

УДК 577.21

Аналоги малых ядрышковых С/D-бокс-РНК человека как регуляторы альтернативного сплайсинга пре-мРНК-мишени

Г. А. Степанов^{1*}, Д. В. Семенов¹, Е. В. Кулигина¹, О. А. Коваль¹, И. В. Рабинов¹, Ю. Я. Кит², В. А. Рихтер¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

²Институт биологии клетки НАН Украины, 79005, Львов, ул. Драгоманова, 14/16

*E-mail: stepanovga@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 24.10.2011 г.

РЕФЕРАТ Малые ядрышковые РНК (мяоРНК) играют важную роль в биогенезе эукариотических рибосомных РНК (рРНК). С/D-бокс-мяоРНК направляют сайт-специфичное 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК и малых ядерных РНК (мяРНК). Некоторые природные С/D-бокс-РНК, а также их фрагменты участвуют в регуляции посттранскрипционной модификации и альтернативного сплайсинга пре-мРНК. В представленной работе сконструированы и синтезированы искусственные аналоги U24 С/D-бокс-мяоРНК, направленные на нуклеотиды 28S и 18S рРНК человека, пре-мРНК и зрелой мРНК белка теплового шока hsc70. Установлено, что в клетках линии MCF-7 человека, трансфицированных синтетическими аналогами С/D-бокс-РНК в комплексе с липофектаминол, аналоги мяоРНК проникают внутрь клеток и накапливаются в цитоплазме и ядре. Трансфекция клеток человека синтетическими аналогами С/D-бокс-РНК, несущих область узнавания, комплементарную пре-мРНК белка hsc70, вызывает частичное нарушение сплайсинга мРНК-мишени. Трансфекция аналогами С/D-бокс-РНК, направленными на нуклеотиды 18S и 28S рРНК, ключевых для функционирования рибосом, приводит к снижению жизнеспособности клеток MCF-7.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА малые ядрышковые С/D-бокс-РНК, посттранскрипционная модификация РНК, альтернативный сплайсинг пре-мРНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ рРНК – рибосомные РНК; мяоРНК – малые ядрышковые РНК; мяРНК – малые ядерные РНК; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; офВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия; FAM – карбоксифлуоресцеин.

ВВЕДЕНИЕ

Класс малых ядрышковых РНК (мяоРНК) представлен двумя основными семействами – С/D-бокс-РНК и Н/АСА-бокс-РНК. В составе рибонуклеопротеидных комплексов эти РНК, выполняя функцию узнающего и направляющего элемента, участвуют в модификации нуклеотидов эукариотических рибосомных РНК. РНК, относящиеся к семейству С/D-бокс-РНК, направляют 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК. С/D-бокс-РНК содержат консервативные структурные элементы – CUGA (D-бокс) и RUGAUGA (С-бокс) вблизи 5'- и 3'-конца соответственно. В С/D-бокс-РНК выделяют область узнавания мишени – последовательность, комплементарную участку РНК-мишени. Некоторые РНК содержат две области узнавания и две пары С/D-боксов (С, D, С', D') [1].

В работе Cavaille J. и соавт. [2] показано, что если РНК содержит структурные элементы, определяющие ее принадлежность к семейству С/D-бокс-РНК, то для определения мишени метилирования достаточно соответствующей области С/D-бокс-мяоРНК, комплементарной РНК-мишени. Показана возможность направлять 2'-О-метилирование нуклеотидов РНК, не имеющих природных 2'-О-метильных групп, посредством аналогов С/D-бокс-РНК [2].

Один из основных подходов к изучению свойств С/D-бокс-РНК – создание ДНК-конструкций, экспрессирующихся внутри клетки с образованием либо коротких неприродных мяоРНК, либо фрагментов пре-мРНК, из которых в результате процессинга образуются мяоРНК, направленные на заранее заданные мишени [2]. На основе этого подхода разрабо-

таны методы направленной модификации нуклеотидов в эукариотических РНК, а также картирования функционально важных сайтов рРНК, чувствительных к *de novo* 2'-О-метилированию [3, 4]. При этом круг мишеней искусственных малых ядрышковых РНК не ограничивается рРНК и мяРНК. Все большее внимание привлекает участие мяРНК в процессе созревания мРНК. Уже известно, что С/D-боксы-РНК могут взаимодействовать и с продуктами транскрипции РНК-полимеразой I, локализованными в ядрышке, и с продуктами РНК-полимеразы II [2]. Кроме того, малая ядрышковая РНК NBII-52 (MBII-52) участвует в процессинге пре-мРНК серотонинового рецептора 5-HT_{2c}R [5, 6]. Таким образом, структура малых ядрышковых С/D-боксы-РНК представляет перспективную основу для разработки средств направленной регуляции экспрессии генов в клетках человека.

В данной работе изучено влияние синтетических аналогов природных С/D-боксы-РНК на сплайсинг пре-мРНК-мишени и процессинг 18S и 28S рРНК клеток человека. Получены аналоги U24 С/D-боксы-РНК человека, направленные на пре-мРНК белка теплового шока hsc70 и рРНК человека. Показано, что трансфекция линии клеток MCF-7 – аденокарциномы молочной железы человека, синтетическими аналогами приводит к частичному нарушению сплайсинга – исключению одного из экзонов из пре-мРНК-мишени. Установлено, что трансфекция клеток MCF-7 синтетическими аналогами С/D-боксы-РНК, направленными на рРНК, вызывает снижение жизнеспособности клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение искусственных С/D-боксы-РНК

Синтетические аналоги С/D-боксы-РНК получали с помощью транскрипции *in vitro* ДНК-матриц, полученных методом ПЦР, с использованием РНК-полимеразы фага T7 («Fermentas», Литва).

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-глутамина и 40 мкг/мл гентамицина в присутствии 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота при 37°C. Синтетические аналоги С/D-боксы-РНК преинкубировали с липофектаминол (Lipofectamine Reagent, «Invitrogen», США) согласно протоколу производителя и добавляли в культуральную среду. После инкубации клеток MCF-7 в течение 18 ч выделяли суммарную РНК с помощью Trizol Reagent

(«Invitrogen», США) согласно протоколу производителя.

