



Поиск микроРНК, потенциально задействованных в поддержании самообновления плюрипотентных клеток лабораторной крысы

В.В. Шерстюк^{1, 2, 3, 4}✉, С.П. Медведев^{1, 2, 3, 4}, М.Т. Ри^{5, 6}, Ю.В. Вяткин^{1, 4, 5, 6}, О.В. Сайк¹, Д.Н. Штокало^{1, 5, 6, 7}, С.М. Закиян^{1, 2, 3, 4}

- ¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
² Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия
³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
⁵ ООО «АкадемДжин», Новосибирск, Россия
⁶ Институт Сен-Лорана, Вобурн, США
⁷ Институт систем информатики им. А.П. Ершова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Самообновление культивируемых плюрипотентных клеток – сложный процесс, объединяющий множество функциональных и регуляторных уровней. В поддержании самообновления клеток принимают участие сеть транскрипционных факторов, широкий спектр их генов-мишеней, включая ферменты, регулирующие структуру хроматина, сигнальные каскады, а также контур, содержащий систему регуляторных некодирующих РНК. Изучение молекулярно-генетических основ поддержания самообновления и реализации свойства плюрипотентности культивируемых клеток млекопитающих является крайне важной задачей для понимания процессов, происходящих в доимплантационном эмбриогенезе, а также для построения эффективных методик получения линий плюрипотентных стволовых клеток в интересах экспериментальной биологии и медицины. МикроРНК (миРНК) играют важную роль в процессах поддержания плюрипотентного состояния и репрограммирования клеток. Однако участие данного класса некодирующих РНК в представленных процессах и функции отдельных миРНК изучены недостаточно. Целью настоящего исследования был поиск миРНК, потенциально участвующих в процессах поддержания плюрипотентного состояния и репрограммирования клеток крысы *Rattus norvegicus*. С использованием методов биоинформатики и данных, полученных в результате секвенирования нового поколения, нами проанализирована экспрессия миРНК в эмбриональных стволовых клетках, индуцированных плюрипотентных стволовых клетках и эмбриональных фибробластах крысы. Проведенный анализ дифференциальной экспрессии между группами плюрипотентных клеток и фибробластов, а также анализ проверенных экспериментально генов-мишеней дифференциально экспрессирующихся известных миРНК крысы позволили выявить новых потенциальных участников процессов поддержания плюрипотентного состояния и репрограммирования. Кроме того, новые потенциальные участники этих процессов обнаружены среди ранее не аннотированных миРНК крысы. Использование биоинформатических подходов и методов системной биологии – первый необходимый шаг при выборе кандидатов для дальнейшего экспериментального изучения. Полученные результаты существенно дополняют представления о системе регуляции самообновления у такого модельного организма, как лабораторная крыса, и расширяют знания о данной системе у млекопитающих в целом.

Ключевые слова: плюрипотентность; микроРНК; системная биология.

The search for microRNAs potentially involved in the self-renewal maintaining of laboratory rat pluripotent stem cells

V.V. Sherstyuk^{1, 2, 3, 4}✉, S.P. Medvedev^{1, 2, 3, 4}, M.T. Ri^{5, 6}, Y.V. Vyatkin^{1, 4, 5, 6}, O.V. Saik¹, D.N. Shtokalo^{1, 5, 6, 7}, S.M. Zakian^{1, 2, 3, 4}

- ¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
² E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk, Russia
³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia
⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
⁵ AcademGene LLC, Novosibirsk, Russia
⁶ St. Laurent Institute, Woburn, USA
⁷ A.P. Ershov Institute of Informatics Systems SB RAS, Novosibirsk, Russia

Self-renewal of cultured pluripotent stem cells is a complex process, which includes multiple functional and regulatory levels. Transcription factors, their target genes, chromatin modifiers, signaling pathways, and regulatory noncoding RNAs are involved in the maintaining of self-renewal. Studies of molecular and genetic bases of maintaining self-renewal and pluripotency in cultured mammalian cells are important to understand processes in preimplantation embryogenesis and to develop efficient techniques to obtain pluripotent stem cell lines for experimental biology and medicine. MicroRNAs (miRNAs) play an important role in pluripotency maintaining and reprogramming. However, involvement of this class of noncoding RNAs and functions of individual molecules are poorly studied. The goal of this study was the search for the miRNAs potentially involved in the pluripotency maintaining and reprogramming of *Rattus norvegicus* cells. We analyzed the expression of miRNAs in rat embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells and embryonic fibroblasts using bioinformatic methods and data obtained with next generation sequencing. The analysis of differential expression between groups of rat pluripotent cells and fibroblasts, and the analysis of experimentally confirmed target genes of differentially expressed known rat miRNAs revealed novel potential players of pluripotency maintaining and

reprogramming processes. In addition, novel members of these processes were revealed among novel rat miRNAs. The use of bioinformatic and systems biology approaches is the first step, which is necessary for choosing candidates for the subsequent experimental studies. The results obtained substantially improve our understanding of the self-renewal regulation system of the laboratory rat, a popular biomedical object, and our knowledge about the system in mammals.

Key words: pluripotency; microRNA; system biology.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шерстюк В.В., Медведев С.П., Ри М.Т., Вяткин Ю.В., Сайк О.В., Штокало Д.Н., Закиян С.М. Поиск микроРНК, потенциально задействованных в поддержании самообновления плюрипотентных клеток лабораторной крысы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):179-186. DOI 10.18699/VJ18.345

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Sherstyuk V.V., Medvedev S.P., Ri M.T., Vyatkin Y.V., Saik O.V., Shtokalo D.N., Zakian S.M. The search for microRNAs potentially involved in the self-renewal maintaining of laboratory rat pluripotent stem cells. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):179-186. DOI 10.18699/VJ18.345 (in Russian)

