УДК 612

# РОЛЬ МИКРОРНК В РЕГУЛЯЦИИ ЦИРКАДИАННЫХ РИТМОВ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

**Губин Д.Г.**

*ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия», Тюмень, e-mail: dgubin@mail.ru*

В настоящем обзоре проанализированы и обобщены современные данные о роли микро-РНК (miРНК) в тонкой подстройке циркадианных биологических часов (БЧ) на уровне центрального осциллятора (супрахиазматических ядер гипоталамуса, СХЯ) и в периферических тканях и органах. Обсуждаются механизмы воздействия miРНК (miR-132, miR-216, miR-182, miR-96, miR-122, miR-141, miR-192/94, miR-206) на этапы экспрессии ключевых генов БЧ. Продемонстрировано опосредованное этим влияние miРНК на параметры циркадианного ритма (период, амплитуда, фазовый ответ на внешний световой сигнал), а также участие данных процессов в модуляции физиологических ритмов на более высоких уровнях организации млекопитающих.

**Ключевые слова: микроРНК, циркадианные ритмы, гены биологических часов, РНК-интерференция, млекопитающие**

# ROLE OF MICRORNAS IN REGULATION OF CIRCADIAN RHYTHMICITY IN MAMMALS

**Gubin D.G.**

*Tyumen medical academy, Tyumen, e-mail: dgubin@mail.ru*

A review presents summary of current knowledge about microRNA's (miRNAs) role in fine-tuning of mammalian circadian clockwork in central oscillator (suprachiasmatic nucleus, SCN) and in peripheral tissues and organs. Mechanisms by which miRNAs (miR-132, miR-216, miR-182, miR-96, miR-122, miR-141, miR-192/94, miR-206) maintain interference upon core clock genes expression and consequently influence circadian rhythm parameters (period, amplitude, phase response to external stimuli) are discussed. Possible applications, derived from such miRNA-caused intervention for higher level modulations of circadian rhythmicity of physiological and tissue-specific processes in mammals are considered.

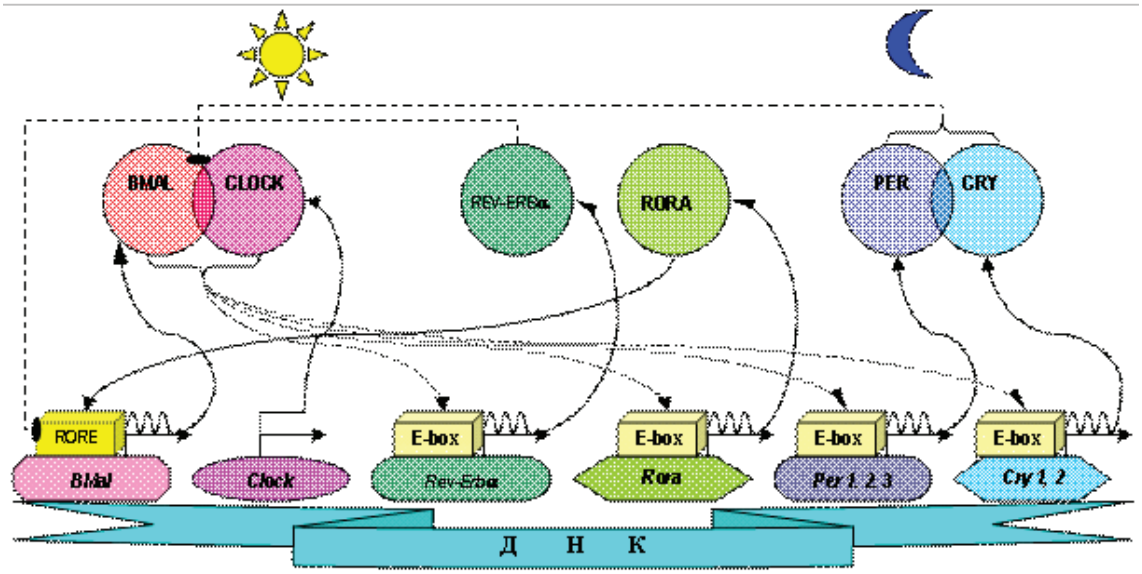
**Keywords: miRNA, circadian, clock genes, RNA-interference, mammals**