Выделение цитоплазматической и ядерной фракций лизата клеток MCF-7

По завершении инкубации клетки MCF-7 охлаждали на льду. Среду отбирали, клетки промывали двумя сменами фосфатно-солевого буфера (PBS) и лизировали на льду в течение 10 мин (0.5% Тритон X-100 в буфере А, содержащем 150 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl pH 7.5, 10 мМ EDTA). Лизат суспендировали и наслаивали на 10% раствор сахарозы в буфере А, центрифугировали в течение 20 мин при 600 g. Выделение РНК из супернатанта (цитоплазматическая фракция MCF-7) и осадка ядер, суспендированного в буфере А, проводили с помощью Trizol Reagent. Концентрацию РНК в препаратах определяли спектрофотометрически ($\lambda = 260$ нм) с учетом коэффициента экстинкции для РНК ($\epsilon_{260} = 25$ л/моль · см).

Анализ вариантов сплайсинга пре-мРНК гена HSPA8 методом ОТ-ПЦР

Обратную транскрипцию пре-мРНК HSPA8 и амплификацию кДНК проводили в реакционной смеси для ОТ-ПЦР «РеалБест Мастер микс ОТ» («ВекторБест», Новосибирск) с использованием праймеров hsp2.1 – 5'-ACTGAACGGTTGATCGGTGA-3' и hsp8.2 – 5'-AGATGAGCACGTTTCTTTCT-3'. Продукты анализировали в 4% полиакриламидном геле. Количество продуктов амплификации в геле оценивали с помощью программного обеспечения Gel-Pro Analyzer 3.1. Нуклеотидные последовательности определяли по методу Сэнгера с использованием флуоресцентно меченных терминаторов ДНК-полимеразы в составе смеси «BigDye 3.1» с последующим разделением ДНК на анализаторе ABI3100 «Applied Biosystems» (Межинститутский центр секвенирования ДНК СО РАН).

Получение флуоресцентно меченной С/D-боксы-РНК и анализ накопления флуоресцентно меченной РНК в клетках человека

Флуоресцентно меченную РНК получали с помощью транскрипции *in vitro* РНК-полимеразой фага T7 («Fermentas», Литва) с использованием Flu-12-UTP («Биосан», Новосибирск). РНК-транскрипт выделяли с помощью ион-парной оФВЭЖХ на приборе Милихром А-02 на сорбенте ProntoSIL-120-5-C18 и колонке 2.0 × 7.5 мм. Накопление флуоресцентно меченной РНК в клетках MCF-7 анализировали с использованием флуоресцентной микроскопии (Центр коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН). С этой целью 3 × 10⁴ клеток MCF-7 высаживали на пред-

метное стекло камеры Culture Slide («BD Falcon», США), через 24 ч трансфицировали флуоресцентно меченной РНК и инкубировали в течение 18 ч. После инкубации среду убрали, клетки дважды промывали PBS, препараты заключали в каплю красителя DAPI/Antifade («Millipore», США) и покрывали покровным стеклом. Препараты анализировали на микроскопе Axioskop 2 Plus («Carl Zeiss», Германия).

Анализ 2'-О-метилирования G1702 18S рРНК

2'-О-метильные группы рРНК выявляли при помощи частичного щелочного гидролиза как описано в работе [7]. Суммарную РНК клеток MCF-7 (2.5–5.0 мкг) инкубировали в растворе 50 мМ Na₂CO₃ (рН 9.0) в течение 18 мин при 90°C. Продукты гидролиза осаждали этанолом. Обратную транскрипцию проводили с использованием праймера 18.1702 – 5'-GCCGATCCGAGGGCCTCACT-3', комплементарного участку 18S рРНК 1731–1750, с использованием обратной транскриптазы MMLV («Биосан», Новосибирск). Секвенирование участка рРНК методом обратной транскрипции в присутствии ddNTP проводили согласно [8].

Анализ жизнеспособности клеток MCF-7 с помощью МТТ-теста

Для анализа влияния аналогов С/Д-боксов-РНК на жизнеспособность клетки MCF-7 культивировали в 96-луночном планшете (3 × 10⁴ клеток на лунку). Через 24 ч к культуральной среде добавляли раствор РНК (в комплексе с липофектаминоном) до концентрации 3.0, 10.0 и 70.0 нМ. Клетки MCF-7 инкубировали с РНК в течение 3 сут, после чего в среду добавляли раствор МТТ в PBS до конечной концентрации 0.5 мг/мл. Инкубировали при 37°C в течение 90 мин, среду удаляли, кристаллы МТТ-формазана растворяли в 100 мкл изопропилового спирта. Оптическую плотность раствора определяли (λ = 570 нм, контроль при λ = 620 нм) на многоканальном спектрофотометре Apollo 8 LB 912 («Berthold Technologies», Германия). Данные представляли как снижение жизнеспособности (100% – (МТТ-индекс)) по сравнению с контролем (клетки, инкубированные в тех же условиях с липофектаминоном без РНК).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние синтетических аналогов С/Д-боксов-РНК на процессинг РНК в клетках человека изучали с использованием сконструированных нами аналогов природной U24 С/Д-боксов-РНК человека. U24 РНК человека содержит последовательности CUGA и AUGAUGU (GUGAUGA) – D- и С (С')-боксы соответственно, а также две области узнавания мишеней, направляющие 2'-О-метилирование C2338

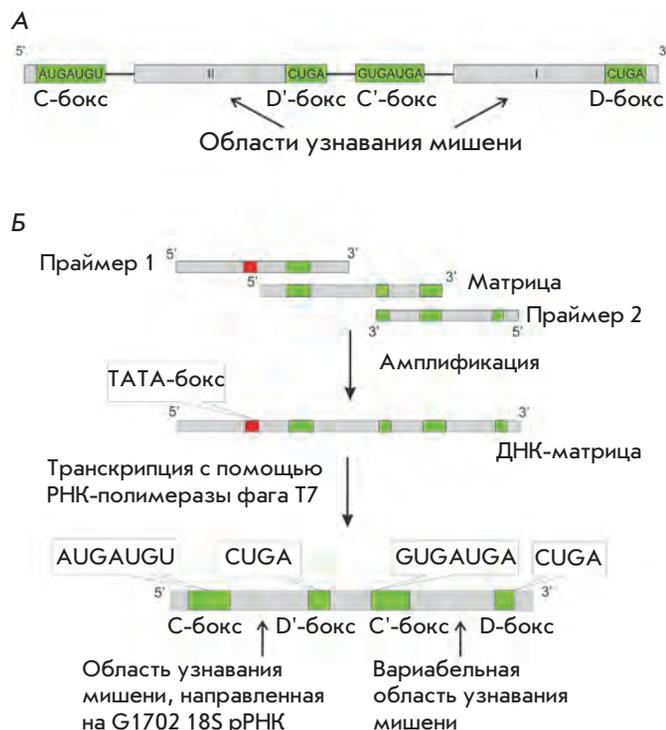


Рис. 1. Структура U24 С/Д-боксов-РНК (А) и схема синтеза аналогов С/Д-боксов-РНК (Б).

