

РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ И ПАТОГЕНЕЗ ВИРУСА ГРИППА А

© А. Н. Горшков,^{1,2,*} А. В. Петрова,¹ А. В. Васин^{1,3}

¹ Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197376,

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

³ Кафедра молекулярной биологии С.-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251;

* электронный адрес: angorsh@yahoo.com

Явление РНК-интерференции было открыто в 90-е годы XX в. в исследованиях на нематоде *Caenorhabditis elegans*. Терминологически, изначально РНК-интерференция была определена как селективная деградация мРНК-транскрипта при появлении в клетках короткой интерферирующей РНК (киРНК) — короткой (20—25 п. н.) экзогенной двухнитевой РНК, комплементарной к его экзонным участкам. За прошедшие с того времени 2 десятилетия понятие РНК-интерференции приобрело значительно более широкое значение; она была осмыслена в качестве одного из важнейших и универсальных звеньев посттранскрипционной регуляции активности генов, широко распространенной среди всех групп эукариот, а также вирусов. Настоящий обзор включает в себя краткую характеристику различных механизмов антивирусной и провирусной РНК-интерференции; далее мы рассматриваем значение РНК-интерференции в биологии вируса гриппа А, а также возможности и трудности использования РНК-интерференции как новой терапевтической стратегии в борьбе с гриппом.

Ключевые слова: РНК-интерференция, вирус гриппа А, микроРНК, киРНК, интерфероновый ответ.

Принятые сокращения: ВГА — вирус гриппа А, ВГС — вирус гепатита С, ВИЧ — вирус иммунодефицита человека, ОРС — открытая рамка считывания, п. н. — пары нуклеотидов, ПТГС — посттранскрипционный генный сайленсинг, диРНК — двухнитевая РНК, киРНК — короткая интерферирующая РНК, кшРНК — короткая шпилечная РНК, мРНК — матричная РНК, ЭСК — эмбриональные стволовые клетки, рiРНК — Рiwi-взаимодействующая РНК, ргi-miRNA — первичный микроРНК-транскрипт, рге-miRNA — предшественник микроРНК, RdRp — РНК-зависимая РНК-полимераза, RISC — РНК-индуцированный комплекс сайленсинга, UTR — нетранслируемая область, MRE — микроРНК-узнающий элемент.

Вирус гриппа А (ВГА), регулярно вызывающий эпидемии и пандемии, является серьезной глобальной медицинской проблемой. При тяжелом течении болезни ВГА вызывает не только инфекцию респираторного тракта, но и системные нарушения, способные стать причиной смерти.

Используемые специфические анти-ВГА лекарственные средства направлены на блокирование функции двух вирусных белков — нейраминидазы (НА) и ионного канала М2. В первом случае используют осельтамивир и занамивир, во втором — ремантадин и амантадин. Однако к настоящему времени возникли штаммы ВГА, устойчивые к этим группам лекарств (Saladino et al., 2010; Jacob et al., 2016). Появление таких штаммов стимулирует поиск новых стратегий и лекарств, влияющих не на ингибирование вирусных белков, а на принципиально другие мишени.

Открытие биологического феномена РНК-интерференции (называемого также посттранскрипционным генным сайленсингом — ПТГС) обнаружило неизвестные ранее сложность и глубину взаимодействий вирусов и инфицированных ими клеток, вовлекающих микроРНК

клеток-хозяев, микроРНК вирусов, а также (в некоторых группах организмов) вирусные короткие интерферирующие РНК (киРНК). Идеи о перспективах терапевтического использования РНК-интерференции для подавления экспрессии «нежелательных» генов (мутантных генов, онкогенов и вирусных генов) возникли вскоре после ее открытия (Shuey et al., 2002; Coburn, Cullen, 2003). Потенциал РНК-интерференции в борьбе с ВГА активно исследуется в последнее десятилетие. Помимо сайленсинга генов ВГА экспериментально разрабатывается и ряд других антивирусных применений РНК-интерференции — киРНК-скрининг новых клеточных мишеней для терапии гриппа, создание аттенуированных вакцин нового поколения и терапевтическая компенсация дерегуляции клеточных микроРНК при инфекции ВГА.

Цель настоящего обзора — описание основных механизмов провирусной и антивирусной РНК-интерференции, а также анализ недавних публикаций, отражающих успехи и трудности использования РНК-интерференции как нового терапевтического подхода в борьбе с вирусом гриппа.

Жизненный цикл вируса гриппа А

ВГА является оболочечным вирусом из семейства Orthomyxoviridae. ВГА имеет сегментированный геном, состоящий из 8 сегментов РНК с отрицательной полярностью. Геном ВГА кодирует следующие вирусные белки: поверхностные гликопротеины гемагглютинин и нейраминидаза, ионный канал М2, матриксный белок М1, нуклеопротеин NP, полимеразный кислый белок PA, полимеразные основные белки 1 и 2 (PB1 и PB2 соответственно), белок PB1-F2 (характерный не для всех штаммов ВГА), неструктурный белок 1 (NS1) и 2 (NS2, называемый также белком ядерного экспорта, NEP).

Жизненный цикл ВГА в инфицированных клетках исследовали неоднократно (см. обзоры: Samji, 2009; Киселев, 2011; Щелканов и др., 2015). Кратко, начальная точка цикла — адсорбция вируса — опосредуется взаимодействием субъединицы HA1 гемагглютинина с остатками N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты, локализованными на поверхности клеток-мишеней. Особенности этого взаимодействия, прежде всего связывание HA1 с $\alpha 2$ —3- или $\alpha 2$ —6-сиалозидами, преимущественно определяют видоспецифичность, тропизм и в конечном итоге — эпидемический потенциал различных штаммов ВГА.

Проникновение вируса в клетку связано с процессом эндоцитоза. Известно, что эндоцитоз ВГА может быть как классическим клатринзависимым, так и клатриннезависимым (с участием кавеол либо посредством макропиноцитоза). Эндоцитированные вирионы локализуются в эндосомах, которые транслоцируются из субмембранной в перинуклеарную область цитоплазмы. Ключевым событием, необходимым для выхода вирусных нуклеокапсидов из эндосом, является конформационный переход субъединицы HA2 гемагглютинина в условиях низкого pH поздней эндосомы, приводящий к экспонированию ранее скрытого пептида слияния и встраиванию данного пептида в мембрану эндосомы, т. е. к слиянию мембран вириона и эндосомы. Одновременно низкий pH эндосомы открывает вирусный протонный канал М2, что приводит к понижению pH внутри вириона и освобождению вирусных рибонуклеопротеинов (РНП) от матриксного белка М1. В итоге вирусные РНП-комплексы выходят из просвета эндосомы в цитозоль и затем транспортируются в ядро. Транспорт РНП в ядро опосредуется несколькими карбоферинами, в частности импортинами α и β .

Транскрипция вирусных РНК в ядре осуществляется вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRp) — гетеротримером из PA, PB1 и PB2. Для инициации транскрипции необходим процесс «кэп-снэтчинга» («похищения кэпов»), в ходе которого вирусная PB2 связывается с экпированным 5'-концом клеточной мРНК, а PA отрезает кэп-структуру и первые 10—15 нуклеотидов клеточной мРНК, которые используются в качестве праймера для последующей транскрипции вирусной мРНК. На 3'-конце вирусная мРНК получает полиА-хвост за счет «пробуксовки» RdRp на полиU-последовательности вирусной РНК. Для экспорта вирусных мРНК из ядра используется ряд клеточных белков, в частности TREX и NXF1/TAP.

На более поздних стадиях ВГА-инфекции RdRp переключается с транскрипционной на репликационную активность. Репликация вирусных РНК в отличие от транскрипции не требует праймера и финально приводит к синтезу точных копий вирусной РНК, не несущих 5'-кэп-структуры и 3'-полиА-хвоста.

Синтез вирусных белков происходит на рибосомах в цитоплазме, после чего белковые компоненты РНП-комплекса направляются в ядро для ассоциации со вновь синтезированными вирусными РНК, а поверхностные белки вируса транспортируются по секреторному пути, гликозилируются в аппарате Гольджи и встраиваются в апикальную плазматическую мембрану. Собранные в ядре РНП-комплексы также доставляются к местам почкования новых вирионов на апикальной мембране, причем сайтами сборки и почкования вирусного потомства являются мембранные рафты, обогащенные холестерином. Важнейшим фактором в отпочковывании вирионов от мембраны является ферментативная активность нейраминидазы, вызывающая расщепление α -кетозидной связи между терминальным остатком сиаловой кислоты и следующим моносахаридным остатком. С помощью мутационного анализа была обнаружена также ключевая роль цитоплазматического хвоста белка М2 и матриксного белка М1 в процессе почкования дочерних вирионов ВГА.

На всех этапах жизненного цикла ВГА вирус теснейшим образом взаимодействует с большим количеством эффекторных и сигнальных белковых систем инфицированной клетки, используя и перестраивая их в целях собственного размножения (Watanabe et al., 2010). В качестве примеров таких систем можно назвать митогенактивируемые сигнальные пути (МАРК), фосфатидил-инозитольный сигнальный путь, многочисленные малые ГТФазы и их регуляторы, актиновый и тубулиновый компоненты цитоскелета, системы везикулярного транспорта и сортировки и значительное количество других белковых платформ. В частности, известно множество взаимодействий вирусного неструктурного белка NS1 с различными клеточными белками, приводящих к подавлению интерферонового ответа клетки, ингибированию апоптоза и к подавлению сплайсинга и экспорта из ядра клеточных мРНК.

Значительная часть клеточных генов, вовлеченных в репликацию ВГА, посттранскрипционно контролируется микроРНК. Резкое изменение профиля данных клеточных микроРНК является важной стороной патогенеза ВГА. Соответственно перспективы терапевтического использования РНК-интерференции связаны как с ПТГС вирусных генов с помощью экзогенно введенных синтетических антивирусных киРНК, так и с компенсацией дерегуляции клеточных микроРНК при гриппозной инфекции.

Механизм РНК-интерференции и биогенез малых интерферирующих РНК

В настоящее время известны три основных типа малых интерферирующих РНК — микроРНК, короткие интерферирующие РНК (киРНК) и Рiwi-взаимодействующие РНК (рiРНК).

В соматических клетках позвоночных основным типом эндогенных коротких РНК, опосредующих ПТГС, являются микроРНК. МикроРНК представляют собой короткие (18—25 п. н.) РНК, кодируемые ядерной ДНК, а также геномами многих вирусов. Клеточная белковая машина, используемая для синтеза и процессинга микроРНК, к настоящему времени достаточно хорошо известна (Carthew, Sontheimer, 2009; Hammond, 2015). Формирование зрелых микроРНК в клетке происходит в

несколько стадий. Первичный микроРНК-транскрипт (pri-miRNA), транскрибируемый обычно РНК-полимеразой 2 (Lee et al., 2004), имеет длину от нескольких сотен до нескольких десятков тысяч нуклеотидов (Saini et al., 2007). Молекулы pri-miRNA содержат одну или несколько шпилечных структур, которые в дальнейшем становятся источниками отдельных микроРНК (Lee et al., 2002). Процессинг pri-miRNA связан с ее эндонуклеазным расщеплением. Первая фаза расщепления pri-miRNA происходит в ядре и осуществляется с помощью белкового комплекса, называемого микропроцессором, состоящего из РНКазы III-подобного фермента Drosha и РНК-связывающего белка DGCR8. DGCR8 узнает фланкирующие одонитевые базальные участки в шпилечных структурах pri-miRNA и определяет правильную локализацию комплекса. Drosha разрезает двухцепочечную РНК шпильки на расстоянии 11 п. н. от начала стебля (Gregory et al., 2004; Han et al., 2006). Рибонуклеазная активность Drosha приводит к высвобождению предшественника микроРНК (pre-miRNA) длиной 60—100 нуклеотидов, имеющего вторичную структуру «стебель—петля» (Zeng et al., 2005). Существует также альтернативный путь биогенеза pre-miRNA, связанный со сплайсингом микроРНК-кодирующих интронов (миртронов) и не вовлекающий комплекса микропроцессора (Ruby et al., 2007).

Pre-miRNA экспортируются в цитоплазму при участии экспортина-5, ассоциированного с малой ГТФазой Ran (Yi et al., 2003). На втором этапе эндонуклеазного процессинга РНКазы III Dicer удаляет петлевую область, оставляя РНК-дуплекс длиной 21—23 п. н. (Hutvagner et al., 2001). Узнавание и связывание Dicer с pre-miRNA происходит при участии белка TRBP (Chendrimada et al., 2005).

После отрезания петли микроРНК-дуплекс связывается с белками семейства Argonaut (Ago), формируя комплекс RISC (РНК-индуцированный комплекс сайленсинга) (Peters, Meister, 2007). Стадия ассоциации Ago с микроРНК-дуплексом является кратковременной, так как N-домен белков Ago обладает геликазной активностью и обеспечивает быстрое разматывание двухнитевой микроРНК (Kwak, Tomari, 2012). После разделения одна из нитей («пассажирская нить») удаляется из комплекса, а другая («ведущая нить») в комплексе с Ago опосредует сайленсинг целевых генов.

Связывание микроРНК в составе комплекса RISC с целевыми мРНК осуществляется с неполной комплементарностью. Узнавание мРНК-мишеней обычно происходит за счет комплементарного спаривания нуклеотидов 2—7 на 5'-конце микроРНК (seed region) с 3'-нетранслируемой областью (3'-UTR) мРНК (Bartel, 2009). Во многих микроРНК имеются также дополнительные сайты комплементарности помимо seed region (Grimson et al., 2007).

ПТГС достигается несколькими возможными механизмами. Одним из них является разрезание целевой мРНК в результате эндонуклеазной активности Ago2 (Liu et al., 2004). Сайт расщепления локализован между 9-м и 10-м нуклеотидами с 5'-конца микроРНК (Martinez et al., 2002). Именно комплементарное спаривание центральной области микроРНК (9—11-й нуклеотиды) с мРНК является необходимым условием эндонуклеазной активности Ago2 (Doench et al., 2003). Альтернативно RISC может инициировать деаденилирование целевой мРНК и ее последующую деградацию (Wu et al., 2006) путем рекрутирования адаптерного белка GW182 и деаденилазного комплекса Ccr4—Not (Fabian et al., 2012). GW182 связывает, кроме того, белок PABP. Предположительно взаи-

модействие GW182 с PABP делает невозможной циркуляризацию мРНК, необходимую для инициации трансляции белка (Zekri et al., 2009). Схема биогенеза и основных эффекторных механизмов действия микроРНК представлена на рисунке.

