

УДК 577.112.7

©Коллектив авторов

ЦИФРОВАЯ КАПЕЛЬНАЯ ПЦР – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К КОЛИЧЕСТВЕННОМУ ПРОФИЛИРОВАНИЮ микроРНК

Я.Ю. Киселева*, К.Г. Птицин, С.П. Радько, В.Г. Згода, А.И. Арчаков

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; тел./факс: (495)245-08-57; эл. почта: yana.kiseleva@gmail.com

МикроРНК – особый класс регуляторных молекул, влияющих на экспрессию генов. Циркулирующие микроРНК, которые обнаруживают в крови и других биологических жидкостях, рассматриваются сегодня как потенциальные биомаркеры патологий человека. К настоящему времени выявлены количественные изменения определённых циркулирующих микроРНК для большого числа онкологических и других заболеваний. Недавно появившийся метод цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) обладает рядом преимуществ, которые делают его наиболее подходящим для верификации и валидации перспективных микроРНК-маркеров патологий человека. К этим преимуществам относятся: высокая точность и воспроизводимость результатов определения количества микроРНК, а также возможность прямого определения абсолютного количества копий микроРНК в широком динамическом диапазоне с высокой производительностью. В работе рассмотрены биогенез микроРНК, происхождение и методы количественной детекции циркулирующих микроРНК. Также рассмотрены технические особенности цкПЦР, которые делают её привлекательным методом для использования как в исследованиях микроРНК-маркеров различных патологий человека, так и в исследованиях, посвящённых фундаментальным вопросам регуляции генной экспрессии молекулами микроРНК.

Ключевые слова: микроРНК, биомаркеры, профилирование, цифровая капельная ПЦР

DOI 10.18097/PBMC20166204403

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК представляют особый класс регуляторных молекул, влияющих на экспрессию генов. Как правило, микроРНК действуют как репрессоры трансляции, связываясь с комплементарным участком мРНК. Являясь важным эндогенным модулятором, микроРНК вовлечены в регуляцию генов, участвующих в эмбриогенезе, пролиферации клеток, дифференцировке тканей, гемопоэзе, апоптозе, липидном обмене, обмене глюкозы, онкогенезе [1-4]. Полагают, что микроРНК регулируют экспрессию не менее 30% генов, кодирующих белки [5].

В настоящее время известно около двух тысяч микроРНК человека. Особый интерес вызывает количественное определение (профилирование) различных микроРНК, присутствующих в крови (циркулирующие микроРНК), что связано с активными поисками биомаркеров для ранней диагностики и прогностики заболеваний человека, в первую очередь, онкологических [6]. МикроРНК обладают такими характеристиками “идеального биомаркера”, как: 1) высокая стабильность в биологических жидкостях, включая плазму и сыворотку крови, 2) устойчивость к внешним воздействиям, что позволяет эффективно выделять циркулирующие микроРНК из биологических жидкостей, 3) близость профилей микроРНК в норме у мужчин и женщин, а также у лиц разного возраста. К настоящему времени выявлены количественные изменения определённых циркулирующих микроРНК для большого числа различных неоплазий и ряда других заболеваний [7-16].

Недавно появившийся метод цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) [17, 18] делает возможным прямое определение абсолютного количества различных микроРНК в анализируемом образце. В сравнении с другими технологическими подходами к профилированию микроРНК, такими как гибридизация микроРНК на ДНК-микрочипах и “секвенирование следующего поколения” (next-generation sequencing, NGS), цкПЦР обладает большим динамическим диапазоном (10^6 против 10^4 и 10^5 соответственно) и существенно более высокой чувствительностью [19].

В работе рассмотрены биогенез микроРНК, происхождение и методы количественной детекции циркулирующих микроРНК. Также рассмотрены технические особенности цкПЦР, которые делают её привлекательным методом для использования в исследованиях, посвящённых как фундаментальным вопросам регуляции генной экспрессии молекулами микроРНК, так и в исследованиях, направленных на поиск биомаркеров различных патологий человека.

1. БИОГЕНЕЗ микроРНК И ПОСТ-ТРАНСЛЯЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

МикроРНК – это короткие (19-23 нуклеотида) одонитевые некодирующие эндогенные молекулы РНК. Впервые микроРНК была обнаружена в 1993 году у нематоды *Caenorhabditis elegans* [20]. В последующем молекулы микроРНК были выявлены в самых разных организмах – от одноклеточных водорослей до человека, что свидетельствует о древности и

* - адресат для переписки

важности функций микроРНК для клеточной регуляторной системы [21, 22]. Гены микроРНК эволюционно консервативны и локализованы в различных частях генома. Последовательности, кодирующие микроРНК, могут находиться как в интронах, так и в экзонах генов, кодирующих белки, а также в межгенных участках [23, 24]. У человека локусы микроРНК часто находятся в непосредственной близости друг от друга, составляя транскрипционную полицистронную единицу [25]. Показано, что число генов микроРНК в геноме коррелирует со степенью сложности программы развития организма. Так, млекопитающие имеют наибольшее количество генов микроРНК [6]. В настоящее время известна 1881 последовательность микроРНК человека (<http://www.mirbase.org>, Release 21).

Биогенез микроРНК начинается в клеточном ядре и проходит в несколько этапов [25] (рис. 1). Первичная микроРНК, длина которой обычно составляет несколько сотен нуклеотидов, образуется в результате транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II. Подобно транскриптам, кодирующим белки, первичные микроРНК “кэпированы” на 5'-конце и полиаденилированы на 3'-конце. На следующем этапе, фермент рибонуклеаза III Droscha расщепляет первичную микроРНК с образованием пре-микроРНК (длиной 70 нуклеотидов), структура которой представляет “шпильку”. Пре-микроРНК с помощью белка экспортин-5 переносится в цитоплазму, где связывается с рибонуклеазой III Dicer, которая

вырезает петлю шпильки, формируя зрелую двухцепочечную микроРНК длиной 19-23 нуклеотида. Каждая из цепей дуплекса может выступать как функциональная микроРНК, однако лишь одна из них – “направляющая” – затем входит в рибонуклеиновый комплекс, известный как “РНК-индуцируемый комплекс выключения” гена (RNA-induced silencing complex, RISC), а вторая – “пассажирская” – подвергнется деградации [25].

