

УДК 577.21

# Модифицированный метод анализа структуры рРНК позволил выявить новые свойства аналогов С/D-бокс-РНК

Ю. А. Филиппова<sup>1,2\*</sup>, Г. А. Степанов<sup>1</sup>, Д. В. Семенов<sup>1</sup>, О. А. Коваль<sup>1,2</sup>, Е. В. Кулигина<sup>1</sup>, И. В. Рабинов<sup>1</sup>, В. А. Рихтер<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

\*E-mail: filipova@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 04.08.2014

После доработки 19.01.2015

**РЕФЕРАТ** Созревание рибосомных РНК (рРНК) представляет собой сложный процесс, в ходе которого отдельные нуклеотиды подвергаются химическим модификациям по азотистым основаниям или остатку рибозы. Одна из самых распространенных модификаций рРНК – 2'-О-метилирование нуклеотидов – осуществляется рибонуклеопротеидными комплексами, содержащими в своем составе малые ядрышковые С/D-бокс-РНК. Поскольку большая часть 2'-О-метилированных нуклеотидов расположена в наиболее консервативных участках рРНК, формирующих важнейшие функциональные центры рибосом, то изменения в профиле 2'-О-метилирования могут приводить к нарушению сборки и функционирования рибосом. Один из основных методов выявления положений 2'-О-метилированных нуклеотидов в протяженных РНК – метод терминации обратной транскрипции. В настоящей работе этот метод адаптирован к использованию флуоресцентно меченных праймеров и анализу продуктов терминации капиллярным гель-электрофорезом на автоматическом геномном анализаторе. С помощью разработанного подхода проанализировано действие синтетических аналогов С/D-бокс-РНК на посттранскрипционные модификации 28S рРНК человека в клетках линии MCF-7. Установлено, что трансфекция клеток MCF-7 аналогом С/D-бокс-РНК приводит к увеличению глубины модификации отдельных сайтов 2'-О-метилирования в рРНК-мишени. Наблюдаемый эффект воздействия синтетических РНК на 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК в клетках человека указывает на возможность направленной регуляции посттранскрипционного созревания рРНК. Представленный подход может найти применение в разработке методов выявления заболеваний человека.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** малые ядрышковые С/D-бокс-РНК, посттранскрипционные модификации нуклеотидов РНК, 2'-О-метилирование РНК, терминация обратной транскрипции.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** рРНК – рибосомная РНК; ПТЦ – пептидилтрансферазный центр; мяоРНК – малая ядрышковая РНК; мяоРПК – малый ядрышковый рибонуклеопротеидный комплекс; FAM – 5(6)-карбокCIFлуоресцеин; M-MLV – Moloney Murine Leukemia Virus, вирус лейкоза мышей Молони; dNTP – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты; ОТ – обратная транскрипция; ПААГ – полиакриламидный гель.

## ВВЕДЕНИЕ

РНК всех живых организмов подвергаются посттранскрипционной модификации и содержат не только канонические, но и модифицированные нуклеотиды, необходимые для правильного функционирования сложных биологических комплексов. Посттранскрипционные модификации существенно влияют на формирование вторичной структуры и функции РНК [1, 2].

Одна из наиболее распространенных модификаций некодирующих РНК у млекопитающих – метилирование нуклеотидов по 2'-О-положению рибозы [3]. Положения многих сайтов 2'-О-метилирования в рРНК носят консервативный характер, а большинство модификаций обнаружены в наиболее эволюционно консервативных и важных участках рРНК, которые играют ключевую роль на различных этапах трансляции [4]. Изменение общей картины распре-

деления модифицированных нуклеотидов или недостаток таких нуклеотидов могут привести к нарушению сборки и функционирования рибосом [5, 6]. Например, показано, что блокирование модификации нуклеотидов пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) рибосом вызывает изменения во вторичной структуре 25S рРНК дрожжей, нарушает трансляционную активность рибосом и повышает, в ряде случаев, чувствительность клеток к действию ингибиторов трансляции [2, 7].

Считается, что модификации способствуют стабилизации «функциональной» структуры рРНК за счет влияния на внутри- и межмолекулярные взаимодействия [2]. На данный момент основной функцией модификаций считают участие в созревании и сборке рибосом: модификация рРНК в определенной степени может служить дополнительным критерием качества новосинтезированной рРНК, что способствует отбору только «правильных» рРНК для включения в рибосомы [8].

Известно, что 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК и малых ядерных РНК клеток млекопитающих осуществляют рибонуклеопротеидные комплексы (мяоРПК), содержащие малые ядрышковые С/D-боксы-РНК [9]. При этом С/D-боксы-РНК, будучи комплементарными участку РНК-мишени, непосредственно участвуют в процессе узнавания нуклеотида-мишени 2'-О-метилирования – модификации подвергается пятый нуклеотид от D-бокса (рис. 1) [10, 11].

Недавно показали, что в клетках некоторых типов рака повышен уровень экспрессии генов С/D-боксы-РНК, а также фибрилларина – ключевого белка мяоРПК, выполняющего роль метилтрансферазы [12, 13]. Установлено, что клетки рака молочной железы разного типа могут отличаться глубиной модификации отдельных нуклеотидов рРНК [14]. Различия в экспрессии отдельных С/D-боксы-РНК выявлены и при разных типах лейкоза [15]. Ранее уже отмечалось, что нарушения в созревании рРНК и синтеза рибосомных белков в клетках человека могут приводить к патологическим изменениям [16, 17]. Таким образом, мяоРНК могут участвовать в онкогенезе, а изменение профиля 2'-О-метилирования рРНК может иметь диагностическую значимость. Поэтому актуальной представляется разработка новых подходов к анализу структуры рРНК и других протяженных клеточных РНК, позволяющих количественно оценивать глубину модификации отдельных нуклеотидов таких РНК.

