

## ДЛИННЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК — ПЕРСПЕКТИВНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А. Ю. Филатова<sup>1</sup> ✉, П. А. Спарбер<sup>1</sup>, И. А. Кривошеева<sup>1</sup>, М. Ю. Скоблов<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория функциональной геномики, Медико-генетический научный центр, Москва

<sup>2</sup> Лаборатории медицинских генетических технологий, отдел фундаментальных исследований НИМСИ, Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова, Москва

<sup>3</sup> Лаборатория функционального анализа генома, Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

На сегодняшний день в мире проводится около 2,5 тысяч клинических исследований препаратов для генной терапии. Несколько из них уже одобрены для клинического применения. Мишенями подавляющего большинства таких препаратов являются хорошо охарактеризованные белок-кодирующие гены. Однако в последние годы появляется всё больше исследований, посвященных длинным некодирующим РНК (днРНК) и их участию в различных клеточных процессах. Из 16 тысяч генов днРНК человека функционально охарактеризовано только около двух сотен. Но уже сейчас показана их возможная роль в развитии более 200 различных заболеваний, при этом в некоторых случаях они являются одним из ключевых звеньев патогенеза. Это делает длинные некодирующие РНК перспективной мишенью для генной терапии. Существующий арсенал молекулярно-биологических методов уже успешно применяют для разработки днРНК-направленных подходов к лечению различных заболеваний. В обзоре рассказывается об основных подходах к генной терапии с использованием днРНК.

**Ключевые слова:** длинные некодирующие РНК, малые интерферирующие РНК, антисмысловые олигонуклеотиды, генная терапия, опухолевые заболевания, наследственные заболевания

✉ **Для корреспонденции:** Филатова Александра Юрьевна  
ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115478; maacc@yandex.ru

**Статья получена:** 25.06.2017 **Статья принята к печати:** 28.06.2017

## LONG NONCODING RNAs ARE A PROMISING THERAPEUTIC TARGET IN VARIOUS DISEASES

Filatova AYU<sup>1</sup> ✉, Sparber PA<sup>1</sup>, Krivosheeva IA<sup>1</sup>, Skoblov MYU<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Functional Genomics, Research Centre of Medical Genetics, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Laboratory of Medical Genetic Technologies, Department of Basic Research of MDRI, Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Genomic Functional Analysis Laboratory, Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russia

As of today, there have been about 2,500 gene therapy clinical trials initiated or completed worldwide. Some of the tested drugs have been already approved for clinical use. Most of these drugs target well-characterized protein-coding genes. At the same time, the past few years have witnessed an increasing interest in long noncoding RNAs (lncRNAs) and their role in cellular processes. Of 16,000 identified human lncRNA genes, biological functions have been elucidated for only two hundred. Nevertheless, we already know about their association with the development of 200 different disorders. In some cases these genes are the key element in disease pathogenesis, which makes long noncoding RNAs a promising target for gene therapy. To date, researchers successfully employ molecular biology techniques for the development of lncRNA-based therapeutic strategies. The following review focuses on the main approaches to gene therapy based on the use of lncRNA.

**Keywords:** long noncoding RNA, small interfering RNA, antisense oligonucleotides, gene therapy, cancer, inherited disease

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexandra Filatova  
ul. Moskvorechie, d. 1, Moscow, Russia, 115478; maacc@yandex.ru

**Received:** 25.06.2017 **Accepted:** 28.06.2017

За последнее десятилетие было проведено множество исследований с применением методов секвенирования нового поколения (next generation sequencing), позволивших выявить удивительный феномен: примерно 70 % генома человека транскрибируется, но только 1,5 % транскриптов кодируют белки. Всё остальное приходится на некодирующие РНК (нкРНК). Они включают хорошо изученные классы рибонуклеиновых кислот: рибосомные (рРНК), транспортные (тРНК), микро-, малые ядерные (мяРНК) и малые ядрышковые РНК (мякРНК) и др. В последние годы

активно исследуется еще один класс нкРНК — длинные некодирующие РНК (днРНК). Ими называют транскрипты длиной более 200 нуклеотидов, которые не содержат протяженной открытой рамки считывания.

По последним данным проекта GENCODE (Encyclopedia of genes and gene variants), в геноме человека насчитывается 15 787 генов длинных некодирующих РНК [1]. При этом функциональная значимость описана менее чем для 200 из них [2]. Но уже ясно, что днРНК — это гетерогенная группа транскриптов, выполняющих разнообразные

функции в клетке. Они могут влиять на экспрессию генов на транскрипционном уровне за счет образования комплексов с транскрипционными факторами [3, 4] или привлечения хроматин-модифицирующих комплексов, таких как репрессивные комплексы PRC1 [5], PRC2 [4, 6, 7], LSD1 [8] или активирующий комплекс TrxG [9]. Кроме того, днРНК могут оказывать влияние и на посттранскрипционном уровне. Они способны активно взаимодействовать с микроРНК, тем самым регулируя уровень экспрессии их мишеней [10, 11]. Также днРНК могут образовывать дуплексы с мРНК-мишенью, ингибируя ее трансляцию [12] или изменяя стабильность [13, 14]. Более того, некоторые длинные некодирующие РНК способны оказывать влияние на сплайсинг пре-мРНК [15–17].

Несмотря на небольшое количество охарактеризованных днРНК, ясно, что они могут играть роль в развитии многих заболеваний. Так, в базе данных lncRNADisease содержатся записи примерно из 500 научных публикаций о 321 днРНК, участвующей в развитии 221 заболевания [18]: среди них опухолевые, нейродегенеративные, сердечно-сосудистые патологии, болезни геномного импринтинга и многие другие. При этом в некоторых случаях днРНК играют главную роль в молекулярном патогенезе заболевания, что делает их не только перспективными биомаркерами, но и мишенями для терапии. В обзоре мы приводим наиболее интересные примеры использования днРНК в качестве потенциальных мишеней для терапии различных заболеваний, а также описываем существующие на сегодняшний день подходы генной терапии, которые могут быть направлены на модуляцию активности днРНК.

### Терапевтические подходы, направленные на изменение активности днРНК

Развитие и прогрессирование различных заболеваний могут быть связаны как с активацией экспрессии длинных некодирующих РНК [3, 19–23], так и со снижением их содержания в клетке [24–28]. Поэтому на сегодняшний день активно развиваются подходы к генной терапии, направленные на активацию и подавление экспрессии днРНК, а также на ингибирование их активности. К методам активации экспрессии генов можно отнести экспрессию с векторов, как плазмидных, так и вирусных, а также использо-

вание искусственных ген-специфичных транскрипционных активаторов. Для подавления экспрессии генов днРНК можно использовать такие подходы, как РНК-интерференция, антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), репрессия транскрипции и геномное редактирование. Ингибировать активность днРНК можно с помощью АСО или малых молекул.

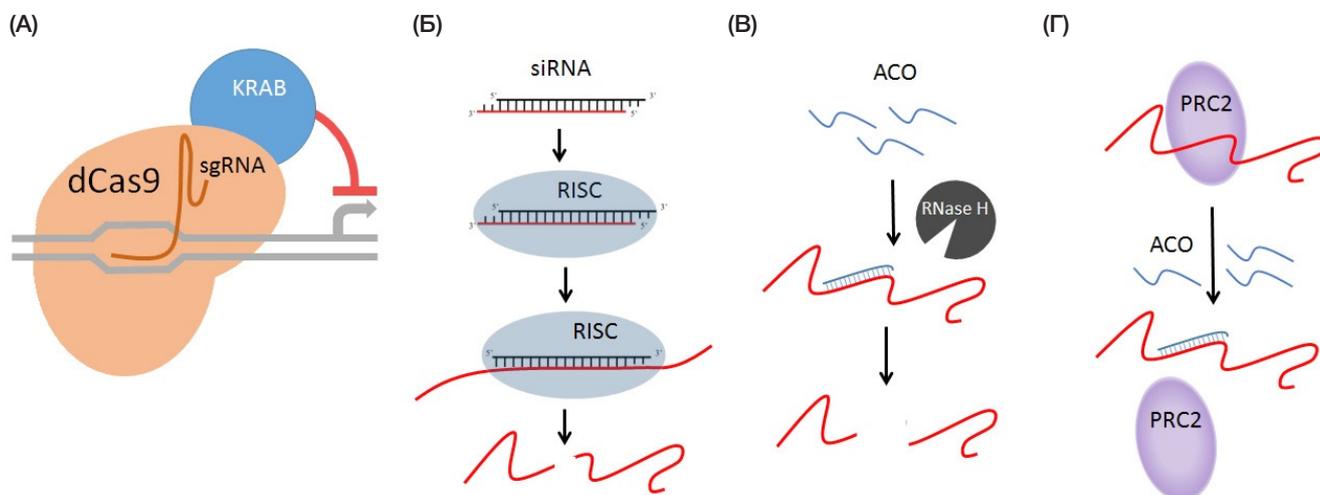
Указанные выше методы были разработаны для генной терапии заболеваний, вызываемых изменениями в белок-кодирующих генах, но хорошо подходят и для днРНК. При этом, арсенал методов воздействия на белок-кодирующие гены гораздо шире. Это связано с имеющимся на сегодняшний день большим объемом знаний о функционировании белков, тогда как о днРНК известно пока не так много. Большой потенциал для изучения имеют вторичные структуры, свойственные молекулам днРНК. Поэтому следует ожидать, что накопление знаний о функциях длинных некодирующих РНК в норме и при патологии приведет к разработке новых эффективных и высокоспецифичных методов генной терапии.

Ниже описаны принципы основных подходов, направленных на изменение экспрессии или активности длинных некодирующих РНК (рисунок).

#### Экспрессионные векторы

Использование экспрессионных векторов на сегодняшний день является самым распространенным методом увеличения экспрессии целевого гена как в научных исследованиях, так и в генной терапии. Существует большое количество различных векторов и способов их доставки в клетки (вирусных и невирусных) [29]. Данный подход активно используется для компенсации потери экспрессии функционального гена в результате возникновения в нем делеции или патогенной мутации.