и C2352 28S рРНК (рис. 1А) [9]. Полученные аналоги содержат консервативные участки, идентичные U24 С/Д-боксов-РНК, и области, комплементарные участкам РНК-мишеней, сконструированные таким образом, чтобы целевой нуклеотид в РНК-мишени был комплементарен пятому нуклеотиду от D (D')-боксов (CUGA) аналога С/Д-боксов-РНК [2]. Все полученные РНК содержали два набора С/Д-боксов (С/Д и С'/D') и соответственно две области узнавания (рис. 1Б).

Первая из областей узнавания (D-боксов-зависимая) была направлена на нуклеотиды пре-мРНК гена *HSPA8*, кодирующего белок теплового шока (hsc70). Подавление экспрессии белков, родственных hsp70, в том числе белка hsc70, вызывает гибель раковых клеток в культуре. При этом сам ген *HSPA8* рассматривается в качестве перспективной мишени для ген-направленной терапии опухолей [10]. В качестве мишеней синтетических аналогов были выбраны нуклеотиды, модификация которых может отрицательно повлиять на процесс вырезания второго интрона при сплайсинге пре-мРНК: аденозин – точка разветвления при сплайсинге, донорный и акцепторный сайты сплайсинга, первый и последний нуклеотиды интрона. Вторая область узнавания (D'-боксов-зависимая) была направлена на G1702 18S рРНК

Таблица 1. Синтетические аналоги U24 C/D-боксов-РНК, направленные на нуклеотиды, критичные для сплайсинга пре-мРНК гена *HSPA8*

Обозначение	Нуклеотидная последовательность*	Нуклеотид-мишень в пре-мРНК hsc70
PM.7	5' - UGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAG AUG <u>GUGAUGA</u> CAAAUGAAAACACUUUCAAU <u>CUGA</u> UGCA-3'	Аденозин – точка разветвления сплайсинга
PM.8	5' - UGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAG AUG <u>GUGAUGA</u> AAAUUAGGAACUCACCAAAA <u>CUGA</u> UGCA-3'	Донорный сайт сплайсинга
PM.9	5' - UGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAG AUG <u>GUGAUGA</u> AAAUUAGGAACUCACCAAAA <u>CUGA</u> UGCA-3'	Первый нуклеотид интрона
PM.10	5' - UGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAG AUG <u>GUGAUGA</u> ACAGAUGCCAAACGUCUGAU <u>CUGA</u> UGCA-3'	Акцепторный сайт сплайсинга
PM.11	5' - UGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAG AUG <u>GUGAUGA</u> UACAGAUGCCAAACGUCUGAU <u>CUGA</u> UGCA-3'	Последний нуклеотид интрона

*AUGAUGU – консервативные элементы C/D-боксов-РНК; A – нуклеотиды, комплементарные нуклеотиду-мишени.

человека. Последовательности аналогов C/D-боксов-РНК представлены в табл. 1.

В результате трансфекции клеток MCF-7 синтетическими аналогами C/D-боксов-РНК и анализа вариантов альтернативного сплайсинга пре-мРНК гена *HSPA8* установлено, что в контрольных клетках MCF-7 детектируются два варианта альтернативного сплайсинга этой пре-мРНК – основная и минорная (рис. 2, дорожки К). Определение нуклеотидных последовательностей этих форм показало, что они отличаются наличием либо отсутствием второго экзона. В клетках, трансфицированных синтетическими C/D-боксов-РНК, направленными на нуклеотиды, критичные для сплайсинга пре-мРНК, увеличивается содержание минорной формы, т.е. формы без второго экзона (рис. 2А, дорожки 1–5). Таким образом установлено, что аналоги C/D-боксов-РНК, направленные на выбранные нуклеотиды пре-мРНК гена *HSPA8*, влияют на сплайсинг пре-мРНК-мишени и приводят к исключению второго экзона.

Эффективность трансфекции, распределение и стабильность синтетических аналогов C/D-боксов-РНК оценивали с помощью ОТ-ПЦР-анализа ядерной и цитоплазматической РНК клеток MCF-7, трансфицированных РНК PM.8. Из данных, представленных на рис. 3, видно, что через 3 ч после пассивной трансфекции клеток РНК PM.8 без липофектамина РНК не удается детектировать ни в ядерной, ни в цитоплазматической фракции клеток MCF-7 (рис. 3, дорожки 1, 7). После трансфекции клеток аналогом C/D-боксов-РНК в комплексе с липофектаминам PM.8 РНК присутствует как в цитоплазматической, так и в ядерной фракции даже через 26 ч после трансфекции (рис. 3, дорожки 5, 11). Все это