Микро-РНК (далее, miРНК) – многочисленный класс некодирующих РНК, которые в последнее время приковали своей значимостью внимание научного сообщества настолько, что упоминание о них в сети чаще всего сочетается со словами «малая РНК – революция» (small RNA revolution) [18]. Зрелые miРНК имеют средний размер 19–25 нуклеотидов (нт.). Созревание miРНК происходит подобно м-РНК: предшественники miРНК также транскрибируются, подвергаются кэпированию, аденилированию и сплайсингу [2]. Хотя функции miРНК весьма разнообразны, основная их роль состоит в участии в процессах РНК-интерференции, благодаря которым в цитоплазме клетки регулируется активность механизма трансляции разных белков через воздействие на соответствующие м-РНК. Благодаря вмешательству mi-РНК в синтез белков, они осуществляют регуляцию этапов эмбриогенеза, дифференцировки тканей, онкогенеза у животных; цветения и образования вегетативных органов у растений, а также пост-транскрипционный контроль циркадианной системы, механизмы которого и являются предметом настоящего обзора.

Для живых организмов самого разного уровня организации характерно наличие эволюционно-обусловленной эндогенной циркадианной ритмичности [19]. Каждая клетка млекопитающего представляет собой потенциальный осциллятор, так как в ней присутствуют необходимые элементы, определяющие молекулярно-генетические механизмы циркадианных биологических часов, которые могут быть активированы при тех или иных условиях [4].

Главные гены БЧ млекопитающих включают в себя ген *Bmal*, работающий в паре с геном *Clock*, семейство генов *Per* (их разновидности: *Per1, Per2, Per3) и* гены *Cry* (их разновидности: *Cry1, Cry2* – кодирующие белки криптохромы*)*, но имеются также и некоторые другие, подконтрольные им («clock-controlled genes», «*ccg*»). Для проявления своей функциональной активности белковые продукты генов: CLOCK/BMAL *и* PER/CRY должны образовать между собой пары – гетеродимеры [24]. В утренние часы белки-активаторы BMAL1 и CLOCK связываются с регуляторным участком ДНК Е-бокс (E-box) – специфическим гексануклеотидным (CACGTG) фрагментом промотора, распознающим «стартовый» транскрипционный фактор БЧ – белковый гетеродимер CLOCK/BMAL1, при этом включаются в работу гены *Per* и *Cry*. Через 2 часа после активации часовых генов негативного звена в клетке наблюдается пик концентрации соответствующих м-РНК,

а к послеполуденному времени (середине световой фазы при лабораторных условиях) накапливается максимальное количество белков PER и CRY [15]. В течение 4-х часов, их концентрация достигает порогового уровня, достаточного для образования димерного комплекса PER/CRY, что приходится уже на вечерние часы, после чего они постепенно возвращаются в ядро. Там активность гетеродимера PER/CRY направлена на подавление функций BMAL1 и CLOCK, через образование с ними прочного комплекса, что впоследствии приводит и к блокировке генов *Per* и *Cry*. Суммарная продолжительность такого циклического процесса составляет около 24 часов. Вторая петля отрицательной обратной связи у млекопитающих обусловлена конкурентным и разнонаправленным взаимодействием белков REV-ERBα и RORA с элементом RORE (retinoic acid-related orphan receptor response element) – распознающим участком промотора гена *BMal* [26]. Первый белковый продукт, REV-ERBα, – член семьи ядерных рецепторов REV-ERB, связываясь с промоторным участком *BMal*, препятствует его транскрипции. Второй белковый продукт семьи ядерных рецепторов, RORA (ретиноидный орфановый рецептор альфа) взаимодействуя с тем же промоторным участком *BMal* (RORE), выступает в качестве активатора его транскрипции [22]. Гетеродимер CLOCK/BMAL, в свою очередь, способствует транскрипции гена *rev-erbα*, замыкая контур обратной связи второй цепи (рисунок).




*Две основные петли отрицательной обратной связи генетического механизма БЧ млекопитающих*

Циркадианная ритмичность характерна как для процессов транскрипции, так и для этапов процессинга м-РНК, а также для пост-трансляционных механизмов. На уровне протеома, однако, доля процессов, обладающих отчетливой циркадианной ритмичностью – наибольшая [21].

Последние работы по изучению многообразных ролей miРНК показали принципиальную важность их участия в регуляции циркадианных ритмов на пост-транскрипционном уровне [5, 10, 17, 18]. Разнообразные miРНК выполняют посреднические функции между транскрипционными и пост-трансляционными процессами как на уровне центрального осциллятора млекопитающих (СХЯ), так и, эффекторно, локально, в тканях различных органов. Будучи регуляторами скорости синтеза клеточных белков, miРНК тем самым способны модулировать как значение Tcd, так и реактивность фазово-зависимого ответа БЧ на воздействие света.