Находясь в составе RISC, зрелая одноцепочечная микроРНК устойчива к действию экзонуклеаз, поскольку её концы связаны с доменами главного каталитического белка комплекса – Argonaute (Ago). При этом сама микроРНК в составе RISC доступна для комплементарного взаимодействия с мРНК [26]. Наиболее распространенной мишенью для связывания микроРНК является 3'-нетранслируемая область мРНК, с которой комплементарно взаимодействует только небольшой участок на 5'-конце микроРНК со 2 по 8 нуклеотид [25]. Однако сайты связывания микроРНК могут также присутствовать как в последовательностях, кодирующих белки [27], так и в 5'-нетранслируемых областях мРНК [28]. МикроРНК животных и человека только частично комплементарна своей мишени, вследствие чего одна микроРНК может иметь сразу много мишеней, и наоборот – одна мРНК может взаимодействовать со многими микроРНК [29, 30].

Механизм регуляции экспрессии генов, опосредованной микроРНК, включает репрессию трансляции мРНК с последующей её деградацией [26]. Механизм репрессии трансляции остается во многом неясным. Предполагается, что микроРНК может сначала блокировать трансляцию, снижая скорость её инициации, а затем запускает 5'-3'-экзонуклеазную деградацию мРНК [26, 31-33] (рис. 2).

2. ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ микроРНК

Основная часть микроРНК локализована внутри клетки и составляет около 0,01% РНК клетки [34]. Однако значительная доля микроРНК присутствует вне клеток – это так называемые циркулирующие микроРНК. Они обнаружены в различных биологических жидкостях, включая кровь, мочу, слюну и грудное молоко [35]. Известно, что циркулирующие микроРНК устойчивы к действию РНКаз [36], а также различным неблагоприятным условиям *in vitro*, таких как циклы замораживания-оттаивания, экстремальное изменение рН среды, длительное пребывание при комнатной температуре [37, 38]. Это связано с тем, что микроРНК секретируются во внеклеточное пространство внутри везикул, либо в составе белковых комплексов, формируемых такими белками как компонент RISC Ago2 [36, 39], нуклеофосмин [38], липопотеины высокой плотности [40]. Основным транспортером циркулирующей микроРНК в крови человека считается белок Ago2; именно с ним связано 90% микроРНК в плазме крови [36, 39]. Комплекс микроРНК с Ago2 очень стабилен: в экспериментах *in vitro* он сохраняется в культуральной среде в течение 2 месяцев после гибели клеток [39].

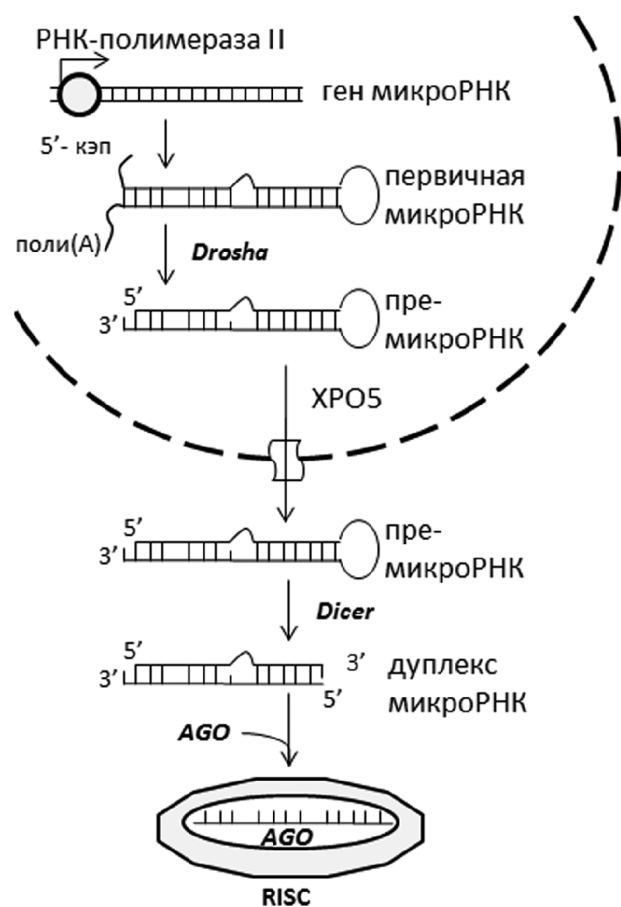


Рисунок 1. Схема биогенеза микроРНК.

