

## ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ микроРНК

### Обзор

© 2015 Ю.А. Макарова<sup>1,2\*</sup>, М.Ю. Шкурников<sup>2,3</sup>,  
А.А. Турчинович<sup>4</sup>, А.Г. Тоневицкий<sup>3</sup>, А.И. Григорьев<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
119991 Москва; факс: +7(495)135-1405,  
электронная почта: j-makarova@yandex.ru

<sup>2</sup> ООО Научно-технический центр «БиоКлиникум», 115088 Москва;  
факс: +7(495)665-6189, электронная почта: mail@bioclinicum.com

<sup>3</sup> МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ»  
Минздрава РФ, 125284 Москва; факс: +7(495)945-8020,  
электронная почта: info@mnioni.ru

<sup>4</sup> Molecular Epidemiology Group, German Cancer Research Center, Germany;  
факс: +49(0)6221-422995, E-mail: a.turchinovich@dkfz-heidelberg.de

<sup>5</sup> ГНЦ РФ, Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва;  
факс: +7(499)195-2253, электронная почта: grigoriev@imbp.ru

Поступила в редакцию 19.02.15

После доработки 31.03.15

Обнаружение miРНК в плазме крови и других биологических жидкостях привело к представлению о том, что некодирующие РНК животных могут служить внеклеточным переносчиком сигнала. Обсуждается текущее состояние исследований в данной области, в частности, способность miРНК переносить информацию между клетками *in vitro* и *in vivo*; возможность использования внеклеточных miРНК в качестве маркеров для диагностики широкого спектра заболеваний, а также необходимость совершенствования и стандартизации существующих методик выделения внеклеточных miРНК.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** miРНК, экзосомы, РНК-маркеры, некодирующие РНК, онкогенез.

MiРНК составляют одно из самых многочисленных семейств некодирующих РНК. Число описанных miРНК человека превысило 2000 и продолжает расти (<http://mirbase.org>). MiРНК участвуют в регуляции экспрессии генов и вовлечены во множество процессов в организме, например, в пролиферацию и дифференцировку клеток, апоптоз и различные метаболические пути [1, 2]. По существующим оценкам, miРНК регулируют экспрессию более 60% генов белков [3]. Многие патологические процессы, в том числе онкологические заболевания, сопровождаются нарушениями экспрессии miРНК [4].

В 2007 г. было обнаружено, что miРНК, секретированные одним типом клеток, могут переноситься в другие типы клеток [5]. Вскоре

miРНК были найдены в плазме крови [6–8] и, позже, в других биологических жидкостях [9–14]. Такие данные позволили предположить, что внеклеточные miРНК (circulating miRNA, c-miРНК) являются новым типом переносчика сигнала между различными клетками и органами. Это открыло новую страницу в представлениях о межклеточной коммуникации и регуляции процессов в организме животных (ранее подобные наблюдения были сделаны для растений). c-miРНК могут оказаться намного более специфичными регуляторами, чем гормоны или цитокины, и влиять на более широкий спектр процессов. Состав c-miРНК меняется при различных физиологических и патологических состояниях организма и потому в настоящее время интенсивно исследуется возможность применения c-miРНК в качестве высокоспецифичных маркеров, позволяющих производить неинвазивную диагностику [15, 16]. Ниже обсуждается текущее состояние исследований в данной области. Особое внимание уделено необходимости

Принятые сокращения: c-miРНК (circulating microRNA) – внеклеточные микроРНК; HDL (high-density lipoproteins) – липопротеиды высокой плотности; РНП – рибонуклеопротеид.

\* Адресат для корреспонденции.

совершенствования и стандартизации существующих методов исследования с-miРНК.

### ПРОЦЕССИНГ И ФУНКЦИИ miРНК

Гены miРНК могут представлять собой самостоятельные транскрипционные единицы или располагаться в интронах генов белков, а также в интронах и экзонах генов некодирующих РНК и иногда в экзонах генов белков [17, 18]. Гены miРНК транскрибируются РНК-полимеразой II в составе длинных кепированных и полиаденилированных предшественников (primary miРНК, pri-miРНК) [19, 20]. Гены некоторых miРНК, расположенные к 3'-концу от повторов Alu, транскрибируются РНК-полимеразой III [21]. Pri-miРНК имеют в своем составе шпильку длиной ~70 н. (pre-miРНК), содержащую последовательность зрелой miРНК. Pre-miРНК вырезаются из предшественника РНКазой III Drosophila в комплексе с РНК-связывающим белком DGCR8 [22] и с помощью белка Exportin5 транспортируются в цитоплазму [23], где подвергаются дальнейшему процессингу с участием РНКазы III Dicer в комплексе с РНК-связывающим белком TRBP. Образующиеся ~22 н. двухцепочечные молекулы ассоциируют с белком семейства Ago, который является основным компонентом белкового комплекса, названного RISC (RNA-induced silencing complex). Одна из цепей дуплекса деградирует, а зрелая miРНК в составе RISC может комплементарно взаимодействовать с мРНК-мишенью. За редкими исключениями, комплементарность между ними неполная, а потому разрезания мРНК по механизму РНК-интерференции обычно не происходит. Более того, из четырех присутствующих у человека белков семейства Ago нуклеазной активностью, необходимой для разрезания мРНК, обладает только один – Ago2. Поэтому для ингибирования экспрессии необходимо участие дополнительных белков, в частности, белка GW182, который ассоциирует с комплексом RISC [24] и рекрутирует белки, осуществляющие репрессию трансляции или деаденилирование и деградацию мРНК [1, 2]. Обнаружено, что miРНК имеют и другие, «неканонические» функции: они могут вызывать усиление трансляции мРНК [25] и осуществлять транскрипционный сайленсинг генов [26].

В большинстве случаев участки связывания miРНК расположены в 3'-нетранслируемых областях мРНК, хотя иногда могут располагаться в кодирующей последовательности [27] и 5'-нетранслируемых областях [28–29]. Благодаря своей

малой длине и неполной комплементарности с мРНК каждая miРНК может иметь сотни мишеней [30]. С другой стороны, мРНК, как правило, имеет несколько участков связывания для одной и той же или для разных miРНК, что позволяет осуществлять комплексную регуляцию трансляции, которая может быть различной в разных типах клеток [3].

