

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

*На правах рукописи*

**Журавлев Евгений Сергеевич**

**ПУТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК  
И ИХ АНАЛОГОВ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
к.х.н. Степанов Григорий Александрович

Новосибирск – 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b> .....	<b>2</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	<b>5</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>7</b>
<b>ГЛАВА 1. НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b> .....	<b>12</b>
1.1 Малые ядрышковые РНК: структура, организация генов, биогенез .....	12
1.2. Неканонические функции мяоРНК .....	14
1.3. Неканонические мономеры в структуре некодирующих РНК.....	15
1.4. Заключение.....	19
<b>ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	<b>20</b>
2.1 Материалы и реактивы .....	20
2.2 Ферменты.....	20
2.3 Олигодезоксирибонуклеотиды .....	21
2.3.1 Олигодезоксирибонуклеотиды, используемые для ОТ и ПЦР фрагментов рРНК клеток человека .....	21
2.3.2 Олигодезоксирибонуклеотиды, используемые для ПЦР участков рРНК клеток человека .....	21
2.3.3 Олигодезоксирибонуклеотиды, используемые для ген-специфичного ОТ-ПЦР суммарной РНК клеток человека .....	21
2.3.4 Олигодезоксирибонуклеотиды, используемые для синтеза ДНК-матриц аналогов мяоРНК и мяРНК.....	22
2.4 Олигорибонуклеотиды .....	22
2.5 Буферные смеси .....	23
2.6 Методы .....	23
2.6.1 Конструирование и синтез аналогов мяоРНК .....	23
2.6.2 Получение FITC-меченных РНК .....	25
2.6.3 Культуры клеток и вирус.....	25
2.6.4 Трансфекция клеток MCF-7, MDA-MB-231 и SK-OV-3 аналогами мяоРНК.....	26
2.6.5 Выделение суммарной РНК клеток человека.....	26
2.6.6 Выделение РНК из цитоплазматической и ядерной фракций клеток .....	26
2.6.7 Оценка глубины метилирования сайтов 2'-О-метилирования нуклеотидов в составе рРНК клеток человека методом ОТ-ПЦР .....	27
2.6.8 Определение содержания неканонических мономеров в составе синтетических и природных РНК.....	27
2.6.9 Анализ накопления флуоресцентно меченой РНК в клетках человека.....	28
2.6.10 Анализ стабильности радиоактивно меченых аналогов мяоРНК и мяРНК в клетках человека.....	29

2.6.11 Анализ изменения уровня экспрессии генов в клетках человека, трансфицированных аналогами мяоРНК и мяРНК .....	29
2.6.12 Определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста.....	29
2.6.13 Подготовка препаратов суммарной РНК клеток человека для дифференциального анализа экспрессии генов массовым параллельным секвенированием.....	29
2.6.14 Биоинформационный и функциональный анализ данных, полученных в результате секвенирования.....	30
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>32</b>
<b>РАЗДЕЛ 3.1 Исследование влияния неканонических нуклеотидов на функционирование аналогов малых ядрышковых РНК в клетках человека .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.1 Синтез набора аналогов малых ядрышковых РНК со статистическим включением в структуру неканонических мономеров .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.2 Влияние неканонических нуклеотидов на накопление и локализацию аналогов мяоРНК в клетках человека .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1.3 Влияние неканонических нуклеотидов на цитотоксическое и антипролиферативное действие аналогов мяоРНК в клетках человека .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1.4 Функциональный анализ изменений экспрессии генов в клетках человека, трансфицированных модифицированными аналогами мяоРНК.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1.5 Влияние неканонических нуклеотидов на взаимодействие аналогов мяоРНК с РНК-рецепторами в клетках человека .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1.6 Функциональный анализ данных секвенирования поли(А)-фракции клеток человека SK-OV-3, трансфицированных аналогами U74 и U35a мяоРНК .....</b>	<b>45</b>
<b>РАЗДЕЛ 3.2. Анализ паттерна экспрессии мяоРНК в клетках человека A549 в условиях инфекции вирусом гриппа А .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.1 Выбор модельного штамма вируса гриппа и модельной клеточной линии.....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.2 Анализ дифференциальной экспрессии мяоРНК в условиях инфекции вирусом гриппа А.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.3 Исследование форм C/D-боксов РНК в условиях инфекции вирусом гриппа А .....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.4 Анализ экспрессии генов, участвующих в биогенезе C/D-боксов РНК в условиях инфекции вирусом гриппа А .....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.5 Оценка уровня 2'-О-метилирования нуклеотидов рРНК в условиях инфекции вирусом гриппа А .....</b>	<b>66</b>
<b>3.2.6 Анализ инфекции вирусом гриппа А клеток A549 с подавленным уровнем SNORD93 .....</b>	<b>68</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>71</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>73</b>

<i>СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ .....</i>	<i>74</i>
<i>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</i>	<i>75</i>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AGO –	семейство белков Argonaute
AMV –	вирус миелобластога птиц
CI –	клеточный индекс (cell Index)
dNTP –	дезоксинуклеозид-5'-трифосфат
FITC –	изотиоцианат флуоресцеина (fluorescein isothiocyanate)
Hoechst –	4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид
IMDM –	культуральная среда Дульбеко в модификации Искова
m5C –	5-метилцитидин
m6A –	N6-метиладенозин
M-MLV –	вирус лейкемии мышей Молони
MTT –	бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия
NaAc –	ацетат натрия
NGS –	секвенирование нового поколения (next generation sequencing)
Nm –	2'-O-метилованный нуклеотид
NTP –	нуклеозид-5'-трифосфат
SAM –	S-аденозилметионин
scaРНК –	малые РНК телец Кахалья (small Cajal РНК)
SDS –	додецилсульфат натрия
sdРНК –	РНК, полученные из мяоРНК (snoRNA-derived RNA)
siРНК –	малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота
TEMED –	N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
TER –	теломеразная РНК
Ψ –	псевдоуридин
ВЭЖХ –	высокоэффективная жидкостная хроматография
ДНК –	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы –	дезоксирибонуклеаза
ДТТ –	дитиотреит
дцРНК –	двухцепочечная рибонуклеиновая кислота
е.а. –	единица активности
кДНК –	комплементарная ДНК
мРНК –	матричные РНК
МС/МС –	тандемная масс-спектрометрия
мяоРНК –	малые ядрышковые РНК
мяРНК –	малые ядерные РНК