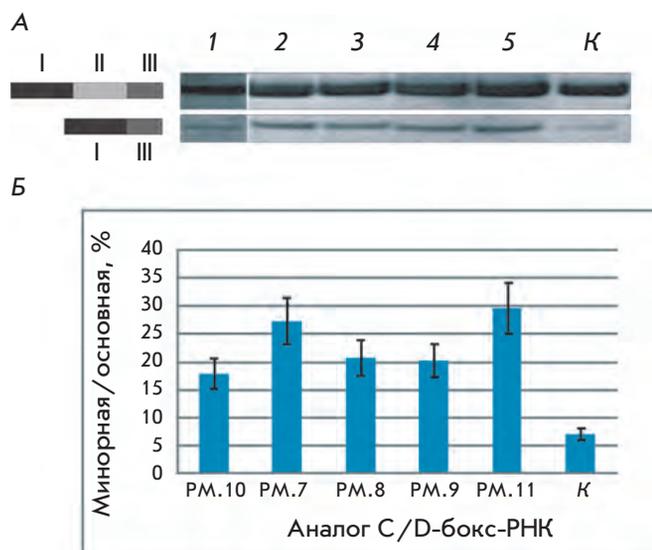


Рис. 2. Влияние синтетических аналогов U24 РНК на сплайсинг пре-мРНК гена *HSPA8*. А – продукты ОТ-ПЦР вариантов сплайсинга пре-мРНК гена *HSPA8*. Дорожки соответствуют продуктам амплификации кДНК: 1–5 – клетки, трансфицированные аналогами РНК PM.10, РНК PM.7, РНК PM.8, РНК PM.9, РНК PM.11 соответственно; К – контрольные клетки MCF-7, инкубированные с липофектаминам без РНК. Продукты ПЦР анализировали гель-электрофорезом в 4% ПААГ. Слева схематически представлены анализируемые варианты сплайсинга пре-мРНК-мишени. I, II, III – порядковые номера экзонов в структуре пре-мРНК. Б – Диаграмма соотношения выхода продуктов амплификации кДНК основной и минорной формы альтернативного сплайсинга пре-мРНК белка теплового шока hsc70. РНК PM.7–РНК PM.11 – клетки трансфицировали аналогами C/D-боксов-РНК РНК PM.7–РНК PM.11 соответственно. К – Контрольные клетки MCF-7 инкубировали с липофектаминам без РНК.

Время инкубации, ч	3	3	21	21	26	21	3	3	21	21	26	21
Аналог С/D-РНК	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Липофектамин	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+

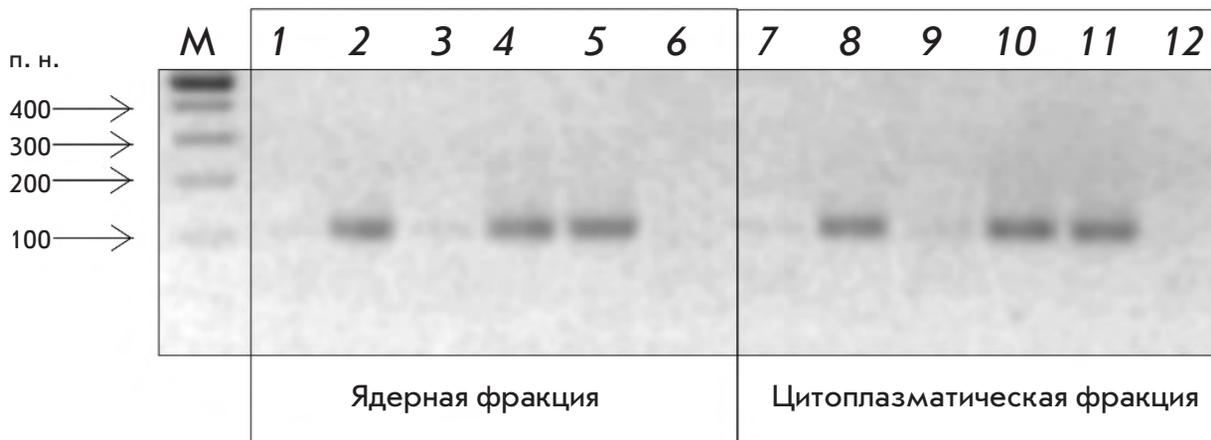


Рис. 3. Анализ стабильности С/D-бокс-РНК РМ.8 в клетках MCF-7 методом ОТ-ПЦР. Клетки инкубировали с аналогом РМ.8 в присутствии липофектамина (2, 4, 5, 8, 10, 11) либо без липофектамина (1, 3, 7, 9) в течение указанного времени (3, 21 либо 26 ч). Контрольные клетки инкубировали с липофектамином без РМ.8 (6, 12) в течение 21 ч. 1–6 – Продукты ОТ-ПЦР кДНК РНК, выделенной из ядерной фракции; 7–12 – продукты ОТ-ПЦР кДНК РНК, выделенной из цитоплазматической фракции. Продукты ОТ-ПЦР разделяли гель-электрофорезом в 2% агарозном геле. М – маркер молекулярной массы ДНК.

позволяет заключить, что в присутствии липофектамина синтетические С/D-бокс-РНК эффективно проникают в цитоплазму и ядро клеток, где могут участвовать в процессинге пре-мРНК-мишени.

Данные ОТ-ПЦР хорошо согласуются с результатами анализа распределения меченой FAM РНК РМ.8 в клетках MCF-7 при помощи флуоресцентной микроскопии. Так, при инкубации клеток в среде с меченой FAM РНК С/D-бокс-РНК в комплексе с липофектамином происходит захват, интернализация и распределение РНК и в цитоплазме, и в ядре клеток (рис. 4).

Известно, что посттранскрипционным модификациям – псевдоуридилированию и 2'-О-метилованию – чаще подвергаются нуклеотиды рРНК, непосредственно вовлеченные в формирование активных центров рибосом или расположенные вблизи них [11]. Эти данные позволяют предположить, что посттранскрипционные модификации существенно влияют на структуру рРНК в процессе сборки и, в конечном счете, определяют функциональность рибосом [11–13].

Для оценки способности аналогов С/D-бокс-РНК направлять модификацию рРНК анализировали индукцию 2'-О-метилования мишени второй области узнавания – G1702 18S рРНК. G1702 был выбран в качестве мишени как один из ключевых нуклеотидов декодирующего центра человеческих рибосом

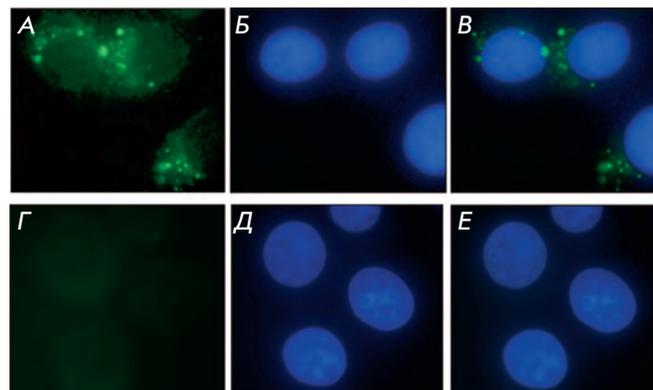


Рис. 4. Анализ накопления С/D-бокс-РНК РМ.8 в клетках MCF-7 методом флуоресцентной микроскопии. Представлены изображения трансфицированных (А – В) и контрольных клеток (Г – Е): А, Г – зеленый фильтр (FAM-меченый аналог С/D-бокс-РНК РМ.8); Б, Д – синий фильтр (окрашивание ядер с помощью DAPI); В, Е – наложение двух изображений.

