

*На правах рукописи*



САВЕЛЬЕВА АННА ВАЛЕНТИНОВНА

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ РНК ВО ФРАКЦИЯХ  
ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ВЛИЯНИЕ  
НУКЛЕОФОЗМИНА 1 НА ПРОНИКНОВЕНИЕ  
СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ТАКИХ РНК В КЛЕТКИ  
МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

**Научный руководитель:**

к.х.н., доцент Семенов Дмитрий Владимирович

**Официальные оппоненты:**

д.б.н., проф. Гуляева Людмила Федоровна  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и  
биофизики», зав. лабораторией

к.б.н. Горчаков Андрей Александрович  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, с.н.с.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии  
наук

Защита состоится «26» мая 2017 г. в 10:00 часов  
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Институт химической  
биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090,  
Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Институт химической  
биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» апреля 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
к.х.н., доцент



Коваль В.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Кровь является одной из самых динамичных тканей человека и отличается повышенной вариабельностью состава не только между индивидуумами, но и в пределах одного организма, отражая его физиологическое состояние. РНК присутствуют в крови человека в форменных элементах, а также во внеклеточных мембранных везикулах (апоптотических тельцах, микровезикулах и экзосомах), внеклеточных комплексах с РНК-связывающими белками и комплексах с липопротеинами высокой плотности (Yáñez-Mó et al., 2015, Arroyo et al., 2011, Vickers et al., 2011). Данные литературы указывают на то, что внеклеточные мембранные везикулы крови содержат полноразмерные формы всех классов клеточных РНК, таких как рРНК, тРНК, мРНК, микроРНК, коротких и длинных некодирующих РНК, а также их фрагменты (Semenov et al., 2012, Nolte-’t Hoen et al., 2012). Для внеклеточных микроРНК крови также показана их циркуляция в комплексах с липопротеинами высокой плотности (Vickers et al., 2011) и РНК-связывающими белками, такими как аргонавт 2 (AGO2) (Arroyo et al., 2011) и нуклеофозмин 1 (NPM1) (Wang et al., 2010).

Показано также, что внеклеточные комплексы – везикулы, рибонуклеопротеины и липопротеины – являются медиаторами процессов межклеточного взаимодействия, и вовлечены в развитие иммунного ответа, воспалительных реакций, а также опосредуют процессы, связанные с развитием онкологических заболеваний и вирусных инфекций (Yáñez-Mó et al., 2015).

Таким образом, изменение набора РНК периферической крови, в том числе и ее внеклеточных фракций, таких как плазма и сыворотка, отражает протекание различных физиологических и патологических процессов в клетках и тканях организма. В настоящее время изменения состава РНК циркулирующих везикул крови используют в качестве диагностических и прогностических маркеров при разработке перспективных подходов малоинвазивной диагностики заболеваний человека. Также огромный интерес вызывает возможность использования циркулирующих комплексов для доставки лекарственных средств и поиска диагностических маркеров.

Несмотря на интенсивные исследования, направленные на описание состава циркулирующих РНК крови, данных о сравнительном анализе распределения клеточных РНК во фракциях плазмы крови человека, обогащенных мембранными везикулами или циркулирующими рибонуклеопротеиновыми комплексами, представлено не было.

Исследования биогенеза, транспортировки и интернализации внеклеточных комплексов позволят расширить представления о потенциале таких комплексов и усовершенствовать подходы к диагностике и терапии заболеваний человека.

### **Цель и задачи исследования**

**Целью** данной работы являлось проведение сравнительного анализа состава внеклеточных РНК фракций плазмы крови человека в норме и при развитии онкологического заболевания, а также оценка эффективности проникновения комплексов синтетических аналогов внеклеточных РНК и нуклеофозмина 1 в клетки человека.

В ходе работы необходимо было решить следующие задачи:

- методом последовательного центрифугирования получить фракции крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), обогащенные внеклеточными циркулирующими везикулами, и провести анализ морфологии, антигенного состава и гидродинамических размеров частиц;
- провести высокопроизводительное секвенирование РНК фракций плазмы крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ и охарактеризовать наборы полученных РНК;
- выявить формы РНК, характеризующиеся дифференциальным распределением во фракциях крови;

- выявить формы РНК, характеризующиеся дифференциальной экспрессией в анализируемых фракциях крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ;
- провести поиск кольцевых РНК в составе фракций крови человека и определить распределение их полноразмерных форм во фракциях крови здоровых доноров методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени;
- исследовать влияние рекомбинантного белка нуклеофозмина 1 на эффективность накопления синтетических аналогов внеклеточных РНК в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

**Научная новизна работы.** В настоящей работе впервые проведен сравнительный анализ состава РНК внеклеточных комплексов, циркулирующих в крови человека в норме и при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ). Показано, что внеклеточные везикулы плазмы крови, осаждаемые при усилиях 160 000 g, отличаются повышенным содержанием фрагментов малых ядерных РНК U1, U5A/B и U6 и пониженным содержанием фрагментов малых ядрышковых РНК.

В составе РНК фракций крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ выявлено 8 новых форм кольцевых РНК, ранее не аннотированных в базе данных [ncbi.nlm.nih.gov/sra](http://ncbi.nlm.nih.gov/sra). Впервые показано, что полноразмерные кольцевые РНК циркулируют в крови в составе комплексов с мембранными везикулами крови.

Впервые проведен анализ влияния рекомбинантного белка нуклеофозмина 1 на проникновение синтетических аналогов внеклеточных РНК плазмы крови в клетки человека и показано, что протяженные структурированные РНК (> 300 н.) в комплексе с нуклеофозмином 1 эффективнее накапливаются в клетках по сравнению со свободными РНК.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные в работе данные об относительном содержании фрагментов и полноразмерных РНК в составе различных типов внеклеточных комплексов плазмы крови человека в норме и при раке легкого расширяют и дополняют существующие представления о составе РНК циркулирующих комплексов крови. Выявленные для каждой фракции характеристические РНК, а также РНК, содержание которых во фракциях крови здоровых доноров отличается от онкопациентов, могут быть использованы для разработки тест-систем для ранней диагностики НМРЛ. Подход, разработанный для доставки аналогов синтетических РНК в клетки, основанный на использовании РНК-связывающих белков, может стать основой для создания РНК-трансфектантов белковой природы.

**Публикации и апробация работы.** По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах. Результаты работы были представлены на II Международной конференции "Физико-химическая биология" (Новосибирск, Россия, 2011), 16-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА" (Пущино, Россия, 2012), Международной конференции «Постгеномные технологии для биомедицины» (Новосибирск, Россия, 2012), Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские бионанотехнологии» (Москва, Россия, 2012), Международной конференции EMBO|EMBL Symposium «The complex life of mRNA» (Хайдельберг, Германия, 2012), научной конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, Россия, 2013), Международной конференции FEBS EMBO 2014 (Париж, Франция, 2014), Международной конференции «IX Congress CNAPS – Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum» (Берлин, Германия, 2015), VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015), XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова (Москва, Россия, 2016), Международной

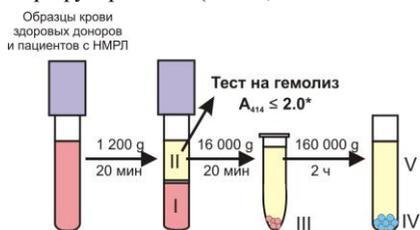
конференции 15th Annual Meeting of the International Society for Extracellular Vesicles (Роттердам, Нидерланды, 2016), Международной конференции «Химическая биология-2016» (Новосибирск, Россия, 2016), V съезде биохимиков России (Сочи, Россия, 2016).

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 135 страницах, включает 17 рисунков, 7 таблиц и 1 приложение. Список литературы содержит 270 источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1.1 Фракционирование крови человека методом последовательного центрифугирования

Препараты венозной крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) разделяли на пять фракций методом последовательного центрифугирования (Рис. 1).



**Рис. 1.** Схема получения фракций крови человека. Фракции крови: I – форменные элементы; II – плазма; III – мембранные частицы и клеточный дебрис, осаждаемые при 16 000 g; IV – мембранные частицы, осаждаемые при 160 000 g (в том числе экзосомы); V – супернатант плазмы, обедненный мембранными частицами. \* - допустимая глубина гемолиза в образцах плазмы крови, использованных для получения фракций крови II-V (Kirschner et al., 2011).