н. –	нуклеотид
НК –	нуклеиновая кислота
нкРНК –	некодирующие РНК
ОТ-ПЦР –	обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией
оцРНК –	одноцепочечная рибонуклеиновая кислота
п.н. –	пара нуклеотидов
ПААГ –	полиакриламидный гель
пре-мРНК –	предшественник матричной рибонуклеиновой кислоты
пре-рРНК –	предшественник рибосомных рибонуклеиновых кислот
РНК –	рибонуклеиновая кислота
РНКаза –	рибонуклеаза
РНП –	рибонуклеопротеид
рРНК –	рибосомные РНК
ТВ –	точка ветвления
Трис –	трис(гидроксиметил)аминометан
тРНК –	транспортные РНК
ТСХ –	тонкослойная хроматография
УФ –	ультрафиолет
ЦПД –	цитопатическое действие
ЭДТА –	этилендиаминтетрауксусная кислота

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Шесть десятилетий назад, в период становления молекулярной биологии как самостоятельной науки, британским ученым Фрэнсисом Криком была сформулирована центральная догма молекулярной биологии, согласно которой рибонуклеиновые кислоты (РНК): матричные РНК (мРНК), рибосомные РНК (рРНК) и транспортные РНК (тРНК) – выступали исключительно посредниками на этапе передачи информации от дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) к белкам [1,2]. Открытие в начале 1980-х гг. первых РНК, обладающих каталитической активностью, способствовало привлечению существенного внимания мирового научного сообщества к миру некодирующих РНК (нкРНК) [3,4]. Вскоре были подробно описаны высокопредставленные в клетке малые ядрышковые РНК (мяоРНК) [5–7]. Открытие класса микроРНК в начале 2000-х гг. выступило ещё одним аттрактантом мира некодирующих РНК, подчеркнув значимость нкРНК в регуляции процессов реализации генетической информации на пост-транскрипционном уровне [8–10].

К настоящему времени мир РНК разросся до огромного количества как коротких, так и длинных некодирующих РНК, объединенных в многочисленные классы и обладающих широким функциональным разнообразием [11]. Вследствие этого, всё более отчетливой становится точка зрения, согласно которой функцию нкРНК некорректно рассматривать изолированно, её необходимо анализировать в рамках биологических сетей взаимодействия между РНК [12,13]. В условиях таких переплетений наравне с открытием новых классов нкРНК, появляются данные, свидетельствующие о неканоническом функционировании ранее описанных нкРНК.

Малые ядрышковые РНК (мяоРНК) являются одной из наиболее многочисленных и широко представленных групп некодирующих РНК (нкРНК) в клетках человека. В рамках своей канонической функции, мяоРНК в составе рибонуклеопротеидных комплексов регулируют созревание предшественников рибосомных РНК, осуществляя две наиболее распространенные модификации нуклеотидов: представители семейства C/D-бокс-мяоРНК направляют 2'-О-метиляцию, а представители семейства H/ACA-бокс-мяоРНК – псевдоуридилирование [14–17].

Благодаря развитию высокопроизводительных методов исследования, были открыты как новые представители данного семейства, так и большое число различных путей функционирования мяоРНК. В настоящее время известно, что мишенями мяоРНК для широкого диапазона модификаций выступают представители различных классов РНК; при этом мяоРНК

взаимодействуют с различными белковыми партнерами, конкурируют с другими РНК-связывающими регуляторными агентами и привлекают к мишеням ряд специфических факторов. В список неканонических функций мяоРНК входят процессинг РНК, модуляция альтернативного сплайсинга, контроль эффективности трансляции, подавление экспрессии генов по микроРНК-подобному механизму, а также рекрутинг белков, участвующих в модификации хроматина [18,19]. Интересно, что для ряда мяоРНК характерно изменение клеточной локализации под воздействием экзогенных стрессовых стимулов, а также тканеспецифичное распределение [20,21]. Более того, недавно было показано, что для патогенеза некоторых наследственных, онкологических и вирусных заболеваний свойственны изменения в экспрессии и локализации отдельных представителей группы мяоРНК [22,23].

Таким образом, изучение молекулярных механизмов функционирования малых ядрышковых РНК остается существенной фундаментальной задачей, поскольку может привести к открытию новых путей развития патологических процессов и разработке механизмов направленной регуляции экспрессии генов.

## **Цели и задачи**

**Целью** данной работы являлся поиск новых путей функционирования малых ядрышковых РНК и их аналогов в клетках человека.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

### ***раздел 1:***

1. на основе структуры природных малых ядрышковых РНК человека сконструировать и синтезировать аналоги, содержащие неканонические нуклеотиды: псевдоуридин (Ψ), 5-метилцитидин ( $m^5C$ ), N<sup>6</sup>-метиладенозин ( $m^6A$ ), а также триметилгуанозин ( $m_3^{2,2,7}G$ ) в структуре кэпа;
2. проанализировать влияния модифицированных нуклеотидов на локализацию и накопление аналогов мяоРНК в клетках человека;
3. оценить влияние модифицированных нуклеотидов на цитотоксическую активность аналогов мяоРНК;
4. изучить изменения в экспрессии генов в клетках человека после трансфекции модифицированными аналогами мяоРНК;



## *раздел 2:*

5. охарактеризовать изменения в уровне отдельных форм мяоРНК в клетках человека в условиях инфекции вирусом гриппа А;
6. оценить экспрессии генов, участвующих в биогенезе C/D-боксов РНК в условиях инфекции вирусом гриппа А;
7. изучить изменение уровня 2'-О-метилирования нуклеотидов рРНК в условиях инфекции вирусом гриппа А;
8. провести анализ инфекции вирусом гриппа А клеток А549 с подавленным уровнем мяоРНК SNORD93.