В СХЯ млекопитающих ключевая роль принадлежит двум разновидностям miРНК – miR-132 и miR-219 [5]. При этом продукция miR132 является светозависимой, тогда как продукция miR-219 – нет. В то же время, только ген miR-219 несет на себе участок Е-бокс. Таким образом, miR-219 – является компонентом системы *ccg* генов – ее суточная динамика синхронна с динамикой *Per 1 и 2* м-РНК (с акрофазой в первой половине светового отрезка суток) и, очевидно, также запускается гетеродимером CLOCK/BMAL1. В свою очередь, про-

дукция miR-132 является CREB–зависимой (CREB, $Ca^{2+}$/cAMP response binding protein, транскрипционный фактор, связывающийся с распознающим его участком ДНК CRE, cAMP-response element, элементом, отвечающим на воздействие цАМФ) и усиливается при воздействии светового сигнала достаточной интенсивности в темновую фазу суток. По всей видимости, miR-219 играет свою роль в регуляции значения Tcd, тогда как miR-132 – в подстройке фазового ответа на световые сигналы. MiR-219 оказывает мягкий ускоряющий БЧ эффект, слегка уменьшая значение Tcd (на 10–20 минут), тогда как miR-132, снижает чувствительность БЧ к воздействию внешних световых импульсов в темное время суток и, играя роль своеобразных «шторок», по-видимому, снижает амплитуду физиологических ритмов. Непосредственный механизм действия miR-219 и miR-132 на конкретные мишени, определяющие ход БЧ, подлежит дальнейшему изучению. Вероятно, он имеет комплексный характер. В частности в одной из последних работ было показано, что эффект miR-132 на экспрессию генов семейства *Per* является непрямым, а опосредован ее влиянием на м-РНК других генов, участвующих в моделировании структуры хроматина (*Mecp2*, *Ep300*, *Jarid1a*) и регуляции трансляционных процессов (*Btg2*, *Paip2a*). Последние, в свою очередь, действуют разнонаправлено: белок MeCP2 активирует транскрипцию *Per1* и *Per2*, тогда как белки PAIP2A и BTG2 ускоряют деградацию *Per* м-РНК, препятствуя трансляции белка PERIOD [3].

В последнее время появился ряд работ, демонстрирующих что активность значительной части miРНК либо приурочена к определенным этапам онтогенеза, либо является ткане- и органоспецифической [27]. По отношению к miРНК, участвующим в работе БЧ это тоже справедливо. Так, в печени около 70 % от всех miРНК составляет miR-122, которую можно считать специфической для данного органа [11]. В последних работах показано участие miR-122 во многих ритмически протекающих функциях печени у млекопитающих, ее роль в регуляции амплитуды и фазы циркадианных ритмов на органном уровне. Транскрипция miR-122 взаимосвязана с белковым фактором REV-ERBα. Мишенью для REV-ERBα служат уже упомянутые элементы RORE, обнаруженные в промоторах ряда часовых генов, например *BMal1* [26]. Участок промотора гена miR-122 также содержит элемент RORE. Взаимодействуя с ним, REV-ERBα блокирует транскрипцию pri-miR-122, акрофаза REV-ERBα у мышей приходится на вторую половину светового отрезка суток, что соответствует батифазе pri-miR-122 (primary, первичной) и pre-miR-122 (premature, незрелой) [20, 26].