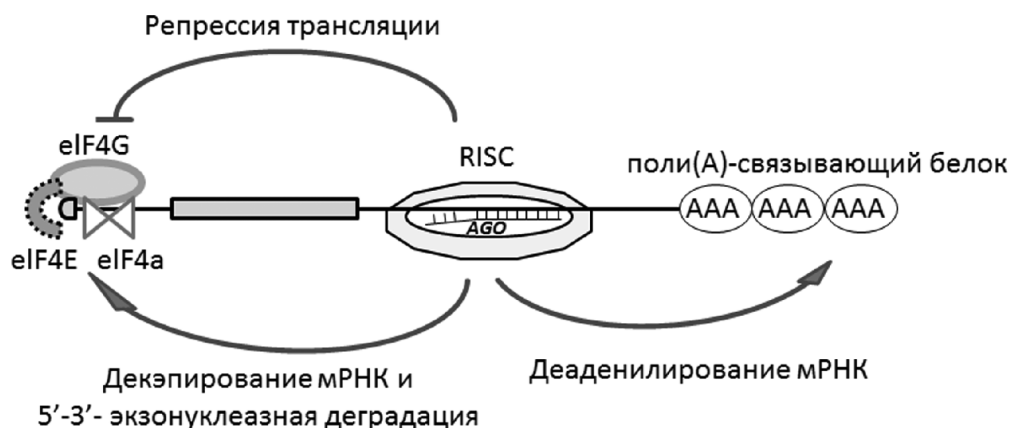


Рисунок 2. Негативная регуляция экспрессии генов. МикроРНК животных и человека в составе RISC связывается с частично комплементарной последовательностью мРНК, после чего запускается репрессия трансляции посредством ингибирования активности и/или взаимодействия факторов инициации трансляции eIF4G, eIF4E, eIF4A. Кроме того, инициируется деаденилирование и декэпирование мРНК. Потеря “кэп”-структуры позволяет основной цитоплазматической 5'-3'-экзонуклеазе XRN1 деградировать мРНК (адаптировано из [33]).

Кроме комплексов микроРНК-белок, циркулирующие микроРНК обнаружены в биологических жидкостях в составе внеклеточных везикул – эктосом (микровезикулы диаметром 100-1000 нм) и экзосом (диаметр 30-100 нм) [41]. В качестве ещё одного везикулярного транспортера микроРНК могут также выступать апоптотические тельца [42].

В настоящее время не ясно, являются ли циркулирующие микроРНК продуктом метаболизма и гибели клеток, или их появление связано с активным транспортом микроРНК как части процесса межклеточного взаимодействия. Возможно, что комплексы микроРНК-белок появляются в плазме в результате клеточной гибели. С другой стороны, в экспериментах *in vitro* показано, что трансфицированные эндотелиальные клетки, экспрессирующие фактор транскрипции KLF2, индуцируют наработку таких микроРНК как miR-143 и miR-145 и выделяют внеклеточные везикулы с повышенным содержанием данных микроРНК [43]. Везикулы способны транспортировать функционально активные miR-143 и miR-145 в гладкомышечные клетки и снижать экспрессию генов-мишеней, а внутривенное введение везикул в кровотока трансгенных ApoE(-/-) мышей, находящихся на высокожировой диете, уменьшает формирование атеросклеротических поражений аорты [43]. Также показано, что моноциты активно секретируют микроРНК miR-150, упакованную в везикулы. Будучи интернализована в составе везикул эндотелиальными клетками, miR-150 усиливает их миграцию в условиях *in vitro* [44].

3. МЕТОДЫ ПРОФИЛИРОВАНИЯ микроРНК

В настоящее время ведётся интенсивная работа по установлению экспрессионных профилей микроРНК в норме и при различных патологиях [6, 45-47]. Хотя сегодня не существует метода, который был бы принят в качестве “золотого стандарта” для определения количества микроРНК,

прямая гибридизация микроРНК на ДНК-микрочипах и ПЦР в реальном времени являются двумя наиболее распространёнными подходами к оценке количества микроРНК.

Достоинством ДНК-микрочипов является возможность одновременного определения относительного количества сотен микроРНК и отсутствие необходимости проведения реакции обратной транскрипции, так как флуоресцентно-меченная микроРНК может быть непосредственно гибридизована на ДНК-микрочипе [48]. Однако чувствительность детекции невысока, метод требует значительного количества исходного материала (0,2-2 мкг РНК), а его динамический диапазон составляет всего 3 порядка [48]. Для повышения чувствительности и специфичности детекции предложено использовать LNA-зонды (LNA – Locked Nucleic Acid), что позволяет снизить различия в температурах плавления микроРНК [49].

Метод ПЦР в реальном времени имеет динамический диапазон 7 порядков, высокую чувствительность и специфичность, а также требует небольшое количество начального материала (нанограммы РНК) [50]. Недостатком метода является то, что он включает необходимость шага обратной транскрипции, эффективность которой может быть низка. Для преодоления этого недостатка был разработан подход, в котором для обратной транскрипции используется не линейный праймер, а содержащий шпильку на 5'-конце, который специфично гибридизуется с 3'-концом микроРНК (рис. 3). Связываясь со зрелой микроРНК в 2000 раз более эффективно, чем с пре-микроРНК, такой праймер повышает как эффективность обратной транскрипции, так и её специфичность, что позволило различать пре-микроРНК и зрелые микроРНК [50]. Для повышения чувствительности и специфичности детекции зрелых микроРНК были также разработаны модификации метода ПЦР, использующие LNA-модифицированные праймеры [51], праймеры с липким 5'-концом [52], либо специфический праймер,

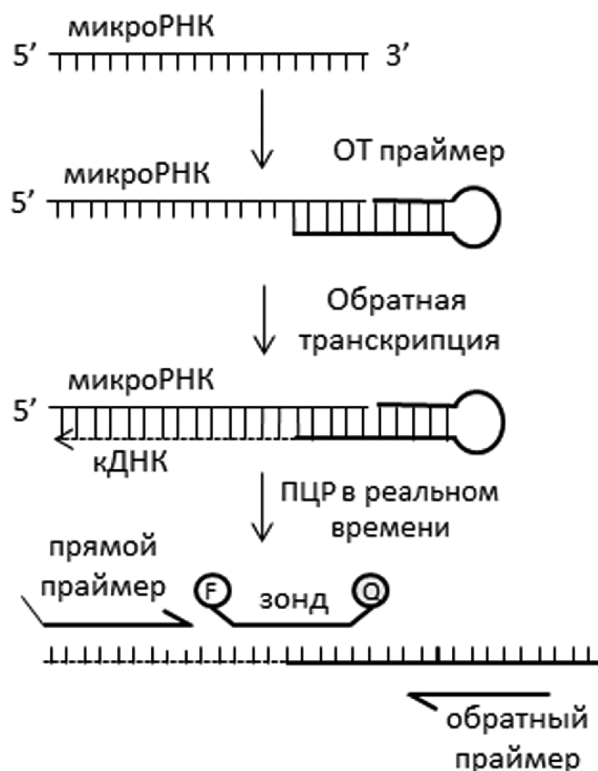


Рисунок 3. Схематическое изображение этапов определения количества микроРНК на основе технологии TaqMan, с использованием ОТ-праймера, содержащего “шпильку”.