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) могут быть дифференцированы в производные всех трех зародышевых листков. Известно два типа ПСК: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), получаемые из внутренней клеточной массы бластоцист, и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), получаемые путем сверхэкспрессии факторов плюрипотентности (Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc) из соматических клеток (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson et al., 1998; Takahashi, Yamanaka, 2006). ПСК и их дифференцированные производные нашли широкое применение для изучения процессов, происходящих в раннем развитии, создания моделей генетических заболеваний и тестирования лекарственных препаратов. Для успешного получения, культивирования и применения ПСК необходимо понимание процессов и механизмов, участвующих в регуляции самообновления и поддержания плюрипотентного состояния, а также его реализации в ходе дифференцировки. В настоящее время известно множество факторов, участвующих в регуляции этих процессов, в том числе транскрипционные факторы, эпигенетические механизмы, сигнальные каскады, некодирующие РНК (Васькова и др., 2013; Vaskova et al., 2013; Hackett, Surani, 2014; Huang et al., 2015). Среди некодирующих РНК особое внимание уделяется микроРНК (миРНК) – коротким молекулам длиной от 18 до 25 нуклеотидов, осуществляющим регуляцию экспрессии генов на посттранскрипционном уровне (Eulalio et al., 2008; Filipowicz et al., 2008). Участие в поддержании плюрипотентного состояния клеток мыши и человека показано для ряда миРНК, среди которых наиболее известны миРНК, закодированные в кластерах miR-290-295 (miR-371-373 у человека), miR-302-367, а также миРНК семейства miR-200 (Calabrese et al., 2007; Huang et al., 2015; Yuan et al., 2017). МиРНК крысы, в отличие от мыши, исследованы менее детально как в рамках процесса поддержания плюрипотентности, так и в целом. Крыса *Rattus norvegicus* – один из классических объектов экспериментальной биологии. Однако ЭСК крысы впервые получены только в 2008 г. (Vuehr et al., 2008; Li et al., 2008). ЭСК и ИПСК крысы культивируют в условиях отсутствия бычьей эмбриональной сыворотки с добавлением лейкемия-ингибирующего фактора и ингибиторов Mek1/2 и Gsk3 киназ. Ранее при сравнительном анализе транскриптома

ПСК и эмбриональных фибробластов крысы был выявлен ряд видоспецифичных особенностей поддержания плюрипотентного состояния (Vaskova et al., 2015). Таким образом, поиск новых миРНК, задействованных в данном процессе, необходим как для понимания уровня консервативности тех или иных миРНК, так и для выявления новых участников. В настоящей работе проведен поиск новых участников процесса поддержания плюрипотентного состояния среди миРНК на основании результатов полного секвенирования малых РНК, полученных из ЭСК, ИПСК и эмбриональных фибробластов крысы.

Материалы и методы

Анализ первичных данных секвенирования малых РНК. Использованы данные, полученные ранее в ходе секвенирования малых РНК ЭСК, ИПСК и эмбриональных фибробластов крысы и загруженные в базу данных SRA (SRX395433-395442). На первом этапе произведена фильтрация прочтений по качеству и удалена последовательность адаптера при помощи FASTX Toolkit v0.0.14. Далее прочтения картировали на референсный геном *R. norvegicus* (версия m5) и на референс рибосомальных РНК *R. norvegicus* из базы данных Silva с использованием программного обеспечения BWA v0.7.10-r806 (Gibbs et al., 2004; Quast et al., 2013). Известно, что миРНК имеют характерную длину от 18 до 25 нуклеотидов. Поэтому прочтения длиной менее 18 и более 27 нуклеотидов были удалены из дальнейшего анализа. Проведена фильтрация прочтений от известных повторенных последовательностей класса РНК. В результате обработки получен набор «информативных прочтений». Подсчет уровня экспрессии известных миРНК производили путем вычисления количества информативных прочтений, пересекающихся с координатами известных миРНК *R. norvegicus* из базы данных miRbase v21 (Griffiths-Jones et al., 2006). Нормированный уровень экспрессии миРНК вычисляли по следующей формуле:

$$x_j^i = \frac{X_j^i \cdot 10^6}{(\text{Количество информативных прочтений})_i},$$

где i – образец, j – миРНК; X_j^i – количество прочтений, картированных на миРНК; x_j^i – нормализованный уровень экспрессии (RPM, reads per million).

Поиск новых миРНК крысы. Поиск новых миРНК крысы проведен с использованием программного обеспечения miRanalyzer и miRDeep2. Для полученного набора новых миРНК произведена фильтрация против известных миРНК крысы и повторенных последовательностей класса РНК. Вторичные структуры пре-миРНК получены с использованием программного обеспечения RNAFold (Hofacker, 2003).

Анализ дифференциальной экспрессии миРНК между группами плюрипотентных клеток и эмбриональных фибробластов крысы выполнен с использованием следующего подхода: произведен расчет уровня статистической значимости различий экспрессии миРНК между группами ПСК (ЭСК и ИПСК) и эмбриональных фибробластов с помощью программного пакета edgeR (Robinson et al., 2010). Далее, для того чтобы повысить достоверность данных, были введены критерии: 1) отношение средних значений экспрессии в группах должно быть не менее 3; 2) минимальное значение экспрессии миРНК в одной из групп должно быть в два раза больше максимального значения в другой группе. МиРНК, соответствующие данным критериям, считали дифференциально экспрессирующимися.

Анализ проверенных экспериментально генов-мишеней дифференциально экспрессирующихся известных миРНК. Проверенные экспериментально гены-мишени миРНК человека, мыши и крысы загружены из базы данных MiRTarBase (Hsu et al., 2011). Выявленные гены-мишени прошли дополнительный отбор по изменению уровня экспрессии относительно миРНК. Так, для миРНК, уровень экспрессии которых повышен в ПСК по сравнению с эмбриональными фибробластами, были отобраны только те гены-мишени, которые имеют сниженный уровень экспрессии в ПСК, и наоборот. Применение этого подхода обусловлено основной функцией миРНК, выраженной в негативной регуляции экспрессии мРНК-мишени. Используемые в нашей работе транскриптомные данные были получены ранее для тех же линий клеток (Vaskova et al., 2015). Анализ участия полученных генов-мишеней и дифференциально экспрессирующихся известных миРНК крысы в процессах поддержания стволового состояния и мезенхимально-эпителиального перехода проведен с использованием программного обеспечения ANDSystem (Ivanisenko et al., 2015).