В настоящей работе метод определения положений 2'-О-метилированных нуклеотидов РНК адаптирован к использованию 5'-флуоресцентно меченных праймеров с последующим анализом продуктов

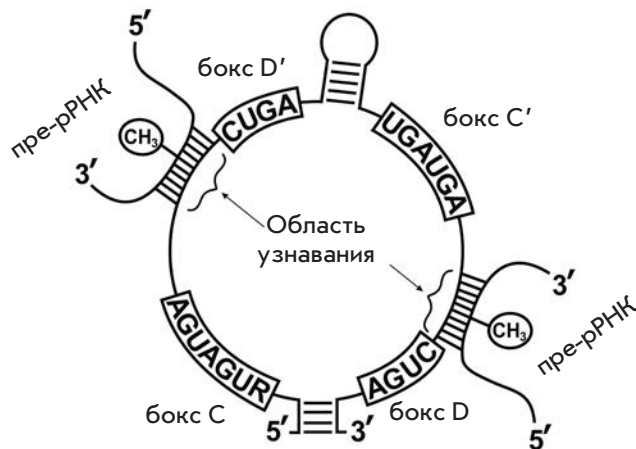


Рис. 1. Структура С/D-боксы-РНК и ее взаимодействие с предшественником рРНК

терминации обратной транскрипции (ОТ) на автоматическом ДНК-анализаторе. При помощи предложенного подхода проведен анализ влияния синтетических аналогов С/D-боксы-РНК на изменение профиля 2'-О-метилированных нуклеотидов рРНК в клетках человека. Показано, что при трансфекции клеток аденокарциномы MCF-7 синтетическими С/D-боксы-РНК, направленными на 28S рРНК, происходит увеличение глубины 2'-О-метилирования отдельных нуклеотидов рРНК-мишени.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### Анализ профилей 2'-О-метилирования 18S и 28S рРНК человека

Номера нуклеотидов рРНК человека приведены в соответствии с GenBank: U13369 (7935–12969 н.) для 28S рРНК и X03205 для 18S рРНК.

Обратную транскрипцию проводили с использованием праймеров, содержащих на 5'-конце [<sup>32</sup>P] либо остаток 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеина (FAM): 18-2 – 5'-ТААТГАТССТТССГСАГГТТС-3' (комплементарен участку 1849–1869 н. 18S рРНК); FAM-28-2.2 – 5'-АТТГГСТССТСАГССААГСА-3' (4608–4627 н. 28S рРНК) и FAM-4491 – 5'-GACGGTCTAAACCCAGCTCA-3' (4491–4510 н. 28S рРНК). Реакционную смесь, содержащую 3.0 мкг суммарной клеточной РНК и 1.4 пмоль праймера, инкубировали при 70°C в течение 3 мин и охлаждали до 4°C. Добавляли буфер для обратной транскрипции, содержащий (мМ) 50 KCl, 50 Трис-НСl (рН 8.3), 4 MgCl<sub>2</sub> и 10 ДТТ; а также 3 ед. акт./мкл обратной транскриптазы М-MLV («Биосан», Новосибирск).

В отдельные пробы добавляли dNTP до конечной концентрации 2.0, 1.0, 0.1 или 0.04 мМ. Реакционную смесь инкубировали 2 ч при 40°C. Продукты ОТ осаждали 75% этанолом, высушивали и растворяли в деионизованной воде.

Секвенирование участка 18S рРНК проводили методом обратной транскрипции в присутствии ddNTP. Для этого инкубировали 3.0 мкг суммарной клеточной РНК и 1.4 пмоль праймера 18-2 в течение 3 мин при 70°C, охлаждали до 4°C. К смеси добавляли один из ddNTP: ddATP до конечной концентрации 5.0 мкМ, ddCTP – 2.5 мкМ, ddGTP – 5.0 мкМ или dTTP – 5.0 мкМ. Конечная концентрация dNTP, соответствующего ddNTP в смеси, равна 25 мкМ, а остальных dNTP – 100 мкМ. К полученной смеси добавляли буфер для обратной транскрипции (см. выше), а также 2.0 мМ MnCl<sub>2</sub>, 10 мМ ДТТ и 3 ед. акт./мкл обратной транскриптазы M-MLV. Смесь инкубировали в течение 90 мин при 40°C. Продукты ОТ осаждали 75% этанолом, высушивали и растворяли в деионизованной воде.

#### Анализ продуктов обратной транскрипции рибосомных РНК клеток человека

Флуоресцентно меченные продукты обратной транскрипции рРНК анализировали на анализаторе ABI3100 Applied Biosystems (ЦКП «Геномика» СО РАН). Данные анализировали с помощью программного обеспечения Peak Scanner Software версии 1.0 (Applied Biosystems, США). Относительное изменение выхода продуктов ОТ определяли с использованием значений площадей пиков, нормированных на сумму площадей пиков, относительная интенсивность которых изменялась меньше чем на 20%. Представлены средние данные как минимум трех независимых экспериментов.

#### Получение синтетических С/Д-боксов-РНК

Аналоги С/Д-боксов-РНК были получены с помощью транскрипции *in vitro* согласно [18, 19]:

28A4518 (98 н.)

5'-

GACUCAGCAUGCGUGUUCAUGCUAUGAUGAAA-AAGUCAACUUAGGCGUGGUUGUGGCCUAAAA-CUAACCGUCUCUGAUGGCAGAGGCAUGCUGA-GUC-3';

РНК3 (77 н.)

5'-

GGGUGCAGAUAGAUGUAAAAUAGCGACGGGCGG-UGCUGAGAGAUGGUGAUGAACGGUCUAAACCC-AGCUGAUGCACCC-3';

РНК5 (77 н.)

5'-

GGGUGCAGAUAGAUGUAAAAUAGCGACGGGCGG-

UGCUGAGAGAUGGUGAUGAACGACGGUCUAAA-CCCUGAUGCACCC-3';

РНК5mC (77 н.)

5'-

GGGUGCAGACAGCACAAAAUAGCGACGGGCGG-UGCUGAGAGAUGGCAGCAGACGACGGUCUAAA-CCCUGAUGCACCC-3';

РНК5D/N (77 н.)

5'-

GGGUGCAGAUAGAUGUAAAAUAGCGACGGGCGG-UGCUGAGAGAUGGUGAUGAACGACGGUCUAAA-CCAGUCUGCACCC-3';

РНК5mD (77 н.)

5'-

GGGUGCAGAUAGAUGUAAAAUAGCGACGGGCGG-UGAAAAAGAGAUGGUGAUGAACGACGGUCUAAA-CCAAAAUGCACCC-3'.

Подчеркнута область узнавания нуклеотидов рРНК, жирным шрифтом выделены консервативные элементы (С- и D-боксы).

