

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК В  
ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ  
ЗАРАЖЕНИИ ВИРУСОМ ГРИППА И ОБРАБОТКЕ РНКАЗОЙ**

Байчурина И.А.<sup>1</sup>,

Маркелова М.И.<sup>1</sup>,

Шах Махмуд Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет", 420008,  
г. Казань, ул. Кремлевская, д.18

**A COMPARATIVE ANALYSIS OF miRNA EXPRESSION IN  
HUMAN LUNG EPITHELIAL CELLS DURING INFECTION WITH  
INFLUENZA VIRUS AND RNASE TREATMENT**

Baichurina I. A.<sup>a</sup>,

Markelova M. I.<sup>a</sup>,

Shah Mahmud R.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kazan (Volga region) Federal University, Kazan University, 420008, Kazan,  
Kremlyovskaya str., 18

**Резюме.** Вирус гриппа способен вызывать острую респираторную инфекцию, которая ежегодно затрагивает от 5% до 20% человеческой популяции. Распространение эпидемии вируса гриппа происходит за короткое время из-за высокого уровня контагиозности. Помимо этого, ежегодная циркуляция вируса среди домашнего скота и водоплавающих птиц увеличивает риск зоонозной передачи новых штаммов в человеческую популяцию, у которой ранее не был сформирован иммунитет. Кроме того, в прошлом появилось несколько пандемических штаммов с высокой вирулентностью, и постоянно присутствует угроза возникновения нового пандемического штамма. Идентификация физиологических и молекулярных аспектов гриппа А может помочь в разработке терапевтических подходов для снижения побочных эффектов, связанных с заболеванием, вызванным этим вирусом. Профиль РНК в клетках человека изменяется после воздействия вируса гриппа. В настоящее время ученые все чаще уделяют внимание исследованию молекул микроРНК, которые способны регулировать экспрессию генов. Таким образом, микроРНК способны играть решающую роль в широком спектре биологических процессов, и ранее было показано, что они являются важными эффекторами в сложных сетях взаимодействия хозяин-патоген. Изучение количественного и качественного состава микроРНК является важным инструментом для диагностики и лечения различных заболеваний на ранней стадии. Целью работы является анализ профиля микроРНК для изучения воздействия вируса гриппа А (H1N1) на эпителиальные клетки аденокарциномы легких человека. Фракция микроРНК была получена с помощью фенол-хлороформной экстракции и проанализирована с помощью высокопроизводительного секвенирования на платформе SOLiD 550xl wildfire и биоинформатических методов. В работе было исследовано 129 зрелых микроРНК из неинфицированных клеток, обработанных РНКазой *Bacillus pumilus* и клеток, инфицированных вирусом гриппа А (H1N1). Установлено, что в неинфицированных клетках, обработанных РНКазой, присутствует в 2 раза больше различных микроРНК, которые могут участвовать в подавлении канцерогенеза. Наибольшая экспрессия в клетках, инфицированных вирусом гриппа, наблюдается для miR-6884-

5p. Для клеток, обработанных РНКазой, наибольшая экспрессия наблюдается для miR-3923, практически в 400 раз больше, чем в клетках, зараженных вирусом гриппа. Мы предполагаем, что интактные вирусы или их внутриклеточные компоненты способны изменять клеточный метаболизм в сторону снижения устойчивости к процессам канцерогенеза.

**Ключевые слова:** микроРНК, клетки эукариот, вирус гриппа, рак, биомаркер, секвенирование

**Abstract.** The influenza virus is capable of causing an acute respiratory infection that affects 5% to 20% of the human population annually. The spread of the influenza virus epidemic occurs within a short period of time due to its high contagiousness. In addition, the annual circulation of the virus among livestock and waterfowl increases for new strains a risk of zoonotic transmission to human populations with unestablished yet immunity. In addition, several high virulence pandemic strains have emerged in the past, and the threat of a new pandemic strain is constantly present. The identification of the physiological and molecular aspects related to influenza A can help developing therapeutic approaches to lower side effects associated with the disease caused by this virus. The RNA profile in human cells changes after exposure to influenza virus. Currently, scientists have been increasingly paying attention to study of microRNAs capable of regulating gene expression. Thus, microRNAs may play a critical role in a wide range of biological processes and have been previously shown to be important effectors in multilayered host-pathogen interplay. The study of the quantitative and qualitative miRNA composition is an important tool for diagnosing and treating various diseases at an early stage. The aim of this work is to analyze the microRNA profile for investigating an effect of influenza A (H1N1) virus on human lung epithelial adenocarcinoma cells. The microRNA fraction was isolated by using phenol-chloroform extraction and analyzed with high-throughput sequencing on the SOLiD 550xl wildfire platform using bioinformatic methods. The study examined 129 mature microRNAs from uninfected cells treated with Bacillus pumilus RNase as well as cells infected with the influenza A (H1N1) virus. It was found that uninfected cells treated with RNase contained 2-fold more different microRNAs that can participate in suppressing carcinogenesis. The peak expression in influenza virus-infected cells is observed for miR-6884-5p. For cells treated with RNase, the peak expression is observed for miR-3923 that was higher by 400-fold than in cells infected with the influenza virus. We hypothesize that intact viruses or their intracellular components are able to alter cellular metabolism by skewing it to decreased resistance to carcinogenesis processes.

**Key words:** microRNA, eukaryotic cells, influenza virus, cancer, biomarker,

**Экспрессия микроРНК при гриппе H1N1**

**Expression of miRNA in H1N1 flu**

**10.15789/2220-7619-ACA-1454**

**sequencing**

## 1 Введение

2 Последние 20 лет малые некодирующие РНК (нкРНК) находятся в центре  
3 внимания многих исследований. Некодирующие РНК относятся к транскриптам,  
4 которые не подвергаются дальнейшей трансляции. В настоящее время роль  
5 малых нкРНК широко изучена при различных заболеваниях человека [23].

6 Анализ малых некодирующих РНК имеет большое значение, так как многие из  
7 них играют решающую роль в различных биологических процессах [6]. Одним из  
8 классов нкРНК является микроРНК – класс коротких консервативных 5' -  
9 фосфорилированных РНК, длина которых составляет 19-24 нуклеотида. Главной  
10 функцией микроРНК является посттранскрипционная регуляция экспрессии генов.  
11 Пострегуляция транскрипции мРНК играет важную роль для поддержания  
12 оптимального баланса белков в клетках, что необходимо для нормального  
13 функционирования организма [21].

14 Молекулы микроРНК рассматривают в качестве биомаркеров благодаря их  
15 стабильности и специфичности. Анализ микроРНК как биомаркера является  
16 неинвазивным, чувствительным и специфичным к заболеваниям, позволяет  
17 определить болезнь на ранних этапах, чувствителен к течению болезни и терапии [8].