Примечательно, что образование pri-miR-122 и pre-miR-122 происходит синхронно в циркадианном ритме с акрофазой, приходящейся на конец темновой фазы суток, ритм имеет высокую амплитуду: пиковые значения превосходят минимальные в 4–10 раз. Эти предшественницы miR-122 очень неустойчивы: их период полураспада в 400 раз короче, чем у зрелой miR-122, которая, возможно именно по причине своей стабильности, не имеет выраженной циркадианной ритмики. Однако отсутствие выраженного циркадианного ритма содержания miR-122 в клетке не мешает ей влиять на циркадианные ритмы трансляции белков основных генов БЧ и на циркадианные ритмы метаболических процессов в печени [7]. Авторы последней работы предлагают три механизма, посредством которых даже постоянный уровень miR-122 может служить фактором, оказывающим непосредственное влияние на циркадианные ритмы экспрессии зависимых от нее генов. Первый механизм предполагает наличие многих мишеней для взаимодействия с miR-122, концентрация которых не является константной. Биологический смысл такого явления может состоять в «удалении шумов»: снижении доли стохастических колебаний, непременно возникающих при низком уровне транскрипции, тогда как одновременное образование тормозящего фактора (miR-122) способно обеспечить более четкую ритмичность экспрессии гена [6, 13]. Второй механизм подразумевает существование короткоживущих субпопуляций miR-122 с разнообразными функциями и точками приложения активности. Возможные причины наличия таких субпопуляций авторы усматривают, во-первых, во влиянии белковых факторов при формировании RISC – структура miR при этом может быть преобразована альтернативными способами, а, во-вторых, в различной концентрации модификаций miR-122 в тех или иных органоидах клетки. Здесь следует учитывать и вероятную роль открытого недавно механизма 3'-аденилирования miРНК в цитоплазме клетки [9]. И, наконец, третий механизм состоит в том, что участие только вновь образованных, «свежих» RISC miR-122 оказывает влияние на циркадианную ритмичность «подшефных» м-РНК. В этом случае быстро совершающееся их взаимодействие с мишенями miR-122 бу-

дет определять амплитудно-фазовые характеристики и размах колебаний продукции конечных белков. Следует также заметить, что по данным [21] около половины всех циклически синтезируемых белков печени образуются из нецикличных м-РНК.

В печени и почках наблюдается высокий уровень экспрессии еще двух примечательных разновидностей miРНК – miR-192 и miR-194 [23, 25]. В одной из последних работ, проведенной на культуре долгоживущих клеток HeLa с использованием технологии внедрения с помощью ретровирусных векторов генетического кластера miR-192/194 было показано, что данные miРНК обладают способностью ингибировать все три гена семейства *Per* [16]. В данной работе приводятся также аргументы в пользу того, что и эндогенно продуцируемые miR-192 и miR-194 подавляют синтез белков семейства PER, за счет чего возможен эффект микрии мутаций в соответствующих часовых генах – сокращение значения Tcd (Tcd < 24 часов).

Еще одной, также, по-видимому, тканеспецифической разновидностью miРНК, с преимущественно печеночной локализацией, интерферирующей с генами БЧ является miR-141 [14]. Чрезмерная экспрессия miR-141 в злокачественных клетках холангиоцитов приводит к репрессии образования CLOCK, который, в свою очередь, является фактором, замедляющим рост опухоли. В данном случае последствия нарушений циркадианной ритмичности на органном уровне связано с одним из основных генов БЧ и сопровождается прогрессированием злокачественного новообразования. В подобных случаях, когда гиперэкспрессия miРНК имеет очевидные негативные последствия, могут быть актуальны клинические исследования антисмысловых олигонуклеотидов, блокирующих данную miРНК.

Обобщенные данные о локализации, механизме действия и эффектах на циркадианную систему известных в настоящее время микро-РНК

| Наименование miРНК | Локализация | Мишень и механизм действия | Циркадианный эффект |
|---|---|---|---|
| miR-132 | СХЯ | Разнонаправленный эффект на м-РНК *Per*, опосредованный моделированием хроматина другими факторами | Слабое сокращение Tcd (10-20 мин) |
| miR-216 | СХЯ | Не изучен | ↓ Чувствительности к свету, ↓ амплитуды |
| miR-182/miR96 | Сетчатка | м-РНК ADCY 6 и *Clock* | Способствуют синтезу мелатонина, возможно влияние на Tcd (через Clock м-РНК) |
| miR-122 | Печень | Контроль синтеза белка ноктурнина − «циркадианной деаденилазы печени» | Регуляция метаболических процессов в печени |
| miR-141 | Печень | Подавление активности CLOCK | ↓ Амплитуды, десинхронизация метаболических процессов |
| miR-192/194 | Печень | Подавление синтеза белков семейства PER | Сокращение Tcd |
| miR-206 | Скелетная мускулатура | Разнонаправленное взаимодействие с *Clock* | Стабилизация Tcd |