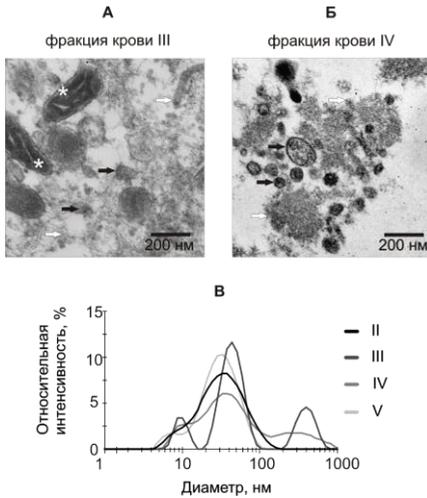
На первом этапе образцы цельной крови центрифугировали при 1 200 g и получали препараты форменных элементов (осадок) и плазмы, обедненной тромбоцитами (супернатант) (Cattaneo et al., 2007). На следующих этапах фракционирования использовали только препараты плазмы, в которых оптическое поглощение образца на длине волны 414 нм, соответствующее поглощению гемоглобина, не превышало 2,0 (Kirschner et al., 2011).

Отобранные образцы плазмы последовательно центрифугировали при 16 000 g и 160 000 g (Рис. 1). Такой подход позволяет на первом этапе провести осаждение микровезикул и апоптотических телец внеклеточной жидкости (Witwer et al., 2013, Crescitelli et al., 2013), а затем, на этапе ультрацентрифугирования – экзосом (Witwer et al., 2013, Momen-Heravi et al., 2012, Moldovan et al., 2013).

### 1.2 Анализ содержания мембранных частиц во фракциях крови человека методами электронной микроскопии, проточной цитофлуориметрии и динамического светорассеяния

Известно, что фракции плазмы крови человека, полученные центрифугированием при 16 000 и 160 000 g, обогащены субмикронными частицами, такими как микровезикулы и экзосомы, соответственно (Witwer et al., 2013, Momen-Heravi et al., 2012).

Для подтверждения присутствия мембранных частиц в осадках плазмы крови, полученных при усилиях 16 000 g и 160 000 g (фракции III и IV), был проведен анализ их ультратонких срезов с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Было установлено, что фракции III и IV обогащены мембранными пузырьками диаметром ~ 40-100 нм (Рис. 2 А, Б), а также содержат клеточный дебрис и макромолекулярные агрегаты биополимеров. При этом среди частиц плазмы крови, осаждаемых при 16 000 g (фракция III), были обнаружены митохондрии (Рис. 2 А).



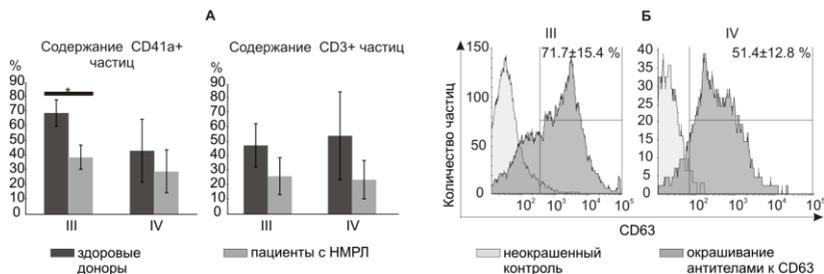
**Рис. 2.** Морфологический анализ фракций крови II-V. А, Б. Частицы плазмы крови, осаждаемые при усилиях 16 000 г (А) и 160 000 г (Б), данные просвечивающей электронной микроскопии ультратонких срезов. Черными стрелками обозначены мембранные частицы, белыми стрелками обозначены клеточный дебрис и макромолекулярные агрегаты биополимеров, звездочками обозначены митохондрии. В. Анализ фракций крови II-V методом динамического светорассеяния. II – плазма крови, III – мембранные частицы и клеточный дебрис, осаждаемые при 16 000 г, IV – мембранные частицы, осаждаемые при 160 000 г (в том числе экзосомы), V – супернатант плазмы, обедненный мембранными частицами.

Анализ полученных фракций крови методом динамического светорассеяния показал, что плазма крови (II) и ее фракции (III-V) содержат две схожие популяции частиц с гидродинамическим диаметром 5-20 нм и 20-100 нм (Рис. 2 В), что по литературным данным соответствует белковым комплексам плазмы крови (2-70 нм) и малым внеклеточным везикулам, в том числе экзосомам (30-100 нм) (Akers et al., 2013, Luik et al., 1998). Кроме того, во фракциях плазмы крови III и IV выявлена популяция частиц с гидродинамическим диаметром 150-1000 нм, которая, по-видимому, также относится к мембранным частицам плазмы крови, выявленным ПЭМ (Рис. 2 В).

Для того чтобы оценить клеточное происхождение мембранных частиц, выявленных во фракциях крови III и IV, был проведен анализ содержания поверхностных антигенов CD3, CD79a, CD41a и CD34, характерных для Т-клеток, В-клеток, тромбоцитов и незрелых гемопозитических клеток, соответственно. Методом проточной цитофлуориметрии было установлено, что мембранные частицы плазмы крови здоровых доноров, осаждаемые при 16 000 г/160 000 г (фракции крови III/IV), обогащены антигенами тромбоцитов/мегакариоцитов ( $69,4 \pm 9,0 \%$ / $43,6 \pm 21,5 \%$ ) и Т-клеток ( $71,7 \pm 15,4 \%$ / $51,4 \pm 12,8 \%$ ) (Рис. 3 А). При этом, сравнение фракций крови III и IV пациентов с НМРЛ и здоровых доноров показало, что во фракции везикул, осаждаемых при 16 000 г из плазмы онкопациентов, достоверно (t-критерий,  $p < 0,05$ ) снижено содержание частиц с маркерами тромбоцитов/мегакариоцитов (CD41a+) (Рис. 3 А).

Кроме того, мы провели анализ распределения трансмембранного белка CD63, используемого для идентификации и выделения экзосом (Jansen et al., 2009, Kosaka et al., 2010). Было установлено, что везикулы крови здоровых доноров (Рис. 3 Б) и пациентов с НМРЛ, осаждаемые при 16 000 г (III) и 160 000 г (IV), содержат  $71,7 \pm 15,4 \%$  и  $51,4 \pm 12,8 \%$  CD63+-частиц, соответственно.

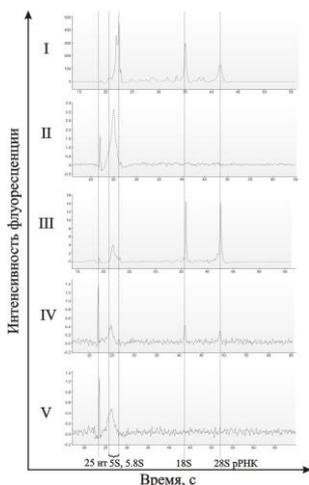
Анализ полученных результатов и данных литературы (Witwer et al., 2013, Hunter et al., 2008) позволяет заключить, что осадки плазмы крови 16 000 г и 160 000 г обогащены циркулирующими внеклеточными мембранными частицами - микровезикулами и экзосомами, преимущественно секретлируемыми тромбоцитами/мегакариоцитами и Т-клетками.



**Рис. 3.** Иммунохимический анализ мембранных частиц плазмы крови, осаждаемых при 16 000 г (III) и 160 000 г (IV), методом проточной цитометрии. А. Сравнительный анализ содержания CD41a<sup>+</sup>- и CD3<sup>+</sup>-частиц в осадках плазмы крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), получаемых при усилиях 16 000 г (III) и 160 000 г (IV). CD41a<sup>+</sup> - маркер тромбоцитов/мегакариоцитов, CD3<sup>+</sup> - маркер Т-клеток. Б. Анализ содержания CD63<sup>+</sup>-частиц в 16 000 г (III) и 160 000 г (IV) осадках плазмы крови здоровых доноров. Относительное количество CD63<sup>+</sup>-частиц приведено в формате значение среднего ± стандартное отклонение, рассчитанного для трех независимых повторов.

### 1.3 Электрофоретический анализ суммарной РНК фракций крови человека

Для того, чтобы охарактеризовать РНК фракций I-V, выделенных из крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, мы использовали метод микрокапиллярного электрофореза на платформе Agilent Bioanalyzer. Было показано, что фракции крови I-V содержат набор форм РНК, в которых вклад полноразмерных 18S, 28S рРНК и коротких форм (< 200 н.) существенно отличается у разных доноров. Все рассматриваемые фракции крови содержали РНК, длина которых соответствует коротким некодирующим РНК (< 200 н.), а также фрагментам РНК (Рис. 4). При этом во всех исследованных препаратах суммарной РНК клеток крови (I), а также везикул крови, осаждаемых при 16 000 г и 160 000 г (III и IV), присутствовали полноразмерные 18S и 28S рРНК (Рис. 4).



**Рис. 4.** Электрофоретические профили РНК фракций крови человека. Анализ препаратов суммарной РНК проводили с использованием RNA Pico Chip на Agilent 2100 Bioanalyzer. На рисунке для каждой фракции крови приведено изображение, отражающее типичный для данной фракции профиль РНК. Исследование выполнено в трех независимых повторах. I – форменные элементы крови; II – плазма крови; III – везикулы и клеточный дебрис, осаждаемые при 16 000 г; IV – везикулы, осаждаемые при 160 000 г (в том числе экзосомы); V – супернатант плазмы, обедненный везикулами.