18 На сегодняшний день нет полного понимания молекулярных механизмов  
19 запускаемых с помощью микроРНК в клетках, которые инфицированы вирусом  
20 гриппа А. Ранее в исследованиях были получены противоречивые результаты: с  
21 одной стороны, внутриклеточные микроРНК могут ингибировать репликацию  
22 вирусов, а с другой, у некоторых вирусов, включая IAV, появились механизмы,  
23 которые позволяют избегать ингибирующего действия микроРНК хозяина [30]. Lin и  
24 соавторы изучили механизм микроРНК индуцированной репрессии иммунного  
25 ответа, в реакции с белком вируса птичьего гриппа А (H9N2) [18]. МикроРНК  
26 miR-674 и miR-155 влияют на активацию дендритных клеток иммунной  
27 системы в ответ на белок вируса А (H9N2). Авторами установлено, что  
28 ингибирование miR-674 или miR-155 значительно повышало репликацию вируса  
29 H9N2. Избыточная экспрессия mi-R674 или miR-155 ингибировала репликацию  
30 вируса птичьего гриппа [18]. МикроРНК играют важную роль в регуляции

31 клеточного цикла (miR-34c, miR-138, miR-139b), отвечают за индукцию врожденного  
32 иммунитета (let-4f, miR-146b, miR-192, miR-223, miR-451), участвуют в развитии В и  
33 Т-лимфоцитов (miR-34c, miR-181a). Известно, что miR-323, miR-491, miR-654 и miR-  
34 let-7c могут подавлять экспрессию вирусных генов и ингибировать репликацию  
35 вируса H1N1 in vitro [22].

36 При раке часто нарушается экспрессия микроРНК. МикроРНК  
37 классифицируют как онкогенные (онкомикроРНК), которые способствуют развитию  
38 рака, а также как микроРНК - супрессоры опухоли, которые подавляют  
39 онкологический процесс. Некоторые микроРНК могут играть двойную роль и  
40 оказывать онкогенный или супрессирующий эффект на определенную опухоль [20].  
41 Было установлено, что miR-3923 может негативно регулировать экспрессию  
42 протоонкогена KRAS и соответствующих белков. Ингибирование miR-3923  
43 активирует онкогенный KRAS путь. При раке поджелудочной железы наблюдается  
44 снижение miR-3923. Сверхэкспрессия miR-3923 ингибирует рост опухоли и  
45 метастазы в печени in vivo. Известно, что экспрессия miR-3923 значительно  
46 снижается в тканях рака поджелудочной железы и рака молочной железы [16, 29].  
47 Сверхэкспрессия miR-3923 снижает инвазивную способность клеток рака [29]. Ранее  
48 было установлено, что РНКаза *B.pumilus* взаимодействует с эндогенным KRAS.  
49 После обработки РНКазой лейкозных клеток было отмечено увеличение экспрессии  
50 62 генов, связанных с апоптозом. РНКаза *B.pumilus* ингибировала пролиферацию  
51 RAS трансформированных фибробластов. Ильинская О.Н. и соавторы предположили,  
52 что апоптоз в опухолевых клетках может происходить вследствие взаимодействия  
53 между биназой и KRAS [10]. Изучение функций микроРНК в регуляции иммунитета  
54 при раке играет важную роль для последующего выяснения механизмов, которые  
55 приведут к открытию новых методов лечения онкологических заболеваний [11].

56 Ранее была выдвинута гипотеза о том, что иммунитет и иммунная память  
57 против антигенов, ассоциированных с опухолью, не появляются *de novo* на  
58 опухолевых клетках или предраковых областях, а образуются в более раннем  
59 возрасте в ответ на вирусные и другие инфекции [9]. Результаты нескольких  
60 крупных эпидемиологических исследований показали, что у лиц с фебрильными

61 детскими инфекциями в анамнезе снижался риск различных видов рака в течение  
62 жизни. Механизмы, лежащие в основе этой защитной функции, неизвестны [9]. В  
63 работе Kuznetsova и соавт. [14] было показано, что мыши, которые перенесли  
64 инфекции, вызванные двумя разными вирусами гриппа, лучше контролируют рост  
65 перевиваемых опухолей легких [14].

66 Актуальным направлением в противораковой терапии является разработка  
67 онколитических вирусов. Онколитические вирусы избирательно размножаются в  
68 опухолевой ткани и уничтожают её, не вызывая повреждения здоровых тканей [24]. В  
69 работе Кузнецовой И. и соавторов [14] был разработан онколитический вирус на  
70 основе аттенуированного вируса гриппа А (IAV). Авторы работы исследовали  
71 способность созданного онколитического вируса реплицироваться в опухолевых  
72 клетках и оказывать онколитический эффект *in vivo*. В результате внутриопухолевое  
73 применение сгенерированного вируса оказывало положительный терапевтический  
74 эффект [14]. Исследователи создают онколитические вирусы на основе  
75 аденовирусов, например, в работе [31]. Авторы ожидают, что синтезированный  
76 вирус, который получил название dl355 будет избирательно реплицироваться в  
77 раковых клетках. В исследовании был сделан вывод о том, что способность  
78 репликации в dl355 в раковых клетках заметно увеличена по сравнению с  
79 нормальными клетками [31].

80 Заболеваемость и смертность у детей, получающих терапию от рака, могут  
81 быть обусловлены гриппом [12]. У детей с онкологическими заболеваниями, которые  
82 заболели гриппом, по сравнению со здоровыми людьми, наблюдалось увеличение  
83 длительности и тяжести заболевания [5]. Несмотря на то, что заболевание гриппом у  
84 детей с раком явление редкое, оно требует повышенного внимания [26]. Грипп у  
85 онкобольных детей может приводить к респираторным осложнениям, в виде  
86 пневмоний, и сепсису. При наличии инфекции вируса гриппа могут возникать  
87 противопоказания к использованию противораковой терапии [26].

88 Биназа – это бактериальная экзогенная рибонуклеаза из бактерии *Bacillus*  
89 *pumilus*. Ранее было показано, что биназа обладает противовирусной активностью  
90 и снижет титр вируса гриппа А (H1N1pdm09) в клетках линии A549 при



91 нетоксичных концентрациях [27]. Внеклеточные бактериальные рибонуклеазы, в том  
92 числе биназа, обладает противоопухолевой активностью при определенных  
93 концентрациях. Биназа обладает большим потенциалом в качестве и  
94 противоопухолевого, и противовирусного препарата [19].

95 Целью работы является изучение профиля микроРНК при воздействии вируса  
96 гриппа А (H1N1) или РНКазы на эпителиальные клетки легких человека с диагнозом  
97 аденокарцинома.

98

### 99 **Материалы и методы**

100 *Подготовка клеточной культуры.* В работе были использованы эпителиальные  
101 клетки легких человека с диагнозом аденокарцинома легких линии A549.  
102 Использовали клетки, которые заражали пандемическим вирусом гриппа  
103 A/Humburg/04/09 (H1N1pdm) (Av) и неинфицированные клетки, обработанные  
104 противовирусным препаратом РНКазой (Ad). Заражение проводили после  
105 двукратного отмывания клеток фосфатным буфером (Sigma Aldrich, США)  
106 содержащим 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,9mM CaCl<sub>2</sub>, 100 Ед/мл пенициллина и 0,1мг/мл  
107 стрептомицина. Добавляли 0,5 мл суспензии с вирусом на клетки с последующим  
108 инкубированием в темноте при комнатной температуре. Через час суспензию с  
109 вирусом гриппа удаляли с добавлением свежей среды [25]. Обработанные  
110 РНКазой и зараженные вирусом гриппа клетки выращивали в 6-ти луночном  
111 планшете, содержащем среду Игла с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки  
112 (РАА, Австрия), 100 Ед/мл пенициллина и 0,1мг/мл стрептомицина (P/S) (Gibco,  
113 США). Клетки инкубировали в течение 12 часов при температуре 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и  
114 95% атмосферы.