### **Научная новизна и практическая значимость.**

В данном исследовании было впервые установлено, что модифицированные нуклеотиды в структуре аналогов C/D-боксов мяоРНК снижают уровень активации системы врожденного иммунного ответа, а также цитотоксическое и антипролиферативное действие аналогов на клетки человека. Была выявлена ключевая значимость внутриклеточного рецептора PKR в механизмах узнавания и передачи сигналов аналогов мяоРНК. Полученные результаты закладывают базис для разработки искусственных регуляторов экспрессии генов в клетках человека на основе структурных особенностей C/D-боксов мяоРНК.

В рамках изучения биогенеза и функционирования класса мяоРНК в условиях заражения клеток человека вирусом гриппа А, впервые были выявлены изменения в уровне отдельных форм мяоРНК. Описанные эффекты вносят вклад в понимание роли малых ядрышковых РНК в контроле инфекции вирусом гриппа А и в дальнейшем могут быть использованы для разработки специфичных средств регуляции репликации вируса.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

- Наличие в структуре аналогов мяоРНК модифицированных нуклеотидов N<sup>6</sup>-метиладенозина (m<sup>6</sup>A), псевдоуридина (Ψ) и 5-метилцитидина (m<sup>5</sup>C), а также триметилгуанозина (m<sup>7</sup>G и m<sup>3,2,7</sup>G) в структуре кэпа, не оказывает существенного влияния на их стабильность и локализацию при трансфекции в клетки человека с липидными трансфицирующими агентами.
- Включение модифицированных нуклеотидов в структуру аналогов мяоРНК снижает цитотоксическое и антипролиферативное воздействие аналогов мяоРНК на клетки человека, а также уровень активации системы врожденного иммунного ответа.

- Ключевым внутриклеточным рецептором мяоРНК, обеспечивающим значительный уровень активации сигнальных путей, является PKR.
- U74 мяоРНК участвует в формировании стрессового состояния клеток за счет нарушений в процессах созревания пре-мРНК и рРНК.
- В условиях развития в клетках человека инфекции вирусом гриппа А наблюдается специфичная регуляция уровня и форм-процессинга отдельных мяоРНК, дисбаланс уровня основных генов биогенеза мяоРНК, а также снижение уровня 2'-О-метилирования нуклеотидов-мишеней рРНК.
- Подавление уровня мяоРНК SNORD93 в клеточной линии A549 приводит к снижению относительного уровня вирусной РНК в клетках через 24 ч и 48 ч инкубации после заражения.

### **Апробация работы и публикации**

По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ. Результаты работы представлены на 12 международных конференциях: "Химическая биология-2016" (Новосибирск, 2016), научной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов "Open Bio 2017" (Новосибирск, 2017), II-й всероссийской конференции "Высокопроизводительное секвенирование в геномике" (Новосибирск, 2017), "МНСК-2017" (Новосибирск, 2017), IX-м международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Новосибирск, 2017), научной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов "Open Bio 2018" (Новосибирск, 2018), симпозиуме "EMBO | EMBL Symposium: The Complex Life of RNA" (Хайдельберг, 2018), VI-м съезде биохимиков России (Сочи, 2018), научной конференции с элементами школы молодых ученых "Biotop 2020: актуальные вопросы современной биологии" (Новосибирск, 2020), III-й всероссийской конференции "Высокопроизводительное секвенирование в геномике" (Новосибирск, 2022), всероссийской конференции "Синтетическая биология и биофармацевтика" (Новосибирск, 2022), VII-м съезде биохимиков России (Сочи, 2022).

### **Личный вклад автора**

Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов. Планирование, анализ и обсуждение результатов работы проведено под руководством к.х.н. Г.А. Степанова. Термодинамический анализ проведён к.ф.-м.н. А.А. Ломзовым (Лаборатория биомедицинской химии, ИХБФМ СО РАН). Конфокальная микроскопия подготовленных образцов проведена

к.б.н. А.Л. Матвеевым (Лаборатория молекулярной микробиологии, ИХБФМ СО РАН). Конструирование библиотек для высокопроизводительного секвенирования проводилось совместно с сотрудниками Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета к.б.н. Р. Шах Махмуд и к.б.н. С.Ю. Маланиным. Подготовка препаратов клеток человека, инфицированных вирусом гриппа А, проводилась на базе ФГБУ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева к.б.н. М.В. Сергеевой.

### **Объём и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Текст изложен на 82 странице, иллюстрирован 35 рисунками, включает 6 таблиц, список литературы содержит 111 библиографических источника.

# ГЛАВА 1. НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

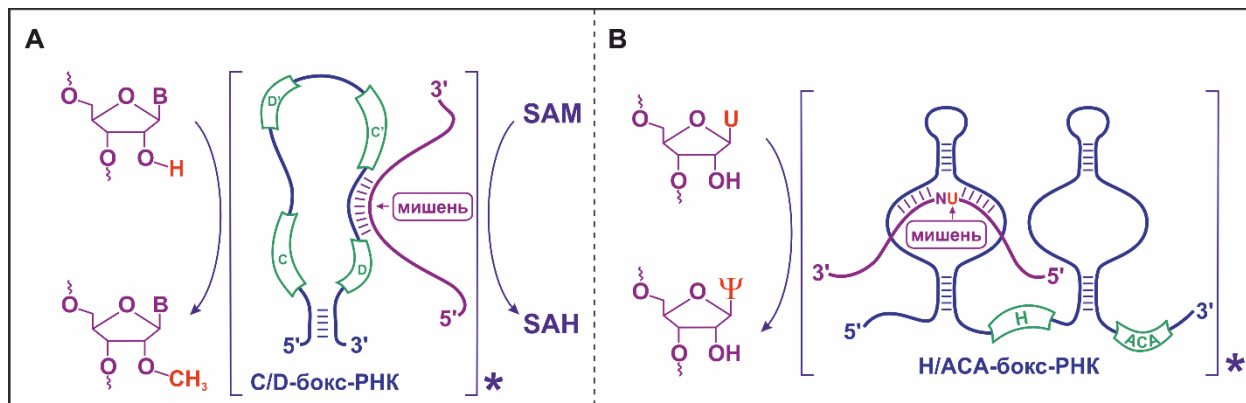
## 1.1 Малые ядрышковые РНК: структура, организация генов, биогенез