В целом, наши результаты и данные литературы (Nolte-<sup>t</sup> Hoen et al., 2012, Crescitelli et al., 2013) позволяют заключить, что РНК везикул крови, которыми обогащены фракции

III и IV, представлена композицией полноразмерных форм клеточных РНК (в том числе и рРНК) и их фрагментов.

#### **1.4 Анализ РНК фракций крови I-V человека методом высокопроизводительного секвенирования**

Для детального анализа первичной структуры РНК фракций крови было использовано секвенирование по технологии SOLiD - одного из наиболее производительных методов для определения структуры коротких форм РНК (Mardis et al., 2008).

Для конструирования кДНК-библиотек мы использовали образцы венозной крови трех здоровых доноров – мужчин в возрасте от 45 до 65 лет без выявленных онкологических, аутоиммунных заболеваний и без обострений хронических воспалительных заболеваний. Кроме того, были использованы образцы крови 3 пациентов с аденокарциномой легкого (АКЛ) со следующими стадиями заболевания: T2aNxM1, T2bN3M1, T3N3M0 и образцы венозной крови 4-х пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ) на стадиях T2–3NxM0 в возрасте от 50 до 60 лет.

Образцы крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ разделяли на фракции как описано в разделе 1.1. Препараты форменных элементов крови и препараты плазмы крови объединяли в группах: здоровых доноров, пациентов с АКЛ и пациентов с ПКРЛ. Фракционирование плазмы и выделение РНК из фракций проводили с объединенными (пулированными) препаратами. Для конструирования кДНК-библиотек SOLiD был использован усовершенствованный метод, позволяющий анализировать короткие циркулирующие РНК (19-100 н.) с различным расположением концевых фосфатных групп (Semenov et al., 2012). Секвенирование по технологии SOLiD проводили в ЦКП «Геномика» СО РАН.

В результате было получено ~ 9-32 млн прочтений для каждой из 15 кДНК-библиотек. Для классификации выявленных фрагментов РНК фракций крови была использована стратегия выравнивания, описанная ранее в работе (Semenov et al., 2012).

В результате выравнивания было идентифицировано ~ от 3 до 15 миллионов экспериментальных последовательностей для каждой кДНК-библиотеки. Среди идентифицированных экспериментальных последовательностей РНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ были выявлены фрагменты всех основных классов клеточных РНК (Таблица 1).

##### **1.4.1 Характеристические РНК фракций крови I-V человека**

На следующем этапе мы провели попарный сравнительный анализ содержания индивидуальных форм РНК во фракциях крови I-V с использованием наборов РНК, идентифицированных для здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, как независимых реплик. В результате для каждой из пяти рассматриваемых фракций крови были найдены характеристические РНК, содержание которых в рассматриваемой фракции значительно отличалось от фракции сравнения как у здоровых доноров, так и у пациентов с НМРЛ. Повышенное содержание характеристических РНК в определенной фракции позволяет относить их к РНК, селективно загружаемыми во внеклеточные комплексы в процессе сборки последних, и, как следствие, делает их потенциальными медиаторами межклеточной коммуникации.

**Таблица 1.** Относительная представленность основных классов РНК в препаратах суммарной РНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ. Данные получены при выравнивании экспериментальных последовательностей, допускающем не более одного совпадения в наборе референсных последовательностей.

Фракции	I. Форменные элементы			II. Плазма			III. 16 000 g осадок			IV. 160 000 g осадок			V. 160 000 g супернатант		
	ЗД	ПКРЛ	АКЛ	ЗД	ПКРЛ	АКЛ	ЗД	ПКРЛ	АКЛ	ЗД	ПКРЛ	АКЛ	ЗД	ПКРЛ	АКЛ
<b>образцы крови<sup>(1)</sup></b>															
<b>Относительное содержание, %</b>															
мгРНК	2,45	5,38	0,72	13,76	8,89	0,33	17,84	12,01	1,01	2,83	1,16	0,12	7,52	0,61	0,09
pРНК	23,69	18,21	27,63	35,01	18,06	4,36	40,39	19,89	1,81	20,60	25,17	51,27	29,61	12,18	2,20
tРНК	0,70	0,36	2,74	2,39	0,70	0,21	0,42	0,23	1,05	0,50	0,57	0,52	1,06	0,86	0,53
У-РНК	1,83	0,88	1,53	1,48	1,31	0,37	5,01	1,29	4,80	1,31	0,79	0,64	1,62	0,25	3,73
U1-U17 мяРНК и 7SK РНК	0,52	0,22	0,56	0,20	0,07	0,07	0,06	0,04	0,02	0,17	0,31	0,70	0,18	0,15	0,12
SINE <sup>(2)</sup>	1,18	0,27	0,79	0,61	0,28	0,16	0,64	0,47	0,08	0,17	0,26	0,14	0,51	0,13	0,06
LINE <sup>(2)</sup>	0,46	0,23	0,17	0,23	0,35	0,15	0,15	0,28	0,14	0,18	0,32	0,17	0,28	0,51	0,18
LTR <sup>(2)</sup>	0,09	0,06	0,04	0,06	0,09	0,02	0,04	0,07	0,05	0,03	0,10	0,08	0,07	0,17	0,05
ДНК-повторы <sup>(2)</sup>	0,04	0,08	0,17	0,03	0,05	0,02	0,02	0,05	0,04	0,08	0,06	0,08	0,05	0,06	0,03
Другие транскрибируемые повторы <sup>(3)</sup>	0,03	0,07	0,03	0,09	0,07	0,02	0,06	0,05	0,03	0,05	0,25	0,13	0,75	3,85	0,03
мРНК	22,50	30,54	26,08	19,80	34,12	30,24	15,21	29,88	31,28	25,16	33,98	20,11	21,09	35,80	31,36
нкРНК	22,71	3,55	2,95	2,84	2,92	4,16	1,62	3,27	16,30	2,25	3,13	2,95	3,60	3,19	17,93
Non-RefSeq РНК <sup>(4)</sup>	23,79	40,14	36,60	23,50	33,10	59,89	18,54	32,47	43,39	46,67	33,89	23,08	33,67	42,23	43,69
<b>Количество экспериментальных последовательностей<sup>(5)</sup></b>															
Сумма <sup>(5)</sup>	8,0Е6	2,8Е6	4,1Е6	6,0Е6	4,3Е6	3,5Е5	5,3Е6	5,3Е6	1,5Е6	3,6Е6	4,1Е6	6,2Е6	3,2Е6	3,2Е6	2,1Е6

<sup>(1)</sup> Образцы крови здоровых доноров (ЗД), пациентов с плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ) или аденокарциномой легкого (АКЛ).

<sup>(2)</sup> Последовательности, классифицированные как фрагменты семейств SINE-, LINE-, LTR- и ДНК-повторов, аннотированных в базе данных G1R1 RepBase (Jurka et al., 2005). К семейству SINE-повторов отнесены также фрагменты 7SL РНК (NR\_002715).

<sup>(3)</sup> Группа включает транскрипты сателлитных повторов, простых повторов и ряда других повторов ДНК, аннотированных в G1R1 RepBase (Jurka et al., 2005).

<sup>(4)</sup> Последовательности, классифицированные как фрагменты транскриптов генома человека (интронов NM/NR записей базы данных РНК человека RefSeq и интронов новых днРНК, не аннотированных в базе РНК человека RefSeq).

<sup>(5)</sup> Общее число экспериментальных последовательностей, классифицированных для каждой кДНК-библиотеки.

#### 1.4.1.1 Распределение митохондриальных РНК во фракциях крови

Сравнительный анализ содержания индивидуальных форм мтРНК во фракциях крови показал, что частицы плазмы (16 000 г) значительно обогащены фрагментами мт-тРНК<sub>Asp</sub> и 16S рРНК (mt-RNR2) по сравнению с супернатантом плазмы, обедненным циркулирующими везикулами (Приложение А диссертации, Таблица А.1).

Недавно было показано, что источником внеклеточных митохондрий в плазме крови являются тромбоциты, которые секретируют активные митохондрии в составе везикул и в свободной форме (Duchez et al., 2015, Boudreau et al., 2014). При этом внеклеточные митохондрии тромбоцитарного происхождения в комплексе с секреторной фосфолипазой А2 ПА взаимодействуют с нейтрофилами, активируют последние и тем самым участвуют в процессе развития реакции воспаления (Boudreau et al., 2014).

В совокупности с данными литературы наши результаты указывают на то, что часть частиц, выявленных нами в осадке плазмы 16 000 г, является митохондриями тромбоцитарного происхождения.