содержащий олиго(dT), который гибридизуется с предварительно полиаденилированной микроРНК [53, 54]. До недавнего времени существенным недостатком метода ПЦР была низкая производительность. Однако в последние годы были разработаны автоматизированные высокопроизводительные платформы на основе метода ПЦР в реальном времени, позволяющие проводить одновременно количественную оценку нескольких сотен микроРНК [46, 49, 55, 56].

Появление метода секвенирования следующего поколения (NGS) сделало возможным разработку третьего подхода к профилированию экспрессии микроРНК, который потенциально позволяет одновременно секвенировать миллионы микроРНК [57]. Применительно к профилированию микроРНК, метод NGS включает следующие этапы: выделение РНК, обогащение библиотеки короткими РНК, их лигирование с 5'- и 3'-концов адаптерами, обратная транскрипция, ПЦР-амплификация с минимальным количеством циклов и массовое параллельное секвенирование полученной кДНК-библиотеки [58, 59]. Основное преимущество метода – это возможность детекции как уже известных, так и новых микроРНК. Однако идентификация микроРНК в таком большом массиве данных является сложной задачей, решение которой требует разработки специальных алгоритмов и наличия биоинформационных ресурсов [60, 61]. Наряду со сложностью анализа данных, к недостаткам метода NGS можно отнести высокую стоимость

секвенирования, большое количество исходного материала (до 10 мкг РНК), невозможность определения абсолютного количества микроРНК [48, 55]. Также возможно появление систематических ошибок на этапе получения кДНК-библиотеки, результатом которых может быть завышение (или занижение) представленности микроРНК [59, 62, 63].

Количественные оценки микроРНК могут значительно варьировать в зависимости от используемой технологии, что связано в определённой степени с различиями в нормировке данных [49, 56]. Нормализация является важной частью обработки данных. В качестве наиболее эффективного подхода к нормировке рассматривается использование синтетической микроРНК, которую добавляют в образец в известном количестве [64, 65]. Такой подход хорошо себя зарекомендовал как при использовании ДНК-микрочипов, так и для метода ПЦР в реальном времени, где он позволяет учесть различия в эффективности обратной транскрипции [64, 65]. В случае NGS возможность применения синтетической РНК для нормировки данных находится ещё в стадии изучения [55, 66].

4. МикроРНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ПАТОЛОГИЙ ЧЕЛОВЕКА

Интерес к циркулирующим микроРНК как потенциальным биомаркерам для целей ранней диагностики заболеваний человека постоянно растёт. Поиск в текстовой базе данных публикаций биомедицинской направленности “PubMed” (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) по ключевым словам *circulating microRNA biomarkers* показал, что количество публикаций в год по данной тематике возросло почти 5-кратно за последние пять лет – с 68 в 2010 г. до 313 в 2014 г. Наибольший интерес вызывает поиск биомаркеров для раннего выявления злокачественных новообразований и сердечно-сосудистых заболеваний.

В 2008 году появились первые работы, указывающие, что циркулирующие микроРНК могут служить в качестве биомаркеров онкологических заболеваний. Так, было установлено, что в сыворотке крови пациентов с эпителиальными опухолями молочных желез, лёгких, толстой кишки и простаты уровень микроРНК miR-141 повышен настолько, что позволяет отличить их с высокой чувствительностью и специфичностью от контрольной группы, состоящей из здоровых людей [37]. Повышенное содержание микроРНК miR-21, miR-155 и miR-210 было обнаружено в сыворотке крови больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой по сравнению с контролем [67]. Повышен уровень экспрессии miR-25 и miR-223 у больных немелкоклеточным раком лёгкого [68]. У пациентов с глиобластомой уровень miR-21 в микровезикулах сыворотки крови 40-кратно превышал её уровень в контрольной группе [69]. Используя две независимые выборки больных раком молочной железы, Cuk и соавт. [7, 70]

выявили семь микроРНК, уровень которых повышен в плазме пациентов по сравнению с контролем. При этом панель из пяти микроРНК – miR-127-3p, miR-148b, miR-409-3p, miR-652 и miR-801, позволяет дифференцировать пациентов с I и II стадиями рака молочной железы по отношению к здоровому контролю [7].

Tijssen и соавт. [71] обнаружили циркулирующую микроРНК miR-423-5p, повышенный уровень которой позволял дифференцировать пациентов с сердечной недостаточностью не только от здоровых людей, но и от пациентов с диспноэ, у которых отсутствует сердечная недостаточность. Позднее повышенный уровень miR-423-5p у пациентов с сердечной недостаточностью был подтверждён ещё в двух независимых исследованиях [72, 73]. У больных с острым инфарктом миокарда было выявлено значительное повышение уровня микроРНК miR-1 в плазме крови через 6 ч после инфаркта, которое уже на 3 и 7 день не обнаруживается [74, 75].

Наряду с онкологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями, ведутся интенсивные исследования потенциала микроРНК в качестве биомаркеров таких патологий, как атеросклероз [11], нейродегенеративные заболевания [12, 76-78], аутоиммунные заболевания [14], сахарный диабет 2-го типа [13], фиброз кожи [15], остеоартрит [15].

В последние годы особое внимание уделено вопросам, связанным с повышением достоверности и воспроизводимости оценки количества циркулирующих микроРНК [79]. К их числу относятся выбор способа нормировки данных [79] и влияние процедур пробоподготовки [36, 41, 80]. В результате был выработан ряд рекомендаций, которые включают: (1) отказ от использования гемолизированных образцов крови; (2) проведение пробоподготовки в пределах 6 часов после забора крови; (3) использование плазмы крови вместо сыворотки; (4) высокоскоростное центрифугирование (14000-16000 g) плазмы крови перед выделением РНК; (5) использование агентов, усиливающих преципитацию РНК; (6) использование синтетической РНК для контроля эффективности процедуры преципитации микроРНК в процессе её выделения. Следование этим рекомендациям существенно повышает воспроизводимость количественной оценки уровня микроРНК [7, 70] и должно быть учтено в дальнейшем при проведении исследований, связанных с верификацией и валидацией перспективных микроРНК-маркеров.