Имеется ряд других белковых взаимодействий, вовлекающих комплекс RISC. В общей сложности предполагается 9 взаимодополняющих молекулярных механизмов RISC-опосредованного сайленсинга генов, детали которых пока до конца не выяснены (Morozova et al., 2012).

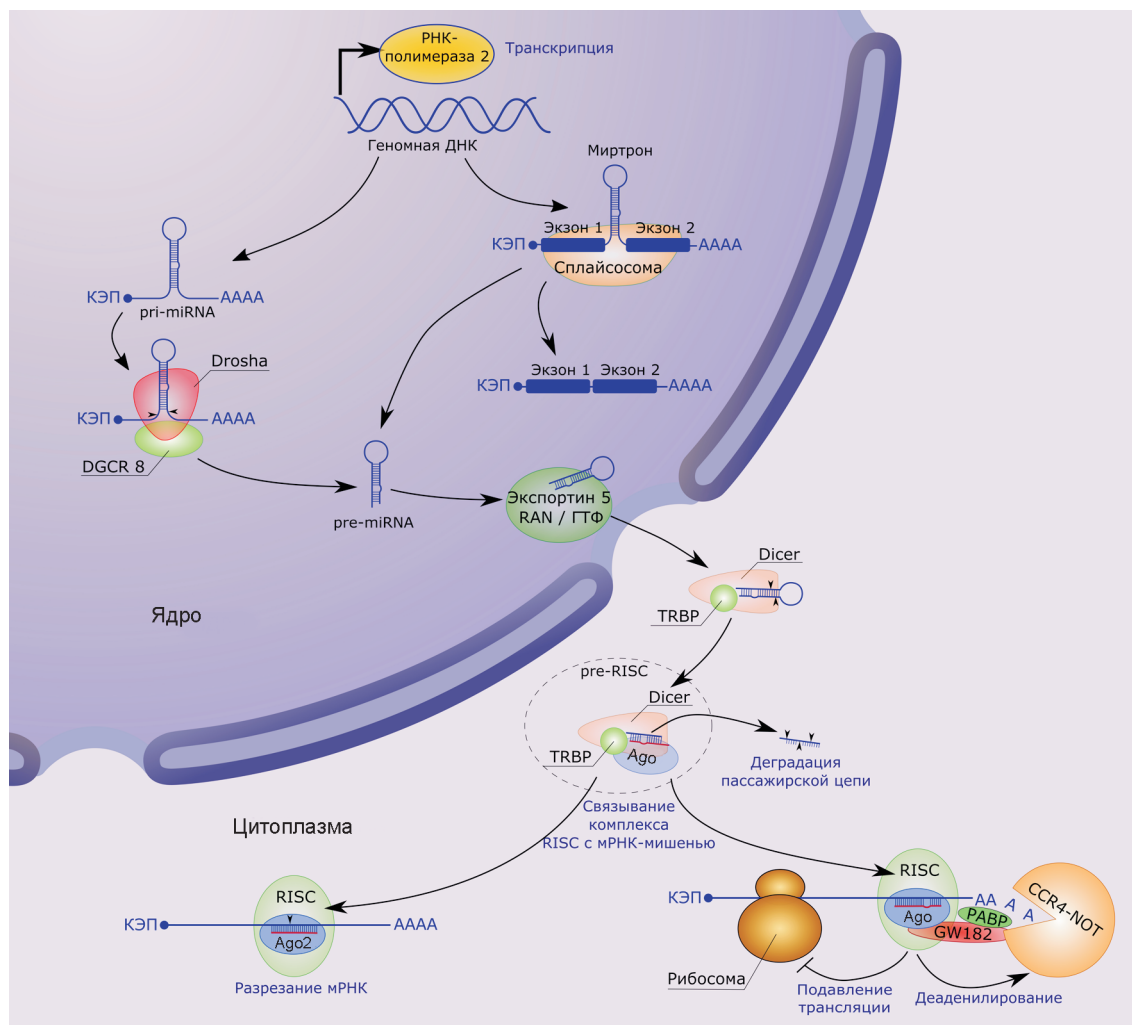
В клетке каждая микроРНК способна узнавать ряд мРНК-мишеней. В то же время одна мРНК может являться мишенью для многих микроРНК (Krek et al., 2005). В результате совокупность микроРНК осуществляет сложную сеть взаимодействий с мРНК-мишенями, обеспечивая тонкую настройку активности генов и регулируя важнейшие функции в норме и при множестве патологических процессов (Ghildiyal, Zamore, 2009; Рукша и др., 2016). По разным оценкам, 30—60 % генов человека, кодирующих белок, находятся под репрессивным контролем микроРНК (Lewis et al., 2005; Friedman et al., 2009). Кроме того, многие микроРНК в клетке существуют в нескольких изоформах (Guo, Chen, 2014).

Инфекция ВГА существенно изменяет профиль клеточных микроРНК, при этом некоторые изменения можно оценить как провирусные, а некоторые — как антивирусные. Динамика микроРНК при гриппе и ее биологическая роль подробно рассматриваются ниже.

Вторым типом малых интерферирующих РНК являются киРНК. Структурно киРНК представляют собой дуплексы длиной 21—25 п. н., схожие с вышеописанными микроРНК-дуплексами. В отличие от микроРНК киРНК не кодируются клеточными генами. Они были открыты в исследованиях на нематоде *Caenorhabditis elegans* как продукт разрезания РНКазой Dicer экзогенно введенных в клетки длинных двухнитевых РНК (днРНК), комплементарных к экзонным участкам генов (Fire et al., 1998). В ряде групп организмов источниками киРНК помимо экспериментально введенных могут быть также вирусные днРНК и продукты двунаправленной транскрипции мобильных элементов генома. Эффекторный механизм киРНК-интерференции схож с вышеописанным генным сайленсингом, опосредованным микроРНК. Он включает в себя сборку комплекса RISC и фрагментацию мРНК-мишени белком Ago2.

В последние годы синтетические киРНК, направленные на подавление экспрессии генов ВГА, активно исследуются в качестве перспективных новых лекарственных средств в лечении гриппа. В этом направлении в ряде лабораторий достигнуты заметные успехи, результаты данных работ детально обсуждаются ниже.

Третьим типом малых интерферирующих РНК являются рiРНК, имеющие длину 25—32 нуклеотида. Они взаимодействуют с белками клада PIWI, также входящими в семейство Argonaut. У млекопитающих белки PIWI и рiРНК обнаружены только в гонадах. Биогенез рiРНК существенно отличается от биогенеза микроРНК и киРНК. рiРНК частично происходят из специализированных рiРНК-кластеров длиной от 1000 до 100 000 п. н. и более, частично — из транскриптов активных мобильных элементов генома. По имеющимся данным, предшественники рiРНК в отличие от предшественников микроРНК и киРНК не имеют шпилечной структуры и являются одонитевыми молекулами. Основной функцией рiРНК является репрессия подвижных элементов генома (транспозо-



Биогенез микроРНК и основные эффекторные механизмы посттранскрипционного генного сайленсинга (ПТГС).

Первичный микроРНК-транскрипт (pri-miRNA) транскрибируется РНК-полимеразой 2 и формирует шпилечную вторичную структуру. Далее комплекс микропроцессор (РНКазы III-подобный фермент Drosha и РНК-связывающий белок DGCR8) вырезает предшественник микроРНК (pre-miRNA) со структурой «стебель—петля». Альтернативный путь биогенеза pre-miRNA связан со сплайсингом микроРНК-кодирующих интронов (миртронов). Pre-miRNA экспортируются в цитоплазму при участии экспортина 5 и малой ГТФазы Ran. В цитоплазме РНКазы III Dicer при участии белка TRBP удаляет петлевую область, оставляя микроРНК-дуплекс длиной 21—23 п. н. МикроРНК-дуплекс связывается с белками семейства Argonaute (Ago), формируя комплекс RISC, при этом одна из нитей (ведущая нить) опосредует ПТГС, а вторая (пассажирская) нить удаляется из комплекса. Возможные эффекторные механизмы ПТГС состоят в разрезании целевой мРНК белком Ago2, деаденировании целевой мРНК деаденилазным комплексом Ccr4—Not и подавлении трансляции мРНК.

нов) в клетках зародышевого пути. Эта задача решается как в ядре, где белки PIWI вовлечены в регуляцию структуры хроматина, препятствующую транскрипции транспозонов, так и в цитоплазме, где комплексы PIWI и piРНК обеспечивают комплементарное узнавание и фрагментацию транскриптов подвижных элементов (Toth et al., 2016).

piРНК, по-видимому, не вовлечены в патогенез ВГА (к настоящему времени их не обнаружено в респираторных эпителиях), поэтому ниже мы сконцентрируемся на киРНК- и микроРНК-ветвях РНК-интерференции.

Антивирусная РНК-интерференция на основе киРНК вирусного происхождения

РНК-интерференция играет ключевую роль в сложных взаимодействиях между вирусом и инфицированной им клеткой. У растений, грибов и в некоторых группах

беспозвоночных (членистоногие и нематоды) РНК-интерференция на основе киРНК вирусного происхождения является важнейшим механизмом противовирусной защиты. Вирусные днРНК узнаются белками семейства Dicer DCL1 (*Caenorhabditis elegans*), DCL2 (*Drosophila*), DCL3 и DCL4 (*Arabidopsis thaliana*), которые разрезают их на короткие двухнитевые вирусные киРНК-фрагменты (21—24 п. н.), структурно схожие с вышеописанными микроРНК-дуплексами (Ding, 2010). Эта рибонуклеазная активность перечисленных форм Dicer, направленная на вирусные днРНК, сама по себе обладает противовирусным действием. Однако эффекторный иммунный механизм у данных организмов включает сборку комплекса RISC, включающего вирусные киРНК, узнавание вирусных мРНК с полной комплементарностью и их фрагментацию в результате эндонуклеазной активности белков Ago (Pantaleo et al., 2007; Schuck et al., 2013).

Вопрос о том, насколько распространена и функционально значима антивирусная киРНК-интерференция у

млекопитающих, является дискуссионным (Cullen et al., 2013; Cullen, 2014; Gantier, 2014; Weng et al., 2015). В целом хорошо известно, что введенные в клетки млекопитающих экзогенные киРНК вызывают высокоэффективный ПТГС целевых генов за счет эндонуклеазной активности Ago2. Следовательно, млекопитающие обладают необходимыми эффекторными механизмами для киРНК-опосредованной деградации мРНК-мишеней. Вместе с тем в отличие от селективного действия киРНК трансфекция целевых длинных днРНК вызывает лишь неспецифическое подавление экспрессии генов по механизму интерферонного ответа (Elbashir et al., 2002), т. е. в клетках млекопитающих длинные днРНК не процессируются Dicer на значительном уровне в киРНК-дуплексы.

Бесспорно, основной механизм антивирусного врожденного иммунитета у позвоночных — это интерфероновый ответ, в ходе которого распознавание вирусных днРНК берут на себя белковые паттернраспознающие рецепторы (Berke et al., 2013; Del Toro Duany et al., 2015). Единственная форма Dicer, экспрессируемая у млекопитающих, направлена на продукцию микроРНК из шпилечных pre-miRNA; рибонуклеазная активность Dicer млекопитающих в отношении длинных дЦРНК низка за счет аутоингибиторной роли его N-концевого домена, гомологичного DExD/H-box-геликазам (Ma et al., 2008). Ферментативная активность Dicer также критически зависима от ряда партнеров по связыванию, определяющих его конформационное состояние: белки TRBP, ADAR1 и, возможно, RHA активируют Dicer (Robb, Rana, 2007; Chakravarthy et al., 2010; Ota et al., 2013), в то время как белок PACT, напротив, ингибирует активность Dicer в отношении длинных днРНК (Lee et al., 2013a).

В согласии с перечисленными фактами глубокое секвенирование клеток млекопитающих, инфицированных различными вирусами, не обнаружило в них существенных количеств малых РНК, которые явно соответствовали бы всем критериям вирусных киРНК (размеру 22 ± 2 нуклеотида, высокому уровню аккумуляции, равному числу смысловых и антисмысловых нитей, специфической ассоциации с Ago) (Backes et al., 2014; Bogerd et al., 2014). Кроме того, продемонстрировано, что в клеточных линиях с отсутствующей активностью гена *Dicer* репликация ряда РНК- и ДНК-вирусов, в том числе ВГА, идет с той же скоростью, что и в интактных клетках (Bogerd et al., 2014). Эти результаты привели ряд авторов к заключению, что киРНК-интерференция как средство функциональной антивирусной защиты в принципе нехарактерна для млекопитающих (Cullen et al., 2013; Backes et al., 2014; Bogerd et al., 2014).

Тем не менее существуют аргументы и противоположного рода. Обнаружено (Parameswaran et al., 2010), что клетки млекопитающих, инфицированные шестью различными РНК-вирусами, содержат короткие РНК вирусного происхождения, часть из которых являются РНК-дуплексами с несколькими (до трех) неспаренными нуклеотидами на 3'-концах (характерный признак эндонуклеазного расщепления Dicer). Для вируса гепатита С авторы продемонстрировали также ассоциацию коротких вирусных РНК с сверхэкспрессированными Ago1—Ago4, хотя их реальная функциональная роль в РНК-интерференции в этой работе не была показана (Parameswaran et al., 2010).