[14]. В структуре рРНК из клеток MCF-7, трансфицированных синтетическими аналогами, методом ограниченного щелочного гидролиза не удалось обнаружить дополнительного 2'-О-метилованного нуклеотида в положении G1702 18S рРНК (рис. 5). Присутствие 2'-О-метилованного нуклеотида в составе рРНК в продуктах обратной транскрип-

Рис. 5. Анализ индукции 2'-О-метилирования G1702 18S рРНК. Продукты обратной транскрипции. 1–5 – рРНК клеток MCF-7, трансфицированных аналогами С/D-боксов-РНК РМ.7–РМ.11 соответственно; 6 – рРНК контрольных клеток; 7–10 – продукты терминации обратной транскрипции рРНК клеток MCF-7 в присутствии ddNTP (секвенирование соответствующего участка 18S рРНК человека). Продукты обратной транскрипции ограниченно гидролизованной рРНК разделяли гель-электрофорезом в 12% денатурирующем полиакриламидном геле. Стрелкой слева указано положение кДНК-продукта, снижение выхода которого может указывать на 2'-О-метилирование G1702 18S рРНК.

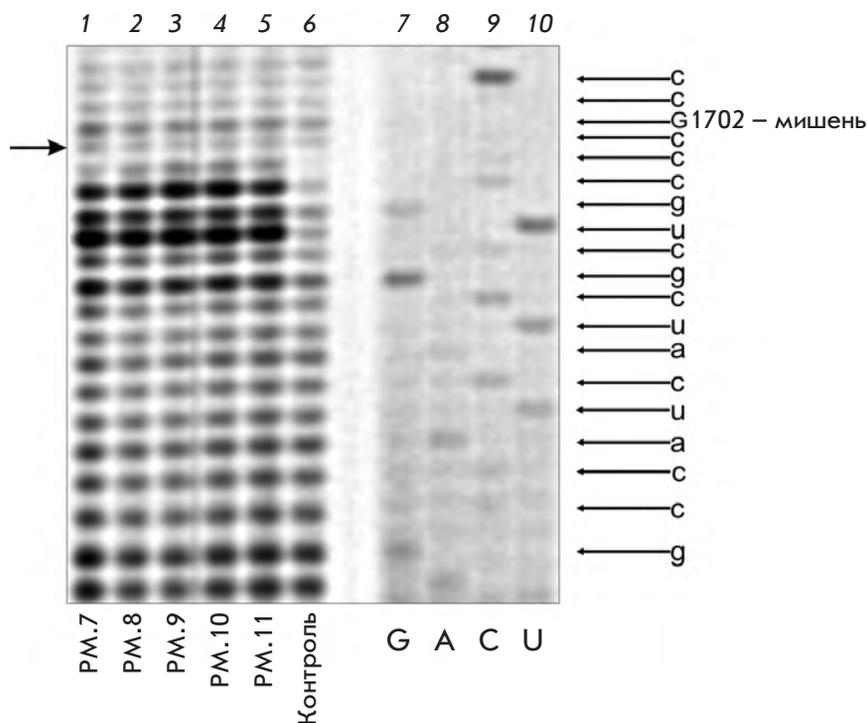


Таблица 2. Синтетические аналоги U24 С/D-боксов-РНК, направленные на нуклеотиды 18S и 28S рРНК человека

Обозначение	Нуклеотидная последовательность*	Нуклеотид-мишень в рРНК человека
PP.1827	5' -GGGUGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAGAUG <u>GUGAUGA</u> CCUUGUUACGA <u>CUUU</u> <u>CUGA</u> UGCACCC-3'	U1827 18S
PP.4499	5' -GGGUGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAGAUG <u>GUGAUGA</u> ACGGUCUAAAC <u>CCAG</u> <u>CUGA</u> UGCACCC-3'	G4499 28S
PP.4500	5' -GGGUGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAGAUG <u>GUGAUGA</u> GACGGUCUAA <u>ACC</u> <u>CUGA</u> UGCACCC-3'	U4500 28S
PP.4502	5' -GGGUGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAGAUG <u>GUGAUGA</u> ACGACGGUCU <u>AAACC</u> <u>CUGA</u> UGCACCC-3'	U4502 28S

* См. примечание к табл. 1.

ции статистически гидролизованной рРНК приводит к снижению выхода кДНК-продукта, длина которого определяется положением нуклеотида, прилежащего с 3'-стороны к 2'-О-метилированному нуклеотиду [8]. Однако, как видно из рис. 5, при трансфекции клеток человека любым из аналогов С/D-боксов-РНК выход кДНК-транскрипта, соответствующего 2'-О-метилированному G1702 18S рРНК, не снижается.

Влияние синтетических аналогов С/D-боксов-РНК на посттранскрипционную модификацию рРНК в клетках человека анализировали с использованием сконструированных и полученных аналогов U24 С/D-боксов-РНК, первая область узнавания которых

была направлена на нуклеотиды 18S и 28S рРНК человека. Нуклеотидные последовательности аналогов С/D-боксов-РНК представлены в табл. 2. Выбранные мишени являются ключевыми нуклеотидами функциональных центров рибосом: U1827 18S рРНК – входит в состав декодирующего центра рибосом; G4499, U4500, U4502 28S рРНК – в пептидилтрансферазный центр [3, 4]. Вторая область узнавания аналогов (D'-бокс-зависимая) направлена на G1702 18S рРНК человека (табл. 2).

Проведен сравнительный анализ влияния аналогов С/D-боксов-РНК на жизнеспособность клеток MCF-7. Влияние аналогов С/D-боксов-РНК оценивали после инкубации клеток в среде с начальной концен-

трацией РНК – 3.0, 10.0 и 70.0 нМ. Из рис. 6 видно, что наибольшее снижение жизнеспособности (>35%) вызывали С/D-боксы-РНК, направленные на U1827 18S рРНК, G4499, U4500 и U4502 28S рРНК. При этом аналоги U24 РНК, первая область узнавания которых направлена на пре-мРНК белка hsc70, вызывают снижение жизнеспособности и пролиферации клеток не более чем на 22% (рис. 6, РМ.7 и РМ.8).