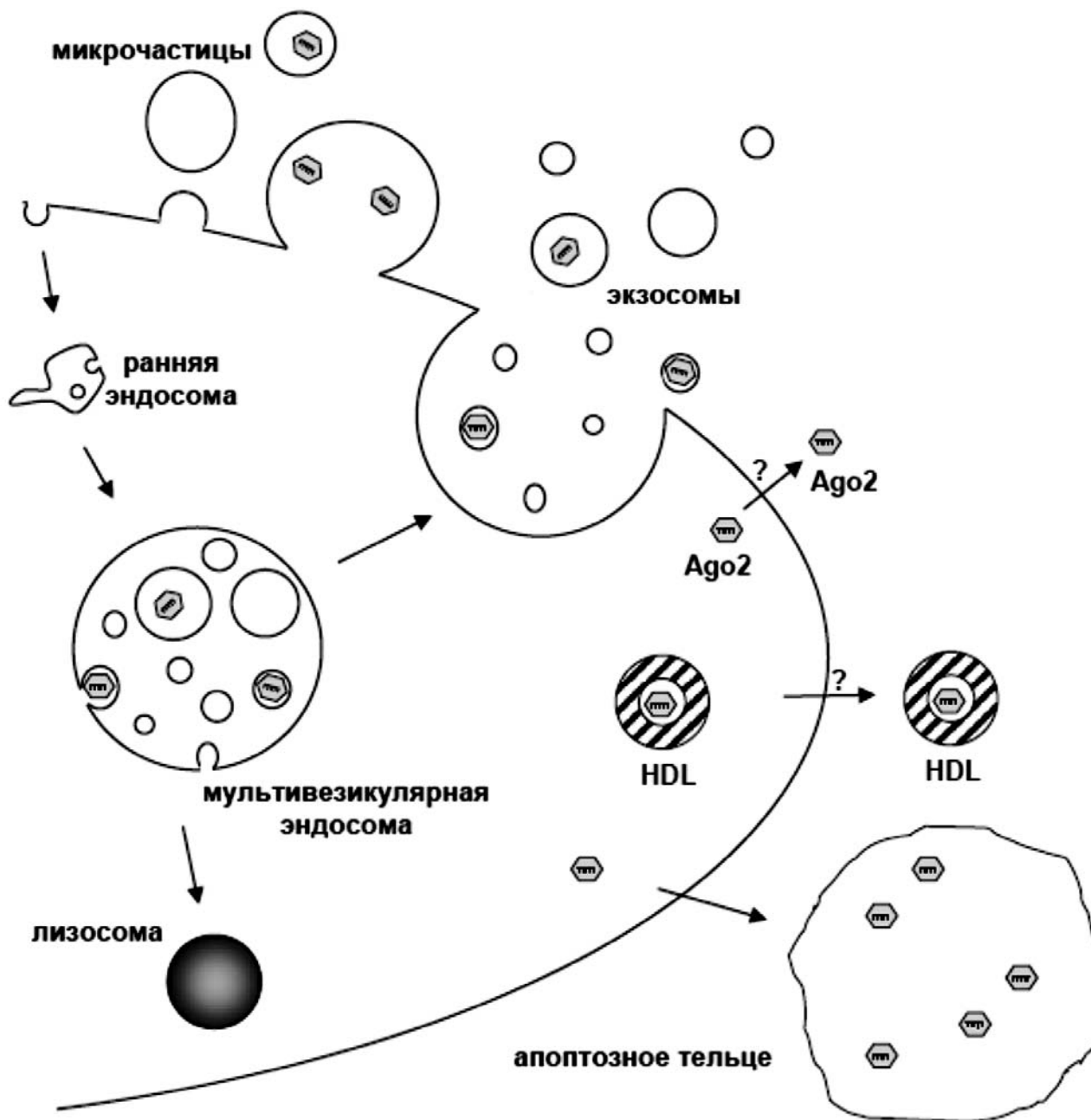
В каждом типе клеток экспрессируется, как правило, 200–600 miРНК, и каждый тип клеток имеет свой собственный профиль экспрессии miРНК. Например, профили экспрессии различаются у разных видов лейкоцитов [31–33]. Большинство miРНК экспрессируется в широком спектре тканей и только некоторые имеют выраженную тканеспецифичную экспрессию [34].

### ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ miРНК МОГУТ БЫТЬ АССОЦИИРОВАНЫ С РАЗНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ

К настоящему времени miРНК обнаружены вне клеток в составе различных биологических жидкостей, в частности, в плазме и сыворотке крови, молоке, слезах, слюне, моче, амниотической, семенной и спинномозговой жидкостях и асцитах [6, 9–14]. Оказалось, что они весьма стабильны: не подвержены действию РНКаз, устойчивы к замораживанию и значительным колебаниям pH; их концентрация не меняется при длительном инкубировании плазмы при комнатной температуре [7, 35, 36]. Такая стабильность объясняется тем, что miРНК ассоциированы с различными носителями. Это могут быть разнообразные везикулы, секретлируемые клетками. Так, почти все типы клеток способны образовывать мембранные пузырьки, отделяемые непосредственно плазматической мембраной, т.н. микровезикулы (microvesicles, microparticles: у данного термина есть много синонимов [37]) (рисунок). Их размер составляет ~100 нм–1 мкм. Помимо этого, клеточные эндосомы способны образовывать инвагинации с последующим образованием внутриэндосомальных везикул. В результате образуются т.н. мультивезикулярные тельца (multivesicular bodies). Впоследствии такая эндосома может сливаться с плазматической мембраной, в результате чего содержащиеся в ней везикулы, называемые экзосомами, высвобождаются во внеклеточное пространство (рисунок) [38, 39]. Экзосомы имеют размер ~40–100 нм (следует отметить, что такой же термин используется в совершенно другой области клеточной биологии для обозначения комплекса экзорибонуклеаз, осуществляющих процес-

синг 3'-концов ряда РНК [40]). Помимо этого, во внеклеточной среде присутствуют т.н. апоптотные тельца – везикулы размером ~1–4 мкм, образовавшиеся в результате программируемой клеточной смерти [41]. Все эти везикулы могут содержать miРНК, ассоциированные с белками Ago [42, 43]. miРНК обнаружены также в комплексе с липопротеидами высокой плотности (high-density lipoprotein, HDL) [44], размер которых составляет ~9–12 нм. Наконец, фракция

miРНК присутствует во внеклеточной среде только в комплексе с белками Ago и, возможно, с белком нуклеофозмином 1 (nucleophosmin 1) [45], причем в состав этой фракции входит, вероятно, ~90% всех внеклеточных miРНК [35, 46] (рисунок). Получены указания на то, что некоторые виды miРНК преимущественно локализованы в везикулах, тогда как другие обнаружены главным образом в составе несвязанных с везикулами комплексах с Ago [46].



Пути секреции miРНК

Выделение разных фракций с-miРНК представляет довольно сложную экспериментальную задачу. Так, размер апоптозных телец соответствует размеру тромбоцитов и сопоставим с размерами клеток крови. Поэтому вопрос о том, относить ли вообще miРНК из апоптозных телец к внеклеточным miРНК, является дискуссионным. По крайней мере, отделить их от тромбоцитов и фрагментов разрушенных в ходе экспериментальных процедур клеток с использованием традиционно применяемого для выделения с-miРНК центрифугирования невозможно. Еще одной пока неразрешенной проблемой остается разделение микрочастиц и экзосом. В полной мере разделить их в настоящее время не представляется возможным, поскольку их размеры могут быть очень близкими, а универсальные белковые маркеры, специфичные для каждого из типов частиц и встречающиеся во всех типах клеток, пока не обнаружены [47]. В работах, посвященных данной теме, экзосомами, как правило, называют фракцию везикул, полученную в результате ультрацентрифугирования (~100 000 g). Таким образом, на сегодняшний день в данной области термин «экзосома» имеет различное смысловое содержание: во-первых, его используют, подразумевая путь образования этих частиц, во-вторых, обозначают способ их выделения и, наконец, термин продолжает использоваться в более широком смысле, обозначая любые секретлируемые клеткой везикулы [37]. Благодаря этому прямое сравнение результатов работ, посвященных экзосомам, становится невозможным. Для решения этой и других проблем в данной области биологии в 2011 г. было создано Международное общество по изучению внеклеточных везикул (International Society for Extracellular Vesicles, <http://www.isev.org>), члены которого работают над совершенствованием и стандартизацией методических подходов и выработкой единой терминологии.

