зерттеуге мүмкіндік береді [255].

Зерттеу жұмысымызда SH-SY5Y жасуша линиясындағы Q23 және Q74 ақуыздарының экспрессиясы Вестерн блот көмегімен талданды. Төмендегі 12-ші суретте көрсетілгендей, Htt-ақуызының жабайы түрі Q23 шамамен 34 kDa, ал мутантты Q74 түрі 50 kDa болды. Әр үлгі үшін гельге ақуыздың бірдей мөлшері жүктелуін қамтамасыз ету үшін (loading control) β -Актин қолданылды (сурет 12). Жабайы типті және мутантты формалар арасындағы молекулалық салмақтарының айырмашылықтары мутант түріндегі ұзартылған polyQ қайталануының әсерін көрсетеді.

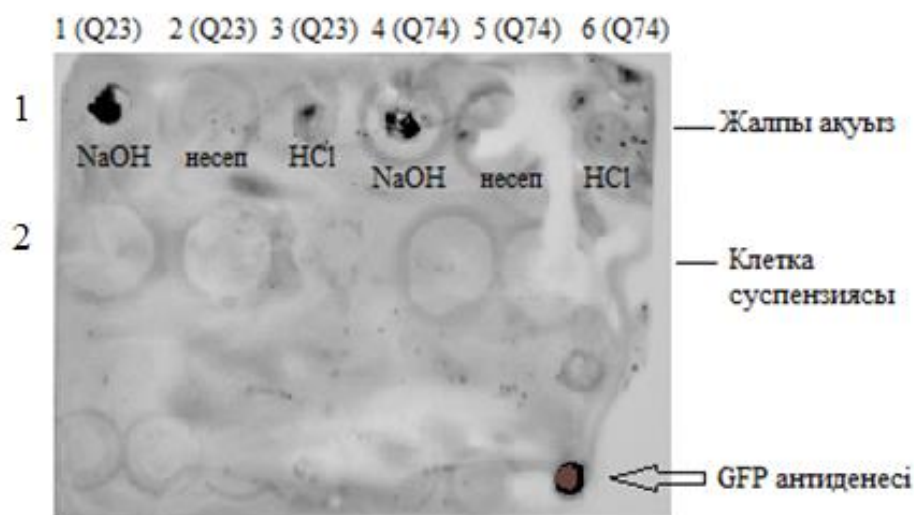


Трансфекцияланбаған SH-SY5Y жасуша линиясында жолақтар байқалмады. Ақуыз өнімдері Htt-Q23 жасуша лизаттарында 34 kDa және Htt-Q74 - 50 kDa байқалды (β -Актин ақуыздың жүктелуін қалыпқа келтіру үшін қолданылды).

Сурет 12- Htt-Q23/Q74 экспрессиясының және β -Актиннің Вестерн блот талдауы

Айта кету керек, құрамында ұзартылған полиглутаминді жолдары бар N-терминалды гентингтин фрагментінің экспрессиясы өсірілген жасушаларда ақуыз агрегаттарының түзілуіне әкеледі. Мұндай агрегаттардағы ақуыз компоненттерінің айналымын зерттеу олардың сулы ерітінділерде ерімейтіндігіне байланысты оларды анықтау қиынға түсті. Полиглутаминді агрегаттардың биохимиялық қасиеттерін зерттеу үшін *Hazeki N et al., 2000* [304] зерттеу жұмыстарына сүйене отырып, агрегаттарды әртүрлі қышқыл және сілтілермен, соның ішінде 1 N NaOH сілтісімен, несеп қышқылы (8 M urea plus) және тұз қышқылымен (1-12 N HCl) ерітуге тырыстық.

Нәтижесінде NaOH сілтісін қолданғанда Q23 және Q74 линияларында несеп және тұз қышқылдарымен салыстырғанда агрегаттардың ерігенін көрсетіп, тиімділігі жоғары екені байқалды (сурет 13). Осыған байланысты, Вестерн блотты талдау әдісінде Q74 жасуша линиясынан бөлініп алынған ақуызға 10 μ l NaOH сілтісін қосу арқылы Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad) аппаратында, 25V кернеуінде 60 минут бойы иммобилизденген PVDF мембраналарына аударылды.

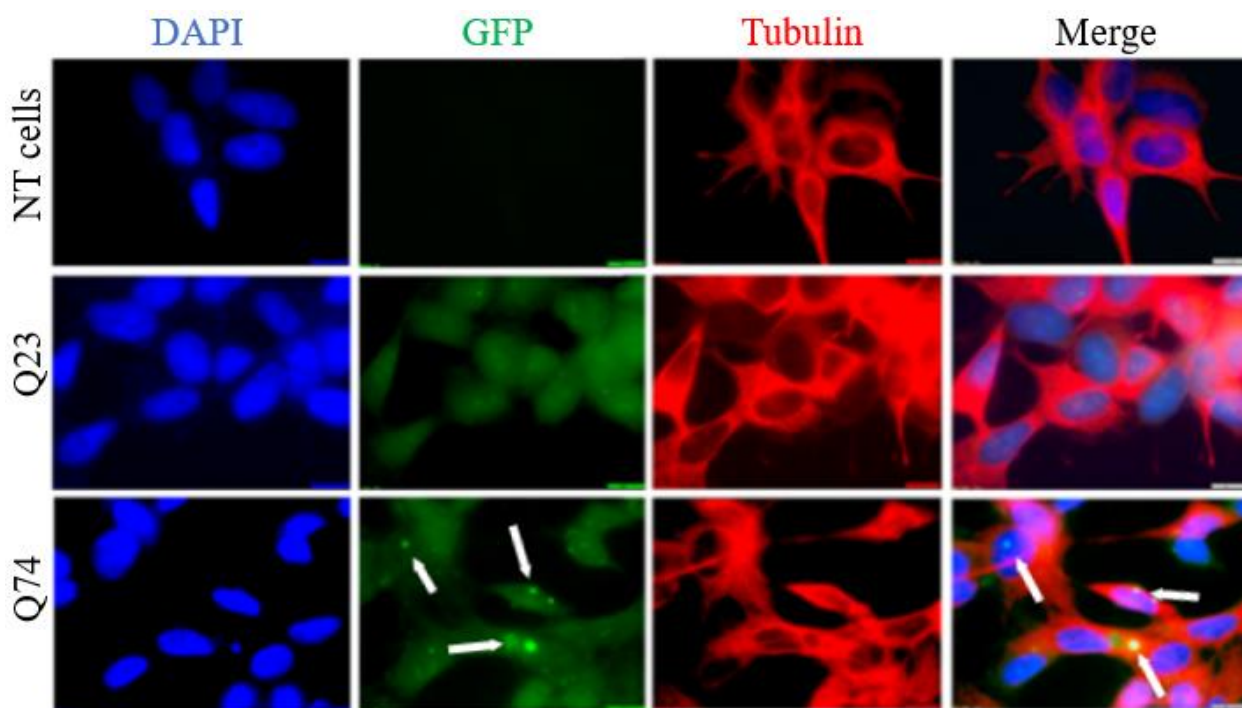


1- НТТ-Q23 және НТТ-Q74 линияларынан бөлініп алынған ақуыз (1-ші (Q23) және 4-ші (Q74) дөңгелекте қара дақтардың көрінгенін, яғни NaOH сілтісінің тиімділігін көре аламыз). 2-Теріс бақылау ретінде қолданылған клетка суспензиясы (GFP антиденесі оң бақылау ретінде қолданылды).

Сурет 13 - НТТ-Q23 және НТТ-Q74 линияларының агрегаттарын ерітуге қолданылған NaOH сілтісінің, несеп және тұз қышқылдарының дот блоттинг көрінісі

Келесі иммунофлуоресцентті бояу әдісі бастапқы (parental) SH-SY5Y, тұрақты трансфекцияланған Q23-Htt және Q74-Htt линияларында жүргізілді. Алынған нәтижелер Q74-Htt ақуызының Q23-пен салыстырғанда агрегацияға бейім екенін көрсетті. Сонымен қатар, бұл нәтижелер бойынша төмендегі 14-ші суретте көріп тұрғанымыздай Q74-Htt линиясында агрегаттардың ядроға жақын орналасқанын, ал Q23-Htt - SH-SY5Y жасушасының цитоплазмасында біркелкі таралғанын көруімізге болады (сурет 14).

Бұл ақуыз агрегаттарының әртүрлі локализациясы, әсіресе ядроға жақын орналасқан агрегаттардың болуы, генетикалық аурулардың патогенезінде маңызды рөл атқарады. Бұл Гентингтон, Паркинсон және Альцгеймер сияқты нейродегенеративті аурулардың дамуына әкелуі мүмкін.



Жасуша ядролары DAPI арқылы көк түске боялды. Ата-аналық (parental/NT cells) SH-SY5Y жасушаларында GFP белгілері анықталмады. НТТ-Q74 ядро ішінде, және ядроға жақын орналасқан агрегаттарды құрады (ақ көрсеткішпен нұсқауланған), ал НТТ-Q23 - SH-SY5Y жасушаларының цитоплазмасында біркелкі таралды (үлкейту: 100 х; 10 мкм).

Сурет 14 - Трансфекцияланбаған бастапқы SH-SY5Y, және НТТ-Q23/Q74 жасуша линияларының иммунофлуоресценциясы

Иммунофлуоресценция Гентингтон ауруын зерттеу аясында мутант гентингтин ақуыздарының экспрессиясын және орналасуын талдауды жеңілдететін әдіс болып табылады. Агрегаттар әдетте гентингтин ақуызында CAG тринуклеотидті қайталым сандарының (36-дан жоғары) шамадан тыс артуынан пайда болады. Ақуыз агрегация процесін және аурудың патологиясын түсіну үшін гентингтин ақуызының қалыпты Q23-Htt және мутантты Q74-Htt формаларының ақуыз экспрессиясының негізінде жатқан механизмдерді зерттеу өте маңызды болып табылады.

Қорытындылай келе, SH-SY5Y жасуша линиясына тұрақты трансфекцияланған НТТ-Q23 және НТТ-Q74 линияларында ақуыз экспрессиясын талдау нейродегенеративті бұзылысты аурулардың молекулалық механизмдерін зерттеуге мүмкіндік бере отырып, Гентингтон ауруын зерттеудегі құнды үлгісі болып табылады. Сонымен қатар, микроРНК экспрессиясының профилін құру мақсатында осы жасуша линиялары қолданылады. Бұл жасуша линиялары алдағы нейродегенеративті бұзылысты аурулар туралы түсінігімізді жақсартуда және терапевтік зерттеу жұмыстарында маңызды ықпалын тигізеді.

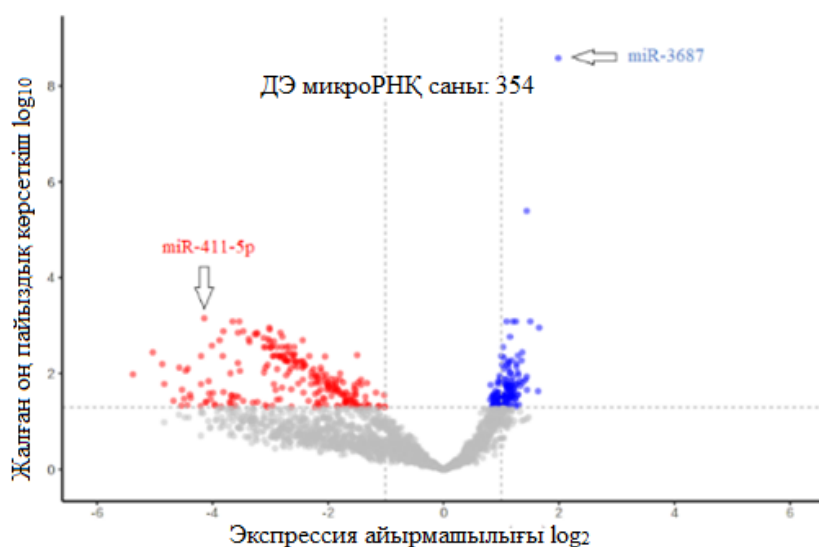
3.6 Адамның НТТ-Q23 және НТТ-Q74 жасуша линиясының үлгісіндегі микроРНК-ның экспрессиясын талдау

Адамның SH-SY5Y жасушасына трансфекцияланған қалыпты (Q23) және мутантты (Q74) жасуша линиялары арасында 2083 микроРНК молекулаларының экспрессия профилдері HTG EdgeSeq жүйесі арқылы талданды. Бұл микроРНК молекулаларының ішінен 354 микроРНК молекулалары Q23 және Q74 жасуша линияларында дифференциалды түрде экспрессияланды (ДЭ) (сурет 15). Олардың ішінде экспрессиясы 126 жоғары және 228 төмен микроРНК молекулалары анықталды ($p < 0.05$), (қосымша кесте А). МикроРНК молекулаларының басым бөлігі ГА (Q74) жасуша линиясында экспрессиясының төмендеуі байқалды. МикроРНК молекулаларының профилдері HTG EdgeSeq miRNA жүйесін қолдана отырып, МТС (multi-tissue control) бақылау техникалық көшірмелерімен бірге жасалды және үлгілердің барлығы талдаудан өтті (кесте 27).

Кесте 27 - ГА үлгілерінің бақылау және ауру түрлерінің сапасын бақылау

Үлгінің аты	ОБЗ %	СБ 0 Статус	Жалпы сандар	СБ 1 Статус	ССА	СБ 2 Статус	СБ Статус	Топ
377-A046139 (Q23)	0.19	Өтті	785965	Өтті	0.803	Өтті	Өтті	Бақылау
377-A046140 (Q23)	0.31	Өтті	714911	Өтті	0.295	Өтті	Өтті	Бақылау
377-A046141 (Q23)	0.28	Өтті	733547	Өтті	0.671	Өтті	Өтті	Бақылау
377-A046142 (Q23)	0.32	Өтті	766019	Өтті	0.65	Өтті	Өтті	Бақылау
377-A046145 (Q74)	0.27	Өтті	689284	Өтті	0.656	Өтті	Өтті	Ауру
377-A046146 (Q74)	0.37	Өтті	696576	Өтті	0.645	Өтті	Өтті	Ауру
377-A046147 (Q74)	0.34	Өтті	105697	Өтті	0.459	Өтті	Өтті	Ауру
377-A046148 (Q74)	0.41	Өтті	820913	Өтті	0.698	Өтті	Өтті	Ауру

*ОБЗ - оң бақылау зондтары; СБ - сапа бақылауы; ССА - салыстырмалы стандартты ауытқу (relative standard deviation).

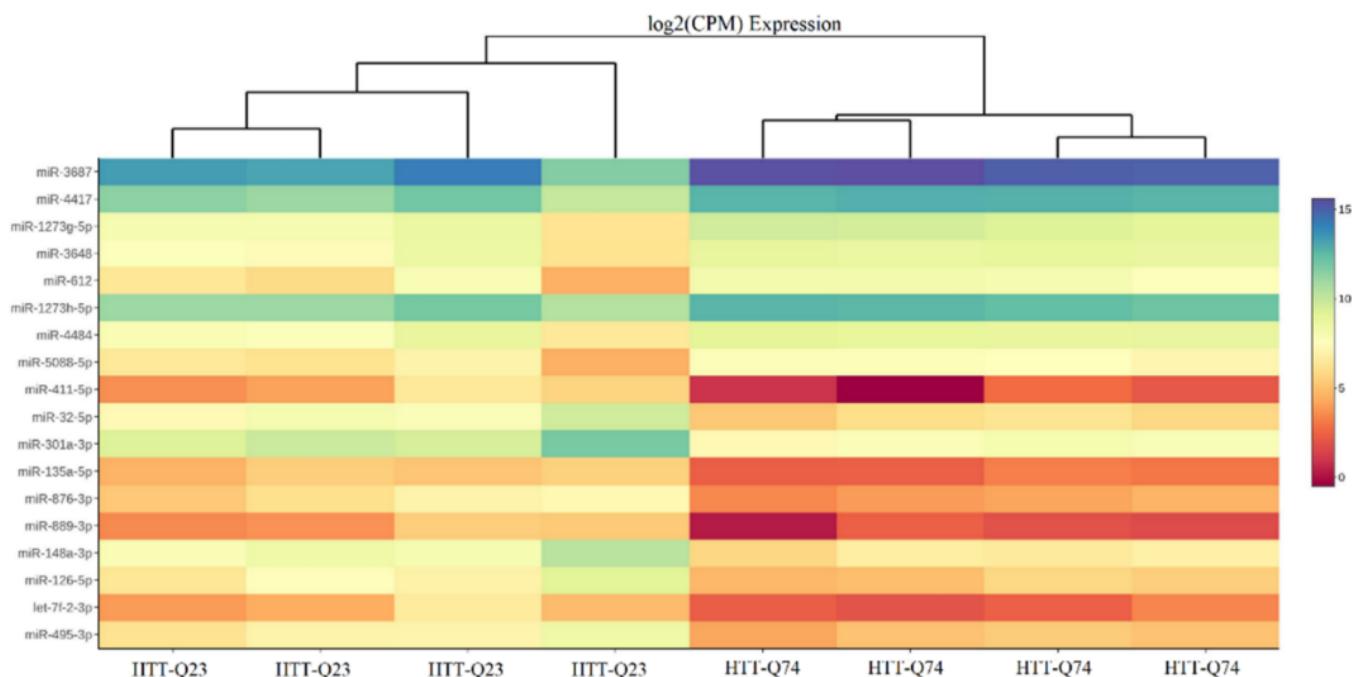


Сурет 15 - Дифференциалды түрде жоғары және төмен экспрессияланған 354 микроРНК-ның таралу аймағы (Volcano plot)

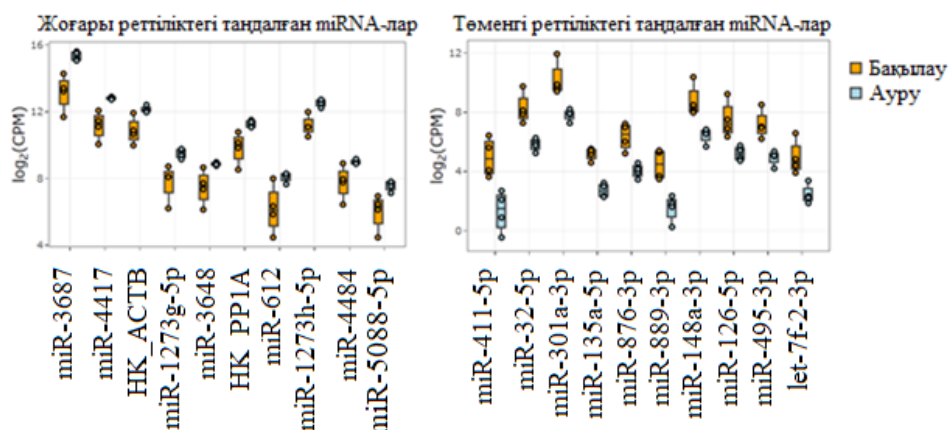
HTG EdgeSeq miRNA тұтас транскриптомды талдау жүйесі жаңа буынды секвенирлеу (NGS) көмегімен микроРНК молекулаларының экспрессиясын өлшеуге мүмкіндік берді. Бұл жүйенің арнайы HTG EdgeSeq Reveal статистикалық талдау құралы арқылы микроРНК молекулаларының экспрессия деректері талданды.

Қалыпты (Q23) және мутантты (Q74) Htt жасуша линияларында микроРНК экспрессиясының графикалық түрлі түсті картасы (heatmap) жасалды. Графикалық түрлі түсті карта экспрессия үлгілерін бір уақытта түстері арқылы деректердің графикалық көрінісін салыстырмалы түрде визуализациялау үшін берілді. Графикалық түрлі түсті картадағы көк түс жоғары, ал қызыл түс төмен экспрессияны білдіреді. Мысалы, miR-3687 микроРНК молекуласы мутантты (Q74) Htt жасуша линияларында қою көк түске боялғанын, яғни экспрессиясының жоғары, ал miR-411-5p - қою қызыл түсте экспрессиясының төмен екендігін білдіреді. Сонымен қатар, бақылау (Htt-Q23) және ауру (Htt-Q74) топпен салыстырғандағы бастапқы 18 микроРНК (top DE miRNAs) молекулаларының жоғары және төмен экспрессиялары графикалық кескінде көрсетілді (сурет 16, А, Ә).

(А)



(Ә)



Сурет 16 - (А) Дифференциалды жоғары және төмен экспрессияланған 18 микроРНК-ның графикалық түрлі түсті картасы. (Ә) МикроРНК-ның экспрессиясының бақылау (НТТ-Q23) және ауру (НТТ-Q74) топпен салыстырғандағы жоғары және төмен экспрессиялары

Сонымен қатар, төмендегі 28-ші кестеде көрсетілгендей, miR-3687, miR-4417, miR-1273g-5p, miR-3648, miR-612, miR-1273h-5p, miR-4484, miR-5088-5p, miR-504-3p және miR-4261 айтарлықтай экспрессиялары жоғары екендігі анықталды. Экспрессиялары жоғары болған микроРНК молекулаларының ішінде салыстырмалы түрде miR-3687-нің өзгеріс ауқымы (fold change) 3.96 мәнде ең жоғары көрсеткіш көрсетті (Q23 экспр. 10239; Q74 экспр. 40520; орташа экспр. 14.63). Бұл микроРНК молекулаларының ішінен miR-3687, miR-4417, miR-1273g-5p және miR-612 - Q23 және Q74 үлгілерінде жоғары экспрессиялатындығы расталды. Ал, miR-411-5p, miR-32-5p, miR-301a-3p, miR-135a-5p, miR-876-3p, miR-889-3p, miR-148a-3p, miR-126-5p, miR-495-3p, let-7f-2-3p және miR-22-5p - Q23 және Q74 үлгілерінде экспрессиялары төмен болды. Мысалы, miR-411-5p өзгеріс ауқымы (FC) = -17.69 мәнде экспрессиясы ең төмен микроРНК молекулаларының бірі болды (28 кесте).