5. ЦИФРОВАЯ КАПЕЛЬНАЯ ПЦР

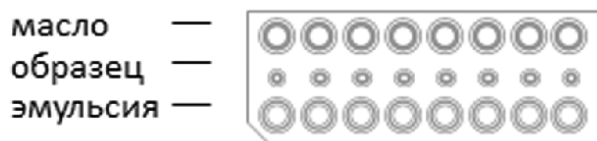
Цифровая капельная ПЦР является дальнейшим развитием метода, известного как “цифровая ПЦР”, который основан на проведении многочисленных полимеразных цепных реакций в разных образцах, полученных разбавлением исходной пробы до средней концентрации 1 молекула/образец [17]. После амплификации исходное количество молекул ДНК в пробе вычисляют с высокой точностью по соотношению положительных и отрицательных

реакций. Оценка количества ДНК базируется на предположении, что это соотношение следует закону Пуассона. Одно из преимуществ цифровой ПЦР по сравнению с ПЦР в реальном времени состоит в том, что результат анализа не зависит от эффективности реакции амплификации. В методе цифровой ПЦР оценка количества ДНК осуществляется по конечной точке реакции амплификации, что делает её устойчивой к ингибиторам полимеризации и исключает необходимость использования стандартов (образцов ДНК с известной концентрацией) и калибровочных кривых при определении абсолютного количества молекул ДНК в пробе. Однако существенным недостатком цифровой ПЦР является необходимость проведения сотен и тысяч реакций для анализа каждого образца, что делает метод очень трудоёмким. Этот недостаток был преодолен совмещением двух технологий – цифровой ПЦР и эмульсионной ПЦР [17].

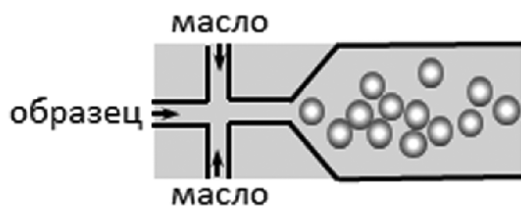
В 2011 г. компания BioRad (www.bio-rad.com) приобрела права на производство и коммерческое распространение разработанной компанией QuantaLife аналитической платформы, базирующейся на методе цифровой капельной ПЦР (цкПЦР). Метод цкПЦР основан на проведении параллельной амплификации ДНК в тысячах микрокапель, каждая из которых может рассматриваться как независимый микрореактор. Случайное распределение молекул ДНК по микрокаплям приводит к тому, что они либо отсутствуют в микрокапле, либо присутствуют в средней концентрации 1 молекула на микрокаплю. По аналогии с цифровой ПЦР, исходное количество молекул ДНК в пробе вычисляют по соотношению микрокапель с положительным и отрицательным результатом реакции, что делает возможным прямое определение абсолютного количества молекул ДНК в образце [17]. Детекция результата реакции амплификации основана на технологии TaqMan (www.lifetechnologies.com), в которой используются олигонуклеотидные зонды, несущие на 5'-конце флуорофор, а на 3'-конце – органическую молекулу, способную гасить флуоресценцию молекулы флуорофора (quencher). В случае РНК, как и для ПЦР в реальном времени, метод цкПЦР требует проведения реакции обратной транскрипции для получения кДНК.

Анализ образцов ДНК (или кДНК) методом цкПЦР включает несколько этапов (рис. 4). ПЦР-пробу, содержащую ДНК (кДНК), TaqMan-зонд, праймеры и буфер для ПЦР, вносят в ячейки одноразового 8-канального картриджа для генерации микрокапель. В соответствующие ячейки картриджа заливается специальное минеральное масло. Заполненный картридж устанавливают в генератор микродисперсных капель, где образцы и масло соединяются при одновременном пропускании их через микроканалы, в результате чего формируется эмульсия. В каждом образце эмульсии ПЦР-проба представлена в виде примерно 20000 монодисперсных капель объёмом ~1 нл [17, 18]. Эмульсионные образцы переносят в 96-луночный планшет и проводят ПЦР-амплификацию. При наличии молекулы ДНК

1. Загрузка ПЦР-пробы и масла в картридж для генерации микрокапель



2. Получение микрокапель



3. Перенос микрокапель в 96-луночный ПЦР-планшет

4. ПЦР-амплификация

5. Подсчет микрокапель

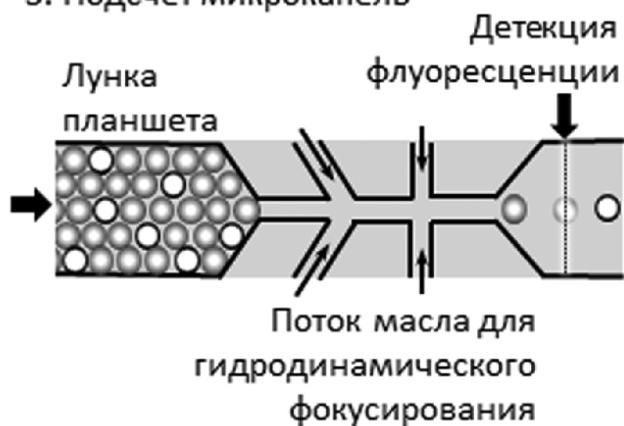


Рисунок 4. Схема цкПЦР.