#### Трансфекция клеток MCF-7 синтетическими РНК. Выделение суммарной клеточной РНК

Клетки MCF-7 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, ИИЦ РАН, Санкт-Петербург) культивировали в среде IMDM с 10 мМ L-глутамином и 40 мкг/мл гентамицина в присутствии 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

Синтетические аналоги С/Д-боксов-РНК (10<sup>-6</sup> М) предварительно инкубировали с липофектаминам (Lipofectamine Reagent, Invitrogen, США) в концентрации 0.06 мг/мл в течение 15 мин при 20°C. Клетки MCF-7 трансфицировали комплексом липофектамина с РНК (конечная концентрация РНК в среде 7 × 10<sup>-8</sup> М). Контрольные клетки инкубировали в среде с липофектаминам (6 мкг/мл). После 24 ч инкубации суммарную РНК клеток выделяли с помощью Trizol Reagent (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Сохранность суммарной РНК оценивали электрофорезом на Lab-on-chip анализаторе нуклеиновых кислот Agilent Bioanalyzer и использовали препараты со значениями RIN не менее 8.0. Профиль 2'-О-метиличивания рРНК анализировали как описано выше.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

##### Модификация метода терминации обратной транскрипции

Метод терминации обратной транскрипции основан на способности 2'-О-метиличиванных нуклеотидов вызывать остановку ревертазы при концентрации dNTP менее 1 мМ [20]. По длине

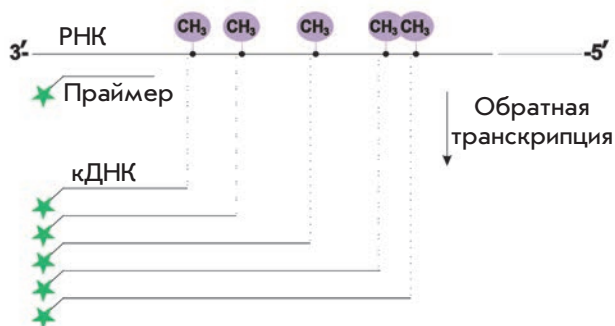


Рис. 2. Метод терминции обратной транскрипции

продуктов терминции ОТ можно судить о положениях 2'-О-метилованных нуклеотидов в анализируемой РНК-матрице [21] (рис. 2). В отличие от стандартной методики, которая предполагает проведение реакции обратной транскрипции с радиоактивно меченным праймером и разделение кДНК-продуктов в полиакриламидном геле с последующей радиоавтографией, разработанный нами подход основан на использовании флуоресцентно меченных праймеров и анализе кДНК капиллярным гель-электрофорезом на автоматическом генном анализаторе.

Возможность применения такого подхода к определению положений 2'-О-метилованных нуклеотидов в РНК изучали с помощью обратной транскрипции 18S или 28S рРНК из линии клеток MCF-7 с [5'-<sup>32</sup>P]- или 5'-ФАМ-мечеными праймерами. На рис. 3 представлено сравнение типичных результатов «стандартного» метода с использованием радиоактивно меченных праймеров и метода, адаптированного к анализу флуоресцентно меченных кДНК-продуктов на автоматическом ДНК-анализаторе. Видно, что наборы кДНК-продуктов на рис. 3А,Б хорошо согласуются между собой по длине и относительному выходу.

Для точного определения соответствия детектируемых продуктов терминции ОТ положениям конкретных нуклеотидов РНК-матрицы мы разделяли продукты реакции секвенирования по Сэнгеру участка 18S рРНК (рис. 3А, нижняя вставка).

Воспроизводимость результатов оценивали с использованием данных трехкратного повторения обратной транскрипции суммарной клеточной РНК с праймерами, специфичными к различным участкам 18S и 28S рРНК, с последующим разделением ДНК-транскриптов на генном анализаторе. В серии экспериментов было установлено, что главные продукты терминции ОТ одинаковых участков рРНК-матрицы согласуются по времени выхода ( $\pm 1$  н.) и интенсивностям сигналов кДНК ( $\pm 10\%$ ) (данные не приведены).

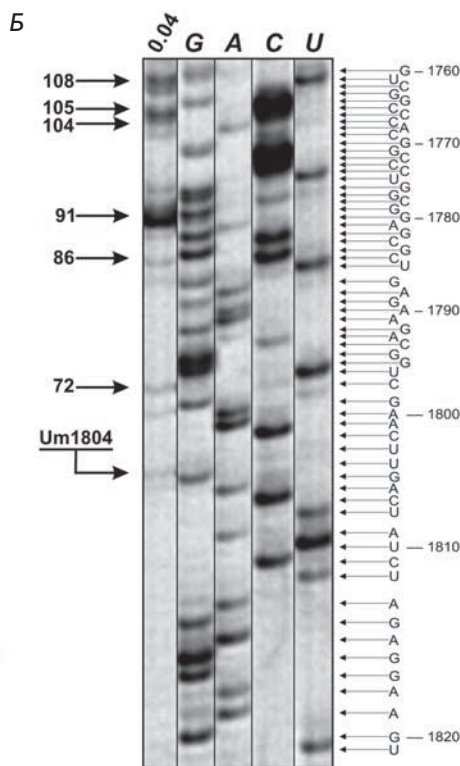
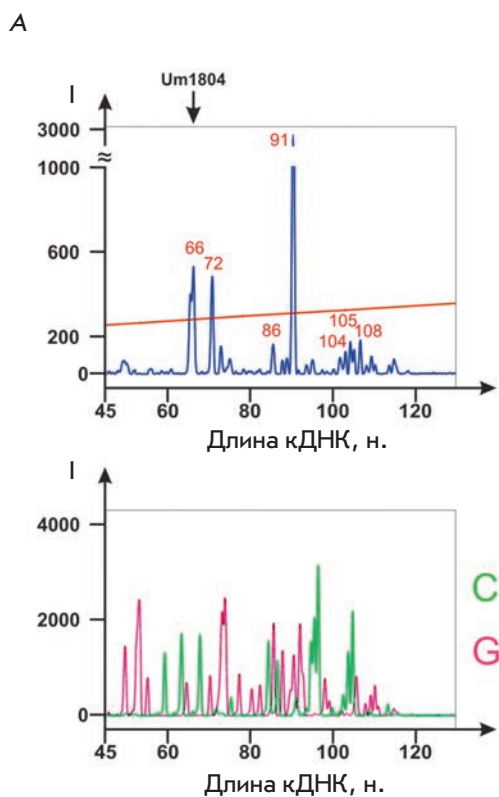
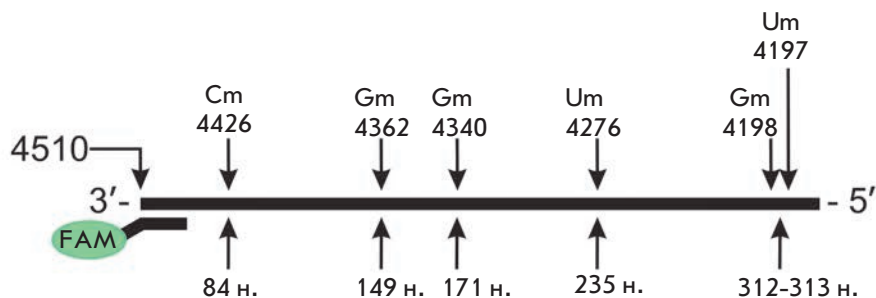
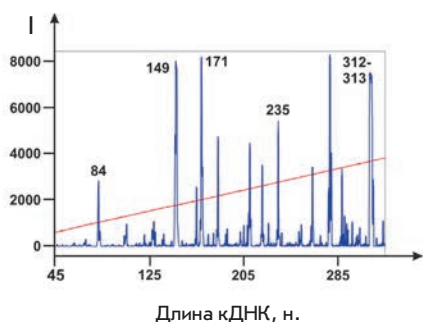