Для анализа индукции *de novo* 2'-О-метилирования нуклеотидов-мишеней клетки MCF-7 трансфицировали аналогами С/D-боксы-РНК (табл. 2) и выявляли 2'-О-метилированные нуклеотиды рРНК методом ограниченного щелочного гидролиза. Установлено, что в пуле суммарной РНК трансфицированных клеток MCF-7 вклад форм рРНК, содержащих 2'-О-метилированный нуклеотид-мишень, был ниже уровня чувствительности метода детекции.

Совокупность данных об изменении жизнеспособности клеток под действием С/D-боксы-РНК и наблюдаемое отсутствие модификации нуклеотидов-мишеней позволяют предположить, что влияние аналогов на клетки человека может быть обусловлено участием С/D-боксы-РНК не только в 2'-О-метилировании нуклеотидов рРНК, но и в других этапах посттранскрипционного процессинга рРНК и сборки рибосом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Консервативные структурные элементы С/D-боксы-РНК – С/С' (RUGAUGA) и D/D' (CUGA)-боксы, а также область узнавания мишени обеспечивают способность этих РНК участвовать в формировании каталитического комплекса с белками метилтрансферазного комплекса и направлять 2'-О-метилирование заранее заданного нуклеотида [1, 2, 15]. Область узнавания мишени С/D-боксы-РНК представляет собой последовательность из 10–21 нуклеотида, комплементарную РНК-мишени, при этом метилируемый нуклеотид комплементарен пятому нуклеотиду мяоРНК с 5'-стороны от D-боксы [7].

Основными мишенями С/D-боксы-РНК в клетках эукариот являются рРНК и мяРНК. В то же время обнаружены мяоРНК, которые участвуют в процессинге пре-мРНК [6]. Ранее уже было установлено, что С/D-боксы-РНК могут взаимодействовать с транскриптами, синтезируемыми РНК-полимеразой II, и направлять 2'-О-метилирование заранее заданного нуклеотида РНК-мишени. При этом эффективность модификации нуклеотида-мишени значительно ниже, чем РНК-мишеней, синтезируемых в ядрышке РНК-полимеразой I [2]. Вместе с тем известно, что химическая модификация (в частности, метилирование) 2'-ОН-групп нуклеотидов, участвующих в сплайсинге пре-мРНК, существенно влияет на эффективность

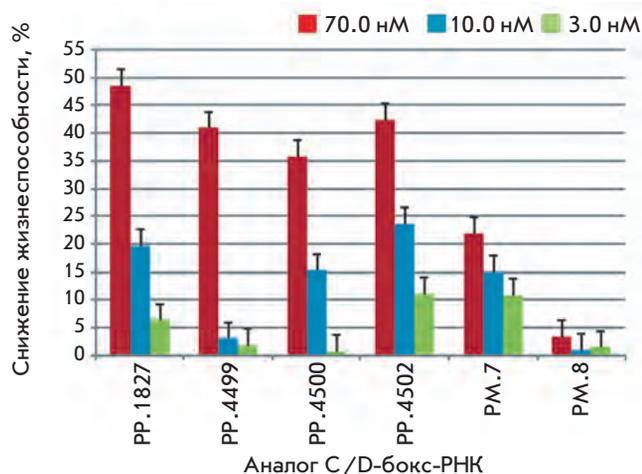


Рис. 6. Влияние синтетических аналогов С/D-боксы-РНК на жизнеспособность клеток MCF-7. Клетки MCF-7 после трансфекции комплексом РНК/липофектамин инкубировали в течение 3 сут. Показано снижение жизнеспособности (средние и стандартные отклонения МТТ-индекса в серии из трех независимых экспериментов) клеток, инкубированных в присутствии: 3.0 нМ (зеленый); 10.0 нМ (синий); 70.0 нМ (красный) РНК. Снижение жизнеспособности 0% соответствует МТТ-индексу клеток, инкубированных с липофектамином без РНК.

этапов созревания пре-мРНК [16]. Поэтому аналоги С/D-боксы-РНК, направляющие 2'-О-метилирование нуклеотидов пре-мРНК, представляют перспективную модель для разработки средств регуляции процессов сплайсинга.

В представленной работе сконструированы и получены аналоги U24 малой ядрышковой С/D-боксы-РНК, направленные на нуклеотиды пре-мРНК гена *HSPA8*, кодирующего белок теплового шока (hsc70) (рис. 1). Нами установлено, что трансфекция клеток человека синтетическими аналогами С/D-боксы-РНК, направленными на донорный и акцепторный сайты сплайсинга второго интрона, аденозин – точку разветвления сплайсинга, первый и последний нуклеотиды первого интрона пре-мРНК *HSPA8* (табл. 1), приводит к увеличению количества продукта сплайсинга пре-мРНК без второго экзона (рис. 2). Можно предложить два основных механизма влияния аналогов С/D-боксы-РНК на процессинг пре-мРНК-мишени – 2'-О-метилирование нуклеотида-мишени и комплементарное взаимодействие антисмыслового участка С/D-боксы-РНК с РНК-мишенью. Оба пути потенциально могут привести к ингибированию отдельных этапов сплайсинга и, как результат, к изменению соотношения вариантов альтернативного сплайсинга пре-мРНК-мишени.

Методы детекции 2'-О-метилированных нуклеотидов, широко применяемые в настоящее время, не позволяют эффективно выявлять такие модификации в мРНК и пре-мРНК. Поэтому нельзя однозначно сказать, происходит ли метилирование нуклеотида-мишени и обусловлено ли влияние на сплайсинг 2'-О-метилированием пре-мРНК-мишени. Известно, что ключевые точки сплайсинга пре-мРНК в разной степени чувствительны к модификациям 2'-ОН-групп остатков рибозы [16]. Полученные данные не позволяют говорить о существенных различиях в эффективности подавления сплайсинга аналогами C/D-бокс-РНК, направленными на разные нуклеотиды пре-мРНК, поэтому нельзя исключать возможность того, что наблюдаемое частичное изменение соотношения форм альтернативного сплайсинга пре-мРНК-мишени обусловлено ингибированием сплайсинга антисмысловой РНК по механизму, описанному для различных производных олигонуклеотидов [17–19].