Кесте 28 - НТТ-Q23 және НТТ-Q74 жасуша линияларының арасындағы дифференциалды экспрессияланған микроРНК-ның тізімі

МикроРНК	Орташа нормаланған бақылау	Орташа нормаланған ауру	Орташа экспрессия	Өзгеріс ауқымы (FC)	Түзетілген <i>p</i> мәні (Adj. <i>p</i> value)
miR-3687	10239	40520	14.63	3.96	2.72E-09
miR-4417	2586	6998	12.23	2.71	4.03E-06
miR-411-5p	46	3	4.61	-17.69	7.03E-04
miR-32-5p	646	56	8.46	-11.61	8.24E-04
miR-1273g-5p	253	714	8.92	2.82	8.24E-04
miR-3648	198	458	8.36	2.30	8.24E-04
miR-301a-3p	2813	224	10.57	-12.57	8.24E-04
miR-135a-5p	49	6	4.80	-8.08	1.10E-03
miR-612	84	268	7.46	3.14	1.10E-03

miR-876-3p	130	16	6.19	-8.05	1.20E-03
miR-889-3p	34	3	4.18	-14.05	1.30E-03
miR-148a-3p	973	88	9.05	-11.07	1.30E-03
miR-126-5p	434	37	7.88	-11.79	1.40E-03
miR-495-3p	281	30	7.28	-9.39	1.40E-03
let-7f-2-3p	38	5	4.43	-7.08	1.40E-03
miR-1273h-5p	2594	5753	12.03	2.22	1.70E-03
miR-4484	243	497	8.53	2.04	2.80E-03
miR-504-3p	147	339	7.92	2.30	1.20E-02
miR-22-5p	257	89	7.44	-2.87	2.74E-02
miR-4261	124	263	7.60	2.10	3.74E-02

Ескертпе: көк – жоғары, қызыл – төмен экспрессияланған микроРНК молекулалары.

Зерттеу нәтижесі бойынша, НТТ-Q23 және НТТ-Q74 жасуша линияларының арасындағы айтарлықтай ДЭ микроРНК молекулаларының экспрессиясын адамның *mirna tissue atlas* жүйесі бойынша RPKM көрсеткіштерін анықтадық (кесте 29). Нәтиже бойынша, miR-411-5p, miR-876-3p, miR-889-3p, miR-495-3p және miR-4261 экспрессиялары тіндерге қарағанда ми бөлігінде жоғары екендігі байқалды. Бұл көрсеткіштер арқылы зерттеу жұмыста анықталған ДЭ микроРНК молекулалары адамның ми бөлігінде басқа тіндерге қарағанда көбірек бөлінетіндігін растайды.

Кесте 29 - Адамның *mirna tissue atlas* - бойынша ДЭ микроРНК экспрессияларының мидағы және жүйке жүйесіндегі экспрессия көрсеткіштері

МикроРНК	Мида (RPKM)	Жүйке жүйесінде (RPKM)	МикроРНК	Мида (RPKM)	Жүйке жүйесінде (RPKM)
miR-3687	-4.21	3.92	miR-889-3p	4.65	-2.81
miR-4417	223.53	527.36	miR-148a-3p	158.76	130.43
miR-411-5p	37.18	-3.73	miR-126-5p	65.12	63.62
miR-32-5p	7.89	-2.52	miR-495-3p	144.58	1.18
miR-1273g-5p	28.39	15.73	let-7f-2-3p	0.90	0.17
miR-3648	59.03	273.47	miR-1273h-5p	-	-
miR-301a-3p	73.70	6.33	miR-4484	151.36	134.47
miR-135a-5p	59.02	0.02	miR-504-3p	-	-
miR-612	-1.31	-1.90	miR-22-5p	12.05	16.87
miR-876-3p	1.91	-4.21	miR-4261	85.82	16.47

Зерттеу жұмыстың талдау нәтижелері бойынша, miR-3687 экспрессиясы басқа ДЭ микроРНК молекулаларымен салыстырғанда қалыпты (Q23) және мутантты (Q74) Нтт жасуша линияларында ең жоғары екендігі анықталды. Қазіргі уақытта нейродегенеративті бұзылыстарда miR-3687 бойынша бірнеше зерттеулер бар. Жақында жасалған (*Sanooghi* және т.б. 2022) адамның ми қанындағы мезенхималық бағаналы жасушаларынан алынған моторлы нейрон тәрізді жасушалардағы микроРНК экспрессиясын талдау бойынша зерттеу жұмыстарында miR-3687 айтарлықтай жоғары экспрессияланатынын көрсеткен [305]. Сонымен

қатар, компьютерлік TargetScan нәтижелері бойынша miR-3687 убиквитинге қатысты ақуыздармен байланысты болған [306, 307]. Убиквитинді байланысатын ақуыздар көптеген нейродегенеративті ауруларды сипаттайтын нейротоксикалық ақуыз агрегаттарының негізгі құрамдас бөлігі болып саналады [308]. Убиквитин-протеазомдық жүйенің дисфункциясы нейродегенеративті аурулардың патогенезін бастайтын және ауырлататын негізгі фактор болып табылады. Мысалы, кейбір зерттеулер SNIP убиквитин лигазасы мутантты Htt фрагментінің агрегациясын басуы мүмкін екенін хабарлаған болатын [309].

Сонымен қатар, қазіргі уақытта miR-4261 бойынша қатерлі ісікке байланысты бірнеше зерттеулер бар [310, 311]. Дегенмен, нейродегенеративті бұзылулардағы miR-4261 деңгейлері бұрын хабарланбаған. Адамның микроРНК ұлпасының атласына сәйкес miR-4261 экспрессиясы басқа тіндермен салыстырғанда мида жоғары көрсеткіш көрсеткен (экспрессиясы: 85.82 RPKM) [312].

Нейродегенеративті бұзылыстарда miR-612 және онымен байланысты механизмдер түсініксіз болып қала берді. *Chen* және т.б. (2022) ғалымдардың зерттеу жұмыстарында miR-504-3p - htau тышқандарында дифференциалды түрде жоғары экспрессияланатынын анықталды [313].

Алдыңғы зерттеулердің жұмыстары бойынша, miR126-5p экспрессиясының төмендетілуі амиотрофиялық бүйірлік склерозда жасушалық емес автономды механизм арқылы аксонның дегенерациясын және жүйке-бұлшықет қосылыстарының бұзылуын жеңілдететінін көрсеткен [314]. Кейбір зерттеулер miR-126-5p эндотелий жасушаларының пролиферациясын реттеуде маңызды рөл атқара алатынын көрсетеді [315]. 2020 жылы *Patrício* және т.б. ғалымдардың [316] зерттеу жұмыстары бойынша, созылмалы жеңіл күйзеліс пен флуоксетинмен (антидепрессант, серотонинді кері қармаудың селективті ингибиторлары тобының негізгі өкілдерінің бірі) емдеудің микроРНК деңгейлеріне әсері ми аймақтарында өзгеретінін және флуоксетинмен өңделген егеуқұйрықтардың қанында miR-411-5p айтарлықтай төмендегенін анықтаған. Сонымен қатар, miR-126-5p және miR-411-5p экспрессиясының төмендеуі жануарлар мен адам зерттеулерінде ұқсас қатынастары бар екенін түсіндіре алды.

Бұл анықталған дифференциалды экспрессияланған микроРНК молекулаларының профилдері Гентингтон және басқа да нейродегенеративті бұзылыстарды (Альцгеймер және Паркинсон т.б.) патологиялық зерттеу үшін ерте диагностика биомаркерлері ретінде қызмет ете алуы мүмкін. Алдағы жұмыстың нәтижесінде анықталған дифференциалды экспрессияланған микроРНК молекулаларын тәжірбиелік жағдайда Гентингтон, Альцгеймер және Паркинсон ауруларына шалдыққан науқастардан биоматериалдар жинау арқылы олардың экспрессияларын анықтау маңызды болып табылады.

Сонымен қатар, адамның SH-SY5Y жасуша үлгісінде трансфекцияланған Q23 және Q74 жасуша линияларында miR-191-5p микроРНК молекуласы 354 микроРНК ішінде төмен экспрессиясы анықталды (орташа экспрессиясы: 12, өзгеріс ауқымы: -3.68). Бұған дейінгі М.А. Айтхожин атындағы Молекулалық биология және биохимия институтында жүргізілген микроРНК молекулаларының онкопатологиядағы экспрессия жағдайы атты ғылыми жобада miR-191-5p

Қазақстандық популяциядағы сүт безі ісігінің диагностикасында ықтимал биомаркер екені анықталған [317]. Жұмыстың нәтижесінде сау бақылау топтарымен салыстырғанда сүт безі ісігі науқастарында miR-191-5p айтарлықтай жоғарылаған ($P = 3.7e-10$). Long Wang және т.б. (2022) зерттеу жұмыстарында плазмадағы miR-191-5p Альцгеймер ауруы үшін жаңа және перспективалы инвазивті емес диагностикалық биомаркер ретінде анықталған [318]. Сондықтан, miR-191-5p микроРНК молекуласы сүт безі қатерлі ісігімен қатар, нейродегенеративті ауруларда да негізгі әлеуетті биомаркер ретінде ұсынылуда.

3.7 Дифференциалды экспрессияланған микроРНК-ның нысана гендерінің экспрессиясын зерттеу

3.7.1 Дифференциалды экспрессияланған микроРНК-ның адам гендерінің негізінде түзілетін мРНК-мен өзара әрекеттесуін *in silico* жағдайында талдау

MirTarget бағдарламасының көмегімен 126 жоғары және 228 төмен ДЭ микроРНК молекулаларының 17494 адам гендерінің мРНК-мен өзара әрекеттесу сипаттамалары зерттелді. Өзара байланысу сайттарын есептеу нәтижесі бойынша, 126 жоғары ДЭ микроРНК-ның 8482, және 228 төмендетілген ДЭ микроРНК-ның 6618 адам гендерінің мРНК-мен өзара байланыстары 3'UTR, 5'UTR және CDS аймақтарында анықталды.

Айтарлықтай жоғары және төмен дифференциалды экспрессияланған микроРНК молекулалары (miR-3687, miR-612, miR-4417, miR-4261, miR-504-3p, miR-126-5p, miR-411-5p, miR-889-3p және miR-22-5p) нейродегенеративті бұзылысты аурулардың дамуымен байланысты 18 гендердің мРНК-мен өзара әрекеттесті (кесте 30).

Кесте 30 - Дифференциалды экспрессияланған микроРНК-ның байланысатын нысана гендері және олардың нейродегенеративті аурулармен өзара ассоциациялары

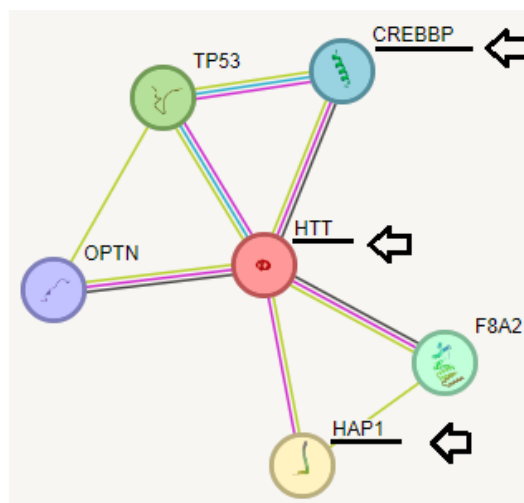
МикроРНК	Ген	Байланысу сайтының басталуы	ΔG , кДж/моль	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Аймақ	Микро РНК, ұзындығы	Ауру аты [PMID]
miR-3687	B3GNT2	77	-113	82	5'UTR	24	Аутоиммунды аурулар [35079000], [34790667]; Шизофрения [23904455]
miR-612	CSMD2	4047	-119	85	CDS	25	Нейропсихикалық ауру, Шизофрения, аутизм спектрінің бұзылуы [31068362]
	GNAO1	1958	-117	83	CDS	25	Еріксіз қозғалыстар мен НА [35782616]
	ATXN2	2810	-114	82	CDS	25	НА, 2-ші типті жұлын церебеллярлық атаксия [36511898]
miR-4417	DUSP15	950	-98	92	CDS	18	Аутизмнің бұзылуы [34257739]; Шуурс-Хоеймейкерлер синдромы [28628100];

							Бас миының ауруы [35082514]
	<i>EPN3</i>	1762	-96	90	CDS	18	Аутосомды-доминантты синдромды емес керендік [33842346]
	<i>GLIS1</i>	405	-96	90	5'UTR	18	НА [32699115], [29779043]; Паркинсон ауруы [22759478]
	<i>CREBBP</i>	6004	-87	82	CDS	18	НА (Альцгеймер ауруы) [36441024]; Бас миының ауруы (<i>HTT</i> генімен байланысты) [36246562], [36466848], [20448484]
miR-4261	<i>ATN1</i>	1758 ÷ 2319 (2)	-72 ÷ -76	83 ÷ 88	CDS	16	НА, тринуклеотидті бұзылыстар (DRPLA), 7-ші типті жұлын церебеллярлық атаксия [36176563], [35401096], [35295941], [8136840]
	<i>GLIS1</i>	1928	-74	85	CDS	16	НА [32699115], [29779043]; Паркинсон ауруы [22759478]
	<i>CREBBP</i>	6351	-70	80	CDS	16	НА (Альцгеймер ауруы) [36441024]; Бас миының ауруы (<i>HTT</i> генімен байланысты) [36246562], [36466848], [20448484]
	<i>HAP1</i>	180 ÷ 3147(2)	-70	80	CDS ÷ 3 UTR	16	НА [36509909], [36251080]; Бас миының аурулары [35609730], [35327413]
miR-504-3p	<i>ATXN1</i>	1230	-96	80	CDS	21	1-ші типті жұлын-церебеллярлық атаксия [36497172], [36462087]
miR-126-5p	<i>DNM1L</i>	2154	-87	82	CDS	21	НА [34307245], [36302323], [35916724]
	<i>GEMIN4</i>	2162	-91	86	CDS	21	Нейродегенеративті аурулар, Жүйке-бұлшықет ауруы [35295849], [34984269]
miR-411-5p	<i>NOS3</i>	1040	-89	81	CDS	21	Альцгеймер ауруы [16813604], [11041283], [18183499], [12697290]
	<i>EFNA5</i>	369	-89	81	CDS	21	НА [5406389], [35105727], [35321205]

miR-889-3p	<i>CNPY1</i>	796	-85	82	3'UTR	21	НА [34638438], [34314101], [32570916]
	<i>KIAA1324L</i>	1633	-85	82	CDS	21	НА [17475571], [21177533]
miR-22-5p	<i>ATXN10</i>	1126	-93	83	CDS	22	10-шы типті жұлын- церебеллярлық атаксия түрі [36199580], [36092952], [35469073]
Ескерту: [PMID] - әрбір басылымға берілген бірегей сәйкестендіру нөмірі; НА - нейродегенеративті аурулар.							

miR-3687 микроРНК молекуласының нысана *B3GNT2* генінің мРНК-мен 5'UTR аймағында -113 кДж/моль бос байланыс энергиясында өзара байланысу сайты анықталды. Сондай-ақ, *CSMD2*, *GNAO1* және *ATXN2* гендерінің мРНК-ның CDS аймақтарында -114 және -119 кДж/моль бос энергия мәнінде, miR-612 микроРНК молекуласымен байланысу сайттары табылды. Ал, miR-4417 және miR-4261 - *DUSP15*, *EPN3*, *GLIS1*, *CREBBP*, *ATN1* және *HAP1* гендерінің мРНК-мен 3'UTR, 5'UTR және CDS аймақтарында -70 кДж/мольден -98 кДж/мольге дейін бос байланыс энергиясында байланысу сайттары анықталды. Кейбір гендердің мРНК молекулаларының 3'UTR және CDS аймақтарында miR-4261 микроРНК молекуласымен байланысу сайттары анықталды. Мысалы, *HAP1* генінің мРНК-мен 3'UTR және CDS аймақтарында miR-4261 микроРНК молекуласының байланысу сайттары бар. Сондай-ақ, miR-4261 - *ATN* және *HAP1* гендерінің мРНК-ның 3'UTR және CDS аймақтарында байланысу сайттары 1758÷2319 нт, және 180÷3147 нт-де басталатын екі байланысу сайттары табылды. Ал, miR-504-3p микроРНК молекуласының нысана *ATXN1* генінің мРНК-мен CDS аймағында -96 кДж/моль бос энергияда өзара әрекеттесетіні анықталды. Сонымен қатар, экспрессиясы төмен болған miR-126-5p, miR-411-5p, miR-889-3p және miR-22-5p микроРНК молекулаларының *DNM1L*, *GEMIN4*, *NOS3*, *EFNA5*, *CNPY1*, *KIAA1324L* және *ATXN* гендерінің мРНК-мен 3'UTR және CDS аймақтарында байланысу сайттары бар екендігі анықталды.

Нейродегенеративті бұзылыстардың дамуында маңызды рөл атқаратын гендер арасында *HAP1* және *CREBBP* гендері Гентингтон ауруында маңызды рөл атқаратын гендер болып табылады [319, 320]. *HAP1* функциясын және онымен байланысты ақуыздарды түсіну Гентингтон ауруының патогенезін түсіндіруге көмектесуі мүмкін [321]. Функционалдық ақуыз ассоциациясының желілер нәтижесі (<https://string-db.org/>) көрсеткендей *CREBBP* және *HAP1* ақуызы Htt ақуызымен өзара әрекеттесетінін көрсетті (сурет 17).



Сурет 17 - Htt ақуызының байланысатын ақуыздық өзара әрекеттесу желілері (STRING <https://string-db.org/> жүйесі арқылы анықталды)

Дифференциалды экспрессияланған miR-3687, miR-612, miR-4417, miR-4261, miR-504-3p, miR-126-5p, miR-411-5p, miR-889-3p және miR-22-5p молекулаларының *ATXN2*, *CREBBP*, *ATN1*, *HAP1*, *ATXN1*, *GEMIN4*, *NOS3*, *KIAA1324L* және *ATXN10* гендернің мРНК-мен өзара әрекеттесу схемалары төмендегі 31-ші кестеде берілді.

Кесте 31 - Дифференциалды экспрессияланған микроРНК-ның нейродегенеративті аурулармен байланысы бар гендердің мРНК-мен өзара әрекеттесу схемалары

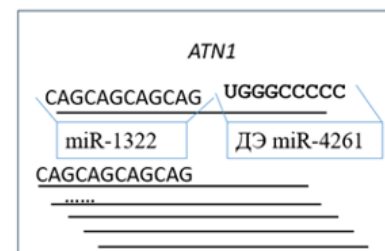
Ген; микроРНК; байланысу сайтының басталуы, байланысу аймағы; бос энергияның өзгерісі (ΔG , кДж/моль); $\Delta G/\Delta G$ м (%) мәні; микроРНК ұзындығы, нт	
<i>B3GNT2</i> ; miR-3687;77;5'UTR; -113;82;24 5' -AC AC CGCCGGG CG CGCC CG UCCGGG-3' 3' -UG CA GCGUGC U UGCGG AC AGGCCC-5'	<i>CREBBP</i> ; miR-4261;6351; CDS; -70;80;16 5' -UGGGCCCCCGGAUGCCC-3' 3' -ACCCAGGGACAAAGGA-5'
<i>CSMD2</i> ; miR-612;4047; CDS; -118;85;25 5' -AAGGAGCUGAGU G CCCCGGCCCCUGC-3' 3' -UUCCUCGAGUCU U CGGGACGGGUCG-5'	<i>HAP1</i> ; miR-4261;180÷3147; CDS÷3'UTR; -70;80;16 5' -UGG A UCCCAU U CCUC-3' 3' -ACCCAGGGACAA AGGA -5'
<i>GNAO1</i> ; miR-612;1958; CDS; -117;83;25 5' -ACUGAGC CC AGCCGCCCGUGCCC G GC-3' 3' -UUCCUCG AG UCU U CGGGACGGG U CG-5'	<i>ATXN1</i> ; miR-504-3p;1230; CDS; -96;80;21 5' -UACUCCCC CG CCCCAGC G CUCCC-3' 3' -CUUUGGG AC GGGACG U GAGGG-5'
<i>ATXN2</i> ; miR-612;2810; CDS; -114;81;25 5' -AAGGG GU UCAGACU U CCAGCCCAGC-3' 3' -UUCC U CGAGUCU U CGGACGGGUCG-5'	<i>DNM1L</i> ; miR-126-5p;2154; CDS; -87;82;21 5' -AG U GUGCCAA AGG CAGUAAUG-3' 3' -GCGCAUGGU U U U CAUUAU U UAC-5'
<i>DUSP15</i> ; miR-4417;950; CDS; -98;92;18 5' -CGC CC CGGGAAGCCCA CC -3' 3' -GGG AG GCCCU U CGGGUGG-5'	<i>GEMIN4</i> ; miR-126-5p;2162; CDS; -91;86;21 5' -CGCGU GCCG AGAGGAUACUG-3' 3' -GCGCA UGG U U U U CAUUAU U UAC-5'
<i>EPN3</i> ; miR-4417;1762; CDS; -96;90 5' -CCCUC U GGGAAGCC AGC -3' 3' -GGGAG G CCCU U CGGGUGG-5'	<i>EFNA5</i> ; miR-411-5p;369; CDS; -89;81;21 5' -CGACCGCU AC GCUGUCUAC UG -3' 3' -GCAUGCGAU A UGCCAGA U GA U -5'
<i>GLIS1</i> ; miR-4417;405;5'UTR; -96;90;18	<i>NOS3</i> ; miR-411-5p;1040; CDS; -89;81;21

5' -CCCUGC AGGA AGCCACC-3' 3' -GGGAGG CCCU UCGGGUGG-5'	5' -GGUGCGCUAC CG CGGGCUAC CG -3' 3' -GCAUGCGAU AUG CCAGAUG AU -5'
<i>CREBBP</i> ; miR-4417;6004; CDS; -87;82;18 5' -UCCACAGGGAAGCC U ACC-3' 3' -GGGAGG CCCU UCGGGUGG-5'	<i>EFNA5</i> ; miR-411-5p;369; CDS; -89;81;21 5' -CGACCGCUAC CG CUGUCUAC UG -3' 3' -GCAUGCGAU AUG CCAGAUG AU -5'
<i>ATN1</i> ; miR-4261;1758÷2319; CDS; -72÷-76;83÷88;16 5' -UGGG CCCCCU CCUCCU-3' 3' -ACCC AGGGACAA AGGA-5'	<i>CNPY1</i> ; miR-889-3p;796;3'UTR; -85;82;21 5' - GCAGUGGCUGUCUGAUA AAGAA-3' 3' -UGU UACCAACAGG CUAUAUU-5'
<i>GLIS1</i> ; miR-4261;1928; CDS; CDS; -74;85;16 5' -UGGGG CCCGGCU CCUCCU-3' 3' -ACCCAGGGAC AA AGGA-5'	<i>KIAA1324L</i> ; miR-889-3p;1633; CDS; -85;82;21 5' -ACAAUG AUUACU GAUCUUA-3' 3' -UGUUAC CAACAGG CUAUAUU-5'
<i>ATXN10</i> ; miR-22-5p;1126; CDS; -93;83;22 5' -UCAAGCUGGCCUCUGAG GGAGCC -3' 3' -AUUUCGAACGGUGACU UCUUGA -5'	
Ескерту: қалың қара шрифт канондық емес А және С, G және U, жұптарының нуклеотидтерін көрсетеді.	