Рис. 3. Сравнение продуктов терминции обратной транскрипции 18S рРНК с [5'-<sup>32</sup>P]-меченым и 5'-ФАМ-меченым праймером 18-2 (в присутствии 0.04 мМ dNTP). А – разделение 5'-ФАМ-меченных продуктов терминции ОТ капиллярным электрофорезом на автоматическом ДНК-анализаторе (верхняя вставка); продукты терминции ОТ 18S рРНК в присутствии ddGTP и ddCTP (нижняя вставка). Б – разделение [5'-<sup>32</sup>P]-меченных продуктов ОТ в 12% денатурирующем ПААГ. Дорожка 0.04 – продукты терминции ОТ при 0.04 мМ dNTP. Дорожки G, A, C и U – терминция ОТ 18S рРНК в присутствии ddCTP, dTTP, ddGTP и ddATP соответственно

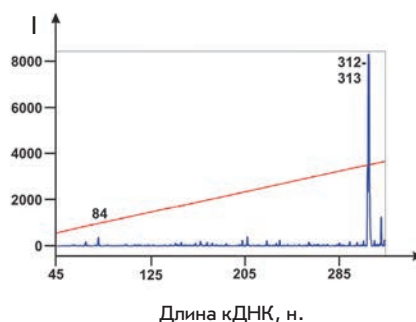
A



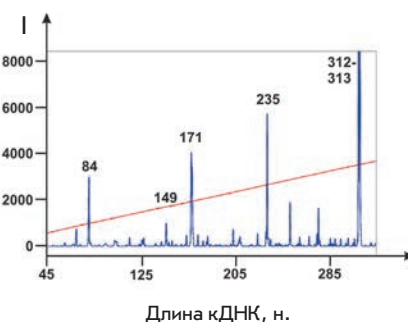
Б



В



Г



**Рис. 4.** Анализ кДНК-продуктов терминации ОТ, соответствующих известным сайтам 2'-О-метилирования в 28S рРНК. А – схема расположения 2'-О-метилированных нуклеотидов в 28S рРНК и длин соответствующих им кДНК-продуктов терминации ОТ с праймера FAM-4491. Б–Г – разделение FAM-меченых продуктов терминации ОТ на автоматическом ДНК-анализаторе. ОТ 28S рРНК клеток MCF-7 проводили при следующих концентрациях dNTP в реакционной смеси (мМ): Б – 0.1, В – 1.0, Г – 2.0

С помощью предлагаемого метода мы проанализировали наборы продуктов терминации ОТ 28S рРНК человека при разных концентрациях мономеров в реакционной смеси. В дополнение к стандартным условиям эксперимента по терминации ОТ, при которых используют пониженные концентрации dNTP в реакционной смеси (0.001–0.1 мМ) [21], мы проводили реакцию и при повышенных концентрациях мономеров (2.0 мМ). Из рис. 4 видно, что при понижении концентрации dNTP в реакционной смеси увеличивается выход кДНК-продуктов длиной 84, 149, 171 и 235 н., соответствующих известным сайтам 2'-О-метилирования – Cm4426, Gm4362, Gm4340 и Um4276 (рис. 4Б,В). ОТ терминируется непосредственно на модифицированном нуклеотиде (Gm4362, Gm4340 и Um4276) либо на нуклеотиде, прилежащем с 3'-конца к 2'-О-метилированному (Cm4426). Кроме того, установлено, что при повышении концентрации dNTP до 2.0 мМ удастся увеличить специфичность терминации на 2'-О-метилированных нуклеотидах рРНК. Так, при 2.0 мМ dNTP выход продуктов терминации, не относящихся к 2'-О-метилированным нуклеотидам РНК-матрицы, значительно снижает-

ся по сравнению с ОТ, проводимой при 0.1 мМ dNTP (рис. 4Б,Г).

Преимуществом нового подхода является возможность количественной оценки выхода продуктов терминации ОТ. При этом разделение продуктов терминации на автоматическом геномном анализаторе позволяет получать более полную информацию о распределении сайтов терминации в структуре РНК-матрицы за счет анализа более протяженных участков РНК по сравнению со стандартным разделением кДНК в денатурирующем ПААГ. Предложенный подход может быть использован как для идентификации модифицированных нуклеотидов в природных РНК и подтверждения положений сайтов модификации в синтетических РНК, так и для решения других задач, связанных с анализом структуры протяженных РНК, методом обратной транскрипции.

#### **Влияние аналогов С/Д-боксов-РНК на профиль 2'-О-метилирования нуклеотидов рРНК человека**

Представленный в нашей работе подход был использован для изучения влияния аналогов малых ядерш-