Результаты

Поиск потенциальных участников процесса поддержания плюрипотентности путем анализа дифференциальной экспрессии. Современные технологии секвенирования позволяют находить огромные массивы данных об экспрессии транскриптов. В нашей работе использованы результаты, полученные при секвенировании малых РНК ЭСК, ИПСК и эмбриональных фибробластов крысы. Эти линии клеток получены и охарактеризованы ранее в лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Vaskova et al., 2015). При обработке данных выявлена экспрессия 674 миРНК в ЭСК, ИПСК и эмбриональных фибробластах крысы. Одним из основных подходов при анализе транскриптомных данных является поиск генов, дифференциально экспрес-

сирующихся между типами клеток. В результате анализа дифференциальной экспрессии миРНК между группами ПСК и эмбриональных фибробластов обнаружено 219 дифференциально-экспрессирующихся миРНК. При этом повышенный уровень экспрессии имеют 77 миРНК в ПСК и 142 – в эмбриональных фибробластах. На рис. 1 представлена выборка из дифференциально-экспрессирующихся миРНК с наибольшим уровнем экспрессии в ПСК крысы. Среди миРНК с повышенным уровнем экспрессии в ПСК выявлены ранее известные молекулы, участвующие в поддержании плюрипотентности клеток мыши, такие как миРНК кластера miR-290-295 (miR-290, miR-291a, miR-291b, miR-292, miR-293, miR-294, miR-295) и семейства miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429). В настоящее время эти семейства наиболее изучены в контексте поддержания плюрипотентного состояния, а также процесса репрограммирования к плюрипотентному состоянию (Calabrese et al., 2007; Leonardo et al., 2012; Huang et al., 2014). Для ряда других миРНК, например кластера miR-182-96-183, ранее показана экспрессия в ПСК мыши, но не известны функции и гены-мишени (Zhao et al., 2014). Экспрессия данного кластера выявлена нами также в ПСК крысы. Кроме того, обнаружено 14 миРНК, локализованных в участке размером около 45 т. п. н. на длинном плече X-хромосомы (Xq37): miR-743a, miR-743b, miR-742, miR-883, miR-471, miR-3551, miR-741, miR-463, miR-880, miR-878, miR-881, miR-871, miR-3580, miR-465. Высокий уровень экспрессии в ПСК, а также его снижение при дифференцировке, что было ранее показано для miR-741-3p и miR-743a-3p, позволяют предположить участие данных миРНК в процессе поддержания плюрипотентного состояния.

Поиск потенциальных участников процесса поддержания плюрипотентности путем анализа генов-мишеней миРНК. Известно, что миРНК осуществляют репрессию генов путем связывания с мРНК-мишенью в комплексе RISC (RNA-induced silencing complex), что приводит к деградации целевой мРНК или ингибированию процесса трансляции (Filipowicz et al., 2008). При этом каждая отдельная миРНК может регулировать множество мРНК (Bartel, 2009). Важный этап при анализе миРНК – поиск генов-мишеней. В настоящее время разработано множество программ для поиска потенциальных генов-мишеней миРНК. Среди наиболее известных – TargetScan v7.0 (Agarwal et al., 2015), miRanda v3.3a (Betel et al., 2008), TargetSpy v1.1 (Sturm et al., 2010). Основным недостатком поиска потенциальных генов-мишеней является высокая доля ложноположительных результатов (Yue et al., 2009). Для того чтобы повысить достоверность результатов, в анализе рассматривались только проверенные экспериментально гены-мишени для списка миРНК. Одна из наиболее полных баз данных проверенных экспериментально генов-мишеней миРНК – MiRTarBase (Hsu et al., 2011).

В нашей работе в результате поиска по базе данных MiRTarBase выявлено 457 генов для миРНК, дифференциально-экспрессирующихся между группами ПСК и эмбриональных фибробластов крысы. Чтобы выявить миРНК, участвующие в процессе поддержания стволового состояния, полученные списки генов и дифференци-

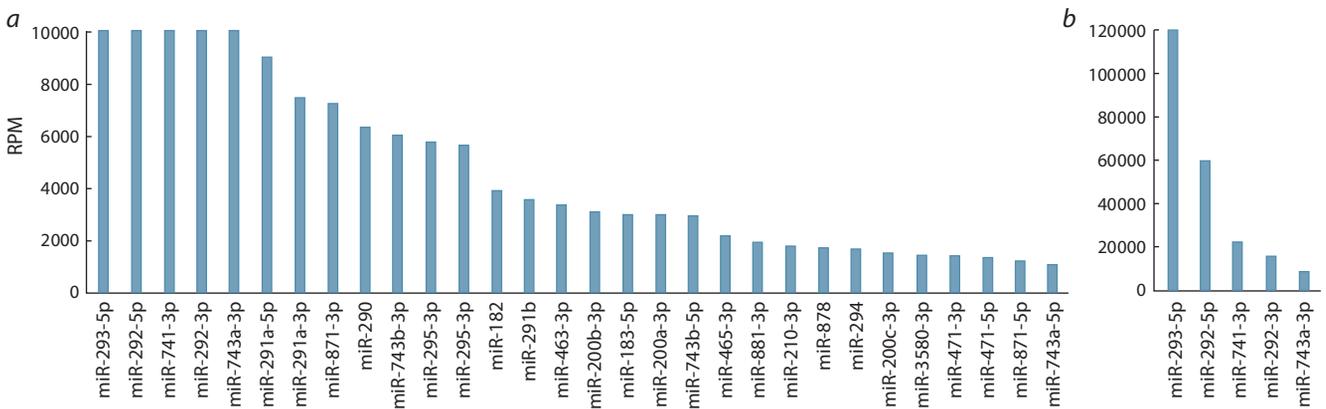


Fig. 1. Upregulated miRNAs in rat pluripotent stem cells compared to embryonic fibroblasts. (a) Top 30 miRNAs with the highest expression levels in PSCs. (b) Top 5 miRNAs with the highest expression levels in PSCs.