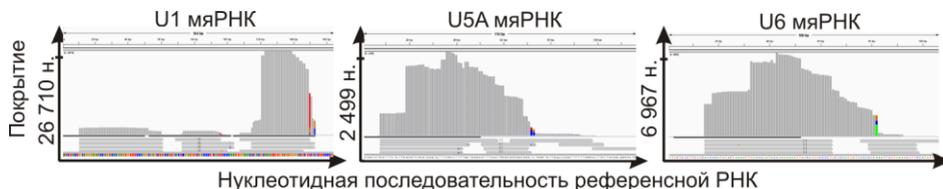
#### 1.4.1.2 Распределение мажорных клеточных РНК и транскрибируемых геномных повторов во фракциях крови

Сравнительный анализ распределения фрагментов мажорных клеточных РНК во фракциях крови показал, что везикулы плазмы крови, осаждаемые при усилиях 160 000 г, обогащены фрагментами малых ядерных РНК. При этом относительный вклад фрагментов U1, U5A/B и U6 мяРНК в общий набор форм РНК был в 2,6-3,9 раз выше в осадке плазмы, получаемом при усилиях 160 000 г, по сравнению с цельной плазмой и осадком плазмы, получаемом при усилиях 16 000 г (Таблица 2).

**Таблица 2.** Характеристические формы мажорных клеточных РНК мембранных частиц плазмы крови, осаждаемых при усилиях 160 000 г (IV) (составлено по данным Таблицы А.1 приложения А диссертации).

Фракция крови 1	Фракция крови 2	ID	FPKM1	FPKM2	Log <sub>2</sub>	q-value
IV. 160 000 г осадок плазмы	II. Плазма	U5A_snRNA	1,1E5	1,7E4	2,6	0,038
		U5B_snRNA	1,1E5	1,3E4	3,1	0,003
		U6_snRNA	3,9E5	2,7E4	3,9	0,003
	III. 16 000 г осадок плазмы	U1_snRNA	5,7E5	5,7E4	3,3	0,003
		U5A_snRNA	1,1E5	1,3E4	3,1	0,015
		U5B_snRNA	1,1E5	1,5E4	2,9	0,045

Анализ распределения экспериментальных последовательностей по референсным последовательностям мяРНК показал, что, в отличие от U5A и U6 мяРНК, циркулирующие фрагменты U1 мяРНК относятся к 3'-концевой части этой мяРНК (Рис. 5).



**Рис. 5.** Покрывтие референсных последовательностей U1, U5A и U6 мяРНК экспериментальными последовательностями циркулирующих РНК, идентифицированных в препаратах РНК частиц плазмы (160 000 г) здоровых доноров и пациентов с НМРЛ. Визуализацию

данных проводили с использованием программного пакета IGV v.2.3 (<http://www.broadinstitute.org/igv/>).

Известно, что процессинг некодирующих РНК приводит к образованию микроРНК-подобных форм, участвующих в регуляции экспрессии генов по механизму РНК-интерференции (Röther et al., 2011, Wei et al., 2013). Таким образом, анализ распределения фрагментов U1, U5A/B и U6 мяРНК позволяет предполагать, что, наряду с микроРНК, фрагменты малых ядерных РНК, а также их полноразмерные формы в составе мембранных частиц плазмы крови (160 000 г) являются медиаторами процессов межклеточного взаимодействия.

#### **1.4.1.3 Экзоны мРНК и некодирующих РНК, аннотированные в базе данных РНК человека RefSeq**

Сравнительный анализ фракций крови показал, что везикулы плазмы здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, осаждаемые при 16 000 г и 160 000 г, значительно обеднены фрагментами малых ядрышковых РНК, такими как SNORD110, SNORD65, SNORA31, и обогащены по ряду индивидуальных форм мРНК и микроРНК (Приложение А диссертации, Таблица А.2).

#### **1.4.2 Биоинформационный поиск РНК с дифференциальным и инвариабельным распределением во фракциях крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ**

Развитие НМРЛ сопровождается значительным изменением профиля внеклеточных микроРНК, мяРНК, мяоРНК и длинных некодирующих РНК крови (Hu et al., 2008, Chen et al., 2008, Heegaard et al., 2012, Köhler et al., 2016., Hu et al., 2016).

В данной работе было проведено сравнение наборов РНК фракций крови здоровых доноров и пациентов с ПКРЛ, а также отдельно фракций крови здоровых доноров и пациентов с АКЛ. В результате были выявлены формы РНК, имеющие схожее и дифференциальное распределение во фракциях крови здоровых доноров и онкопациентов. В данной работе для форм РНК с близким относительным вкладом во фракциях крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ мы используем обозначение «инвариабельные РНК». Поскольку относительный вклад инвариабельных РНК во фракциях крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ отличается незначительно, то можно предположить участие таких РНК в жизненно-важных процессах организма, опосредованных внеклеточными комплексами плазмы крови.

Списки инвариабельных форм РНК приведены в Таблицах А.3-А.10 (Приложение А диссертации), а списки форм РНК с дифференциальным распределением во фракциях крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ приведены в Таблицах А.11 и А.12 (Приложение А диссертации).

##### **1.4.2.1 Инвариабельные мтРНК и транскрипты геномных повторов фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ**

Наименьшей вариабельностью относительного вклада во всех фракциях крови отличаются фрагменты транспортных РНК митохондрий (мт-тРНК). Кроме того, среди 10 наиболее представленных инвариабельных мтРНК плазмы крови также выявлены фрагменты мт-рРНК (RNR1) и мт-мРНК (АТР8 и ND1). (Приложение А диссертации, Таблица А.3)

Сравнительный анализ относительного вклада транскриптов геномных повторов показал, что бо́льшая часть форм инвариабельных транскриптов кодируется повторами L1-семейства ретротранспозонов (LINE-1) (Приложение А диссертации, Таблица А.4).

##### **1.4.2.2 Инвариабельные мРНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ**

Наборы фрагментов мРНК (записи NM базы данных RefSeq), имеющих близкий относительный вклад в общий набор форм РНК индивидуальных фракций крови

здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, значительно отличались между фракциями. Однако были выявлены и инвариабельные индивидуальные формы РНК, характерные для нескольких фракций одновременно, например: мРНК гена PRKCH, кодирующего протеин киназу C-eta (Приложение А диссертации, Таблица А.6).

С помощью пакета программ PANTHER (Mi et al., 2016) проведен анализ генных аннотаций для выявления функциональных групп инвариабельных форм РНК фракций крови. Показано, что форменные элементы крови, плазма и везикулы, осаждаемые при 16 000 g и 160 000 g, обогащены фрагментами мРНК, кодирующих гистоны – ядерные белки, участвующие в процессе сборки и организации хроматина (выявлены группы генных онтологий GO:0031497 и GO:0006325,  $p$ -value с коррекцией по Бонферрони < 2,2E-05). Кроме того, в списке инвариабельных мРНК везикул плазмы, осаждаемых при 160 000 g, выявлено обогащение мРНК, кодирующими белки рибосомного комплекса; белки, участвующие в трансляции и деградации транскрибируемых в ядре мРНК; а также белки, участвующие в процессинге рРНК (GO:0006412, GO:0000184, GO:0006364,  $p$  < 6,0E-07). При этом для набора из 133 инвариабельных мРНК, выявленных для плазмы, обедненной везикулами (супернатант 160 000 g), значимых ( $p$  < 0,05) обогащений фрагментами мРНК генов, связанных онтологиями, выявлено не было.

#### **1.4.2.3 Инвариабельные днРНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ**

Анализ распределения инвариабельных длинных некодирующих РНК (записи NR в базе данных RefSeq, которым соответствуют транскрипты длиной > 200 н.) показал, что мембранные частицы плазмы, осаждаемые при 160 000 g, а также супернатант плазмы (160 000 g) отличались повышенным содержанием индивидуальных форм инвариабельных днРНК – 20 и 13 видов, соответственно (Приложение А диссертации, Таблица А.7), по сравнению с форменными элементами, плазмой и осадком плазмы (16 000 g). Отсутствие перекрывающихся форм в списках инвариабельных днРНК фракций крови IV и V указывает на существующие различия в процессах селективной загрузки днРНК во внеклеточные комплексы, которыми обогащены эти фракции – везикулы и рибонуклеопротеиновые комплексы, соответственно.

#### **1.4.2.4 Инвариабельные микроРНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ**

Среди инвариабельных форм микроРНК изоформы MIR103-1/2 были выявлены во всех пяти фракциях крови: клетках, плазме и ее субфракциях (Приложение А диссертации, Таблица А.8). При этом микроРНК MIR16-1/2, 107, 126, 223 и 451 отличались схожим распределением в образцах крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ как минимум в трех фракциях из пяти (Приложение А диссертации, Таблица А.8). Схожий набор микроРНК (MIR451, 103-1/2, 16-1/2, 223 и 126) входит в топ 20 микроРНК, высокопредставленных во фракциях крови I-V.

Недавно, по результатам гибридизации на микрочипах и с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени было показано, что микроРНК MIR16, 103, 107, 223 и 451 являются мажорными микроРНК, секретлируемыми тромбоцитами человека в составе микрочастиц (Laffont et al., 2013, Duchez et al., 2015).