115 *Выделение тотальной РНК.* Тотальную РНК из клеток выделяли с помощью  
116 реагента TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, США), клетки в количестве 10<sup>6</sup>  
117 растворяли в 1 мл реагента. Затем выделяли тотальную РНК по методу  
118 Хомчинского [7] в соответствии с инструкцией производителя TRIzol Reagent. В  
119 пробирку, содержащую тотальную РНК клеток, добавляли по 50 мкл воды без  
120 РНКаз (Life Technologies, США) [1].

121 *Выделение микроРНК из фракции тотальной РНК.* Для выделения малых  
122 РНК из тотальной РНК клеток, использовали магнитные частицы Agencourt  
123 AMPure XP Reagent beads (Beckman Coulter, США). В пробирку добавили  
124 образец тотальной РНК и инкубировали при 70 °С в течение 2 минут. Затем  
125 добавили 0,5 объема магнитных частиц в горячий образец. Устанавливали  
126 пробирку в магнитный штатив, переносили прозрачный раствор в новую  
127 пробирку. Далее, очищали с помощью 0,5 мл изопропанола, центрифугировали в  
128 течение 30 мин при 4°С, 20000g. Аккуратно удаляли надосадочную жидкость,  
129 добавляли 1 мл свежеприготовленного 75% этанола и центрифугировали в течении  
130 60 мин, при 20000 g и 4 °С. Удаляли супернатант и оставили сушиться  
131 пробирки на столе с открытой крышкой в течение 15 минут, затем растворяли РНК  
132 в 50 мкл воды без РНКаз.

133 *Подготовка библиотеки для секвенирования.* Для приготовления библиотеки с  
134 последующим секвенированием использовали SOLiD Total RNA-Seq kit (Thermo  
135 Fisher Scientific, США) для приготовления библиотеки малых РНК. Провели  
136 реакции гибридизации и лигирования адаптеров, с выделенными матрицами  
137 микроРНК с помощью компонентов набора SOLiD Total RNA-Seq Kit. Осуществили  
138 реакцию обратной транскрипции со смесью после лигирования, используя  
139 компоненты набора для секвенирования. Проводили реакцию амплификации,  
140 используя компоненты набора SOLiD Total RNA-Seq Kit, чтобы увеличить  
141 количество кДНК и ДНК необходимого размера. Очищали полученную ДНК от  
142 ПЦР продуктов с помощью коммерческого набора PureLink PCR Purification Kit  
143 (Invitrogen, США) и проводили реакцию конверсии. Секвенирование выполняли на  
144 приборе SOLiD 5500xl wildfire next generation sequencer (Thermo FisherScientific,  
145 США).

146 *Анализ количества и состава фракций РНК в образцах.* Количественный  
147 анализ РНК, выделенной из эпителиальных клеток легких человека, проводили с  
148 помощью флуорометрического метода на приборе «Qubit 2.0» (ThermoFisher  
149 Scientific, США). Для анализа размера тотальной РНК использовали реагенты  
150 Agilent RNA 6000 Pico/Nano Kit (Agilent Technologies, США). Состав микроРНК

151 изучали с применением набора реагентов Agilent Small RNA Kit (Agilent  
152 Technologies, США). Для анализа качества, полученной библиотеки для  
153 секвенирования использовали Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent  
154 Technologies, США). Измерения проводили на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer  
155 (Agilent Technologies, США) по инструкции производителя.

156 *Биоинформатический и статистический анализ.* Полученные прочтения  
157 были картированы на референсную базу данных микроРНК miRBase v. 21 [13] с  
158 помощью программы Bowtie [15]. Подсчет количества картированных ридов на  
159 каждую микроРНК был произведен с помощью featureCounts [17],  
160 дифференциальная экспрессия считалась в среде R с помощью пакета DESeq[3].

161

## 162 **Результаты**

163 В работе была получена фракция микроРНК с помощью отбора по размерам с  
164 использованием магнитных частиц. Этот метод является эффективным для  
165 получения малых РНК (до 400 нуклеотидов) из внутриклеточной тотальной РНК  
166 (рис. 1).

167

168

### 169 **Рисунок № 1.**

170

171 На рисунке 2 показана фракция малых некодирующих РНК размером до 150  
172 нуклеотидов. В этот диапазон размеров входят различные классы малых РНК, в том  
173 числе и микроРНК.

174

### 175 **Рисунок № 2.**

176

### 177 **Рисунок № 3.**

178

### 179 **Рисунок № 4.**

180

181 В работе установлено, что в клетках, зараженных вирусом гриппа А (H1N1),  
182 наибольшую экспрессию, имеет miR-6884-5p (рис. 5). На сегодняшний день для miR-  
183 6884-5p мишени ещё не обнаружены, поэтому функции данной микроРНК остаются  
184 неизвестными.

185

186 **Рисунок № 5.**

187

188 **Рисунок № 6.**

189

190

## 191 Обсуждение

192 Известно, что в клетках до 30 % генов регулируются с помощью микроРНК [2].  
193 Можно выстроить цепь воздействия микроРНК на организм человека: организм  
194 реагирует на внешние изменения регуляцией экспрессии микроРНК, затем  
195 микроРНК воздействует на мРНК-мишень, которая участвует в трансляции  
196 белков, которые в свою очередь оказывают влияние на адаптацию организма к  
197 меняющимся условиям. В работе было обнаружено 62 и 67 зрелых микроРНК клеток  
198 после обработки препаратом и в клетках после заражения вирусом гриппа,  
199 соответственно. На рисунке 3 показано количественное распределение зрелых  
200 микроРНК, которые принимают участие в различных процессах в организме  
201 человека, данные получены с помощью баз данных «mirBase», «mirDB» и «NCBI».  
202 Наибольшую долю всех обнаруженных микроРНК занимают микроРНК, которые  
203 участвуют в канцерогенезе. На их долю приходится 29% и 22,4% в клетках,  
204 обработанных биназой и в клетках, инфицированных вирусом гриппа,  
205 соответственно (рис. 3).

206 Известно, что нарушения экспрессии микроРНК могут приводить к развитию  
207 онкологических заболеваний [21]. Было установлено, что количество разных зрелых  
208 микроРНК, которые функционируют как репрессоры канцерогенеза, в 2 раза  
209 увеличивается в неинфицированных клетках, обработанных препаратом по  
210 сравнению с вирус зараженными клетками (рис. 4). В клетках, зараженных вирусом

211 гриппа, увеличивается количество онкогенных микроРНК. Установлено, что эти  
212 микроРНК участвуют в развитии рака молочной железы и рака легких. Ранее было  
213 установлено [4,28], что в поджелудочной железе количество онкомаркеров  
214 снижается в связи с тем, что в поджелудочной железе присутствует панкреатическая  
215 рибонуклеаза, которая подавляет канцерогенез. В нашей работе рибонуклеаза  
216 бактериального происхождения, подавляя определенные микроРНК, репрессирует  
217 образование рака, однако механизм действия ещё предстоит изучить.