### СПОСОБЫ СЕКРЕЦИИ И ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ с-miРНК

Существование различных носителей с-miРНК подразумевает существование различных путей секреции с-miРНК. Комплексы RISC и белок GW182 ассоциированы с мембранами эндосом и обнаружены в составе экзосом [42, 48]. Секреция происходит, вероятно, при участии керамид-зависимого механизма образования экзосом [49], поскольку экспорт miРНК в составе экзосом уменьшается при ингибировании нейтральной сфингомиелиназы 2 (nSMase2) [36, 50, 51]. Этот фермент осуществляет синтез керами-

да-сфинголипида, который индуцирует образование экзосом [49]. Напротив, секреция miРНК, связанных с HDL, негативно регулируется nSMase2 [44]. Путей секреции miРНК, ассоциированных только с белками Ago и составляющих, вероятно, большинство с-miРНК, до сих пор не обнаружено. Поэтому полагают, что такие miРНК-комплексы неселективно высвобождаются в результате клеточной гибели и, благодаря своей высокой стабильности, могут длительное время циркулировать в кровотоке [35]. Вообще, один из основных и широко обсуждаемых вопросов состоит в том, существует ли специфическая регуляция секреции miРНК, или же они являются лишь побочным продуктом секреторной активности клетки и результатом клеточной гибели [52]. В последнем случае с-miРНК вряд ли смогут претендовать на роль специфических переносчиков сигнала, да и вообще, возможно, не несут никакой функции. Существуют экспериментальные данные в поддержку каждой из этих точек зрения. Вероятно, в клетке происходят процессы как селективного, так и неселективного высвобождения miРНК во внешнюю среду.

Свидетельством в пользу неселективного высвобождения miРНК-комплексов в результате отмирания клеток (и основой представления о том, что такие с-miРНК не являются переносчиками сигнала) служит то, что их концентрация в культуральной среде коррелировала с уровнем гибели клеток [35]. Еще одним свидетельством является то, что при повреждениях органов, сопровождающихся гибелью клеток, в кровотоке обнаруживается повышенное содержание специфических для этих органов miРНК [53–57]. С другой стороны, при изучении изменения концентрации специфических для мышц miРНК miR-1 и miR-133 в плазме в результате физических нагрузок, сопровождавшихся повреждением мышечных волокон, обнаружено, что повысившаяся после нагрузок концентрация этих miРНК возвращается к норме уже через несколько часов [58, 59]. Это свидетельствует о существовании механизмов достаточно быстрой утилизации внеклеточных miРНК-комплексов, так что они присутствуют в кровотоке намного меньше времени, чем можно было ожидать, исходя из их стабильности *in vitro*. Поэтому можно полагать, что кратковременное повышение в кровотоке специфической для какого-либо органа miРНК может служить способом передачи сигнала о нарушении целостности определенного типа клеток. Таким образом, вопрос о функциональности с-miРНК в составе свободных РНК-комплексов требует дальнейшего изучения.

В отличие от РНП-комплексов, miРНК из внеклеточных везикул и HDL интуитивно представляются подходящими кандидатами на роль специфических переносчиков сигнала. Их секреция контролируется клеткой. Кроме того, везикулы содержат специфические поверхностные белки и поэтому способны обеспечить адресную доставку содержащихся в них miРНК. Действительно, к настоящему времени получено множество свидетельств того, что miРНК в составе везикул, секретированных одним типом клеток, могут поглощаться другим типом клеток и менять в них уровень экспрессии генов-мишеней (обзоры [60, 61]). Например, miРНК из экзосом раковых клеток способны изменять экспрессию генов в клетках окружающих тканей и тем самым, вероятно, способствовать прогрессии опухолей [60, 62–63]. miРНК в составе HDL тоже могут регулировать экспрессию генов-мишеней в клетке-реципиенте [64]. К сожалению, все эти данные получены *in vitro* на культурах клеток. Один из главных вопросов при обсуждении существования переноса сигнала с помощью с-miРНК *in vivo* заключается в том, достаточна ли концентрация с-miРНК для переноса информации. В недавно опубликованной работе группы Тевари проведен количественный анализ содержания miРНК в экзосомах и показано, что оно, в среднем, не превышает одной молекулы на 100 экзосом [65]. Эти данные заставили авторов предположить, что для переноса информации *in vivo* должен существовать механизм сортировки, позволяющий секретировать небольшое количество экзосом с высоким содержанием miРНК. Свидетельства в пользу существования такого механизма получены во многих работах, где сравнивали профиль экспрессии клеточных miРНК и miРНК в составе везикул: оказалось, что такие профили различаются [51, 66–70]. Более того, обнаружено, что посттранскрипционные модификации miРНК, а именно, нематричное добавление нуклеотида к 3'-концу, определяет преимущественное удержание miРНК в клетке (miРНК с 3'-концевым адениловым остатком) или включение в состав экзосом (miРНК с 3'-концевым уридиловым остатком) [70]. Наконец, в работе [71] удалось с достаточной степенью достоверности разделить относительно крупные микрочастицы (осадок после центрифугирования при 10 000 g в течение 30 мин) и два типа экзосом (осадок после центрифугирования при 100 000 g в течение 1 ч и последующее выделение разных типов экзосом с использованием моноклональных антител) и показать, что наборы miРНК в них различаются. Обнаружено также, что транспорт miРНК в экзосомы происходит при участии

белка hnRNP A2B1B, который узнает специфические последовательности в составе miРНК [72]. Таким образом, к настоящему времени накоплено значительное число свидетельств существования механизмов специфической сортировки miРНК в секретлируемые везикулы.

Получены данные, указывающие на то, что miРНК в составе экзосом могут переносить информацию *in vivo*. Например, везикулы с повышенным содержанием miR-143/miR-145, секретированные культурой эндотелиальных клеток, снижали количество атеросклеротических повреждений в *Apo*<sup>-/-</sup> мышцах [73]. Циркулирующие в кровотоке мышечной экзосомы, продуцированные первичной опухолью и содержащие miR-200 miРНК, увеличивали способность к метастазированию у инъецированных в кровь клеток линии рака молочной железы, обладавших низким метастатическим потенциалом [74]. Таким образом, накапливается все больше данных, позволяющих считать miРНК новым типом переносчиков сигнала между клетками организма.

Механизмы действия с-miРНК могут оказаться довольно неожиданными, что связано с их необычной – внеклеточной – локализацией. Обнаружено, что с-miРНК могут служить лигандами для Toll-like рецепторов, расположенных в эндосомах макрофагов и модифицировать иммунный ответ [75–76]. Таким образом, miРНК могут выполнять роль гормонов, что является совершенно новой и очень неожиданной для них функцией.