Зерттеу жұмысымызда *in vitro* жағдайында анықталған ДЭ 354 микроРНК молекулалары зерттеу нәтижелеріміздің 3.1, 3.2 және 3.3 тарауындағы MirTarget бағдарламасының көмегімен есептелінген *in silico* жұмыстарында сипатталған микроРНК молекулалары арасында кездеспеді. Оның себебіне статистикалық түрде есептеліп отырған ДЭ микроРНК сандарының аз болуы әсер етті. Мысалы, *in silico* жағдайында біз 6000-ға жуық микроРНК молекулаларының 17494 гендердің мРНК-мен байланысу сайттары есептелінді. Ал, *in vitro* жағдайында анықталған тек 354 ДЭ микроРНК молекулаларының 17494 гендердің мРНК-мен байланысу сайттары ізделінді. Дегенмен, *in vitro* жағдайында анықталған ДЭ miR-4261, *in silico* әдісімен анықталған miR-1322 сияқты *ATN1* генінің мРНК-ның тринуклеотидті аймағымен байланыспағанымен, осы геннің яғни нуклеотидті қайталымы бар *ATN1* генінің CDS аймағында байланысу сайттары анықталды. Сонымен қатар, ДЭ анықталған miR-504-3p және *ATXN1* генінің мРНК-ның CDS аймағында байланысу сайты табылды. Бұған дейінгі, *in silico* әдісінің зерттеу нәтижесімен *ATXN1* генінің мРНК-ның CDS аймағында miR-1322 - CAG тринуклеотидті аймағымен байланысқан болатын (сурет 18).

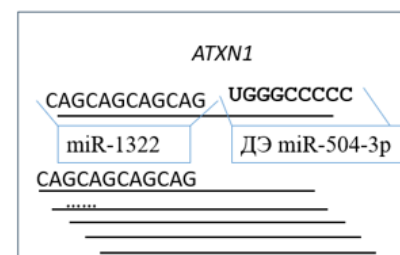
(A) *ATN1*; **miR-1322**;1693;**CDS**;-89;87;19
 5' -CAGCAGCAGCAGCAGCAGC-3'
 ||||| ||||| |||
 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'

ATN1; **ДЭ miR-4261**;1758÷2319;**CDS**;-72÷-76;83÷88;16
 5' -UGGGCCCCCUCUCCU-3'
 ||||| |||||
 3' -ACCCAGGGACAAAGGA-5'



(Ә) *ATXN1*; **miR-1322**;1569;**CDS** -89;87;19
 5' -CAGCAGCAGCAGCAGCAGC-3'
 ||||| ||||| |||
 3' -GUCGUAGUCGUCGUAGUAG-5'

ATXN1; **ДЭ miR-504-3p**;1230;**CDS**;-96;80;21
 5' -UACUCCCCGCCCCAGCGCUCCC-3'
 | ||||| |||||
 3' -CUUUGGGACGGGACGUGAGGG-5'



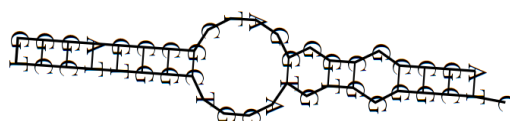
(A) *ATN1* генінің мРНҚ-ның CDS аймағында miR-1322 және miR-4261 байланысу сайттары;
 (Ә) *ATXN1* генінің мРНҚ-ның CDS аймағында miR-1322 және miR-504-3p байланысу сайттары.

Сурет 18 - *ATN1* және *ATXN1* гендерінің мРНҚ-ның нуклеотидті тізбектеріндегі микроРНҚ-ның байланысу сайттары

MirTarget бағдарламасынан бөлек, *in vitro* жағдайында анықталған ДЭ микроРНҚ-мен олардың нысана гендерінің байланысу сайттарын болжайтын MirWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) және Diana (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>) сияқты бағдарламалар көмегімен салыстырмалы түрде есептелді. Нәтижесінде MirWalk бағдарламасының есептеуі бойынша miR-3648, miR-612 және miR-1273h-5p нысана гендерінің байланысу сайттарының бос энергиялары MirTarget бағдарламасымен салыстырғанда төмен болды және байланысу сайттары бойынша мРНҚ-да нуклеотидті қайталымдар кездеспеді. Байланысу схемалары бойынша MirTarget бағдарламасы сияқты схемалар берілмеді, тек 2D құрылымы берілген (сурет 19).

miR-3648 және нысана гендерінің байланысу сайттарының сипаттамасы

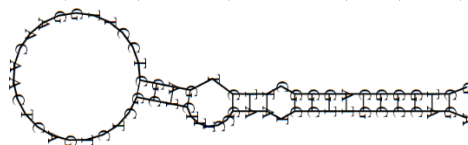
miRNA	RefseqID	GeneSymbol	Duplex	Score	Position	Binding Site	Au	Me	N Pairings	Targetsan	Mirdb	Mirtarbase
hsa-miR-3648	NM_001390832	OR9G4	details	1.00	CDS	336,358	0.52	-19.073	15	—	—	—
hsa-miR-3648	NM_001178007	BBS12	details	1.00	CDS	690,704	0.6	-18.913	13	—	—	—
hsa-miR-3648	NM_001286354	GPRC6A	details	1.00	CDS	1292,1307	0.53	-18.399	13	—	—	—
hsa-miR-3648	NM_001288824	GDF9	details	1.00	CDS	385,402	0.54	-18.391	14	—	—	—



2D құрылымы

miR-612 және нысана гендерінің байланысу сайттарының сипаттамасы

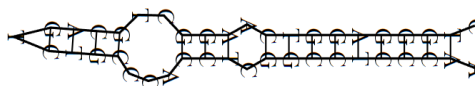
miRNA	RefseqID	GeneSymbol	Duplex	Score	Position	Binding Site	Au	Me	N Pairings	Targetscan	Mirdb	Mirtarbase
hsa-miR-612	NM_001256427	PDLIM5	details	1.00	CDS	612,652	0.54	-7.373	17	—	—	—
hsa-miR-612	NM_001256429	PDLIM5	details	1.00	CDS	374,395	0.43	-12.418	16	—	—	—
hsa-miR-612	NM_001256468	KAT6B	details	1.00	CDS	4281,4303	0.52	-7.861	17	—	—	—



2D құрылымы

miR-1273h-5p және нысана гендерінің байланысу сайттарының сипаттамасы

miRNA	RefseqID	GeneSymbol	Duplex	Score	Position	Binding Site	Au	Me	N Pairings	Targetscan	Mirdb	Mirtarbase
hsa-miR-1273h-5p	NM_001256429	PDLIM5	details	1.00	CDS	387,408	0.38	-7.587	16	—	—	—
hsa-miR-1273h-5p	NM_001256429	PDLIM5	details	1.00	CDS	357,376	0.41	-6.34	17	—	—	—
hsa-miR-1273h-5p	NM_001256429	PDLIM5	details	1.00	CDS	254,274	0.41	-8.094	15	—	—	—
hsa-miR-1273h-5p	NM_001256430	STON2	details	1.00	CDS	3431,3449	0.6	-11.207	17	—	—	—



2D құрылымы

Сурет 19 - miR-3648, miR-612 және miR-1273h-5p-мен олардың нысана гендерінің байланысу сайттарының MirWalk бағдарламасы арқылы есептеу нәтижелерінің сипаттамалары

Келесі микроРНК молекулаларымен олардың нысана гендерінің байланысу сайттарын болжайтын Diana бағдарламасымен ДЭ микроРНК және олардың нысана гендерін есептеу барысында бос байланыс энергияларымен байланысу схемаларын көрсетпеді (сурет 20).

Ensembl Gene Id	miRNA name	miTG score	Also Predicted
1 ENSG00000149480 (MTA2)	hsa-miR-3687	0.941144196180626	☐ ☒

Gene details

Gene ID:

MTA2

Expression:

External Gene ID:

ENSG00000149480

Ensembl version:

77

Description:

metastasis associated 1 family, member 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:7411]

Chromosome:

11

DIANA resources:

[microT-CDS](#) [TarBase .7](#) [LncBase Exprerimental](#) [LncBase Predicted](#)

miRNA details

pubMed links:

[miRNA](#) | [gene](#) | [both](#)

UCSC graphic

Region	Binding Type	Transcript position	Score	Conservation
UTR3	8mer	197-220	0.0377677569494776	10
UTR3	7mer	190-203	0.0182435464548026	10

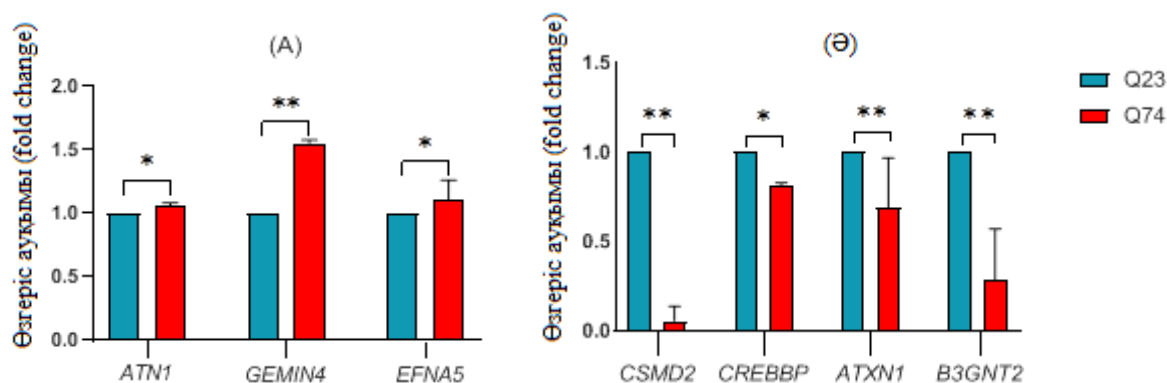
Сурет 20 - Diana бағдарламасы арқылы анықталған miR-1273h-5p және оның нысана генінің байланысу сайты

Қорыта келгенде, микроРНК-мен олардың нысана гендерінің байланысу сайттарын болжайтын бағдарламалардан MirTarget бағдарламасымен есептеудің ерекшелігі: микроРНК молекуласының мРНК-мен байланысуының басталу аймағын; микроРНК молекуласының 5'UTR, CDS және 3'UTR аймақтарында мРНК-мен байланысу сайттарының орналасуын; микроРНК - мРНК арасындағы нуклеотидтердің әрекеттесу схемаларын; микроРНК - мРНК-мен байланысуының бос энергияларын (ΔG , кДж/моль) және $\Delta G/\Delta G_m$ (%) табу болып табылды. Сонымен қатар, MirTarget бағдарламасының нәтижесіне сәйкес Гентингтон ауруы бойынша адамның жасуша линиясының үлгісінде анықталған ДЭ микроРНК молекулаларының нысана гендері кейбір нейродегенеративті аурулардың дамуында маңызды рөл атқаратын гендер екендігін көрсетті.

3.7.2 Дифференциалды экспрессияланған микроРНК-ның байланысу нысаны болған гендердің экспрессияларын сандық ПТР көмегімен талдау

Сандық ПТР арқылы нейродегенеративті аурулардың дамуына жауапты гендердің экспрессиясын талдау осы жағдайлардың негізінде жатқан молекулалық механизмдер туралы құнды түсініктер береді. Зерттеу жұмыстың бұл бөлігінде ГА жасуша үлгісінде анықталған ДЭ микроРНК молекулаларының байланысу нысаны болған 18 гендердің экспрессияларын сандық ПТР арқылы талдау жасалды. Зерттеу нәтижелері бойынша, ДЭ микроРНК молекулаларының байланысу нысаны болған 3 геннің (*ATN1*, *GEMIN4*, *EFNA5*) экспрессиясының жоғарылауы және 4 геннің (*CSMD2*, *CREBBP*, *ATXN1*, *B3GNT2*) экспрессиясының төмендеуі анықталды. Жоғары экспрессияланған гендердің ішінен *GEMIN4* геннің экспрессиясы 1.5 есеге жоғары ($p = 0.0022$) мәнді көрсетті. Ал, *ATN1* ($p = 0.0400$) және *EFNA5* ($p = 0.0228$) гендерінде шекті жоғарылау байқалды (сурет 21, А).

Сандық ПТР нәтижелері бойынша, *CSMD2*, *CREBBP*, *ATXN1* және *B3GNT2* гендерінің экспрессиясының төмендеуі анықталды (сурет 21, Ә). Бұл гендерден *CSMD2* үшін экспрессия мәні 2 есе ($p = 0.0022$), *ATXN1* үшін 1 есе ($p = 0.0043$) және *CREBBP* үшін 0.5 есе ($p = 0.0152$) болды. Бұл нәтижелер ДЭ микроРНК молекулаларының нейродегенеративті ауруларымен байланысы бар гендермен өзара байланысу арқылы олардың экспрессиясын реттей алатындығын болжайды.



(А) *ATN1*, *GEMIN4* және *EFNA5* гендерінің экспрессиясының жоғарылауы.
 (Ә) *CSMD2*, *CREBBP*, *ATXN1* және *B3GNT2* гендерінің экспрессиясының төмендеуі
 (* және ** $p < 0.05$ және 0.01 мәнін көрсетеді).

Сурет 21 - Қалыпты (Q23) және мутантты (Q74) үлгілер арасындағы кандидат дифференциалды экспрессияланған гендердің сандық ПТР нәтижелері

Дифференциалды экспрессияланған *B3GNT2* гені бета-1,3-N ацетилглюкозаминилтрансфераза тобының мүшесін кодтайды. *B3GNT2* генімен байланысты ауруларға бұлшықет дистрофиясы-В, 1-ші типті дистрогликанопатия және бұлшықет тінінің аурулары жатады. Сонымен қатар, *B3GNT2* генінің шизофрения қаупімен байланысты аутоиммундық бұзылуларға қатысатындығы туралы болжамдар бар [322]. Иммунитетпен байланысы бар гендердің арасында *B3GNT2* геннің ерекше қызметі N-ацетилглюкозаминнің (GlcNAc) донор молекуласынан UDP-GlcNAc гликопротеиндер мен гликолипидтердегі терминалдық бета-галактозаның қалдығына тасымалдануын катализдеу болып табылады. Бұл процестің нәтижесінде, бета-1,3-N-ацетилглюкозамин байланыстары пайда болады. *B3GNT2* гені әртүрлі биологиялық процестерге әсер етіп, осы молекулалардың құрылымдық және функционалды әртүрлілігіне ықпал етеді [323, 324].

Біздің зерттеуімізде сандық ПТР талдауының нәтижесі барысында Q23-пен салыстырғанда Q74 үлгілерінде *B3GNT2* ген экспрессиясының төмендеуі байқалды ($p < 0.01$). Осы нәтижеге сүйене отырып, Гентингтон ауруында miR-3687 микроРНК молекуласы байланысу нысаны болған *B3GNT2* генінің экспрессиясын реттей алатындығы болжануда.

miR-4261 микроРНК молекуласының кандидат *ATN1* және *CREBBP* гендерімен ассоциациялары нейродегенеративті бұзылыстарда маңызды рөл атқарады. Мысалы, *ATN1* гені мидың және басқа мүше жүйелерінің дамуы үшін маңызды ядролық транскрипциялық реттегіш ретінде рөл атқарады деп саналады [325]. *ATN1* гені атрофин-1 деп аталатын ақуызды кодтайды. Бұл ген адамдарда 12-ші хромосомада орналасқан. *ATN1* геніндегі мутациялар дентаторубральды паллидолий атрофиясы деп аталатын сирек кездесетін неврологиялық аурумен байланысты. Дентаторубральды паллидолий атрофия ГА-на ұқсас полиглутаминді қайталанатын бұзылулардың бірі [326]. Сонымен қатар, *ATN1* функциясы ГА-да

әсер етуі мүмкін, өйткені бұл ген *polyQ* ауруларының негізгі себебі болып табылады. Соңғы зерттеу жұмыстарының хабарлауы бойынша, барлық *polyQ* ауруларындағы гендермен салыстырғанда *ATN1* генінің мида ең жоғары экспрессияға ие болғанын көрсеткен [327]. *ATN1* генінің және оның ақуызының функциясын зерттеу дентаторубральды паллидолий атрофия және ГА сияқты нейродегенеративті бұзылулар негізінде жатқан молекулалық механизмдер туралы түсінік беруді жалғастыруда.

CREBBP гені бүкіл денедегі тіндердегі көптеген гендердің белсенділігін реттейтін CREB байланыстыратын ақуыздарды жасауға нұсқаулар береді. *CREBBP* гені транскрипция деп аталатын процесс арқылы мРНК-ға транскрипцияланады. Белгілі ДНҚ тізбегімен байланысатын ақуыздар болып табылатын транскрипция факторлары *CREBBP* генінің экспрессиясын реттейді. Транскрипциядан кейін мРНК өңделеді және жасуша ядросынан цитоплазмаға экспортталады. Цитоплазмада мРНК рибосомалар арқылы CBP (CREB binding protein) ақуызына ауысады [325, 328]. Коактиватор функциялары арқылы CBP жасушаның өсуіне, дифференциациясына және дамуына қатысатын гендердің кең ауқымының экспрессиясына әсер етеді. *CREBBP* геніндегі реттеудің бұзылуы немесе мутация әртүрлі бұзылыстарға, сирек кездесетін генетикалық ауруларға, даму және интеллектуалдық бұзылуларға, соның ішінде Рубинштейн-Тайби синдромына әкелуі мүмкін [329]. Көптеген алдыңғы зерттеулер көрсеткендей, *CREBBP* байланыстыратын ақуыздар мидың дамуына және ұзақ мерзімді жадының қалыптасуына қатысады [330-332]. *CREBBP* гені ГА сияқты әртүрлі нейродегенеративті аурулардың патогенезінде рөл атқаруы мүмкін [333].

Зерттеу жұмыстың сандық ПТР нәтижесінде экспрессиясы жоғары болған *miR-4261* микроРНК молекуласының *ATN1* (экспрессиясы жоғары) және *CREBBP* (экспрессиясы төмен) нысана гендерімен ассоциациялары тринуклеотидті нейродегенеративті аурулардың, оның ішінде дентаторубральды паллидолий атрофия, Гентингтон және дамудың интеллектуалдық бұзылыстарының диагностикасының биомаркерлері ретінде қызмет ете алуы мүмкін.

miR-612 микроРНК молекуласының байланысу нысаны болған *CSMD2* гені дамып келе жатқан орталық жүйке жүйесінде қабынуды белсендірудің реттегіштері ретінде сипатталған [334]. Кейбір зерттеулерде, *CSMD2* генінің нейродаму және нейропсихиатриялық бұзылулардың дамуында жауапты ген екені болжанған. Сонымен қатар, *CSMD2* гені шизофрения және басқа неврологиялық жағдайлардың жоғары қаупімен байланысты болды [335, 336]. ДЭ микроРНК молекулаларының байланысу нысаны болған, нейродегенеративті аурулардың дамуында маңызды рөл атқаратын гендердің экспрессияларын сандық ПТР көмегімен талдау барысында, жоғары ДЭ *miR-612* микроРНК молекуласының нысана *CSMD2* генінің экспрессиясы айтарлықтай төмен екендігі анықталды.

Нейродегенеративті бұзылыстарда кеңінен зерттелген *ATXN1* гені *miR-504-3p* молекуласының (жоғары экспрессияланған) байланысу нысаны болды және оның экспрессиясы ПТР нәтижесінде айтарлықтай төмен болды. *ATXN1* гені 1-ші типті жұлын церебеллярлық атаксия деп аталатын нейродегенеративті бұзылыстың дамуында жауапты гендердің бірі болып табылады. 1-ші типті жұлын

церебеллярлық атаксия мидың және жүйке жүйесінің басқа бөліктерінің прогрессивті деградациясымен сипатталады. 1-ші типті жұлын церебеллярлық атаксия механизмі, ең алдымен, *ATXN1* генінде тринуклеотидті қайталау тізбегінің (CAG) қалыптан тыс артуының болуымен байланысты. Бұл қайталанатын CAG тізбегі глутамин амин қышқылын кодтайды. *ATXN1* генінің экспрессиясының төмендеуі CAG қайталануының артуынан туындаған нейродегенеративті ауру болып табылатын транскрипциялық өзгерістерге әкелетіні белгілі [337].