218 Наибольшая экспрессия в клетках, обработанных препаратом биназы,  
219 обнаружена для miR-3923 (рис. 6). У данной микроРНК (miR-3923) 215 мишеней, в  
220 том числе гены, которые отвечают за развитие аденокарциномы легкого, острого  
221 миелоидного лейкоза и колоректальной карциномы, также miR-3923 экспрессируется  
222 в инфицированных вирусом клетках. Количество miR-3923 в клетках, зараженных  
223 вирусом гриппа, практически в 400 раз меньше, чем в неинфицированных клетках,  
224 обработанных РНКазой. Из литературных данных [16,29] известно, что  
225 сверхэкспрессия miR-3923 ингибирует рост опухоли и метастазирование в  
226 различных типах рака. Так как наблюдалось снижение экспрессии микроРНК miR-  
227 3923, мы выдвигаем предположение, что клетки зараженные вирусом гриппа  
228 обладают меньшей устойчивостью к канцерогенезу.

## 229 Выводы

230 1 Установлено, что в клетках линии A549, зараженных вирусом гриппа,  
231 увеличивается количество микроРНК, мишенями которых могут выступать  
232 онкогенные белки. При обработке клеток аденокарциномы легких человека РНКазой  
233 количество микроРНК, мишенями которых являются мРНК с функцией подавления  
234 канцерогенеза, увеличивается.

235 2 В клетках, инфицированных вирусом гриппа А (H1N1), наибольшая экспрессия  
236 наблюдается для miR-6884-5p. В клетках, обработанных РНКазой, экспрессия  
237 микроРНК miR-3923 почти в 400 раз выше, чем в клетках, инфицированных вирусом  
238 гриппа, одной из мишеней данной микроРНК является белок, который участвует в  
239 сдерживании процессов канцерогенеза.

240

241 **Благодарность:** Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной  
242 Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в  
243 сфере научной деятельности 0671-2020-0058. Часть работы выполнена за счет  
244 средств Программы стратегического академического лидерства Казанского  
245 (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030). Исследование  
246 проводилось на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного  
247 пользования ресурсов Казанского федерального университета.

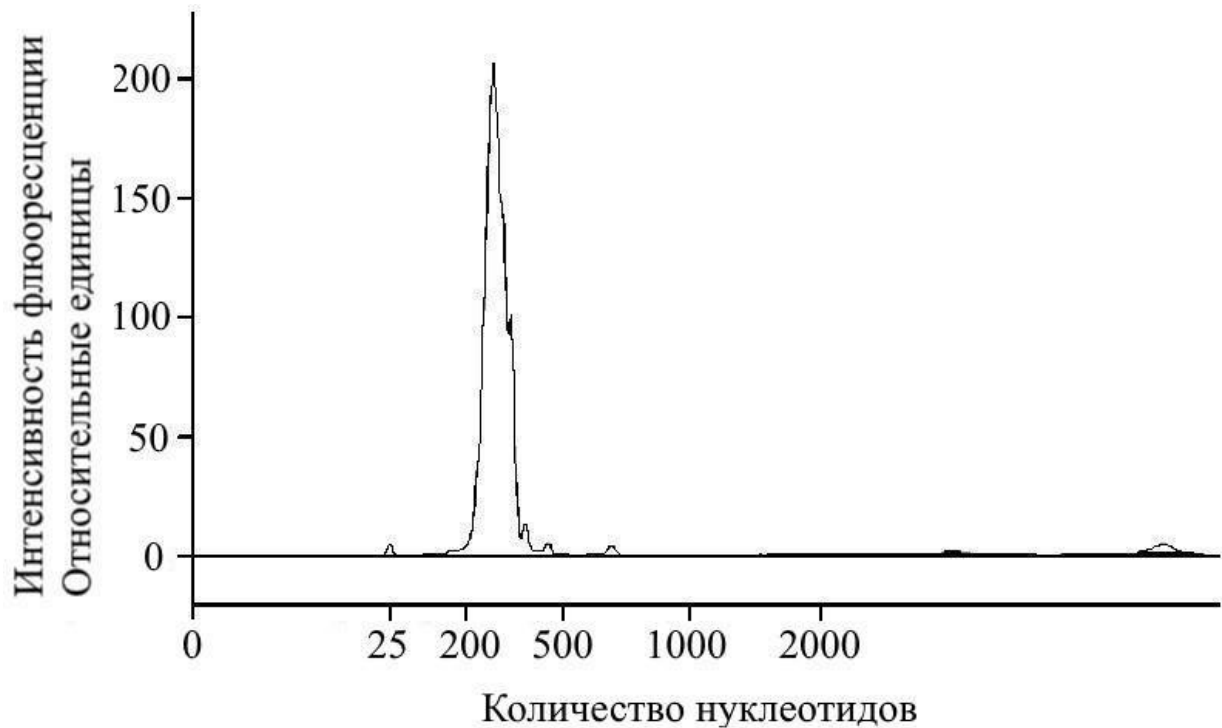
248 **Acknowledgement:** This work was funded by the subsidy allocated to Kazan Federal  
249 University for the state assignment in the sphere of scientific activities 0671-2020-0058.  
250 This paper has been supported by the Kazan Federal University Strategic Academic  
251 Leadership Program (PRIORITY-2030). The research was performed using the equipment  
252 of the Interdisciplinary Center for Shared Use of the Kazan Federal University

253

## РИСУНКИ

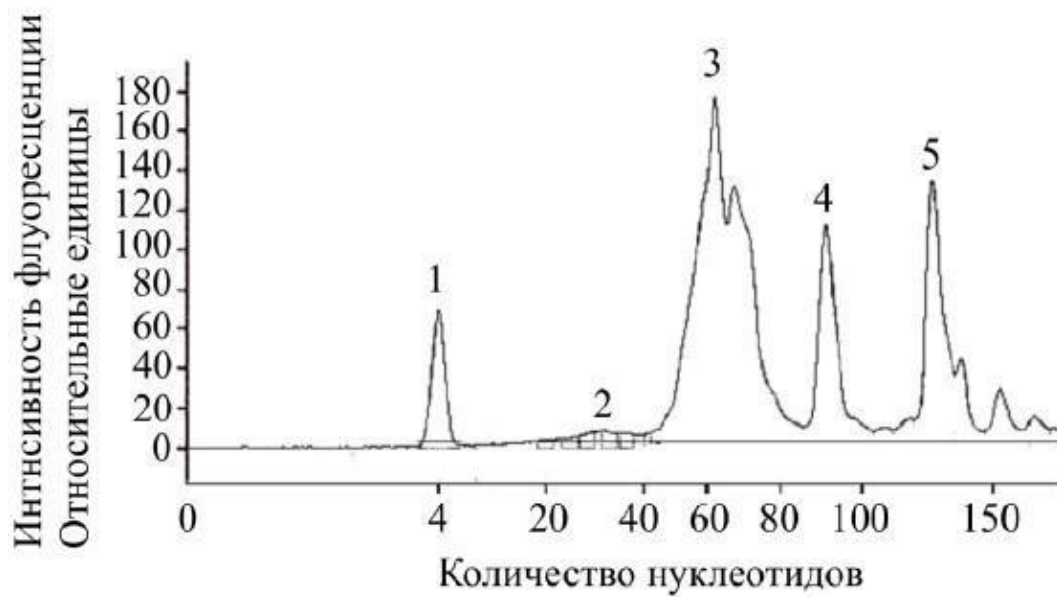
Рисунок\_1\_ Анализ размера РНК эпителиальных клеток легких человека, полученных с использованием магнитных частиц и последующей термообработкой