Малые ядрышковые РНК составляют многочисленную группу коротких некодирующих РНК, участвующих в пост-транскрипционном созревании предшественников рРНК [24]. В классе мяоРНК по наличию консервативных элементов нуклеотидной последовательности выделяют два семейства – С/D-бокс-РНК и Н/АСА-бокс-РНК. Основная часть представителей семейства С/D-бокс-РНК направляют 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК [25,26], а большинство РНК Н/АСА-бокс-семейства участвуют в реакции псевдоуридилирования – превращения уридина в псевдоуридин в структуре рРНК [27]. Некоторые малые ядрышковые РНК: U3, U8, U13, U22 участвуют в качестве РНК-шаперонов в процессе вырезания зрелых форм 5,8S; 18S; 28S рРНК из структуры пре-рРНК транскрипта [28,29].

Представители семейства С/D-бокс-РНК – одноцепочечные РНК (оцРНК), имеющие длину 60-120 н. В своей структуре они содержат консервативные элементы: «С-бокс» (UGAUGA) и «D-бокс» (CUGA), расположенные вблизи 5'- и 3'-концевых участков, соответственно (**Рисунок 1, А**). Для концевых участков С/D-бокс-РНК характерны комплементарные взаимодействия, результатом которых является формирование элемента вторичной структуры, названного «С/D-мотивом» и включающего в себя С-бокс, D-бокс и концевой дуплекс [30]. Также в структуре имеется расположенная с 5'-конца от D-бокса «область узнавания» - последовательность 10-21 н., частично комплементарная участку РНК-мишени. Пятый нуклеотид РНК-мишени от D-бокса подвергается модификации. Некоторые С/D-бокс-РНК имеют дополнительную пару функциональных элементов – «С'-бокс» и «D'-бокс», расположенных вблизи центра молекулы РНК. С 5'-стороны от D'-бокса также может находиться область узнавания, направляющая 2'-О-метилирование нуклеотидов комплементарной РНК-мишени [31].

Представители семейства Н/АСА-бокс-РНК – оцРНК, имеющие длину порядка 150 н. Их структура характеризуется наличием консервативных элементов, названных «Н-бокс» (ANANNA; {N – любой нуклеотид}) и «АСА-бокс» (ACA), которые необходимы для правильной сборки функционирующего РНП. Вторичная структура Н/АСА-бокс-РНК представляет собой две шпильки, соединенные петлей, и 3'-концевой одноцепочечный участок (**Рисунок 1, В**). Н-бокс и АСА-бокс – находятся в основании шпильки с 5'- и 3'-конца соответственно. Область узнавания (9-13 н.) каждой Н/АСА-мяоРНК состоит из двух отдельных частей, находящихся во внутренней области шпилек. Расстояние от Н- или АСА-бокса до модифицируемого нуклеотида

должно составлять 14–16 н. При взаимодействии с РНК-мишенью внутри шпильки формируются два участка, комплементарно связанных с Н/АСА-боксом-РНК и экспонирующихся в одноцепочечном «окне» пары нуклеотидов, один из которых подвергается псевдоуридилрованию [32].



**Рисунок 1.** Структура и функционирование C/D-боксов-РНК и Н/АСА-боксов-РНК, направляющих 2'-О-метилирование (А) и псевдоуридилрование рРНК (В) [33].

Малые ядрышковые РНК, как и многие другие нкРНК, функционируют вместе с белками, образуя рибонуклеопротеидные комплексы. В клетках эукариот каждый комплекс составляют одна молекула мяоРНК и специфичный набор РНК-связывающих белков, в число которых входит фермент, непосредственно катализирующий реакцию модификации. В клетках млекопитающих в каталитический комплекс, формирующийся на базе определенной C/D-боксов-РНК и осуществляющий 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК, входят фибрилларин (S-аденозилметионин-(SAM)-зависимая метилтрансфераза), белки NOP56p, NOP58p и 15.5 kDa [34]. Н/АСА-боксов-РНК, направляющие псевдоуридилрование рРНК в клетках эукариот, входят в структуру РНП со следующими белками: дискерин (псевдоуридинсинтаза CBF5p), GAR1p, NOP10p и NHP2p [30]. Белки фибрилларин и дискерин катализируют описанные реакции модификации.

Гены мяоРНК млекопитающих расположены в интронах кодирующих и некодирующих РНК. Более того, большинство генов мяоРНК находятся в интронах генов домашнего хозяйства. При такой локализации формирование зрелых форм малых ядрышковых РНК происходит в результате разрушения и процессинга нуклеазами структуры "лассо" вырезанного интрона. Небольшая часть мяоРНК клеток высших эукариот кодируется отдельными транскрипционными единицами, которые независимо синтезируются РНК-полимеразой II [35].

## 1.2. Неканонические функции мяоРНК

К настоящему времени, помимо описанных выше канонических функций мяоРНК, выявлены и новые, ранее неизвестные процессы, в которых задействованы представители данного класса РНК [20,21]. При рассмотрении вопроса о спектре возможных мишеней C/D-бокс-РНК и H/ACA-бокс РНК стоит отметить, что, родственные ядрышковым РНК, короткие нкРНК из телец Кахаля, названные scaРНК (от англ. “small Cajal body-specific RNAs”), участвуют в модификации нуклеотидов мяРНК, что необходимо для правильной сборки сплайсосом и прохождения сплайсинга пре-мРНК [36].