Dicer-зависимая продукция киРНК вирусного происхождения и сборка комплекса RISC были обнаружены в плюрипотентных эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) мыши, инфицированных вирусом энцефаломио-

кардита (Picornaviridae) (Maillard et al., 2013). Дифференцировка мышечных ЭСК резко (в 10 раз) снижала уровень вирусной киРНК, что, по-видимому, связано с активацией генов системы врожденного иммунитета (Flemr et al., 2013). Установлено, что ооциты мыши экспрессируют высокоактивную N-терминально укороченную форму Dicer (Dicer⁰) с отсутствующим DExD/H-box-подобным доменом (Flemr et al., 2013); возможно, Dicer⁰ экспрессируется и в ЭСК мыши (Cullen, 2014). Уровень экспрессии Dicer в ЭСК в целом существенно выше, чем в дифференцированных соматических клетках (Billy et al., 2001; Chen et al., 2010), что, очевидно, также способствует более высокому уровню противовирусной киРНК-интерференции в ЭСК.

Некоторое усиление репликации ВГА после нокдауна гена *Dicer* было обнаружено в клеточной линии Vero, характеризующейся отсутствием экспрессии генов *IFN-A1* и *IFN-B1* (Matskevich et al., 2007). Эти результаты позволяют предположить возможность антивирусной киРНК-интерференции в данной интерферон-дефицитной клеточной системе и подтверждают, что в клетках млекопитающих существуют конкурентные отношения между системой интерферонного ответа и антивирусной киРНК-интерференцией.

Многие вирусы кодируют белки-супрессоры антивирусной киРНК-интерференции, ограничивающие способность Dicer разрезать вирусные днРНК. Заражение клеток млекопитающих вирусами с делециями или мутациями соответствующих генов приводило к появлению в них значительных количеств вирусных киРНК и к Ago2-опосредованному снижению инфекционной способности вируса. Такие результаты были получены для вируса Нодавируса (*Nodaviridae*) с делецией белка B2 (NoΔB2) (Li et al., 2013; Maillard et al., 2013), для вируса гепатита мышей (*Coronaviridae*) с мутацией белка N (Cui et al., 2015). На модельных системах подавление экспериментальной киРНК-интерференции было продемонстрировано также для целого ряда сверхэкспрессированных вирусных супрессорных белков, в том числе NS1 из ВГА (Bucher et al., 2004; Li et al., 2004). Доказано прямое связывание днРНК с N-концевым (аминокислотные остатки 1—73) доменом белка NS1 ВГА (Chien et al., 2004; Cheng et al., 2009), препятствующее рибонуклеазной активности Dicer.

Таким образом, у млекопитающих антивирусная киРНК-интерференция, по-видимому, ограничена ооцитами и ЭСК (предположительно только грызунов), что может быть связано с экспрессией в данных клетках высокоактивного Dicer⁰ (Flemr et al., 2013) и отсутствием в них существенного уровня экспрессии генов интерферонного ответа (Harada et al., 1990). В дифференцированных соматических клетках млекопитающих киРНК-интерференция, очевидно, не играет заметной роли в борьбе с вирусами из-за включения в клетках генов интерферонного ответа, а также супрессии днРНК-процессирующей способности Dicer по нескольким механизмам (аутоингибирование, ингибирование клеточными белками и ингибирование супрессорами вирусного происхождения).

киРНК-интерференция как новый терапевтический подход в борьбе с ВГА

Терапевтическое применение киРНК-интерференции для лечения ряда заболеваний, в том числе гриппа, активно исследуется с начала 2000-х годов. В целом успех

киРНК-опосредованного сайленсинга целевого гена по существу определяется двумя компонентами — оптимальным дизайном киРНК и выбором эффективного средства доставки киРНК в клетки-мишени.

В ряде работ экспериментально были определены благоприятные и неблагоприятные факторы дизайна киРНК, влияющие на финальную эффективность и специфичность киРНК-интерференции (Reynolds et al., 2004; Birmingham et al., 2007). Были разработаны алгоритмы подбора киРНК, учитывающие перечисленные выше требования к их дизайну (Birmingham et al., 2007; Wang et al., 2009). Существуют web-ресурсы, нацеленные на подбор киРНК для сайленсинга целевых генов (Lagana et al., 2015). В настоящее время доступны полногеномные библиотеки киРНК, позволяющие проводить различные высокопроизводительные функциональные исследования на основе нокдаунов индивидуальных генов. В исследованиях *in vitro* наряду с собственно киРНК часто используются плазмиды или лентивирусные векторы, кодирующие шпилечные предшественники киРНК (кшРНК).

Вторым критически важным обстоятельством, определяющим успешность киРНК-интерференции и в перспективе киРНК-терапии, является создание средства доставки киРНК, которое одновременно соответствовало бы целому ряду необходимых требований — высокой эффективности доставки киРНК в целевые клетки (в случае гриппа — в клетки респираторных эпителиев), защите киРНК от нуклеаз во внеклеточной среде, низкой токсичности, отсутствию иммуногенности, эффективной биоразлагаемости и выведению из организма. В случае системного введения к требованиям относится способность преодолевать ряд тканевых барьеров (эндотелий, базальные мембраны, тканевые макрофаги), а в случае эндотозного поглощения клетками — способность к высвобождению из эндосом. Предложено несколько экспериментальных платформ доставки киРНК, основными из которых являются липосомы, вирусные векторы, поликатионные наноносители и пептидные системы доставки (Wang et al., 2010; Ruigrok et al., 2016). Несмотря на большое количество исследований в данном направлении и ряд обнадеживающих результатов, вопрос выбора оптимальной стратегии доставки терапевтических киРНК *in vivo* не может пока считаться решенным.

Подавление репликации ВГА с помощью киРНК-интерференции вирусных генов неоднократно исследовали экспериментально. Как и для клеточных генов, для генов ВГА были сформулированы биоинформационные алгоритмы подбора наиболее эффективно действующих киРНК (Elnefnawi et al., 2011; Liu et al., 2013); для решения этой задачи имеется ряд web-ресурсов (Sharma et al., 2015).

Результаты этих исследований суммированы в табл. 1. Из приведенных в таблице данных очевидно, что эффективно функционирующие анти-ВГА киРНК (или кшРНК-кодирующие плазмиды), как правило, направлены на консервативные вирусные гены, кодирующие внутренние белки вируса и полимеразный комплекс. В результате такого выбора мишеней киРНК-интерференции в ряде случаев удалось достичь ингибирования нескольких штаммов ВГА одними и теми же киРНК (табл. 1).

Как видно из данных табл. 1, в экспериментах по анти-ВГА киРНК-интерференции были использованы различные средства доставки киРНК — как традиционные, так и достаточно новые — ПЭГилованные иммунолипосомы (Khantaspur et al., 2014) и pH-зависимые пептиды (Liang et al., 2015). Поскольку ВГА является рес-

пираторным вирусом, *in vivo* существует возможность интраназального или ингаляционного введения киРНК-содержащих препаратов, что позволяет избежать ряда серьезных препятствий, связанных с их системным введением (Ruigrok et al., 2016). Тем не менее проблемы защиты киРНК от нуклеаз и высвобождения киРНК из эндосом эпителиальных клеток остаются актуальными и в этом случае. Несмотря на приведенные в табл. 1 положительные результаты, именно разработка оптимального средства доставки киРНК *in vivo* в инфицированные ВГА клетки остается основным препятствием, затрудняющим немедленную трансляцию киРНК-технологии в клиническую практику терапии гриппа.

Еще одним перспективным направлением использования киРНК в борьбе с гриппом является поиск и ПТГС не вирусных, а клеточных генов, важных для репликации ВГА. В ряде работ с этой целью был проведен скрининг клеточных факторов репликации ВГА с использованием киРНК-библиотек. Полногеномный киРНК-скрининг является мощнейшим инструментом в функциональных генетических исследованиях биологии ВГА, однако его результаты оказываются критически зависимыми от выбранных в исследовании параметров — клеточной линии, штамма вируса, эффективности киРНК-нокдауна, выбора временных точек скрининга. В частности, в 7 полногеномных исследованиях с использованием библиотек киРНК, проведенных к настоящему времени, было выявлено в общей сложности 1362 хозяйских гена, связанных с репликацией ВГА. Однако только 6 генов (*ATP6AP1*, *ATP6V0C*, *ATP6V0D1*, *COPA*, *COPG* и *NXF1*) пересекались в четырех скринингах и, парадоксальным образом, ни одного гена — во всех 7 исследованиях (Chou et al., 2015). Поэтому интерпретация результатов киРНК-скрининга и особенно их последующий перевод в плоскость разработки лекарственных средств требуют определенной осторожности при всей важности и информативности таких данных.

Вирусные микроРНК: провирусная микроРНК-интерференция

Ряд вирусов использует РНК-интерференцию для обеспечения беспрепятственного прохождения ими жизненного цикла, кодируя в своих геномах вирусные микроРНК. Вирусные микроРНК кодируются геномами ряда ДНК-содержащих вирусов, принадлежащих к нескольким семействам: *Herpesviridae*, *Polyomaviridae*, *Ascoviridae*, *Baculoviridae*, *Adenoviridae* и *Iridoviridae* (Grundhoff, Sullivan, 2011; Takane, Kanai, 2011; Liu, 2014). Более 200 вирусных микроРНК было обнаружено в геномах альфа-, бета- и гамма-герпес-вирусов. Вирусные микроРНК ДНК-содержащих вирусов имеют множество мишеней как среди вирусных мРНК (ауторегуляция вирусных генов) (Murphy et al., 2008; Lin et al., 2011), так и среди клеточных мРНК. Вирусные микроРНК регулируют переключение с литического на персистентный тип инфекции, вызывают необходимые вирусу изменения клеточного метаболизма, модулируют прохождение клеткой клеточного цикла, обеспечивают уклонение от действия иммунной системы хозяина, ингибируют апоптоз инфицированных клеток (Grundhoff, Sullivan, 2011; Takane, Kanai, 2011; Powdrill et al., 2016).

Данные по кодированию микроРНК РНК-содержащими вирусами к настоящему времени очень скудны.

Т а б л и ц а 1

**Экспериментальное использование киРНК, направленных на вирусные мишени,
для эффективного подавления репликации вируса гриппа**

Модель	Ингибируемые штаммы ВГА	Система доставки киРНК	Мишени киРНК-интерференции	Литературный источник
Клетки 293Т, ВНК	A/WSN/33 (H1N1) с нуклеотидной заменой валлина на аланин в позиции 41 в ОРС М1	ТФР Trans IT LT-1 + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК	M2	McCown et al., 2003
Клетки MDCK	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1)	Электропорация киРНК	NP, PA, PB1	Ge et al., 2003
Клетки Vero	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	ТФР Oligofectamine + киРНК	NP NP, PA, PB1	
Куриные эмбрионы				
Мыши	То же	ПЭИ + киРНК (внутривенное введение)	NP, PA	Ge et al., 2004
		ПЭИ + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК (ВВ)	NP	
		ПЭИ + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК (ИН)	NP, PB1	
Клетки Vero		Лентивирусный вектор, кодирующий кшРНК	NP	
Мыши	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Hong Kong/156/97 (H5N1), A/Netherlands/219/03 (H7N7), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)	Свободная киРНК (ВВ) с последующим ТФР Oligofectamine + киРНК (ИН)	NP, PA	Tompkins et al., 2004
Клетки MDCK	A/WSN/33 (H1N1)	Лентивирусный вектор, кодирующий кшРНК	M1	Hui et al., 2004
Мыши	A/PuertoRico/8/34 (H1N1)	Деацетилованный ПЭИ + киРНК, (ВВ)	NP	Thomas et al., 2005
Клетки MDCK	A/chicken/Hubei/327/2004 (H5N1), A/Duck/Hubei/W1/2004 (H9N2), A/Hubei/2003 (H1N1)	ТФР Lipofectamine + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК	NP, M2	Zhou et al., 2007
Мыши		ПЭИ + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК (ВВ)		
Клетки MDCK	A/chicken/Qinghaihu/726/2005 (H5N1)	ТФР SuperFect + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК	NP, PA, PB1	Zhou et al., 2008
Куриные эмбрионы		ТФР Oligofectamine + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК		
Мыши		Плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК (ВВ)		
Клетки CEF	A/Chicken/Henan/1/04 (H5N1)	ТФР Lipofectamine + РНК-олигонуклеотиды, модифицированные 2'-О-метил с 3'-бутанол-меткой	NS1	Wu et al., 2008
Цыплята		ТФР Lipofectamine + РНК-олигонуклеотиды, модифицированные 2'-О-метил с 3'-бутанол-меткой (ИН)		
Клетки CH-SAH и MDCK	A/turkey/Ontario/6118/68 (H8N4), A/turkey/Massachusetts/3740/65 (H6N2), A/duck/Czech/56 (H4N6), A/Quail/Italy/1117/65 (H10N8)	ТФР Lipofectamine + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК	NP, PA	Abrahamyan et al., 2009
Клетки MDCK	A/New Caledonia/20/1999 (H1N1), A/Hong Kong/486/97 (H5N1)	ТФР Lipofectamine + киРНК, лентивирусный вектор, кодирующий кшРНК	M2	Sui et al., 2009
Клетки MDCK	A/PuertoRico/8/34 (H1N1)	Бакуловирусный вектор, кодирующий кшРНК	NP	Suzuki et al., 2009
	A/Tiger/HarBin/01/2002 (H5N1)	ТФР Lipofectamine + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК	PA	Zhang et al., 2009
Мыши		ПЭИ + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК (ВВ)		

Таблица 1 (продолжение)

Модель	Ингибируемые штаммы ВГА	Система доставки киРНК	Мишени киРНК-интерференции	Литературный источник
Клетки MDCK Куриные эмбрионы Мыши	A/PuertoRico/8/34 (H1N1) То же	ТФР Lipofectamine + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК ТФР Lipofectamine + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК (внутривенное введение) ПЭИ + киРНК (ВВ с последующим ИН)	PB1 NS1	Li et al., 2011 Rajput et al., 2012
Клетки MDCK	A/Chicken/Thailand/VSMU-3-BKK/2004 (H5N1), A/Openbillstork/Thailand/VSMU-5-NSN/2004 (H5N1)	Катионные ПЭГилированные иммунолипосомы + киРНК	NP	Khantasup et al., 2014
Клетки HD11 Куриные эмбрионы	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	ТФР Lipofectamine + киРНК, АВА-21/117Q полимер + киРНК АВА-21/117Q полимер + киРНК	PB1	Hinton et al., 2014
Клетки MDCK Мыши	То же » »	ТФР TransPass HeLa + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК ТФР TransPass HeLa + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК (ВВ)	NS1, NS2	Svancarova et al., 2015
Клетки MDCK	A/turkey/Italy/2676/2000 (H7N1), A/swine/Italy/1521/1998 (H1N2), A/swine/Italy/1523/1998 (H3N2), A/swine/Italy/1513/1998 (H1N1), A/swine/Italy/437/1976 (H1N1) A/chicken/Navapur/7972/2006 (H5N1)	ТФР Effectene + плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК	NP	Stoppani et al., 2015
Клетки MDCK, A549	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	ТФР X-treme Gene Transfectant + киРНК	NP, PB2	Behera et al., 2015
Клетки MDCK	То же	pH-зависимые пептиды + киРНК	NP	Liang et al., 2015
	A/WS/33(H1N1)	Лентивирусный вектор, кодирующий кшРНК ТФР Lipofectamine + киРНК	NP, PB1 M1, M2, NS1, NS2	Xu et al., 2015 McMillen et al., 2016
Клетки LMH	A/chicken/Texas/473-2/2010(H6N2), A/turkey/Colorado/235497/2003(H8N4)	Плазмидная ДНК, кодирующая кшРНК, трансформированная в <i>E. coli</i> бактериальный вектор tkRNAi	NP, PA	Linke et al., 2016
Клетки A549 Трансгенные мыши, экспрессирующие кшРНК	A/WSN/33 (H1N1), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	Лентивирусный вектор, кодирующий кшРНК	Нейраминидаза	Wang et al., 2016

Примечание. ТФР — трансфекционный реагент, ПЭИ — полиэтиленимин, ПЭГ-полиэтиленгликоль, ВВ и ИН — соответственно внутривенно и интранозально.