Весьма перспективной является возможность использования ткане- или опухолеспецифических промоторов, что позволяет обеспечить специфичность экспрессии целевого гена. Например, известно, что промотор днРНК H19 активируется во многих опухолевых клетках. Таким образом, введение данного промотора в конструкцию, экспрессирующую гены-супрессоры опухолевого роста (как кодирующие, так и некодирующие), позволяет изменять их экспрессию только в тканях опухоли [30].



Некоторые геннотерапевтические подходы, нацеленные на длинные некодирующие РНК (днРНК). (А) Репрессия транскрипции с использованием механизма CRISPRi. (Б) РНК-интерференция. (В) Антисмысловые олигонуклеотиды (АСО) активируют РНКазу H — зависимую деградацию РНК-мишени за счет образования РНК-ДНК-дуплекса. (Г) АСО препятствуют связыванию днРНК с репрессивным белковым комплексом PRC2

*РНК-интерференция*

РНК-интерференция — механизм подавления экспрессии генов при помощи малых молекул РНК. Такими молекулами являются малые интерферирующие РНК (siРНК) и микроРНК, представляющие собой РНК-дуплекс длиной 21–25 пар нуклеотидов. Одна из цепей малой РНК, называемая ведущей (guide strand), встраивается в комплекс RISC (RNA-induced silencing complex) и направляет его к своим РНК-мишеням. Это в итоге приводит к деградации целевой РНК или ингибированию ее трансляции.

Данный подход также является универсальным и пригоден для подавления экспрессии как белок-кодирующих генов, так и длинных некодирующих РНК. На сегодняшний день разрабатываются подходы к генной терапии с использованием siРНК и микроРНК или малых шпилечных РНК (shРНК) — предшественников siРНК, доставляемых в клетки в составе экспрессионного вектора. Несмотря на их высокую эффективность в подавлении экспрессии гена, использование механизма РНК-интерференции для терапии заболеваний часто сопряжено с проблемами доставки, специфичности и иммуногенности данных препаратов. Однако ведутся активные исследования, направленные на решение этих проблем, например с использованием химических модификаций малых РНК.

*Антисмысловые олигонуклеотиды*

Антисмысловые олигонуклеотиды (АСО) — это малые синтетические молекулы ДНК или РНК, способные по принципу комплементарности связываться с РНК-мишенями, подавляя их экспрессию или влияя на их функцию. Наиболее часто используемым механизмом действия АСО является привлечение РНКазы H, которая расщепляет молекулу целевой РНК в составе РНК–ДНК-гибрида [31]. Другим примером действия антисмысловых олигонуклеотидов является влияние на прохождение сплайсинга, при котором связывание АСО с участком пре-мРНК ведет к блокированию связывания с ней определенных факторов сплайсинга (splice-switching) [32]. В этом случае антисмысловые олигонуклеотиды синтезируют со специальными химическими модификациями, такими как пептидо-нуклеиновые кислоты (peptide nucleic acid, PNA) или морфолиновые олигонуклеотиды (phosphoramidate morpholino oligomer, PMO), в результате чего они не приводят к активации РНКазы H-зависимого расщепления [33]. Для длинных некодирующих РНК также показан механизм блокирования их связывания с хроматин-модифицирующим комплексом PRC2 за счет связывания с АСО [21].

Кроме PNA- и PMO-модификаций олигонуклеотидов существуют и другие. Самыми распространенными из них являются LNA (Locked nucleic acid) и 2'-O-Methyl (2'-OMe)-модификации. Они повышают стабильность олигонуклеотида, а также его специфичность и аффинность связывания с РНК-мишенью. Кроме того, было показано, что LNA-модификация не влияет на способность молекул РНК встраиваться в комплекс RISC [33]. Таким образом, на сегодняшний день РНК-интерференция и использование антисмысловых олигонуклеотидов являются наиболее часто используемыми методами подавления экспрессии генов в клинической практике. По данным на 2016 г., 26 лекарственных препаратов на основе siРНК и АСО проходят различные стадии клинических испытаний для более чем 50 заболеваний [33].

*Редактирование генома*

Перспективными выглядят подходы геномного редактирования, позволяющие как исправить патогенную мутацию, так и провести нокаут гена. В случае длинных некодирующих РНК последний вариант кажется наиболее реализуемым (ниже будут приведены примеры заболеваний, возникающих при чрезмерной экспрессии днРНК).

Редактирование генома стало широкодоступным после исследования механизмов связывания с ДНК искусственно созданных белков типа «цинковые пальцы» (ZNF) [34] и затем белков-эффекторов, подобных активаторам транскрипции (TALENs) [35]. Эти подходы основаны на возможности определенных белковых последовательностей (мономеров) связываться с конкретными нуклеотидами в составе двуцепочечной ДНК. Чередование таких мономеров позволяет создать белок, связывающийся с заданной (желаемой) последовательностью ДНК. При этом каждый мономер ZNF узнает последовательность из трех нуклеотидов, тогда как мономер TALEN распознает отдельные нуклеотиды, что делает последний метод гораздо более универсальным.

Однако немного позже начала активно использоваться еще одна система редактирования генома — CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats). В отличие от предыдущих систем узнавание целевой последовательности ДНК системой CRISPR осуществляется за счет комплементарного связывания направляющей РНК (small guide RNA, sgРНК) с ДНК и привлечения нуклеазы Cas9, способной расщеплять двуцепочечную ДНК. Система CRISPR/Cas9 является значительно более эффективной и простой в применении, чем ZNF или TALEN [36]. Поэтому на сегодняшний день она является самым распространенным методом редактирования генома и решения других задач [37]. И хотя до сих пор ведутся споры относительно допустимости ее использования в клинической практике из-за недостаточной специфичности [38–40], многие группы ученых ведут исследования по оптимизации и разработке подходов к генной терапии на основе системы CRISPR/Cas9.

*Регуляция транскрипции*

Кроме как для редактирования генома, технология CRISPR/Cas9 может быть использована для изменения экспрессии генов без вмешательства в структуру ДНК. Для этого в последовательность нуклеазы Cas9 были внесены мутации, инактивирующие ее нуклеазную активность, а получившийся белок назвали dCas9 (deactivated Cas9). К нему можно присоединять различные белковые домены, активирующие (CRISPRa: VP64, p65, Rta) или репрессирующие (CRISPRi: KRAB, ZNF10) транскрипцию, и таким образом влиять на экспрессию генов [41–44]. Использование данных систем показало свою эффективность на клеточных культурах. Например, Gilbert и соавт. применили систему dCas9-KRAB для репрессии транскрипции 5 днРНК, вовлеченных в канцерогенез (H19, MALAT1, NEAT1, TERC, XIST). При этом экспрессия РНК-мишеней снижалась более чем на 80 %, что не уступает по эффективности РНК-интерференции или использованию АСО [45]. В то же время Perez-Pinera и соавт. показали возможность усиления транскрипции различных белок-кодирующих генов в 2–250 раз с применением системы dCas9-VP64 [44].

Использование подходов CRISPRa/i имеет ряд преимуществ перед РНК-интерференцией и экспрессионными

векторами. Во-первых, только система CRISPRa/i позволяет модулировать функцию РНК *in cis*. Известно, что часто некодирующие РНК проявляют свою функцию в локусе транскрипции, а иногда именно сам процесс транскрипции днРНК важен для регуляции экспрессии соседних генов [21, 28, 46]. Во-вторых, активация эндогенного промотора будет приводить к экспрессии всех альтернативных изоформ РНК в их необходимых соотношениях [47]. Впрочем, существует и ряд ограничений применения систем на основе CRISPR для регуляции работы длинных некодирующих РНК, так как они часто перекрываются с одним или несколькими белок-кодирующими генами или имеют с ними общую промоторную область. Поэтому изменение транскрипции таких днРНК может привести к нежелательному влиянию на экспрессию соседних генов [47].

#### *Влияние на активность днРНК при помощи малых молекул*

Другим подходом к терапии заболеваний, развитие которых связано с днРНК, является использование малых молекул, препятствующих взаимодействию днРНК с их белковыми партнерами [48, 49]. С помощью высокопроизводительного скрининга можно выявлять малые молекулы, препятствующие образованию комплекса днРНК–белок и в дальнейшем использовать эти молекулы для лечения заболеваний [50]. По сравнению с другими генно-терапевтическими агентами малые молекулы лучше доставляются и поглощаются клетками. Известные взаимодействия между днРНК и белком, такие как HOTAIR–PRC2, ANRIL–CBX7, PCAT-1–PRC2 и H19–EZ2 стали привлекательными мишенями для скрининга ингибиторов малых молекул [51]. Например, в работе Zhou и соавт. две малые молекулы, DZNER и 2-PCPA, были использованы для ингибирования взаимодействия днРНК HOTAIR с белками PRC2 и LSD1 для изучения роли HOTAIR в развитии глиобластомы [52].

#### **Примеры днРНК — потенциальных мишеней для терапии различных заболеваний**

##### *днРНК SAMMSON в развитии меланомы*

Меланома — злокачественная опухоль, образующаяся из пигментных клеток кожи, меланоцитов. Для меланомы характерен повышенный риск образования метастазов [53]. По статистике, приведенной Американским онкологическим обществом (American cancer society), на меланому приходится около 4–6 % всех вновь выявляемых случаев рака [54].

В 2016 г. в работе Leucci и соавт. [3] были проведены обширные исследования роли длинной некодирующей РНК SAMMSON в развитии меланомы и возможности использования этой днРНК в качестве мишени для терапии. Основываясь на данных проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA), авторы продемонстрировали, что данная днРНК имеет эктопическую экспрессию более чем в 90 % образцов меланомы. Более того, экспрессия данной РНК является меланомоспецифической. В дальнейшей экспериментальной работе было показано, что экспрессия SAMMSON активируется при воздействии известного меланомоспецифического транскрипционного фактора SOX10. При этом нокдаун SAMMSON с использованием LNA-модифицированных олигонуклеотидов в меланомных клеточных культурах приводил к значительному снижению скорости роста клеток и усилению апоптоза. Также

исследователи показали, что SAMMSON напрямую взаимодействует с белком p32, а нокдаун SAMMSON приводит к снижению митохондриальной фракции p32. Это, в свою очередь, приводит к нарушению синтеза белков дыхательной цепи митохондрий, снижению потенциала мембраны митохондрий и апоптозу. Кроме того, снижение количества p32 в митохондриях приводит к накоплению «токсичных» предшественников митохондрий, что также индуцирует гибель клеток.