Наши результаты согласуются с выдвинутым ранее предположением (Laffont et al., 2013) о том, что тромбоциты являются основным источником мембранных микрочастиц и, как следствие, циркулирующих РНК крови. Вместе с тем, наши данные также указывают на то, что не только тромбоциты, но и другие форменные элементы крови, в том числе лимфоциты, вносят значительный вклад в разнообразие микроРНК плазмы крови и ее субфракций.

#### **1.4.2.5 Инвариабельные мяоРНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ**

Малые ядрышковые Н/АСА бокс и С/Д бокс РНК – это класс регуляторных некодирующих РНК, о распределении которых в крови, плазме и ее фракциях, а также об их функциях во внеклеточном пространстве в настоящее время имеются лишь отрывочные данные.

Наибольшее количество инвариабельных мяоРНК было выявлено во фракции клеток крови и везикул плазмы (160 000 g) здоровых доноров и пациентов с НМРЛ (Приложение А диссертации, Таблица А.9). При этом фрагменты SNORD84 (NR\_003065) были обнаружены среди инвариабельных мяоРНК клеток крови, плазмы и частиц плазмы, осаждаемых при 160 000 g. Остальные инвариабельные мяоРНК были представлены набором неперекрывающихся форм для каждой фракции (Приложение А диссертации, Таблица А.9).

Особый интерес представляет тот факт, что везикулы плазмы крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, осаждаемые при 160 000 g, содержали обширный набор инвариабельных мяоРНК (бокс Н/АСА и бокс С/Д РНК), непересекающийся с набором мяоРНК клеток крови.

#### **1.4.2.6 Инвариабельные фрагменты РНК, неаннотированных в базе данных RefSeq (non-RefSeq), фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ**

В настоящее время известно, что бoльшая часть геномной ДНК человека участвует в процессе транскрипции (Wong et al., 2001). При этом в составе РНК клеток человека кроме канонических транскриптов, таких как рРНК, тРНК, мРНК, мяРНК, мцРНК, содержатся длинные некодирующие РНК ( $n > 200$  н.), отличающиеся расположением кодирующих их последовательностей по отношению к белок-кодирующим генам. Показано, что днРНК присутствуют не только в клетках, но и во внеклеточном пространстве. В данной работе для каждой исследуемой фракции крови был проведен поиск инвариабельных фрагментов днРНК, среди идентифицированных фрагментов non-RefSeq РНК (Приложение А диссертации, Таблица А.10).

Было установлено, что каждая из рассматриваемых фракций крови человека содержит уникальный набор фрагментов днРНК, среди которых встречаются транскрипты интронов известных мРНК, а также новые, не описанные ранее, транскрипты человека. При этом уникальность набора non-RefSeq РНК фракций крови, обогащенных микровезикулами и экзосомами, указывает на функционирование процессов селективной загрузки днРНК во внеклеточные везикулы.

#### **1.4.2.7 Дифференциально распределенные фрагменты РНК фракций крови I-V здоровых доноров и пациентов с НМРЛ**

Для выявления транскриптов, содержание которых во фракциях крови здоровых доноров достоверно отличается от содержания во фракциях крови пациентов с НМРЛ, мы провели две серии попарных сравнений фракций крови здоровых доноров и пациентов с плоскоклеточным раком легкого, а также здоровых доноров и пациентов с аденокарциномой легкого с помощью пакета программ Cuffdiff (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>) (Приложение А диссертации, Таблицы А.11 и А.12).

Оба набора дифференциально распределенных транскриптов, выявленных для фракций крови пациентов с ПКРЛ (Приложение А диссертации, Таблица А.11) и пациентов с АКЛ (Приложение А диссертации, Таблица А.12), были представлены фрагментами транскриптов митохондриальных генов, транскрибируемых геномных повторов, фрагментами vault-РНК, мРНК, днРНК, микроРНК и мяоРНК.

При этом для везикул плазмы (16 000 g) пациентов с ПКРЛ было выявлено 367 дифференциально экспрессированных РНК, из них 313 являлись фрагментами мРНК и микроРНК (Приложение А диссертации, Таблица А.11). В то время как среди 63/74

дифференциально экспрессированных форм РНК плазмы/супернатанта плазмы крови (160 000 г) пациентов с АКЛ был выявлен повышенный вклад индивидуальных форм мРНК (26/37, соответственно) (Приложение А диссертации, Таблица А.12).

Изменения в составе циркулирующих микроРНК крови онкологических пациентов связаны с развитием злокачественного новообразования (Hu et al., 2008, Chen et al., 2008), поэтому микроРНК плазмы крови рассматривают как основной объект для разработки тест-систем малоинвазивной диагностики онкологических заболеваний. Однако наши данные указывают на то, что не только микроРНК, но и циркулирующие мРНК являются перспективными объектами для усовершенствования методов диагностики онкологических заболеваний человека.

### **1.5 Кольцевые РНК фракций крови I-V человека**

Недавно во внеклеточном пространстве были выявлены новые формы некодирующих РНК - кольцевые РНК (кцРНК) (Koh et al., 2014, Conn et al., 2015, Bahn et al., 2015). Кольцевые РНК – это класс некодирующих РНК с замкнутой структурой рибозофосфатного остова, содержащих внутримолекулярную 5'-3'-фосфодиэфирную связь между первым и последним нуклеотидами транскрипта. В настоящее время кцРНК рассматривают как одну из форм конкурентных эндогенных РНК, к которым также относятся линейные длинные некодирующие РНК (Salmena et al., 2011, Qu et al., 2015).

Поскольку замкнутая структура кцРНК обеспечивает им большую стабильность во внеклеточном пространстве, на следующем этапе работы был проведен поиск и анализ распределения полноразмерных транскриптов кцРНК во фракциях крови человека.

#### **1.5.1 Поиск индикаторных последовательностей кольцевых транскриптов в массиве данных высокопроизводительного секвенирования РНК форменных элементов, плазмы и субфракций плазмы крови человека**

Массив экспериментальных данных высокопроизводительного секвенирования РНК крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) сравнивали с набором референсных последовательностей, составленным из индикаторных соединений 5'- и 3'-концов экзонов пре-мРНК и пре-днРНК.

В результате выравнивания экспериментальных последовательностей РНК фракций крови здоровых доноров и онкопациентов было выявлено 1134 индикаторных соединения экзонов. Из них для дальнейшего анализа было выбрано 88 кцРНК крови человека, индикаторные соединения которых встречались в исходном наборе экспериментальных последовательностей более 4-ех раз и не содержали простых геномных повторов (Таблица 3).

Сравнение полученных результатов с данными литературы показало, что 80 из 88 достоверных индикаторных соединений экзонов аннотированы в базе данных *circBase* (Glazar et al., 2014), а 8 соединений экзонов представляют собой фрагменты новых, не аннотированных ранее, кольцевых РНК человека (Таблица 3).

#### **1.5.2 Анализ функций кцРНК крови человека *in silico***

Для ряда кцРНК показано участие в регуляции экспрессии генов за счет взаимодействия с малыми РНК и белками, модулирующими транскрипцию или трансляцию генов того же геномного локуса, который кодирует эти кцРНК (Guo et al., 2014, Memczak et al., 2013, Zhang et al., 2013). Поэтому процессы, в которых участвуют белки – продукты данного гена, потенциально, регулируются и продуктами обратного сплайсинга пре-мРНК – кольцевыми РНК этого же гена.

Анализ генных онтологий (GO-аннотаций) для выявленных 88 генов, кодирующих кцРНК крови человека показал, что данный набор обогащен ( $p < 0,05$ ) генами транскрипционных регуляторов и кофакторов (*SIN3A*, *ZMYND8*, *NCOA2* и др.), а также генами, продукты которых участвуют в процессах котранскрипционной и посттранскрипционной модификации белков (категория генных онтологий GO:0006464).

Кроме того, в наборе достоверно ( $p < 0,05$ ) повышен вклад генов, кодирующих белки мембранных везикул и регуляторов мембранного транспорта – *CLTA*, *SEC31A*, *VAMP3* и др.

Полученные данные позволяют предположить, что кольцевые РНК форменных элементов и плазмы крови человека могут участвовать в регуляции процессов синтеза РНК в ядре, в процессах модификации белков, а также в процессах сборки везикулярных мембран и регуляции мембранного транспорта.

**Таблица 3.** Кольцевые РНК, выявленные высокоэффективным секвенированием суммарных РНК форменных элементов, плазмы и субфракций плазмы крови человека (составлено по данным Таблицы 5 диссертации). Подчеркнуты ID кцРНК, выбранных для анализа методом ОТ-ПЦР.