В 2006 году при изучении синдрома Прадера-Вилли, связанного с отсутствием отцовской копии участка хромосомы 15q11-13, содержащего ген мяоРНК SNORD115, было впервые выявлено участие представителей малых ядрышковых РНК в альтернативном сплайсинге. Оказалось, что мяоРНК SNORD115 за счет антисенс-элемента, комплементарного 18-нуклеотидной последовательности экзона Vb серотонинового рецептора 5-HT<sub>2c</sub>R, препятствует действию сайленсера данного экзона. Блокировка сайленсера приводит к включению экзона Vb в зрелую мРНК и последующему образованию высокочувствительного, нормально функционирующего серотонинового рецептора [37]. В дальнейшем, биоинформационный поиск мишеней и экспериментальная проверка выявили ещё пять мРНК, в которых включение/выключение экзона регулируется мяоРНК SNORD115 [38]. Помимо описанного природного механизма были предложены схемы направленной регуляции альтернативного сплайсинга с помощью искусственных мяоРНК, одна из которых предполагает 2'-О-метилирование аденозина точки ветвления, что приводит к исключению из зрелой мРНК экзона, фланкирующего интрон с 3'-конца [39].

В 2008 году по результатам биоинформационного анализа данных крупномасштабного секвенирования малых РНК (19-40 н.) было установлено, что мяоРНК, как и другие некодирующие РНК клетки, являются предшественниками более коротких форм РНК [40]. Позже на базе нескольких библиотек коротких РНК было подтверждено, что более половины мяоРНК образуют короткие фрагменты, получившие название sdРНК (от англ. “snoderived RNAs”) [41]. Более того, большая часть sdРНК, образовавшихся из одной мяоРНК, имеет одинаковые нуклеотидные последовательности, что указывает на наличие специфического процессинга, так как продуктам случайной деградации был бы свойственен разброс по последовательности мяоРНК, выступающей в качестве предшественника sdРНК [42]. Было установлено, что sdРНК, образовавшиеся из разных семейств мяоРНК, имеют специфические признаки. Так, из C/D-бокс-мяоРНК образуются C/D-sdРНК длиной ≈17-19 н. (с включением срединной части молекулы) и ≈30 н. (5'-концевой части молекулы), в то время как H/ACA-sdРНК являются производными длиной ≈20-24 н. (с включением 3'-концевой шпильки мяоРНК) [40]. На

искусственных конструкциях было показано, что и C/D-, и H/ACA-sdРНК способны подавлять экспрессию генов за счет взаимодействия с белками семейства AGO (от англ. “Argonaute”), основными компонентами комплекса RISC (RNA-induced silencing complex) [43]. Позже, совокупностью методов биоинформационного прогнозирования и экспериментального подтверждения были обнаружены природные мишени sdРНК [44].

В 2011 году при исследовании окислительного стресса, было описано участие мяоРНК в процессах клеточного ответа на стресс. Повышенная экспрессия трех мяоРНК (SNORD32a, SNORD33, SNORD35a), закодированных в интронах гена рибосомного белка RPL13A, наблюдалась в клетках при стрессе, индуцированном избытком жирных кислот в питательной среде. Направленное подавление этих мяоРНК вызывала устойчивость клеток к метаболическому стрессу, что указывает на их ключевую роль в индукции клеточной гибели [45]. Интересно, что при повышенной экспрессии данных мяоРНК происходило накопление их полноразмерных форм в цитоплазме, но при этом уровень метилирования соответствующих сайтов рРНК не увеличивался [46]. Полученные результаты позволили предположить, что механизм участия мяоРНК в ответе клеток на стресс не связан с модификацией рРНК, а опосредован осуществляемой мяоРНК регуляцией трансляции дополнительных цитоплазматических мРНК-мишеней.

### ***1.3. Неканонические мономеры в структуре некодирующих РНК***

Вопрос о роли пост-транскрипционных модификаций в структуре зрелых форм многих классов нкРНК не теряет актуальности по сегодняшний день. Известно, что нкРНК помимо канонических нуклеотидов (С, U, G, А) содержат их производные – нуклеотиды, модифицированные по остаткам рибозы или основанию, получившие общее обозначение «минорные» или «неканонические» нуклеотиды. Количество работ, выявляющих новые сайты природных модификаций, роль которых в структуре регуляторных РНК пока неизвестна, непрерывно растет [47,48].

Предполагают, что модификации нуклеотидов в совокупности стабилизируют «правильную» вторичную структуру молекулы РНК, повышают её устойчивость к гидролизу нуклеазами, а также контролируют прочность межмолекулярных взаимодействий с другими РНК и белками в сложных биологических комплексах [49–51]. Более того, преобразование химической структуры отдельных нуклеотидов способно кардинально влиять на функциональные свойства нкРНК, в частности, менять их сродство к РНК-мишеням [52].

К распространенным и хорошо изученным модификациям РНК можно отнести псевдоуридины и 2'-О-метилированные нуклеотиды рРНК. Модифицированные нуклеотиды преимущественно расположены в наиболее консервативных участках рРНК эукариот,