MirTarget бағдарламасы арқылы miR-126-5p және miR-411-5p микроРНК молекулалары *GEMIN4* және *EFNA5* гендерінің мРНК-мен өзара байланысатыны анықталды. Бұл гендердің экспрессиялары Q74 жасуша линияларында айтарлықтай жоғары болды. Жақында жүргізген зерттеу жұмыстарының нәтижелерінде *GEMIN4* генінің патогендік нұсқалары нейродаму ерекшеліктерімен байланысты екені хабарланған. *GEMIN4* генінің мутациялары немесе реттелуінің бұзылуы жұлын бұлшықеттерінің атрофиясымен байланысты болды, бұл жұлынның моторлы нейрондарының дегенерациясымен сипатталатын, бұлшықет әлсіздігі мен атрофиясына әкелетін генетикалық аурулардың тобына жатады [338-340]. *EFNA5* - эфрин (ephrin) A5 ақуызын кодтайтын ген. Эфрин-A5 жасуша сигналында, әсіресе жүйке жүйесінің дамуында маңызды рөл атқаратын эфриндер тобының мүшесі. Ол аксонды басқаруға, нейрондық миграцияға және синаптикалық пластикаға қатысады. *EFNA5* геніндегі мутациялар немесе реттелмеу әртүрлі неврологиялық бұзылуларға және даму ауытқуларына әкелуі мүмкін. *EFNA5* гені Альцгеймер ауруы және Паркинсон ауруымен байланысты болды [341, 342]. Жүйке жүйесіндегі эфрин супертұқымдасының мүшесі болып табылатын *EFNA5* адам миында және гиппокампта жоғары дәрежеде экспрессияланады [343-345].

Зерттеу нәтижесінде Гентингтон ауруы жасуша линиясының үлгісінде дифференциалды түрде экспрессияланған микроРНК молекулаларының нейродегенеративті бұзылысты ауруларға жауапты гендермен өзара байланыстары анықталды. Жалпы алғанда, алынған нәтижелердің дифференциалды экспрессияланған miR-4261, miR-126-5p, miR-411-5p, miR-612, miR-4261, miR-504-3p және miR-3687 және олардың кандидат *ATN1*, *GEMIN4*, *EFNA5*, *CSMD2*, *CREBBP*, *ATXN1*, *B3GNT2* гендерінің тринуклеотидті қайталымды ауруларда маңызды рөл атқаратындығы анықталды. Бұл нәтижелер жаңа диагностикалық стратегияларды жасауға мүмкіндік береді және нейродегенеративті ауруларды, оның ішінде Гентингтон ауруын емдеудің баламалы емдік жолдарын ұсынады.

ҚОРЫТЫНДЫ

Нуклеотидтік қайталымдардың тұрақсыз шамадан тыс артуы ақуыз деңгейіне немесе уыттылыққа, РНҚ молекуласына байланысты механизмдері бар генетикалық тұқымқуалайтын, әсіресе жүйке жүйесіне әсер ететін ауруларға алып келеді. МикроРНҚ, сонымен қатар пиРНҚ молекулалары гендердің экспрессиясында маңызды рөл атқаратынын ескере отырып, олардың нуклеотидті бұзылыстардан туындайтын ауруларға жауапты гендердің мРНҚ тізбектерімен байланысу ерекшеліктерін сипаттау маңызды болып табылады. Сонымен қатар, тринуклеотидті бұзылысты ауруларға диагностикалық биомаркер ретінде адамның жасуша линиясының үлгісіндегі микроРНҚ молекуласының экспрессиясын зерттеу осы бұзылулардың негізінде жатқан молекулалық механизмдер туралы құнды түсініктер бере алады. Осыған орай, микроРНҚ және кейбір пиРНҚ-ның нысана гендерінің мРНҚ-ның нуклеотидті қайталымды тізбектерімен байланысын және адамның жасуша линиясының үлгісінде микроРНҚ-ның экспрессиясын зерттеуге қойылған міндеттерге байланысты төмендегідей тұжырымдар жасалды:

1. miR-1273f, miR-1322, miR-1181, miR-4258, miR-1281, miR-6833-5p, miR-877-3p, miR-3960, miR-4458, miR-1910-5p, miR-4302, miR-1260a, miR-8083 және miR-1908-3p нейродегенеративті аурулардың дамуына жауап беретін 36 гендердің мРНҚ-ның CDS аймағындағы тринуклеотидті қайталымдарымен (ACC, CAG, CGG, CCG, AGG, UCC, CCC) бос байланыс энергиясының жоғары мәндерінде (-84 кДж/моль және одан жоғары) байланысу сайттары анықталды.

2. miR-4258, miR-3960, miR-211-3p және miR-3155b нейродегенеративті аурулардың дамуына жауапты 34 гендердің мРНҚ-ның 5'-UTR және 3'-UTR аймақтарында CGG, GCC және CUG тринуклеотидті қайталымдарымен бос байланыс энергиясының жоғары мәндерімен (-87 кДж/моль және одан жоғары) өзара әрекеттесу сайттары табылды. *Londin* және т.б. ашқан микроРНҚ молекулалары арасында ID00372.5p-miR, ID01508.5p-miR, ID00296.3p-miR, ID01702.3p-miR және ID00522.5p-miR - *ATXN2*, *FMN2*, *MN1*, *ADRBK1*, *BRSK2*, *C11orf87*, *FMR1*, *BLMH* және *DMPK* гендерінің мРНҚ-ның CAG, CGG және CUG тринуклеотидті қайталымдарымен бос байланыс энергиясының жоғары мәндерінде (-121 кДж/моль және одан жоғары) байланысу сайттары анықталды. Сонымен қатар, miR-466, ID00436.3p-miR, miR-574-5p және ID00470.5p-miR нейродегенеративті (15 ген), онкологиялық (18 ген) және диабетті (9 ген) аурулардың дамуына жауап беретін гендердің мРНҚ-ның GU және AC динуклеотидті қайталымдарымен байланысу сайттары анықталды.

3. piR-32860, piR-28515 және piR-65782 - *AR*, *ATN1*, *CASKIN1*, *DLX6*, *DMRTA2*, *E2F4*, *FOXE1*, *FOXF2*, *HTT*, *IRF2BPL*, *MAML3*, *MNX1*, *NKX2*, *RAI1*, *SMARCA2*, *TBP*, *ZIC5*, *ZNF384*, *ZNF703*, *ZSWIM6* гендерінің мРНҚ-ның CDS аймақтарында және *BCL11A*, *BCL2L11*, *GLS*, *GNB2*, *KIF3B*, *MAB21L1*, *NDRG3*, *SBF1*, *SMAD9*, *WBP4* гендерінің 5'UTR аймақтарында CAG, CGG және GCC тринуклеотидті қайталымдарымен бос байланыс энергиясының жоғары мәндерінде (-118 кДж/моль және одан жоғары) байланысу сайттары анықталды.

4. рEGFP-Q23 және -Q74 плазмидалары адамның SH-SY5Y жасуша линиясында тұрақты трансфекцияланды. Трансфекция нәтижесінде Гентингтон ауруының және қалыпты үлгідегі жасуша линиялары құрылды.

5. Q74-Htt ақуызы Q23-ке қарағанда агрегацияға бейім болды. Q74-Htt агрегаттары ядроға жақынырақ орналасты, ал Q23-Htt ақуызы болса цитоплазмада біркелкі таралды.

6. НТТ-Q23 және НТТ-Q74 жасуша линиялары арасында 354 микроРНК дифференциалды түрде экспрессияланды ($p < 0.05$). Бақылаумен салыстырғанда Гентингтон ауруы үлгісінің линияларында 126 микроРНК-ның экспрессиялары айтарлықтай жоғары, ал 228 микроРНК-ның экспрессиялары төмен болды.

7. Гентингтон ауруының жасушалық линиясында дифференциалды экспрессияланған 354 микроРНК молекулаларының ішінде 9 микроРНК (miR-3687, miR-612, miR-4417, miR-4261, miR-504-3p, miR-126-5p, miR-411-5p, miR-889-3p және miR-22-5p) нейродегенеративті аурулардың дамуында маңызды рөл атқаратын 18 гендердің мРНК-мен 5'UTR, CDS және 3'UTR аймақтарында байланысу сайттары анықталды. 18 нысана гендердің ішінде 7 ген Гентингтон ауруының НТТ-Q74 үлгі жасуша линиясында дифференциалды экспрессияланды ($p < 0.05$ мәндері бойынша *ATN1*, *EFNA5*, *CREBBP* гендері және $p < 0.01$ мәндері бойынша *GEMIN4*, *CSMD2*, *ATXN1*, *B3GNT2* гендері).

Осы жұмыста анықталған микроРНК және пиРНК молекулалары және олардың нысана гендерімен өзара ассоциациялары нейродегенеративті аурулардың дамуында маңызды рөл атқаруы мүмкін. Қосымша зерттеулер жаңа диагностикалық стратегиялар мен баламалы терапия әдістерін жасауға негіз болатын патологиялық процестердің механизмдерін табу арқылы анықталған функционалдық байланыстарды растауы керек.

Адамның жасуша линиясының үлгісіндегі дифференциалды түрде экспрессияланған микроРНК молекулалары Гентингтон ауруының, сондай-ақ басқа да нейродегенеративті аурулардың потенциалды биомаркерлері (ерте диагностика, болжау, емдеу мониторингі және т.б.) ретінде қарастырылуы мүмкін. Мұндай биомаркерлерді жасау пациенттер тобы мен сау бақылауларға қосымша зерттеулерді қажет етеді.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Rodriguez C.M., Todd P.K. New pathologic mechanisms in nucleotide repeat expansion disorders // *Neurobiol Dis.* - 2019. - Vol. 130. - P.1-39.
- 2 Lee S.T., Chu K. Altered microRNA regulation in Huntington's disease models // *Exp. Neurol.* - 2011. - Vol. 227. - P.172–179.
- 3 World Health Organization: Neurological disorders affect millions globally // [who.int/news/item/27-02-2007-neurological-disorders-affect-millions-globally-who-report](https://www.who.int/news/item/27-02-2007-neurological-disorders-affect-millions-globally-who-report).
- 4 Rajgor D., Hanley J.G. The ins and Outs of miRNA-Mediated Gene Silencing during Neuronal Synaptic Plasticity // *Noncoding RNA.* - 2016. - Vol. 2, №1.- P. 1-13.
- 5 Kamenova S., Sharapkhanova A., Akimniyazova A., Kuzhybayeva K., Kondybayeva A., Rakhmetullina A., Pyrkova A., Ivashchenko A. piRNA and miRNA Can Suppress the Expression of Multiple Sclerosis Candidate Genes // *Nanomaterials.* - 2022. - Vol. 13. - P.1-18.
- 6 Jones K.W. Satellite DNA // *J Med Genet.* - 1973. - Vol. 10, №3. - P. 273-81.
- 7 Lower S.E., Dion-Côté A.M., Clark A.G., Barbash D.A. Special Issue: Repetitive DNA Sequences // *Genes.* - 2019. - Vol. 10, № 11. - P. 1-3.
- 8 Mariana L., Sandra L., Margarida G., Raquel C. Genomic Tackling of Human Satellite DNA: Breaking Barriers through Time // *International journal of molecular sciences.* - 2021. - Vol. 22. - P. 1-20.
- 9 Šatović-Vukšić E., Plohl M. Satellite DNAs-From Localized to Highly Dispersed Genome Components // *Genes.* - 2023. - Vol. 14. - P. 1-22.
- 10 Eslami R. M., Hernández Y., Drinan S.D. Fuxman Bass JI, Benson G. Genome-wide characterization of human minisatellite VNTRs: population-specific alleles and gene expression differences // *Nucleic Acids Res.* - 2021 - Vol. 49. - P. 4308-4324.
- 11 Biswas M.K., Darbar J.N., Borrell J.S., Bagchi M., Biswas D., Nuraga G.W., Demissew S., Wilkin P., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J.S. The landscape of microsatellites in the enset (*Ensete ventricosum*) genome and web-based marker resource development // *Sci Rep.* - 2020. - Vol. 10. - P.15312.
- 12 Li K., Luo H., Huang L., Luo H., Zhu X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know // *Cancer Cell Int.* - 2020. - Vol. 20. - P. 1-13.
- 13 Paço A., Freitas R., Vieira-da-Silva A. Conversion of DNA Sequences: From a Transposable Element to a Tandem Repeat or to a Gene // *Genes (Basel).* - 2019. - Vol. 10. - P. 1-16.
- 14 Ramos K.S., Bojang P., Bowers E. Role of long interspersed nuclear element-1 in the regulation of chromatin landscapes and genome dynamics // *Exp Biol Med (Maywood).* - 2021. - Vol. 246. - P.2082-2097.
- 15 Li Y., Jiang N., Sun Y. Anno SINE: a short interspersed nuclear elements annotation tool for plant genomes // *Plant Physiol.* - 2022. - Vol. 188. - P. 955-970.
- 16 Greally J.M. Short interspersed transposable elements (SINEs) are excluded from imprinted regions in the human genome // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2002. - Vol. 99, №1. - P.327-32.

- 17 Parker., Matthew W. Mechanisms and regulation of DNA replication initiation in eukaryotes // Critical reviews in biochemistry and molecular biology. - 2017. -Vol. 52. - P. 107-144.
- 18 Den D. Trinucleotide repeat disorder // Handb Clin Neurol. - 2017. - Vol. 145. - P. 383-391.
- 19 Edyta K., Emilia K., Edyta J., Wlodzimierz J. MicroRNA Deregulation in Trinucleotide Repeat Expansion Disorders // In book: Applied RNAi: From Fundamental Research to Therapeutic Applications. - 2014. - Vol.12. - P. 227-246.
- 20 Dewar, J. M., Walter J. C. Mechanisms of DNA replication termination // Nature reviews. Molecular cell biology. - 2017. - Vol.18. - P. 507–516.
- 21 Leman A.R., Noguchi E. The replication fork: understanding the eukaryotic replication machinery and the challenges to genome duplication // Genes (Basel). - 2013. - Vol. 4. - P.1-32.
- 22 Schwerk J., Savan R. Translating the Untranslated Region // Journal of immunology. - 2015. - Vol. 195, № 7. P. 2963-2971.
- 23 Kaplan S., Itzkovitz S., Shapiro E. A universal mechanism ties genotype to phenotype in trinucleotide diseases // PLoS Comput Biol. - 2007. - Vol. 3. № 11. - P: e235.
- 24 Malik I., Kelley C.P., Wang E.T., Todd PK. Molecular mechanisms underlying nucleotide repeat expansion disorders // Nat Rev Mol Cell Biol. - 2021. - Vol. 22. - P.589-607.
- 25 Gymrek M. A genomic view of short tandem repeats // Curr. Opin. Genet. Dev. - 2017. - Vol. 44. - P.9–16.
- 26 Hannan A. J. Tandem repeats mediating genetic plasticity in health and disease // Nat. Rev. Genet. - 2018. - Vol. 19. - P. 286-298.
- 27 Coffee B., Zhang F., Ceman S., Warren S. T. Reines D. Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized FMR1 gene in fragile X syndrome // Am. J. Hum. Genet. - 2002. - Vol. 71. - P. 923-932.
- 28 van Eyk C.L., Richards R.I. Dynamic mutations: where are they now? // Adv Exp Med Biol. - 2012. - Vol.7 69. - P. 55-77.
- 29 Budworth H., McMurray C. T. A brief history of triplet repeats diseases // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). - 2013). - Vol. 1010. - P. 3-17.
- 30 La Spada., Albert R., J Paul Taylor. Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis // Nature reviews. Genetics. - 2010. Vol. 11, № 4. - P. 247-58.
- 31 Jin P., et al. Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a Drosophila model of fragile X tremor/ataxia syndrome // Neuron. - 2007. - Vol. 55. - P.556-564.
- 32 Nagata E., Sawa A., Ross C.A., Snyder S.H. Autophagosome-like vacuole formation in Huntington's disease lymphoblasts // Neuroreport. - 2004. - Vol. 15. - P. 1325–1328.
- 33 La Spada A.R., Taylor J.P. Polyglutamines placed into context // Neuron. - 2003. - Vol. 38, №5. - P.681-4.

- 34 Orr H.T, Zoghbi H.Y. Trinucleotide repeat disorders // *Annu Rev Neurosci.* -2007. - Vol. 30. - P. 575-621.
- 35 Bennett E.J., Shaler T.A., Woodman B., Ryu K.Y, Zaitseva T.S., Becker C.H., Bates G.P., Schulman H., Kopito R.R. Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease // *Nature.* - 2007. - Vol. 448, № 7154. - P.704-8.
- 36 Margulis B.A., Vigont V., Lazarev V.F., Kaznacheyeva E.V., Guzhova I.V. Pharmacological protein targets in polyglutamine diseases: mutant polypeptides and their interactors // *FEBS Lett.* - 2013. - Vol. 587. - P.1997-2007.
- 37 Zoghbi H.Y., Orr H.T. Polyglutamine diseases: protein cleavage and aggregation // *Curr Opin Neurobiol.* - 1999. - Vol. 5. - P. 566-70.
- 38 Peter O. Bauer N. The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies // *Journal of Neurochemistry.* - 2009. - Vol.110. - P.1737-1765.
- 39 Fan H.C., Ho L.I., Chi C.S., Chen S.J., Peng G.S., Chan T.M., Lin S.Z., Harn H.J. Polyglutamine (PolyQ) diseases: genetics to treatments // *Cell Transplant.* - 2014. - Vol. 23. - P.441-58.
- 40 Huang M., Verbeek D.S. Why do so many genetic insults lead to Purkinje cell degeneration and spinocerebellar ataxia? // *Neurosci Lett.* - 2018. - Vol. 18. - P. 30080-30086.
- 41 Paulson H.L., Shakkottai V.G., Clark H.B., Orr H.T. Polyglutamine spinocerebellar ataxias—from genes to potential treatments // *Nat Rev Neurosci.* - 2017. - Vol.18, № 10. - P.613-626.
- 42 Durr A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: Polyglutamine expansions and beyond // *Lancet Neurol.* - 2010. - Vol. 9, № 9. - P. 885-894.
- 43 Wojciechowska M., Krzyzosiak W.J. Cellular toxicity of expanded RNA repeats: focus on RNA foci // *Hum Mol Genet.* - 2011. - Vol. 20. - P. 3811-3821.
- 44 Matilla-Duenas A., Sanchez I., Corral-Juan M., Davalos A., Alvarez R., Latorre P. Cellular and molecular pathways triggering neurodegeneration in the spinocerebellar ataxias // *Cerebellum.* - 2010. - Vol. 9. - P.148-166.
- 45 Mushegian A.R., Bassett D.E., Jr, Boguski M.S., Bork P., Koonin E.V. Positionally cloned human disease genes: patterns of evolutionary conservation and functional motifs // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 1997. - Vol. 94. - P. 5831-5836.
- 46 Yang S., Li X.J., Li S. Molecular mechanisms underlying Spinocerebellar Ataxia 17 (SCA17) pathogenesis // *Rare Dis.* - 2016. - Vol. 4. - P. e1223580.
- 47 Sullivan R., Yau W.Y., O'Connor E., Houlden H. Spinocerebellar ataxia: an update // *Journal of neurology.* - 2019. - Vol. 266. - P.533-544.
- 48 Chintawar S., Hourez R., Ravella A., Gall D., Orduz D., Rai M., Bishop D. P., Geuna S., Schiffmann S. N. Pandolfo M. Grafting neural precursor cells promotes functional recovery in an SCA1 mouse model // *J. Neurosci.* - 2009. - Vol. 29. - P. 13126-13135.
- 49 Watase K., Gatchel J. R., Sun Y., Emamian E., Atkinson R., Richman R. Lithium therapy improves neurological function and hippocampal dendritic arborization in a spinocerebellar ataxia type 1 mouse model // *PLoS Med.* - 2007. - Vol. 4. - P. e182.

- 50 Paulson H. Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3 // Handbook of clinical neurology. - 2012. - Vol. 103. - P. 437-449.
- 51 Todd P. K., Paulson H. L. RNA-mediated neurodegeneration in repeat expansion disorders // Ann. Neurol. - 2010. - Vol. 67. - P. 291-300.
- 52 Carlos A. Matos Luís Pereira de Almeida., Clévio Nóbrega. Machado–Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: lessons from disease pathogenesis and clues into therapy // Journal of Neurochemistry. - 2022. - Vol. 161, № 5. -P.1-14.
- 53 Costa Mdo C., Paulson, H. L. Toward understanding Machado-Joseph disease // Prog. Neurobiol. - 2012. - Vol. 97. - P. 239-257.
- 54 Klockgether T., Mariotti C., Paulson H. L. Spinocerebellar ataxia // Nat. Rev. Dis. Primers. - 2019. - Vol.5. - P. 24.
- 55 Ghosh R., Tabrizi S. J. Huntington disease // Handb. Clin. Neurol. - 2018. - Vol. 147. - P. 255–278.
- 56 Pringsheim T., Wiltshire K., Day L., Dykeman J., Steeves T., Jette N. The incidence and prevalence of Huntington’s disease: a systematic review and meta-analysis // Mov Disord. - 2012. -Vol. 27. - P. 1083-91.
- 57 Boland B., Yu W. H., Corti O., Mollereau B., Henriques A., Bezard E. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. - 2018. -Vol. 9. - P.660-688.
- 58 Pan L., Feigin A. Huntington's Disease: New Frontiers in Therapeutics // Curr Neurol Neurosci Rep. - 2021. - Vol.21. - P.10.
- 59 Mahalingam S., Levy L.M. Genetics of Huntington disease // AJNR Am J Neuroradiol. - 2014. - Vol. 35(6). - P.1070-2.
- 60 Myers R.H. Huntington's disease genetics // NeuroRx. - 2004. Vol. 1. - P.255-62.
- 61 Caviston J.P., Holzbaur E.L. Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking // Trends Cell Biol. - 2009. - Vol.19(4). - P.147-55.
- 62 Seefelder M., Klein F., Landwehrmeyer B., Fernández-Busnadiego R., Kochanek S. Huntingtin and Its Partner Huntingtin-Associated Protein 40: Structural and Functional Considerations in Health and Disease // J Huntingtons Dis. - 2022. – Vol. 11 (3). - P. 227-242.
- 63 Reiner A., Dragatsis I., Dietrich P. Genetics and neuropathology of Huntington's disease // Int Rev Neurobiol. - 2011. - Vol.98. - P. 325-72.
- 64 Jimenez-Sanchez M., Licitra F., Underwood B.R., Rubinsztein D.C. Huntington's Disease: Mechanisms of Pathogenesis and Therapeutic Strategies // Cold Spring Harb Perspect Med. - 2017. - Vol.7(7). - P. a024240.
- 65 Landles C., Bates G.P. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series // EMBO Rep. - 2004 - Vol. 5(10). - P.958-63.
- 66 Machiela E., Southwell A.L. Biological Aging and the Cellular Pathogenesis of Huntington's Disease // J Huntingtons Dis. - 2020. - Vol. 9(2). - P. 115-128.
- 67 Aguiar S., van der Gaag B., Cortese F. RNAi mechanisms in Huntington's disease therapy: siRNA versus shRNA // Transl Neurodegener. - 2017. - Vol.6. - P.30.