#### **с-miРНК МОГУТ СЛУЖИТЬ МАРКЕРАМИ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ ОРГАНИЗМА**

Содержание с-miРНК в плазме/сыворотке, а также в других биологических жидкостях, изменяется при многих заболеваниях (онкологических, аутоиммунных, вирусных – пожалуй, при всех, которые были исследованы на этот предмет) [15, 62, 77–78], а также при различных нормальных физиологических состояниях (например, физических нагрузках [79] и беременности [6]). Интересно, что при поражении печени гельминтами специфические для них miРНК попадают в кровоток хозяина [80]. Такая способность служить индикаторами состояния организма в сочетании с высокой стабильностью делает с-miРНК удобными маркерами, позволяющими производить неинвазивную и высокоспецифичную диагностику. В последнее время число статей с описанием с-miРНК-маркеров различных заболеваний растет почти экспонен-

циально. Диагностика на основе с-miРНК может быть не только дешевле и точнее, чем с использованием уже существующих маркеров, но может существенно расширить список диагностируемых состояний и позволить прогнозировать развитие болезней.

Для исследований используют с-miРНК, выделенные из цельной биологической жидкости (например, плазмы), или же ассоциированные с определенным носителем, например, с экзосомами. В первом случае выделить с-miРНК намного проще, однако, согласно существующим сегодня представлениям, основная часть этих miРНК произошла из отмерших клеток [35], а потому в большинстве случаев (за исключением массовой гибели клеток) необходимую информацию будет сложно получить из-за высокого фонового уровня, создаваемого miРНК, высвобожденными в результате клеточной гибели. Напротив, miРНК, ассоциированные с экзосомами или HDL, являются продуктами контролируемой секреции, а потому, несмотря на сложность выделения, могут быть намного более специфичными маркерами. Например, установлено, что злокачественные опухоли секретируют везикулы со специфическими наборами miРНК [62, 63, 81]. Такие наборы интенсивно изучаются с целью поисков с-miРНК-маркеров различных видов и стадий онкологических заболеваний [81–82]. Полезную информацию может предоставить также дифференциальное определение miРНК, связанных с различными носителями. Например, в случае вызванного лекарствами (высокой дозой парацетамола) поражения печени специфическая для этого органа miРНК miR-122 была обнаружена главным образом в составе свободных РНП-комплексов, содержащих Ago2, тогда как в случае алкогольного поражения она присутствовала в составе экзосом [83].

В большинстве случаев определения одной miРНК оказывается недостаточно, необходима детекция сразу нескольких [15]. В настоящее время обсуждается идея создания универсального набора с-miРНК, который позволил бы диагностировать максимально широкий спектр заболеваний [16, 84]. Одно из основных соображений, лежащих в основе этой идеи, состоит в том, что даже в случае обнаружения маркеров для диагностики каждой болезни (а для белковых маркеров это очень дорогой и времязатратный процесс), для того, чтобы определить, чем именно болен пациент, придется применить большое число таких маркеров, что чрезвычайно дорого и занимает много времени. Даже если с помощью универсального набора с-miРНК можно будет определить не саму болезнь, а только ор-

ган, в котором происходит патологический процесс, это уже позволит сэкономить время и средства, поскольку даст возможность сразу перейти к специфичной и более дорогостоящей диагностике [16]. Разными группами используется разная тактика поиска таких маркеров: либо для их выбора используют уже имеющиеся данные (специфическая экспрессия в органе, участие в воспалительных процессах) [16], либо не используют никакой информации об их функции [85]. Альтернативный подход заключается в анализе miРНК цельной крови. Например, при анализе профиля экспрессии miРНК более чем у тысячи пациентов, страдающих различными (преимущественно онкологическими) заболеваниями, был определен набор из 34 miРНК, экспрессия которых была нарушена при большинстве заболеваний [86]. И, хотя с помощью этого набора пока невозможно различить отдельные заболевания, он может послужить основой будущей универсальной диагностической панели, если будет дополнен специфическими маркерами.

#### **ДЛЯ УСПЕШНОГО ВНЕДРЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ НЕОБХОДИМО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ с-miРНК**

Несмотря на интенсивные исследования с-miРНК-маркеров и обилие полученных данных, остается ряд вопросов, которые необходимо разрешить для успешного внедрения этого нового вида маркеров в клиническую практику.

Одной из главных задач является выработка стандартного метода выделения с-miРНК. В качестве примера обсудим с-miРНК крови, поскольку их исследуют чаще всего. При выделении плазмы/сыворотки могут быть использованы различные скорости центрифугирования. Хотя клетки во всех случаях осаждаются полностью, тромбоциты частично остаются в надосадочной жидкости, причем при различных скоростях центрифугирования их количество будет разным. Тромбоциты содержат значительное количество miРНК [87–88]. miРНК тромбоцитов смешивается с с-miРНК плазмы, поэтому даже при выделении с-miРНК плазмы единственного донора с использованием различных скоростей центрифугирования профиль miРНК будет различным [89]. Помимо тромбоцитов, при разных скоростях центрифугирования по-разному осаждаются микрочастицы, что порождает те же проблемы [89].

Если miРНК-маркер не экспрессируется в тромбоцитах, то загрязнение препарата тромбо-

цитарными miRNA не скажется на ее детекции (за исключением случая, когда концентрация miRNA-маркера в плазме низка – на фоне высокого содержания тромбоцитарных miRNA она может быть не обнаружена). А в случае, когда miRNA-маркер присутствует в тромбоцитах, сравнение результатов, полученных с использованием различных скоростей центрифугирования при выделении плазмы, вообще невозможно.

Аналогичная и даже более драматичная ситуация возникает, когда для обнаружения маркеров исследуют miRNA экзосом. Их выделение намного сложнее, а набор используемых методов значительно богаче. Помимо традиционного ультрацентрифугирования (которое тоже не является вполне стандартизованным) возможно использование коммерческих наборов без его применения, причем качество полученных с помощью этих методов образцов и наборы обнаруженных РНК значительно отличаются [90]. Поскольку методики выделения, применяемые различными исследователями, чаще всего неидентичны, прямое сравнение результатов, полученных разными группами, как правило, невозможно.

Помимо скорости и продолжительности центрифугирования, существует много других методических нюансов, влияющих на результат исследования. Например, при увеличении количества исходного материала происходит преимущественное выделение miRNA с низким содержанием GC [91]. Кроме того, в плазме обнаружены ингибиторы реакции обратной транскрипции, которые влияют на ее эффективность при выделении miRNA [92]. Поэтому большой объем взятой для исследования плазмы приводил к значительному искажению результатов благодаря действию ингибиторов, а слишком маленький – к неэффективной детекции miRNA из-за слишком малого количества материала. В ходе описываемого исследования путем подбора был определен оптимальный объем исходного образца (50 мкл) [92]. Профиль с-miRNA изменяется в результате гемолиза и увеличения промежутка времени между отбором крови и центрифугированием (рекомендуется, чтобы интервал не превышал 2 ч [93]). При длительном (5 ч) инкубировании сыворотки при комнатной температуре падает доля не связанных с экзосомами miRNA, что подразумевает разную стабильность с-miRNA, связанных с различными носителями [94]. Даже тип антикоагулянта в пробирке, использованный при отборе крови, может оказывать влияние на результат исследования [92]. Ряд других нюансов, например, различные способы выделения miRNA, обсуждаются в обзоре [95]. Приведенные примеры служат допол-

нительной иллюстрацией невозможности прямого сравнения результатов большинства работ, выполненных в данной области.