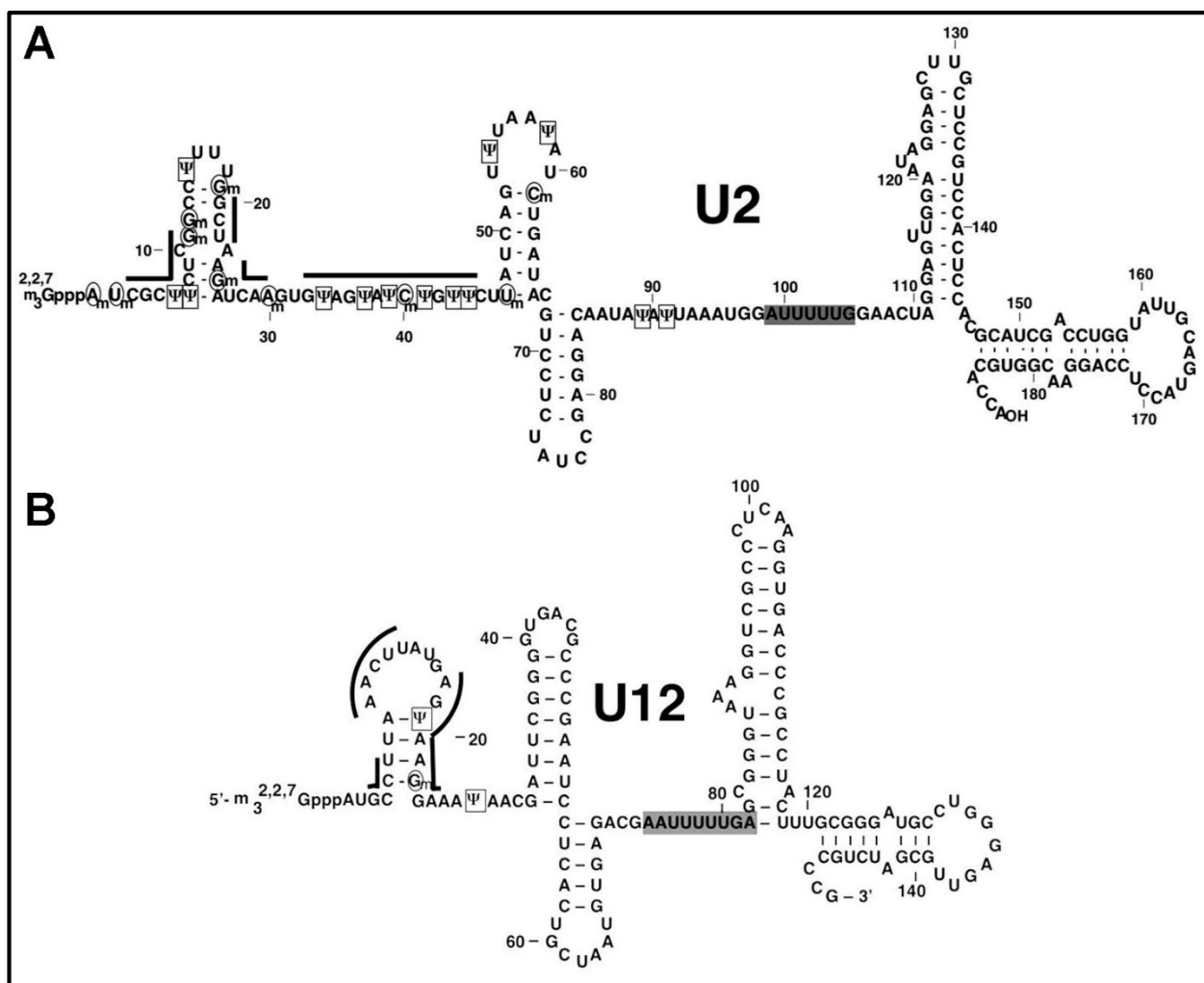
формирующих важнейшие функциональные центры рибосом: декодирующий, пептидилтрансферазный и тРНК-связывающий центры [53]. Модификации как азотистых оснований, так и остатков рибозы изменяют химические и структурные свойства не только отдельных нуклеотидов, но и макромолекулы в целом. Метилирование остатка рибозы отдельного нуклеотида может повлиять на его конформацию и взаимодействие с другими нуклеотидами, наличие метокси-группы в 2'-положении рибозы в составе РНК предотвращает гидролиз фосфодиэфирной связи с 3'-конца модифицированного нуклеотида [54].

Установлено, что малые ядерные РНК в процессе созревания подвергаются ряду модификаций: приобретают моно- или три-метилированный гуанозин в составе кэпа на 5'-конце ( $m^7G$  и  $m_3^{2,2,7}G$ , Lsm- и Sm-класс мяРНК соответственно) и несколько внутримолекулярных модификаций нуклеотидов. В пуле всех мяРНК выявлено 28 псевдоуридинов и 32 нуклеотида, метилированных по 2'-О-положению [55]. Локализация большинства обнаруженных модифицированных нуклеотидов эволюционно устойчива и связана с функционально важными областями молекул. Известно, что образование модификаций в мяРНК происходит по двум механизмам: РНК-зависимому (С/D-бокс- и Н/АСА-бокс-скаРНК направляют работу РНП, осуществляющих модификации) и РНК-независимому (одиночный белок ответственен как за узнавание субстрата, так и за каталитическую реакцию [56]). При этом в модификации некоторых нуклеотидов, например,  $\Psi 34$  U2 мяРНК, задействованы оба механизма [57].

Модифицированные нуклеотиды мяРНК в процессе сборки и функционирования сплайсосомы оказывают влияние на РНК-РНК-взаимодействия, на взаимодействия между мяРНК и белками сплайсосомы, а также напрямую участвуют в каталитических реакциях. В качестве конкретного примера рассмотрим функциональную роль модификаций наиболее изученной U2 мяРНК, взаимодействующей с последовательностью точки ветвления сплайсинга. В структуру данной РНК входят 13 псевдоуридинов и 10 2'-О-метилированных нуклеотидов (**Рисунок 2, А**). Наиболее интересным описанным фактом, помимо расположения всех модификаций в 5'-половине молекулы, являются индивидуальная необходимость 2'-О-метилирования нуклеотидов в положениях 1, 2, 12 и 19 для функционирования данной мяРНК; и в то же время кумулятивное влияние наличия псевдоуридинов на эффективность сплайсинга [58]. Кроме того, при определении кристаллической структуры взаимодействия U2 мяРНК и области ТВ субстрата была выявлена характерная роль  $\Psi 34$  в формировании «суперскрученного» аденозина с открытой 2'-ОН-группой, доступной для нуклеофильной атаки на донорный 5'-сайт сплайсинга [59]. Для U12 мяРНК наблюдается гомология положения сайтов модификации  $\Psi 19$  U12 мяРНК (гомологичен  $\Psi 34$  U2 мяРНК), взаимодействующего с аденозином ТВ сплайсинга (**Рисунок 2, В**) [60]. Данный факт ещё раз указывает на важную роль модификаций