(кДНК) в микрокапле происходит её амплификация, сопровождаемая энзиматической деградацией TaqMan-зондов, приводящей к многократному увеличению интенсивности флуоресценции капли. По завершении амплификации, планшет с образцами загружается в автоматизированное устройство для подсчёта капель (ридер), которое последовательно пропускает эмульсию из каждой лунки планшета через тонкий капилляр. При прохождении через капилляр микрокапли разделяются и со скоростью ~1500 капель/с последовательно проходят между источником возбуждающего света и детектором, регистрирующим уровень флуоресценции каждой микрокапли. Основываясь на общем количестве зарегистрированных микрокапель и количестве микрокапель, в которых уровень флуоресценции превышает фоновый (пороговый), ридер рассчитывает абсолютное количество молекул ДНК (кДНК) в одном микролитре образца. (Адаптировано из [17, 18]).

Применительно к профилированию микроРНК, метод цкПЦР позволяет существенно упростить анализ и повысить точность определения количества микроРНК. Возможность определить абсолютное количество копий микроРНК в образце упрощает последующую нормировку данных, при этом не требуется проведения трудоемких процедур приготовления стандартов и получения калибровочных кривых [18]. В работе Hindson и соавт. [19] было проведено сравнение ПЦР в реальном времени и цкПЦР, показавшее, что в трёх независимых измерениях, проведенных в разные дни, цкПЦР обладала большей точностью (коэффициент вариации ниже на 48-72%). Далее было проведено сравнение этих методов по способности обнаружения микроРНК miR-141 в сыворотке больных с метастазирующим раком простаты [37]. При использовании цкПЦР, коэффициент вариации уровня miR-141 был в 7 раз ниже, чем в случае ПЦР в реальном времени, что значительно повысило дискриминирующую способность метода и позволило дифференцировать больных раком простаты и здоровых индивидуумов со значительно большей достоверностью ($p=0,0036$ vs. $p=0,1199$) [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

МикроРНК рассматриваются сегодня как потенциальные биомаркеры патологий человека. Успех их превращения в клинические биомаркеры будет во многом зависеть от наличия метода, позволяющего эффективно проводить верификацию и валидацию перспективных биомаркеров на основе микроРНК. Более высокая точность и воспроизводимость результатов определения количества микроРНК по сравнению с другими методами анализа микроРНК, а также возможность прямого определения абсолютного количества копий микроРНК в широком динамическом диапазоне с высокой производительностью, делают цифровую капельную ПЦР методом, наиболее подходящим для проведения работ по верификации и валидации перспективных микроРНК-маркеров патологий человека. Эти преимущества делают цкПЦР также привлекательным методом для использования как в исследованиях, посвященных фундаментальным вопросам регуляции генной экспрессии молекулами микроРНК, так и, в перспективе, в клинико-диагностических лабораториях для рутинной оценки уровня микроРНК у пациентов.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bartel D.P. (2004) Cell, **116**, 281-297.
2. Stefani G., Slack F.J. (2008) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., **9**, 219-230.
3. Fernandez-Hernando C., Suarez Y., Rayner K.J., Moore K.J. (2010) Curr. Opin. Lipidol., **22**, 86-92.