Таким образом, SAMMSON является хорошей таргетной мишенью для терапии меланомы. Для демонстрации этого Leucci и соавт. провели исследование *in vivo*. Мышам прививали ксенографтные опухоли меланомы. После чего внутривенно вводили модифицированный антисмысловый олигонуклеотид против днРНК SAMMSON. Использование целевого олигонуклеотида приводило к значимому снижению темпов роста опухоли по сравнению с контролем: примерно в 1,5 раза. Кроме того, использование данного олигонуклеотида в комбинации с дабрафенибом (селективным ингибитором киназы BRAF с мутацией V600E) приводило к значительному — более чем в 2 раза — усилению терапевтического эффекта последнего. Таким образом, исследователи пришли к выводу, что днРНК SAMMSON может быть использована как информативный биомаркер меланомы, а также как перспективная мишень для терапии данного заболевания.

##### *днРНК BCAR4 в развитии рака молочной железы*

Опухоль молочной железы — самое распространенное опухолевое заболевание среди женщин. При этом в структуре смертности от опухолевых заболеваний у женщин рак молочной железы стоит на втором месте (14 %). В работе Xing и соавт. [19] было продемонстрировано, что экспрессия днРНК BCAR4 не детектируется в нормальных тканях молочной железы, но присутствует более чем в половине образцов опухолей молочной железы. При этом уровень экспрессии BCAR4 возрастает на стадии метастазирования в лимфатические узлы, а ее повышенная экспрессия коррелирует со снижением кумулятивной выживаемости пациентов. Кроме того, предыдущие исследования других авторов показали, что экспрессия BCAR4 активируется в клетках опухоли в ответ на лечение тамоксифеном, что делает клетки нечувствительными к дальнейшей терапии антиэстрогеновыми препаратами [55].

Xing и соавт. [19] показали также, что нокдаун гена BCAR4 в клеточных линиях опухоли молочной железы приводит к значительному снижению уровня миграции и инвазии клеток, но не к снижению их пролиферации. Используя методики аффинной очистки лизатов и масс-спектрометрии, исследователям удалось установить, что днРНК BCAR4 напрямую взаимодействует с белками SNIP1 и PNUITS. При этом было выявлено, что BCAR4 через SNIP1 образует комплекс с фосфорилированным белком GLI2. GLI2 является транскрипционным фактором, регулирующим транскрипцию генов клеточной миграции и инвазии через активацию сигнального пути Hedgehog. С помощью ChiRP-анализа (Chromatin isolation by RNA purification) была выявлена локализация транскрипта BCAR4 в области промотора гена-мишени GLI2, при этом нокдаун гена BCAR4 приводил к снижению экспрессии транскрипционного фактора.

Также было установлено, что данная днРНК при взаимодействии с белком PNUITS образует комплекс с фосфатазой PP1, которая, в свою очередь, дефосфорилирует

РНК-полимеразу II, что необходимо для ее нормального функционирования. Таким образом, было показано, что днРНК BCAR4 является важным участником комплекса, активирующего транскрипцию генов-мишеней GLI2, что на клеточном уровне приводит к активизации миграции и инвазии клеток опухоли.

В конце своей работы Xing и соавт. продемонстрировали терапевтический эффект нокдауна BCAR4 *in vivo*. У мышей моделировали активно метастазирующую опухоль с использованием ксенографта. Далее мышам внутривенно вводили по отдельности 2 различных модифицированных антисмысловых олигонуклеотида (LNA) против BCAR4 и сравнивали с контрольной неспецифичной (scramble) LNA. У мышей, обработанных таргетными LNA, значительно снижалось легочное метастазирование относительно контроля. При этом размер первичной опухоли не изменялся.

Кроме того, исследователи использовали другой подход для лечения мышей: инъекции таргетных shRNA в жировую ткань непосредственно молочной железы. При таком воздействии также наблюдалось значительное снижение уровня метастазирования в легкие при том же размере первичной опухоли. Однако в последнем случае эффект был более выраженным, чем при внутривенном введении LNA. Xing и соавт. предлагают использовать экспрессию BCAR4 как важный прогностический признак прогрессии опухоли молочной железы и как мишень для ингибирования метастазирования опухоли у пациентов с высоким риском метастазирования и у пациентов с развившейся резистентностью к антиэстрогеновым препаратам.

#### *днРНК HOTAIR в развитии различных опухолевых заболеваний*

HOTAIR (Hox transcript antisense intergenic RNA) — одна из первых некодирующих РНК, для которой было показано участие в развитии опухолевых заболеваний [7]. HOTAIR транскрибируется с антисмысловой цепи кластера генов HOXC на хромосоме 12 и способна привлекать к другому кластеру гомеобоксных генов, HOXD, репрессирующие комплексы белков PRC2 (polycomb repressive complex 2) [7] и LSD1 (lysine-specific demethylase 1) [8]. При этом активность комплекса PRC2 приводит к метилированию гистона H3K27, а активность комплекса LSD1 — к деметилированию H3K4me2, что приводит к подавлению транскрипции генов-мишеней. В последующих работах было показано, что HOTAIR способна привлекать PRC2-комплекс не только к генам HOXD, но и множеству других генов. В том числе к гену рецептора прогестерона *PGR*, к генам семейства протокадгеринов (*PCDH10*, *PCDH5*, *PCDH20*), генам, вовлеченным в опухолевый ангиогенез — *EPHA1* и *JAM2* [56], а также генам-супрессорам опухолевого роста (*PTEN* [7]).

Было показано, что экспрессия HOTAIR в метастазах опухоли молочной железы увеличена в сотни раз [56], тогда как уровень ее экспрессии в первичной опухоли достаточно гетерогенен. Анализ первичных опухолей показал, что высокий уровень экспрессии HOTAIR является значимым прогностическим признаком развития метастазов и снижения выживаемости пациентов. Кроме того, в экспериментах на клеточных культурах и *in vivo* на мышах было показано, что увеличение экспрессии HOTAIR ведет к увеличению инвазивной активности клеток опухоли и развитию метастазов в легких. Например, Gupta и соавт. подсаживали мышам опухолевую клеточную линию MDA-MB-231, содержащую вектор, сверхэкспрессирующий HOTAIR, или контрольный пустой вектор. Первичный размер опухоли у

мышей с сверхэкспрессией HOTAIR был значимо, но несильно увеличен по сравнению с контролем, тогда как уровень метастазирования в легкие при увеличении экспрессии HOTAIR возрос в 4 раза [56].

В дальнейшем была показана роль HOTAIR в развитии целого ряда опухолевых заболеваний, таких как сквамозно-клеточный рак пищевода, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, гепатоцеллюлярная карцинома, рак эндометрия, рак простаты, назофарингеальная карцинома, сквамозно-клеточный рак гортани, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, меланома, глиома, саркома. Причем в большинстве случаев повышенная экспрессия HOTAIR коррелирует с активностью метастазирования и ухудшением прогноза течения заболевания [57].

В связи с этим HOTAIR может являться мишенью для эффективной терапии некоторых опухолевых заболеваний, особенно с неблагоприятным прогнозом. Действительно, на сегодняшний день, существует ряд работ, сообщающих об экспериментах *in vivo* на ксенографтных мышинных моделях, в которых снижение экспрессии HOTAIR приводило к значительному торможению роста опухоли. Например, в работе Li и соавт. были проведены эксперименты с мышинной моделью сквамозно-клеточного рака гортани. Животным подкожно вводили клетки Her-2, после чего у них развивались опухоли. В дальнейшем проводили внутриопухолевые инъекции лентивирусного вектора, содержащего shRNA против HOTAIR. В результате размер опухоли после введения целевой shRNA был значительно ниже по сравнению с контрольной группой (1,113 ± 0,209 г против 1,960 ± 0,584 г соответственно) [58].

#### *днРНК MALAT1 в развитии различных опухолевых заболеваний*

Длинная некодирующая РНК MALAT1 (Metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1) была впервые описана еще в 1997 г., однако свое нынешнее название получила только в 2003 г. Тогда Ji и соавт. показали, что ее экспрессия ассоциирована с развитием метастазов у пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Это была первая днРНК, для которой была описана ее роль в развитии опухолевых заболеваний [59]. При этом MALAT1 экспрессируется на высоком уровне во многих нормальных тканях человека и является консервативной среди млекопитающих [59]. В дальнейшем было показано, что MALAT1 локализуется в основном в ядре клетки в составе nuclear speckles [15].

Оказалось, что MALAT1 способна образовывать комплексы с SR-белками сплайсинга и изменять их локализацию в ядре, а также модулировать фосфорилирование белков SF2/ASF. Более того, Tripathi и соавт. продемонстрировали, что нокдаун MALAT1 в клеточной линии аденокарциномы шейки матки Hela приводит к изменению альтернативного сплайсинга многих генов [16]. Хотя в других исследованиях, проведенных на клеточных линиях опухолей легкого (A549, WT, GFP, KO1-3), не было показано значимое влияние нокдауна MALAT1 на альтернативный сплайсинг [60]. Кроме того, мыши, нокаутные по MALAT1, нормально развиваются и не демонстрируют никакого патологического фенотипа или даже изменения в локализации SR-белков. Такое несоответствие полученных результатов может быть связано с тем, что MALAT1 может выполнять различные функции у мыши и человека, или с тем, что для проявления фенотипического влияния MALAT1 необходимы какие-либо специальные, возможно, стрессовые, условия [20, 61].