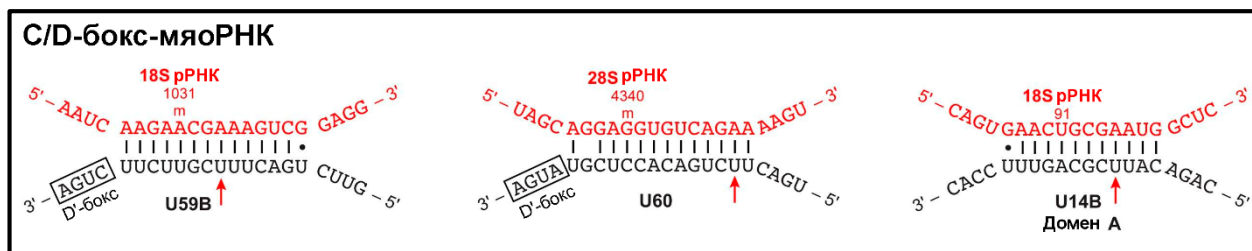
модифицированных мономеров в функционировании мяРНК как основной, так и минорной форм сплайсосомы человека.



**Рисунок 2.** Псевдоуридины и 2'-О-метилированные нуклеотиды U2 (А) и U12 (Б) мяРНК человека [55]. Отображены первичная и вторичная структура молекулы РНК. Ψ заключены в прямоугольники, 2'-О-метилированные нуклеотиды в эллипсы. Толстые линии указывают на последовательности, участвующие в РНК-РНК взаимодействиях и в каталитических реакциях сплайсинга пре-мРНК. Серым цветом выделен сайт связывания с Sm-белками. На рисунке также отражен 5'-три-метилированный гуанозин.

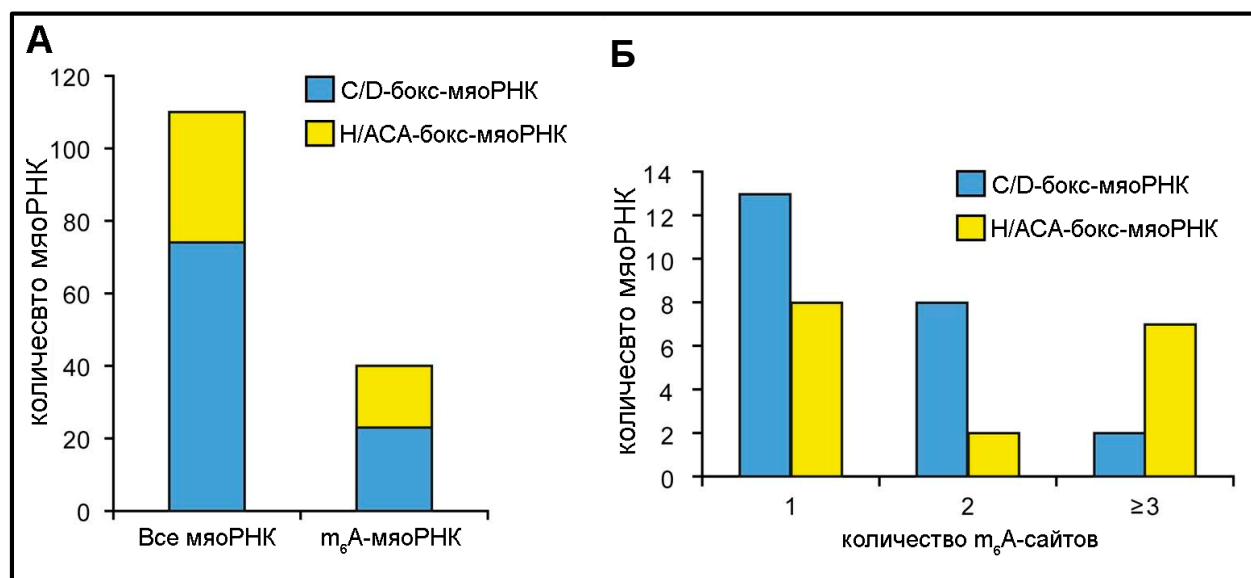
В структуре малых ядрышковых РНК внутримолекулярные модифицированные нуклеотиды были обнаружены в результате развития методов полнотранскриптомного картирования модификаций. В 2014 году за счет реализации подхода, объединяющего метод идентификации положений Ψ по продуктам терминации обратной транскрипции РНК, предварительно обработанной N-циклогексил-N'-(2-(4-метил)морфолиноэтил)-карбодиимида [61], и метод полногеномного секвенирования на высокопродуктивных платформах, были выявлены 9 сайтов псевдоуридилрования в C/D-бокс-РНК и 1 – в H/ACA-бокс-РНК клеток человека HEK293 [62]. Тот факт, что 6 из 9 псевдоуридинов C/D-бокс-РНК располагались в 5'-

конец области узнавания, позволяет сделать предположение о функциональной значимости данных модификаций (**Рисунок 3**).



**Рисунок 3.** Сайты псевдоуридилрования в человеческих мяоРНК [62]. На рисунке отражены области комплементарности между тремя С/D-бок-мяоРНК (черные) и их целевыми сайтами рРНК (красные). Красные стрелки указывают на сайты псевдоуридилрования, выявленные в работе.

В 2015 году в мышинных мяоРНК при помощи технологии miCLIP (от англ. "m<sup>6</sup>A individual-nucleotide-resolution cross-linking and immunoprecipitation") удалось зафиксировать наличие и положение m<sup>6</sup>A-модификаций. Оказалось, что более 25% представителей семейств С/D-бок- и Н/АСА-бок-РНК имеют по меньшей мере один сайт N6-метилирования аденозина (**Рисунок 4, А**). Более того, в структуре некоторых молекул мяоРНК может быть несколько m<sup>6</sup>A-модификаций (**Рисунок 4, Б**). Установлено, что метилирование мяоРНК происходит в основном в одноцепочечных областях в контексте консенсусного мотива DRACH (D обозначает А, G или U и H обозначает А, С или U) [46].