В сетчатке механизмы посттранскрипционного контроля циркадианных ритмов задействуют тканеспецифические miРНК (miR-96 и miR-182) [28]. Содержание обеих этих mi-РНК в сетчатке у мышей имеет достоверный циркадианный ритм ночного типа, сопоставимый по амплитуде с ритмом основного компонента БЧ – *Bmal* м-РНК. Акрофазы содержания miR-182 и miR-96 синхронны и четко привязаны к началу темного времени суток. Возможными мишенями для miR-96 и miR-182 являются м-РНК аденилатциклазы VI (ADCY6) и гена *Clock*. Примечательно, что ADCY6 является фактором, препятствующим образованию NAT (N-ацентилтрансферазы) – ключевого ферментом синтеза мелатонина, важнейшего компонента системной гуморальной регуляции циркадианной ритмичности физиологических, биохимических и клеточных процессов. ADCY6 в сетчатке имеет выраженную циркадианную ритмичность, противофазную miR-96 и miR-182 с батифазой в середине ночи, примерно через

4 часа после акрофазы miR-96 и miR-182, что также может быть объяснено воздействием данных miРНК на ADCY6 м-РНК. Таким образом, miR-96 и miR-182 косвенно способствуют продукции мелатонина сетчаткой.

Наконец, в мышечной ткани, циркадианная ритмичность модулируется эффектами еще одной разновидности miR, miR-206 [29]. MiR-206 является специфической для скелетной мускулатуры разновидностью miРНК. Транскрипция генов miR-206 находится под контролем миогенных регуляторных факторов MyoD1 и миогенина, которые, в свою очередь, являются ключевыми элементами циркадианных БЧ в мышечной ткани. Среди основных часовых генов мишенью miR-206 служит ген *Clock* [8].

В динамической модели, предложенной в одной из последних работ [29] продемонстрирована необходимость наличия всех ключевых факторов циркадианных БЧ (Clock, MyoD1, miR-206) для поддержания циркадианной ритмичности на тканеспецифическом уровне (скелетная мускулатура). При нарушении образования miR-206, Tcd становится нестабильным и, с течением последовательных циклов, постепенно смещается к значениям 24,5 → 24,7 часов. В данной модели также показано, что именно присутствие miR-206 обеспечивает точный ход БЧ с Tcd = 24 часа. Кроме того, предложенная модель объясняет, почему нарушение функции гена *BMal* способны приводить к утрате циркадианной ритмичности. *BMal* является своего рода «инициатором», запускающим весь механизм обратной связи между ключевыми генами БЧ. В то же время, присутствие второго фактора позитивного звена цепи (*Clock*) во многом определяет параметрические характеристики ритма [29]. Находящиеся в «приглушенном» состоянии низкоамплитудные ритмы биологических процессов в периферических тканях, легко подстраиваются под синхронизирующие импульсы СХЯ при поступлении световых сигналов [4, 12]. Для осуществления такого ответа, однако, требуется присутствие всех тканеспецифических компонентов (основных генов БЧ, *ccg и* miРНК). В противном случае система способна генерировать колебания с Tcd в установленном циркадианном диапазоне, отличные от $T = 24$ часа, что приводит в конечном счете к появлению физиологических и биохимических ритмов с нерегулярными колебаниями в экстрациркадианном диапазоне частот [1]. В данной работе нами была обоснована модель возникновения стохастических гармоник биохимических и физиологических процессов, обнаруживаемых при различных стрессовых и патологических состояниях, а также в процессе старения. Авторы одной из последних работ [29] в своей динамической модели на примере своей модели также показывают, что «устойчивые и стабильные осцилляции возможны только в пределах определенных значений параметров ритмов основных системных компонентов БЧ» и далее, обсуждая роль miR-206, «нарушение экспрессии одного из компонентов способно приводить к развитию различных заболеваний». Таким образом, участие определенных miРНК на тканевом уровне, в периферических органах, может служить важнейшим фактором в поддержании стабильной циркадианной ритмичности с Tcd = 24 ч и определять амплитудно-фазовые характеристики ритмов физиологических, биохимических процессов, поведенческих реакций и т.д. и играть ключевую роль в синхронизации биологических процессов.

**Список литературы**

1. Агаджанян Н.А., Губин Д.Г. Десинхроноз: механизмы развития от молекулярно-генетического до системного уровня // Усп. физиол. наук. – 2004. – Т. 35, № 2. – С. 57–72.

2. Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. Некодирующие РНК // Биохимия. – 2007. – Т, 72, № 11. – С. 1427–1448.

3. Alvarez-Saavedra M., Antoun G., Yanagiya A. et al. miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock // Hum. Mol. Genet. – 2011. – №20 (4). – P. 731–751.