Тогда как вопрос о влиянии MALAT1 на альтернативный сплайсинг остается дискуссионным, участие этой днРНК в регуляции экспрессии генов-мишеней не вызывает сомнений. В работе Тапо и соавт. было продемонстрировано, что нокдаун MALAT1 в клеточной линии легочной карциномы A549 значительно снижает экспрессию генов (*CTHRC1*, *CCT4*, *HMMR*, *ROD1* и др.), отвечающих за клеточную миграцию, что приводит к снижению уровня подвижности клеток [62]. Расширенное исследование других авторов, проведенное на нескольких клеточных линиях, также продемонстрировало роль MALAT1 в активации экспрессии генов, приводящих к метастазированию опухолей (*GPC6*, *LPHN2*, *CDCP1* и *ABCA1*). При этом уровень экспрессии генов-ингибиторов миграции и инвазии клеток (*MIA2*, *ROBO1*) при нокдауне MALAT1 увеличивался [60]. Возможный механизм влияния MALAT1 на экспрессию генов был описан в работе Yang и соавт. где было показано, что MALAT1 способна образовывать комплекс с белком Pc2, причем только с неметилированной его фракцией, тогда как метилированная фракция Pc2 взаимодействует с другой днРНК, TUG1, и входит в состав комплекса PRC1 (polycomb repressive complex 1) [5].

Уже в самых первых работах была показана роль MALAT1 в развитии метастазов опухолей легкого человека [59, 62]. В дальнейшем была продемонстрирована роль aberrантной экспрессии MALAT1 во многих видах опухолей, включая рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, нейробластому, остеосаркому, рак яичников, рак простаты, аденому гипофиза, миеломную болезнь и рак почки [20].

Все вышеперечисленное делает MALAT1 перспективной мишенью для терапии различных опухолей с целью предотвращения их метастазирования. В работе Gutschner и соавт. была исследована модель метастазирования клеток опухоли легкого человека у мыши *in vivo*. Для этого мышам прививали подкожно первичную опухоль, состоящую из клеток человека EBC-1. После чего делили животных на 2 группы: одной группе подкожно вводили антисмысловый олигонуклеотид против MALAT1, а второй — контрольный АСО. В результате было показано, что размер первичной опухоли не отличался в двух группах, тогда как количество и размер метастазов в легкие были меньше в группе мышей с введенным АСО к MALAT1. Исходя из результатов эксперимента, авторы делают вывод, что нокдаун MALAT1 в опухоли может быть эффективным для предотвращения метастазирования опухоли [60].

#### днРНК BACE1-AS в развитии болезни Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера — наиболее частая форма возрастной деменции; нейродегенеративное заболевание, проявляющееся в виде нарушений памяти, речи и когнитивных способностей. В основе заболевания лежит гибель нейронов в результате внеклеточного накопления  $\beta$ -амилоидных бляшек, повреждающих клетки [63]. Ведущую роль в формировании амилоидных бляшек играет белок BACE1 ( $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1). Данный белок является  $\beta$ -секретазой и расщепляет белок-предшественник APP до  $\beta$ -амилоида, образующего бляшки [64].

BACE1-AS — некодирующая РНК длиной около 2 тыс. оснований, транскрибируемая с противоположной цепи локуса BACE1 (11q23.3). Данная днРНК содержит участок длиной 106 нуклеотидов, полностью комплементарный эк-

зону 6 мРНК BACE1. Faghghi и соавт. исследовали участие BACE1-AS в патогенезе болезни Альцгеймера, наблюдая за экспрессией BACE1 [13]. Специфический нокдаун BACE1-AS в клеточной линии нейроblastомы человека (SH-SY-5Y) приводил к значительному снижению уровня не только самой BACE1-AS, но и ее антисмыслового партнера BACE1, а также белка  $\beta$ -секретазы. С другой стороны, увеличение экспрессии BACE1-AS сопровождалось увеличением уровня BACE1 как на уровне РНК, так и на уровне белка. Кроме того, исследователи показали, что BACE1 и BACE1-AS формируют РНК-РНК-дуплекс, образование которого приводит к увеличению стабильности мРНК BACE1. При этом различные стрессовые воздействия на клетки, в том числе и их обработка амилоидными бляшками, приводят к совместному повышению уровня экспрессии BACE1 и BACE1-AS.

Полученные данные также подтверждает тот факт, что у пациентов с болезнью Альцгеймера уровень экспрессии BACE1-AS в пораженных областях мозга в 2–6 раз выше, чем в контрольных образцах. Таким образом, при болезни Альцгеймера различные клеточные стрессы приводят к повышению экспрессии днРНК BACE1-AS, которая образует дуплекс с мРНК BACE1, тем самым повышая ее стабильность. В результате растет содержание  $\beta$ -секретазы и происходит накопление амилоидных бляшек, что, в свою очередь, еще больше повышает уровень экспрессии BACE1-AS, замыкая порочный круг.

Основываясь на предыдущем исследовании, авторы выдвинули гипотезу о возможности использования siRNA против BACE1-AS и BACE1 для терапии болезни Альцгеймера *in vivo* [65]. Для этого использовали трансгенных мышей Tg-19959, в клетках которых синтезировался человеческий мутантный белок APP. Животным была имплантирована осмотическая миниомпа в третий желудочек головного мозга и затем в течение 14 дней им вводили LNA-модифицированные siРНК против BACE1 и BACE1-AS отдельно и совместно. В результате все три варианта нокдауна привели к значительному снижению уровня BACE1, а самым эффективным подходом оказался нокдаун обоих транскриптов одновременно: уровень BACE1 снижался до 60 % от исходного уровня. Далее авторы исследовали влияние нокдауна BACE1-AS на уровень нерастворимого бета-амилоида *in vivo*. После 14-дневной инфузии siRNA против BACE1-AS в тканях гиппокампа был измерен уровень  $\beta$ -амилоида. Было показано, что использование siRNA против BACE1-AS приводит к значительному снижению содержания нерастворимого  $\beta$ -амилоида в тканях гиппокампа исследуемых мышей, тогда как уровень растворимого амилоида не изменялся. Faghghi и соавт. подчеркивают, что BACE1 и BACE1-AS могут быть полезны в качестве мишеней для терапии болезни Альцгеймера.

#### днРНК SMN-AS1 в развитии спинальной мышечной атрофии

Спинальная мышечная атрофия (СМА) — это аутоcомно-рецессивное наследственное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью нейронов передних рогов спинного мозга и проявляющееся симметричной мышечной слабостью и атрофией [66]. Причиной СМА является делеция или мутация в гене *SMN1* (Survival Motor Neuron 1) [67]. Известно, что у человека в результате дупликации гена *SMN1* образовался ген *SMN2*. Последовательность последнего практически идентична исходной последовательности, но содержит однонуклеотидную

замену в экзоне 7, из-за чего происходит нарушение сплайсинга пре-мРНК SMN2, а ее экзон 7 не включается в зрелую мРНК. Следствием этого является образование укороченного нестабильного белка, хотя при этом около 10–20 % пре-мРНК SMN2 сплайсируются правильно и в результате образуется зрелый белок, идентичный продукту гена SMN1 [68, 69].

У человека ген SMN2 расположен в нестабильной хромосомной области, которая часто подвергается процессам дуплицирования, делетирования и генной конверсии. Из-за этого количество копий гена SMN2 у людей может варьировать [70]. При этом больные СМА с большим числом копий SMN2 имеют более мягкую форму заболевания [71]. Для СМА I типа с 1–2 копиями гена SMN2 характерен наиболее ранний дебют и смерть в возрасте до 2 лет. При СМА III и IV типов в геноме присутствуют 3 или более копии гена SMN2, при этом болезнь характеризуется юношеским или взрослым дебютом и менее быстрым прогрессированием [72].

Таким образом, методы, направленные на повышение эндогенного содержания SMN2, могут привести к значительному улучшению состояния больных с СМА. Такой подход к терапии СМА был описан в работе Woo и соавт. [21]. Исследователи проанализировали общедоступные данные ChIP-seq (иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием) из проекта ENCODE и сделали вывод о том, что репрессивный комплекс PRC2 связывается с геномным локусом SMN2. Далее авторы проводили эксперименты на первичных клеточных культурах фибробластов больных СМА. Было показано, что нокадаун белков EZH1 и EZH2, входящих в состав комплекса PRC2, приводит к более чем двукратному увеличению содержания полноразмерной мРНК SMN с экзон 7.

Woo и соавт. также обнаружили ранее неисследованную днРНК, транскрибируемую с локуса SMN, которую они назвали SMN-AS1 (SMN-Antisense 1). Из-за высокой степени гомологии между локусами генов SMN1 и SMN2 авторы предположили, что SMN-AS1 транскрибируется с обоих локусов. И действительно, методом ОТ-ПЦП была установлена зависимость между уровнем экспрессии SMN-AS1 и количеством копий гена SMN2 в геноме. Кроме того, авторы показали, что SMN-AS1 способна привлекать в геномные локусы SMN комплекс PRC2, подавляющий транскрипцию генов, т. е. SMN-AS1 негативно регулирует уровень SMN-транскриптов.

Вышесказанное означает, что снижение активности SMN-AS1 можно использовать в качестве подхода для терапии СМА. В рассматриваемой работе авторы предложили метод, основанный не на модуляции уровня днРНК в клетке, а на блокировании ее взаимодействия с PRC2-комплексом. Этого достигали путем добавления LNA-модифицированных АСО, комплементарных участку связывания SMN-AS1 с PRC2. Введение таких LNA в первичные фибробласты больных СМА привело к увеличению содержания полноразмерного продукта гена SMN в 6 раз. А РНК-иммунопреципитация (RIP) подтвердила нарушение взаимодействия SMN-AS1 с белками PRC2-комплекса. При этом эффект применения LNA был специфичным и мало влиял на взаимодействие других днРНК с PRC2. К тому же было показано, что повышение содержания полноразмерного SMN зависело от концентрации LNA. Схожие результаты авторами были получены и на модели нейрональных клеток больных СМА.

Кроме того, Woo и соавт. исследовали эффект использования LNA против SMN-AS1 совместно с другими ранее

описанными АСО, корректирующими сплайсинг гена SMN2 [73]. В результате было установлено, что обработка клеток двумя антисмысловыми олигонуклеотидами приводит к двукратному увеличению содержания полноразмерной мРНК SMN2 по сравнению с использованием только корректора сплайсинга. Содержание функционального белка SMN при этом также увеличивалось. Таким образом, совмещая два подхода, можно получить максимальный терапевтический эффект.