Figure\_1\_ RNA size analysis of human lung epithelial cells obtained by using magnetic particles and subsequent heat treatment



Рисунок\_2\_ Анализ размера выделенных малых РНК с использованием магнитных частиц с последующей термообработкой. 1 - маркер, 2 - микроРНК, 3 - тРНК, 4 - 5S рРНК, 5 – 5.8S рРНК

Figure\_2\_ Size analysis of isolated small RNAs by using magnetic particles followed by heat treatment. 1 – (size) marker, 2 - microRNA, 3 - tRNA, 4 - 5S rRNA, 5 - 5.8S rRNA





Рисунок\_3\_Количественное распределение различных видов микроРНК в организме человека. Клетки обработанные биназой (синий) и клетки, инфицированные вирусом (серый). (ССС -сердечно – сосудистая система)

Figure\_3\_The quantitative distribution of various types of miRNAs in the human body. Binase-treated cells (blue) and virus-infected cells (gray). (CCC - cardiovascular system)

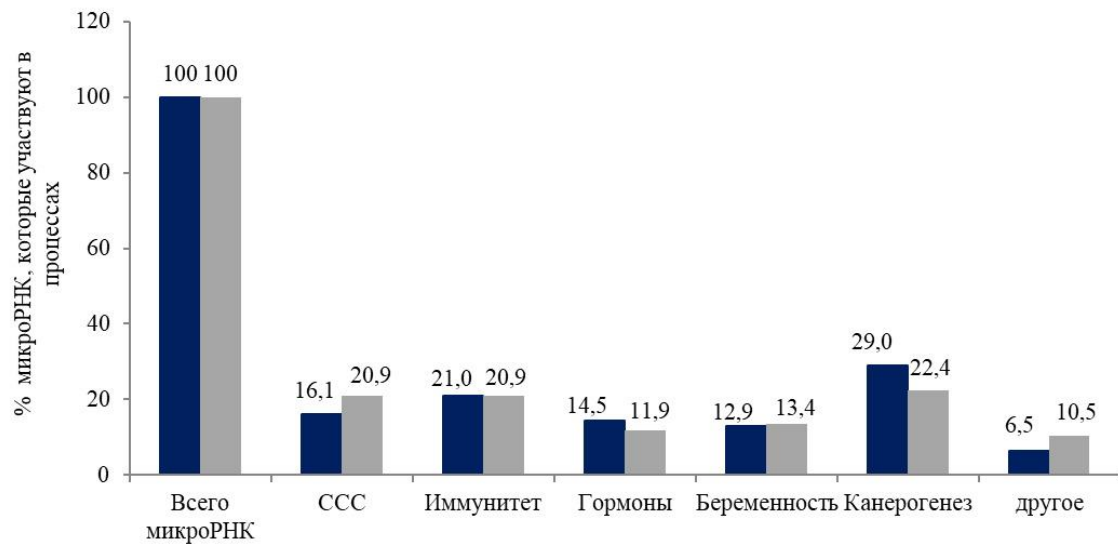


Рисунок \_4\_ Количественный анализ микроРНК, участвующих в канцерогенезе

Figure\_4\_ Quantitative analysis of microRNAs involved in carcinogenesis

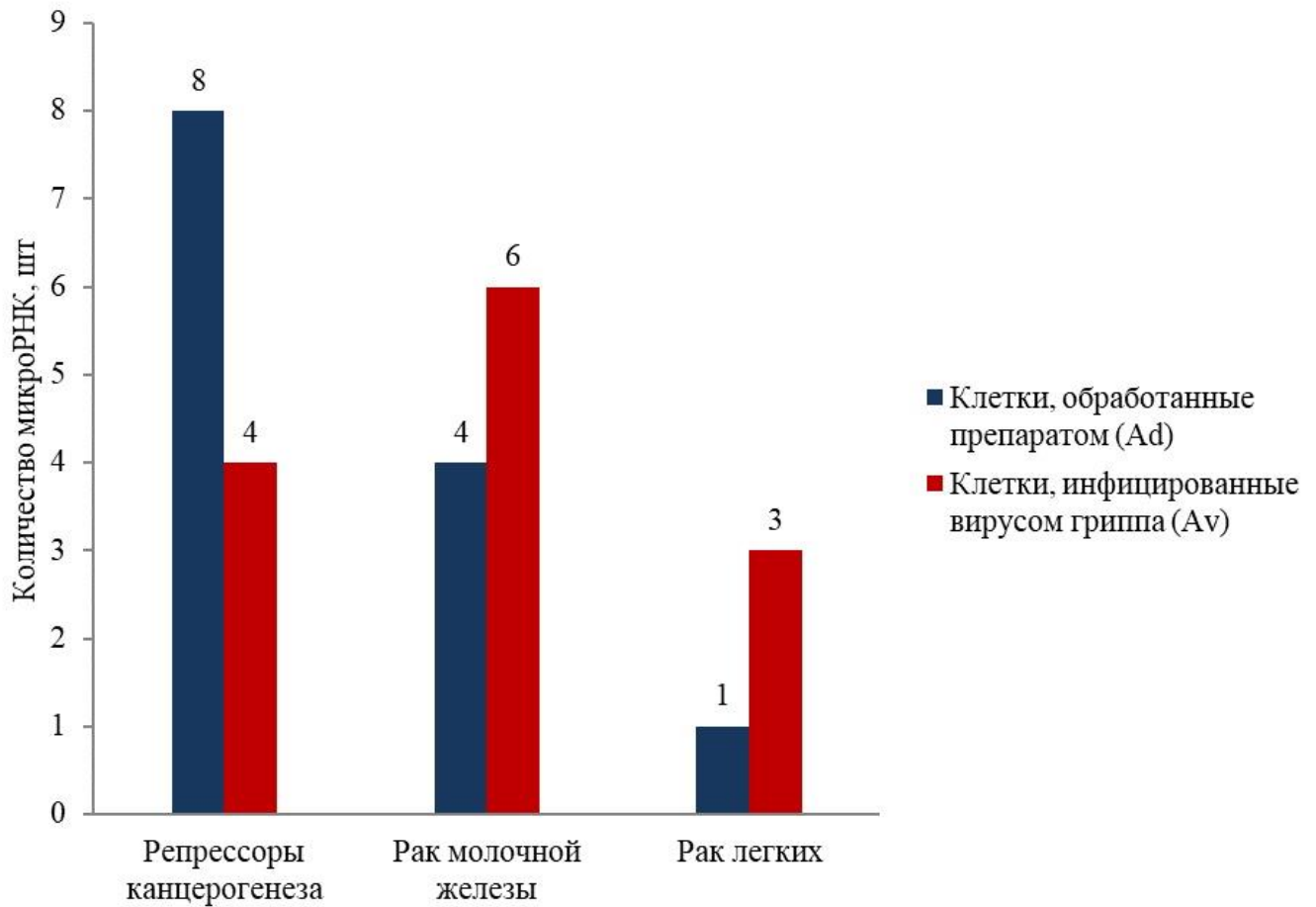
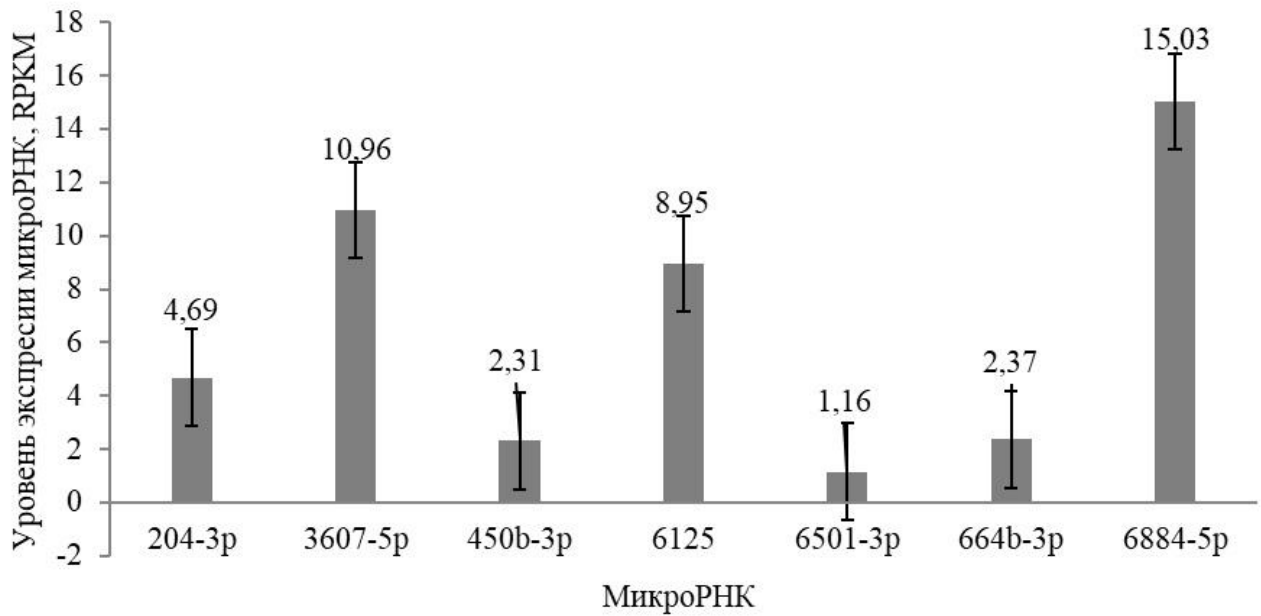