В идеальном случае с-miRNA-маркер должен быть высокоспецифичен для конкретного заболевания, а при нормальных условиях его уровень должен быть очень низким. Оказалось, что основную массу с-miRNA плазмы/сыворотки составляют miRNA, секретированные клетками крови [96]. Большинство этих miRNA экспрессируется и в других клетках организма (и, очевидно, секретировается ими) [31–34]. Поэтому в случае, когда с-miRNA-маркер экспрессируется не только в органе-мишени, но также и в клетках крови, ее колебания будут не так заметны (или незаметны вообще) на фоне общего высокого содержания в плазме. Поэтому в последнее время все в большем количестве работ стараются исключать из списка потенциальных маркеров miRNA с высоким уровнем экспрессии в клетках крови (как, например, в работе [97]).

Присутствие в плазме большого количества miRNA из клеток крови породило еще одну существенную и неочевидную проблему. Многие заболевания сопровождаются изменением количества и/или соотношения различных популяций клеток крови. Соответственно изменяется и количество продуцируемых ими с-miRNA. В этом случае изменения профиля экспрессии с-miRNA будут отражать просто колебания числа клеток крови, а не свидетельствовать об обнаружении специфических маркеров [96].

Наконец, хотя и сыворотка, и плазма содержат с-miRNA, количество их в данных жидкостях различается: при исследовании сыворотки и плазмы одних и тех же людей в сыворотке оно оказывалось выше. Причины этого пока не ясны. Одной из них может быть интенсивная секреция экзосом тромбоцитами и лейкоцитами в ходе свертывания крови [98]. В другой работе продемонстрировано, что для некоторых miRNA при выделении из сыворотки воспроизводимость результатов намного ниже, чем для плазмы [92].

Для пояснения сложности текущей ситуации можно привести следующий пример. Авторами работы [97] были отобраны несколько (семь) miRNA, для которых ранее была продемонстрирована повышенная экспрессия в опухолях при колоректальной аденоме и которые, с другой стороны, не входят в число наиболее интенсивно экспрессирующихся в клетках крови. Можно было полагать, что уровни именно этих miRNA будут повышены в плазме больных людей, причем для одной из этих miRNA (miR-29a) такое повышение уже было продемонстрировано ранее [99]. Однако ни для одной из этих семи

miРНК (включая miR-29a) повышения уровня обнаружено не было. Пока группа проводила эксперименты, было опубликовано четыре статьи, посвященные той же теме [100–103]. Во всех были обнаружены с-miРНК-маркеры колоректальной аденомы. Причем, несмотря на значительное сходство наборов исследованных miРНК-кандидатов, во всех статьях предложены разные маркеры.

В настоящее время многими исследовательскими коллективами предпринимаются активные шаги по выработке оптимальных методик выделения с-miРНК и внеклеточных везикул (например, [104–107]). Растущее понимание необходимости стандартизации позволяет надеяться, что общепринятые методики будут выработаны и внедрены.

Исследования с-miРНК открыли новую страницу в изучении межклеточной коммуникации, поскольку с-miРНК, вероятно, являются новым переносчиком сигнала, способным осуществлять намного более тонкую и специфич-

ную регуляцию, чем гормоны. В настоящее время необходимо установить, насколько распространена такая регуляция *in vivo*, в частности, достаточна ли концентрация с-miРНК для передачи сигнала. Пока невыясненным остается интересный вопрос о том, способны ли с-miРНК из биологических секретов (слюны, молока и т.д.) переносить информацию, и если да, то каким реципиентам.

В области клинической практики с-miРНК, вероятно, откроют новую эру точной, высокоспецифичной и неинвазивной диагностики, применимой не только к широкому спектру заболеваний, но и ко многим физиологическим состояниям (например, беременности и физическим нагрузкам). Для успешных шагов в этой области необходимо создание эффективных и стандартных методов выделения с-miРНК и достижение согласия относительно их применения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 14-44-00051).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pasquinelli, A.E. (2012) MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship, *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 271–282.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay, *Nat. Rev. Genet.*, **12**, 99–110.
- Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs, *Genome Res.*, **19**, 92–105.
- Palanichamy, J.K., and Rao, D.S. (2014) miRNA dysregulation in cancer: towards a mechanistic understanding, *Front. Genet.*, **5**, 54.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nat. Cell Biol.*, **9**, 654–659.
- Chim, S.S., Shing, T.K., Hung, E.C., Leung, T.Y., Lau, T.K., Chiu, R.W., and Lo, Y.M. (2008) Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma, *Clin. Chem.*, **54**, 482–490.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., and Tewari, M. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10513–10518.
- 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., and Harris, A.L. (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma, *Br. J. Haematol.*, **141**, 672–675.
- Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K., and Ochiya, T. (2010) microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk, *Silence*, **1**, 7.
- Park, N.J., Zhou, H., Elashoff, D., Henson, B.S., Kastratovic, D.A., Abemayor, E., and Wong, D.T. (2009) Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection, *Clin. Cancer Res.*, **15**, 5473–5477.
- Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A.C., Kausch, I., Jocham, D., Warnecke, J.M., and Szczakiel, G. (2010) A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer, *Urol. Oncol.*, **28**, 655–661.
- Wang, C., Yang, C., Chen, X., Yao, B., Zhu, C., Li, L., Wang, J., Li, X., Shao, Y., Liu, Y., Ji, J., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C.Y., and Zhang, C. (2011) Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility, *Clin. Chem.*, **57**, 1722–1731.
- Cogswell, J.P., Ward, J., Taylor, I.A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., Kelnar, K., Kempainen, J., Brown, D., Chen, C., Prinjha, R.K., Richardson, J.C., Saunders, A.M., Roses, A.D., and Richards, C.A. (2008) Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways, *J. Alzheimers Dis.*, **14**, 27–41.
- Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., Huang, K.H., Lee, M.J., Galas, D.J., and Wang, K. (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids, *Clin. Chem.*, **56**, 1733–1741.
- Schwarzenbach, H., Nishida, N., Calin, G.A., and Pantel, K. (2014) Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **11**, 145–156.
- Sheinerman, K.S., Tsvinsky, V.G., and Umansky, S.R. (2013) Analysis of organ-enriched microRNAs in plasma