ально-экспрессирующихся миРНК проанализировали с использованием программного обеспечения ANDSysSystem (Ivanisenko et al., 2015). Эта программа позволяет реконструировать генные сети на основе информации о взаимодействиях между изучаемыми генами, белками, миРНК, метаболитами и др. и их участии в различных процессах, полученной из баз данных опубликованных научных статей и информационных ресурсов. В полученной генной сети представлены известные маркеры плюрипотентного состояния, такие как Nanog, Sox2, Esrrb, Nodal и Lin28a (рис. 2, а) (Huang et al., 2015), в ней присутствуют также миРНК miR-429 и miR-183 с повышенным уровнем экспрессии в ПСК. Можно предположить, что эти миРНК задействованы в процессе поддержания плюрипотентности у крысы. Кроме того, в данной сети участвуют миРНК, вовлеченные в процесс негативной регуляции плюрипотентного состояния клеток мыши и человека, такие как, например, miR-145 и представители семейства let-7 (Xu et al., 2009; Rahkonen et al., 2016). В сети представлены также миРНК семейства miR-181, регулирующие Tcf1a и Wnt3a. Ранее Tcf1a был использован в качестве одного из факторов репрограммирования клеток человека (Picanço-Castro et al., 2011). Wnt3a – участник сигнального пути Wnt, активация которого необходима для поддержания плюрипотентного состояния клеток крысы (Buehr et al., 2008; Li et al., 2008).

Кроме того, дифференциально-экспрессирующиеся миРНК и их экспериментально подтвержденные гены-мишени проанализированы на участие в мезенхимально-эпителиальном переходе (МЭП), ключевом процессе начального этапа репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию (рис. 2, б) (Samavarchi-Tehrani et al., 2010). Одним из основных генов, повышающих уровень экспрессии на начальных этапах репрограммирования, является *Cdh1*, кодирующий E-cadherin и способствующий МЭП (An et al., 2017). *Cdh1* представлен в сети МЭП. В этой сети участвуют три миРНК, две из которых имеют повышенный уровень экспрессии в ПСК (miR-182 и miR-429), одна миРНК (miR-615) имеет повышенный уровень экспрессии в фибробластах. miR-429 относится к семейству miR-200, которое способствует

начальным этапам репрограммирования фибробластов мыши к плюрипотентному состоянию (Samavarchi-Tehrani et al., 2010). miR-182, как известно, повышает уровень экспрессии при репрограммировании фибробластов мыши (Chen et al., 2012). Участие miR-182 в сети МЭП свидетельствует о том, что эта миРНК может способствовать репрограммированию путем активации данного процесса. С другой стороны, miR-615, экспрессия которой снижается при переходе к состоянию плюрипотентности, может являться потенциальным ингибитором процесса репрограммирования. Таким образом, представленный подход, основанный на методах системной биологии и биоинформатики, позволил выявить потенциальных участников процессов поддержания плюрипотентности и репрограммирования для их дальнейшего экспериментального изучения.

Поиск потенциальных участников процесса поддержания плюрипотентности среди новых, ранее не аннотированных миРНК крысы. Новые участники процесса поддержания плюрипотентности могут быть выявлены среди не только известных, но и ранее не аннотированных миРНК. Последняя версия базы данных миРНК miRBase v 21 (<http://mirbase.org/>) содержит 765 зрелых миРНК крысы, в то время как количество известных зрелых миРНК мыши и человека составляет 1915 и 2588 соответственно (Griffiths-Jones et al., 2006). Для поиска новых миРНК существует ряд доступных программ, например miRanalyzer (Hackenberg et al., 2011) и miRDeep2 (Friedlander et al., 2012). В результате поиска новых миРНК крысы с использованием приведенных программ и анализа дифференциальной экспрессии выявлено 10 новых зрелых миРНК с повышенным уровнем экспрессии в ПСК, 4 из 10 миРНК не имеют известных гомологов. Причем 2 из этих 4 миРНК представляют собой зрелые формы (5'- и 3'-плечи) одной пре-миРНК. Остальные 6 миРНК имеют известные гомологи у мыши и человека.

Среди новых миРНК крысы выявлены гомологи miR-302a и miR-302b мыши (рис. 3, а и б). Известно, что данные миРНК участвуют в регуляции плюрипотентного состояния мыши и человека, однако не были обнаружены ранее у крысы (Jouneau et al., 2012). Кроме того, в локусе