#### *днРНК HTTAS в развитии болезни Гентингтона*

Болезнь Гентингтона — аутосомно-доминантное прогрессирующее нейродегенеративное заболевание с поздним началом, проявляющееся экстрапирамидными симптомами и когнитивными нарушениями [74]. Причиной данного заболевания является экспансия тринуклеотидного повтора CAG в гене гентингтина (HTT). В норме количество повторов варьирует от 9 до 36, увеличение числа повторов свыше 37 приводит к трансляции белка, содержащего длинный полиглутаминовый тракт. Такой белок является токсичным для клеток [75].

В работе Chung и соавт. была обнаружена новая днРНК HTTAS (huntingtin antisense), транскрибирующаяся с антисмысловой цепи геномного локуса HTT [28]. Было описано две изоформы HTTAS, из которых наибольший интерес представляет одна — HTTAS\_v1, т. к. ее первый экзон включает область экспансии CAG-повторов. В работе было продемонстрировано, что уровень экспрессии антисмыслового транскрипта зависит от длины CAG-повтора: чем больше число повторов, тем ниже уровень экспрессии. Эксперименты по нокадауну и увеличению уровня экспрессии HTTAS\_v1 в клеточных линиях человека HEK293 и SH-SY-5Y показали, что данный транскрипт негативно регулирует уровень мРНК гена HTT. Например, увеличение экспрессии HTTAS\_v1 при помощи генетической конструкции, содержащей промотор цитомегаловируса, приводит к снижению содержания HTT на 90 % вне зависимости от длины повтора, тогда как при нативном уровне экспрессии HTTAS\_v1 ее негативное влияние на HTT снижается при увеличении длины повтора. Таким образом, если в норме HTTAS сдерживает уровень экспрессии HTT, то при патологии этот механизм нарушается, что приводит к избыточному накоплению токсичного белка в клетках и возможному усугублению течения заболевания. В заключение авторы указывают, что повышение уровня HTTAS\_v1 можно в перспективе использовать в терапии болезни Гентингтона.

#### *днРНК UBE3A-ATS в развитии синдрома Ангельмана*

Синдром Ангельмана — заболевание, связанное с нарушением геномного импринтинга, характеризующееся умственной отсталостью, отсутствием речи, припадками и специфическим поведением [76]. Причиной развития данного синдрома в 60–70 % случаев является делеция участка 15q11-13 на материнской хромосоме. Другими, менее распространенными, причинами являются отцовская однопородительская дисомия (2–5 % случаев) и мутации в гене UBE3A (20 % случаев). Все эти механизмы приводят к отсутствию экспрессии гена UBE3A, кодирующего E3 убиквитин лигазу, которая в нейронах в норме экспрессируется только с материнской хромосомы.

UBE3A-ATS — длинная некодирующая РНК, транскрибирующаяся с антисмысловой цепи гена UBE3A. Было

показано, что у человека и мыши она является частью большого транскрипта, точка инициации транскрипции которого находится перед центром импринтинга на длинном плече хромосомы 15 [77]. В норме эта днРНК в нейронах экспрессируется только с отцовской хромосомы, тогда как транскрипция смыслового гена *UBE3A* с нее не происходит [78].

В работе Meng и соавт. был исследован механизм регуляции экспрессии мРНК *UBE3A* ее антисмысловым партнером днРНК *UBE3A-ATS* [46]. Используя мышиную модель синдрома Ангельмана, авторы показали, что делеция промотора *UBE3A-ATS* приводит к активации экспрессии *UBE3A* с отцовской хромосомы *in vivo*. Для подтверждения того, что процесс транскрипции *UBE3A-ATS* приводит к подавлению экспрессии *UBE3A*, были получены мыши, в геноме которых содержались сигналы преждевременной терминации транскрипции для *UBE3A-ATS* на отцовской хромосоме. Было обнаружено, что в нервных клетках, в которых не происходит транскрипции *UBE3A-ATS* с отцовской хромосомы, уровень экспрессии *UBE3A* увеличился. Так была показана роль некодирующей РНК *UBE3A-ATS* в подавлении экспрессии *UBE3A* на отцовской хромосоме. Следовательно, в случае делеции этого участка материнской хромосомы активация экспрессии *UBE3A* с отцовской хромосомы не приводит к развитию патологического фенотипа.

В 2015 г. той же группой исследователей была опубликована еще одна работа, в которой было предложено использовать подавление экспрессии *UBE3A-ATS* с помощью АСО для активации экспрессии *UBE3A* с отцовской хромосомы с целью терапии синдрома Ангельмана. Работу проводили на мышиную модель заболевания. Авторы получили культуру нейронов модельных животных и обработали ее АСО против *UBE3A-ATS*, что привело к повышению уровня экспрессии *UBE3A* до 66–90 % от уровня экспрессии этого гена в нейронах мышей дикого типа. Кроме того, авторы подтвердили специфичность использования АСО. Проведенная ими ПЦР с обратной транскрипцией показала, что уровень экспрессии соседних с *UBE3A* генов не изменился.

Также был проведен ряд экспериментов *in vivo*, в которых АСО против *UBE3A-ATS* однократно вводили в латеральный желудочек головного мозга взрослым модельным мышам. Животные хорошо перенесли инъекции. Через месяц у мышей не наблюдали существенных изменений в массе тела, гибели нервных клеток или повышенного образования глиальной ткани. При этом через 4 нед. после введения АСО наблюдали значительное снижение уровня *UBE3A-ATS* — на 60–70 %, а уровень экспрессии *UBE3A* при этом увеличивался в 2–5 раз в различных областях головного и спинного мозга. После однократной инъекции АСО сниженный уровень экспрессии *UBE3A-ATS* наблюдали в течение 16 нед., после чего он восстанавливался до исходного значения к 20 нед. Аналогичные данные были получены и для *UBE3A*. Кроме того, анализ фенотипа показал, что введение АСО модельным мышам приводило к смягчению когнитивных и других фенотипических нарушений, ассоциированных с заболеванием [22].

*днРНК DBE-T в развитии лице-лопаточно-плечевой миодистрофии Ландузи–Дежерина 1 типа*

Лице-лопаточно-плечевая миодистрофия Ландузи–Дежерина 1 типа (МЛД1) — аутосомно-доминантная мышечная дистрофия, для которой характерна прогрессирующая

потеря мышечной силы в мышцах лица и пояса верхних конечностей [79]. Причиной заболевания является делеция в хромосомном регионе 4q35, в котором у здоровых людей находится от 11 до 110 копий макросателлитного повтора D4Z4 длиной 3,3 тыс. пар нуклеотидов. При снижении количества повторов меньше 11 развивается заболевание [23]. При наличии большого числа копий повторов D4Z4 данный геномный локус находится в состоянии гетерохроматина и в нем не происходит транскрипция. В поддержании статуса гетерохроматина локуса 4q35 играет роль репрессивный комплекс PRC2, обладающий метилтрансферазной активностью в отношении гистона H3 (H3K27me3). У пациентов с МЛД1 при снижении количества повторов происходит снижение уровня метилирования H3K27me3 и дерепрессия транскрипции генов из 4q35-области, одним из которых является ген *DUX4* [80, 81]. Белок *DUX4* является транскрипционным фактором, и его aberrантная экспрессия при МЛД1 является токсичной для клеток [82].

В работе Cabianca и соавт. было установлено, что в мышцах больных МЛД1 в локусе D4Z4 происходит транскрипция днРНК DBE-T (D4Z4 Binding Element-Transcript). При этом у здоровых людей экспрессия данного транскрипта отсутствует. Это связано с тем, что при наличии большого количества повторов D4Z4 происходит активное связывание белков PcG (Polycomb Group) в каждом повторе, что приводит к подавлению транскрипции в данном локусе. В случае уменьшения числа повторов D4Z4 не происходит связывание PcG белков с ДНК, и активируется транскрипция DBE-T. Используя методы иммунопреципитации хроматина (ChIP-qPCR) и РНК (RIP), исследователи установили, что некодирующая РНК DBE-T способна напрямую связываться с белком ASH1L и привлекать его в локус D4Z4. Белок ASH1L входит в состав комплекса TrxG, активность которого приводит к дерепрессии транскрипции в локусе 4q35, в результате чего активируется экспрессия белка *DUX4*, токсичного для мышечных клеток [9].

Известно, что в развитии МЛД1 играет роль не только *DUX4*, но и другие гены, расположенные в локусе 4q35, например *FRG1* (Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) region gene 1) [80]. Поэтому в предыдущих работах по созданию подходов к терапии МЛД1 Wallace и соавт. предложили использовать аденоассоциированную вирусную доставку микроРНК к гену *FRG1* [83]. Однако ясно, что патогенез МЛД1 является сложным процессом, в который вовлечены несколько генов из локуса D4Z4. При этом экспрессия днРНК DBE-T является триггером, запускающим их экспрессию, поэтому можно предположить, что подавление экспрессии днРНК DBE-T является наиболее перспективным подходом к терапии МЛД1 [9], хотя работы по этой теме пока не опубликованы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До недавнего времени считалось, что белки являются единственным конечным продуктом реализации генетической информации. Поэтому и проводившиеся исследования патогенеза заболеваний, и разработка подходов к их лечению были направлены в сторону белок-кодирующих генов. Однако с помощью современных методов анализа был выявлен целый мир длинных некодирующих транскриптов, которые по своему числу и разнообразию не уступают белковому миру. Всестороннее изучение функций днРНК только началось. Но уже ясно, что они вовлечены, по-видимому, в большинство клеточных процессов,

а также участвуют в патогенезе многих заболеваний. При этом оказалось, что для днРНК можно применять ранее разработанные молекулярно-биологические подходы к генной терапии. Залогом успеха для разработок в этом

направлении является глубокое и детальное исследование функций днРНК как в норме, так и при патологии. Это лишний раз демонстрирует важность фундаментальной науки, являющейся базой прикладных исследований.