- as an approach to development of Universal Screening Test: feasibility study, *J. Transl. Med.*, **11**, 304.
17. Finnegan, E.F., and Pasquinelli, A.E. (2013) MicroRNA biogenesis: regulating the regulators, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **48**, 51–68.
  18. Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs, *RNA*, **10**, 1957–1966.
  19. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II, *EMBO J.*, **23**, 4051–4060.
  20. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 228–234.
  21. Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 1097–1101.
  22. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V.N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, *Nature*, **425**, 415–419.
  23. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, *Genes Dev*, **17**, 3011–3016.
  24. Braun, J.E., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2013) The role of GW182 proteins in miRNA-mediated gene silencing, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **768**, 147–163.
  25. Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation, *Science*, **318**, 1931–1934.
  26. Kim, D.H., Saetrom, P., Snove, O., Jr., and Rossi, J.J. (2008) MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16230–16235.
  27. Forman, J.J., Legesse-Miller, A., and Collier, H.A. (2008) A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14879–14884.
  28. Lee, I., Ajay, S.S., Yook, J.I., Kim, H.S., Hong, S.H., Kim, N.H., Dhanasekaran, S.M., Chinnaiyan, A.M., and Athey, B.D. (2009) New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites, *Genome Res.*, **19**, 1175–1183.
  29. Lytle, J.R., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (2007) Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'-UTR as in the 3'-UTR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9667–9672.
  30. Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, **136**, 215–233.
  31. Basso, K., Sumazin, P., Morozov, P., Schneider, C., Maute, R.L., Kitagawa, Y., Mandelbaum, J., Haddad, J., Jr., Chen, C.Z., Califano, A., and Dalla-Favera, R. (2009) Identification of the human mature B cell miRNome, *Immunity*, **30**, 744–752.
  32. Larsen, M.T., Hother, C., Hager, M., Pedersen, C.C., Theilgaard-Monch, K., Borregaard, N., and Cowland, J.B. (2013) MicroRNA profiling in human neutrophils during bone marrow granulopoiesis and *in vivo* exudation, *PLoS One*, **8**, e58454.
  33. Polikepahad, S., and Corry, D.B. (2013) Profiling of T helper cell-derived small RNAs reveals unique antisense transcripts and differential association of miRNAs with argonaute proteins 1 and 2, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 1164–1177.
  34. Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N.D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foa, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Muller, R.U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D.B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H.I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C.E., Nagle, J.W., Ju, J., Papavasiliou, F.N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M.J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J.J., Sander, C., Zavolan, M., and Tuschl, T. (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing, *Cell*, **129**, 1401–1414.
  35. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., and Burwinkel, B. (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7223–7233.
  36. Kubota, S., Chiba, M., Watanabe, M., Sakamoto, M., and Watanabe, N. (2015) Secretion of small/microRNAs including miR-638 into extracellular spaces by sphingomyelin phosphodiesterase 3, *Oncol. Rep.*, **33**, 67–73.
  37. Gould, S.J., and Raposo, G. (2013) As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles, *J. Extracell. Vesicles*, **2**, DOI: 10.3402/jev.v2i0.20389.
  38. Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends, *J. Cell Biol.*, **200**, 373–383.
  39. Colombo, M., Raposo, G., and Thery, C. (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **30**, 255–289.
  40. Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases, *Cell*, **91**, 457–466.
  41. Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B.S., and Chen, C.C. (2013) Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies, *J. Neurooncol.*, **113**, 1–11.
  42. Gibbins, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009) Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1143–1149.
  43. Boon, R.A., and Vickers, K.C. (2013) Intercellular transport of microRNAs, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **33**, 186–192.
  44. Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., and Remaley, A.T. (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins, *Nat. Cell Biol.*, **13**, 423–433.
  45. Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., and Galas, D.J. (2010) Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7248–7259.
  46. 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., and Tewari, M. (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 5003–5008.
  47. Kowal, J., Tkach, M., and Thery, C. (2014) Biogenesis and secretion of exosomes, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **29**, 116–125.
  48. Lee, Y.S., Pressman, S., Andress, A.P., Kim, K., White, J.L., Cassidy, J.J., Li, X., Lubell, K., Lim do, H., Cho, I.S., Nakahara, K., Preall, J.B., Bellare, P., Sontheimer, E.J., and Carthew, R.W. (2009) Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1150–1156.
  49. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., and Simons, M. (2008) Ceramide triggers budding of exosome