С наибольшей достоверностью гены микроРНК были обнаружены в геномах вирусов семейства *Retroviridae*, включая ВИЧ-1 (Omoto et al., 2004; Zhang et al., 2014). Ретровирусы имеют в своем жизненном цикле стадию обратной транскрипции и интеграции провирусной ДНК в геном клетки-хозяина, что позволяет им использовать для синтеза и процессинга собственных микроРНК клеточную микроРНК-производящую белковую машинерию (Harwig et al., 2014).

Ряд авторов полагает, что микроРНК, возможно, в принципе несвойственны РНК-вирусам по двум при-

чинам. Во-первых, многие РНК-вирусы имеют цитоплазматический цикл репликации и внутриядерные компоненты микроРНК-процессинга оказываются для них недоступными. Во-вторых, эндонуклеазное разрезание первичных микроРНК-транскриптов способно дестабилизировать вирусный геном и вызвать его фрагментацию (Cullen, 2010; Grundhoff, Sullivan, 2011).

Вместе с тем опубликованы результаты работ по генетическому инжинирингу ВГА (Varble et al., 2010; Varble, tenOever, 2011) вируса клещевого энцефалита (*Flaviviridae*) (Rouha et al., 2010) и вируса Синдбис (*Togoviridae*)

(Shapiro et al., 2010), доказывающие возможность вставки шпилечного микроРНК-предшественника в некодирующую область вирусного РНК-генома и последующую экспрессию данной функциональной микроРНК в инфицированных клетках без утраты репликативных свойств вируса. Помимо очевидной фундаментальной важности приведенных выше работ они открывают перспективу использования РНК-содержащих вирусов в качестве новых векторов для доставки целевых терапевтических микроРНК в клетки (tenOever, 2013).

Особенно интересно, что если вирус гриппа имеет внутриядерную фазу жизненного цикла, *Flaviviridae* и *Togoviridae* считаются семействами РНК-вирусов с полностью цитоплазматическим циклом репликации. Тем не менее для флавивируса процессинг пре-микроРНК транскрипта оказался зависимым от ядерной нуклеазы Drosha. Авторы исследования объясняют этот необычный факт возможным перераспределением потоков внутриклеточного транспорта при флавивирусной инфекции (Rouha et al., 2010). Позднее транслокация Drosha в цитоплазму при инфицировании клеток вирусом Синдбис была доказана экспериментально (Shapiro et al., 2012). По мнению авторов работы, этот случай представляет собой новый полностью цитоплазматический путь процессинга шпилечной РНК в клетке. Транслокация Drosha в цитоплазму инфицированных РНК-вирусами клеток и цитоплазматическая рибонуклеазная активность данного фермента в отношении вирусных дцРНК, приводящая к их деградации, была впоследствии охарактеризована как ранее неизвестный способ антивирусной защиты клеток млекопитающих, независимый как от антивирусной кРНК-интерференции, так и от интерферонового ответа (Shapiro et al., 2014).

Таким образом, препятствия к кодированию микроРНК в геномах РНК-содержащих вирусов и их экспрессии в инфицированных клетках не являются фундаментально непреодолимыми. В последние годы в нескольких публикациях приводятся доказательства существования микроРНК (или «микроРНК-подобных молекул») в геномах нескольких РНК-вирусов — вируса Западного Нила (*Flaviviridae*) (Hussain et al., 2012), вируса гепатита А (*Picornaviridae*) (Shi et al., 2014) и вируса Эбола (*Filoviridae*) (Liang et al., 2014). Эти важные результаты нуждаются в дальнейшей верификации, однако, по-видимому, микроРНК-интерференция на основе вирусных микроРНК не ограничивается группами ДНК-вирусов и ретровирусов (Swaminathan et al., 2013).

Взаимодействия вируса с микроРНК клетки-хозяина: общие механизмы

В инфицированной клетке вирус вступает во взаимодействия с системой клеточных микроРНК. Часть из этих взаимодействий предположительно можно охарактеризовать как антивирусные, являющиеся компонентом противовирусной защиты клетки-хозяина, а другую часть — как провирусные, являющиеся частью репликативной стратегии вируса.

В целом ряде работ мРНК вирусов были определены в качестве мишеней для множества микроРНК инфицированной клетки (в большинстве случаев на основе компьютерных предсказаний и использования репортерных систем) (Skalsky, Cullen, 2010; Ojha et al., 2016).

Высказывались предположения, что взаимодействия клеточных микроРНК и вирусных мРНК носят антивирусный характер, так как они в принципе способны подавлять экспрессию вирусных генов (Watanabe et al., 2007). В некоторых случаях антивирусный эффект был продемонстрирован для клеток, оверэкспрессирующих данные микроРНК (Russo, Potenza, 2011). Однако истинную степень биологической значимости таких взаимодействий в борьбе организма с вирусами оценить трудно. Система микроРНК является консервативной, многие микроРНК в неизменном виде экспрессируются в разных группах организмов, эволюционно далеко отстоящих друг от друга. В то же время общеизвестно, что вирусы, во-первых, обычно имеют узкий репертуар хозяев и, во-вторых, быстро эволюционируют. В этой связи направленная эволюция клеточных микроРНК на узнавание вирусных мРНК-мишеней трудно представима. Скорее, напротив, многие вирусы активно эволюционируют в сторону избегания узнавания своих мРНК хозяинскими RISC-комплексами. Направлениями такой эволюции предположительно являются укорочение 3'-UTR вирусных мРНК в ряде семейств вирусов, а также существенное усложнение вторичной структуры 3'-UTR многих вирусных мРНК, что затрудняет связывание с ними комплексов RISC (Cullen, 2013).

Кроме того, большинство микроРНК в клетке присутствует в малом числе копий и поэтому имеет слишком низкий потенциал сайленсинга для сколько-нибудь заметного снижения мощного уровня экспрессии вирусных генов (tenOever, 2013).

В уже упоминавшемся исследовании (Bogerd et al., 2014) было установлено, что в клетках с отсутствующей активностью гена *Dicer* ряд вирусов реплицируется с той же эффективностью, что и в интактных клетках. Эти результаты ставят под сомнение не только роль кРНК вирусного происхождения (о чем уже говорилось ранее), но и роль клеточных микроРНК (также являющихся продуктом *Dicer*) в противовирусной защите клеток млекопитающих.

Более того, в некоторых случаях связывание клеточных микроРНК с вирусными РНК, напротив, носит явно провирусный характер. Наиболее исследованным примером подобного рода является miR-122, обильно экспрессируемая в печени. miR-122 имеет 2 атипичных сайта связывания с 5'-некодирующей областью геномной РНК вируса гепатита С (ВГС) (Henke et al., 2008). При инфекции miR-122 формирует олигомерный комплекс с РНК ВГС (Machlin et al., 2011), тем самым защищая ее некэпированный 5'-конец от воздействия клеточных экзонуклеаз. Таким образом, miR-122 является важнейшим фактором патогенности ВГС, играющим ключевую роль в репликации и длительном персистировании данного вируса. Блокирование функции miR-122 в инфицированных гепатоцитах оказалось многообещающей терапевтической стратегией в борьбе с ВГС (Lanford et al., 2010).

Одновременно РНК ВГС служит молекулярной губкой, секвестрирующей miR-122 и соответственно депрессирующей ее клеточные мишени (Luna et al., 2010), среди которых, в частности, ряд детерминант метастазирования гепатоцеллюлярной карциномы (Tsai et al., 2009).

Функционирование вирусных РНК в качестве молекулярных губок, адсорбирующих на свои сайты связывания клеточные микроРНК (по-видимому, с их последующей деградацией) и тем самым у-регулирующих

экспрессию определенных клеточных генов в целях пролиферации или персистенции вируса, очевидно, является достаточно распространенным явлением, многократно возникавшим в эволюции вирусов (McCaskill et al., 2015). Помимо вышеупомянутой miR-122 и РНК ВГС подобные функциональные взаимоотношения продемонстрированы для ряда клеточных микроРНК и нескольких герпес-вирусов (Guo, Steitz, 2014).

В нескольких недавних публикациях была предложена гипотеза «конкурирующих эндогенных РНК» (Tay et al., 2014) или применительно к вирусам «конкурирующих вирусных и хозяйских РНК» (Li et al., 2014). Авторы предполагают, что вирусные мРНК и клеточные мРНК в инфицированной клетке, имеющие сайты узнавания одних и тех же микроРНК, вступают в конкурентные отношения за их связывание. Эти взаимодействия приводят к реципрокной регуляции в системе вирусная РНК—клеточная микроРНК—клеточная мРНК и в конечном итоге создают оптимальные условия для репликации и (или) персистенции вируса. Таким образом, возможно, именно в конкурентном связывании клеточных микроРНК и депрессии их клеточных мишеней, а не в прямом анти-вирусном действии и состоит биологическая роль большинства выявленных или предсказанных взаимодействий вирусных РНК и микроРНК инфицированной клетки.

Еще одной стороной проблемы взаимодействия вирусов с микроРНК инфицированной клетки является изменение профиля клеточных микроРНК, не связанного напрямую с узнаванием ими вирусных РНК. Оценка динамики клеточных микроРНК в условиях различных вирусных инфекций проводилась неоднократно (Guo, Steitz, 2014). Наиболее ярким примером подобных изменений провирусного характера является 1000-кратный рост концентрации miR-155 в В-лимфоцитах человека, латентно инфицированных вирусом Эпштейна—Барра (Yin et al., 2008). Мишени miR-155 вовлечены в BACH-1-опосредованную регуляцию транскрипции (Yin et al., 2008), в сигнальный путь NF-κB (Lu et al., 2008) и в регуляцию пролиферации В-клеток (Loeb et al., 2012).

Изменение уровня экспрессии микроРНК может быть использовано и клеткой-хозяином в целях борьбы с вирусом. В частности, существует теснейшая связь между антивирусным интерфероновым ответом и микроРНК-регуляцией клеточных генов. Так, одним из интерферонстимулируемых генов является *CH25H*. Холестерин-25-гидроксилаза катализирует превращение холестерина в антивирусный липидный агент 25-гидроксихолестерол (25-НС) (Liu et al., 2013). 25-НС имеет несколько эффекторных антивирусных механизмов, одним из которых является up-регуляция miR-130b и miR-185. Мишенями этих микроРНК являются гены липидного метаболизма, в частности *AGPAT3*, *SREBP2*, *SCARB1*, *LDLR*, *FADS1* и *PPARγ*. Подавление их экспрессии, по-видимому, определяет антивирусный эффект miR-185 в отношении ряда вирусов (Singaravelu et al., 2015).

Другим примером подобного рода является up-регуляция miR-342-5p интерферониндуцируемым транскрипционным фактором IRF1. Среди многочисленных мишеней miR-342-5p обнаружены ферменты IDI1 и SC4MOL, вовлеченные в биосинтез стеролов. Их репрессия в конечном итоге приводит к снижению уровня холестерина в инфицированной клетке и, по-видимому, опосредует противовирусный эффект miR-342-5p в отношении ВГА (H1N1), вируса простого герпеса 1, цитомегаловируса человека и мыши (Robertson et al., 2016).

Динамика клеточных микроРНК при инфекции ВГА

В ряде работ установлено, что ВГА, как и другие вирусы, инициирует изменение профиля клеточных микроРНК. Основными методами профилирования микроРНК являются скрининг с помощью микрочипов (microarray analysis) и секвенирование нового поколения. Для валидации получаемых результатов обычно используются количественная ПЦР в реальном времени и люциферазная репортерная система. В недавних интегративных исследованиях речь идет о сотнях микроРНК, уровень которых значимо изменяется при вирусной инфекции (Tan et al., 2014; Bao et al., 2015; Peng et al., 2015; Makkoch et al., 2016). На наш взгляд, наиболее ясные в смысле вовлеченных мишеней и внутриклеточных процессов результаты исследований динамики клеточных микроРНК при гриппозной инфекции суммированы в табл. 2.

Из приведенных в табл. 2 данных очевидно, что инфекция ВГА изменяет уровень множества микроРНК, вовлеченных в важнейшие клеточные процессы. Одним из них является индукция апоптоза инфицированных клеток по нескольким вовлекающим микроРНК механизмам. Апоптоз инфицированных клеток можно рассматривать как средство противовирусной защиты организма, направленное на ограничение репликации вируса. Однако одновременно апоптоз вносит вклад в тяжесть заболевания. Массовая апоптотическая гибель легочных эпителиальных клеток становится одним из звеньев фатального острого респираторного дистресс-синдрома (Short et al., 2014).