4. Balsalobre A. Clock genes in mammalian peripheral tissues // Cell Tissue Res. – 2002. – №309. – P. 193–199.

5. Cheng, H.Y., Papp, J.W., Varlamova, O. et al. microRNA Modulation of circadian-clock period and entrainment // Neuron. – 2007. – №54. – P. 813–829.

6. Cohen S.M, Brennecke J., Stark A. Denoising feedback loops by thresholding–A new role for microRNAs // Genes & Dev. – 2006. – №20. – P. 2769–2772.

7. Gatfield D., Le Martelot G., Vejnar C.E. et al. Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression // Genes & Dev. – 2009. – №23. – P. 1313–1326.

8. Gonze D., Halloy J., Goldbeter A. Robustness of circadian rhythms with respect to molecular noise // Proc Natl Acad Sci USA. – 2002. – №99. – P. 673–678.

9. Katoh T, Sakaguchi Y, Miyauchi K. et al. Selective stabilization of mammalian microRNAs by 39 adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2 // Genes & Dev. – 2009. – №23. – P. 433–438.

10. Kojima S., Shingle D.L., Green C. Post-transcriptional control of circadian rhythms // J Cell Sci. – 2011. – №124. – P. 311–320.

11. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A. et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse // Curr Biol. – 2002. – №12. – P. 735–739.

12. Leloup J.C., Goldbeter A. Toward a detailed computational model for the mammalian circadian clock // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – №100. – P. 7051–7056.

13. Li X, Cassidy J.J., Reinke C.A. et al. A microRNA imparts robustness against environmental fluctuation during development // Cell. – 2009. – №137. – P. 273–282.

14. Meng, F., Henson, R., Lang, M. et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy

in human cholangiocarcinoma cell lines // Gastroenterology. – 2006. – №130. – P. 2113–2129.

15. Mrosovsky N., Edelstein K., Hastings M.H., Maywood E.S. Cycle of period gene expression in a diurnal mammal (Spermophilus tridecemlineatus): implications for nonphotic phase shifting // J. Biol. Rhythms. – 2001. – №16 (5). – P. 471–478.

16. Nagel R., Clijsters L., Agami R. The miRNA-192/194 cluster regulates the Period gene family and the circadian clock // FEBS Journal. – 2009. – №276. – P. 5447–5455.

17. O'Neill J.S., Hastings M.H. Circadian clocks: timely interference by MicroRNAs // Curr Biol. – 2007. – №17. – R760–R762.

18. Pegoraro M., Tauber E. The role of microRNAs (miRNAs) in circadian rhythmicity // J. Genetics. – 2008. – №87 (5). – P. 505–511.

19. Pittendrgh C.S. Temporal organization: a reflection of a Darwinian clock-watcher // Annu. Rev. Physiol. – 1993. – №55. – P. 16–54.

20. Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L. et al. The orphan nuclear receptor REV-ERBa controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator // Cell. – 2002. – №110. – P. 251–260.

21. Reddy A. B., Karp N. A., Maywood E. S. et al. Circadian orchestration of the hepatic proteome // Curr. Biol. – 2006. – №16. – P. 1107–1115.

22. Sato T.K., Panda S., Miraglia, L.J. et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock // Neuron. – 2004. – №43. – P. 527–537

23. Sun Y., Koo S., White N. et al. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs // Nucleic Acids Res. – 2004. – №32. – e188.

24. Takahashi J.S., Hong H.K., Ko C.H., McDearmon E.L. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease // Nat Rev Genet. – 2008. – №9. – P. 764–75.

25. Tang X, Gal J, Zhuang X, et al. A simple array platform for microRNA analysis and its application in mouse tissues // RNA. – 2007. – №13. – P. 1803–1822.

26. Ueda H.R., Chen W., Adachi A., et al. A transcription factor response element for gene expression during circadian night // Nature. – 2002. – №418. – P. 534–539.

27. Wienholds E., Kloosterman W.P., Miska E. et al. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development // Science. – 2005. – №309. – P. 310–311.

28. Xu S., Witmer P.D., Lumayag S. et al. MicroRNA (miRNA) Transcriptome of Mouse Retina and Identification of a Sensory Organ-specific miRNA Cluster. // J. Biol.Chem. – 2007. – №282, 34. – P. 25053–25066.

29. Zhou W., Li Y., Wang X., Wu L., Wang Y. MiR-206-mediated dynamic mechanism of the mammalian circadian clock // BMC Systems Biology. – 2011. – №5. – P. 141.