- vesicles into multivesicular endosomes, *Science*, **319**, 1244–1247.
50. Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., and Ochiya, T. (2010) Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells, *J. Biol. Chem.*, **285**, 17442–17452.
  51. Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M.A., Bernad, A., and Sanchez-Madrid, F. (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T-cells to antigen-presenting cells, *Nat. Commun.*, **2**, 282.
  52. Turchinovich, A., and Cho, W.C. (2014) The origin, function and diagnostic potential of extracellular microRNA in human body fluids, *Front. Genet.*, **5**, 30.
  53. Laterza, O.F., Lim, L., Garrett-Engele, P.W., Vlasakova, K., Muniappa, N., Tanaka, W.K., Johnson, J.M., Sina, J.F., Fare, T.L., Sistare, F.D., and Glaab, W.E. (2009) Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury, *Clin. Chem.*, **55**, 1977–1983.
  54. Corsten, M.F., Dennert, R., Jochems, S., Kuznetsova, T., Devaux, Y., Hofstra, L., Wagner, D.R., Staessen, J.A., Heymans, S., and Schroen, B. (2010) Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease, *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **3**, 499–506.
  55. Zhang, Y., Jia, Y., Zheng, R., Guo, Y., Wang, Y., Guo, H., Fei, M., and Sun, S. (2010) Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases, *Clin. Chem.*, **56**, 1830–1838.
  56. Akat, K.M., Moore-McGriff, D., Morozov, P., Brown, M., Gogakos, T., Correa Da Rosa, J., Mihailovic, A., Sauer, M., Ji, R., Ramarathnam, A., Totary-Jain, H., Williams, Z., Tuschl, T., and Schulze, P.C. (2014) Comparative RNA-sequencing analysis of myocardial and circulating small RNAs in human heart failure and their utility as biomarkers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 11151–11156.
  57. Turchinovich, A., Weiz, L., and Burwinkel, B. (2012) Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function, *Trends Biochem. Sci.*, **37**, 460–465.
  58. Banzet, S., Chennaoui, M., Girard, O., Racinais, S., Drogou, C., Chalabi, H., and Koulmann, N. (2013) Changes in circulating microRNAs levels with exercise modality, *J. Appl. Physiol.* (1985) **115**, 1237–1244.
  59. Uhlemann, M., Mobius-Winkler, S., Fikenzer, S., Adam, J., Redlich, M., Mohlenkamp, S., Hilberg, T., Schuler, G.C., and Adams, V. (2012) Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults, *Eur. J. Prev. Cardiol.*, **21**, 484–491.
  60. Hannafon, B.N., and Ding, W.Q. (2013) Intercellular Communication by Exosome-Derived microRNAs in Cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 14240–14269.
  61. Turchinovich, A., Samatov, T.R., Tonevitsky, A.G., and Burwinkel, B. (2013) Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front. Genet.*, **4**, 119.
  62. Salido-Guadarrama, I., Romero-Cordoba, S., Peralta-Zaragoza, O., Hidalgo-Miranda, A., and Rodriguez-Dorantes, M. (2014) MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer, *Onco Targets Ther.*, **7**, 1327–1338.
  63. Saleem, S.N., and Abdel-Mageed, A.B. (2014) Tumor-derived exosomes in oncogenic reprogramming and cancer progression, *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**, 1–10.
  64. Tabet, F., Vickers, K.C., Cuesta Torres, L.F., Wiese, C.B., Shoucri, B.M., Lambert, G., Catherinet, C., Prado-Lourenco, L., Levin, M.G., Thacker, S., Sethupathy, P., Barter, P.J., Remaley, A.T., and Rye, K.A. (2014) HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells, *Nat. Commun.*, **5**, 3292.
  65. Chevillet, J.R., Kang, Q., Ruf, I.K., Briggs, H.A., Vojtech, L.N., Hughes, S.M., Cheng, H.H., Arroyo, J.D., Meredith, E.K., Gallichotte, E.N., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Morrissey, C., Stirewalt, D.L., Hladik, F., Yu, E.Y., Higano, C.S., and Tewari, M. (2014) Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 14888–14893.
  66. Kogure, T., Lin, W.L., Yan, I.K., Braconi, C., and Patel, T. (2011) Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth, *Hepatology*, **54**, 1237–1248.
  67. Nolte-'t Hoen, E.N., Buermans, H.P., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M.H., and 't Hoen, P.A. (2012) Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 9272–9285.
  68. Li, C.C., Eaton, S.A., Young, P.E., Lee, M., Shuttleworth, R., Humphreys, D.T., Grau, G.E., Combes, V., Bewaw, M., Gong, J., Brammah, S., Buckland, M.E., and Suter, C.M. (2013) Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and non-coding RNAs which alter gene expression in recipient cells, *RNA Biol.*, **10**, 1333–1344.
  69. Guduric-Fuchs, J., O'Connor, A., Camp, B., O'Neill, C.L., Medina, R.J., and Simpson, D.A. (2012) Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types, *BMC Genomics*, **13**, 357.
  70. Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I.V., van Eijndhoven, M.A., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J.M., Ylstra, B., de Menezes, R.X., Wurdinger, T., Meijer, G.A., and Pegtel, D.M. (2014) Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes, *Cell Rep.*, **8**, 1649–1658.
  71. Ji, H., Chen, M., Greening, D.W., He, W., Rai, A., Zhang, W., and Simpson, R.J. (2014) Deep sequencing of RNA from three different extracellular vesicle (EV) subtypes released from the human LIM1863 colon cancer cell line uncovers distinct miRNA-enrichment signatures, *PLoS One*, **9**, e110314.
  72. Villarroya-Beltri, C., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Cabo, F., Perez-Hernandez, D., Vazquez, J., Martin-Cofreces, N., Martinez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., and Sanchez-Madrid, F. (2013) Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs, *Nat. Commun.*, **4**, 2980.
  73. 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., and Dimmeler, S. (2012) Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 249–256.
  74. Le, M.T., Hamar, P., Guo, C., Basar, E., Perdigo-Henriques, R., Balaj, L., and Lieberman, J. (2014) miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis, *J. Clin. Invest.*, **124**, 5109–5128.
  75. Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G.J., Zanesi, N., Crawford, M., Ozer, G.H., Wernicke, D., Alder, H., Caligiuri, M.A., Nana-Sinkam, P., Perrotti, D., and Croce, C.M. (2012) MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 2110–2116.
  76. Lehmann, S.M., Kruger, C., Park, B., Derkow, K., Rosenberger, K., Baumgart, J., Trimbuch, T., Eom, G., Hinz, M., Kaul, D., Habel, P., Kalin, R., Franzoni, E.,