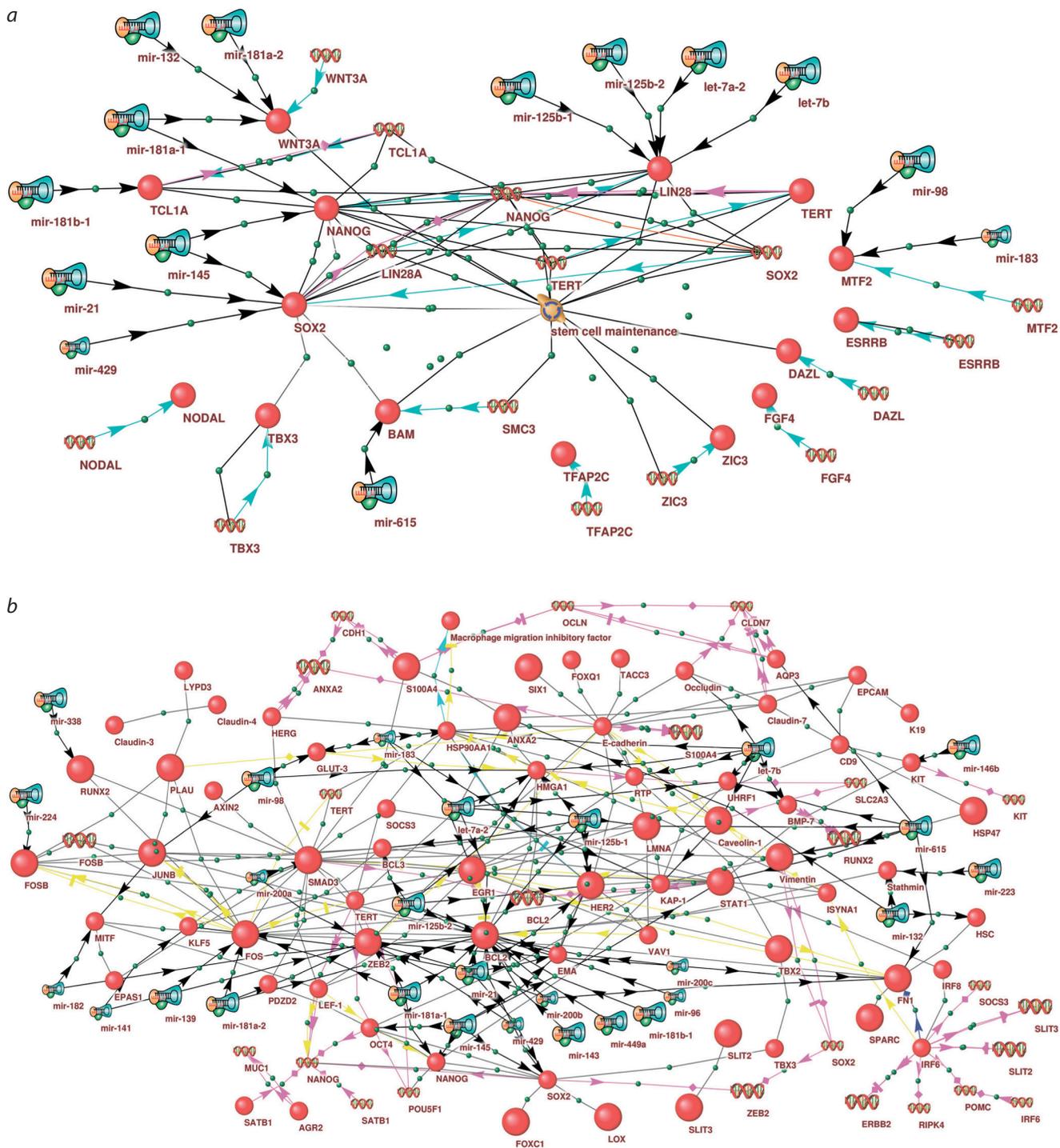


Fig. 2. Gene network that includes differentially expressed miRNAs and their experimentally confirmed target genes involved: *a* – stem cell maintenance; *b* – mesenchyme-to-epithelium transition.

miR-290-295 выявлена новая микроРНК, гомологичная miR-372 человека (см. рис. 3, е). Кластер miR-290-295 мыши и гомологичный ему miR-371-373 человека играют значительную роль в поддержании плюрипотентного состояния (Cao et al., 2015; Yuan et al., 2017). MiR-147, гомолог которой найден нами у крысы, участвует в активации МЭП, опосредованно активируя экспрессию *CDH1* в клетках рака толстой кишки и легких человека (Lee et al., 2014).

Предположительно, данная микроРНК может действовать по аналогичному механизму в ходе репрограммирования. Найдена микроРНК, гомологичная miR-18b мыши. Известно, что miR-18b мыши и человека локализуется в кластере miR-106a-363, экспрессия которого активируется в ходе репрограммирования (Chen et al., 2012).

Среди новых микроРНК крысы, не имеющих известных гомологов у других видов, обнаружена микроРНК, локали-

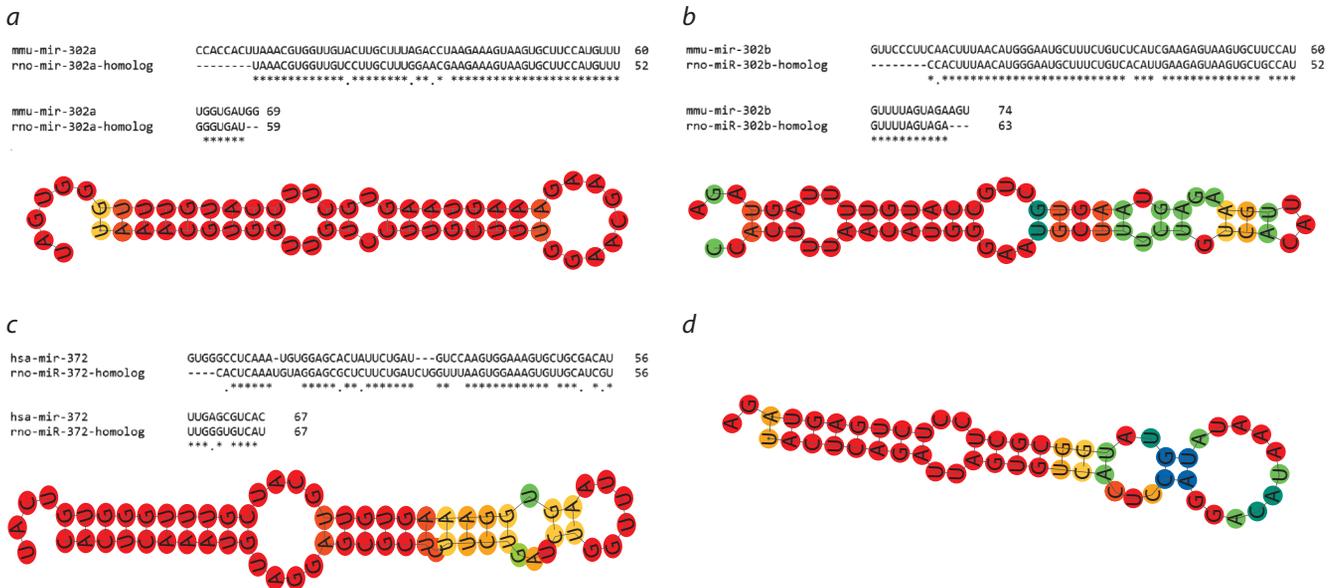


Fig. 3. Nucleotide alignments and secondary structures of novel rat miRNAs with known mouse and human homologs: (a) miR-302a, (b) miR-302b, (c) miR-372. (d) Secondary structure of a novel rat miRNA, which is expressed at a high level in pluripotent stem cells.