Рисунок \_5\_ Экспрессия различных микроРНК в клетках, зараженных вирусом гриппа

Figure\_5\_Expression of various miRNAs in cells infected with influenza virus



Рисунок\_6\_ Экспрессия miR-3923 в клетках, обработанных биназой и в клетках, зараженных вирусом

Figure\_6\_ The expression of miR-3923 in cells binase-treated and virus-infected cells



## МЕТАДАННЫЕ

Название статьи:

Сравнительный анализ экспрессии микроРНК в эпителиальных клетках легких человека при заражении вирусом гриппа и обработке РНКазой

Comparative analysis of miRNA expression in human lung epithelial cells upon infection with influenza virus and RNase treatment

### Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Байчурина Ирина Алексеевна,  
младший научный сотрудник НИЛ  
«Омиксные технологии»

ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский)  
федеральный университет", 420008, г.  
Казань, ул. Кремлевская, д.18

Почтовый адрес для переписки: Россия,  
Республика Татарстан, г. Казань, 420124,  
ул. Чистопольская 23 - 103

Телефон: 89503277039  
e-mail [letovaira1995@mail.ru](mailto:letovaira1995@mail.ru)

Baichurina Irina Alekseevna  
Junior Researcher laboratory  
«Omix Technologies»

Kazan (Volga region) Federal University,  
Kazan University, 420008, c. Kazan, st.  
Kremlevskaya, h.18

Mailing address for correspondence:  
Russia, Republic of Tatarstan, Kazan,  
420124, st. Chistopolskaya 23 - 103

phone number: 89503277039  
e-mail [letovaira1995@mail.ru](mailto:letovaira1995@mail.ru)

### Блок 2. Информация об авторах

Байчурина Ирина Алексеевна, младший  
научный сотрудник, e-mail:  
[letovaira1995@mail.ru](mailto:letovaira1995@mail.ru), ORCID 0000-  
0002-2608-8325

Маркелова Мария Ивановна, аспирант,  
научный сотрудник, e-mail:  
[mimarkelova@gmail.com](mailto:mimarkelova@gmail.com), ORCID 0000-  
0001-7445-2091

Шах Махмуд Раихан, кандидат  
биологических наук, научный сотрудник,  
e-mail [raihan.shah@kpfu.ru](mailto:raihan.shah@kpfu.ru),  
ORCID 0000- 0002-6543-688X

Baichurina Irina Alekseevna, Junior  
Researcher, e- mail:  
[letovaira1995@mail.ru](mailto:letovaira1995@mail.ru), ORCID 0000-  
0002-2608-8325

Markelova Maria Ivanovna, graduate  
student, Researcher, e-mail:  
[mimarkelova@gmail.com](mailto:mimarkelova@gmail.com), ORCID 0000-  
0001-7445-2091

Shah Mahmud Raihan, Ph.D. in Biology,  
Researcher, e-mail [raihan.shah@kpfu.ru](mailto:raihan.shah@kpfu.ru),  
ORCID 0000-0002-6543-688X

2) Байчурина И.А., Маркелова М.И., Шах Махмуд Р.

3) –

**Блок 3. Метаданные статьи**

1) Экспрессия микроРНК при гриппе H1N1; Expression of miRNA in H1N1 flu

2) Ключевые слова: микроРНК, клетки эукариот, вирус гриппа, рак, биомаркер, секвенирование

Key words: microRNA, eukaryotic cells, influenza virus, cancer, biomarker, sequencing

Количество страниц: 10

Количество рисунков: 6

Количество таблиц: 0

3) Оригинальная статья

4) Дата отправления работы: 10.04.2020

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или doi
1.	Летова И.А., Мадумаров С.А., Сыроева М.А., Шах Махмуд Р.З. Ускоренный и эффективный метод выделения микроРНК из плазмы крови человека // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019, т. 9, № 1, С. 53 – 59.	Letova I.A., Madumarov S.A., Sysoyeva M.A., Shah Mahmud R.Z. Accelerated and efficient method for isolating microRNA from human blood plasma. Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 53 – 59. (In Russian)	<a href="https://vuzbiochemi.elpub.ru/jour/article/view/173">https://vuzbiochemi.elpub.ru/jour/article/view/173</a>  [DOI:10.21285/2227-2925-2019-9-1-53-59]
2.	Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. Некодирующие РНК. Биохимия. 2007, т. 72, № 11. С.1427 – 1448.	Makarova Yu.A., Kramerov D.A. Non-coding RNA. Biochemia, 2007, vol. 72, no. 11, pp.1427 – 1448. (In Russian)	<a href="https://elibrary.ru/item.asp?id=9903293">https://elibrary.ru/item.asp?id=9903293</a>
3.	Anders S., Huber W. Differential expression of RNA-Seq data at the gene level—the DESeq package. Heidelberg, Germany: European Molecular Biology Laboratory (EMBL). 2012, vol. 10, pp. 1 -24.	-	<a href="https://www.genomatix.de/online_help/help_regionminer/DESeq_1.10.1.pdf">https://www.genomatix.de/online_help/help_regionminer/DESeq_1.10.1.pdf</a>
4.	Boudouresque F., Siret C., Dobric A., Silvy F., Soubeyran P., Iovanna J., Lombardo D., Berthois Y. Ribonuclease MCPiP1 contributes to the loss of micro-RNA-200 family members in pancreatic cancer cells. Oncotarget, 2018, vol. 9, no. 89, pp. 35941 - 35961.	-	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6267598/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6267598/</a>  [DOI:10.18632/oncotarget.26310]