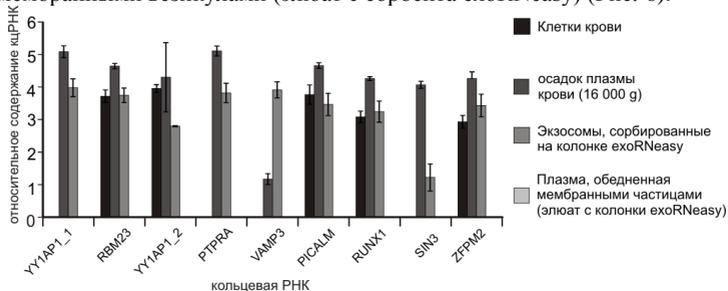
NM/NR <sup>(1)</sup>	ID	E1 <sup>(2)</sup>	E2 <sup>(2)</sup>	N <sup>(3)</sup>	S <sup>(4)</sup>	Chr <sup>(5)</sup>
<b>Известные кцРНК (Top 10)</b>						
NM_139121	<u>YYIAP1</u>	5	3	56	-	chr1:155646339-155649303
NM_018107	<u>RBM23</u>	3	2	54	-	chr14:23378692-23380612
NM_139121	<u>YYIAP1</u>	6	3	48	-	chr1:155644801-155649303
NM_015313	<u>ARHGEF12</u>	3	2	42	+	chr11:120276827-120278532
NM_080841	<u>PTPRA</u>	5	4	36	+	chr20:2944918-2945848
NM_213649	<u>SFXN4</u>	5	3	35	-	chr10:120920427-120921926
NM_001142680	<u>ANO6</u>	13	11	28	+	chr12:45771836-45784281
NM_006540	<u>NCOA2</u>	4	3	25	-	chr8:71126138-71128999
NM_177969	<u>PPM1B</u>	4	2	24	+	chr2:44436349-44445676
NM_019001	<u>XRN1</u>	2	2	22	-	chr3:142151503-142151735
... известные кцРНК, выбранные для верификации						
NM_003489	<u>NRIP1</u>	3	2	12	-	chr21:16386665-16415895
NM_004781	<u>VAMP3</u>	4	3	11	+	chr1:7837220-7838229
NM_001754	<u>RUNX1</u>	7	6	9	-	chr21:36206707-36231875
NM_015477	<u>SIN3A</u>	6	5	9	-	chr15:75703833-75705386
NM_012082	<u>ZFPM2</u>	3	2	5	+	chr8:106431372-106456609
NM_001379	<u>DNMT1</u>	7	5	4	-	chr19:10284547-10288043
NM_007166	<u>PICALM</u>	12	9	4	-	chr11:85707869-85714494
<b>Новые<sup>(6)</sup></b>						
NM_018051	<u>WDR60</u>	5	3	7	+	chr7:158663833-158672680
NM_005548	<u>KARS</u>	7	3	4	-	chr16:75668071-75674247
NM_172373	<u>ELF1</u>	7	6	4	-	chr13:41517088-41518061
NM_014393	<u>STAU2</u>	10	5	4	-	chr8:74507401-74585477
NM_025267	<u>PTGES3L-AARSD1</u>	6	5	4	-	chr17:41122306-41123713
NM_203364	<u>CAPRINI</u>	9	8	4	+	chr11:34104372-34104588
NR_033798	<u>CAST</u>	7	3	4	+	chr5:96083049-96090445
NM_015569	<u>DNM3</u>	16	14	4	+	chr1:172100315-172277979

(1) NM/NR идентификатор линейного транскрипта в базе данных Nucleotide NCBI.  
(2) Номера экзонов с 5'-и 3'-концов индикаторного соединения обратного сплайсинга.  
(3) Количество идентифицированных экспериментальных последовательностей.  
(4) Ориентация транскрипта в хромосоме.  
(5) Геномные координаты 5'-конца акцепторного экзона и 3'-конца донорного экзона обратного сплайсинга (GRCh37/hg19).  
(6) Выявленные в данной работе индикаторные соединения донорных и акцепторных сайтов обратного сплайсинга кольцевых РНК, не аннотированные в базе данных circbase.org (Glažar et al., 2014).

### 1.5.3 Анализ распределения полноразмерных кцРНК во фракциях крови здоровых доноров методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Анализ содержания полноразмерных форм 12 обнаруженных кцРНК в форменных элементах и в субфракциях плазмы крови здоровых доноров проводили методом ОТ-ПЦР. Для получения фракций крови, обогащенных экзосомами, мы использовали сорбент ExoRNeasy (Qiagen, Германия). Подобранные пары праймеров позволяли проводить обратную транскрипцию РНК и ПЦР так, чтобы в амплификации участвовали только кДНК кольцевых РНК, но не их линейных гомологов. Из 12 выбранных кцРНК (таблица 3) 3 полноразмерных транскрипта: ARHGEF12, NRIP1 и DNMT1 не были выявлены ни в одной из анализируемых фракций крови здоровых доноров.

Для 9 кцРНК было установлено, что относительный вклад таких транскриптов во фракциях крови человека значительно ( $p < 0,05$ ) различается от фракции к фракции. При этом наибольшее относительное содержание кольцевых РНК (кроме VAMP3) выявлено в составе частиц крови, осаждающихся при 16 000 g. Ни один из выбранных для анализа полноразмерных кольцевых транскриптов не был выявлен во фракциях плазмы крови, обедненной мембранными везикулами (элюат с сорбента exoRNeasy) (Рис. 6).



**Рис. 6.** Анализ содержания кольцевых РНК во фракциях крови методом ОТ-ПЦР. Относительное содержание кольцевых РНК в составе форменных элементов, частиц плазмы крови, осаждаемых при 16 000 g, а также в составе частиц плазмы крови, связывающихся с сорбентом exoRNeasy, и плазмы, обедненной по мембранным везикулам.

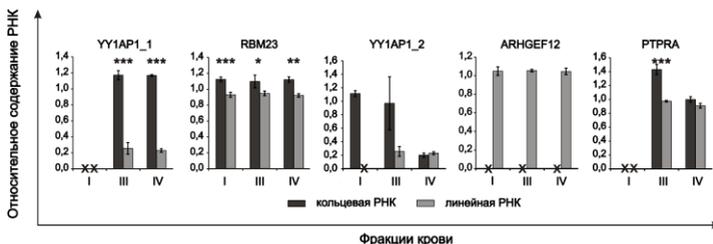
Таким образом, показано, что внеклеточные кцРНК циркулируют в крови преимущественно в составе мембранных комплексов, таких как экзосомы и микровезикулы.

### 1.5.4 Анализ относительного распределения кцРНК и их линейных мРНК-гомологов во фракциях крови здоровых доноров методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Для того чтобы сравнить представленность кольцевых транскриптов и их линейных мРНК-гомологов – продуктов одного гена - мы подобрали пары праймеров, которые позволяют проводить обратную транскрипцию и амплификацию кДНК экзонов мРНК, прилежащих к экзонам, образующим рассматриваемые кольцевые транскрипты.

Для всех проанализированных генов, кроме ARHGEF12, установлено, что содержание кольцевых форм РНК сравнимо или превышает содержание их линейных мРНК-гомологов в форменных элементах, во фракциях везикул (16 000 g) и в препаратах экзосом крови, взаимодействующих с сорбентом exoRNAeasу (Рис. 7).

Наши результаты в совокупности с данными литературы подтверждают предположение о том, что кольцевые РНК могут проявлять свойства конкурентных эндогенных РНК в клетках человека.



**Рис. 7.** Анализ относительного содержания кольцевых и линейных транскриптов генов *YYIAP1*, *RBM23*, *ARHGEF12*, *PTPRA* во фракциях крови методом ОТ-ПЦР. Относительное содержание продуктов генов *YYIAP1*, *RBM23*, *ARHGEF12*, *PTPRA* - кольцевых РНК и их линейных мРНК-гомологов - во фракциях крови: I – форменные элементы; III – мембранные частицы плазмы крови, осаждаемые при 16 000 g; IV – мембранные частицы плазмы крови, связывающиеся с сорбентом exoRNeasy. X – ПЦР-продукт не был детектирован. \*\*\*, \*\*, \* -  $p_{\text{St}} \leq 0,001, 0,01, 0,05$ , соответственно.

### 1.5.5 Анализ экспрессии кольцевых РНК крови в культивируемых клетках человека методом ОТ-ПЦР

Ранее было показано, что культивируемые линии клеток человека характеризуются уникальным паттерном экспрессии кцРНК (Salzman et al., 2013). Поэтому мы провели анализ экспрессии выявленных кольцевых РНК крови в трех линиях культивируемых клеток человека: аденокарциномы молочной железы – MCF-7 и MDA-MB-231, а также в клетках аденокарциномы легкого A549.

Было установлено, что каждая из 12 выбранных кцРНК крови человека достоверно детектируется по крайней мере в одной из трех линий культивируемых клеток человека (Таблица 4).

**Таблица 4.** Экспрессия кольцевых РНК в культивируемых клетках человека: аденокарциномы молочной железы MCF-7, MDA-MB-231 и аденокарциномы легкого A549.