## Литература

- Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, Diekhans M, Kokocinski E et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* 2012 Sep; 22 (9): 1760–74. DOI: 10.1101/gr.135350.111.
- Kornienko AE, Dotter CP, Guenzl PM, Gisslinger H, Gisslinger B, Cleary C et al. Long non-coding RNAs display higher natural expression variation than protein-coding genes in healthy humans. *Genome Biol.* 2016 Jan 29; 17: 14. DOI: 10.1186/s13059-016-0873-8.
- Leucci E, Vendramin R, Spinazzi M, Laurette P, Fiers M, Wouters J et al. Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature.* 2016 Mar 24; 531 (7595): 518–22. DOI: 10.1038/nature17161.
- Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science.* 2008 Oct 31; 322 (5902): 750–6. DOI: 10.1126/science.1163045.
- Yang L, Lin C, Liu W, Zhang J, Ohgi KA, Grinstein JD et al. ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. *Cell.* 2011 Nov 11; 147 (4): 773–88.
- Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J et al. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell.* 2008 Oct 24; 32 (2): 232–46. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.08.022.
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 2007 Jun 29; 129 (7): 1311–23. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.022.
- Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science.* 2010 Aug 6; 329 (5992): 689–93. DOI: 10.1126/science.1192002.
- Cabianca DS, Casa V, Bodega B, Xynos A, Ginelli E, Tanaka Y et al. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. *Cell.* 2012 May 11; 149 (4): 819–31. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.035.
- Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell.* 2011 Oct 14; 147 (2): 358–69. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.028.
- Karreth FA, Tay Y, Perna D, Ala U, Tan SM, Rust AG et al. In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell.* 2011 Oct 14; 147 (2): 382–95. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.032.
- Yoon JH, Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Martindale JL, De S et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol Cell.* 2012 Aug 24; 47 (4): 648–55. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.06.027.
- Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med.* 2008 Jul; 14 (7): 723–30. DOI: 10.1038/nm1784.
- Gong C, Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature.* 2011 Feb 10; 470 (7333): 284–8. DOI: 10.1038/nature09701.
- Spector DL, Lamond AI. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Feb 1; 3 (2). pii: a000646. DOI: 10.1101/cshperspect.a000646.
- Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell.* 2010 Sep 24; 39 (6): 925–38. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.08.011.
- Engreitz JM, Sirokman K, McDonel P, Shishkin AA, Surka C, Russell P et al. RNA-RNA interactions enable specific targeting of noncoding RNAs to nascent Pre-mRNAs and chromatin sites. *Cell.* 2014 Sep 25; 159 (1): 188–99. DOI: 10.1016/j.cell.2014.08.018.
- Chen, Wang Z, Wang D, Qui C, Liu M, Chen X et al. LncRNADisease: a database for long-non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 1; 41 (Database issue): D983–6. DOI: 10.1093/nar/gks1099.
- Xing Z, Lin A, Li C, Liang K, Wang S, Liu Y et al. lncRNA directs cooperative epigenetic regulation downstream of chemokine signals. *Cell.* 2014 Nov 20; 159 (5): 1110–25. DOI: 10.1016/j.cell.2014.10.013.
- Yoshimoto R, Mayeda A, Yoshida M, Nakagawa S. MALAT1 long non-coding RNA in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jan; 1859 (1): 192–9. DOI: 10.1016/j.bbaggm.2015.09.012.
- Woo CJ, Maier VK, Davey R, Brennan J, Li G, Brothers J 2nd et al. Gene activation of SMN by selective disruption of lncRNA-mediated recruitment of PRC2 for the treatment of spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Feb 21; 114 (8): E1509–E1518. DOI: 10.1073/pnas.1616521114.
- Meng L, Ward AJ, Chun S, Bennett CF, Beaudet AL, Rigo F. Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA. *Nature.* 2015 Feb 19; 518 (7539): 409–12. DOI: 10.1038/nature13975.
- Zernov NV, Marakhonov AV, Vyakhireva JV, Guskova AA, Dadalia EL, Skoblov MY. Clinical and Genetic Characteristics and Diagnostic Features of Landouzy–Dejerine Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Russian Journal of Genetics.* 2017; 53 (6): 640–50.
- Sun M, Liu XH, Wang KM, Nie FQ, Kong R, Yang JS et al. Downregulation of BRAF activated non-coding RNA is associated with poor prognosis for non-small cell lung cancer and promotes metastasis by affecting epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cancer.* 2014 Mar 21; 13: 68. DOI: 10.1186/1476-4598-13-68.
- Pickard MR, Williams GT. Regulation of apoptosis by long non-coding RNA GAS5 in breast cancer cells: implications for chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Jun; 145 (2): 359–70. DOI: 10.1007/s10549-014-2974-y.
- Mourtada-Maarabouni M, Pickard MR, Hedge VL, Farzaneh F, Williams GT. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene.* 2009 Jan 15; 28 (2): 195–208. DOI: 10.1038/onc.2008.373.
- Cao S, Liu W, Li F, Zhao W, Qin C. Decreased expression of lncRNA GAS5 predicts a poor prognosis in cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7 (10): 6776–83.
- Chung DW, Rudnicki DD, Yu L, Margolis RL. A natural antisense transcript at the Huntington's disease repeat locus regulates HTT expression. *Hum Mol Genet.* 2011 Sep 1; 20 (17): 3467–77. DOI: 10.1093/hmg/ddr263.
- Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res.* 2012; 1: 27. DOI: 10.4103/2277-9175.98152.
- Zhang F, Zhang L, Zhang C. Long noncoding RNAs and tumorigenesis: genetic associations, molecular mechanisms, and therapeutic strategies. *Tumour Biol.* 2016 Jan; 37 (1): 163–75. DOI: 10.1007/s13277-015-4445-4.
- Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 10; 1489 (1): 31–44.
- Rigo F, Seth PP, Bennett CF. Antisense oligonucleotide-based

- therapies for diseases caused by pre-mRNA processing defects. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 825: 303–52. DOI: 10.1007/978-1-4939-1221-6\_9.
33. Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc J.* 2016 Jul; 4 (7): 35–50.
  34. Klug A. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Q Rev Biophys.* 2010 Feb; 43 (1): 1–21. DOI: 10.1017/S003358351000089.
  35. Boch J, Bonas U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol.* 2010; 48: 419–36. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080508-081936.
  36. Nemudnyi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakian SM. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae.* 2014 Jul; 6 (3): 19–40.
  37. Boettcher M, McManus MT. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell.* 2015 May 21; 58 (4): 575–85. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.04.028.
  38. Schaefer KA, Wu WH, Colgan DF, Tsang SH, Bassuk AG, Mahajan VB. Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo. *Nat Methods.* 2017 May 30; 14 (6): 547–8. DOI: 10.1038/nmeth.4293.
  39. Iyer V, Shen B, Zhang W, Hodgkins A, Keane T, Huang X, et al. Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice. *Nat Methods.* 2015 Jun; 12 (6): 479. DOI: 10.1038/nmeth.3408.
  40. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triprenuclear zygotes. *Protein Cell.* 2015 May; 6 (5): 363–72. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5.
  41. Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, E PRI, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods.* 2015 Apr; 12 (4): 326–8. DOI: 10.1038/nmeth.3312.
  42. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell.* 2013 Jul 18; 154 (2): 442–51. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.044.
  43. Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu Y, Ho QH, Joung JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods.* 2013 Oct; 10 (10): 977–9. DOI: 10.1038/nmeth.2598.
  44. Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Khabadi AM, Polstein LR, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods.* 2013 Oct; 10 (10): 973–6. DOI: 10.1038/nmeth.2600.
  45. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell.* 2014 Oct 23; 159 (3): 647–61. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.029.
  46. Meng L, Person RE, Beaudet AL. Ube3a-ATS is an atypical RNA polymerase II transcript that represses the paternal expression of Ube3a. *Hum Mol Genet.* 2012 Jul 1; 21 (13): 3001–12. DOI: 10.1093/hmg/dds130.
  47. Goyal A, Myacheva K, Gross M, Klingenberg M, Duran Arque B, Diederichs S. Challenges of CRISPR/Cas9 applications for long non-coding RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2017 Feb 17; 45 (3): e12. DOI: 10.1093/nar/gkw883.
  48. Ma L, Chua MS, Andrisani O, So S. Epigenetics in hepatocellular carcinoma: an update and future therapy perspectives. *World J Gastroenterol.* 2014 Jan 14; 20 (2): 333–45. DOI: 10.3748/wjg.v20.i2.333.
  49. Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov.* 2011 Oct; 1 (5): 391–407. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-11-0209.
  50. Pedram Fatemi R, Salah-Uddin S, Modarresi F, Khoury N, Wahlestedt C, Faghihi MA. Screening for Small-Molecule Modulators of Long Noncoding RNA-Protein Interactions Using AlphaScreen. *J Biomol Screen.* 2015 Oct; 20 (9): 1132–41. DOI: 10.1177/1087057115594187.
  51. Fatima R, Akhade VS, Pal D, Rao SM. Long noncoding RNAs in development and cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. *Mol Cell Ther.* 2015; 3: 5. DOI: 10.1186/s40591-015-0042-6.
  52. Zhou X, Ren Y, Zhang J, Zhang C, Zhang K, Han L et al. HOTAIR is a therapeutic target in glioblastoma. *Oncotarget.* 2015 Apr 10; 6 (10): 8353–65. DOI: 10.18632/oncotarget.3229.
  53. Rubio-Rodríguez D, De Diego Blanco S, Perez M, Rubio-Terres C. Cost-Effectiveness of Drug Treatments for Advanced Melanoma: A Systematic Literature Review. *Pharmacoeconomics.* 2017 May 27. DOI: 10.1007/s40273-017-0517-1.
  54. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2017 [Интернет]. Atlanta, Georgia: American Cancer Society; 2017 [процитировано: июнь 2017 г.]. Доступно по ссылке: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>
  55. Godinho M, Meijer D, Setyono-Han B, Dorssers LC, van Aghthoven T. Characterization of BCAR4, a novel oncogene causing endocrine resistance in human breast cancer cells. *J Cell Physiol.* 2011 Jul; 226 (7): 1741–9. DOI: 10.1002/jcp.22503.
  56. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature.* 2010 Apr 15; 464 (7291): 1071–6. DOI: 10.1038/nature08975.
  57. Yu X, Li Z. Long non-coding RNA HOTAIR: A novel oncogene (Review). *Mol Med Rep.* 2015 Oct; 12 (4): 5611–8. DOI: 10.3892/mmr.2015.4161.
  58. Li D, Feng J, Wu T, Wang Y, Sun Y, Ren J, et al. Long intergenic noncoding RNA HOTAIR is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2013 Jan; 182 (1): 64–70. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.08.042.
  59. Ji P, Diederichs S, Wang W, Boing S, Metzger R, Schneider PM, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene.* 2003 Sep 11; 22 (39): 8031–41. DOI: 10.1038/sj.onc.1206928.
  60. Gutschner T, Hammerle M, Eissmann M, Hsu J, Kim Y, Hung G et al. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res.* 2013 Feb 1; 73 (3): 1180–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2850.
  61. Nakagawa S, Ip JY, Shioi G, Tripathi V, Zong X, Hirose T et al. Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice. *RNA.* 2012 Aug; 18 (8): 1487–99. DOI: 10.1261/ma.033217.112.
  62. Tano K, Mizuno R, Okada T, Rakwal R, Shibato J, Masuo Y et al. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS letters.* 2010 Nov 19; 584 (22): 4575–80. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.10.008.
  63. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991 Oct; 12 (10): 383–8.
  64. St George-Hyslop P, Haass C. Regulatory RNA goes awry in Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2008 Jul; 14 (7): 711–2. DOI: 10.1038/nm0708-711.
  65. Modarresi F, Faghihi MA, Patel NS, Sahagan BG, Wahlestedt C, Lopez-Toledano MA. Knockdown of BACE1-AS Nonprotein-Coding Transcript Modulates Beta-Amyloid-Related Hippocampal Neurogenesis. *Int J Alzheimers Dis.* 2011; 2011: 929042. DOI: 10.4621/2011/929042.
  66. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat.* 2000; 15 (3): 228–37.
  67. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 1995 Jan 13; 80 (1): 155–65.
  68. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 May 25; 96 (11): 6307–11.
  69. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet.* 1999 Jul; 8 (7): 1177–83.
  70. Fang P, Li L, Zeng J, Zhou WJ, Wu WQ, Zhong ZY et al. Molecular characterization and copy number of SMN1, SMN2 and NAIP in Chinese patients with spinal muscular atrophy and unrelated healthy controls. *BMC musculoskelet Disord.* 2015 Feb 7; 16: 11.