4. Zhu H., Shyh-Chang N., Segre A.V., Shinoda G., Shah S.P., Einhorn W.S., Takeuchi A., Engreitz J.M., Hagan J.P., Kharras M.G. et al. (2011) *Cell*, **147**, 81-94.
5. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. (2005) *Cell*, **120**, 15-20.
6. Allegra A., Alonci A., Campo S., Penna G., Petrunaro A., Gerace D., Musolino C. (2012) *Int. J. Oncol.*, **41**, 1897-1912.
7. Cuk K., Zucknick M., Madhavan D., Schott S., Golatta M., Heil J., Marme F., Turchinovich A., Sinn P., Sohn C., Junkermann H., Schneeweiss A., Burwinkel B. (2013) *PLoS One*, **8**, e76729.
8. Fayyad-Kazan H., Bitar N., Najar M., Lewalle P., Fayyad-Kazan M., Badran R., Hamade E., Daher A., Hussein N., ElDirani R. et al. (2013) *J. Transl. Med.*, **11**, 31.
9. Huang Y., Hu Q., Deng Z., Hang Y., Wang J., Wang K. (2014) *Technol. Cancer Res. Treat.*, **13**, 277-287.
10. Kondkar A.A., Abu-Amro K.K. (2015) *Biomed. Res. Int.*, **2015**, 821-823.
11. Menghini R., Casagrande V., Federici M. (2013) *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, **6**, 924-930.
12. Cheng L., Quek C.Y., Sun X., Bellingham S.A., Hill A.F. (2013) *Front. Genet.*, **4**, 150.
13. Zampetaki A., Kiechl S., Drozdov I., Willeit P., Mayr U., Prokopi M., Mayr A., Weger S., Oberhollenzer F., Bonora E., Shah A., Willeit J., Mayr M. (2010) *Circ. Res.*, **107**, 810-817.
14. Zeng L., Cui J., Wu H., Lu Q. (2014) *Autoimmunity*, **47**, 419-429.
15. Babalola O., Mamalis A., Lev-Tov H., Jagdeo J. (2013) *Arch. Dermatol. Res.*, **305**, 763-776.
16. Beyer C., Zampetaki A., Lin N.Y., Kleyer A., Perricone C., Iagnocco A., Distler A., Langley S. R., Gelse K., Sesselmann S. et al. (2015) *Ann. Rheum. Dis.*, **74**, e18.
17. Hindson B.J., Ness K.D., Masquelier D.A., Belgrader P., Heredia N.J., Makarewicz A.J., Bright I.J., Lucero M.Y., Hiddessen A.L., Legler T.C. et al. (2011) *Anal. Chem.*, **83**, 8604-8610.
18. Pinheiro L.B., Coleman V.A., Hindson C.M., Herrmann J., Hindson B.J., Bhat S., Emslie K.R. (2012) *Anal. Chem.*, **84**, 1003-1011.
19. Hindson C.M., Chevillet J.R., Briggs H.A., Gallichotte E.N., Ruf I.K., Hindson B.J., Vessella R.L., Tewari M. (2013) *Nat. Methods*, **10**, 1003-1005.
20. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. (1993) *Cell*, **75**, 843-854.
21. Zhao T., Li G., Mi S., Li S., Hannon G.J., Wang X.J., Qi Y. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 1190-1203.
22. Ibanez-Ventoso C., Vora M., Driscoll M. (2008) *PLoS One*, **3**, e2818.
23. Ozsolak F., Poling L.L., Wang Z., Liu H., Liu X.S., Roeder R.G., Zhang X., Song J.S., Fisher D.E. (2008) *Genes Dev.*, **22**, 3172-3183.
24. Monteys A.M., Spengler R.M., Wan J., Tecedor L., Lennox K.A., Xing Y., Davidson B.L. (2010) *RNA*, **16**, 495-505.
25. Ha M., Kim V.N. (2014) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **15**, 509-524.
26. Dalmay T. (2013) *Essays Biochem.*, **54**, 29-38.
27. Duursma A.M., Kedde M., Schrier M., le Sage C., Agami R. (2008) *RNA*, **14**, 872-877.
28. Stoynowska-Czerwinska A., Fiszer A., Krzyzosiak W.J. (2014) *Cell. Mol. Life Sci.*, **71**, 2253-2270.
29. Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engele P., Grimson A., Schelter J.M., Castle J., Bartel D.P., Linsley P.S., Johnson J.M. (2005) *Nature*, **433**, 769-773.
30. Selbach M., Schwanhaussner B., Thierfelder N., Fang Z., Khanin R., Rajewsky N. (2008) *Nature*, **455**, 58-63.
31. Bazzini A.A., Lee M.T., Giraldez A.J. (2012) *Science*, **336**, 233-237.
32. Djuranovic S., Nahvi A., Green R. (2012) *Science*, **336**, 237-240.
33. Jonas S., Izaurralde E. (2015) *Nat. Rev. Genet.*, **16**, 421-433.
34. Peltier H.J., Latham G.J. (2008) *RNA*, **14**, 844-852.
35. Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S., Huang D.Y., Huang K.H., Lee M.J., Galas D.J., Wang K. (2010) *Clin. Chem.*, **56**, 1733-1741.
36. Arroyo J.D., Chevillet J.R., Kroh E.M., Ruf I.K., Pritchard C.C., Gibson D.F., Mitchell P.S., Bennett C.F., Pogosova-Agadjanyan E.L., Stirewalt D.L., Tait J.F., Tewari M. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 5003-5008.
37. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Fritz B.R., Wyman S.K., Pogosova-Agadjanyan E.L., Peterson A., Noteboom J., O'Brian K.C., Allen A. et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10513-10518.
38. Wang K., Zhang S., Weber J., Baxter D., Galas D.J. (2010) *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7248-7259.
39. Turchinovich A., Weiz L., Langheinz A., Burwinkel B. (2011) *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7223-7233.
40. Vickers K.C., Palmisano B.T., Shoucri B.M., Shamburek R.D., Remaley A.T. (2011) *Nat. Cell Biol.*, **13**, 423-433.
41. Turchinovich A., Weiz L., Burwinkel B. (2012) *Trends Biochem. Sci.*, **37**, 460-465.
42. Zerneck A., Bidzhekov K., Noels H., Shagdarsuren E., Gan L., Denecke B., Hristov M., Koppel T., Jahantigh M.N., Lutgens E., Wang S., Olson E.N., Schober A., Weber C. (2009) *Sci. Signal.*, **2**, ra81.
43. Hergenreider E., Heydt S., Treguer K., Boettger T., Horrevoets A.J., Zeiher A.M., Scheffer M.P., Frangakis A.S., Yin X., Mayr M., Braun T., Urbich C., Boon R.A., Dimmeler S. (2012) *Nat. Cell Biol.*, **14**, 249-256.
44. Zhang Y., Liu D., Chen X., Li J., Li L., Bian Z., Sun F., Lu J., Yin Y., Cai X. et al. (2010) *Mol. Cell*, **39**, 133-144.
45. Hunter M.P., Ismail N., Zhang X., Aguda B.D., Lee E.J., Yu L., Xiao T., Schafer J., Lee M.L., Schmittgen T.D., Nana-Sinkam S.P., Jarjoura D., Marsh C.B. (2008) *PLoS One*, **3**, e3694.
46. Catuogno S., Esposito C.L., Quintavalle C., Cerchia L., Condorelli G., De Franciscis V. (2011) *Cancers (Basel)*, **3**, 1877-1898.
47. Saikumar J., Ramachandran K., Vaidya V.S. (2014) *Clin. Chem.*, **60**, 1158-1173.
48. Koshiol J., Wang E., Zhao Y., Marincola F., Landi M.T. (2010) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **19**, 907-911.
49. Wang B., Howel P., Bruheim S., Ju J., Owen L.B., Fodstad O., Xi Y. (2011) *PLoS One*, **6**, e17167.
50. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, e179.
51. Raymond C.K., Roberts B.S., Garrett-Engele P., Lim L.P., Johnson J.M. (2005) *RNA*, **11**, 1737-1744.
52. Sharbati-Tehrani S., Kutz-Lohroff B., Bergbauer R., Scholven J., Einspanier R. (2008) *BMC Mol. Biol.*, **9**, 34.
53. Fu H.J., Zhu J., Yang M., Zhang Z.Y., Tie Y., Jiang H., Sun Z.X., Zheng X.F. (2006) *Mol. Biotechnol.*, **32**, 197-204.
54. Ro S., Park C., Jin J., Sanders K.M., Yan W. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 756-763.
55. Pritchard C.C., Cheng H.H., Tewari M. (2012) *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 358-369.
56. Mestdagh P., Hartmann N., Baeriswyl L., Andreassen D., Bernard N., Chen C., Cheo D., D'Andrade P., DeMayo M., Dennis L. et al. (2014) *Nat. Methods*, **11**, 809-815.
57. Metzker M.L. (2010) *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 31-46.
58. Lu C., Meyers B.C., Green P.J. (2007) *Methods*, **43**, 110-117.