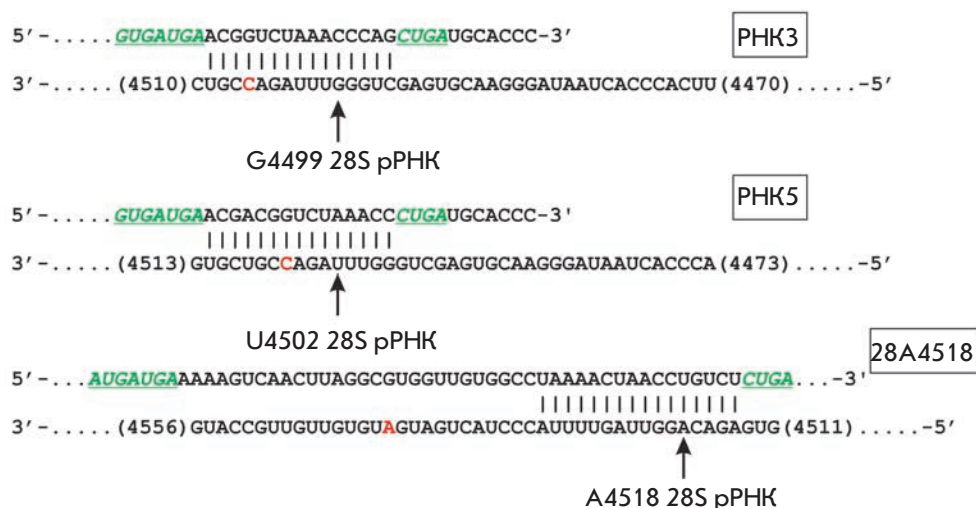


Рис. 5. Конструирование синтетических аналогов С/D-боксов-РНК. Консервативные элементы аналогов мяоРНК – С (С')- и D (D')-боксы – выделены зеленым цветом. Нуклеотиды-мишени в рРНК обозначены стрелкой с указанием номера нуклеотида в соответствии с [26]. Известные 2'-О-метилованные нуклеотиды в структуре 28S рРНК выделены красным цветом. В рамках справа приведены обозначения аналогов С/D-боксов-РНК, содержащих в своей структуре соответствующую область комплементарности к рРНК

ковых С/D-боксов-РНК на процессинг рРНК-мишеней в клетках человека. Ранее J. Cavaille и соавт. показали возможность направления 2'-О-метилования нуклеотидов рРНК с использованием ДНК-конструкций, кодирующих С/D-боксов-РНК [22]. Нами были сконструированы и получены синтетические аналоги малых ядрышковых С/D-боксов-РНК человека, содержащие измененные области узнавания мишени (рис. 1). В качестве мишеней синтетических С/D-боксов-РНК были выбраны нуклеотиды рРНК человека, входящие в состав или находящиеся вблизи ПТЦ рибосом – G4499, U4502 и A4518 28S рРНК [23–25]. Аналоги малых ядрышковых С/D-боксов-РНК были сконструированы таким образом, чтобы их последовательности содержали необходимые компоненты для направления 2'-О-метилования в заранее заданный нуклеотид-мишень: консервативные области С- и D-боксов (домены узнавания белков мяоРНК); а также область, комплементарную участку рРНК-мишени (рис. 5).

Аналог С/D-боксов-РНК – 28A4518 – имел структуру, способную направлять 2'-О-метилование нуклеотида A4518 28S рРНК. Из рис. 6В видно, что трансфекция РНК 28A4518 в клетки человека линии MCF-7 не вызывает появления нового продукта терминации в положении нуклеотида-мишени, соответствующему кДНК длиной 109 н. Вопрос отсутствия модификации нуклеотидов-мишеней в составе рРНК мы обсуждали ранее [18]. В частности, мы полагаем, что наблюдаемое отсутствие 2'-О-метилования нуклеотидов-мишеней может указывать на низкое содержание модифицированной рРНК в клетках вследствие ее быстрой деградации. Как показано в работах В. Liu и М. J. Fournier с соавт., 2'-О-метилование ряда нуклеотидов, формирующих активные центры рибосом клеток дрожжей,

индуцирует деградацию рРНК-мишеней и приводит к снижению скорости роста клеток [23, 27, 28].

Несмотря на отсутствие терминации на нуклеотиде-мишени РНК 28A4518, трансфекция клеток синтетическим аналогом приводила к изменению глубины 2'-О-метилования известных сайтов модификации рРНК. Из данных рис. 6 видно, что увеличивается выход продуктов терминации, соответствующих положениям 2'-О-метилованных Gm4362, Gm4198 и Um4197 (рис. 6Б,В). Сравнение значений интенсивностей кДНК-продуктов показало, что трансфекция клеток аналогом РНК 28A4518 приводит к усилению терминации на нуклеотиде Gm4362 в 1.5 раза, тогда как выход продукта длиной 428–429 н. (Gm4198 и Um4197) возрастает в 2.2 раза. Повышение выхода продуктов ОТ, соответствующих остановке ревертазы на 2'-О-метилованных нуклеотидах, указывает на большую глубину модификации этих нуклеотидов рРНК в трансфицированных клетках.

Изменение глубины модификации нуклеотидов рибосомных РНК может быть связано с увеличением локальной концентрации компонентов комплексов, осуществляющих 2'-О-метилование нуклеотидов при созревании ядрышкового предшественника рРНК. Нуклеотиды Gm4362, Gm4198 и Um4197 28S рРНК находятся на значительном расстоянии (более 150 н.) от участка комплементарности аналогов С/D-боксов-РНК к рРНК (рис. 5). Увеличение глубины 2'-О-метилования перечисленных нуклеотидов может быть связано с их сближенностью в пространственной структуре предшественника рРНК с нуклеотидами-мишенями С/D-боксов-РНК и миграцией компонентов метилтрансферазного комплекса от дуплекса С/D-боксов-РНК · рРНК к ближайшим нуклеотидам рРНК. Нельзя исключать также воз-