Для участия в сплайсинге искусственная РНК должна взаимодействовать с пре-мРНК-мишенью внутри ядра. Как было показано, в присутствии липофектамина аналоги C/D-бокс-РНК эффективно проникают в клетки человека (рис. 3, 4). Из рис. 3 видно, что аналог C/D-бокс-РНК достоверно детектируется методом ОТ-ПЦР спустя 26 ч после однократной трансфекции с использованием липофектамина в ядерной и цитоплазматической фракциях РНК клеток MCF-7. Полученные данные указывают на то, что искусственные C/D-бокс-РНК потенциально доступны для взаимодействия с РНК-мишенями, локализованными внутри ядра. Накопление синтетической РНК в клетках подтверждается методом флуоресцентной микроскопии (рис. 4). Более того, установлено, что синтетические аналоги C/D-бокс-РНК в присутствии липофектамина эффективно сохраняются и обнаруживаются методом ОТ-ПЦР внутри клеток человека спустя 72 ч после однократной трансфекции (данные не иллюстрированы). В то же время в случае трансфекции без использования липофектамина синтетические РНК не детектируются в клетках человека методом ОТ-ПЦР уже через 3 ч после добавления в культуральную среду (рис. 3).

У всех полученных нами аналогов U24 мяоРНК одна из двух областей узнавания мишени сконструирована таким образом, чтобы направлять 2'-О-метилирование G1702 18S рРНК человека (табл. 1). Ранее мы показали, что трансфекция клеток человека синтетическими аналогами C/D-бокс-РНК, направленными на нуклеотиды рРНК (табл. 2), вызывает терминацию обратной транскрипции на нуклеотидах-мишенях [20, 21]. Однако анализ 2'-О-метилирования G1702 18S рРНК

клеток, трансфицированных аналогами C/D-бокс-РНК, методом частичного щелочного гидролиза не выявил дополнительной 2'-О-метильной группы в заданном положении (рис. 5). Не обнаружено также *de novo* 2'-О-метилирования нуклеотидов рРНК – мишени аналогов, перечисленных в табл. 2 (после трансфекции клеток соответствующими РНК). При этом с помощью использованного метода нам удавалось определить положение ряда известных 2'-О-метилированных нуклеотидов рРНК человека.

Для объяснения отсутствия модификации нуклеотидов-мишеней (кроме известных ограничений методов анализа [8]) необходимо дополнительно рассмотреть следующие данные. Известно, что участие C/D-бокс-РНК в 2'-О-метилировании рРНК клеток человека возможно только при условии узнавания этой РНК белками – субъединицами метилтрансферазного комплекса – фибриларином, NOP56p, NOP58p и 15.5 кДа, и формирования комплекса с участием C/D-бокс-РНК [22–24]. Поэтому наблюдаемый низкий выход 2'-О-метилирования мишеней можно объяснить низкой эффективностью сборки каталитически компетентных метилтрансферазных комплексов с аналогами C/D-бокс-РНК. Вместе с тем, ранее Liu В. и соавт. [3, 4, 25] при трансфекции клеток дрожжей ДНК-конструкциями, кодирующими аналоги C/D-бокс-РНК, показали, что в трансфицированных клетках происходит экспрессия и созревание искусственных мяоРНК. Оказалось также, что экспрессия C/D-бокс-РНК, направленных на ряд нуклеотидов рРНК, существенно снижала скорость пролиферации и жизнеспособность клеток. Совокупность полученных данных позволила заключить, что именно 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК, направляемое аналогами C/D-бокс-РНК, было основной причиной влияния ДНК-конструкций на скорость пролиферации клеток. Однако в случае ряда C/D-бокс-РНК [3, 4, 25] удалось выявить лишь низкий уровень 2'-О-метилирования (либо отсутствие модификации) нуклеотидов-мишеней. С другой стороны, известно, что посттранскрипционные модификации – 2'-О-метилирование и псевдоуридилирование, происходят на стадии созревания 47S рРНК-предшественника [7, 26–28]. На стадии сборки функциональных рибосом проверяется качество рРНК-транскрипта, и неправильные, нефункциональные РНК-транскрипты подвергаются при этом деградации в экзосомах [29]. Синтетические аналоги C/D-бокс-РНК направлены на нуклеотиды рРНК, непосредственно участвующие в формировании и функционировании активных центров рибосомы. Возможно, 2'-О-метилирование рРНК, направляемое синтетическими аналогами C/D-бокс-РНК, существенно влияет на структуру рРНК и функ-

циональность рибосом, что, как следствие, приводит к быстрой деградации модифицированной РНК и ее низкому содержанию в трансфицированных клетках [25, 29].

Несмотря на наблюдаемое отсутствие модификации нуклеотида-мишени, искусственные С/D-боксы-РНК, комплементарно взаимодействуя с рРНК-мишенью, могут участвовать в регуляции процессов созревания рРНК-транскриптов, а также в сборке и функционировании рибосом. Таким образом, синтетические аналоги С/D-боксы-РНК могут участвовать в процессах жизнедеятельности трансфицированных клеток и, как результат, влиять на жизнеспособность и пролиферацию клеток человека.

Влияние аналогов С/D-боксы-РНК на жизнеспособность клеток человека МСF-7 мы оценивали с использованием МТТ-теста. Полученные нами данные позволили заключить, что трансфекция клеток синтетическими аналогами, первая область узнавания которых направлена на нуклеотиды 18S и 28S рРНК (табл. 2), приводит к снижению их жизнеспособности на 36–48% при начальной концентрации синтетической РНК в среде 70.0 нМ (рис. 6, РР.1827, РР.4499, РР.4500, РР.4502). В то же время синтетические аналоги, направленные одновременно на пре-мРНК белка теплового шока hsc70 и на G1702 18S рРНК (табл. 1), снижали жизнеспособность клеток только на 20–25% в диапазоне начальной концентрации 3.0–70.0 нМ (рис. 6, РМ.7, РМ.8).

При трансфекции клеток МСF-7 синтетическими аналогами С/D-боксы-РНК, направленными на U1827 18S рРНК, G4499, U4500 и U4502 28S рРНК, значительно снижалась скорость пролиферации и образования монослоя, а также изменялась морфология клеток. При этом уровень снижения жизнеспособности отличался у разных аналогов и зависел от нуклеотида-мишени и начальной концентрации РНК в культуральной среде (рис. 6).