59. Hafner M., Landgraf P., Ludwig J., Rice A., Ojo T., Lin C., Holoch D., Lim C., Tuschl T. (2008) *Methods*, **44**, 3-12.
60. Friedlander M.R., Chen W., Adamidi C., Maaskola J., Einspanier R., Knespel S., Rajewsky N. (2008) *Nat. Biotechnol.*, **26**, 407-415.
61. Garber M., Grabherr M.G., Guttman M., Trapnell C. (2011) *Nat. Methods*, **8**, 469-477.
62. Linsen S.E., de Wit E., Janssens G., Heater S., Chapman L., Parkin R.K., Fritz B., Wyman S.K., de Bruijn E., Voest E.E., Kuersten S., Tewari M., Cuppen E. (2009) *Nat. Methods*, **6**, 474-476.
63. Tian G., Yin X., Luo H., Xu X., Bolund L., Zhang X., Gan S.Q., Li N. (2010) *BMC Biotechnol.*, **10**, 64.
64. Sarkar D., Parkin R., Wyman S., Bendoraite A., Sather C., Delrow J., Godwin A.K., Drescher C., Huber W., Gentleman R., Tewari M. (2009) *Nucleic Acids Res.*, **37**, e17.
65. Kroh E.M., Parkin R.K., Mitchell P.S., Tewari M. (2010) *Methods*, **50**, 298-301.
66. Qing T., Yu Y., Du T., Shi L. (2013) *Sci. China Life Sci.*, **56**, 134-142.
67. Lawrie C.H., Gal S., Dunlop H.M., Pushkaran B., Liggins A.P., Pulford K., Banham A.H., Pezzella F., Boulwood J., Wainscoat J.S., Hatton C.S., Harris A. L. (2008) *Br. J. Haematol.*, **141**, 672-675.
68. Chen X., Ba Y., Ma L., Cai X., Yin Y., Wang K., Guo J., Zhang Y., Chen J., Guo X. et al. (2008) *Cell Res.*, **18**, 997-1006.
69. Skog J., Wurdinger T., van Rijn S., Meijer D.H., Gainche L., Sena-Estevés M., Curry W.T. Jr., Carter B.S., Krichevsky A.M., Breakefield X.O. (2008) *Nat. Cell. Biol.*, **10**, 1470-1476.
70. Cuk K., Zucknick M., Heil J., Madhavan D., Schott S., Turchinovich A., Arlt D., Rath M., Sohn C., Benner A., Junkermann H., Schneeweiss A., Burwinkel B. (2013) *Int. J. Cancer*, **132**, 1602-1612.
71. Tijssen A.J., Creemers E.E., Moerland P.D., de Windt L.J., van der Wal A.C., Kok W.E., Pinto Y.M. (2010) *Circ. Res.*, **106**, 1035-1039.
72. Goren Y., Kushnir M., Zafrir B., Tabak S., Lewis B.S., Amir O. (2012) *Eur. J. Heart Fail.*, **14**, 147-154.
73. Dickinson B.A., Semus H.M., Montgomery R.L., Stack C., Latimer P.A., Lewton S.M., Lynch J.M., Hullinger T.G., Seto A.G., van Rooij E. (2013) *Eur. J. Heart Fail.*, **15**, 650-659.
74. Cheng Y., Tan N., Yang J., Liu X., Cao X., He P., Dong X., Qin S., Zhang C. (2010) *Clin. Sci. (Lond)*, **119**, 87-95.
75. Ai J., Zhang R., Li Y., Pu J., Lu Y., Jiao J., Li K., Yu B., Li Z., Wang R., Wang L., Li Q., Wang N., Shan H., Yang B. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **391**, 73-77.
76. Dorval V., Nelson P.T., Hebert S.S. (2013) *Front. Mol. Neurosci.*, **6**, 24.
77. Jin X.F., Wu N., Wang L., Li J. (2013) *Cell. Mol. Neurobiol.*, **33**, 601-613.
78. Sheinerman K.S., Umansky S.R. (2013) *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 150.
79. Witwer K.W. (2014) *Clin. Chem.*, **61**, 56-63.
80. Moldovan L., Batte K.E., Trgovcich J., Wisler J., Marsh C.B., Piper M. (2014) *J. Cell. Mol. Med.*, **18**, 371-390.

Поступила: 10. 03. 2015.
Принята к печати: 05. 06. 2015.

DIGITAL DROPLET PCR - A PROSPECTIVE TECHNOLOGICAL APPROACH TO QUANTITATIVE PROFILING OF microRNA

Y.Y. Kiseleva, K.G. Ptitsyn, S.P. Radko, V.G. Zgoda, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel./fax: (495)245-08-57; e-mail: yana.kiseleva@gmail.com

MicroRNA is a special type of regulatory molecules governing gene expression. Circulating microRNAs found in blood and other biological fluids are considered today as potential biomarkers of human pathology. Presently, quantitative alterations of particular microRNAs are revealed for a large number of oncological diseases and other disorders. The recently emerged method of digital droplet PCR (ddPCR) possesses a number of advantages making this method the most suitable for verification and validation of perspective microRNA markers of human pathologies. Among these advantages are the high accuracy and reproducibility of microRNA quantification as well as the capability to directly measure the absolute number of microRNA copies with the large dynamic range and a high throughput. The paper reviews microRNA biogenesis, the origin of circulating microRNAs, and methods used for their quantification. The special technical features of ddPCR, which make it an attractive method both for studying microRNAs as biomarkers of human pathologies and for basic research devoted to aspects of gene regulation by microRNA molecules, are also discussed.

Key words: microRNA, biomarkers, profiling, digital droplet PCR