зованная на X-хромосоме, с высоким уровнем экспрессии в ПСК крысы (см. рис. 3, *г*). Повышенный уровень экспрессии этой миРНК наблюдается как у 5'-, так и 3'-плеча. Однако уровень экспрессии 3'-плеча гораздо выше чем у 5'-плеча, это показывает, что гены-мишени следует искать для 3'-плеча данной миРНК. Таким образом, на основе результатов тотального секвенирования малых РНК нами выделены кандидаты для дальнейшего анализа среди новых, ранее не аннотированных миРНК крысы.

Обсуждение

Система регуляции плюрипотентного состояния представляет собой сложную сеть взаимодействий множества факторов, среди которых значимую роль играют некодирующие РНК, и в частности миРНК. В настоящее время аннотировано около двух тысяч зрелых миРНК в геноме мыши и почти тысяча – в геноме крысы. Использование подходов системной биологии и биоинформатики необходимо для установления потенциальных участников процесса поддержания плюрипотентности. В представленном нами подходе можно выделить несколько основных этапов: 1) анализ уровня экспрессии известных миРНК; 2) поиск новых, ранее не аннотированных миРНК; 3) установление дифференциально-экспрессирующихся миРНК между группами плюрипотентных и соматических клеток; 4) поиск потенциальных и проверенных экспериментально генов-мишеней дифференциально-экспрессирующихся миРНК; 5) анализ потенциальных и проверенных экспериментально генов-мишеней с использованием ANDSystem (Ivanisenko et al., 2015).

Анализ генов-мишеней является одним из ключевых моментов при изучении функций конкретных молекул миРНК. Однако при анализе проверенных экспериментально генов-мишеней следует отметить следующие проблемы. Так, для различных пар миРНК–мРНК отличается методика, применяемая для экспериментального под-

тверждения. Наиболее достоверными считаются метод с использованием люциферазных конструкций и анализ количества белка с помощью вестерн-блоттинга при трансфекции миРНК (Long, Lahiri, 2011). Менее строгие доказательства пары миРНК–мРНК получены при анализе транскриптомных данных, путем сравнения уровней экспрессии либо в различных типах клеток, либо при трансфекции миРНК в клетки и анализе изменений в экспрессии мРНК (Thomas et al., 2010). В таких случаях влияние миРНК может быть опосредованным. Кроме того, гены-мишени миРНК, экспериментально подтвержденные для определенного типа клеток, могут не регулироваться этой миРНК в другом типе клеток.