- Rybak, A., Nguyen, D., Véh, R., Ninnemann, O., Peters, O., Nitsch, R., Heppner, F.L., Golenbock, D., Schott, E., Ploegh, H.L., Wulczyn, F.G., and Lehnardt, S. (2012) An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration, *Nat. Neurosci.*, **15**, 827–835.
77. Saikumar, J., Ramachandran, K., and Vaidya, V.S. (2014) Noninvasive micromarkers, *Clin. Chem.*, **60**, 1158–1173.
  78. Lagana, A., Russo, F., Veneziano, D., Bella, S.D., Giugno, R., Pulvirenti, A., Croce, C.M., and Ferro, A. (2013) Extracellular circulating viral microRNAs: current knowledge and perspectives, *Front. Genet.*, **4**, 120.
  79. Makarova, J.A., Maltseva, D.V., Galatenko, V.V., Abbasi, A., Maximenko, D.G., Grigoriev, A.I., Tonevitsky, A.G., and Northoff, H. (2014) Exercise immunology meets MiRNAs, *Exerc. Immunol. Rev.*, **20**, 135–164.
  80. Hoy, A.M., Lundie, R.J., Ivens, A., Quintana, J.F., Nausch, N., Forster, T., Jones, F., Kabatereine, N.B., Dunne, D.W., Mutapi, F., Macdonald, A.S., and Buck, A.H. (2014) Parasite-derived microRNAs in host serum as novel biomarkers of helminth infection, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **8**, e2701.
  81. Sato-Kuwabara, Y., Melo, S.A., Soares, F.A., and Calin, G.A. (2015) The fusion of two worlds: Non-coding RNAs and extracellular vesicles – diagnostic and therapeutic implications (Review), *Int. J. Oncol.*, **46**, 17–27.
  82. Eicheler, C., Stuckrath, I., Muller, V., Milde-Langosch, K., Wikman, H., Pantel, K., and Schwarzenbach, H. (2014) Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients, *Oncotarget*, **5**, 9650–9663.
  83. Bala, S., Petrasek, J., Mundkur, S., Catalano, D., Levin, I., Ward, J., Alao, H., Kodys, K., and Szabo, G. (2012) Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases, *Hepatology*, **56**, 1946–1957.
  84. Taguchi, Y.H., and Murakami, Y. (2014) Universal disease biomarker: can a fixed set of blood microRNAs diagnose multiple diseases? *BMC Res. Notes*, **7**, 581.
  85. Taguchi, Y.H., and Murakami, Y. (2013) Principal component analysis based feature extraction approach to identify circulating microRNA biomarkers, *PLoS One*, **8**, e66714.
  86. Keller, A., Leidinger, P., Vogel, B., Backes, C., ElSharawy, A., Galata, V., Muller, S.C., Marquart, S., Schrauder, M.G., Strick, R., Bauer, A., Wischhusen, J., Beier, M., Kohlhaas, J., Katus, H.A., Hoheisel, J., Franke, A., Meder, B., and Meese, E. (2014) miRNAs can be generally associated with human pathologies as exemplified for miR-144, *BMC Med.*, **12**, 224.
  87. Ple, H., Landry, P., Benham, A., Coarfa, C., Gunaratne, P.H., and Provost, P. (2012) The repertoire and features of human platelet microRNAs, *PLoS One*, **7**, e50746.
  88. Stakos, D.A., Gatsiou, A., Stamatelopoulos, K., Tselepis, A.D., and Stellos, K. (2013) Platelet microRNAs: From platelet biology to possible disease biomarkers and therapeutic targets, *Platelets*, **24**, 579–589.
  89. Cheng, H.H., Yi, H.S., Kim, Y., Kroh, E.M., Chien, J.W., Eaton, K.D., Goodman, M.T., Tait, J.F., Tewari, M., and Pritchard, C.C. (2013) Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels, *PLoS One*, **8**, e64795.
  90. Van Deun, J., Mestdagh, P., Sormunen, R., Cocquyt, V., Vermaelen, K., Vandesompele, J., Bracke, M., De Wever, O., and Hendrix, A. (2014) The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling, *J. Extracell. Vesicles*, **3**, DOI: 10.3402/jev.v3.24858.
  91. Monleau, M., Bonnel, S., Gostan, T., Blanchard, D., Courgnaud, V., and Lecellier, C.H. (2014) Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells, *BMC Genomics*, **15**, 395.
  92. Kim, D.J., Linnstaedt, S., Palma, J., Park, J.C., Ntrivalas, E., Kwak-Kim, J.Y., Gilman-Sachs, A., Beaman, K., Hastings, M.L., Martin, J.N., and Duelli, D.M. (2012) Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation, *J. Mol. Diagn.*, **14**, 71–80.
  93. Page, K., Guttery, D.S., Zahra, N., Primrose, L., Elshaw, S.R., Pringle, J.H., Blighe, K., Marchese, S.D., Hills, A., Woodley, L., Stebbing, J., Coombes, R.C., and Shaw, J.A. (2013) Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids, *PLoS One*, **8**, e77963.
  94. Koberle, V., Pleli, T., Schmithals, C., Augusto Alonso, E., Hauptenthal, J., Bonig, H., Peveling-Oberhag, J., Biondi, R.M., Zeuzem, S., Kronenberger, B., Waidmann, O., and Piiper, A. (2013) Differential stability of cell-free circulating microRNAs: implications for their utilization as biomarkers, *PLoS One*, **8**, e75184.
  95. Becker, N., and Lockwood, C.M. (2013) Pre-analytical variables in miRNA analysis, *Clin. Biochem.*, **46**, 861–868.
  96. Pritchard, C.C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J.D., Dougherty, K.J., Miyaji, M.M., Tait, J.F., and Tewari, M. (2012) Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies, *Cancer Prev. Res. (Philadelphia)*, **5**, 492–497.
  97. Adams, S.V., Newcomb, P.A., Burnett-Hartman, A.N., Wurscher, M.A., Mandelson, M., Upton, M.P., Zhu, L.C., Potter, J.D., and Makar, K.W. (2014) Rare circulating microRNAs as biomarkers of colorectal neoplasia, *PLoS One*, **9**, e108668.
  98. Wang, K., Yuan, Y., Cho, J.H., McClarty, S., Baxter, D., and Galas, D.J. (2012) Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma, *PLoS One*, **7**, e41561.
  99. Huang, Z., Huang, D., Ni, S., Peng, Z., Sheng, W., and Du, X. (2010) Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer, *Int. J. Cancer*, **127**, 118–126.
  100. Giraldez, M.D., Lozano, J.J., Ramirez, G., Hijona, E., Bujanda, L., Castells, A., and Gironella, M. (2013) Circulating microRNAs as biomarkers of colorectal cancer: results from a genome-wide profiling and validation study, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **11**, 681–688.
  101. Kanaan, Z., Roberts, H., Eichenberger, M.R., Billeter, A., Ocheretner, G., Pan, J., Rai, S.N., Jorden, J., Williford, A., and Galandiuk, S. (2013) A plasma microRNA panel for detection of colorectal adenomas: a step toward more precise screening for colorectal cancer, *Ann. Surg.*, **258**, 400–408.
  102. Wang, Q., Huang, Z., Ni, S., Xiao, X., Xu, Q., Wang, L., Huang, D., Tan, C., Sheng, W., and Du, X. (2012) Plasma miR-601 and miR-760 are novel biomarkers for the early detection of colorectal cancer, *PLoS One*, **7**, e44398.
  103. Toiyama, Y., Takahashi, M., Hur, K., Nagasaka, T., Tanaka, K., Inoue, Y., Kusunoki, M., Boland, C.R., and Goel, A. (2013) Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, **105**, 849–859.
  104. Farina, N.H., Wood, M.E., Perrapato, S.D., Francklyn, C.S., Stein, G.S., Stein, J.L., and Lian, J.B. (2014) Standardizing analysis of circulating microRNA: clinical and biological relevance, *J. Cell. Biochem.*, **115**, 805–811.
  105. Moret, I., Sanchez-Izquierdo, D., Iborra, M., Tortosa, L., Navarro-Puche, A., Nos, P., Cervera, J., and Beltran, B. (2013) Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction, *PLoS One*, **8**, e82753.
  106. Witwer, K.W., Buzas, E.I., Bemis, L.T., Bora, A., Lasser, C., Lotvall, J., Nolte-’t Hoen, E.N., Piper, M.G.,

- Sivaraman, S., Skog, J., They, C., Wauben, M.H., and Hochberg, F. (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research, *J. Extracell. Vesicles*, **2**.
- 107 Kanwar, S.S., Dunlay, C.J., Simeone, D.M., and Nagrath, S. (2014) Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes, *Lab Chip*, **14**, 1891–1900.

## CIRCULATING microRNAs

**J. A. Makarova<sup>1,2\*</sup>, M. U. Shkurnikov<sup>2,3</sup>,  
A. A. Turchinovich<sup>4</sup>, A. G. Tonevitsky<sup>3</sup>, A. I. Grigoriev<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> *V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow 119991, Russia; fax: +7(499)135-1405, E-mail: j-makarova@yandex.ru*

<sup>2</sup> *Scientific Research Center Bioclinicum, ul. Ugreshskaya 2/85, Moscow 115088, Russia; fax: +7(495)665-6189, E-mail: mail@bioclinicum.com*

<sup>3</sup> *P. A. Hertsen Moscow Scientific Research Institute of Oncology, P. A. Hertsen Federal Medical Research Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, 2nd Botkinskii proezd 3, Moscow 125284, Russia; fax: +7(495)945-8020, E-mail: mshkurnikov@gmail.com*

<sup>4</sup> *Molecular Epidemiology Group, German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280 69120 Heidelberg, Germany; fax: +49(0)6221 422995, E-mail: a.turchinovich@dkfz-heidelberg.de*

<sup>5</sup> *State Scientific Center of the Russian Federation, Institute for Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoye shosse 76A, Moscow 123007, Russia; fax: +7(499)195-2253, E-mail: grigoriev@imbp.ru*

Received February 19, 2015

Revision received March 31, 2015

The detection of miRNAs in plasma and other body fluids opened up a fascinating possibility that animal noncoding RNAs can act as extracellular signaling molecules. In this review we discuss recent progress in the field including the ability of miRNAs to participate in intercellular communication *in vitro* and *in vivo*, and the application of circulating miRNAs as diagnostic markers of a wide range of diseases. Special attention is paid to the relevance of the development and unification of current techniques for circulating miRNAs isolation.

*Key words:* miRNA, exosomes, biomarkers, noncoding RNA, cancer