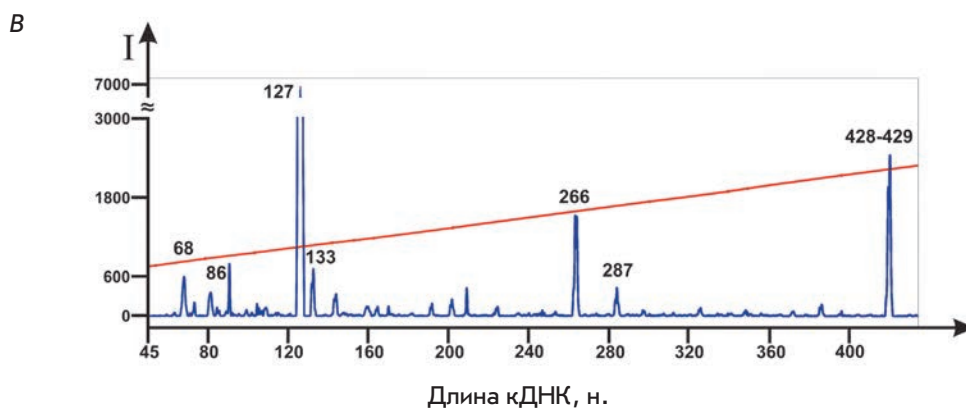
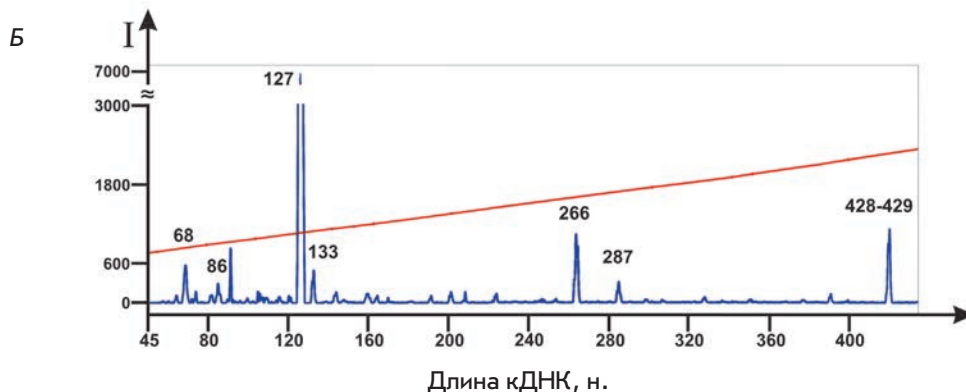
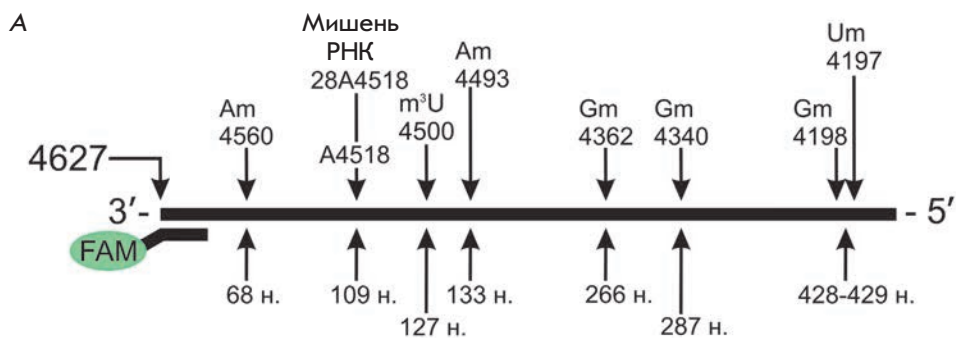


Рис. 6. Влияние синтетических аналогов С/D-боксов-РНК на выход продуктов терминации ОТ рРНК. А – схема расположения 2'-О-метилованных нуклеотидов в 28S рРНК и длин соответствующих им продуктов терминации ОТ с праймера FAM-28-2.2. Продукты ОТ рРНК контрольных клеток МСF-7 (Б) и клеток МСF-7, трансфицированных аналогом 28А4518 (В). ОТ рРНК проводили при концентрации dNTP 0.04 мМ

возможное влияние синтетических РНК на вторичную структуру рРНК и взаимодействие с независимыми трансфакторами, контролирующими этапы созревания рРНК в клетках эукариот, такими, как РНК-геликазы [29].

Усиление терминации ОТ на известных сайтах 2'-О-метилования мы наблюдали при изучении воздействия других аналогов С/D-боксов-РНК на клетки человека. В частности, аналоги РНК3 и РНК5 были сконструированы таким образом, чтобы направлять 2'-О-метилование нуклеотидов 28S рРНК G4499 и U4502 соответственно. Трансфекция клеток МСF-7 аналогом РНК3 или РНК5 не индуцировала модификации нуклеотида-мишени, но приводила к усилению глубины 2'-О-метилования нуклеотида См4506

28S рРНК (рис. 7В,Г). Данные, представленные на рис. 7 и в таблице, показывают, что после трансфекции клеток МСF-7 синтетическими РНК3 и РНК5 выход кДНК-продукта длиной 121 н. увеличивается в 40 и 7 раз соответственно. Этот кДНК-продукт образуется в результате терминации ревертазы М-MLV на 2'-О-метилованном См4506 28S рРНК при элонгации праймера FAM-28-2.2. Наблюдаемое повышение выхода продукта терминации указывает на увеличение глубины 2'-О-метилования См4506.

С целью определения структурных особенностей аналогов С/D-боксов-РНК, влияющих на глубину природного 2'-О-метилования нуклеотидов рРНК, были получены аналоги С/D-боксов-РНК5, содержащие замены в последовательности С(С')-