ID	Chr <sup>(1)</sup>	ОТ-ПЦР			(Salzman et al., 2013)	
		MCF-7	MDA-MB-231	A549	MCF-7	A549
<i>YYIAP1</i>	chr21:16386665-16415895	+	+	+	-	-
<i>RBM23</i>	chr1:7837220-7838229	+	+	+	-	+
<i>YYIAP1</i>	chr21:36206707-36231875	+	+	+	-	-
<i>ARHGEF12</i>	chr15:75703833-75705386	+	+	+	-	+
<i>PTPRA</i>	chr8:106431372-106456609	+	+	+	-	+
<i>NRIP1</i>	chr19:10284547-10288043	+	+	+	+	+
<i>VAMP3</i>	chr11:85707869-85714494	+	+	+	-	-
<i>RUNX1</i>	chr21:16386665-16415895	+	+	+	+	+
<i>SIN3A</i>	chr1:7837220-7838229	-	-	+	-	+
<i>ZFPM2</i>	chr21:36206707-36231875	-	+	+	-	-
<i>DNMT1</i>	chr15:75703833-75705386	+	-	+	-	-
<i>PICALM</i>	chr8:106431372-106456609	+	+	+	-	+

<sup>(1)</sup> Геномные координаты 5'-конца акцепторного экзона и 3'-конца донорного экзона обратного сплайсинга (GRCh37/hg19).

Сравнение полученных результатов с данными литературы показало, что кольцевые РНК – продукты генов *YYIAP1*, *VAMP3*, *ZFPM2* и *DNMT1*, достоверно детектируются в

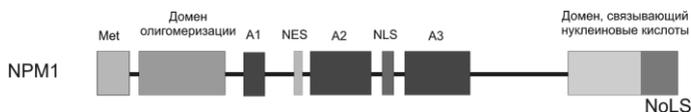
препаратах РНК клеток MCF-7 или A549, однако в работе Salzman с соавт. (Salzman et al., 2013) экспрессия этих кцРНК в соответствующей линии клеток не выявлена (Таблица 4).

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что кольцевые РНК человека, выявленные в составе РНК форменных элементов, плазмы и ее фракций, экспрессируются не только в клетках гемопозитического происхождения, но и в клетках другого тканевого происхождения – эпителиоцитах молочной железы MDA-MB-231, MCF-7, а также в эпителиоцитах легкого A549.

Кроме того, сопоставление наших результатов с данными литературы (Salzman et al., 2013, Zhang et al., 2013) позволяет заключить, что экспрессия кцРНК существенно различается между линиями клеток и между лабораторными штаммами клеток одной линии (таблица 4).

## 1.6 Оценка возможности использования нуклеофозмина 1 в качестве транспортера синтетических аналогов внеклеточных РНК крови в клетки человека

Нуклеофозмин 1 (NPM1/B23/нуматрин) – многофункциональный ядрышкового фосфопротеин, имеющий сложное мультидоменное строение (Рис. 8).



**Рис. 8.** Строение нуклеофозмина 1 человека (в соответствии с (Lindström et al., 2010)). A1-A3 - домены, обогащенные остатками аспарагиновой и глутаминовой кислот; NES - сигнал экспорта из ядра (nuclear export signal); NLS - сигнал локализации в ядре (nuclear localization signal); NoLS - сигнал ядрышковой локализации (nucleolar localization signal); Met – регион, богатый остатками метионина.

Известно, что NPM1 присутствует в неэкзосомной фракции среды, конденсированной клетками первичной культуры фибробластов легкого и клетками гепатокарциномы HepG2, культивированными в условиях сывороточного голодания (Wang et al., 2010). При этом miR-122 в комплексе с NPM1 проявляет повышенную устойчивость к гидролизу РНКазой A *in vitro* (Wang et al., 2010). Эти данные позволили предположить, что нуклеофозмин 1 является компонентом внеклеточных циркулирующих рибонуклеопротеиновых комплексов и непосредственно участвует в упаковке и экспорте микроРНК клетками млекопитающих. Однако вопрос об участии нуклеофозмина 1 в процессах захвата и интернализации внеклеточных РНК клетками-реципиентами оставался нерешенным.

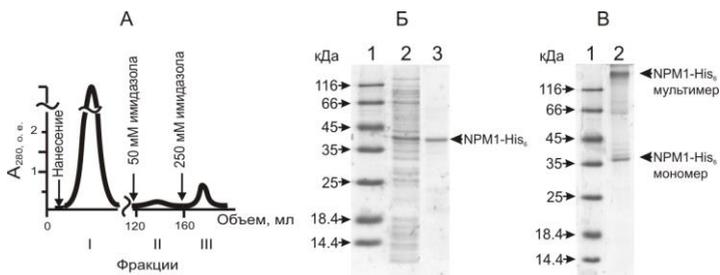
В данной работе проведен анализ взаимодействия генно-инженерного аналога нуклеофозмина 1 с синтетическими некодирующими РНК *in vitro* и оценка влияния нуклеофозмина 1 на эффективность накопления синтетических РНК в клетках аденокарциномы молочной железы MCF-7.

### 1.6.1 Выделение и характеристика рекомбинантного аналога NPM1-His<sub>6</sub>

ДНК гена *NPM1*, кодирующего изоформу B23.1, встраивали в линейаризованный вектор pET23a под контроль T7 промотора. Для наработки рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1 человека (NPM1-His<sub>6</sub>) использовали штамм *E. coli* BL21 (DE3).

Очистку NPM1-His<sub>6</sub> из лизата клеток *E. coli* проводили ступенчатой металл-хелатной хроматографией на Ni-NTA сепарозе. NPM1-His<sub>6</sub> элюировали с сорбента, повышая концентрацию имидалола в буфере до 250 мМ (Рис. 9 А, фракция III).

Структура полученного рекомбинантного аналога NPM1-His<sub>6</sub> была подтверждена методом MALDI-TOF масс-спектрометрии продуктов его трипсинолиза.



**Рис. 9.** А. Выделение рекомбинантного аналога NPM1-His<sub>6</sub> из лизата клеток-производителей *E. coli* аффинной хроматографией на Ni-NTA-сефарозе. Фракции белков: I – не взаимодействующих с сорбентом; II/III – элюируемых буфером, содержащим 50/250 мМ имидазола. Б. Анализ белковых препаратов рекомбинантного аналога NPM1-His<sub>6</sub> денатурирующим электрофорезом в 13% ПААГ. Дорожки: 1 – маркеры молекулярной массы белков; 2 – белки лизата клеток *E. coli* BL21 (DE3), трансформированных вектором pET23a\_NPM1; 3 – препарат рекомбинантного NPM1-His<sub>6</sub>. Положение в геле рекомбинантного NPM1 показано стрелкой. В. Анализ белкового препарата NPM1-His<sub>6</sub> денатурирующим электрофорезом в 13% ПААГ в отсутствие 2-меркаптоэтанола. Дорожки: 1 – маркеры молекулярной массы белков; 2 – препарат рекомбинантного NPM1-His<sub>6</sub>, положение в геле мономера и мультимера NPM1-His<sub>6</sub> показаны стрелками. Белки окрашены кумасси G-250.

Известно, что нуклеофозмин 1 присутствует в клетках человека в форме мономера и в форме декамера (Lindström et al., 2010). Показано, что полученный рекомбинантный аналог NPM1-His<sub>6</sub> в невозстанавливающих условиях (в отсутствие β-меркаптоэтанола) представлен мономерной и мультимерной формами (Рис. 9 В), что указывает на наличие у NPM1-His<sub>6</sub> структурно-функциональных характеристик, сходных с нуклеофозмином 1 (B23.1) человека.

### 1.6.2 Оценка эффективности взаимодействия NPM1-His<sub>6</sub> с синтетическими РНК

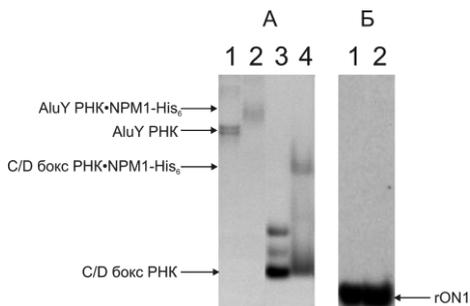
Для оценки РНК-связывающей способности рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1 в качестве модельных РНК были использованы синтетические аналоги Alu Y РНК и U24 C/D бокс РНК.

Известно, что Alu РНК формирует двуединую структуру, в которой "левый" и "правый" Alu-мономеры представлены набором компактных частично-комплементарных участков (Sinnott et al., 1991), в то время как C/D бокс РНК содержат лишь небольшие (5-6 н.) области комплементарности на 5'- и 3'-концах.

NPM1-His<sub>6</sub> инкубировали с синтетическими аналогами AluY РНК и U24 C/D бокс РНК, а также с одноцепочечным олигорибонуклеотидом gON1. Продукты комплексообразования анализировали методом гель-ретардации в нативном 5% ПААГ.