Значительное количество микроРНК вовлечено в зависимость от ВГА модуляцию врожденного иммунитета по нескольким путям (табл. 2). В частности, up-регуляция ряда микроРНК (miR-21, miR-451 и miR-141) при инфекции ВГА подавляет экспрессию провоспалительных цитокинов. С одной стороны, ингибирование провоспалительных цитокинов может оказаться выгодным вирусу. Вместе с тем избыточное неконтролируемое освобождение цитокинов (цитокиновый шторм) является одним из наиболее опасных для жизни последствий гриппа (Tejgato, 2015), поэтому опосредованный микроРНК ПТГС провоспалительных цитокинов, по-видимому, является дополнительным механизмом клеточного контроля воспаления, связанного с инфекцией ВГА.

К числу событий, сопровождающих поздние стадии инфекции ВГА, относятся изменения профиля микроРНК, мишени которых вовлечены в клеточную пролиферацию и репарацию ДНК, что, очевидно, связано с регенеративными процессами в легочном эпителии.

Динамика некоторых клеточных микроРНК была охарактеризована как выгодная вирусу. Так, наблюдаемое снижение концентрации miR-24 приводит к up-регуляции протеазы фурина, протеолитическая активность которой в отношении предшественника гемагглютинина H0 необходима для продукции инфекционных вирионов H5N1, способных к мембранному слиянию (Loveday et al., 2015).

Сходным образом down-регуляция miR-17-3p и miR-221 при инфекции ВГА приводит к депрессии их мишени GalNAc transferase 3 (GALNT3), которая катализирует O-гликозилирование муцинового типа в инфицированных клетках. O-гликозилирование клеточных рецепторов является одним из ключевых факторов, определяющих адсорбцию ВГА вирионов на клеточной поверхности (Nakamura et al., 2015).

Таблица 2

Изменение экспрессии клеточных микроРНК, их мишени и клеточные процессы, в которые они вовлечены при инфицировании ВГА

микроРНК	Динамика микроРНК	Мишень микроРНК	Функция белка	Подтип вируса	Литературный источник
Апоптоз					
miR-29c	↑	BCL2L2	Антиапоптотическая модуляция клеточной гибели	H1N1	Guan et al., 2012
Семейство miR-30	↓	STK17b	Проапоптотическая киназа	H5N1	Li et al., 2011
miR-34a	↓	Bax	Триггер апоптотической пермеабилзации мембраны митохондрий	H1N1	Fan, Wang, 2016
miR-34c	↓	SIRT1	Апоптотическая модуляция деацетелирования	»	Rivera et al., 2016
miR-223	↑	HOXC6	Антиапоптотический транскрипционный фактор	H5N1	Li et al., 2011
	↓	PI3K, PP2A, PKA	Опосредуют антиапоптотический клеточный путь CREB	H1N1	Li et al., 2010
miR-548an	↓	NS1ABP	Антиапоптотическая модуляция клеточной гибели	»	Othumpangat et al., 2013
miR-4276	↓	COX6C	Индукция каспазы 9	»	Othumpangat et al., 2014
Иммунный ответ					
miR-16	↓	TNF- α	Провоспалительные цитокины	H5N3	Wang et al., 2009b
miR-21	↑	IL1B, IL12		H1N2	Skovgaard et al., 2013
	↑			H1N1	Li et al., 2010
miR-141	↑	TGF- β 2		H5N1	Lam et al., 2013
miR-451	↑	IL6		H1N2	Skovgaard et al., 2013
miR-15b-3p	↑	IKKB, TRAF6, IRAK1, TRAF3	Вовлечены в клеточные пути Toll-подобных рецепторов	H1N1	Huang et al., 2015
miR-29	↑	DNMT3a, DNMT3b	Эпигенетические супрессоры для COX2 и синтеза IFN- λ 1	H1N1, H3N2	Fang et al., 2012
miR-124-3p	↑	TRAF2, MAP3K1, MAP3K7IP1, MAP3K7IP3, JAK1, STAT6, STAT5B	Вовлечены в клеточные сигнальные пути врожденного иммунитета	H1N1	Huang et al., 2015
miR-132	↑	MAPK3	Ключевой компонент каскада MAPK/ERK	H1N1, H3N2	Buggele et al., 2012
miR-146a	↑	IRAK-1	Медиатор сигналинга интерлейкина-1	H1N1, H3N2	Buggele et al., 2012; Terrier et al., 2013
miR-200a	↓	IFNAR1, STAT2	Вовлечены в систему сигналинга IFN- I	H1N1	Li et al., 2010
miR-449b	↑	HDAC1	Супрессор IFN β -промотора	H1N1, H3N2	Buggele et al., 2013
miR-650	↓	MxA	Антивирусный белок, стимулируемый IFN	H1N1	Pichulik et al., 2016
miR-664	↑	LIF	Вовлечен в ERK5 сигнальную систему	H7N9	Wolf et al., 2016
Клеточная пролиферация					
miR-21	↑	hMSH2	Участвует в регуляции клеточного цикла клеток легочного эпителия	H1N1	Tan et al., 2014
miR-28-5p	↓	BRCA1	Участвует в системе репарации ДНК	»	Liu et al., 2014
miR-29a, miR-29b	↓	Akt3	Участвует в регуляции клеточного цикла	»	Liu et al., 2010
miR-141	↑	EGFR	Регулирует пролиферацию клеток легочного эпителия	H1N1, H5N1	Vela et al., 2014; Li et al., 2015b
Провирусное влияние на экспрессию генов клетки-хозяина					
miR-9	↑	MCP1P1	Деградация вирусной РНК	H1N1, H3N2	Dong et al., 2016
miR-17-3p, miR-221	↓	GALNT3	Осуществляет О-гликозилирование муцинового типа в зараженных клетках	H1N1, H3N2	Nakamura et al., 2015

Таблица 2 (продолжение)

микроРНК	Динамика микроРНК	Мишень микроРНК	Функция белка	Подтип вируса	Литературный источник
miR-24	↓	Furin	Протеолитическое разрезание прекурсора гемагглютинина, необходимое для образования инфекционно активного вириона	H5N1	Loveday et al., 2015
miR-155	↑	MX1	Важная роль во взаимодействии вирус—хозяин при инфекции	H1N1, H5N3	Wang et al., 2012
miR-485	↑	RIG-I	Паттернраспознающий рецептор	H5N1	Ingle et al., 2015

Примечание. Стрелка вниз или вверх показывает соответственно увеличение или уменьшение экспрессии данной микроРНК при инфекции ВГА.

Еще одним примером провирусного изменения профиля микроРНК при инфекции ВГА является up-регуляция miR-9 в условиях вирусного заражения (Dong et al., 2016). Мишенью miR-9 является белок МСРIP1. Этот белок обладает РНКазной активностью в отношении вирусных РНК (Lin et al., 2013). Опосредованный miR-9 сайленсинг МСРIP1 приводит к существенному усилению репродукции ВГА. В ряде публикаций были установлены вирусные мРНК (ВГА) в качестве мишеней для клеточных микроРНК (табл. 3).

Выше мы обсудили, что прямой антивирусный эффект взаимодействий клеточных микроРНК с вирусными РНК-транскриптами как минимум неочевиден. В ряде случаев более уместно говорить о конкурентных отношениях между вирусными и хозяйскими мРНК за связывание микроРНК (Li et al., 2014). В частности, miR-491-5p, узнающая мРНК PB1 (Song et al., 2010), одновременно имеет своей мишенью мРНК матриксной металлопротеиназы ММР-9 (Yuan et al., 2013). ММР-9 связана с рядом патологических процессов в легких, включая острый рес-

Таблица 3

Клеточные микроРНК, имеющие своими мишенями мРНК ВГА

микроРНК	мРНК-мишень ВГА	Субтип ВГА	Литературный источник
let-7c	M1	H1N1	Ma et al., 2012
miR-323	PB1	»	Song et al., 2010
miR-491			
miR-654			
miR-26a	»	»	Tambyah et al., 2013
miR-576-3p	PA		
miR-628-3p	HA		
miR-136	PB2, HA	»	Scaria et al., 2006
miR-507			
gga-miR-133c	PB1, PB-F2, N40	»	Kumar et al., 2014
gga-miR-146c*			
gga-miR-1710			
miR-485	PB1	H5N1	Ingle et al., 2015
miR-106	HA, NA, PA, PB1, PB2	H5N3	Wang et al., 2012
miR-142-3p	M, NA		
miR-146a	HA, NA, NP, PB1, PB2		
miR-153	HA, NA, PA, PB1, PB2		
miR-155	HA, NA, NP, NS, PB1		
miR-15a	HA, MNP, NS, PB2		
miR-17-3p	HA, M, PA, PB1		
miR-17-5p	HA, M, NA, PA, PB1		
miR-187	HA, NA, PB1, PB2		
miR-18a	HA, M, NA, PB1, PB2		
miR-18b	HA, M, NA, PB1, PB2		
miR-19b	HA, NS, PA, PB1		
miR-202	HA, M, NA, NP, NS, PA, PB1, PB2		
miR-206	HA, M, NP, NS, PB2		
miR-20a	HA, NA, PA, PB1, PB2		

Таблица 3 (продолжение)

микроРНК	мРНК-мишень ВГА	Субтип ВГА	Литературный источник
miR-20b	HA, M, NA, NP, NS, PA, PB1, PB2		
miR-211	HA, M, NA, NP, NS, PA, PB1, PB2		
miR-223	HA, NA, PB1, PB2		
miR-23b	HA, M, NA, NP, PA, PB1, PB2		
miR-24	HA, M, NA, NP, PA, PB1		
miR-29a	HA, M, NA, NP, NS, PB1, PB2		
miR-29c	HA, M, NA, NP, PA, PB1, PB2		
miR-301	HA, NA, NP, PB1, PB2		
miR-30b	NA, NP, PB1, PB2		
miR-32	HA, NS		
miR-34a	HA, NA, PA, PB1, PB2		
miR-7b	HA, M, NA, NP, NS, PA, PB1, PB2		
miR-92	HA, M, NA, NP, PA, PB2		
miR-216b	NA	H5N1, H3N2	Khongnomnan et al., 2015
miR-3145	PB1	H1N1, H5N1, H3N2	
miR-3682	NS	H1N1, H3N2	
miR-4513	PA		
miR-4753	PA, PB1	H1N1, H5N1	
miR-5693	PA	H5N1, H3N2	
miR-127-3p	PB1	H1N1, H3N2, H5N1	Makkoch et al., 2016
miR-128	PA		
miR-136	NP, HA		
miR-16	NP, M, PA, PB1, PB2, NS1		
miR-222	NP, M, PA, PB1, PB2, NS1		
miR-29a	HA		
miR-323	PB1		
miR-548	PB1, NS1		
miR-660	PA		
miR-92a	PB2		

пираторный дистресс-синдром, хроническую обструкцию легких, астму, инфекционную пневмонию и идиопатический фиброз легких (Lee et al., 2013). Поэтому депрессия MMP-9 в результате конкурентного связывания miR-491-5p вирусной мРНК оказывается важным компонентом патогенности ВГА.

Аналогичным образом miR-29a имеет ряд предсказанных мишеней в геноме ВГА (Wang et al., 2012). Вместе с тем клеточной мишенью miR-29a является фосфатаза PTEN, вовлеченная в PI3K/Akt-сигнальный путь (Lin et al., 2016). Депрессия PTEN в результате адсорбции miR-29a на вирусные мРНК является одним из важных факторов апоптоза клеток, инфицированных ВГА.

Терапевтическое воздействие на микроРНК, вовлеченные в клеточные процессы, связанные с инфекцией ВГА, представляет собой новую привлекательную стратегию в борьбе с гриппом. Речь может идти о введении дополнительных копий микроРНК (mimics), вовлеченных в антивирусную регуляцию клеточных процессов (например, в интерфероновый ответ), или, напротив, о блокировании провирусных микроРНК с помощью модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов (antimiRs), обычно используемых в виде antagomirs (ан-

ти-микроРНК, конъюгированные с холестерином) или LNA-олигонуклеотидных модификаций (Stenvang et al., 2012). Нацеленная на микроРНК терапия на основе mimics или antimiRs встречает те же затруднения, что и кРНК-терапия, прежде всего создание эффективного и безопасного средства доставки *in vivo*.

МикроРНК-интерференция является новым подходом для создания аттенуированных гриппозных вакцин нового поколения. С этой целью в нескольких исследованиях был выполнен инжиниринг ВГА, включающий в себя встраивание микроРНК-узнающего элемента (MRE) в последовательность вирусного гена. Таким образом, были созданы аттенуированные вирусы, содержащие MRE miR-93, встроенный в ORC гена *NP* (Perez et al., 2009), и MRE miR-let-7b, встроенный в ORC гена *PB1* (Feng et al., 2015; Shen et al., 2015). Более сложный дизайн аттенуированного вируса был использован Ли с соавторами (Li et al., 2015a). В этой работе в вирусный ген *NS* была встроена экспрессионная кассета miR-93, экспрессирующая искусственную микроРНК, узнающую *NP*. Вакцинация мышей перечисленными рекомбинантными вирусами существенно снижала смертность животных в результате летальной дозы вируса дикого типа.

Заключение

РНК-интерференция представляет собой важнейший механизм регуляции множества биологических функций, в частности взаимодействий ВГА и инфицированной клетки. Несмотря на определенное охлаждение оптимизма конца 90-х годов прошлого века и начала нового, связанного с перспективой немедленного внедрения технологии РНК-интерференции в клиническую практику лечения множества заболеваний, бесспорно, что терапевтическое использование микроРНК- и киРНК-ветвей РНК-интерференции имеет значительный потенциал в борьбе с гриппом. Данный подход позволяет создавать высокоспецифичные лекарственные средства, направленные на ПТГС строго определенных целевых мРНК-транскриптов как вирусной, так и клеточной природы. В настоящее время продолжают активные экспериментальные усилия множества лабораторий по созданию эффективного и безопасного средства доставки *in vivo* малых РНК. Кроме того, дерегуляция профиля микроРНК при вирусных инфекциях является потенциально важнейшим диагностическим инструментом.