Экспрессия микроРНК при гриппе H1N1

Expression of miRNA in H1N1 flu

5.	Carr SB., Adderson EE., Hakim H., Xiong XP., Yan XW., Caniza M. Clinical and Demographic Characteristics of Seasonal Influenza in Pediatric Patients With Cancer. PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL. 2012, vol. 31, no. 11, pp. 202 - 207.	-	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3473140/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3473140/</a>  [DOI:10.1097/INF.0b013e318267f7d9]
6.	Chen C. J., Heard E. Small RNAs derived from structural non-coding RNAs. Methods, 2013, vol. 63, no. 1, pp. 76-84.	-	<a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202313001424?casa_token=MZuEzMN0tM0AAAAA:NUGntQ7ONX7t0J9QMO_n_ZxmoKlK13xo8UomoBb2Kw1QsQyL9W4fVfIyATI7c96m2RKrbGydAoiM">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202313001424?casa_token=MZuEzMN0tM0AAAAA:NUGntQ7ONX7t0J9QMO_n_ZxmoKlK13xo8UomoBb2Kw1QsQyL9W4fVfIyATI7c96m2RKrbGydAoiM</a>  [DOI:10.1016/j.jymeth.2013.05.001]
7.	CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. SINGLE-STEP METHOD OF RNA ISOLATION BY ACID GUANIDINIUM THIOCYANATE PHENOL CHLOROFORM EXTRACTION. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1987, vol. 162, no. 1, pp. 156-159.	-	<a href="https://www.nature.com/articles/nprot.2006.83">https://www.nature.com/articles/nprot.2006.83</a>  [DOI: 10.1016/0003-2697(87)90021-2]
8.	Correia C. N., Nalpas N. C., McLoughlin K. E., Browne J. A., Gordon S. V., MacHugh D. E., Shaughnessy R. G. Circulating microRNAs as Potential Biomarkers of infectious Diseases. Frontiers in Immunology, 2017, vol. 8, no. 118, pp. 1 - 17.	-	<a href="https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00118/full">https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00118/full</a>  [DOI:10.3389/fimmu.2017.00118]



Экспрессия микроРНК при гриппе H1N1

Expression of miRNA in H1N1 flu

9.	Iheagwara U. K., Beatty P. L., Van P. T., Ross T. M., Minden J. S., Finn O. J. Influenza virus infection elicits protective antibodies and T cells specific for host cell antigens also expressed as tumor associated antigens: a new view of cancer immunosurveillance. <i>Cancer Immunol Res</i> , 2014, vol. 2, no. 3, pp. 263–273.	-	<a href="https://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/2/3/263.short">https://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/2/3/263.short</a>  [DOI:10.1158/2326-6066.CIR-13-0125.]
10.	Ilinskaya ON., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. Direct inhibition of oncogenic KRAS by <i>Bacillus pumilus</i> ribonuclease (binase). <i>Biochim Biophys Acta</i> , 2016, vol. 1863, pp. 1559-1567.	-	<a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488916300866">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488916300866</a>  [DOI:10.1016/j.bbamcr.2016.04.005.]
11.	Jadideslam G., Ansarin K., Sakhinia E., Babaloo Z., Abhari A., Ghahremanzadeh K., Khalili M., Radmehr R., Kabbazi A. Diagnostic Biomarker and Therapeutic Target Applications of miR-326 in Cancers: A Systematic Review. <i>Journal of Cellular Physiology</i> , 2019, vol. 234, no. 12, pp. 21560-21574.	-	<a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.28782?casa_token=a7hMzIFs8KMAAAA%3A_6Fe3hXFVfi6N08WPOmdlkgGLiLYIIkvuLL3N8R55CxrORz9PRQnPtDSFZmhdjxNdkSWZ0rc14TjxfwT">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.28782?casa_token=a7hMzIFs8KMAAAA%3A_6Fe3hXFVfi6N08WPOmdlkgGLiLYIIkvuLL3N8R55CxrORz9PRQnPtDSFZmhdjxNdkSWZ0rc14TjxfwT</a>  [DOI:10.1002/jcp.28782]
12.	Kotecha RS., Wadia UD., Jacoby P., Ryan AL., Blyth CC., Keil AD., Gottardo NG., Cole CH., Barr IG., Richmond PC. Immunogenicity and clinical effectiveness of the trivalent inactivated influenza vaccine in immunocompromised children undergoing treatment for cancer. <i>CANCER MEDICINE</i> , 2016,	-	<a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cam4.596">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cam4.596</a>  [DOI:10.1002/cam4.596]

Экспрессия микроРНК при гриппе H1N1

Expression of miRNA in H1N1 flu

	vol. 5, no. 2, pp. 285 – 293.		
13.	Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. <i>Nucleic acids research</i> , 2014. vol. 42, no. D1, pp. 68 - 73.	-	<a href="https://academic.oup.com/nar/article/42/D1/D68/1057911">https://academic.oup.com/nar/article/42/D1/D68/1057911</a>  [DOI:10.1093/nar/gkt1181]
14.	Kuznetsova I., Arnold T., Aschacher T., Schwager C., Hegedus B., Garay T., Stukova M., Pisareva M., Pleschka S., Bergmann M., Egorov A. Targeting an Oncolytic Influenza A Virus to Tumor Tissue by Elastase. <i>Molecular Therapy Oncolytics</i> , 2017, vol. 7, pp. 37 – 44.	-	<a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2372770517300359">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2372770517300359</a>  [DOI:10.1016/j.omto.2017.09.002]
15.	Langmead B. Aligning short sequencing reads with Bowtie. <i>Current protocols in bioinformatics</i> , 2010, vol. 32, no. 1, pp. 11.7. 1-11.7. 14.	-	<a href="https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471250953.bi1107s32">https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471250953.bi1107s32</a>  [DOI:10.1002/0471250953.bi1107s32 ]
16.	Li X., Deng SJ., Zhu S., Jin Y., Cui SP., Chen JY., Xiang C., Li QY., He C., Zhao SF., Chen HY., Niu Y., Liu Y., Deng SC., Wang CY., Zhao G. Hypoxia-induced lncRNA-NUTF2P3-001 contributes to tumorigenesis of pancreatic cancer by derepressing the miR-3923/KRAS pathway. <i>Oncotarget</i> , 2016, vol. 7, no. 5, pp. 6000-6014.	-	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4868736/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4868736/</a>  [DOI:10.18632/oncotarget.6830]