Различие во влиянии синтетических аналогов С/D-боксы-РНК на жизнеспособность клеток МСF-7 указывает на то, что в процессе трансфекции эти РНК вовлекаются в регуляцию жизненно важных процессов в клетках человека. Тот факт, что это

различие обусловлено изменением структуры области узнавания мишени, позволяет предположить, что основной процесс, модулируемый аналогами С/D-боксы-РНК, это посттранскрипционный процессинг пре-рРНК. Необходимо отметить, что в качестве мишеней мы выбрали нуклеотиды рРНК, которые входят в состав активных центров рибосом – декодирующего и пептидилтрансферазного (табл. 2). Ранее Liu B. и соавт. [3, 4, 25] показали, что экспрессия в клетках дрожжей С/D-боксы-РНК, направленных на эти нуклеотиды, вызывала подавление их роста и приводила к частичной деградации рРНК.

Подавление жизнеспособности клеток человека под действием аналогов С/D-боксы-РНК указывает на их участие в регуляции процессов жизнедеятельности трансфицированных клеток. Наблюдаемое отсутствие модификации нуклеотидов-мишеней позволяет предположить, что аналоги С/D-боксы-РНК, направленные на рРНК, слабо вовлекаются в процессы 2'-О-метилирования нуклеотидов рРНК, но, возможно, участвуют в других этапах посттранскрипционного процессинга рРНК и в созревании рибосом.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе показано, что трансфекция клеток МСF-7 – аденокарциномы молочной железы человека, синтетическими аналогами С/D-боксы-РНК, направленными на нуклеотиды пре-мРНК белка теплового шока hsc70, приводит к нарушению сплайсинга пре-мРНК-мишени. Трансфекция клеток МСF-7 аналогами С/D-боксы-РНК, направленными на нуклеотиды 18S и 28S рРНК, ключевые для функционирования рибосом, вызывает снижение жизнеспособности клеток. Полученные результаты указывают на перспективность разработки средств регуляции трансляции и экспрессии генов человека на основе структуры мяоРНК. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 10-04-01386-а и 10-04-01442-а), грантом Президиума СО РАН № 18 (2009–2011 гг.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bachelierie J.P., Cavaille J., Huttenhofer A. // *Biochimie*. 2002. V. 84. P. 775–790.
- Cavaille J., Nicoloso M., Bachelierie J.P. // *Nature*. 1996. V. 383. P. 732–735.
- Liu B., Fournier M. // *RNA*. 2004. V. 10. P. 1130–1141.
- Liu B., Ni J., Fournier M. // *Methods*. 2001. V. 23. P. 276–286.
- Vitali P., Basyuk E., Le M.E., Bertrand E., Muscatelli F., Cavaille J., Huttenhofer A. // *J. Cell. Biochem*. 2005. V. 169. P. 745–753.
- Kishore S., Stamm S. // *Science*. 2006. V. 311. P. 230–232.
- Kiss-Laszlo Z., Henry Y., Bachelierie J.P., Caizergues-Ferrer M., Kiss T. // *Cell*. 1996. V. 85. P. 1077–1088.
- Maden B. // *Methods*. 2001. V. 25. P. 374–382.
- Qu L.H., Henry Y., Nicoloso M., Michot B., Azum M.C., Renalier M.H., Caizergues-Ferrer M., Bachelierie J.P. // *Nucl. Acids Res*. 1995. V. 23. P. 2669–2676.
- Rohde M., Daugaard M., Jensen M.H., Helin K., Nylandsted J., Jaattela M. // *Genes Dev*. 2005. V. 19. P. 570–582.
- Decatur W.A., Fournier M.J. // *Trends Biochem. Sci*. 2002. V. 27. P. 344–351.
- King T.H., Liu B., McCully R.R., Fournier M.J. // *Mol. Cell*.

2003. V. 11. P. 425–435.
13. Baxter-Roshek J.L., Petrov A.N., Dinman J.D. // PLoS ONE. 2007. V. 2. e174.
14. Graifer D.M., Karpova G.G., Knorre D.G. // Biochemistry. 2001. V. 66. P. 585–602.
15. Kiss-Laszlo Z., Henry Y., Kiss T. // EMBO J. 1998. V. 17. P. 797–807.
16. Moore M., Sharp P. // Science. 1992. V. 256. P. 992–997.
17. Dominski Z., Kole R. // Mol. Cell. Biol. 1994. V. 14. P. 7445–7454.
18. Sazani P., Kole R. // J. Clin. Invest. 2003. V. 112. P. 481–486.
19. Zalachoras I., Evers M.M., van Roon-Mom W.M., Aartsma-Rus A.M., Meijer O.C. // Front. Mol. Neurosci. 2011. V. 4. P. 1–12.
20. Semenov D.V., Stepanov G.A., Baryakin D.N., Koval O.A., Kuligina E.V., Richter V.A. // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum / Ed. Gahan P.B. Springer Science+Business Media B.V. 2011. P. 233–237.
21. Semenov D.V., Vratskih O.V., Kuligina E.V., Richter V.A. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008. V. 1137. P. 119–124.
22. Watkins N.J., Segault V., Charpentier B., Nottrott S., Fabrizio P., Bachi A., Wilm M., Rosbash M., Branlant C., Luhrmann R. // Cell. 2000. V. 103. P. 457–466.
23. Tollervey D., Lehtonen H., Jansen R., Kern H., Hurt E.C. // Cell. 1993. V. 72. P. 443–457.
24. Newman D.R., Kuhn J.F., Shanab G.M., Maxwell E.S. // RNA. 2000. V. 6. P. 861–879.
25. Liu B., Liang X.-H., Piekna-Przybylska D. // RNA Biol. 2008. V. 5. P. 249–254.
26. Ganot P., Bortolin M.L., Kiss T. // Cell. 1997. V. 89. P. 799–809.
27. Panse V.G., Johnson A.W. // Trends Biochem. Sci. 2010. V. 35. P. 260–266.
28. Freed E., Bleichert F., Dutca L., Baserga S. // Mol. Biosyst. 2010. V. 6. P. 481–493.
29. Vanacova S., Stefl R. // EMBO Rep. 2007. V. 8. P. 651–657.