Было установлено, что полная задержка AluY РНК (60 нМ) в геле происходила в присутствии 0,1 мМ Mg<sup>2+</sup>, при 20-кратном избытке нуклеофозмина по отношению к РНК (Рис. 10 А, дорожка 2). В тех же условиях лишь ~ 30 % аналога U24 мяорНК (70 нМ) находилось в комплексе с NPM1-His<sub>6</sub> (Рис. 10 А, дорожка 4). Связывания gON1 аналогом нуклеофозмина 1 методом гель-ретардации зарегистрировано не было (Рис. 10 Б, дорожка 2).

Полученные данные указывают на то, что способность рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1 взаимодействовать с РНК убывает в ряду: протяженные структурированные РНК (n > 300 н., для аналогов AluY РНК) > одноцепочечные РНК (n ~ 80 н.) > короткие олигорибонуклеотиды (n ~ 22 н. для gON1).

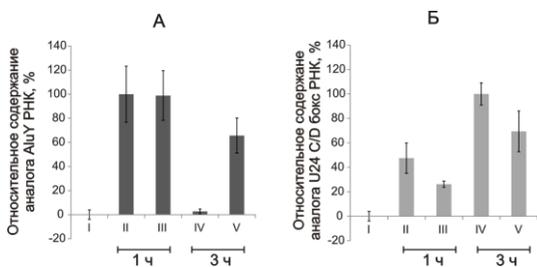


**Рис. 10.** Анализ взаимодействия NPM1-His<sub>6</sub> с РНК методом гель-ретардации. 5'-[<sup>32</sup>P]-меченые: А – AluY РНК (60 нМ) (1,2); аналог C/D бокс РНК (70 нМ) (3,4); Б - rON1 (1,3 мкМ) (1,2) преинкубировали 10 мин при 37 °С в реакционной смеси, содержащей 12 мкМ NPM1-His<sub>6</sub> (дорожки с четными номерами), или без белка (дорожки с нечетными номерами). Реакционные смеси разделяли электрофорезом в нативном 5% ПААГ. На рисунке представлен радиоавтограф геля.

### 1.6.3 Оценка влияния NPM1-His<sub>6</sub> на эффективность трансфекции синтетических РНК в клетки MCF-7 человека

Для того, чтобы оценить действие препаратов рекомбинантного нуклеофозмина 1 на клетки человека был проведен анализ влияния препаратов NPM1-His<sub>6</sub> на жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7. В серии независимых экспериментов было установлено, что после 24 часов инкубации в среде, содержащей NPM1-His<sub>6</sub> (0,1–25 мкг/мл), не происходило снижения жизнеспособности клеток MCF-7 ( $p > 0,5$ ). Кроме того, при анализе световой и люминисцентной микроскопией не было выявлено существенных морфологических изменений клеток MCF-7 при инкубации с NPM1-His<sub>6</sub>.

Для оценки влияния NPM1-His<sub>6</sub> на эффективность трансфекции синтетических РНК в клетки человека клетки MCF-7 инкубировали в среде с синтетическими аналогами AluY РНК и U24 C/D бокс РНК, а также их комплексами с NPM1-His<sub>6</sub>. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени было установлено, что содержание синтетической AluY РНК в препарате суммарной РНК клеток MCF-7, преинкубированных с комплексами AluY РНК•NPM1-His<sub>6</sub> в течение 3 часов в 25 раз выше по сравнению с клетками, преинкубированными со свободной РНК ( $p_{St} < 0,01$ ) (Рис. 11 А, IV и V). При этом преинкубация C/D бокс РНК с рекомбинантным аналогом NPM1-His<sub>6</sub> приводила к частичному снижению эффективности трансфекции клеток MCF-7 этой РНК (Рис. 11 Б).



**Рис. 11.** Влияние NPM1-His<sub>6</sub> на эффективность накопления аналогов AluY-РНК (А) и C/D бокс РНК (Б) в клетках MCF-7. Клетки инкубировали в среде, содержащей: 3,5 нМ AluY РНК (А, II - V) и 20,8 нМ C/D бокс РНК (Б, II - V); (А, Б) РНК в комплексе с NPM1-His<sub>6</sub> (III, V) или без белка (II, IV). Контрольные клетки MCF-7 инкубировали в среде без РНК (I) (А, Б). Суммарную РНК клеток анализировали

ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к синтетическим аналогам, в качестве нормировочной РНК использовали мРНК HPRT. За 100% принято максимальное значение относительного содержания аналогов AluY-РНК или C/D бокс РНК в клетках.

В совокупности наши данные позволяют заключить, что нуклеофозмин 1, не образуя прочных комплексов с короткими однопочечными РНК ( $n \leq 80$  н.), не оказывает существенного влияния на эффективность интернализации таких РНК клетками человека. Взаимодействие нуклеофозмина 1 с протяженными ( $> 300$  н.) РНК с развитой вторичной структурой существенно повышает эффективность трансфекции таких РНК в клетки человека.

## ВЫВОДЫ

1. Из крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) получены препараты форменных элементов, плазмы крови, частиц плазмы, осаждаемых при усилиях 16 000 g и 160 000 g, а также плазмы, обедненной частицами (супернатант 160 000 g). Установлено, что осадки плазмы, полученные при 16 000 g и 160 000 g, содержат частицы, несущие маркеры CD41a, CD3 и CD63, и обогащены везикулами крови диаметром 40-100 нм.

2. Установлено, что РНК исследуемых фракций крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ содержат фрагменты клеточных РНК: мтРНК, рРНК, тРНК, мРНК, микроРНК, мяРНК, мяоРНК, мцРНК и днРНК. Установлено, что фракции крови существенно различаются содержанием фрагментов малых ядрышковых РНК и малых ядерных РНК, а именно:

- вклад фрагментов малых ядерных РНК U1, U5A/B и U6 в общий набор РНК частиц плазмы крови, осаждаемых при 160 000 g, в 6-15 раз выше по сравнению с цельной плазмой и осадком частиц плазмы (16 000 g);

- частицы плазмы, осаждаемые при 16 000 g и 160 000 g, обеднены фрагментами малых ядрышковых РНК.

3. Сравнение наборов РНК фракций плазмы крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого и здоровых доноров выявило отличия в представленности микроРНК, фрагментов мРНК и малых ядрышковых РНК:

- образцы плазмы и частиц плазмы, осаждаемых при 16 000 g, из крови пациентов с плоскоклеточным раком легкого содержат повышенное количество микроРНК и мРНК;

- наборы РНК плазмы крови и супернатанта плазмы крови (160 000 g) пациентов с аденокарциномой легкого обеднены фрагментами малых ядрышковых РНК.

4. В массивах данных высокопроизводительного секвенирования РНК исследуемых фракций крови идентифицировано 88 кольцевых транскриптов, 8 из которых являются новыми, не аннотированными ранее, формами кольцевых РНК человека. Установлено, что полноразмерные кольцевые РНК присутствуют не только в форменных элементах, но и во фракциях плазмы крови, обогащенных мембранными частицами.

5. Показано, что стабильность комплекса рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1 (NPM1-His<sub>6</sub>) с РНК убывает в ряду: протяженные структурированные РНК ( $n > 300$  н., для аналогов AluY РНК) > однопочечные РНК ( $n \sim 80$  н.) > короткие олигорибонуклеотиды ( $n \sim 22$  н. для rON1). Установлено, что преинкубация синтетической AluY РНК с NPM1-His<sub>6</sub> повышает эффективность проникновения AluY РНК в клетки человека MCF-7 ~ в 25 раз ( $p_{St} < 0,01$ ).

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ В РАБОТАХ

1. Савельева, А. В., Семенов, Д. В., Кулигина, Е. В., Рабинов, И. В., Степанов, Г. А., Коваль, О. А., Рихтер, В. А. Влияние рекомбинантного аналога белка человека нуклеофозмин 1 на проникновение синтетических РНК в клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 // Биоорганическая химия. -2014. -Т. 40. - С. 55-63.
2. Savelyeva, A. V., Baryakin, D. N., Chikova, E. D., Kuligina, E. V., Richter, V. A., Semenov, D. V. Vesicular and Extra-Vesicular RNAs of Human Blood Plasma // Advances in Experimental Medicine and Biology -2016. -V. 924. -P. 117-119.
3. Савельева, А. В., Барякин, Д. Н., Морозов, В. В., Кулигина, Е. В., Рихтер, В. А., Семенов, Д. В. Кольцевые РНК форменных элементов, плазмы и субфракций плазмы крови человека // Биоорганическая химия. -2017. -Т. 43. -С. 133-145.
4. Savelyeva, A. V., Kuligina, E. V., Bariakin, D. N., Kozlov, V. V., Ryabchikova E. I., Richter, V. A., Semenov, D. V. Variety of RNAs in Peripheral Blood Cells, Plasma, and Plasma Fractions // BioMedResearch International. -2017. -V. 2017. -doi: 10.1155/2017/7404912.