- DOI: 10.1186/s12891-015-0457-x.
71. Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet.* 2002 Feb; 70 (2): 358–68. DOI: 10.1086/338627.
  72. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal Muscular Atrophy. *Neurol Clin.* 2015 Nov; 33 (4): 831–46. DOI: 10.1016/j.ncl.2015.07.004.
  73. Porensky PN, Burghes AH. Antisense oligonucleotides for the treatment of spinal muscular atrophy. *Hum Gene Ther.* 2013 May; 24 (5): 489–98. DOI: 10.1089/hum.2012.225.
  74. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet.* 2007 Jan 20; 369 (9557): 218–28. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60111-1.
  75. Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet.* 1993 Aug; 4 (4): 387–92.
  76. Petersen MB, Brøndum-Nielsen K, Hansen LK, Wulff K. Clinical, cytogenetic, and molecular diagnosis of Angelman syndrome: estimated prevalence rate in a Danish county. *Am J Med Genet.* 1995 Jun 19; 60 (3): 261–2.
  77. Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kieffmann M, Horsthemke B, Buiting K. The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet.* 2001 Nov 1; 10 (23): 2687–700.
  78. Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, et al. Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of Ube3a. *Hum Mol Genet.* 2003 Apr 15; 12 (8): 837–47.
  79. Вяхирева Ю. В., Зернов Н. В., Марахонов А. В., Гуськова А. А., Скоблов М. Ю. Современные подходы к лечению миодистрофий. *Медицинская генетика.* 2016; 15 (10): 3–16.
  80. Bodega B, Ramirez GD, Grasser F, Cheli S, Brunelli S, Mora M, et al. Remodeling of the chromatin structure of the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) locus and upregulation of FSHD-related gene 1 (FRG1) expression during human myogenic differentiation. *BMC biology.* 2009 Jul 16; 7: 41. DOI: 10.1186/1741-7007-7-41.
  81. Gabellini D, Green MR, Tupler R. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell.* 2002 Aug 9; 110 (3): 339–48.
  82. Kowaljow V, Marcowycz A, Anseu E, Conde CB, Sauvage S, Matteotti C, et al. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord.* 2007 Aug; 17 (8): 611–23. DOI: 10.1016/j.nmd.2007.04.002.
  83. Wallace LM, Garwick-Coppens SE, Tupler R, Harper SQ. RNA interference improves myopathic phenotypes in mice over-expressing FSHD region gene 1 (FRG1). *Mol Ther.* 2011 Nov; 19 (11): 2048–54. DOI: 10.1038/mt.2011.118.

## References

1. Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, Diekhans M, Kokocinski E et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* 2012 Sep; 22 (9): 1760–74. DOI: 10.1101/gr.135350.111.
2. Kornienko AE, Dotter CP, Guenzl PM, Gisslinger H, Gisslinger B, Cleary C et al. Long non-coding RNAs display higher natural expression variation than protein-coding genes in healthy humans. *Genome Biol.* 2016 Jan 29; 17: 14. DOI: 10.1186/s13059-016-0873-8.
3. Leucci E, Vendramin R, Spinazzi M, Laurette P, Fiers M, Wouters J et al. Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature.* 2016 Mar 24; 531 (7595): 518–22. DOI: 10.1038/nature17161.
4. Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science.* 2008 Oct 31; 322 (5902): 750–6. DOI: 10.1126/science.1163045.
5. Yang L, Lin C, Liu W, Zhang J, Ohgi KA, Grinstein JD et al. ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. *Cell.* 2011 Nov 11; 147 (4): 773–88.
6. Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J et al. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell.* 2008 Oct 24; 32 (2): 232–46. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.08.022.
7. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 2007 Jun 29; 129 (7): 1311–23. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.022.
8. Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science.* 2010 Aug 6; 329 (5992): 689–93. DOI: 10.1126/science.1192002.
9. Cabianca DS, Casa V, Bodega B, Xynos A, Ginelli E, Tanaka Y et al. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. *Cell.* 2012 May 11; 149 (4): 819–31. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.035.
10. Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell.* 2011 Oct 14; 147 (2): 358–69. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.028.
11. Karreth FA, Tay Y, Perna D, Ala U, Tan SM, Rust AG et al. In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell.* 2011 Oct 14; 147 (2): 382–95. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.032.
12. Yoon JH, Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Martindale JL, De S et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol Cell.* 2012 Aug 24; 47 (4): 648–55. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.06.027.
13. Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med.* 2008 Jul; 14 (7): 723–30. DOI: 10.1038/nm1784.
14. Gong C, Maquat LE. IncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature.* 2011 Feb 10; 470 (7333): 284–8. DOI: 10.1038/nature09701.
15. Spector DL, Lamond AI. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Feb 1; 3 (2). pii: a000646. DOI: 10.1101/cshperspect.a000646.
16. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell.* 2010 Sep 24; 39 (6): 925–38. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.08.011.
17. Engreitz JM, Sirokman K, McDonel P, Shishkin AA, Surka C, Russell P et al. RNA-RNA interactions enable specific targeting of noncoding RNAs to nascent Pre-mRNAs and chromatin sites. *Cell.* 2014 Sep 25; 159 (1): 188–99. DOI: 10.1016/j.cell.2014.08.018.
18. Chen, Wang Z, Wang D, Qui C, Liu M, Chen X et al. LncRNADisease: a database for long-non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 1; 41 (Database issue): D983–6. DOI: 10.1093/nar/gks1099.
19. Xing Z, Lin A, Li C, Liang K, Wang S, Liu Y et al. IncRNA directs cooperative epigenetic regulation downstream of chemokine signals. *Cell.* 2014 Nov 20; 159 (5): 1110–25. DOI: 10.1016/j.cell.2014.10.013.
20. Yoshimoto R, Mayeda A, Yoshida M, Nakagawa S. MALAT1 long non-coding RNA in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jan; 1859 (1): 192–9. DOI: 10.1016/j.bbaggm.2015.09.012.
21. Woo CJ, Maier VK, Davey R, Brennan J, Li G, Brothers J 2nd et al. Gene activation of SMN by selective disruption of lncRNA-mediated recruitment of PRC2 for the treatment of spinal

- muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Feb 21; 114 (8): E1509–E1518. DOI: 10.1073/pnas.1616521114.
22. Meng L, Ward AJ, Chun S, Bennett CF, Beaudet AL, Rigo F. Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA. *Nature*. 2015 Feb 19; 518 (7539): 409–12. DOI: 10.1038/nature13975.
  23. Zernov NV, Marakhonov AV, Vyakhireva JV, Guskova AA, Dadalia EL, Skoblov MY. Clinical and Genetic Characteristics and Diagnostic Features of Landouzy–Dejerine Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Russian Journal of Genetics*. 2017; 53 (6): 640–50.
  24. Sun M, Liu XH, Wang KM, Nie FQ, Kong R, Yang JS et al. Downregulation of BRAF activated non-coding RNA is associated with poor prognosis for non-small cell lung cancer and promotes metastasis by affecting epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cancer*. 2014 Mar 21; 13: 68. DOI: 10.1186/1476-4598-13-68.
  25. Pickard MR, Williams GT. Regulation of apoptosis by long non-coding RNA GAS5 in breast cancer cells: implications for chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Jun; 145 (2): 359–70. DOI: 10.1007/s10549-014-2974-y.
  26. Mourtada-Maarabouni M, Pickard MR, Hedge VL, Farzaneh F, Williams GT. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene*. 2009 Jan 15; 28 (2): 195–208. DOI:10.1038/onc.2008.373.
  27. Cao S, Liu W, Li F, Zhao W, Qin C. Decreased expression of lncRNA GAS5 predicts a poor prognosis in cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7 (10): 6776–83.
  28. Chung DW, Rudnicki DD, Yu L, Margolis RL. A natural antisense transcript at the Huntington's disease repeat locus regulates HTT expression. *Hum Mol Genet*. 2011 Sep 1; 20 (17): 3467–77. DOI: 10.1093/hmg/ddr263.
  29. Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res*. 2012; 1: 27. DOI: 10.4103/2277-9175.98152.
  30. Zhang F, Zhang L, Zhang C. Long noncoding RNAs and tumorigenesis: genetic associations, molecular mechanisms, and therapeutic strategies. *Tumour Biol*. 2016 Jan; 37 (1): 163–75. DOI: 10.1007/s13277-015-4445-4.
  31. Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Dec 10; 1489 (1): 31–44.
  32. Rigo F, Seth PP, Bennett CF. Antisense oligonucleotide-based therapies for diseases caused by pre-mRNA processing defects. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 825: 303–52. DOI: 10.1007/978-1-4939-1221-6\_9.
  33. Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc J*. 2016 Jul; 4 (7): 35–50.
  34. Klug A. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Q Rev Biophys*. 2010 Feb; 43 (1): 1–21. DOI: 10.1017/S003358351000089.
  35. Boch J, Bonas U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol*. 2010; 48: 419–36. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080508-081936.
  36. Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakian SM. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae*. 2014 Jul; 6 (3): 19–40.
  37. Boettcher M, McManus MT. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell*. 2015 May 21; 58 (4): 575–85. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.04.028.
  38. Schaefer KA, Wu WH, Colgan DF, Tsang SH, Bassuk AG, Mahajan VB. Unexpected mutations after CRISPR–Cas9 editing in vivo. *Nat Methods*. 2017 May 30; 14 (6): 547–8. DOI: 10.1038/nmeth.4293.
  39. Iyer V, Shen B, Zhang W, Hodgkins A, Keane T, Huang X, et al. Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice. *Nat Methods*. 2015 Jun; 12 (6): 479. DOI: 10.1038/nmeth.3408.
  40. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell*. 2015 May; 6 (5): 363–72. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5.
  41. Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, E PRI, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*. 2015 Apr; 12 (4): 326–8. DOI: 10.1038/nmeth.3312.
  42. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 2013 Jul 18; 154 (2): 442–51. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.044.
  43. Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu Y, Ho QH, Joung JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*. 2013 Oct; 10 (10): 977–9. DOI: 10.1038/nmeth.2598.
  44. Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods*. 2013 Oct; 10 (10): 973–6. DOI: 10.1038/nmeth.2600.
  45. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*. 2014 Oct 23; 159 (3): 647–61. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.029.
  46. Meng L, Person RE, Beaudet AL. Ube3a-ATS is an atypical RNA polymerase II transcript that represses the paternal expression of Ube3a. *Hum Mol Genet*. 2012 Jul 1; 21 (13): 3001–12. DOI: 10.1093/hmg/dds130.
  47. Goyal A, Myacheva K, Gross M, Klingenberg M, Duran Arque B, Diederichs S. Challenges of CRISPR/Cas9 applications for long non-coding RNA genes. *Nucleic Acids Res*. 2017 Feb 17; 45 (3): e12. DOI: 10.1093/nar/gkw883.
  48. Ma L, Chua MS, Andrisani O, So S. Epigenetics in hepatocellular carcinoma: an update and future therapy perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014 Jan 14; 20 (2): 333–45. DOI: 10.3748/wjg.v20.i2.333.
  49. Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov*. 2011 Oct; 1 (5): 391–407. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-11-0209.
  50. Pedram Fatemi R, Salah-Uddin S, Modarresi F, Khoury N, Wahlestedt C, Faghihi MA. Screening for Small-Molecule Modulators of Long Noncoding RNA-Protein Interactions Using AlphaScreen. *J Biomol Screen*. 2015 Oct; 20 (9): 1132–41. DOI: 10.1177/1087057115594187.
  51. Fatima R, Akhade VS, Pal D, Rao SM. Long noncoding RNAs in development and cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. *Mol Cell Ther*. 2015; 3: 5. DOI: 10.1186/s40591-015-0042-6.
  52. Zhou X, Ren Y, Zhang J, Zhang C, Zhang K, Han L et al. HOTAIR is a therapeutic target in glioblastoma. *Oncotarget*. 2015 Apr 10; 6 (10): 8353–65. DOI: 10.18632/oncotarget.3229.
  53. Rubio-Rodriguez D, De Diego Blanco S, Perez M, Rubio-Terres C. Cost-Effectiveness of Drug Treatments for Advanced Melanoma: A Systematic Literature Review. *Pharmacoeconomics*. 2017 May 27. DOI: 10.1007/s40273-017-0517-1.
  54. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2017 [Internet]. Atlanta, Georgia: American Cancer Society; 2017 [cited 2017 Jun]. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>
  55. Godinho M, Meijer D, Setyono-Han B, Dorssers LC, van Agthoven T. Characterization of BCAR4, a novel oncogene causing endocrine resistance in human breast cancer cells. *J Cell Physiol*. 2011 Jul; 226 (7): 1741–9. DOI: 10.1002/jcp.22503.
  56. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. 2010 Apr 15; 464 (7291): 1071–6. DOI: 10.1038/nature08975.
  57. Yu X, Li Z. Long non-coding RNA HOTAIR: A novel oncogene (Review). *Mol Med Rep*. 2015 Oct; 12 (4): 5611–8. DOI: 10.3892/mmr.2015.4161.
  58. Li D, Feng J, Wu T, Wang Y, Sun Y, Ren J, et al. Long intergenic noncoding RNA HOTAIR is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2013 Jan; 182 (1): 64–70. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.08.042.
  59. Ji P, Diederichs S, Wang W, Boing S, Metzger R, Schneider PM, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2003 Sep 11; 22 (39): 8031–41. DOI: 10.1038/sj.onc.1206928.
  60. Gutschner T, Hammerle M, Eissmann M, Hsu J, Kim Y, Hung G et al. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the

- metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res.* 2013 Feb 1; 73 (3): 1180–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2850.
61. Nakagawa S, Ip JY, Shioi G, Tripathi V, Zong X, Hirose T et al. Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice. *RNA.* 2012 Aug; 18 (8): 1487–99. DOI: 10.1261/rna.033217.112.
  62. Tano K, Mizuno R, Okada T, Rakwal R, Shibato J, Masuo Y et al. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS letters.* 2010 Nov 19; 584 (22): 4575–80. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.10.008.
  63. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991 Oct; 12 (10): 383–8.
  64. St George-Hyslop P, Haass C. Regulatory RNA goes awry in Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2008 Jul; 14 (7): 711–2. DOI: 10.1038/nm0708-711.
  65. Modarresi F, Faghihi MA, Patel NS, Sahagan BG, Wahlestedt C, Lopez-Toledano MA. Knockdown of BACE1-AS Nonprotein-Coding Transcript Modulates Beta-Amyloid-Related Hippocampal Neurogenesis. *Int J Alzheimers Dis.* 2011; 2011: 929042. DOI: 10.4621/2011/929042.
  66. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat.* 2000; 15 (3): 228–37.
  67. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 1995 Jan 13; 80 (1): 155–65.
  68. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 May 25; 96 (11): 6307–11.
  69. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burgles AH et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet.* 1999 Jul; 8 (7): 1177–83.
  70. Fang P, Li L, Zeng J, Zhou WJ, Wu WQ, Zhong ZY et al. Molecular characterization and copy number of SMN1, SMN2 and NAIP in Chinese patients with spinal muscular atrophy and unrelated healthy controls. *BMC musculoskelet Disord.* 2015 Feb 7; 16: 11. DOI: 10.1186/s12891-015-0457-x.
  71. Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet.* 2002 Feb; 70 (2): 358–68. DOI: 10.1086/338627.
  72. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal Muscular Atrophy. *Neurol Clin.* 2015 Nov; 33 (4): 831–46. DOI: 10.1016/j.ncl.2015.07.004.
  73. Porensky PN, Burghes AH. Antisense oligonucleotides for the treatment of spinal muscular atrophy. *Hum Gene Ther.* 2013 May; 24 (5): 489–98. DOI: 10.1089/hum.2012.225.
  74. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet.* 2007 Jan 20; 369 (9557): 218–28. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60111-1.
  75. Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet.* 1993 Aug; 4 (4): 387–92.
  76. Petersen MB, Brøndum-Nielsen K, Hansen LK, Wulff K. Clinical, cytogenetic, and molecular diagnosis of Angelman syndrome: estimated prevalence rate in a Danish county. *Am J Med Genet.* 1995 Jun 19; 60 (3): 261–2.
  77. Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kieffmann M, Horsthemke B, Buiting K. The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet.* 2001 Nov 1; 10 (23): 2687–700.
  78. Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, et al. Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of Ube3a. *Hum Mol Genet.* 2003 Apr 15; 12 (8): 837–47.
  79. Vyakhireva JV, Zernov NV, Marakhonov AV, Guskova AA, Skoblov MYu. [Current approaches for treatment of muscular dystrophies]. *Meditinskaya genetika.* 2016; 15(10): 3–16. Russian.
  80. Bodega B, Ramirez GD, Grasser F, Cheli S, Brunelli S, Mora M, et al. Remodeling of the chromatin structure of the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) locus and upregulation of FSHD-related gene 1 (FRG1) expression during human myogenic differentiation. *BMC biology.* 2009 Jul 16; 7: 41. DOI: 10.1186/1741-7007-7-41.
  81. Gabellini D, Green MR, Tupler R. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell.* 2002 Aug 9; 110 (3): 339–48.
  82. Kowaljow V, Marcowycz A, Ansseau E, Conde CB, Sauvage S, Matteotti C, et al. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord.* 2007 Aug; 17 (8): 611–23. DOI: 10.1016/j.nmd.2007.04.002.
  83. Wallace LM, Garwick-Coppens SE, Tupler R, Harper SQ. RNA interference improves myopathic phenotypes in mice over-expressing FSHD region gene 1 (FRG1). *Mol Ther.* 2011 Nov; 19 (11): 2048–54. DOI: 10.1038/mt.2011.118.