В результате проведенного нами исследования сформирован список миРНК-кандидатов для дальнейшей экспериментальной проверки, которая позволит подтвердить или опровергнуть участие данных миРНК в процессе поддержания плюрипотентности. Одним из способов подтверждения участия миРНК в поддержании плюрипотентности является нокаут с дальнейшим анализом состояния клеток и экспрессии маркеров плюрипотентности. Современные технологии редактирования генома позволяют провести нокаут миРНК путем внесения мутаций в район, необходимый для процессинга миРНК, что вызывает нарушение созревания миРНК либо удаление кодирующей последовательности из генома (Chang et al., 2016; Liu et al., 2016). Применение системы CRISPR/Cas9 с двумя направляющими РНК приводит к делеции участка генома между сайтами внесения двуцепочечных разрывов (Essletzbichler et al., 2014). Данный подход успешно применяется для нокаута как миРНК, так и длинных некодирующих РНК (Ho et al., 2015; Zhu et al., 2016). Реализация этого подхода станет следующим этапом изучения выбранных нами миРНК-кандидатов в процессе поддержания плюрипотентного состояния клеток крысы.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-14-10084.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Agarwal V., Bell G.W., Nam J.W., Bartel D.P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015;4. DOI 10.7554/eLife.05005.
- An J., Zheng Y., Dann C.T. Mesenchymal to epithelial transition mediated by CDH1 promotes spontaneous reprogramming of male germline stem cells to pluripotency. *Stem Cell Reports*. 2017;8(2):446-459. DOI 10.1016/j.stemcr.2016.12.006.
- Bartel D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-233. DOI 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- Betel D., Wilson M., Gabow A., Marks D.S., Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D149-D153. DOI 10.1093/nar/gkm995.
- Buehr M., Meek S., Blair K., Yang J., Ure J., Silva J., McLay R., Hall J., Ying Q.L., Smith A. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*. 2008;135(7):1287-1298. DOI 10.1016/j.cell.2008.12.007.
- Calabrese J.M., Seila A.C., Yeo G.W., Sharp P.A. RNA sequence analysis defines Dicer's role in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007;104(46):18097-18102. DOI 10.1073/pnas.0709193104.
- Cao Y., Guo W.T., Tian S., He X., Wang X.W., Liu X., Gu K.L., Ma X., Huang D., Hu L., Cai Y., Zhang H., Wang Y., Gao P. miR-290/371-Mbd2-Myc circuit regulates glycolytic metabolism to promote pluripotency. *EMBO J*. 2015;34(5):609-623. DOI 10.15252/embj.201490441.
- Chang H., Yi B., Ma R., Zhang X., Zhao H., Xi Y. CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo. *Sci. Rep*. 2016;6:22312. DOI 10.1038/srep22312.
- Chen J., Wang G., Lu C., Guo X., Hong W., Kang J., Wang J. Synergistic cooperation of microRNAs with transcription factors in iPSC cell generation. *PLoS One*. 2012;7(7):e40849. DOI 10.1371/journal.pone.0040849.
- Essletzbichler P., Konopka T., Santoro F., Chen D., Gapp B.V., Kralovics R., Brummelkamp T.R., Nijman S.M., Burckstummer T. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res*. 2014;24(12):2059-2065. DOI 10.1101/gr.177220.114.
- Eulalio A., Huntzinger E., Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*. 2008;132(1):9-14. DOI 10.1016/j.cell.2007.12.024.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156.
- Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet*. 2008;9(2):102-114. DOI 10.1038/nrg2290.
- Friedlander M.R., Mackowiak S.D., Li N., Chen W., Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(1):37-52. DOI 10.1093/nar/gkr688.
- Gibbs R.A., Weinstock G.M., Metzker M.L., Muzny D.M., Sodergren E.J., Scherer S., Scott G., Steffen D., Worley K.C., Burch P.E., Okwuonu G., Hines S., Lewis L., DeRamo C., Delgado O., Dugan-Rocha S., Miner G., Morgan M., Hawes A., Gill R., Celera, Holt R.A., Adams M.D., Amanatides P.G., Baden-Tillson H., Barnstead M., Chin S., Evans C.A., Ferriera S., Fosler C., Glodok A., Gu Z., Jennings D., Kraft C.L., Nguyen T., Pfannkoch C.M., Sitter C., Sutton G.G., Venter J.C., Woodage T., Smith D., Lee H.M., Gustafson E., Cahill P., Kana A., Doucette-Stamm L., Weinstock K., Fectel K., Weiss R.B., Dunn D.M., Green E.D., Blakesley R.W., Bouffard G.G., De Jong P.J., Osoegawa K., Zhu B., Marra M., Schein J., Bosdet I., Fjell C., Jones S., Krzywinski M., Mathewson C., Siddiqui A., Wye N., McPherson J., Zhao S., Fraser C.M., Shetty J., Shatsman S., Geer K., Chen Y., Abramzon S., Nierman W.C., Havlak P.H., Chen R., Durbin K.J., Egan A., Ren Y., Song X.Z., Li B., Liu Y., Qin X., Cawley S., Worley K.C., Cooney A.J., D'Souza L.M., Martin K., Wu J.Q., Gonzalez-Garay M.L., Jackson A.R., Kalafus K.J., McLeod M.P., Milosavljevic A., Virk D., Volkov A., Wheeler D.A., Zhang Z., Bailey J.A., Eichler E.E., Tuzun E., Birney E., Mongin E., Ureta-Vidal A., Woodwark C., Zdobnov E., Bork P., Suyama M., Torrents D., Alexandersson M., Trask B.J., Young J.M., Huang H., Wang H., Xing H., Daniels S., Gietzen D., Schmidt J., Stevens K., Vitt U., Wingrove J., Camara F., Alba M.M., Abril J.F., Guigo R., Smit A., Dubchak I., Rubin E.M., Couronne O., Poliakov A., Hubner N., Ganten D., Goesele C., Hummel O., Kreitler T., Lee Y.A., Monti J., Schulz H., Zimdahl H., Himmelbauer H., Lehrach H., Jacob H.J., Bromberg S., Gullings-Handley J., Jensen-Seaman M.I., Kwitek A.E., Lazar J., Pasko D., Tonellato P.J., Twigger S., Ponting C.P., Duarte J.M., Rice S., Goodstadt L., Beaton S.A., Emes R.D., Winter E.E., Webber C., Brandt P., Nyakatura G., Adetobi M., Chiaromonte F., Elnitski L., Eswara P., Hardison R.C., Hou M., Kolbe D., Makova K., Miller W., Nekrutenko A., Riemer C., Schwartz S., Taylor J., Yang S., Zhang Y., Lindpaintner K., Andrews T.D., Caccamo M., Clamp M., Clarke L., Curwen V., Durbin R., Eyras E., Searle S.M., Cooper G.M., Batzoglou S., Brudno M., Sidow A., Stone E.A., Venter J.C., Payseur B.A., Bourque G., Lopez-Otin C., Puente X.S., Chakrabarti K., Chatterji S., Dewey C., Pachter L., Bray N., Yap V.B., Caspi A., Tesler G., Pevzner P.A., Haussler D., Roskin K.M., Baertsch R., Clawson H., Furey T.S., Hinrichs A.S., Karolchik D., Kent W.J., Rosenbloom K.R., Trumbover H., Weirauch M., Cooper D.N., Stenson P.D., Ma B., Brent M., Arumugam M., Shteynberg D., Copley R.R., Taylor M.S., Riethman H., Mudunuri U., Peterson J., Guyer M., Felsenfeld A., Old S., Mockrin S., Collins F., Rat Genome Sequencing Project C. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. 2004;428(6982):493-521. DOI 10.1038/nature02426.
- Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S., Bateman A., Enright A.J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Database issue):D140-D144. DOI 10.1093/nar/gkj112.
- Hackenberg M., Rodriguez-Ezpeleta N., Aransay A.M. miRAnalyzer: an update on the detection and analysis of microRNAs in high-throughput sequencing experiments. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:W132-W138. DOI 10.1093/nar/gkr247.
- Hackett J.A., Surani M.A. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell*. 2014;15(4):416-430. DOI 10.1016/j.stem.2014.09.015.
- Ho T.T., Zhou N., Huang J., Koirala P., Xu M., Fung R., Wu F., Mo Y.Y. Targeting non-coding RNAs with the CRISPR/Cas9 system in human cell lines. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(3):e17. DOI 10.1093/nar/gku1198.
- Hofacker I.L. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3429-3431.
- Hsu S.D., Lin F.M., Wu W.Y., Liang C., Huang W.C., Chan W.L., Tsai W.T., Chen G.Z., Lee C.J., Chiu C.M., Chien C.H., Wu M.C., Huang C.Y., Tsou A.P., Huang H.D. miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:D163-D169. DOI 10.1093/nar/gkq1107.
- Huang G., Ye S., Zhou X., Liu D., Ying Q.L. Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network. *Cell Mol. Life Sci*. 2015;72(9):1741-1757. DOI 10.1007/s00181-015-1833-2.
- Huang H.N., Chen S.Y., Hwang S.M., Yu C.C., Su M.W., Mai W., Wang H.W., Cheng W.C., Schuyler S.C., Ma N., Lu F.L., Lu J.