Коллектив авторов приносит благодарность за помощь в подготовке обзора Н. Н. Никольскому (Институт цитологии РАН) и А. Б. Бондаренко (Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 15-15-00170: «Клеточные микроРНК — новые молекулярные мишени для терапии тяжелых вирусных инфекций»).

Список литературы

- Киселев О. И. 2011. Геном пандемического вируса гриппа A/H1N1v-2009. СПб.: Димитрейд График Групп. 164 с. (Kiselev O. I. 2011. The genome of pandemic influenza A/H1N1v-2009. St. Petersburg: Dimitreid Graph of Groups. 164 p.)
- Рукуша Т. Г., Сергеева Е. Ю., Палкина Н. В., Аксененко М. Б., Комина А. В., Климина Г. М., Белоногов Р. Н. 2016. МикроРНК как регуляторы эффектов ультрафиолетового излучения в клетках кожи. Цитология. 58 (10): 733—743. (Ruksha T. G., Sergeeva E. Yu., Palkina N. V., Akseenko M. B., Komina A. V., Klimina G. M., Belonogov R. N. 2016. MicroRNAs as ultraviolet irradiation effects regulators in skin cells. Tsitologiya. 58 (10): 733—743.)
- Щелканов М. Ю., Попов А. Ф., Симакова А. И., Зенин И. В., Прошина Е. С., Кириллов И. М., Дмитриенко К. А., Шевчук Д. В. 2015. Патогенез гриппа: механизмы модуляции белками возбудителя. Журн. инфектол. 7 (2): 31—46. (Shchelkanov M. Yu., Popov A. F., Simakova A. I., Zenin I. V., Proshina Ye. S., Kirillov I. M., Dmitrienko K. A., Shevchuk D. V. 2015. Pathogenesis of influenza: mechanisms of protein modulation of the pathogen. J. Infectol. 7 (2): 31—46.)
- Abrahamyan A., Nagyb E., Golovanc S. 2009. Human H1 promoter expressed short hairpin RNAs (shRNAs) suppress avian influenza virus replication in chicken CH-212 and canine MDCK cells. Antiviral Res. 84: 159—167.
- Backes S., Langlois R. A., Schmid S., Varble A., Shim J. V., Sachs D., ten Oever B. R. 2014. The Mammalian response to virus infection is independent of small RNA silencing. Cell Rep. 8: 114—125.
- Bao Y., Gao Y., Jin Y., Cong W., Pan X., Cui X. 2015. MicroRNA expression profiles and networks in mouse lung infected with H1N1 influenza virus. Mol. Genet. Genomics. 290: 1885—1897.
- Bartel D. P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell. 136: 215—233.
- Behera V., Nagarajan S., Murugkar H., Kalaiyarasu S., Prakash A., Gothwal R., Dubey S. C., Kulkarni D. D., Tosh C. 2015. siRNAs targeting PB2 and NP genes potentially inhibit replication of highly pathogenic H5N1 avian Influenza virus. J. Biosci. 40: 233—240.
- Berke I. C., Li Y., Modis Y. 2013. Structural basis of innate immune recognition of viral RNA. Cell Microbiol. 15: 386—394.
- Billy E., Brondani V., Zhang H., Müller U., Filipowicz W. 2001. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98: 14 428—14 433.
- Birmingham A., Anderson E., Sullivan K., Reynolds A., Boese Q., Leake D., Karpilow J., Khvorova A. 2007. A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. Nat. Protoc. 2: 2068—2078.
- Bogerd H. P., Skalsky R. L., Kennedy E. M., Furuse Y., Whisnant A. W., Flores O., Schultz K. L., Putnam N., Barrows N. J., Sherry B., Scholle F., Garcia-Blanco M. A., Griffin D. E., Cullen B. R. 2014. Replication of many human viruses is refractory to inhibition by endogenous cellular microRNAs. J. Virol. 88: 8065—8076.
- Bucher E., Hemmes H., de Haan V., Goldbach R., Prins M. 2004. The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. J. Gen. Virol. 85: 983—991.
- Buggele W. A., Johnson K. E., Horvath C. M. J. 2012. Influenza A virus infection of human respiratory cells induces primary microRNA expression. Biol. Chem. 287: 31 027—31 040.
- Buggele W. A., Krause K. E., Horvath C. M. 2013. Small RNA profiling of influenza A virus-infected cells identifies miR-449b as a regulator of histone deacetylase 1 and interferon beta. PLoS ONE. 8: e76560.
- Carthew R. W., Sontheimer E. J. 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. 136: 642—655.
- Chakravarthy S., Sternberg S. H., Kellenberger C. A., Doudna J. A. 2010. Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing. J. Mol. Biol. 404: 392—402.
- Chen L. L., Yang L., Carmichael G. G. 2010. Molecular basis for an attenuated cytoplasmic dsRNA response in human embryonic stem cells. Cell Cycle. 9: 3552—3564.
- Chendrimada T. P., Gregory R. I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R. 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature. 436: 740—744.
- Cheng A., Wong S. M., Yuan Y. A. 2009. Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. Cell Res. 19: 187—195.
- Chien C. Y., Xu Y., Xiao R., Aramini J. M., Sahasrabudhe V., Krug R. M., Montelione G. T. 2004. Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode. Biochemistry. 43: 1950—1962.
- Chou Y. C., Lai M. M., Wu Y. C., Hsu N. C., Jeng K. S., Su W. C. 2015. Variations in genome-wide RNAi screens: lessons from influenza research. J. Clin. Bioinform. 5: 2.
- Coburn G. A., Cullen B. R. 2003. siRNAs: a new wave of RNA-based therapeutics. J. Antimicrob. Chemother. 51: 753—756.
- Cui L., Wang H., Ji Y., Yang J., Xu S., Huang X., Wang Z., Qin L., Tien P., Zhou X., Guo D., Chen Y. 2015. The nucleocapsid protein of coronaviruses acts as a viral suppressor of RNA silencing in mammalian cells. J. Virol. 89: 9029—9043.
- Cullen B. R. 2010. Five questions about viruses and microRNAs. PLoS Pathog. 6: e1000787.
- Cullen B. R. 2013. How do viruses avoid inhibition by endogenous cellular microRNAs? PLoS Pathog. 9: e1003694.
- Cullen B. R. 2014. Viruses and RNA interference: issues and controversies. J. Virol. 88: 12 934—12 936.

- Cullen B. R., Cherry S., tenOever B. R. 2013. Is RNA interference a physiologically relevant innate antiviral immune response in mammals? *Cell Host Microbe*. 14 : 374—378.
- Del Toro Duany Y., Wu B., Hur S. 2015. MDA5-filament, dynamics and disease. *Curr. Opin. Virol.* 12 : 20—25.
- Ding S. W. 2010. RNA-based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10 : 632—644.
- Doench J. G., Petersen C. P., Sharp P. A. 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* 17 : 438—442.
- Dong C., Sun X., Guan Z., Zhang M., Duan M. 2016. Modulation of influenza A virus replication by microRNA-9 through targeting MCP1. *J. Med. Virol.* 89 : 41—48.
- Elbashir S. M., Harborth J., Weber K., Tuschl T. 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*. 26 : 199—213.
- ElHefnawi M., Hassan N., Kamar M., Siam R., Remoli A. L., El-Azab I., AlAidy O., Marsili G., Sgarbanti M. 2011. The design of optimal therapeutic small interfering RNA molecules targeting diverse strains of influenza A virus. *Bioinformatics*. 27 : 3364—3370.
- Fabian M. R., Sonenberg N. 2012. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19 : 586—593.
- Fan N., Wang J. 2016. MicroRNA 34a contributes to virus-mediated apoptosis through binding to its target gene Bax in influenza A virus infection. *Biomed. Pharmacother.* 83 : 1464—1470.
- Fang J., Hao Q., Liu L., Li Y., Wu J., Huo X., Zhu Y. 2012. Epigenetic changes mediated by microRNA miR29 activate cyclooxygenase 2 and lambda-1 interferon production during viral infection. *J. Virol.* 86 : 1010—1020.
- Feng C., Tan M., Sun W., Shi Y., Xing Z. 2015. Attenuation of the influenza virus by microRNA response element *in vivo* and protective efficacy against 2009 pandemic H1N1 virus in mice. *Int. J. Infect. Dis.* 38 : 146—152.
- Fire A., Xu S., Montgomery M., Kostas S., Driver S., Mello C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391 : 806—811.
- Fleming M., Malik R., Franke V., Nejezinska J., Sedlacek R., Vlahovicek K., Svoboda P. 2013. A retrotransposon-driven dicer isoform directs endogenous small interfering RNA production in mouse oocytes. *Cell*. 155 : 807—816.
- Friedman R. C., Farh K. K., Burge C. B., Bartel D. P. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19 : 92—105.
- Gantier M. P. 2014. Processing of double-stranded RNA in mammalian cells: a direct antiviral role? *J. Interferon Cytokine Res.* 34 : 469—477.
- Ge Q., Filip L., Bai A., Nguyen T., Eisen H. N., Chen J. 2004. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 101 : 8676—8681.
- Ge Q., McManus M. T., Nguyen T., Shen C. H., Sharp V. A., Eisen H. N., Chen J. 2003. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 100 : 2718—2723.
- Ghildiyal M., Zamore P.D. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 10 : 94—108.
- Gregory R. L., Yan K. P., Amuthan G., Chendrimada T., Dora-totaj B., Cooch N., Shiekhattar R. 2004. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 432 : 235—240.
- Grimson A., Farh K. K., Johnston W. K., Garrett-Engele P., Lim L. P., Bartel D. P. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell*. 27 : 91—105.
- Grundhoff A., Sullivan C. S. 2011. Virus-encoded microRNAs. *Virology*. 411 : 325—343.
- Guan Z., Shi N., Song Y., Zhang X., Zhang M., Duan M. 2012. Induction of the cellular microRNA-29c by influenza virus contributes to virus-mediated apoptosis through repression of antiapoptotic factors BCL2L2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425 : 662—667.
- Guo L., Chen F. 2014. A challenge for miRNA: multiple iso-miRs in miRNAomics. *Gene*. 544 : 1—7.
- Guo Y. E., Steitz J. A. 2014. Virus meets host microRNA: the destroyer, the booster, the hijacker. *Mol. Cell. Biol.* 34 : 3780—3787.
- Hammond S. M. 2015. An overview of microRNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 87 : 3—14.
- Han J., Lee Y., Yeom K.-H., Nam J.-W., Heo I., Rhee J.-K., Sohn S. Y., Cho Y., Zhang B.-T., Kim V. N. 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha—DGCR8 complex. *Cell*. 125 : 887—901.
- Harada H., Willison K., Sakakibara J., Miyamoto M., Fujita T., Taniguchi T. 1990. Absence of the type I IFN system in EC-cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated. *Cell*. 63 : 303—312.
- Harwig A., Das A. T., Berkhout B. 2014. Retroviral microRNAs. *Curr. Opin. Virol.* 7 : 47—54.
- Henke J. I., Goergen D., Zheng J., Song Y., Schüttler C. G., Fehr C., Jünemann C., Niepmann M. 2008. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* 27 : 3300—3310.
- Hinton T. M., Challagulla A., Stewart C. R., Guerrero-Sanchez C., Grusche F. A., Shi S., Bean A. G., Monaghan V., Gunatillake V. A., Thang S. H., Tizard M. L. 2014. Inhibition of influenza virus *in vivo* by siRNA delivered using ABA triblock copolymer synthesized by reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization. *Nanomedicine*. 9 : 1141—1154.
- Huang L., Ma J., Sun Y., Lv Y., Lin W., Liu M., Tu C., Zhou P., Gu W., Su S., Zhang G. 2015. Altered splenic miRNA expression profile in H1N1 swine influenza. *Arch. Virol.* 160 : 979—985.
- Hui E. K., Yap E. M., An D. S., Chen I. S., Nayak D. V. 2004. Inhibition of influenza virus matrix (M1) protein expression and virus replication by U6 promoter-driven and lentivirus-mediated delivery of siRNA. *J. Gen. Virol.* 85 : 1877—1884.
- Hussain M., Torres S., Schnettler E., Funk A., Grundhoff A., Pijlman G., Khromykh A. A., Asgari S. 2012. West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3' untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. *Nucleic Acids Res.* 40 : 2210—2223.
- Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A. E., Balint E., Tuschl T., Zamore P. D. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 293 : 834—838.
- Ingle H., Kumar S., Raut A. A., Mishra A., Kulkarni D. D., Kamayama T., Takaoka A., Akira S., Kumar H. 2015. The microRNA miR-485 targets host and influenza virus transcripts to regulate antiviral immunity and restrict viral replication. *Sci. Signal.* 8 : ra126.
- Jacob A., Sood R., Chanu Kh., Bhatia S., Khandia R., Pateriya A. K., Nagarajan S., Dimri U., Kulkarni D. D. 2016. Amantadine resistance among highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1) isolated from India. *Microb. Pathog.* 91 : 35—40.
- Khantasup K., Kopermsub V., Chaichoun K., Dharakul T. 2014. Targeted small interfering RNA-immunoliposomes as a promising therapeutic agent against highly pathogenic Avian Influenza A (H5N1) virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 : 2816—2824.
- Khongnomnan K., Makkoch J., Poomipak W., Poovorawan Y., Payungporn S. 2015. Human miR-3145 inhibits influenza A viruses replication by targeting and silencing viral PB1 gene. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 240 : 1630—1639.
- Krek A., Grün D., Poy M. N., Wolf R., Rosenberg L., Epstein E. J., MacMenamin P., da Piedade I., Gunsalus K. C., Stoffel M., Rajewsky N. 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 37 : 495—500.
- Kumar A., Vn M.A., Raut A. A., Sood R., Mishra A. 2014. Identification of chicken pulmonary miRNAs targeting PB1, PB1-F2, and N40 genes of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 *in silico*. *Bioinform. Biol. Insights*. 8 : 135—145.
- Kwak P. B., Tomari Y. 2012. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19 : 145—151.