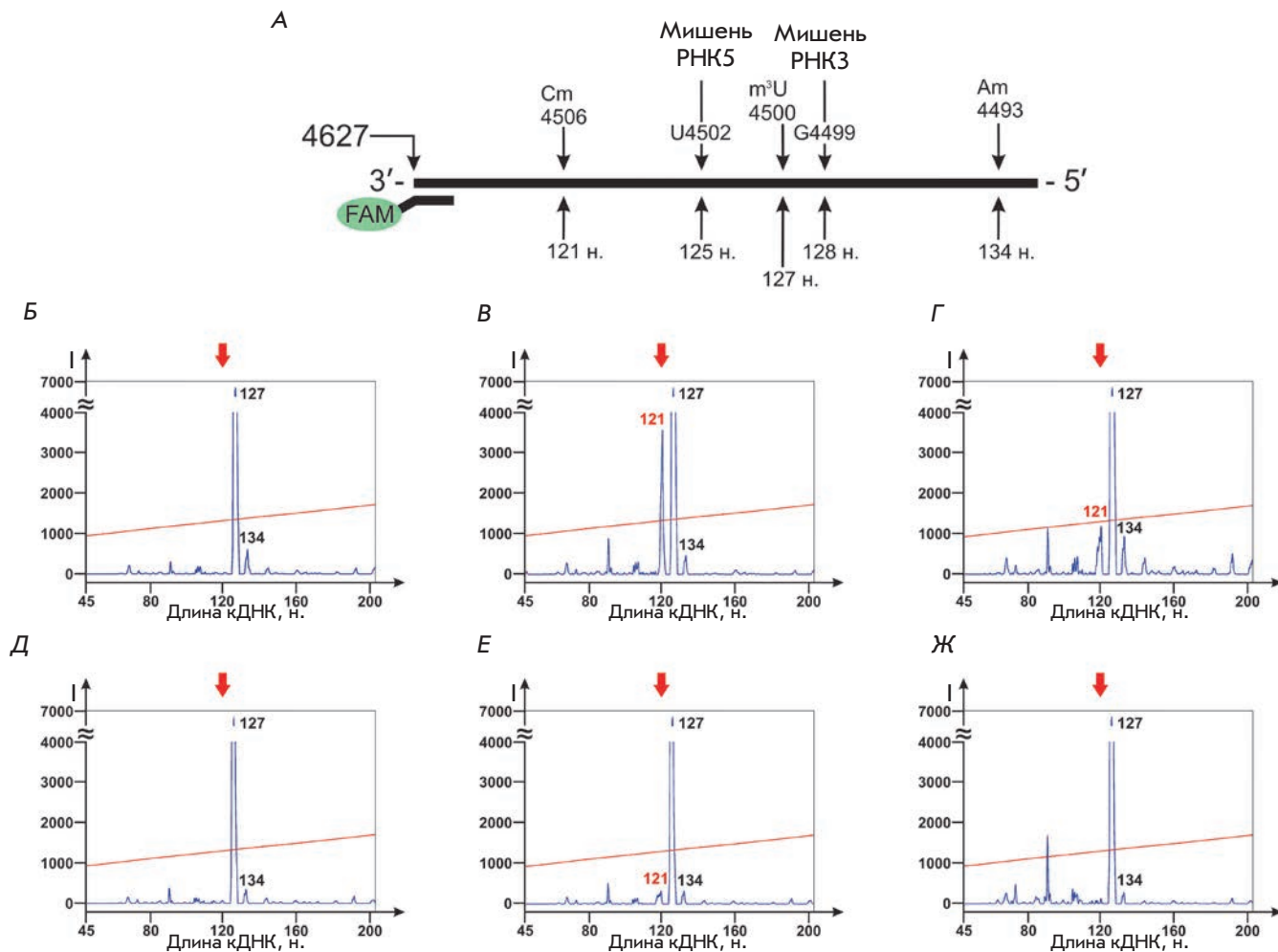


Рис. 7. Влияние синтетических аналогов С/D-боксов-РНК на глубину 2'-О-метилирования нуклеотида Cm4506 28S рРНК в клетках человека. А – расположение праймера FAM-28-2.2, 2'-О-метилированных нуклеотидов 28S рРНК и нуклеотидов-мишеней аналогов С/D-боксов-РНК. Б–Ж – разделение 5'-FAM-меченых продуктов терминирования ОТ 28S рРНК (при концентрации dNTP 0.04 мМ) контрольных клеток MCF-7 (Б) и клеток, трансфицированных РНКЗ (В), РНК5 (Г), РНК5mС (Д), РНК5D/N (Е) и РНК5mD (Ж). Красной стрелкой сверху обозначено положение продукта терминирования ОТ, соответствующего нуклеотиду Cm4506 28S рРНК. Продукт терминирования ОТ длиной 127 н. соответствует m<sup>3</sup>U4500 28S рРНК

или D(D')-боксов: РНК5mС, РНК5D/N и РНК5mD. Все перечисленные аналоги имели одинаковую последовательность области узнавания, направленную на U4502 28S рРНК (рис. 5, таблица). В РНК5mС последовательности С- (AUGAUGU) и С'- (GUGAUGA) боксов были заменены на (ACAGCAC) и (GCAGCAG) соответственно. В структуре РНК5D/N только D-бокс заменен на (AGUC), тогда как в РНК5mD обе последовательности D- и D'-боксов (CUGA) заменены на (AAAA).

Установлено, что замены в структурах D- и С-боксов существенно снижают эффективность действия аналогов С/D-боксов-РНК. Так, при замене

одного D-боксов в структуре РНК5 относительный выход продукта терминирования уменьшается приблизительно в 2 раза, а при одновременной замене обоих D- и D'-боксов либо обоих С- и С'-боксов – снижается до уровня в контрольных клетках (рис. 7Г–Ж, таблица). Полученные данные позволили заключить, что С- и D-боксы являются ключевыми элементами в структуре синтетических аналогов С/D-боксов-РНК, влияющими на глубину 2'-О-метилирования нуклеотидов рРНК при трансфекции их в клетки человека. Для влияния на модификацию рРНК достаточно одной пары С/D-боксов в структуре синтетической РНК. Удаление функциональных элементов – С-



Выход продукта терминации ОТ, соответствующего нуклеотиду Cm4506 28S рРНК клеток MCF-7, трансфицированных аналогами С/D-боксов-РНК

Аналог С/D-боксов-РНК	Изменения в структуре С/D-боксов-РНК относительно аналога РНК5	Выход продукта терминации ОТ, соответствующего Cm4506 28S рРНК**	Относительный выход продукта терминации***, %
РНК5	–	1100 ± 154	100
РНК3	Сдвиг области узнавания на 3 нуклеотида к 5'-концу рРНК	6500 ± 780	590
РНК5mC	Бокс С (AUGAUGU) → (ACAGCAC); бокс С' (GUGAUGA) → (GCAGCAG)	170 ± 25	15
РНК5D/N	Бокс D (CUGA) → (AGUC)	570 ± 86	50
РНК5mD	Боксы D и D' (CUGA) → (AAAA)	150 ± 25	13
Контроль*	–	150 ± 25	13

\*Контрольные клетки MCF-7 инкубировали в среде с липофектамином без РНК.

\*\*Представлены средние значения площадей пиков (± SD).

\*\*\*Приведены значения относительного выхода продукта терминации ОТ, соответствующего Cm4506 28S рРНК, по сравнению с его выходом при ОТ 28S рРНК клеток MCF-7, трансфицированных РНК5.

и D-боксов – отменяет действие аналогов мРНК на структуру рРНК в трансфицированных клетках (рис. 7, таблица).

Полученные данные позволяют заключить, что аналоги С/D-боксов-РНК, проникая в клетки человека, влияют на посттранскрипционный процессинг рибосомных РНК. Хотя трансфекция аналогов С/D-боксов-РНК в клетки MCF-7 не вызывала *de novo* 2'-О-метилирования заранее заданных нуклеотидов-мишеней рРНК, под действием синтетических аналогов происходило увеличение глубины природного 2'-О-метилирования нуклеотидов 28S рРНК.

Недавно показали, что в ряде линий опухолевых клеток повышение уровня отдельных С/D-боксов-РНК сопровождается увеличением содержания фибрилларина – ключевого компонента ядрышкового метилтрансферазного комплекса [12]. Кроме того, профиль 2'-О-метилирования рРНК может различаться в раковых клетках различного происхождения [14]. В связи с этим предполагают, что регуляция созревания рибосомных РНК может влиять на онкотрансформацию клеток и контролировать жизненный цикл раковых клеток [30, 31]. Поэтому наблюдаемый нами эффект синтетических РНК на 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК клеток человека указывает на перспективность разработки систем регуляции посттранскрипционного созревания рРНК, которые могут заложить основу для создания новых терапевтических подходов. Предложенный метод анализа 2'-О-метилированных нуклеотидов в составе РНК может использоваться как для выявления модификаций РНК, возникающих в результате направленного искусственного воздействия, так и для поиска

диагностически значимых различий в профиле модификаций РНК в клетках человека.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе представлена адаптация метода терминации обратной транскрипции для выявления положений 2'-О-метилованных нуклеотидов в РНК и анализа 5'-флуоресцентно меченных кДНК-продуктов капиллярным гель-электрофорезом на автоматическом геномном анализаторе. С помощью предложенного подхода проанализировано влияние синтетических аналогов малых ядрышковых С/D-боксов-РНК на профиль 2'-О-метилирования 28S рРНК человека в клетках линии MCF-7. Показано, что трансфекция клеток синтетическими аналогами С/D-боксов-РНК приводит к усилению терминации ОТ на известных сайтах 2'-О-метилирования рРНК, что указывает на существенное повышение глубины модификации отдельных нуклеотидов рРНК-мишеней. При этом ключевую роль в действии синтетических РНК играют консервативные структурные элементы мРНК – С- и D-боксы.