- miR-200c and GATA binding protein 4 regulate human embryonic stem cell renewal and differentiation. *Stem Cell Res.* 2014;12(2):338-353. DOI 10.1016/j.scr.2013.11.009.
- Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Syst. Biol.* 2015;9(2):S2. DOI 10.1186/1752-0509-9-S2-S2.
- Jouneau A., Ciaudo C., Sismeiro O., Brochard V., Jouneau L., Vandormael-Pourmin S., Coppee J.Y., Zhou Q., Heard E., Antoniewski C., Cohen-Tannoudji M. Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles. *RNA.* 2012;18(2):253-264. DOI 10.1261/rna.028878.111.
- Lee C.G., McCarthy S., Gruidl M., Timme C., Yeatman T.J. MicroRNA-147 induces a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) and reverses EGFR inhibitor resistance. *PLoS One.* 2014;9(1):e84597. DOI 10.1371/journal.pone.0084597.
- Leonardo T.R., Schultheisz H.L., Loring J.F., Laurent L.C. The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming. *Nat. Cell Biol.* 2012;14(11):1114-1121. DOI 10.1038/ncb2613.
- Li P., Tong C., Mehrian-Shai R., Jia L., Wu N., Yan Y., Maxson R.E., Schulze E.N., Song H., Hsieh C.L., Pera M.F., Ying Q.L. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell.* 2008;135(7):1299-1310. DOI 10.1016/j.cell.2008.12.006.
- Liu Z., Hui Y., Shi L., Chen Z., Xu X., Chi L., Fan B., Fang Y., Liu Y., Ma L., Wang Y., Xiao L., Zhang Q., Jin G., Liu L., Zhang X. Efficient CRISPR/Cas9-mediated versatile, predictable, and donor-free gene knockout in human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* 2016;7(3):496-507. DOI 10.1016/j.stemcr.2016.07.021.
- Long J.M., Lahiri D.K. MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid-beta precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011;404(4):889-895. DOI 10.1016/j.bbrc.2010.12.053.
- Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981;78(12):7634-7638.
- Picanço-Castro V., Russo-Carbolante E., Reis L.C., Fraga A.M., de Magalhães D.A., Orellana M.D., Panepucci R.A., Pereira L.V., Covas D.T. Pluripotent reprogramming of fibroblasts by lentiviral mediated insertion of SOX2, C-MYC, and TCL-1A. *Stem Cells Dev.* 2011;20(1):169-180. DOI 10.1089/scd.2009.0424.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarla P., Pepplies J., Glockner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D590-D596. DOI 10.1093/nar/gks1219.
- Rahkonen N., Stubb A., Malonzo M., Edelman S., Emani M.R., Närvä E., Lähdesmäki H., Ruohola-Baker H., Lahesmaa R., Lund R. Mature Let-7 miRNAs fine tune expression of LIN28B in pluripotent human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 2016;17(3):498-503. DOI 10.1016/j.scr.2016.09.025.
- Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010;26(1):139-140. DOI 10.1093/bioinformatics/btp616.
- Samavarchi-Tehrani P., Golipour A., David L., Sung H.K., Beyer T.A., Datti A., Woltjen K., Nagy A., Wrana J.L. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2010;7(1):64-77. DOI 10.1016/j.stem.2010.04.015.
- Sturm M., Hackenberg M., Langenberger D., Frishman D. TargetSpy: a supervised machine learning approach for microRNA target prediction. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:292. DOI 10.1186/1471-2105-11-292.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-676. DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Thomas M., Lieberman J., Lal A. Desperately seeking microRNA targets. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010;17(10):1169-1174. DOI 10.1038/nsmb.1921.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-1147.
- Vaskova E.A., Medvedev S.P., Sorokina A.E., Nemudryy A.A., Elisaphenko E.A., Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Kizilova E.A., Zhelezova A.I., Evshin I.S., Sharipov R.N., Minina J.M., Zhdanova N.S., Khegay I.I., Kolpakov F.A., Sukhikh G.T., Pokushalov E.A., Karasikov A.M., Vlasov V.V., Ivanova L.N., Zakian S.M. Transcriptome characteristics and X-chromosome inactivation status in cultured rat pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2015;24(24):2912-2924. DOI 10.1089/scd.2015.0204.
- Vaskova E.A., Stekleneva A.E., Medvedev S.P., Zakian S.M. "Epigenetic memory" phenomenon in induced pluripotent stem cells. *Acta Naturae.* 2013;5(4):15-21.
- Xu N., Papagiannakopoulos T., Pan G., Thomson J.A., Kosik K.S. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell.* 2009;137(4):647-658. DOI 10.1016/j.cell.2009.02.038.
- Yuan K., Ai W.B., Wan L.Y., Tan X., Wu J.F. The miR-290-295 cluster as multi-faceted players in mouse embryonic stem cells. *Cell Biosci.* 2017;7:38. DOI 10.1186/s13578-017-0166-2.
- Yue D., Liu H., Huang Y. Survey of computational algorithms for microRNA target prediction. *Curr. Genomics.* 2009;10(7):478-492. DOI 10.2174/138920209789208219.
- Zhao B., Yang D., Jiang J., Li J., Fan C., Huang M., Fan Y., Jin Y., Jin Y. Genome-wide mapping of miRNAs expressed in embryonic stem cells and pluripotent stem cells generated by different reprogramming strategies. *BMC Genomics.* 2014;15:488. DOI 10.1186/1471-2164-15-488.
- Zhu S., Li W., Liu J., Chen C.H., Liao Q., Xu P., Xu H., Xiao T., Cao Z., Peng J., Yuan P., Brown M., Liu X.S., Wei W. Genome-scale deletion screening of human long non-coding RNAs using a paired-guide RNA CRISPR-Cas9 library. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(12):1279-1286. DOI 10.1038/nbt.3715.