- Laganà A., Veneziano D., Russo F., Pulvirenti A., Giugno R., Croce C. M., Ferro A. 2015. Computational design of artificial RNA molecules for gene regulation. *Methods Mol. Biol.* 1269 : 393—412.
- Lam W. Y., Yeung A. C., Ngai K. L., Li M. S., To K. F., Tsui S. K., Chan V. K. 2013. Effect of avian influenza A H5N1 infection on the expression of microRNA-141 in human respiratory epithelial cells. *BMC Microbiol.* 13 : 104.
- Lanford R. E., Hildebrandt-Eriksen E. S., Petri A., Persson R., Lindow M., Munk M. E., Kauppinen S., Ørum H. 2010. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science.* 327 : 198—201.
- Lee H. Y., Zhou K., Smith A. M., Noland C. L., Doudna J. A. 2013a. Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Res.* 41 : 6568—6576.
- Lee Y., Jeon K., Lee J. T., Kim S., Kim V. N. 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21 : 4663—4670.
- Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K. H., Lee S., Baek S. H., Kim V. N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23 : 4051—4060.
- Lee Y. H., Lai C. L., Hsieh S. H., Shieh C. C., Huang L. M., Wu-Hsieh B. A. 2013b. Influenza A virus induction of oxidative stress and MMP-9 is associated with severe lung pathology in a mouse model. *Virus Res.* 178 : 411—422.
- Lewis B. P., Burge C. B., Bartel D. P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 120 : 15—20.
- Li C., Hu J., Hao J., Zhao B., Wu B., Sun L., Peng S., Gao G. F., Meng S. 2014. Competitive virus and host RNAs: the interplay of a hidden virus and host interaction. *Protein Cell.* 5 : 348—356.
- Li J., Arévalo M. T., Diaz-Arévalo D., Chen Y., Choi J. G., Zeng M. J. 2015a. Generation of a safe and effective live viral vaccine by virus self-attenuation using species-specific artificial microRNA. *Control. Release.* 207 : 70—76.
- Li T., Lu H., Mukherjee D., Lahiri S. K., Shen C., Yu L., Zhao J. 2015b. Identification of epidermal growth factor receptor and its inhibitory microRNA141 as novel targets of Krüppel-like factor 8 in breast cancer. *Oncotarget.* 6 : 21 428—21 442.
- Li W. X., Li H., Lu R., Li F., Dus M., Atkinson V., Brydon E. W., Johnson K. L., García-Sastre A., Ball L. A., Palese V., Ding S. W. 2004. Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 1350—1355.
- Li W., Yang X., Jiang Y., Wang B., Yang Y., Jiang Z., Li M. 2011. Inhibition of influenza A virus replication by RNA interference targeted against the PB1 subunit of the RNA polymerase gene. *Arch. Virol.* 156 : 1979—1987.
- Li Y., Chan E. Y., Li J., Ni C., Peng X., Rosenzweig E., Tumphey T. M., Katze M. G. 2010. MicroRNA expression and virulence in pandemic influenza virus-infected mice. *J. Virol.* 84 : 3023—3032.
- Li Y., Li J., Belisle S., Baskin C.R., Tumphey T. M., Katze M. G. 2011. Differential microRNA expression and virulence of avian, 1918 reassortant, and reconstructed 1918 influenza A viruses. *Virology.* 421 : 105—113.
- Li Y., Lu J., Han Y., Fan X., Ding S.W. 2013. RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science.* 342 : 231—234.
- Liang H. W., Zhou Z., Zhang S. Y., Zen K., Chen X., Zhang C. Y. 2014. Identification of Ebola virus microRNAs and their putative pathological function. *Sci. China Life Sci.* 57 : 973—981.
- Liang W., Chow M. Y., Lau P. N., Zhou Q. T., Kwok P. C., Leung G. P., Mason A. J., Chan H. K., Poon L. L., Lam J. K. 2015. Inhalable dry powder formulations of siRNA and pH-responsive peptides with antiviral activity against H1N1 influenza virus. *Mol. Pharm.* 12 : 910—921.
- Lin R. J., Chien H. L., Lin S. Y., Chang B. L., Yu H. P., Tang W. C., Lin Y. L. 2013. MCP1P1 ribonuclease exhibits broad-spectrum antiviral effects through viral RNA binding and degradation. *Nucleic Acids Res.* 41 : 3314—3326.
- Lin X., Liang D., He Z., Deng Q., Robertson E. S., Lan K. 2011. miR-K12-7-5p encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stabilizes the latent state by targeting viral ORF50/RTA. *PLoS ONE.* 6 : e16224.
- Lin X., Zhou X., Liu D., Yun L., Zhang L., Chen X., Chai Q., Li L. 2016. MicroRNA-29 regulates high-glucose-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells through PTEN. *In Vitro Cell. Develop. Biol. — Animal.* 52 : 419—426.
- Linke L. M., Wilusz J., Pablonia K. L., Fruehauf J., Magnusson R., Olea-Popelka F., Triantis J., Landolt G., Salman M. 2016. Inhibiting avian influenza virus shedding using a novel RNAi antiviral vector technology: proof of concept in an avian cell model. *AMB Express.* 6 : 16.
- Liu D. G. 2014. MicroRNAs in human virus genomes: helping hands for viral infection. *Microna.* 3 : 75—85.
- Liu J., Carmell M. A., Rivas F. V., Marsden C. G., Thomson J. M., Song J. J., Hammond S. M., Joshua-Tor L., Hannon G. J. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 30 : 1437—1441.
- Liu S. Y., Aliyari R., Chikere K., Li G., Marsden M. D., Smith J. K., Pernet O., Guo H., Nusbaum R., Zack J. A., Freiberg A. N., Su L., Lee B., Cheng G. 2013. Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol. *Immunity.* 38 : 92—105.
- Liu Y., Chang Y., Xu D., Li Z., Zhang H., Li J., Tian M. 2013. Optimised design of siRNA based on multi-featured comparison and analysis of H1N1 virus. *Int. J. Data Min. Bioinform.* 7 : 345—357.
- Liu Z. P., Wu H., Zhu J., Miao H. 2014. Systematic identification of transcriptional and post-transcriptional regulations in human respiratory epithelial cells during influenza A virus infection. *BMC Bioinformatics.* 15 : 336.
- Loeb G. B., Khan A. A., Canner D., Hiatt J. B., Shendure J., Darnell R. B., Leslie C. S., Rudensky A. Y. 2012. Transcriptome-wide miR-155 binding map reveals widespread noncanonical microRNA targeting. *Mol. Cell.* 48 : 760—770.
- Loveday E.-K., Diederich S., Pasick J., Jean F. 2015. Human microRNA-24 modulates highly pathogenic avian-origin H5N1 influenza A virus infection in A549 cells by targeting secretory pathway furin. *J. Gen. Virol.* 96 : 30—39.
- Lu F., Weidmer A., Liu C. G., Volinia S., Croce C. M., Lieberman P. M. 2008. Epstein-Barr virus-induced miR-155 attenuates NF-kappaB signaling and stabilizes latent virus persistence. *J. Virol.* 82 : 10 436—10 443.
- Luna J. M., Scheel T. K., Danino T., Shaw K. S., Mele A., Fak J. J., Nishiuchi E., Takacs C. N., Catanese M. T., de Jong Y. P., Jacobson I. M., Rice C. M., Darnell R. B. 2015. Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122. *Cell.* 160 : 1099—1110.
- Ma E., MacRae I. J., Kirsch J. F., Doudna J. A. 2008. Autoinhibition of human Dicer by its internal helicase domain. *J. Mol. Biol.* 380 : 237—243.
- Ma Y. J., Yang J., Fan X. L., Zhao H., Hu W., Li Z. P., Yu G. C., Ding X., Wang J., Bo X. C., Zheng X. F., Zhou Z., Wang S. Q. 2012. Cellular microRNA let-7c inhibits M1 protein expression of the H1N1 influenza A virus in infected human lung epithelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 16 : 2539—2546.
- Machlin E. S., Sarnow P., Sagan S. M. 2011. Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA—target RNA complex. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 108 : 3193—3198.
- Maillard P. V., Ciaudo C., Marchais A., Li Y., Jay F., Ding S. W., Voynet O. 2013. Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science.* 342 : 235—238.
- Makkoch J., Poomipak W., Saengchoowong S., Khongnomnan K., Praiananathavorn K., Jinato T., Poovorawan Y., Payungporn S. 2016. Human microRNAs profiling in response to influenza A viruses (subtypes pH1N1 H3N2 and H5N1). *Exp. Biol. Med.* 241 : 409—420.
- Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Luhrmann R., Tuschl T. 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* 110 : 563—574.

- Matskevich A. A., Moelling K. 2007. Dicer is involved in protection against influenza A virus infection. *J. Gen. Virol.* 88 : 2627—2635.
- McCaskill J., Prahirunkit P., Sharp P. M., Buck A. H. 2015. RNA-mediated degradation of microRNAs: a widespread viral strategy? *RNA Biol.* 12 : 579—585.
- McCown M., Diamond M. S., Pekosza A. 2003. The utility of siRNA transcripts produced by RNA polymerase I in down regulating viral gene expression and replication of negative- and positive-strand RNA viruses. *Virology* 313 : 514—524.
- McMillen C. M., Beezhold D. H., Blachere F. M., Othumpangat S., Kashon M. L., Noti J. D. 2016. Inhibition of influenza A virus matrix and nonstructural gene expression using RNA interference. *Virology* 497 : 171—184.
- Morozova N., Zinovyev A., Nonne N., Pritchard L. L., Gorbun A. N., Harel-Bellan A. 2012. Kinetic signatures of microRNA modes of action. *RNA* 18 : 1635—1655.
- Murphy E., Vanicek J., Robins H., Shenk T., Levine A. J. 2008. Suppression of immediate-early viral gene expression by herpesvirus-coded microRNAs: implications for latency. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105 : 5453—5458.
- Nakamura S., Horie M., Daidoji T., Honda T., Yasugi M., Kuno A., Komori T., Okuzaki D., Narimatsu H., Nakaya T., Tomonaga K. 2015. Influenza A virus-induced expression of a GalNAc transferase, GALNT3, via microRNAs is required for enhanced viral replication. *J. Virol.* 90 : 1788—1801.
- Ojha C. R., Rodriguez M., Dever S. M., Mukhopadhyay R., El-Hage N. 2016. Mammalian microRNA: an important modulator of host-pathogen interactions in human viral infections. *J. Biomed. Sci.* 23 : 74.
- Omoto S., Ito M., Tsutsumi Y., Ichikawa Y., Okuyama H., Andi B. E., Saksena N. K., Fujii Y. 2004. HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA. *Retrovirology* 1 : 44.
- Ota H., Sakurai M., Gupta R., Valente L., Wulff B. E., Ariyoshi K., Iizasa H., Davuluri R. V., Nishikura K. 2013. ADAR1 forms a complex with Dicer to promote microRNA processing and RNA-induced gene silencing. *Cell* 153 : 575—589.
- Othumpangat S., Noti J. D., Beezhold D. H. 2014. Lung epithelial cells resist influenza A infection by inducing the expression of cytochrome c oxidase VIc which is modulated by miRNA 4276. *Virology* 468 : 256—264.
- Othumpangat S., Noti J. D., Blachere F. M., Beezhold D. H. 2013. Expression of non-structural-1A binding protein in lung epithelial cells is modulated by miRNA-548an on exposure to influenza A virus. *Virology* 447 : 84—94.
- Pantaleo V., Szittyá G., Burgyan J. 2007. Molecular bases of viral RNA targeting by viral small interfering RNA-programmed RISC. *J. Virol.* 8 : 3797—3806.
- Parameswaran P., Sklan E., Wilkins C., Burgon T., Samuel M. A., Lu R., Ansel K. M., Heissmeyer V., Einav S., Jackson W., Doukas T., Paranjape S., Polacek C., dos Santos F. B., Jalili R., Babrzadeh F., Gharizadeh B., Grimm D., Kay M., Koike S., Sarnow P., Ronaghi M., Ding S. W., Harris E., Chow M., Diamond M. S., Kirkegaard K., Glenn J. S., Fire A. Z. 2010. Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. *PLoS Pathog.* 6 : e1000764.
- Peng X., Gao Q. S., Zhou L., Chen Z. H., Lu S., Huang H. J., Zhan C. Y., Xiang M. 2015. MicroRNAs in avian influenza virus H9N2-infected and non-infected chicken embryo fibroblasts. *Genet. Mol. Res.* 14 : 9081—9091.
- Perez J. T., Pham A. M., Lorini M. H., Chua M. A., Steel J., tenOever B. R. 2009. MicroRNA-mediated species-specific attenuation of influenza A virus. *Nat. Biotechnol.* 27 : 572—576.
- Peters L., Meister G. 2007. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol. Cell* 26 : 611—623.
- Pichulik T., Khatamzas E., Liu X., Brain O., Delmiro Garcia M., Leslie A., Danis B., Mayer A., Baban D., Ragoussis J., Weber A. N., Simmons A. 2016. Pattern recognition receptor mediated downregulation of microRNA-650 fine-tunes MxA expression in dendritic cells infected with influenza A virus. *Eur. J. Immunol.* 46 : 167—177.
- Powdrill M. H., Desrochers G. F., Singaravelu R., Pezacki J. P. 2016. The role of microRNAs in metabolic interactions between viruses and their hosts. *Curr. Opin. Virol.* 19 : 71—76.
- Rajput R., Khanna M., Kumar P., Kumar B., Sharma S., Gupta N., Saxena L. 2012. Small interfering RNA targeting the non-structural gene 1 transcript inhibits influenza A virus replication in experimental mice. *Nucleic Acid Therapy* 22 : 414—422.
- Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W. S., Khvorova A. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22 : 326—330.
- Rivera A., Barr T., Rais M., Engelmann F., Messaoudi I. 2016. microRNAs regulate host immune response and pathogenesis during influenza infection in Rhesus macaques. *Viral Immunol.* 29 : 212—227.
- Robb G. B., Rana T. M. 2007. RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol. Cell* 26 : 523—537.
- Robertson K. A., Hsieh W. Y., Forster T., Blanc M., Lu H., Crick P. J., Yutuc E., Watterson S., Martin K., Griffiths S. J., Enright A. J., Yamamoto M., Pradeepa M. M., Lennox K. A., Behlke M. A., Talbot S., Haas J., Dölken L., Griffiths W. J., Wang Y., Angulo A., Ghazal P. 2016. An interferon regulated microRNA provides broad cell-intrinsic antiviral immunity through multihit host-directed targeting of the sterol pathway. *PLoS Biol.* 14 : e1002364.
- Rouha H., Thurner C., Mandl C. W. 2010. Functional microRNA generated from a cytoplasmic RNA virus. *Nucleic Acids Res.* 38 : 8328—8337.
- Ruby J. G., Jan C. H., Bartel D. P. 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448 : 83—86.
- Ruigrok M. J., Frijlink H. W., Hinrichs W. L. 2016. Pulmonary administration of small interfering RNA: the route to go? *J. Control. Release* 235 : 14—23.
- Russo A., Potenza N. 2011. Antiviral effects of human microRNAs and conservation of their target sites. *FEBS Lett.* 585 : 2551—2555.
- Saini H. K., Griffiths-Jones S., Enright A. J. 2007. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 104 : 17 719—17 724.
- Saladino R., Barontini M., Crucianelli M., Nencioni L., Sgarbanti R., Palamara A. T. 2010. Current advances in anti-influenza therapy. *Curr. Med. Chem.* 17 : 2101—2140.
- Samji T. 2009. Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J. Biol. Med.* 82 : 153—159.
- Scaria V., Hariharan M., Maiti S., Pillai B., Brahmachari S. K. 2006. Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirology* 11 : 68.
- Schuck J., Gursinsky T., Pantaleo V., Burgyan J., Behrens S. E. 2013. AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant *in vitro* system. *Nucleic Acids Res.* 41 : 5090—5103.
- Shapiro J. S., Varble A., Pham A. M., tenOever B. R. 2010. Noncanonical cytoplasmic processing of viral microRNAs. *RNA* 16 : 2068—2074.
- Shapiro J. S., Langlois R. A., Pham A. M., tenOever B. R. 2012. Evidence for a cytoplasmic microprocessor of pri-miRNAs. *RNA* 18 : 1338—1346.
- Shapiro J. S., Schmid S., Aguado L. C., Sabin L. R., Yasunaga A., Shim J. V., Sachs D., Cherry S., tenOever B. R. 2014. Drosha as an interferon-independent antiviral factor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 111 : 7108—7113.
- Sharma D., Priyadarshini P., Vrati S. 2015. Unraveling the web of viroinformatics: computational tools and databases in virus research. *J. Virol.* 89 : 1489—1501.
- Shen X., Sun W., Shi Y., Xing Z., Su X. 2015. Altered viral replication and cell responses by inserting microRNA recognition element into PB1 in pandemic influenza A virus (H1N1). *Mediators Inflamm.* 2015 : 976 575.
- Shi J., Sun J., Wang B., Wu M., Zhang J., Duan Z., Wang H., Hu N., Hu Y. 2014. Novel microRNA-like viral small regulatory RNAs arising during human hepatitis A virus infection. *FASEB J.* 28 : 4381—4393.