В настоящее время полагают, что посттранскрипционные модификации разных нуклеотидов рРНК являются независимыми процессами. Так, направленное введение дополнительных 2'-О-метилованных нуклеотидов в состав рРНК не влияет на выход модификации других нуклеотидов [28, 32]. Наши данные показывают, что С/D-боксов-РНК, которая содержит область узнавания, направленную в заранее заданный нуклеотид, и при этом не индуцирует 2'-О-метилирование нуклеотида-мишени, может повлиять на глубину модификации дру-

гих нуклеотидов рРНК. Возможно, что наблюдаемый нами эффект отражает функционирование нового природного механизма взаимосвязанной регуляции посттранскрипционных модификаций нуклеотидов рРНК. Реализация такого механизма может влиять на глубину 2'-О-метилирования одних нуклеотидов при нарушении модификации других нуклеотидов,

сближенных в пространственной структуре ядрышкового предшественника рРНК. ●

*Работа поддержана РФФИ  
(гранты № 13-04-01058 и 14-04-31468)  
и Междисциплинарным интеграционным  
проектом СО РАН № 84 (2012–2014 гг.).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lapeyre B. // *Top. Curr. Genet.* 2005. V. 12. P. 85–91.
2. Baxter-Roshek J.L., Petrov A.N., Dinman J.D. // *PLoS One.* 2007. V. 2. № 1. e174.
3. Piekna-Przybylska D., Decatur W.A., Fournier M.J. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. D178–183.
4. Decatur W.A., Fournier M.J. // *Trends Biochem. Sci.* 2002. V. 27. № 7. P. 344–351.
5. Liang X.H., Liu Q., Fournier M.J. // *Mol. Cell.* 2007. V. 28. № 6. P. 965–977.
6. Esguerra J., Warringer J., Blomberg A. // *RNA.* 2008. V. 14. № 4. P. 649–656.
7. Liang X.H., Liu Q., Fournier M.J. // *RNA.* 2009. V. 15. № 9. P. 1716–1728.
8. Song X., Nazar R.N. // *FEBS Lett.* 2002. V. 523. № 1–3. P. 182–186.
9. Kiss-Laszlo Z., Henry Y., Bachellerie J.P., Caizergues-Ferrer M., Kiss T. // *Cell.* 1996. V. 85. № 7. P. 1077–1088.
10. Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. // *Молекуляр. биология.* 2007. Т. 41. № 2. С. 246–259.
11. Reichow S.L., Hamma T., Ferre'-D'Amare' A.R., Varani G. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 5. P. 1452–1464.
12. Su H., Xu T., Ganapathy S., Shadfian M., Long M., Huang T.H., Thompson I., Yuan Z.M. // *Oncogene.* 2014. V. 33. № 11. P. 1348–1358.
13. Marcel V., Ghayad S.E., Belin S., Therizols G., Morel A.-P., et al. // *Cell.* 2013. V. 24. № 3. P. 318–330.
14. Belin S., Beghin A., Solano-Gonzalez E., Bezin L., Brunet-Manquat S., et al. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 9. e7147.
15. Teittinen K.J., Laiho A., Uusimaki A., Pursiheimo J.P., Gyenesei A., Lohi O. // *Cell. Oncol. (Dordr).* 2013. V. 36. № 1. P. 55–63.
16. Montanaro L., Trere D., Derenzini M. // *Am. J. Pathol.* 2008. V. 173. № 2. P. 301–310.
17. Freed E.F., Bleichert F., Dutca L.M., Baserga S.J. // *Mol. Biosyst.* 2010. V. 6. № 3. P. 481–493.
18. Степанов Г.А., Семенов Д.В., Кулигина Е.В., Коваль О.А., Рабинов И.В., Кит Ю.Я., Рихтер В.А. // *Acta Naturae.* 2012. Т. 4. № 1 (12). С. 34–43.
19. Stepanov G.A., Semenov D.V., Savelyeva A.V., Koval O.A., Kuligina E.V., Rabinov I.V., Richter V.A. // *Biomed. Res. Int.* 2013. ID:656158.
20. Maden B.E., Corbett M.E., Heeney P.A., Pugh K., Ajuh P.M. // *Biochimie.* 1995. V. 77. № 1–2. P. 22–29.
21. Maden B.E. // *Methods.* 2001. V. 25. № 3. P. 374–382.
22. Cavaille J., Nicoloso M., Bachellerie J.P. // *Nature.* 1996. V. 383. № 6602. P. 732–735.
23. Liu B., Fournier M.J. // *RNA.* 2004. V. 10. № 7. P. 1130–1141.
24. Graifer D., Molotkov M., Styazhkina V., Demeshkina N., Bulygin K., Eremina A., Ivanov A., Laletina E., Venyaminova A., Karpova G. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 11. P. 3282–3293.
25. Bulygin K., Malygin A., Hountondji C., Graifer D., Karpova G. // *Biochimie.* 2013. V. 95. № 2. P. 195–203.
26. Lestrade L., Weber M.J. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. D158–162.
27. Liu B., Ni J., Fournier M.J. // *Methods.* 2001. V. 23. № 3. P. 276–286.
28. Liu B., Liang X.H., Piekna-Przybylska D., Liu Q., Fournier M.J. // *RNA Biol.* 2008. V. 5. № 4. P. 249–254.
29. Rodriguez-Galan O., Garcia-Gomez J.J., de la Cruz J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1829. № 8. P. 775–790.
30. Williams G.T., Farzaneh F. // *Nat. Rev. Cancer.* 2012. V. 12. № 2. P. 84–88.
31. Mannoor K., Liao J., Jiang F. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1826. № 1. P. 121–128.
32. Qu G., van Nues R.W., Watkins N.J., Maxwell E.S. // *Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 31. № 2. P. 365–374.