- 68 Dong X., Cong S. MicroRNAs in Huntington's Disease: Diagnostic Biomarkers or Therapeutic Agents? // *Front Cell Neurosci.* - 2021. - Vol. 15. - P. 705348.
- 69 Alkanli S.S., Alkanli N., Ay A., Albeniz I. CRISPR/Cas9 Mediated Therapeutic Approach in Huntington's Disease // *Mol Neurobiol.* - 2023 - Vol. 60(3). -P.1486-1498.
- 70 Veneziano L., Marina F. DRPLA. Seattle, WA // NCBI. GeneReviews. - 2016.
- 71 Hasegawa A., Ikeuchi T., Koike R., Matsubara N., Tsuchiya M., Nozaki H. Long-term disability and prognosis in dentatorubral-pallidoluysian atrophy: a correlation with CAGrepeat length // *Mov Disord.* - 2010. - Vol. 25. - P. 1694–1700.
- 72 Carroll Liam S et al. Dentatorubral-pallidoluysian Atrophy: An Update. Tremor and other hyperkinetic movements (New York, N.Y.). - 2018. - Vol. 8. - P. 577.
- 73 Rinaldi, C., Bott, L. C., Fischbeck, K. H. Muscle matters in Kennedy's disease // *Neuron.* - 2014. - Vol. 82. - P. 251-253.
- 74 Querin G., Sorarù GP-FP. Kennedy disease (X-linked recessive bulbospinal neuronopathy): a comprehensive review from pathophysiology to therapy // *Rev Neurol.* - 2017. - Vol. 5204. - P. 243-360.
- 75 Grunseich C., Fischbeck K.H. Molecular pathogenesis of spinal bulbar muscular atrophy (Kennedy's disease) and avenues for treatment // *Curr Opin Neurol.* -2020. -Vol. 5. - P. 629-634.
- 76 Ciaccio C., Fontana L., Milani D., Tabano S., Miozzo M., Esposito S. Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses // *Italian journal of pediatrics.* - 2017. - Vol. 43. - P. 39.
- 77 Macpherson J.N, Murray A. Development of Genetic Testing for Fragile X Syndrome and Associated Disorders and Estimates of the Prevalence of FMR1 Expansion Mutations // *Genes (Basel).* -2016. -Vol. 7. - P.12.
- 78 Kshatri A., Cerrada A., Gimeno R., Bartolomé-Martín D., Rojas P., Giraldez T. Differential regulation of BK channels by fragile X mental retardation protein // *J Gen Physiol.* - 2020. - Vol. 152, № 5. - P.1-19.
- 79 Orsucci D., Lorenzetti L., Baldinotti F., Rossi A., Vitolo E., Gheri F.L., Napolitano A., Tintori G., Vista M. Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS): A Gender Perspective // *Journal of clinical medicine.* - 2022. - Vol. 11. P.1002.
- 80 Berry-Kravis E., Abrams L., Coffey SM., Hall D.A., Greco C., Gane L.W., Grigsby J., Bourgeois J.A., Finucane B., Jacquemont S., Brunberg J.A., Zhang L., Lin J., Tassone F., Hagerman P.J., Hagerman R.J., Leehey M.A. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: clinical features, genetics, and testing guidelines // *Mov Disord.* - 2007. - Vol. 22(14). - P.2018-30.
- 81 Crawford D.C., Meadows K.L., Newman J.L., Taft L.F., Pettay D.L., Gold L.B., Hersey S.J., Hinkle E.F., Stanfield M.L., Holmgreen P., Yeargin-Allsopp M., Boyle C., Sherman S.L. Prevalence and phenotype consequence of FRAXA and

FRAAXE alleles in a large, ethnically diverse, special education-needs population // *Am J Hum Genet.* - 1999. - Vol.64. - P.495-507.

82 González-del Angel A., Vidal S., Saldaña Y., del Castillo V., Angel Alcántara M, Macías M., Pedro Luna J., Orozco L. Molecular diagnosis of the fragile X and FRAAXE syndromes in patients with mental retardation of unknown cause in Mexico // *Ann Genet.* - 2000. - Vol. 43. - P.29-34.

83 Clay A., Hearle P., Schadt K., Lynch D.R. New developments in pharmacotherapy for Friedreich ataxia // *Expert Opin Pharmacother.* - 2019. - Vol. 20. - P. 1855-1867.

84 Galea C.A, Huq A., Lockhart P.J., et al. Compound heterozygous FXN mutations and clinical outcome in Friedreich ataxia // *Ann Neurol.* - 2016. - Vol. 79. - P.485-495.

85 Ashley C.N., Hoang KD., Lynch DR., Perlman S.L., Maria B.L. Childhood ataxia: clinical features, pathogenesis, key unanswered questions, and future directions // *J Child Neurol.* - 2012. - Vol. 27. - P.1095-1120.

86 Hahn C., Salajegheh M.K. Myotonic disorders: A review article // *Iran J Neurol.* - 2016. - Vol.15. - P.46-53.

87 Lanni S., Pearson C.E. Molecular genetics of congenital myotonic dystrophy // *Neurobiol Dis.* - 2019. - Vol. 132. - P.104533.

88 Moseley M.L., Zu T., Ikeda Y., Gao W., Mosemiller A.K., Daughters R.S., Chen G., Weatherspoon M.R., Clark H.B., Ebner T.J., et al. Bidirectional expression of CUG and CAGexpansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8 // *Nat Genet.* - 2006. - Vol.38. - P. 758-769.

89 Perez B.A., Shorrock H.K., Banez-Coronel M., Zu T., Romano L.E., Laboissonniere L.A. CCG - CGG interruptions in high-penetrance SCA8 families increase RAN translation and protein toxicity // *EMBO Mol Med.* - 2021. - Vol. 13. - P. e14095.

90 Sawada J., Katayama T., Tokashiki T., Kikuchi S., Kano K., Takahashi K., Saito T., Adachi Y., Okamoto Y., Yoshimura A., Takashima H., Hasebe N. The First Case of Spinocerebellar Ataxia Type 8 in Monozygotic Twins // *Intern Med.* - 2020. - Vol.59. - P. 277-283.

91 Everett C.M., Wood N.W. Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease // *Brain.* - 2004. - Vol. 127. - P. 2385-405.

92 Dong X., Cong S. The Emerging Role of microRNAs in Polyglutamine Diseases // *Frontiers in molecular neuroscience.* - 2019. - Vol. 12. - P. 156.

93 Suzuki H.I. Roles of MicroRNAs in Disease Biology // *JMA J.* - 2023. - Vol. 6. - P.104-113.

94 O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front // Endocrinol.* - 2018; - Vol. 9. - P. 402.

95 Broughton J.P., Lovci M.T., Huang J.L., Yeo G.W., Pasquinelli A.E. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity // *Mol Cell.* - 2016. - Vol. 64. - P.320-33.

- 96 Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function // *Nucleic Acids Res.* - 2019. - Vol. 47. - P.155-162.
- 97 Lee R.C., Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans* // *Science.* - 2001. - Vol. 294. - P. 862-4.
- 98 Reinhart B.J., Weinstein E.G., Rhoades M.W., Bartel B., Bartel D.P. MicroRNAs in plants // *Genes Dev.* - 2002. - Vol. 16. - P. 1616-26.
- 99 Bersimbaev R, Bulgakova O, Aripova A, Kussainova A, Ilderbayev O. Role of microRNAs in Lung Carcinogenesis Induced by Asbestos. *J Pers Med.* 2021 Feb 3;11(2):97. doi: 10.3390/jpm11020097. PMID: 33546236; PMCID: PMC7913345.
- 100 Budak H., Bulut R., Kantar M., Alptekin B. MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription // *Brief Funct Genomics.* - 2016. - Vol. 15. - P. 65-71.
- 101 Ambros V., Bartel B., Bartel D.P., Burge C.B., Carrington J.C, Chen X., Dreyfuss G., Eddy S.R., Griffiths-Jones S., Marshall M., Matzke M., Ruvkun G., Tuschl T. A uniform system for microRNA annotation // *RNA.* - 2003. - Vol. 9. - P. 277-9.
- 102 Enright A.J., Griffiths-Jones S. miRBase: a database of microRNA sequences, targets and nomenclature. In: Appasani K. *MicroRNAs: From Basic Science to Disease Biology* // Cambridge University Press. - 2008. - Vol. 157-171.
- 103 Kim V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2005. - Vol. 6. - P. 376-385.
- 104 Kim Y.K., Kim V.N. Processing of intronic microRNAs // *EMBO J.* - 2007. - Vol. 26. - P. 775–83.
- 105 Han J., Lee Y., Yeom K. H., Kim Y. K., Jin H., Kim V. N. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing // *Genes Dev.* - 2004. – Vol. 18. – P. 3016-3027.
- 106 Yi R., Qin Y., Macara, I.G., Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs // *Genes Dev.* - 2003. - Vol. 17. - P. 3011-3016.
- 107 Park J.E., Heo I., Tian Y., Simanshu D.K., Chang H., Jee D., Patel D.J., Kim V.N. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing // *Nature.* - 2011. - Vol. 13. - P.201-5.
- 108 Weng Y.T., Chang Y.M., Chern Y. The Impact of Dysregulated MicroRNA Biogenesis Machinery and microRNA Sorting on Neurodegenerative Diseases // *Int J Mol Sci.* - 2023. - Vol. 24. - P. 3443.
- 109 Lee Y.S., Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene // *Genes Dev.* - 2007. - Vol. 21. - P.1025-1030.
- 110 Wang T., Zhang X., Obijuru L., Laser J., Aris V., Lee P., Mittal K, Soteropoulos P., Wei JJ. A micro-RNA signature associated with race tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2007. - Vol. 46. - P.336-347.
- 111 Nelson P.T., Wang W.X., Rajeev B.W. MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases // *Brain Pathol.* - 2008. - Vol. 18. - P.130-138.

- 112 Hansen T., Olsen L., Lindow M., Jakobsen K.D., Ullum H., Jonsson E., Andreassen O.A., Djurovic S., Melle I., Agartz I., Hall H., Timm S., Wang A.G., Werge T. Brain expressed microRNAs implicated in schizophrenia etiology // PLoS ONE. - 2007. - Vol.2. - P. e873.
- 113 Schanen B.C., Li X. Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes // Genomics. - 2011. - Vol. 97. - P. 1-6.
- 114 Biggar K.K., Storey K.B. Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals // J Exp Biol. - 2015. - Vol. 218. - P. 1281-9.
- 115 Hammond S.M. An overview of microRNAs // Adv Drug Deliv Rev. - 2015. - Vol. 87. - P.3-14.
- 116 Valencia-Sanchez M.A., Liu J., Hannon G.J, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs // Genes Dev. - 2006. - Vol. 20. - P.515-24.
- 117 Oliveira C., Faoro H., Alves L.R., Goldenberg S. RNA-binding proteins and their role in the regulation of gene expression in *Trypanosoma cruzi* and *Saccharomyces cerevisiae* // Genet Mol Biol. - 2017. - Vol. 40. - P. 22-30.
- 118 Lee R., Feinbaum R., Ambros V. A short history of a short RNA // Cell. - 2004. - Vol. 116. - P. 89-92.
- 119 Chen J.F., Mandel E.M., Thomson J.M., Wu Q., Callis T.E., Hammond S.M., Conlon F.L., Wang D.Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation // Nat. Genet. - 2006. - Vol. 38. - P. 228-233.
- 120 Jiao X., Qian X., Wu L., Li B., Wang Y., Kong X., Xiong L. microRNA: the impact on cancer stemness and therapeutic resistance // Cells. - 2019. - Vol. 9. - P.8.
- 121 Baskerville S., Bartel D.P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes // RNA. - 2005. - Vol. 11. - P. 241-247.
- 122 Sevignani C., Calin G.A., Siracusa L.D., Croce C.M. Mammalian micro RNAs: a small world for fine-tuning gene expression // Mamm Genome. -2006. -Vol. 17. -P. 189-202.
- 123 Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engele P., Grimson A., Schelter J.M., Castle J., et al. Microarray analysis shows that some microRNAs down-regulate large numbers of target mRNAs // Nature. - 2005. - Vol. 433. - P. 769-773.
- 124 Mattick J.S., Makunin I.V. Small regulatory RNAs in mammals // Hum Mol Genet. - 2005. - Vol.14. - P. 121-132.
- 125 Ardekani A.M., Naeini M.M. The Role of MicroRNAs in Human Diseases // Avicenna J Med Biotechnol. - 2010. - Vol. 2, № 4. - P. 161-79.
- 126 Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function // Cell. - 2004. - Vol. 116, № 2. - P. 281-297.
- 127 Soifer H.S., Rossi J.J., Sætrom P. MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications // Mol Ther. - 2007. - Vol.15. - P.2070-2079.
- 128 Moslemi Naeini M., Ardekani A.M. Noncoding RNAs and Cancer // Avicenna J Med Biotech. - 2009. - Vol. 1. - P.55-70.

- 129 Zhang B., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A. Micro RNAs as oncogenes and tumor suppressors // *Dev Biol.* - 2007. - Vol. 302. - P. 1-12.
- 130 Aprile M., Costa V., Cimmino A., Calin G.A. Emerging role of oncogenic long noncoding RNA as cancer biomarkers // *Int J Cancer.* - 2023. - Vol. 152. - P. 822-834.
- 131 Ikeda S., Kong S.W., Lu J., Bisping E., Zhang H., Allen P.D., Golub T.R., Pieske B., Pu W.T. Altered microRNA expression in human heart disease // *Physiol Genomics.* - 2007. - Vol. 31. - P.367-73.
- 132 Zhao Y., Samal E., Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis // *Nature.* - 2005. - Vol. 436. - P.214-220.
- 133 Shi Y., Shang J. Circular RNA Expression Profiling by Microarray-A Technical and Practical Perspective // *Biomolecules.* - 2023. - Vol. 13. - P. 679.
- 134 Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies // *Nucleic. Acids. Res.* - 2015. - Vol. 43. - P.: e47.
- 135 agos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A., Meyer J., Lendeckel W., Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse // *Curr Biol.* - 2002. - Vol. 12. - P. 735-739.
- 136 Harris T.A., Yamakuchi M., Ferlito M., Mendell J.T., Lowenstein C.J. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2008. 105. - P. 1516-1521.
- 137 Chen C.Z, Li L., Lodish H.F., Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation // *Science.* - 2004. - Vol. 303. - P. 83–86.
- 138 Ventura A., Young A.G, Winslow M.M., Lintault L., Meissner A., Erkland S.J., et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters // *Cell.* - 2008. - Vol. 132. - P. 875-886.
- 139 Zhou B., Wang S., Mayr C., Bartel D.P., Lodish H.F. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2007. - Vol. 104. - P. 7080-7085.
- 140 Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution // *Nat. Rev. Genet.* - 2004. -Vol. 5. - P. 435-445.
- 141 McMurray C.T. Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development // *Nat Rev Genet.* – 2010. – Vol. 11. – P. 786-99.
- 142 Ruby J.G., Jan C., Player C., Axtell M.J., Lee W., Nusbaum C., Ge H., Bartel D.P. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans* // *Cell.* - 2006. - 127. - P. 1193-207.
- 143 Landgraf P et al., mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing // *Cell.* - 2007. - Vol. 129. - P. 1401-14.
- 144 Persengiev S.P., Kondova I., Bontrop R.E. The Impact of MicroRNAs on Brain Aging and Neurodegeneration // *Curr Gerontol Geriatr Res.* - 2012. - Vol. 2012. - P. 359369.
- 145 Hébert S.S, De Strooper B. Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease // *Trends Neurosci.* - 2009. - Vol. 32. - P. 199-206.

- 146 Latronico M.V., Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology // *Nat Rev Cardiol.* - 2009. - Vol. 6. - P. 419-29.
- 147 Melo S.A., Esteller M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire // *FEBS Lett.* - 2011. - Vol. 585. - P. 2087- 99.
- 148 Wu H. Z. Y., Ong K. L., Seeher K., Armstrong N. J., Thalamuthu A., Brodaty H., et al. Circulating microRNAs as biomarkers of Alzheimer's disease: a systematic review // *J. Alzheimers Dis.* - 2016. - Vol. 49. -P. 755-766.
- 149 Cao D.D., Li L., Chan W.Y. MicroRNAs: Key Regulators in the Central Nervous System and Their Implication in Neurological Diseases // *Int J Mol Sci.* - 2016. - Vol. 17. - P. 842.
- 150 Koscianska E., Kozłowska E., Jaworska E., Krzyzosiak W. MicroRNA Dereglulation in Trinucleotide Repeat Expansion Disorders // In: Patrick A, Marc S, editors. *Applied RNAi: From Fundamental Research to Therapeutic Applications.* Weinberg: Caister Academic Press. - 2014. - P. 227-246.
- 151 Lee Y., Samaco R. C., Gatchel J. R., Thaller C., Orr H. T., Zoghbi H. Y. miR-19, miR-101 and miR-130 co-regulate ATXN1 levels to potentially modulate SCA1 pathogenesis // *Nat. Neurosci.* - 2008. - Vol. 11. - P. 1137-1139.
- 152 Persengiev S., Kondova I., Otting N., Koeppen A. H., Bontrop R. E. Genome-wide analysis of miRNA expression reveals a potential role for miR-144 in brain aging and spinocerebellar ataxia pathogenesis // *Neurobiol. Aging* 32. - 2011. - Vol. - P. 2316.e17-2316.e27.
- 153 Rodriguez-Lebron E., Liu G., Keiser M., Behlke M. A., Davidson B. L. Altered Purkinje cell miRNA expression and SCA1 pathogenesis. *Neurobiol.* - 2013. - Vol. 54. - P. 456-463.
- 154 McCann C., Holohan E. E., Das S., Dervan A., Larkin A., Lee, J. A., et al. The Ataxin-2 protein is required for microRNA function and synapse-specific long-term olfactory habituation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2011. - Vol. 108. - P.655-662.
- 155 Reinhardt A., Feuillette S., Cassar M., Callens C., Thomassin H., Birman S., Lecourtois M., Antoniewski C., Tricoire H. Lack of miRNA Misregulation at Early Pathological Stages in Drosophila Neurodegenerative Disease Models // *Front Genet.* -2012. - Vol. 3. - P. 226.
- 156 Roshan, R., Choudhary, A., Bhambri, A., Bakshi, B., Ghosh, T., and Pillai, B. microRNA dysregulation in polyglutamine toxicity of TATA-box binding protein is mediated through STAT1 in mouse neuronal cells // *J. Neuroinflammation.* - 2017. - Vol. 140. - P.155.
- 157 Das E., Jana N. R., Bhattacharyya N. P. MicroRNA-124 targets CCNA2 and regulates cell cycle in STHdh(Q121)/Hdh(Q121) cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2013. - Vol. 437. - P. 217-224.
- 158 Roshan R., Ghosh T., Gadgil M., Pillai B. Regulation of BACE1 by miR-29a/b in a cellular model of spinocerebellar ataxia 17 // *RNA Biol.* - 2012. - Vol. 9. - P. 891-899.
- 159 McCann C., Holohan E.E., Das S., Dervan A., Larkin A., Lee J.A., Rodrigues V., Parker R., Ramaswami M. The Ataxin-2 protein is required for

microRNA function and synapse-specific long-term olfactory habituation. *Proc // Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2011. - Vol. 1080. - P. 655-662.

160 Harper S.Q. Progress and challenges in RNA interference therapy for Huntington disease // *Arch. Neurol.* - 2009. - Vol. 66. - P. 933-938.

161 Zuccato C., Belyaev N.D., Guest D.J., Cattaneo E., Buckley N.J. A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease // *Neurobiol. Dis.* - 2008. - Vol. 29. - P. 438-445.

162 Packer A.N., Xing Y., Harper S.Q., Jones L., Davidson B.L. The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease // *J Neurosci.* - 2008. - Vol. 28. - P. 14341-6.

163 Cuperus J.T., Fahlgren N., Carrington J.C. Evolution and functional diversification of MIRNA genes // *Plant Cell.* - 2011. - Vol. 23. - P. 431-42.

164 Wu J., Xie X. Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression // *Genome Biol.* - 2006. - Vol. 7. - P. 85.

165 Ridolfi B., Abdel-Haq H. Neurodegenerative disorders treatment: The MicroRNA role // *Curr. Gene Ther.* - 2017. - Vol. 17. - P. 327-363.

166 Jovicic A., Zaldivar Jolissaint J. F., Moser R., Silva Santos Mde F., Luthi-Carter, R. MicroRNA-22 (miR-22) overexpression is neuroprotective via general anti-apoptotic effects and may also target specific huntington's disease-related mechanisms // *PLoS One.* - 2013. - Vol. 8. - P. e54222.

167 Soldati C., Bithell A., Johnston C., Wong K.Y., Stanton L.W., Buckley N.J. Dysregulation of REST-regulated coding and non-coding RNAs in a cellular model of Huntington's disease // *J. Neurochem.* - 2013. - Vol. 124. - P. 418-430.

168 Chang K.-H., Wu Y.-R., Chen C.-M. Down-regulation of miR-9*in the peripheral leukocytes of Huntington's disease patients // *Orphanet J. Rare Dis* - 2017. -Vol. 12. - P.185.

169 Martí E., Pantano L., Bañez-Coronel M., Llorens F., Miñones-Moyano E., Porta, S. A myriad of miRNA variants in control and Huntington's disease brain regions detected by massively parallel sequencing // *Nucleic Acids Res.* - 2010. - Vol. 38. - P. 7219-7235.

170 Johnson R., Buckley N. J. Gene dysregulation in huntington's disease: REST, microRNAs and beyond // *Neuromolecular Med.* - 2009. - Vol. 11. - P. 183-199.