Экспрессия микроРНК при гриппе H1N1

Expression of miRNA in H1N1 flu

17.	Liao Y., Smyth G. K., Shi W. feature Counts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. <i>Bioinformatics</i> , 2014, vol. 30, no. 7, pp. 923-930.	-	<a href="https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/7/923/232889">https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/7/923/232889</a> [DOI:10.1093/bioinformatics/btt656]
18.	Lin J., Chen Y. T., Xia J., Yang Q. MiR674 Inhibits the Neuraminidase-Stimulated Immune Response on Dendritic Cells via Down-Regulated Mbnl3. <i>Oncotarget</i> , 2016, vol. 7, no. 31, pp. 48978-48994.	-	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5226485/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5226485/</a> [DOI:10.18632/oncotarget.9832.]
19.	Makeeva A., Rodriguez-Montesinos J., Zelenikhin P., Nesmelov A., Preissner KT., Cabrera-Fuentes HA., Ilinskaya ON. Antitumor Macrophage Response to <i>Bacillus pumilus</i> Ribonuclease (Binase). <i>Mediators of Inflammation</i> , 2017, vol. 2017, no. 4029641, pp. 1 – 11.	-	<a href="https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/4029641/">https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/4029641/</a> [DOI.10.1155/2017/4029641.]
20.	Monteleone N. J., Lutz C. S. miR- 708- 5p: A microRNA with emerging roles in cancer. <i>Oncotarget</i> , 2017, vol. 8, no. 41, pp. 71292–71316.	-	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5642637/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5642637/</a> [DOI: 10.18632/oncotarget.19772.]
21.	Ortiz-Quintero B. Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers. <i>Cell Proliferation</i> , 2016, vol. 49, no. 3, pp. 281-303.	-	<a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cpr.12262">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cpr.12262</a> [DOI: 10.1111/cpr.12262]

Экспрессия микроРНК при гриппе H1N1

Expression of miRNA in H1N1 flu

22.	Rivera A., Barr T., Rais M., Engelmann F., Messaoudi I. MicroRNAs Regulate Host Immune Response and Pathogenesis during Influenza Infection in Rhesus Macaques. <i>Viral Immunology</i> , 2016, vol. 29, no. 4, pp. 212 – 217.	-	<a href="https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vim.2015.0074">https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vim.2015.0074</a>  [DOI:10.1089/vim.2015.0074]
23.	Romano G., Veneziano D., Acunzo M., M Croce C. Small Non-Coding RNA and Cancer. <i>Carcinogenesis</i> , 2017, vol. 38, no. 5, pp. 485-491.	-	<a href="https://academic.oup.com/carcin/article/38/5/485/3760070">https://academic.oup.com/carcin/article/38/5/485/3760070</a>  [DOI:10.1093/carcin/bgx026]
24.	Russell S. J., Peng K.-W. Viruses as Anticancer Drugs. <i>Trends in pharmacological sciences</i> , 2007, vol. 28, no. 7, pp. 326-333.	-	<a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614707001241?casa_token=HZnaYP2ochkAAAAA:Z6TjGsJYvo6RVgE1cZRftbF4whXJUcnerSTBVIVhnnIAvEerZWB3eNtBL565jGITcgKIT4ukjvU">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614707001241?casa_token=HZnaYP2ochkAAAAA:Z6TjGsJYvo6RVgE1cZRftbF4whXJUcnerSTBVIVhnnIAvEerZWB3eNtBL565jGITcgKIT4ukjvU</a>  [DOI: 10.1016/j.tips.2007.05.005]
25.	Shah Mahmud R., Mostafa A., Müller C., Kanrai P., Ulyanova V., Sokurenko Y., Dzieciolowski J., Kuznetsova I., Ilinskaya O., Pleschka S. Bacterial ribonuclease binase exerts an intra-cellular anti-viral mode of action targeting viral RNAs in influenza a virus infected MDCK-II cells. <i>Virology Journal</i> , 2018, vol. 15, no. 5, pp.1 – 12.	-	<a href="https://link.springer.com/article/10.1186/s12985-017-0915-1">https://link.springer.com/article/10.1186/s12985-017-0915-1</a>  [DOI:10.1186/s12985-017-0915-1.]

Экспрессия микроРНК при гриппе H1N1

Expression of miRNA in H1N1 flu

26.	Tasian SK., Park JR., Martin ET., Englund JA. Influenza-associated morbidity in children with cancer. PEDIATRIC BLOOD & CANCER, 2008, vol. 50, no. 5, pp. 983 – 987.	-	<a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pbc.21472?casa_token=46DSLWnH8qMA AAAA%3AHZ9lvXt0AvAjmydeGh5sO8gSbFLNe5Sx3CuKEGbpObarMBCXBeCgD-Wc3KrgiwXTM2yebp82bDYLMMoJ">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pbc.21472?casa_token=46DSLWnH8qMA AAAA%3AHZ9lvXt0AvAjmydeGh5sO8gSbFLNe5Sx3CuKEGbpObarMBCXBeCgD-Wc3KrgiwXTM2yebp82bDYLMMoJ</a>  [DOI: 10.1002/pbc.21472]
27.	Ulyanova V., Shah Mahmud R., Dudkina E., Vershinina V., Domann E., Ilinskaya O. Phylogenetic distribution of extracellular guanyl-preferring ribonucleases renews taxonomic status of two Bacillus strains. The Journal of General and Applied Microbiology, 2016, vol. 62, no. 4, pp.181-188.	-	<a href="https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/62/4/62_2016.02.005/_article/-char/ja/">https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/62/4/62_2016.02.005/_article/-char/ja/</a>  [DOI:10.2323/jgam.2016.02.005]
28.	Vert A., Castro J., Ribó M., Benito A., Vilanova M. A nuclear-directed human pancreatic ribonuclease (PE5) targets the metabolic phenotype of cancer cells. Oncotarget, 2016, vol. 7, no. 14, pp. 18309 – 18324.	-	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4951290/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4951290/</a>  [DOI:10.18632/oncotarget.7579]
29.	Wang B., Li JD., Sun M., Sun LH., Zhang XY. MiRNA Expression in Breast Cancer Varies with Lymph Node Metastasis and Other Clinicopathologic Features. IUBMB LIFE, 2014, vol. 66, no. 5, pp.371 – 377.	-	<a href="https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iub.1273">https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iub.1273</a>  [DOI:10.1002/iub.1273]
30.	Wang R., Zhang Y.-Y., Lu J.-S., Xia B.-H., Yang Z.-X., Zh X.-D., Zhou X.-W., Huang P.-T. The highly	-	<a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full</a>

Экспрессия микроРНК при гриппе H1N1

Expression of miRNA in H1N1 flu

	pathogenic H5N1 influenza A virus down-regulated several cellular MicroRNAs which target viral genome. Journal Cell. Mol. Medicine, 2017, vol. 21, no. 11, pp.3076 – 3086.		<a href="https://doi.org/10.1111/jcmm.13219">/10.1111/jcmm.13219</a>  [DOI:10.1111/jcmm.13219.]
31.	Yanagawa-Matsuda A., Mikawa Y., Habiba U., Kitamura T., Yasuda M., Towfik-Alam M., Kitagawa Y., Minowa K., Shindoh M., Higashino F. Oncolytic potential of an E4-deficient adenovirus that can recognize the stabilization of AU-rich element containing mRNA in cancer cells. ONCOLOGY REPORTS, 2019, vol. 41, no. 2, pp. 954 - 960.	-	<a href="https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2018.6865">https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2018.6865</a>  [DOI:10.3892/or.2018.6865]