- Short K. R., Kroeze E. J., Fouchier R. A., Kuiken T. 2014. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *Lancet Infect. Dis.* 14 : 57—69.
- Shuey D. J., McCallus D. E., Giordano T. 2002. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. *Drug Discov. Today.* 7 : 1040—1046.
- Singaravelu R., O'Hara S., Jones D. M., Chen R., Taylor N. G., Srinivasan P., Quan C., Roy D. G., Steenbergen R. H., Kumar A., Lyn R. K., Özcelik D., Rouleau Y., Nguyen M. A., Rayner K. J., Hobman T. C., Tyrrell D. L., Russell R. S., Pezacki J. P. 2015. MicroRNAs regulate the immunometabolic response to viral infection in the liver. *Nat. Chem. Biol.* 11 : 988—993.
- Skalsky R. L., Cullen B. R. 2010. Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 64 : 123—141.
- Skovgaard K., Cirera S., Vasby D., Podolska A., Breum S. Ø., Dürrwald R., Schlegel M., Heegaard P. M. 2013. Expression of innate immune genes proteins and microRNAs in lung tissue of pigs infected experimentally with influenza virus (H1N2). *Innate Immun.* 19 : 531—544.
- Song L., Liu H., Gao S., Jiang W., Huang W. 2010. Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells. *J. Virol.* 84 : 8849—8860.
- Stenvang J., Petri A., Lindow M., Obad S., Kauppinen S. 2012. Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence.* 3 : 1.
- Stoppani E., Bassi I., Dotti S., Lizier M., Ferrari M., Lucchini F. 2015. Expression of a single siRNA against a conserved region of NP gene strongly inhibits *in vitro* replication of different Influenza A virus strains of avian and swine origin. *Antiviral Res.* 120 : 16—22.
- Sui H. Y., Zhao G. Y., Huang J. D., Jin D. Y., Yuen K. Y., Zheng B. J. 2009. Small interfering RNA targeting m2 gene induces effective and long term inhibition of influenza A virus replication. *PLoS ONE.* 4 : e5671.
- Suzuki H., Saitoh H., Suzuki T., Takaku H. 2009. Inhibition of influenza virus by baculovirus-mediated shRNA. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxford).* 53 : 287—288.
- Svancarova P., Svetlikova D., Betakova T. 2015. Synergic and antagonistic effect of small hairpin RNAs targeting the NS gene of the influenza A virus in cells and mice. *Virus Res.* 195 : 100—111.
- Swaminathan G., Martin-Garcia J., Navas-Martin S. 2013. RNA viruses and microRNAs: challenging discoveries for the 21st century. *Physiol. Genomics.* 45 : 1035—1048.
- Takane K., Kanai A. 2011. Vertebrate virus-encoded microRNAs and their sequence conservation. *Jpn. J. Infect. Dis.* 64 : 357—366.
- Tambyah P. A., Sepramaniam S., Mohamed Ali J., Chai S. C., Swaminathan P., Armugam A., Jeyaseelan K. 2013. MicroRNAs in circulation are altered in response to influenza A virus infection in humans. *PLoS ONE.* 8 : e76811.
- Tan K. S., Choi H., Jiang X., Yin L., Seet J. E., Patzel V., Engelward B. P., Chow V. T. 2014. Micro-RNAs in regenerating lungs: an integrative systems biology analysis of murine influenza pneumonia. *BMC Genomics.* 15 : 587.
- Tay Y., Rinn J., Pandolfi P. P. 2014. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature.* 505 : 344—352.
- Tejaro J. R. 2015. The role of cytokine responses during influenza virus pathogenesis and potential therapeutic options. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 386 : 3—22.
- tenOever B. R. 2013. RNA viruses and the host microRNA machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* 11 : 169—180.
- Terrier O., Textoris J., Carron C., Marcel V., Bourdon J. C., Rosa-Calatrava M. 2013. Host microRNA molecular signatures associated with human H1N1 and H3N2 influenza A viruses reveal an unanticipated antiviral activity for miR-146a. *J. Gen. Virol.* 94 : 985—995.
- Thomas M., Lu J. J., Ge Q., Zhang C., Chen J., Klibanov A. M. 2005. Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 5679—5684.
- Tompkins S. M., Lo C. Y., Tumpey T. M., Epstein S. L. 2004. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 8682—8686.
- Tóth K. F., Pezic D., Stuwe E., Webster A. 2016. The piRNA pathway guards the germline genome against transposable elements. *Adv. Exp. Med. Biol.* 886 : 51—77.
- Tsai W. C., Hsu P. W., Lai T. C., Chau G. Y., Lin C. W., Chen C. M., Lin C. D., Liao Y. L., Wang J. L., Chau Y. P., Hsu M. T., Hsiao M., Huang H. D., Tsou A. P. 2009. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 49 : 1571—1582.
- Varble A., Chua M. A., Perez J. T., Manicassamy B., Garcia-Sastre A., tenOever B. R. 2010. Engineered RNA viral synthesis of microRNAs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 107 : 11 519—11 524.
- Varble A., tenOever B. R. 2011. Implications of RNA virus-produced miRNAs. *RNA Biol.* 8 : 190—194.
- Vela E. M., Kasoji M. D., Wendling M. Q., Price J. A., Knostman K. A., Bresler H. S., Long J. P. 2014. MicroRNA expression in mice infected with seasonal H1N1 swine H1N1 or highly pathogenic H5N1. *J. Med. Microbiol.* 63 : 1131—1142.
- Wang J., Lu Z., Wientjes M. G., Au J. L. 2010. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *AAPS J.* 12 : 492—503.
- Wang S., Chen C., Yang Z., Chi X., Zhang J., Chen J. L. 2016. Targeted disruption of influenza A virus hemagglutinin in genetically modified mice reduces viral replication and improves disease outcome. *Sci. Rep.* 6 : 23746.
- Wang X., Wang X., Varma R. K., Beauchamp L., Magdaleno S., Sendera T. J. 2009a. Selection of hyperfunctional siRNAs with improved potency and specificity. *Nucleic Acids Res.* 37 : e152.
- Wang Y., Brahmakshatriya V., Lupiani B., Reddy S. M., Soibam B., Benham A. L., Gunaratne P., Liu H. C., Trakooljul N., Ing N., Okimoto R., Zhou H. 2012. Integrated analysis of microRNA expression and mRNA transcriptome in lungs of avian influenza virus infected broilers. *BMC Genomics.* 22 : 278.
- Wang Y., Brahmakshatriya V., Zhu H., Lupiani B., Reddy S. M., Yoon B. J., Gunaratne P. H., Kim J. H., Chen R., Wang J., Zhou H. 2009b. Identification of differentially expressed miRNAs in chicken lung and trachea with avian influenza virus infection by a deep sequencing approach. *BMC Genomics.* 10 : 512.
- Watanabe T., Watanabe S., Kawaoka Y. 2010. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell Host Microbe.* 7 : 427—439.
- Watanabe Y., Kishi A., Yachie N., Kanai A., Tomita M. 2007. Computational analysis of microRNA-mediated antiviral defense in humans. *FEBS Lett.* 581 : 4603—4610.
- Weng K. F., Hsieh P. T., Huang H. I., Shih S. R. 2015. Mammalian RNA virus-derived small RNA: biogenesis and functional activity. *Microbes Infect.* 17 : 557—563.
- Wolf S., Wu W., Jones C., Perwitasari O., Mahalingam S., Tripp R. A. 2016. MicroRNA regulation of human genes essential for influenza A (H7N9) replication. *PLoS ONE.* 11 : e0155104.
- Wu L., Fan J., Belasco J. G. 2006. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 103 : 4034—4039.
- Wu Y., Zhang G., Li Y., Jin Y., Dale R., Sun L. Q., Wang M. 2008. Inhibition of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus replication by RNA oligonucleotides targeting NS1 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365 : 369—374.
- Xu F., Liu G., Liu Q., Zhou Y. 2015. RNA interference of influenza A virus replication by microRNA-adapted lentiviral shRNA. *J. Gen. Virol.* 96 : 2971—2981.
- Yi R., Qin Y., Macara I. G., Cullen B. R. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Develop.* 17 : 3011—3016.
- Yin Q., McBride J., Fewell C., Lacey M., Wang X., Lin Z., Cameron J., Flemington E. K. 2008. MicroRNA-155 is an Epstein—Barr virus-induced gene that modulates Epstein—Barr virus-regulated gene expression pathways. *J. Virol.* 82 : 5295—5306.

Yuan M., Zhan Q., Duan X., Song B., Zeng S., Chen X., Yang Q., Xia J. 2013. A functional polymorphism at miR-491-5p binding site in the 3'-UTR of MMP-9 gene confers increased risk for atherosclerotic cerebral infarction in a Chinese population. *Atherosclerosis*. 226 : 447—452.

Zekri L., Huntzinger E., Heimstad S., Izaurralde E. 2009. The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Mol. Cell. Biol.* 29 : 6220—6231.

Zeng Y., Yi R., Cullen B. R. 2005. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.* 24 : 138—148.

Zhang W., Wang C., Yang S., Qin C., Huc J., Xia X. 2009. Inhibition of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 replication

by the small interfering RNA targeting polymerase A gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390 : 421—426.

Zhang Y., Fan M., Geng G., Liu B., Huang Z., Luo H., Zhou J., Guo X., Cai W., Zhang H. 2014. A novel HIV-1-encoded microRNA enhances its viral replication by targeting the TATA box region. *Retrovirology*. 11 : 23.

Zhou H., Jin M., Yu Z., Xia X., Peng Y., Wu H., Liu J., Liu H., Cao S., Chen H. 2007. Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice. *Antiviral Research*. 76 : 186—193.

Zhou K., He H., Wu Y., Duan M. 2008. RNA interference of avian influenza virus H5N1 by inhibiting viral mRNA with siRNA expression plasmids. *J. Biotechnol.* 135 : 140—144.

Поступила 1 III 2017

RNA INTERFERENCE AND INFLUENZA A VIRUS PATHOGENESIS

A. N. Gorshkov,^{1,2,*} A. V. Petrova,¹ A. V. Vasin^{1,3}

¹ Research Institute of Influenza Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St.-Petersburg, 197376,

² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

³ Peter the Great Polytechnic University, Department of Molecular Biology, St. Petersburg, 195251;

* e-mail: angorsh@yahoo.com

RNA interference was discovered in the 90s during the studies of *Caenorhabditis elegans* nematode. Initially RNA interference has been described as a selective degradation of the mRNA transcript, induced by presence of short interfering RNA (siRNA) — short (20—25 b. p.) exogenous double-stranded RNA which is complementary to mRNA exon sites. Over the last two decades, the concept of RNA interference has become extended. It was recognized as one of the most important and universal elements of gene activity post-transcriptional regulation, which is widespread among prokaryotes, eukaryotes and viruses. In this review we provide a brief description of the various anti-viral and pro-viral RNA interference mechanisms, summarize RNA interference role in the influenza A virus biology, and discuss the opportunities and challenges of RNA interference as a new therapeutic strategy against influenza.

Key words: RNA interference, influenza A virus, microRNA, siRNA, interferon response.