171 Riley B.E., Orr H.T. Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: Assembling the puzzle // *Genes Dev.* - 2006. - Vol. 20. - P. 2183-2192.

172 Suzuki Y., Yazawa I. Pathological accumulation of atrophin-1 in dentatorubralpallidoluysian atrophy // *Int J Clin Exp Pathol.* - 2011. - Vol. 4. - P. 378-84.

173 Huang Y., Shen X. J., Zou Q., Zhao Q. L. Biological functions of microRNAs // *Bioorg. Khim.* - 2010. - Vol. 36. - P. 747-752.

- 174 La Spada A.R., Wilson E. M., Lubahn D. B., Harding A. E., Fischbeck K. H. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*. - 1991. - Vol. 352. - P. 77-79.
- 175 Miyazaki Y., Adachi H., Katsuno M., Minamiyama M., Jiang Y.M., Huang, Z. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2 // *Nat Med*. - 2012. - Vol. 18. - P. 1136-1141.
- 176 Pourshafie N., Lee P. R., Chen K.-L., Harmison G. G., Bott L. C., Katsuno M. MiR-298 counteracts mutant androgen receptor toxicity in spinal and bulbar muscular atrophy // *Mol. Ther*. - 2016. - Vol. 24. - P. 937-945.
- 177 Consortium TD-BFX: Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation // *Cell*. - 1994. - Vol. 78. - P. 23-33.
- 178 Edbauer D., Neilson J., Foster K., Wang C., Seeburg D., Batterton M., Tada T., Dolan B., Sharp P., Sheng M. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132 // *Neuron*. - 2010. - Vol. 65. - P. 373-384.
- 179 Gong X., Wang Y., Zeng J., Li S., Luo Y. Computational identification and experimental validation of microRNAs binding to the fragile X syndrome gene Fmr1 // *Neurochem. Res*. - 2015. - Vol. 40. - P. 109-117.
- 180 DeMarco B., Stefanovic S., Williams A., Moss K., Anderson B., Bassell G., Mihailescu M. FMRP-G-quadruplex mRNA-miR-125a interactions: Implications for miR-125a mediated translation regulation of PSD-95 mRNA // *PLoS ONE*. - 2019. - Vol. 14. - P. e0217275.
- 181 Jin P., Alisch R.S., Warren S.T. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation // *Nat. Cell Biol*. - 2004. - Vol. 6. - P. 1048-1053.
- 182 Cheever A., Ceman S. Translation regulation of mRNAs by the fragile X family of proteins through the microRNA pathway. *RNA Biol*. - 2009. - Vol. 6. - P. 175-178.
- 183 Caudy A.A., Myers M., Hannon G.J., Hammond S.M. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery // *Genes Dev*. - 2002. - Vol. 16. - P. 2491-2496.
- 184 Plante I., Davidovic L., Ouellet D. L., Gobeil L.A., Tremblay S., Khandjian E.W., Provost P. Dicer-derived microRNAs are utilized by the fragile X mental retardation protein for assembly on target RNAs // *J. Biomed. Biotechnol*. - 2006. - Vol. 2006. - P. 64347.
- 185 Perron M.P., Provost P. Protein components of the microRNA pathway and human diseases // *Methods Mol. Biol*. - 2009. - Vol. 487. - P. 369-385.
- 186 Groh W.J., Groh M.R., Shen C., Monckton D.G., Bodkin C.L., Pascuzzi R.M. Survival and CTG repeat expansion in adults with myotonic dystrophy type 1 // *Muscle Nerv*. - 2011. - Vol. 43. - P. 648-651.
- 187 Logigian E.L., Moxley R.T., Blood C.L., Barbieri C.A., Martens W.B., Wiegner A.W., Thornton C.A., Moxley R.T. Leukocyte CTG repeat length correlates with severity of myotonia in myotonic dystrophy type 1 // *Neurology*. - 2004. - Vol. 62. - P. 1081-1089.

188 Sicot G., Gourdon G., Gomes-Pereira M. Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: New findings and future challenges // *Hum. Mol. Genet.* - 2011. - Vol. 20. - P. 116-R123.

189 Mahadevan M.S. Myotonic dystrophies: Is a narrow focus obscuring the rest of the field? // *Curr. Opin. Neurol.* - 2012. - Vol. 25. - P. 609-613.

190 Zu T., Gibbens B., Doty N.S., Gomes-Pereira M., Huguet A., Stone M.D., Margolis J., Peterson M., Markowski T.W., Ingram M.A.C. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2011. - Vol.108. - P. 260-265.

191 Gambardella S., Rinaldi F., Lepore S.M., Viola A., Loro E., Angelini C., Vergani L., Novelli G., Botta A. Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients // *J. Transl. Med.* - 2010. - Vol. 8. - Vol. 48.

192 Hon L.S., Zhang Z. The roles of binding site arrangement and combinatorial targeting in microRNA repression of gene expression // *Genome Biol.* - 2007. - Vol. 8. - Vol. 166.

193 Yuasa K., Hagiwara Y., Ando M., Nakamura A., Takeda S., Hijikata T. MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: Implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy // *Cell Struct. Funct.* - 2008. - Vol. 33. - P. 163-169.

194 Koehorst E, Ballester-Lopez A, Arechavala-Gomez V, Martínez-Piñeiro A, Nogales-Gadea G. The Biomarker Potential of miRNAs in Myotonic Dystrophy Type I // *J Clin Med.* - 2020. - Vol. 9. - P. 3939.

195 Calin G.A., Croce C.M. MicroRNA signatures in human cancers // *Nat Rev Cancer.* - 2006. - Vol. 6. - P. 857-866.

196 Vasu S., Kumano K., Darden C.M., Rahman I., Lawrence M.C., Naziruddin B. MicroRNA Signatures as Future Biomarkers for Diagnosis of Diabetes States // *Cells.* - 2019. - Vol. 28. - P. 1533.

197 Çakmak H.A., Demir M. MicroRNA and Cardiovascular Diseases // *Balkan Med J.* - 2020. - Vol. 37. - P. 60-71.

198 Grasso M., Piscopo P., Confaloni A., Denti MA. Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders // *Molecules.* - 2014. - 19. - P. 6891-910.

199 Boivin M., Charlet-Berguerand N. Trinucleotide CGG Repeat Diseases: An Expanding Field of Polyglycine Proteins? // *Front Genet.* - 2022. - 13. - P. 843014.

200 Zhao Y., Jaber V., Alexandrov P.N., Vergallo A., Lista S., Hampel H., Lukiw W.J. microRNA-Based Biomarkers in Alzheimer's Disease (AD) // *Front Neurosci.* - 2020. - Vol. 14. - P. 585432.

201 Pan., Y., Liu R., Terpstra E., Wang Y., Qiao F., Wang J. Dysregulation and diagnostic potential of microRNA in Alzheimer's disease // *J. Alzheimers. Dis.* - 2016. - Vol. 49. - P. 1-12.

202 Diez-Planelles C., Sanchez-Lozano P., Crespo M. C., Gil-Zamorano, J., Ribacoba R., Gonzalez N. Circulating microRNAs in Huntington's disease: Emerging mediators in metabolic impairment // *Pharmacol. Res.* - 2016. - Vol. 108. - P. 102-110.

- 203 Chang K. H., Wu Y. R., Chen C. M. Down-regulation of miR-9* in the peripheral leukocytes of Huntington's disease patients // *Orphanet J. Rare Dis.* - 2017. - Vol. 12. - P. 185.
- 204 Gaughwin P. M., Ciesla M., Lahiri N., Tabrizi S. J., Brundin P., Bjorkqvist, M. Hsa-miR-34b is a plasma-stable microRNA that is elevated in pre-manifest Huntington's disease // *Hum. Mol. Genet.* - 2011. - Vol. 20. - P. 2225-2237.
- 205 Hoss A. G., Kartha V. K., Dong X., Latourelle J. C., Dumitriu A., Hadzi T. C. MicroRNAs located in the Hox gene clusters are implicated in huntington's disease pathogenesis // *PLoS Genet.* - 2014. - Vol.10. - P. e1004188.
- 206 Hoss A.G., Labadorf A., Latourelle J. C., Kartha V. K., Hadzi T. C., Gusella J. F. MiR-10b-5p expression in Huntington's disease brain relates to age of onset and the extent of striatal involvement // *BMC Med. Genomics.* - 2015. - Vol. 8. - P.10.
- 207 Hoss A. G., Lagomarsino V. N., Frank S., Hadzi T. C., Myers R. H., Latourelle J. C. Study of plasma-derived miRNAs mimic differences in Huntington's disease brain // *Mov. Disord.* - 2015. - Vol. 30. -P. 1961-1964.
- 208 Yu Y., Xiao J., Hann SS. The emerging roles of PIWI-interacting RNA in human cancers // *Cancer Manag Res.* - 2019. - Vol. 28. - Vol. 11. - P. 5895-5909.
- 209 Girard A., Sachidanandam R., Hannon G.J., Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins // *Nature.* - 2006. - Vol. 442. - P. 199-202.
- 210 Vagin V.V., Sigova A., Li C., Seitz H., Gvozdev V., Zamore P.D. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline // *Science.* - 2006. - P. 313. - P. 320-324.
- 211 Höck J., Meister G. The Argonaute Protein Family // *Genome Biol.* - 2008. - Vol. 9. - P.
- 212 Peng J.C., Lin H. Beyond transposons: the epigenetic and somatic functions of the Piwi-piRNA mechanism // *Curr Opin Cell Biol.* - 2013. - Vol. 25. - P. 190-194.
- 213 Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data // *Nucleic Acids Res.* - 2014. - Vol. 42. - P. 68-73.
- 214 Weng W., Li H., Goel A. Piwi-interacting RNAs (piRNAs) and Cancer: Emerging Biological Concepts and Potential Clinical Implications. *Biochim. Biophys // Acta Rev. Cancer.* - 2019. – Vol. 1871. – P. 160–169.
- 215 Williams Z., Morozov P., Mihailovic A. Discovery and characterization of piRNAs in the human fetal ovary // *Cell Rep.* - 2015. -Vol. 13. - P. 854-863.
- 216 Hirakata S., Siomi M. C. piRNA Biogenesis in the Germline: From Transcription of piRNA Genomic Sources to piRNA Maturation. *Biochim. Biophys // Acta Gene Regul. Mech.* - 2016. - Vol. 1859. - P. 82-92.
- 217 Cox DN., Chao A., Lin H. piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development.* - 2000. - Vol. 127. - P. 503-514.
- 218 Brennecke J., Aravin A.A., Stark A. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila* // *Cell.* - 2007. - Vol. 128. - P. 1089-1103.

- 219 Grishok A., Tabara H., Mello C.C. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science*. - 2000. - Vol. 287. - P. 2494-2497.
- 220 Pak J., Fire A. Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science*. - 2007. - Vol. 315. - P. 241-244.
- 221 Mai D., Ding P., Tan L., Zhang J., Pan Z., Bai R., Li C., Li M., Zhou Y., Tan W., Zhou Z., Li Y., Zhou A. PIWI-interacting RNA-54265 is oncogenic and a potential therapeutic target in colorectal adenocarcinoma // *Theranostics*. - 2018. - Vol. 8. - P. 5213-30.
- 222 Kim K.W. PIWI Proteins and piRNAs in the Nervous System // *Mol Cells*. - 2019. Vol.42 (12). - P.828-835.
- 223 Sun W., Samimi H., Gamez M., Zare H., Frost B. Pathogenic tau-induced piRNA depletion promotes neuronal death through transposable element dysregulation in neurodegenerative tauopathies // *Nat Neurosci*. - 2018. - Vol.21 (8). - P.1038-1048.
- 224 Zhang T., Wong G. Dysregulation of Human Somatic piRNA Expression in Parkinson's Disease Subtypes and Stages // *Int J Mol Sci*. - 2022. - Vol.23. - P.2469.
- 225 Simonelig M. Developmental functions of piRNAs and transposable elements: a *Drosophila* point-of-view // *RNA Biol*. - 2011. - Vol. 8 (5). - P. 754-9.
- 226 Sato K, Takayama K.I, Inoue S. Role of piRNA biogenesis and its neuronal function in the development of neurodegenerative diseases // *Front Aging Neurosci*. - 2023. - Vol. 15. - P.1157818.
- 227 Huang X., Wong G. An old weapon with a new function: PIWI-interacting RNAs in neurodegenerative diseases // *Transl Neurodegener*. - 2021. - Vol. 10 (1). - P.9.
- 228 Zhang Q., Zhu Y., Cao X., Tan W., Yu J., Lu Y., Kang R., Wang X., Li E. The epigenetic regulatory mechanism of PIWI/piRNAs in human cancers // *Mol Cancer*. - 2023. - Vol. 22(1). - P. 45.
- 229 Rasheed M., Liang J., Wang C., Deng Y., Chen Z. Epigenetic Regulation of Neuroinflammation in Parkinson's Disease // *Int J Mol Sci*. - 2021. - Vol. 22 (9). - P. 4956.
- 230 Shen L., Wang C., Chen L., Wong G. Dysregulation of MicroRNAs and PIWI-Interacting RNAs in a *Caenorhabditis elegans* Parkinson's Disease Model Overexpressing Human α -Synuclein and Influence of tdp-1 // *Front Neurosci*. - 2021. - Vol. 15. - P.600462.
- 231 Riquelme I., Pérez-Moreno P., Letelier P., Brebi P., Roa J.C. The Emerging Role of PIWI-Interacting RNAs (piRNAs) in Gastrointestinal Cancers: An Updated Perspective // *Cancers (Basel)*. - 2021. - Vol. 14 (1). - P.202.
- 232 Guzzardo P.M., Muerdter F., Hannon G.J. The piRNA pathway in flies: highlights and future directions // *Curr Opin Genet Dev*. - 2013. - Vol. 23. - P. 44-52.
- 233 Wang Q.X., Zhu Y.Q., Zhang H., Xiao J. Altered MiRNA expression in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis // *Cell Physiol Biochem*. - 2015. - Vol. 35. - P. 933-944.
- 234 Feldman N., Gerson A., Fang J. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis // *Nat Cell Biol*. - 2006. - Vol. 8. - P. 188-194.

- 235 Feldman N., Gerson A., Fang J., Li E., Zhang Y., Shinkai Y., Cedar H., Bergman Y. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis // *Nat Cell Biol.* - 2006. -Vol. 8. - P. 188-94.
- 236 Wilson A.S., Power B.E., Molloy P.L. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta.* - 2007. - Vol. 1775. - P. 138-62.
- 237 Siddiqi S., Matushansky I. Piwis and piwi-interacting RNAs in the epigenetics of cancer // *J Cell Biochem.* - 2012. -Vol. 113. - P. 373-380.
- 238 Huang G., Hu H., Xue X. Altered expression of piRNAs and their relation with clinicopathologic features of breast cancer // *Clin Transl Oncol.* - 2013. - Vol. 15. - P. 563-568.
- 239 Hashim A., Rizzo F., Marchese G. RNA sequencing identifies specific PIWI-interacting small non-coding RNA expression patterns in breast cancer // *Oncotarget.* - 2014. - Vol. 5. - P. 9901-9910.
- 240 Peng L., Song L., Liu C. piR-55490 inhibits the growth of lung carcinoma by suppressing mTOR signaling // *Tumour Biol.* - 2016. - Vol. 37. - P. 2749-2756.
- 241 Reeves M.E., Firek M., Jliedi A., Amaar YG. Identification and characterization of RASSF1C piRNA target genes in lung cancer cells // *Oncotarget.* - 2017. - Vol. 8. - P. 34268-34282.
- 242 Rizzo F., Rinaldi, A., Marchese G., Coviello E., Sellitto A., Cordella A. Specific Patterns of PIWI-Interacting Small Noncoding RNA Expression in Dysplastic Liver Nodules and Hepatocellular Carcinoma // *Oncotarget* 7. - 2016. - Vol. 34. - P. 54650–54661.
- 243 Yin J., Jiang X. Y., Qi W., Ji C. G., Xie X. L., Zhang D. X. piR-823 Contributes to Colorectal Tumorigenesis by Enhancing the Transcriptional Activity of HSF 1 // *Cancer Sci.* - 2017. - Vol. 108. - P. 1746-1756.
- 244 Weng W., Liu N., Toiyama Y., Kusunoki M., Nagasaka T., Fujiwara T. Novel Evidence for a PIWI-Interacting RNA (piRNA) as an Oncogenic Mediator of Disease Progression, and a Potential Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer // *Mol. Cancer.* - 2018. - Vol. 17. - P. 16.
- 245 Lin X., Xia Y., Hu D., Mao Q., Yu Z., Zhang H. Transcriptome-Wide piRNA Profiling in Human Gastric Cancer // *Oncol. Rep.* - 2019. - Vol. 41. - P. 3089-3099.
- 246 Martinez V. D., Enfield K. S. S., Rowbotham D. A., Lam W. L. An Atlas of Gastric PIWI-Interacting RNA Transcriptomes and Their Utility for Identifying Signatures of Gastric Cancer Recurrence // *Gastric Cancer.* - 2016. – Vol. 19. – P. 660–665.
- 247 Cheng J., Guo J.-M., Xiao B.-X., Miao Y., Jiang Z., Zhou H. piRNA, the New Non-coding RNA, is Aberrantly Expressed in Human Cancer Cells // *Clinica Chim. Acta.* - 2011. - Vol. 412. - P. 1621-1625.
- 248 Cheng J., Deng H., Xiao B., Zhou H., Zhou F., Shen Z. piR-823, a Novel Non-Coding Small RNA, Demonstrates in Vitro and in Vivo Tumor Suppressive Activity in Human Gastric Cancer Cells. *Cancer Lett.* - 2012. - Vol. 315. - P. 12-17.

- 249 Ghosheh Y., Seridi L., Ryu T., Takahashi H., Orlando V., Carninci P. Characterization of piRNAs across postnatal development in mouse brain // *Sci Rep.* - 2016. - Vol. 6. - P. 25039.
- 250 Lagier-Tourenne C., Cleveland D.W. Rethinking ALS: the FUS about TDP-43 // *Cell.* - 2009. - Vol. 136. -P. 1001-1004.
- 251 Sun W., Samimi H., Gamez M., Zare H., Frost B. Pathogenic tau-induced piRNA depletion promotes neuronal death through transposable element dysregulation in neurodegenerative tauopathies // *Nat Neurosci.* - 2018. -Vol. 21. - P. 1038-1048.
- 252 Frost B., Hemberg M., Lewis J., Feany M.B. Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation // *Nat Neurosci.* - 2014. - Vol. 17. - P. 357-366.
- 253 Qiu W., Guo X., Lin X., Yang Q., Zhang W., Zhang Y., Zuo L., Zhu Y., Li C.R., Ma C., Luo X. Transcriptome-wide piRNA profiling in human brains of Alzheimer's disease // *Neurobiol. Aging.* - 2017. -Vol. 57. - P. 170-177.
- 254 Schulze M., Sommer A., Plötz S., Farrell M., Winner B., Grosch J. Sporadic Parkinson's disease derived neuronal cells show disease-specific mRNA and small RNA signatures with abundant deregulation of piRNAs // *Acta Neuropathol Commun.* - 2018. - Vol. 6. - P. 58.
- 255 Sugeno N., Jäckel S., Voigt A., Wassouf Z., Schulze-Hentrich J., Kahle P.J. α -Synuclein enhances histone H3 lysine-9 dimethylation and H3K9me2-dependent transcriptional responses // *Sci Rep.* - 2016. - Vol. 6. - P. 36328.
- 256 Roy J., Sarkar A., Parida S., Ghosh Z., Mallick B. Small RNA sequencing revealed dysregulated piRNAs in Alzheimer's disease and their probable role in pathogenesis // *Mol. Biosyst.* - 2017. - Vol. 13. - P. 565-576.
- 257 Belkozhayev A., Niyazova R., Wilson C., Jainakbayev N., Pyrkova A., Ashirbekov Y., Akimniyazova A., Sharipov K., Ivashchenko A. Bioinformatics Analysis of the Interaction of miRNAs and piRNAs with Human mRNA Genes Having di- and Trinucleotide Repeats // *Genes (Basel).* - 2022. - Vol. 13. – P. 1-12.
- 258 Londin E., Loher P., Telonis A. G., Quann K., Clark P., Jing Y. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2015. - Vol. 112. - P. 1106-1115.
- 259 Wang J., Sh Y., Zhou H., Zhang P., Song T., Ying, Z. piRBase: integrating piRNA annotation in all aspects // *Nucleic Acids Res.* - 2021. - Vol.50. - P. 265-272.
- 260 Ivashchenko A.T., Pyrkova A.Y., Niyazova R.Y., Alybayeva A., Baskakov K. Prediction of miRNA Minding Sites in mRNA // *Bioinformation.* - 2016. - Vol. 12. - P. 237-240.
- 261 Friedman R.A., Honig B.A. Free Energy Analysis of Nucleic Acid Base Stacking in Aqueous Solution // *Biophys. J.* - 1995. - Vol. 69. - P. 1528-1535.
- 262 Garg A., Heinemann U. A Novel Form of RNA Double Helix Based on G·U and C·A+ Wobble Base Pairing // *RNA.* - 2018. -Vol. 24. - P. 209-218.
- 263 Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices // *Nucleic Acids Res.* - 2002. - Vol. 30. - P. 3497-531.

- 264 Davis E., Caiment F., Tordoir X., Cavaillé J., Ferguson-Smith A., Cockett N., Georges M., Charlier C. RNAi-Mediated Allelic Trans-interaction at the Imprinted Rtl1/ Peg11 Locus // *Curr. Biol.* - 2005. - Vol. 15. - P. 743-749.
- 265 Wang J., Li Z., Liu B., Chen G., Shao N., Ying X., Wang Y. Systematic Study of Cis-Antisense miRNAs in Animal Species Reveals miR-3661 to Target PPP2CA in Human Cells // *RNA.* - 2016. - Vol. 22. - P. 87-95.
- 266 Yurikova O.Y., Aisina D.E., Niyazova R.E., Atambayeva S.A., Labeit S., Ivashchenko A.T. The Interactions of miRNA-5p and miRNA-3p with the mRNAs of Ortolologous Genes // *Mol. Biol.* - 2019. - Vol. 53. - P. 692-704.
- 267 Zhou P., Xu W., Peng X., Luo Z., Xing Q., Chen X., Hou C., Liang W., Zhou J., Wu X., Songyang Z., Jiang S. Large-scale screens of miRNA-mRNA interactions unveiled that the 3'UTR of a gene is targeted by multiple miRNAs // *PLoS One.* - 2013. - Vol. 8. - P.: e68204.
- 268 Albrecht A., Mundlos S. The Other Trinucleotide Repeat: Polyalanine Expansion Disorders // *Curr. Opin. Genet. Develop.* - 2005. - Vol. 15. - P. 285-293.
- 269 Stromme P., Mangelsdorf M.E., Shaw M.A., Lower K.M., Lewis S.M., Bruyere H., Lutchera V., Gedeon A.K., Wallace R.H., Scheffer I.E., Turner G., Partington M., Frints S.G., Fryns J.P., Sutherland G.R., Mulley J.C., Gecz J. Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy // *Nat Genet.* - 2002. - Vol. 30. - P. 441-445.
- 270 Olivetti P. R., Noebels J.L. Interneuron, interrupted: molecular pathogenesis of ARX mutations and X-linked infantile spasms // *Curr Opin Neurobiol.* - 2012 – Vol. 22. – P. 859-65.
- 271 Sedykh I., Yoon B., Roberson L., Moskvina O., Dewey C.N., Grinblat Y. Zebrafish *zic2* controls formation of periocular neural crest and choroid fissure morphogenesis // *Dev Biol.* - 2017. - Vol. 429. - P. 92-104.
- 272 Wanker E.E. Protein aggregation and pathogenesis of Huntington's disease: mechanisms and correlations // *Biol. Chem.* - 2000. - Vol. 381. - P. 937- 942.
- 273 Gusella J.F., MacDonald M.E. Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease // *Nature Rev. Neurosci.* - 2000. - Vol. 1.- P. 109-115.
- 274 Chen W., Cui Y., Liu B., Li C., Du L., Tang R., Qin L., Jiang Y., Li J., Yu X., He Q., He Z. Hsa-miR-1908-3p Mediates the Self-Renewal and Apoptosis of Human Spermatogonial Stem Cells via Targeting KLF2 // *Mol Ther Nucleic Acids.* - 2020. -Vol. 20. - P. 788-800.
- 275 Claudia F., Gasparini, Heidi G., Bridget M., Astrid J., Elhame K., Larisa M. Case-control study of ADARB1 and ADARB2 gene variants in migraine // *The Journal of Headache and Pain.* - 2015. - Vol. 16. - P. 31.
- 276 Tan T.Y., Sedmík J., Fitzgerald M.P., Halevy R.S., Keegan L.P., Helbig I., Basel-Salmon L., Cohen L., Straussberg R., Chung W.K., Helal M., Maroofian R., Houlden H., Juusola J., Sadedin S., Pais L., Howell K.B., White S.M., Christodoulou J., O'Connell M.A. Bi-allelic ADARB1 Variants Associated with Microcephaly, Intellectual Disability, and Seizures // *Am J Hum Genet.* – 2020. – 106. – P. 467-483.

277 Zoufal V., Mairinger S., Krohn M. Measurement of cerebral ABCC1 transport activity in wild-type and APP/PS1-21 mice with positron emission tomography // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. -2020. - Vol. 40. - P. 954-965.

278 Krohn M., Lange C., Hofrichter J., Scheffler K., Stenzel J., Steffen J., Schumacher T., Brüning T., Plath A.S., Alfen F., Schmidt A., Winter F., Rateitschak K., Wree A., Gsponer J., Walker L.C., Pahnke J. Cerebral amyloid- β proteostasis is regulated by the membrane transport protein ABCC1 in mice // *J Clin Invest*. - 2011. - 121. - P.3924-31.

279 Lefterov I. M., Koldamova R. P., Lazo J. S. Human bleomycin hydrolase regulates the secretion of amyloid precursor protein // *Faseb J*. - 2000. - Vol. 14. - P. 1837-1847.

280 Kajiya A., Kaji H., Isobe T., Takeda A. Processing of amyloid beta-peptides by neutral cysteine protease bleomycin hydrolase // *Protein and Peptide Letters*. - 2006. - Vol. 13. - P. 119-123.

281 Namba Y., Ouchi Y., Takeda A., Ueki A., Ikeda K. Bleomycin hydrolase immunoreactivity in senile plaque in the brains of patients with Alzheimer's disease // *Brain Res*. - 1999. - Vol. 830. - P. 200-202.

282 Gartner J., Moser H., Valle D. Mutations in the 70K peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrome // *Nat. Genet*. - 1992. - Vol. 1. - P. 16-23.

283 Paton B.C., Heron S.E., Nelson P.V., Morris C.P., Poulos A. Absence of mutations raises doubts about the role of the 70-kD peroxisomal membrane protein in Zellweger syndrome // *Am. J. Hum. Genet*. - 1997. - Vol. 60. - P. 1535-1539.

284 Peleg S., Sananbenesi F., Zovoilis A., Burkhardt S., Bahari-Java S., Agis-Balboa R. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice // *Science*. - 2010. - Vol.328. - P.753-6.

285 Almuqbil M., Hamdan F., Mathonnet G., Rosenblatt B., Srouf M. De novo deletion of FMN2 in a girl with mild non-syndromic intellectual disability // *Eur J Med Genet*. – 2013. - Vol. 56. - P. 686-688.

286 Roberto C., Paulo S., Nelson R., Cemil K., Eva B., Michael G., Sanaz B. Formin 2 links neuropsychiatric phenotypes at young age to an increased risk for dementia // *EMBO J*. - 2017. - Vol. 36. - P. 2815-2828.

287 Fatemeh P. Genetic Characterization and Risk Stratification of Acute Myeloid Leukemia // *Cancer Manag Res*. - 2020. Vol. 12. - P. 2231–2253.

288 Christopher C., Dan D., Angela E. MN1 C-terminal truncation syndrome is a novel neurodevelopmental and craniofacial disorder with partial rhombencephalosynapsis // *Brain*. - 2020. - Vol. 143. - P. 55-68.

289 Cheng X.R., Cui X.L., Zheng Y., Zhang G.R., Li P., Huang H., Zhao Y.Y., Bo X.C., Wang S.Q., Zhou W.X., Zhang Y.X. Nodes and biological processes identified on the basis of network analysis in the brain of the senescence accelerated mice as an Alzheimer's disease animal model // *Front Aging Neurosci*. - 2013. - Vol. 5. - P. 65.

290 Ferrero K.M., Koch W.J. GRK2 in cardiovascular disease and its potential as a therapeutic target // *J Mol Cell Cardiol*. - 2022. - Vol. 172. - P. 14-23.

- 291 Saiyin H., Na N., Han X., Fang Y., Wu Y., Lou W., Yang X. BRSK2 induced by nutrient deprivation promotes Akt activity in pancreatic cancer via downregulation of mTOR activity // *Oncotarget*. - 2017. - Vol. 8. - P. 44669-44681.
- 292 Mitra E., Adnan N., Lennart W. Transcriptome analysis of fibroblasts from schizophrenia patients reveals differential expression of schizophrenia-related genes // *Scientific Reports*. - 2020. - Vol. 10. - P.1-10.
- 293 Maria J.S. Fragile X Syndrome and associated disorders: clinical aspects and pathology // *Neurobiol Dis*. - 2020. - Vol.136. - P. 104-740.
- 294 Boyle L., Kaufmann W. The behavioral phenotype of FMR1 mutations. *Am J Med Genet*. - 2010. - Vol.15. - P. 469-76.
- 295 Tranfaglia M. The psychiatric presentation of fragile x: evolution of the diagnosis and treatment of the psychiatric comorbidities of fragile X syndrome // *DevNeurosci*. - 2011. - Vol. 33. – P. 337-48.
- 296 Mohan G., Abhilasha S. Unraveling the genes implicated in Alzheimer's disease // *Biomed Rep*. - 2017. - Vol. 7. - P. 105-114.
- 297 Kerwin D., Abdelnour C., Caramelli P., Ogunniyi A., Shi J., Zetterberg H., Traber M. Alzheimer's disease diagnosis and management: Perspectives from around the world // *Alzheimers Dement (Amst)*. - 2022. - Vol. 14. - P. e12334.
- 298 Malherbe P., Faull R.L., Richards J.G. Regional and cellular distribution of bleomycin hydrolase mRNA in human brain: comparison between Alzheimer's disease and control brains // *Neuroscience Letters*. - 2000. -Vol. 3. - P. 37-40.
- 299 Cho D.H., Tapscott S.J. Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2 // *Biochim Biophys Acta*. - 2007. - Vol. 177. - P. 195-204.
- 300 Kaliman P., Llagostera E. Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1 // *Cell Signal*. - 2008. - Vol. 20. - P. 1935-1941.
- 301 Hodgson J.G., Smith DJ, McCutcheon K., Koide H.B., Nishiyama K., Dinulos M.B., Stevens M.E., Bissada N., Nasir J., Kanazawa I., Distèche C.M., Rubin E.M., Hayden M.R. Human huntingtin derived from YAC transgenes compensates for loss of murine huntingtin by rescue of the embryonic lethal phenotype // *Hum Mol Genet*. - 1996. -Vol. 5. - P.1875-85.
- 302 Sun Y.H., Wang R.H., Du K., Zhu J., Zheng J., Xie L.H., Pereira A.A., Zhang C., Ricci E.P., Li X.Z. Coupled protein synthesis and ribosome-guided piRNA processing on mRNAs // *Nat. Commun*. – 2021.- Vol. 12. – P. 5970.
- 303 Du W., Yang W., Xuan J., Gupta S., Krylov S.N., Ma X., Yang Q., Yang B.B. Reciprocal regulation of miRNAs and piRNAs in embryonic development // *Cell Death Differ*. - 2016. - Vol. 23. - P. 1458-1470.
- 304 Hazeki N., Tukamoto T., Goto J., Kanazawa I. Formic acid dissolves aggregate of an N-terminal huntingtin fragment containing an expanded polyglutamine tract: applying to quantification of protein components of the aggregates // *Biochem Biophys Res Commun*. - 2000. - Vol. 277. - P. 386-93.
- 305 Sanooghi D., Lotfi A., Bagher Z., Barati S., Karimi A., Faghihi F., Lotfi E., Joghataei M.T. Large-scale analysis of MicroRNA expression in motor neuron-like

cells derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells // Sci Rep. - 2022. - Vol. 12. - P. 5894.

306 Hagio K., Furuya S., Nakamura J., Maruyama S., Shiraishi K., Shimizu H., Akaike H., Hosomura N., Kawaguchi Y., Amemiya H., Kawaida H., Sudo M., Inoue S, Kono H., Ichikawa D. High miR-3687 Expression Affects Migratory and Invasive Ability of Oesophageal Carcinoma // Anticancer Res. - 2019. - Vol. 39. - P. 557-565.

307 Agarwal V., Bell G.W., Nam J.W., Bartel D.P. Predicting effective microrna target sites in mammalian mRNAs // Elife 4. - 2015. - Vol. 12. - P.4: e05005.

308 Schmidt M.F., Gan Z.Y., Komander D. Ubiquitin signalling in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic opportunities // Cell Death Differ. - 2021. - Vol. 28. - P. 570-590.

309 Miller V.M., Nelson R.F., Gouvion C.M., Williams A., Rodriguez-Lebron E, Harper S.Q., Davidson B.L., Rebagliati M.R., Paulson H.L. CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity in vitro and in vivo // J Neurosci. - 2005. - Vol. 25. - P. 9152-61.

310 Jiao G., Huang Q., Hu M., Liang X., Li F., Lan C., Fu W., An Y., Xu B., Zhou J., Xiao J. Therapeutic Suppression of miR-4261 Attenuates Colorectal Cancer by Targeting MCC // Mol Ther Nucleic Acids. - 2017. - Vol. 8. - P. 36-45.

311 Ma J., Li T-F., Han X-W., Yuan H-F. Downregulated MEG3 contributes to tumour progression and poor prognosis in oesophagal squamous cell carcinoma by interacting with miR-4261, downregulating DKK2 and activating the wnt/ β -catenin signaling // Artif Cells Nanomed Biotechnol. - 2019. -Vol. 47. - P. 1513-23.

312 Nicole Ludwig., Petra Leidinger., Kurt Becker., Christina Backes., Tobias Fehlmann., Christian Pallasch. Steffi Rheinheimer., Benjamin Meder., Cord Stähler., Eckart Meese., Andreas Keller. Distribution of miRNA expression across human tissues // Nucleic Acids Research. - 2016. - Vol. 44. - P. 3865-3877,

313 Chen D., Lan G., Li R., Mei Y., Shui X., Gu X., Wang L., Zhang T., Gan C.L., Xia Y., Hu L., Tian Y., Zhang M., Lee T.H. Melatonin ameliorates tau-related pathology via the miR-504-3p and CDK5 axis in Alzheimer's disease // Transl Neurodegener. - 2022. - Vol.11. - P.27.

314 Maimon R., Ionescu A., Bonnie A., Sweetat S., Wald-Altman S., Inbar S., Gradus T., Trotti D., Weil M., Behar O., Perlson E. miR126-5p Downregulation Facilitates Axon Degeneration and NMJ Disruption via a Non-Cell-Autonomous Mechanism in ALS // J Neurosci. - 2018. - Vol. 38. - P. 5478-5494.

315 Esser J.S., Saretzki E., Pankratz F., Engert B., Grundmann S., Bode C., Moser M., Zhou Q. Bone morphogenetic protein 4 regulates microRNAs miR-494 and miR-126-5p in control of endothelial cell function in angiogenesis // Thromb Haemost. - 2017. - Vol.117. - P. 734-49.

316 Patrício P., Mateus-Pinheiro A., Alves N.D., Morais M., Rodrigues A.J., Bessa J.M., Sousa N., Pinto L. miR-409 and miR-411 Modulation in the Adult Brain of a Rat Model of Depression and After Fluoxetine Treatment // Front Behav Neurosci. - 2020. - Vol. 7. - P.14:136.

317 Ashirbekov Y., Abaildayev A., Omarbayeva N., Botbayev D., Belkozhaev A., Askandirova A., Neupokoyeva A., Utegenova G., Sharipov K., Aitkhozhina N.

Combination of circulating miR-145-5p/miR-191-5p as biomarker for breast cancer detection // *PeerJ*. - 2020. - Vol. 16. - P. 8: e10494.

318 Wang L., Shui X., Zhang M., Mei Y., Xia Y., Lan G., Hu L., Gan C.L., Tian Y., Li R., Gu X., Zhang T., Chen D., Lee T.H. MiR-191-5p Attenuates Tau Phosphorylation, A β Generation, and Neuronal Cell Death by Regulating Death-Associated Protein Kinase 1 // *ACS Chem Neurosci*. - 2022. - Vol. 21. - P. 3554-3566.

319 Qu Y.M., Chen A., Zhao X., Wang Z., Guo D., Shao S.L., Tao Y.Y., Li Q.J., Wang M.Y., Ma W.S. Huntingtin-associated protein 1 is a potential tumor suppressor for gastric cancer // *Mol Biol Rep*. - 2023. - Vol. 50. - P. 1517-1531.

320 Li T., Yin L., Kang X., Xue W., Wang N., Zhang J., Yuan P., Lin L., Li Y. TFEB acetylation promotes lysosome biogenesis and ameliorates Alzheimer's disease-relevant phenotypes in mice // *J Biol Chem*. - 2022. - Vol. 298. - P. 102649.

321 Wu L.L., Zhou X.F. Huntingtin associated protein 1 and its functions // *Cell Adh Migr*. - 2009. - Vol. 3. - P. 71-6.

322 Hao Y, Créquer-Grandhomme A, Javier N, Singh A, Chen H, Manzanillo P, Lo MC, Huang X. Structures and mechanism of human glycosyltransferase β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 (B3GNT2), an important player in immune homeostasis. *J Biol Chem*. 2021 Jan-Jun;296:100042. doi: 10.1074/jbc.RA120.015306. Epub 2020 Nov 22. PMID: 33158990; PMCID: PMC7948737.

323 Sanders A.R., Göring H.H., Duan J., Drigalenko E.I., Moy W., Freda J., He D., Shi J. Transcriptome study of differential expression in schizophrenia // *Hum Mol Genet*. - 2013. - Vol. 22. - P. 5001-14.

324 Fang J., Lin D., Schulz S.C., Xu Z., Calhoun V.D., Wang Y.P. Joint sparse canonical correlation analysis for detecting differential imaging genetics modules // *Bioinformatics*. - 2016. - Vol. 32(22). - P. 3480-3488.

325 Palmer E. E., Hong S., Al Zahrani F., Hashem M. O., Aleisa F. A., Ahmed H. M. J., Kandula T., Macintosh R., Minoche A. E., Puttick C., Gayevskiy V., Drew A. De novo variants disrupting the HX repeat motif of ATN1 cause a recognizable non-progressive neurocognitive syndrome // *Am. J. Hum. Genet*. - 2019. -Vol. 104. - P. 542-552.

326 Carroll L.S., Massey T.H., Wardle M., Peall K.J. Dentatorubral-pallidoluysian Atrophy: An Update // *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. - 2018. - Vol. 8. - P.577.

327 Keo A., Aziz N.A., Dzyubachyk O., van der Grond J., van Roon-Mom WMC., Lelieveldt BPF., Reinders MJT., Mahfouz A. Co-expression Patterns between ATN1 and ATXN2 Coincide with Brain Regions Affected in Huntington's Disease // *Front Mol Neurosci*. - 2017. - Vol. 10. - P. 399.

328 Gao C., Liu S.G., Lu W.T., Yue Z.X., Zhao X.X., Xing T.Y., Chen Z.P., Zheng H.Y., Li Z.G. Downregulating CREBBP inhibits proliferation and cell cycle progression and induces daunorubicin resistance in leukemia cells // *Mol Med Rep*. - 2020. - Vol. 22. - P. 2905-2915.

- 329 Kim S.H., Lim B.C., Chae J.H., Kim K.J., Hwang Y.S. A case of Rubinstein-Taybi Syndrome with a CREB-binding protein gene mutation // *Korean J Pediatr.* - 2010. - Vol. 53(6). - P. 718-21.
- 330 Cardinaux J.R., Notis J.C., Zhang Q., Vo N., Craig J.C., Fass D.M., Brennan R.G., Goodman R.H. Recruitment of CREB binding protein is sufficient for CREB-mediated gene activation // *Mol Cell Biol.* - 2000. - Vol. 20. - P.1546-52.
- 331 Chatterjee S., Angelakos C.C., Bahl E., Hawk J.D, Gaine M.E, Poplawski S.G., Schneider-Anthony A., Yadav M., Porcari G.S., Cassel J.C. The CBP KIX domain regulates long-term memory and circadian activity // *BMC Biol.* - 2020. 18. - P. 155.
- 332 Wang Q., Wang C., Wei W.B., Rong W.N., Shi X.Y. A novel CREBBP mutation and its phenotype in a case of Rubinstein-Taybi syndrome // *BMC Med Genomics.* - 2022. - Vol. 15. - P. 182.
- 333 Steffan J.S., Kazantsev A., Spasic-Boskovic O., Greenwald M., Zhu Y.Z., Gohler H., Wanker E.E., Bates G.P., Housman D.E., Thompson L.M. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2000. - Vol. 97. - P. 6763-8.
- 334 Athanasiu L., Giddaluru S., Fernandes C., Christoforou A., Reinvang I., Lundervold A.J., Nilsson L.G., Kauppi K., Adolfsson R., Eriksson E., Sundet K., Djurovic S., Espeseth T., Nyberg L., Steen V.M., Andreassen O.A., Le Hellard S. A genetic association study of CSMD1 and CSMD2 with cognitive function // *Brain Behav Immun.* - 2017. -Vol. 61. - P. 209-216.
- 335 Havik B., Le Hellard S., Rietschel M., Lybæk H., Djurovic S., Mattheisen M., Mühleisen T.W., Degenhardt F., Priebe L., Maier W., Breuer R., Schulze T.G., Agartz I., Melle I., Hansen T., Bramham C.R., Nöthen M.M., Stevens B., Werge T., Andreassen O.A. The complement control-related genes CSMD1 and CSMD2 associate to schizophrenia // *Biol Psychiatry.* - 2011. - Vol. 70. - P. 35-42.
- 336 Gutierrez M.A., Dwyer B.E., Franco S.J. Csmd2 Is a Synaptic Transmembrane Protein that Interacts with PSD-95 and Is Required for Neuronal Maturation // *eNeuro.* - 2019. - Vol. 6. - P.
- 337 Crespo-Barreto J., Fryer J.D., Shaw C.A., Orr H.T., Zoghbi H.Y. Partial loss of ataxin-1 function contributes to transcriptional dysregulation in spinocerebellar ataxia type 1 pathogenesis // *PLoS Genet.* - 2010. - Vol. 6. - P.: e1001021.
- 338 Aldhalaan H., AlBakheet A., AlRuways S., AlMutairi N., AlNakiyah M., AlGhofaili R., Cardona-Londoño K.J., Alahmadi K.O., AlQudairy H., AlRasheed M.M., Colak D., Arold S.T., Kaya N. A Novel GEMIN4 Variant in a Consanguineous Family Leads to Neurodevelopmental Impairment with Severe Microcephaly, Spastic Quadriplegia, Epilepsy, and Cataracts // *Genes (Basel).* - 2021. -Vol. 13. - P.92.
- 339 Meier I.D., Walker M.P., Matera A.G. Gemin4 is an essential gene in mice, and its overexpression in human cells causes relocalization of the SMN complex to the nucleoplasm // *Biol Open.* – 2018. - Vol. 7. - P. bio032409.
- 340 Charroux B., Pellizzoni L., Parkinson R.A., Yong J., Shevchenko A., Mann M., Dreyfuss G. Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli // *J Cell Biol.* - 2000. - Vol. 148. - P. 1177-86.

341 Potkin S.G., Guffanti G., Lakatos A. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Hippocampal atrophy as a quantitative trait in a genome-wide association study identifying novel susceptibility genes for Alzheimer's disease // PLoS One. - 2009. - Vol. 4. - P. e6501.

342 Lesnick T.G., Papapetropoulos S., Mash D.C. A genomic pathway approach to a complex disease: axon guidance and Parkinson disease // PLoS Genet. - 2007. - Vol. 3. - P. e98.

343 Arvanitis D., Davy A. Eph/ephrin signaling: networks // Genes Dev. -2008. -Vol. 22. - P. 416-429.

344 Martinez A., Soriano E. Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system // Brain Res Brain Res Rev. - 2005. - Vol. 49. - P. 211-226.

345 Potkin S.G., Guffanti G., Lakatos A., Turner J.A., Kruggel F., Fallon J.H., Saykin A.J., Orro A., Lupoli S., Salvi E., Weiner M., Macciardi F. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Hippocampal atrophy as a quantitative trait in a genome-wide association study identifying novel susceptibility genes for Alzheimer's disease // PLoS One. - 2009. - Vol. 4. - P. e6501.

ҚОСЫМША (А)

НТТ-Q23 және НТТ-Q74 жасуша линиялары арасындағы 354 дифференциалды экспрессияланған микроРНК-ның профилдері

МикроРНК	Орт. Экспр.	Өзгеріс ауқымы (FC)	Түзетілген <i>p</i> мәні (Adj. <i>p</i> value)	МикроРНК	Орт. Экспр.	Өзгеріс ауқымы (FC)	Түзетілген <i>p</i> мәні (Adj. <i>p</i> value)
miR-3687	14,63	3,96	2,72E-09	miR-10b-5p	10,30	-3,61	1,98E-02
miR-4417	12,23	2,71	4,03E-06	miR-6835-5p	6,25	2,33	2,02E-02
miR-411-5p	4,61	-17,69	7,03E-04	miR-34b-5p	6,32	-2,92	2,04E-02
miR-32-5p	8,46	-11,61	8,24E-04	miR-191-5p	12,00	-3,68	2,05E-02
miR-1273g-5p	8,92	2,82	8,24E-04	miR-6740-5p	6,47	2,34	2,11E-02
miR-3648	8,36	2,30	8,24E-04	miR-4695-5p	9,70	2,17	2,12E-02
miR-301a-3p	10,57	-12,57	8,24E-04	miR-624-5p	3,58	-6,23	2,13E-02
miR-135a-5p	4,80	-8,08	1,10E-03	miR-181b-5p	10,52	-3,77	2,14E-02
miR-612	7,46	3,14	1,10E-03	miR-323b-3p	4,04	-4,37	2,16E-02
miR-876-3p	6,19	-8,05	1,20E-03	miR-7851-3p	8,93	2,27	2,17E-02
miR-889-3p	4,18	-14,05	1,30E-03	miR-3605-5p	6,65	2,14	2,17E-02
miR-148a-3p	9,05	-11,07	1,30E-03	miR-518b	2,29	-23,11	2,17E-02
miR-126-5p	7,88	-11,79	1,40E-03	miR-181d-5p	10,17	-3,87	2,17E-02
miR-495-3p	7,28	-9,39	1,40E-03	miR-148b-3p	9,74	-4,04	2,17E-02
let-7f-2-3p	4,43	-7,08	1,40E-03	miR-543	6,94	-2,87	2,18E-02
miR-30b-5p	11,11	-9,39	1,50E-03	miR-4725-3p	7,71	2,72	2,19E-02
miR-23c	8,58	-9,67	1,50E-03	miR-29a-3p	10,50	-3,53	2,19E-02
miR-410-3p	5,47	-6,92	1,70E-03	miR-4319	3,25	-7,51	2,22E-02
miR-1273h-5p	12,03	2,22	1,70E-03	miR-5192	6,58	2,19	2,22E-02
miR-379-5p	5,23	-8,68	1,80E-03	miR-30a-5p	11,28	-3,57	2,29E-02
miR-369-3p	4,35	-10,37	1,90E-03	miR-1224-5p	7,44	1,86	2,32E-02
miR-377-3p	7,04	-8,21	1,90E-03	miR-204-3p	10,46	3,11	2,33E-02
miR-34a-3p	6,88	-5,43	2,00E-03	miR-376a-5p	5,39	-3,67	2,37E-02
miR-655-3p	4,07	-14,72	2,00E-03	miR-6799-5p	9,77	1,91	2,43E-02
miR-101-3p	10,85	-7,66	2,10E-03	miR-548b-3p	5,01	-3,22	2,43E-02
miR-660-5p	8,14	-8,06	2,10E-03	miR-539-3p	2,28	-14,05	2,43E-02
let-7d-5p	10,90	-10,28	2,20E-03	miR-6894-5p	10,40	2,23	2,45E-02
miR-380-3p	3,53	-16,12	2,60E-03	miR-455-5p	3,58	-4,50	2,46E-02
miR-651-5p	3,43	-7,82	2,60E-03	miR-6516-5p	11,13	-2,25	2,46E-02
miR-188-3p	3,80	-6,43	2,80E-03	miR-1305	3,10	-5,37	2,50E-02
miR-4484	8,53	2,04	2,80E-03	miR-6165	10,10	1,94	2,50E-02
miR-153-3p	10,38	-7,39	2,80E-03	miR-100-5p	10,06	-3,39	2,51E-02
let-7a-3p	5,63	-6,97	2,80E-03	miR-4800-5p	8,43	2,31	2,51E-02
miR-582-5p	6,40	-6,63	2,80E-03	miR-4696	2,24	-15,94	2,54E-02
miR-20b-5p	12,18	-7,94	2,80E-03	miR-5187-3p	2,66	-16,71	2,60E-02
miR-137	11,52	-8,64	2,80E-03	miR-708-5p	11,33	-3,46	2,63E-02
miR-301b	10,03	-6,00	2,80E-03	miR-3909	3,46	-4,67	2,68E-02
miR-340-3p	5,30	-8,43	2,80E-03	miR-3652	7,96	1,91	2,68E-02
miR-340-5p	7,92	-7,97	2,90E-03	miR-6830-5p	7,63	2,11	2,70E-02
miR-542-3p	4,97	-6,36	3,50E-03	miR-4772-5p	2,60	-21,01	2,74E-02
miR-32-3p	3,10	-32,83	3,60E-03	miR-18a-5p	11,04	-3,19	2,74E-02
miR-5088-5p	7,02	2,57	3,60E-03	miR-22-5p	7,44	-2,87	2,74E-02
miR-196a-3p	4,39	-6,60	3,90E-03	miR-6748-5p	6,06	2,30	2,74E-02
miR-363-3p	9,38	-5,97	3,90E-03	miR-222-3p	6,16	-2,88	2,74E-02
miR-4309	5,35	-2,83	4,10E-03	miR-4428	7,30	2,16	2,74E-02
miR-20a-5p	12,44	-6,16	4,10E-03	miR-4726-5p	8,06	2,25	2,75E-02
miR-154-3p	5,32	-7,43	4,10E-03	miR-6769a-5p	8,21	2,45	2,76E-02
miR-30c-5p	11,78	-6,04	4,10E-03	miR-6503-3p	6,63	1,82	2,79E-02
miR-29b-3p	10,08	-6,91	4,10E-03	miR-4646-5p	9,32	2,43	2,79E-02

miR-3154	7,99	2,44	4,20E-03	miR-146b-5p	7,14	-3,00	2,79E-02
miR-10a-5p	6,60	-5,01	4,30E-03	miR-2467-3p	9,00	2,00	2,79E-02
miR-27a-3p	12,96	-7,76	4,30E-03	miR-106b-5p	13,43	-3,34	2,79E-02
miR-656-3p	3,25	-14,16	4,30E-03	miR-5584-5p	6,60	2,03	2,79E-02
miR-1273c	9,80	2,00	4,30E-03	miR-1207-5p	10,69	2,03	2,79E-02
miR-196a-5p	7,25	-7,11	4,30E-03	miR-3157-5p	5,61	-2,04	2,80E-02
miR-338-3p	9,65	-7,18	4,30E-03	miR-4444	9,94	1,82	2,80E-02
miR-152-3p	8,82	-7,70	4,30E-03	miR-6719-3p	2,68	-12,75	2,87E-02
miR-190a-5p	3,25	-18,37	4,30E-03	miR-3606-3p	2,43	-12,72	2,87E-02
miR-299-5p	4,98	-4,15	4,40E-03	miR-6716-5p	7,94	2,24	2,89E-02
miR-126-3p	8,95	-7,10	4,60E-03	miR-6124	10,57	2,07	2,90E-02
miR-545-3p	4,98	-6,79	4,70E-03	miR-361-5p	10,69	-3,84	2,92E-02
miR-4758-5p	7,55	2,06	4,70E-03	miR-5705	2,84	-12,11	2,94E-02
miR-362-3p	7,65	-6,10	5,00E-03	miR-3064-5p	9,74	2,27	2,95E-02
miR-342-3p	10,23	-6,62	5,20E-03	miR-4685-5p	6,66	2,02	2,98E-02
miR-107	12,16	-6,73	5,30E-03	miR-99a-5p	10,46	-3,28	2,98E-02
miR-6779-5p	7,00	2,26	5,30E-03	miR-3158-5p	7,17	2,01	3,00E-02
miR-590-5p	8,76	-6,65	5,30E-03	miR-4419b	8,58	1,78	3,04E-02
miR-4257	7,04	2,55	5,40E-03	miR-6833-5p	7,60	2,20	3,04E-02
miR-95-3p	7,28	-5,94	5,50E-03	miR-765	9,77	2,16	3,04E-02
miR-27b-3p	12,54	-6,46	5,50E-03	miR-26b-3p	4,74	-2,55	3,04E-02
miR-376b-3p	6,64	-5,38	5,50E-03	miR-6760-5p	9,10	2,21	3,04E-02
miR-921	6,91	2,16	5,50E-03	miR-7108-5p	8,44	1,87	3,04E-02
miR-199b-5p	10,38	-5,49	5,60E-03	miR-4305	2,45	-11,76	3,08E-02
miR-96-5p	8,29	-5,87	5,60E-03	miR-1273e	10,63	1,83	3,10E-02
miR-103a-3p	12,36	-6,48	5,60E-03	miR-4701-3p	5,61	2,30	3,19E-02
miR-132-3p	8,56	-5,62	5,60E-03	miR-542-5p	4,54	-4,24	3,21E-02
miR-649	7,91	2,20	6,00E-03	miR-3133	2,15	-20,86	3,23E-02
miR-142-5p	3,16	-11,81	6,10E-03	miR-6778-5p	11,43	2,37	3,31E-02
miR-4496	10,33	2,40	6,10E-03	miR-2392	8,08	1,91	3,34E-02
miR-4789-3p	2,62	-29,30	6,30E-03	miR-711	7,64	2,04	3,35E-02
miR-323a-3p	5,55	-5,97	6,60E-03	miR-633	1,77	-22,50	3,36E-02
miR-3934-5p	8,57	2,14	6,60E-03	miR-641	3,20	-4,18	3,42E-02
miR-17-5p	13,17	-5,31	6,60E-03	miR-8085	7,54	2,35	3,42E-02
miR-663b	10,55	2,02	6,60E-03	miR-4487	7,31	2,18	3,42E-02
miR-382-3p	3,98	-8,28	6,60E-03	miR-1306-3p	6,23	1,94	3,44E-02
miR-9-3p	9,80	-5,27	6,80E-03	miR-4693-5p	2,15	-16,40	3,44E-02
miR-9-5p	12,15	-5,41	6,90E-03	miR-4436b-3p	8,75	1,81	3,44E-02
miR-4499	7,56	2,39	7,20E-03	miR-4481	7,20	1,99	3,44E-02
miR-23b-3p	13,07	-5,81	7,20E-03	miR-6806-3p	2,68	-7,12	3,44E-02
miR-29c-3p	10,14	-4,37	7,40E-03	miR-6890-5p	6,84	2,03	3,44E-02
miR-487a-3p	4,27	-8,47	7,60E-03	miR-24-3p	13,43	-3,23	3,46E-02
miR-3925-5p	6,72	2,18	7,60E-03	miR-218-5p	14,13	-3,07	3,47E-02
miR-23a-3p	13,16	-5,42	7,60E-03	miR-6739-5p	5,95	2,17	3,47E-02
miR-302b-3p	2,01	-23,84	7,60E-03	miR-140-5p	9,09	-3,01	3,47E-02
miR-3117-5p	3,75	-6,25	7,70E-03	miR-367-3p	2,27	-12,58	3,47E-02
miR-508-5p	2,19	-21,54	7,90E-03	miR-6796-5p	5,21	2,20	3,51E-02
miR-6726-5p	7,69	2,06	7,90E-03	miR-411-3p	3,32	-7,41	3,51E-02
miR-3607-5p	11,95	-4,77	7,90E-03	miR-6848-5p	7,28	1,94	3,51E-02
miR-374b-5p	10,26	-7,37	7,90E-03	miR-6511a-5p	8,45	1,75	3,55E-02
miR-196b-5p	3,23	-11,53	8,90E-03	miR-4687-3p	6,99	1,91	3,59E-02
miR-106a-5p	11,84	-4,35	8,90E-03	miR-365a-3p	8,40	-3,08	3,59E-02
miR-374a-3p	1,87	-22,09	8,90E-03	miR-888-3p	2,12	-25,59	3,72E-02
miR-33a-3p	5,15	-6,39	9,20E-03	miR-30d-5p	11,52	-3,23	3,73E-02
miR-21-5p	13,26	-4,88	9,20E-03	miR-1911-5p	3,14	-11,09	3,73E-02
miR-205-5p	3,39	-8,63	9,50E-03	miR-551b-3p	8,59	-2,94	3,73E-02
miR-3198	6,89	2,43	9,50E-03	miR-3156-5p	5,94	1,98	3,73E-02
miR-6859-5p	7,09	2,22	9,50E-03	miR-4261	7,60	2,10	3,74E-02
miR-329-3p	6,75	-3,46	9,80E-03	miR-335-5p	3,59	-5,06	3,75E-02

miR-1299	8,02	2,22	9,80E-03	miR-4498	6,22	1,84	3,79E-02
miR-577	2,46	-12,91	9,80E-03	miR-105-5p	6,97	-3,25	3,84E-02
miR-511-3p	1,85	-41,65	1,04E-02	miR-380-5p	2,22	-13,03	3,84E-02
miR-381-3p	5,83	-4,11	1,04E-02	miR-1185-1-3p	3,76	-4,53	3,87E-02
miR-4705	4,79	-4,67	1,05E-02	miR-892a	2,32	-17,32	3,90E-02
miR-6829-5p	7,04	2,45	1,08E-02	miR-455-3p	4,69	-3,21	3,90E-02
miR-489-3p	4,65	-6,61	1,09E-02	miR-3611	2,80	-9,36	3,91E-02
miR-4442	8,00	1,96	1,12E-02	miR-20a-3p	9,03	-2,86	3,91E-02
let-7i-5p	10,55	-4,62	1,12E-02	miR-5703	7,29	1,81	3,91E-02
miR-15b-3p	7,69	-4,55	1,14E-02	miR-6746-5p	9,68	2,02	3,91E-02
miR-130a-3p	11,91	-4,25	1,14E-02	miR-15b-5p	12,92	-3,25	3,96E-02
miR-1185-2-3p	3,97	-4,89	1,18E-02	miR-144-5p	1,89	-17,37	3,96E-02
miR-595	5,09	2,71	1,20E-02	miR-182-3p	4,07	-2,56	4,03E-02
miR-504-3p	7,92	2,30	1,20E-02	miR-1251-3p	2,67	-9,86	4,04E-02
miR-19b-3p	14,31	-3,85	1,27E-02	miR-125b-2-3p	3,19	-4,35	4,08E-02
miR-6791-5p	7,69	1,98	1,27E-02	miR-1182	6,46	1,98	4,08E-02
miR-5684	8,11	2,09	1,29E-02	miR-20b-3p	4,98	-2,93	4,14E-02
miR-153-5p	4,20	-4,50	1,29E-02	miR-6827-5p	6,68	2,12	4,16E-02
miR-18b-5p	9,74	-3,64	1,29E-02	miR-1273d	12,21	1,83	4,20E-02
miR-376a-3p	8,02	-3,47	1,34E-02	miR-6780b-3p	3,33	-4,56	4,22E-02
miR-4522	4,43	-5,42	1,34E-02	miR-144-3p	2,14	-13,00	4,27E-02
miR-409-5p	4,98	-2,70	1,34E-02	miR-7515	6,48	2,32	4,29E-02
miR-218-1-3p	4,36	-4,13	1,35E-02	miR-4778-3p	1,87	-15,63	4,37E-02
miR-616-3p	6,04	2,14	1,36E-02	miR-365b-5p	8,04	2,47	4,37E-02
miR-6884-5p	6,06	2,67	1,37E-02	miR-450a-1-3p	2,73	-4,11	4,49E-02
miR-454-5p	4,89	-4,61	1,46E-02	miR-30e-3p	8,12	-3,11	4,53E-02
miR-216a-5p	2,87	-16,79	1,46E-02	let-7d-3p	5,62	-3,33	4,53E-02
miR-4725-5p	7,08	2,25	1,46E-02	miR-7846-3p	7,08	1,95	4,56E-02
miR-6862-5p	6,15	2,49	1,46E-02	miR-6817-3p	2,33	-8,50	4,59E-02
miR-199a-5p	12,48	-4,02	1,48E-02	miR-4664-3p	4,87	-2,46	4,59E-02
miR-7106-5p	7,47	1,92	1,49E-02	miR-6880-5p	10,27	2,23	4,59E-02
miR-5585-3p	11,32	1,98	1,51E-02	miR-892c-3p	2,21	-21,69	4,61E-02
miR-4430	8,68	2,59	1,51E-02	miR-6776-5p	6,22	1,98	4,61E-02
miR-19a-5p	5,04	-3,34	1,51E-02	miR-1229-5p	7,89	1,82	4,63E-02
miR-654-3p	6,06	-2,78	1,51E-02	miR-1587	6,35	1,88	4,66E-02
miR-592	6,29	-4,42	1,51E-02	miR-374c-5p	7,06	-2,44	4,66E-02
miR-6516-3p	9,59	-2,51	1,55E-02	miR-628-5p	4,19	-3,57	4,67E-02
miR-19a-3p	13,00	-3,65	1,55E-02	miR-183-5p	7,33	-2,99	4,67E-02
miR-182-5p	8,11	-4,63	1,58E-02	miR-1185-5p	3,92	-2,84	4,67E-02
miR-1179	3,94	-5,72	1,60E-02	miR-515-5p	2,44	-12,17	4,68E-02
miR-376c-3p	8,63	-4,07	1,62E-02	miR-587	2,41	-15,54	4,69E-02
miR-6856-5p	6,60	2,11	1,64E-02	miR-5702	1,88	-23,31	4,69E-02
miR-450a-5p	5,72	-3,82	1,64E-02	miR-6775-5p	10,26	1,80	4,69E-02
miR-384	2,28	-28,56	1,64E-02	miR-5584-3p	2,11	-7,82	4,69E-02
miR-1	3,90	-7,66	1,65E-02	miR-25-3p	13,49	-2,77	4,70E-02
miR-4486	9,17	2,28	1,65E-02	miR-10b-3p	5,19	-2,17	4,71E-02
miR-4311	5,71	2,41	1,65E-02	miR-520f-3p	1,50	-18,48	4,71E-02
miR-937-5p	7,64	1,92	1,65E-02	miR-6772-5p	6,06	1,92	4,76E-02
let-7c-5p	12,33	-4,90	1,65E-02	miR-5093	7,03	2,39	4,81E-02
miR-6893-5p	7,59	2,12	1,65E-02	miR-6757-5p	8,04	2,06	4,81E-02
miR-2114-5p	3,50	-18,40	1,65E-02	miR-4514	5,77	2,18	4,83E-02
miR-4419a	7,81	2,38	1,66E-02	miR-885-5p	5,82	-3,57	4,83E-02
miR-30e-5p	10,57	-3,81	1,68E-02	miR-660-3p	5,36	-2,19	4,83E-02
miR-4270	9,18	2,19	1,72E-02	miR-6715b-3p	3,75	-4,44	4,83E-02
miR-494-3p	6,59	-2,69	1,72E-02	miR-425-5p	11,15	-2,69	4,85E-02
miR-192-5p	6,34	-3,65	1,72E-02	miR-4301	1,87	-14,45	4,85E-02
miR-1273a	8,94	1,76	1,72E-02	miR-624-3p	2,68	-6,21	4,87E-02
miR-487b-3p	6,44	-4,03	1,72E-02	miR-4291	5,14	-2,03	4,87E-02
miR-6086	9,53	2,24	1,72E-02	miR-24-2-5p	7,42	-2,50	4,87E-02

let-7g-3p	5,40	-2,91	1,73E-02	miR-200c-3p	5,71	-2,84	4,91E-02
miR-6837-5p	7,39	2,10	1,74E-02	miR-7159-5p	2,20	-12,68	4,91E-02
miR-4534	9,01	2,23	1,81E-02	miR-876-5p	7,65	-2,20	4,92E-02
miR-128-3p	9,99	-3,97	1,81E-02	miR-4505	8,68	1,78	4,93E-02
miR-4535	7,19	2,51	1,81E-02	miR-296-3p	7,26	1,92	4,93E-02
miR-6807-5p	7,03	2,14	1,82E-02	miR-193a-3p	6,00	-2,02	4,93E-02
miR-7-2-3p	3,03	-6,95	1,97E-02	miR-7703	3,31	-8,31	4,93E-02
miR-485-3p	5,30	-3,99	1,97E-02	miR-491-3p	3,18	-4,69	4,95E-02
miR-8089	8,64	2,14	1,97E-02	miR-3714	4,59	-2,69	4,95E-02
miR-4446-3p	6,34	2,22	1,97E-02	miR-4743-5p	7,09	2,07	4,96E-02

Ескерту: өзгеріс ауқымындағы минус (-) таңбасы төмен экспрессияны білдіреді