**Рисунок 4.** Диаграммы, отражающие наличие m<sup>6</sup>A-модификаций в мышинных мяоРНК [46]. (А) – сравнение количества проанализированных мяоРНК и мяоРНК, имеющих минимум один сайт m<sup>6</sup>A. (Б) – сравнение количества мяоРНК, имеющих 1, 2 или ≥ 3 сайтов m<sup>6</sup>A.

Пост-транскрипционные модификации 5'-конца мяоРНК напрямую зависят от положения их гена и механизма созревания зрелой формы из предшественника. Поэтому большинство мяоРНК содержат немодифицированный 5'-конец, так как образуются вследствие разрушения структуры лассо интрона гена-хозяина, вырезанного при сплайсинге, и последующего процессинга предшественника мяоРНК экзонуклеазами. Лишь некоторые мяоРНК эукариот (U3, U8 и U13), транскрипция которых осуществляется РНК-полимеразой II независимо, подвергаются кэпированию и содержат 2,2,7-триметилгуанозиновый кэп [63].

Таким образом, результаты, полученные за счет развития методов обнаружения и картирования модифицированных нуклеотидов, указывают на дополнительные механизмы регуляции функционирования некоторых классов нкРНК, связанные с модификацией структурных элементов РНК – нуклеотидов.

#### ***1.4. Заключение***

Миллионы лет эволюции научили природу умело сочетать существующие биохимические строительные блоки для решения задач различной сложности. Ярким примером этого являются модификации РНК, в результате которых основные нуклеотиды (С, U, G, А) приобретают новые свойства за счет различных химических групп, увеличивая богатство химического разнообразия, биологическая значимость которого остается в большей степени нераскрытой на сегодняшний день. В последние годы получены данные о динамическом изменении пула модификаций ключевых форм РНК в зависимости от внешних факторов, действующих на отдельные клетки, и физиологического состояния организма в целом [64,65]. В недавних работах представлены экспериментальные доказательства взаимосвязи механизмов формирования модифицированных нуклеотидов РНК в клетках млекопитающих с развитием патологических состояний [66,67]. Таким образом, модификации могут функционировать как искусные датчики и преобразователи информации, контролируя равновесие внутриклеточного метаболизма на системном уровне. Следовательно, накопление знаний о вкладе модифицированных мономеров в метаболизм и функционирование отдельных форм РНК закладывают основы для создания новых диагностических и терапевтических подходов.

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Материалы и реактивы

В работе были использованы следующие реактивы и материалы: Трис, персульфат аммония, глицерин («Gerbu», Германия), ДТТ («Serva», Германия), TEMED, мочеви́на, акриламид, агароза для электрофореза («Fluka», Швейцария), ЭДТА, NaCl, Тритон X-100 («Хеликон», Москва), N,N'-метиленабисакриламид, L-глутамин («ICN», США), ксиленцианол, бромфеноловый синий, бромистый этидий («Sigma», США), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, рибонуклеозидтрифосфаты («Биосан», Новосибирск), среда культуральная IMDM, трипсин («Sigma», США), гентамицин (Минск, Белоруссия), эмбриональная сыворотка крови крупного рогатого скота («Биолот», Санкт-Петербург), липофектамин, Тризол (Invitrogen, США), РНК-маркер молекулярной массы «RiboRuler Low Range RNA Ladder», ингибитор РНКаз «RiboLock RNase Inhibitor» («Thermo fisher scientific», США), флуоресцеин изотиоцианат (FITC) («MP Biomedicals», США). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации осч или хч.

В работе использовали хроматографические колонки (2.0×7.5 мм) с сорбентом ProntoSIL–120–5–C18 AQ (ЗАО Институт хроматографии «Эконова», Новосибирск), хроматографические пластины для ТСХ Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) и рентгеновскую пленку («Agfa», Бельгия).

### 2.2 Ферменты

В работе были использованы следующие ферменты: рекомбинантная ДНКазы I, обратная транскриптаза (ревертаза) AMV, термочувствительная щелочная фосфатаза – («Thermo fisher scientific», США); РНК-полимераза фага T7, ДНК-полимераза *T.aquaticus* (Taq-полимераза), обратная транскриптаза M-MLV, полинуклеотидкиназа фага T4 (T4 ПНК) (Лаборатория биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН).

Для проведения ПЦР и ОТ-ПЦР использовали готовые реакционные смеси, содержащие ферменты и другие необходимые компоненты, производства ООО «Биолабмикс» (Новосибирск).

## 2.3 Олигодезоксирибонуклеотиды

2.3.1 Олигодезоксирибонуклеотиды, используемые для ОТ и ПЦР фрагментов рРНК клеток человека

18-2 –	5'-ТААТГАТССТТСССГСАГГТТС-3'
18-1702 –	5'-GCCGATCCGAGGGCCTCACT-3'
28-2.2 –	5'-АТТГГСТССТСАГССААГСА-3'
28-3.2 –	5'-СААСАСАТСАТСАГТАГГГТ-3'
18_1490 –	5'-GTCAGTGTAGCGCGCGTGCA-3'
Cm4506r –	5'-СААСАСАТСАТСАГТАГГГТ-3'
28S_Cm3820_r –	5'-CCGTTCCCTTGGCTGTG-3'

2.3.2 Олигодезоксирибонуклеотиды, используемые для ПЦР участков рРНК клеток человека

28-2.1 –	5'-TAGACCGTCGTGAGACAGGT-3'
18S_1804f –	5'-GCGCTGAGAAGACGGTCTGA-3'
28S_Cm4506_f –	5'-GAACGTGAGCTGGGTTTAG-3'
28S_Cm3820_f –	5'-GAACGAGATTCCTCACTG-3'
18S_Gm1490_f –	5'-AGCCACCCGAGATTGAG-3'
18S_C1703_inside –	5'-TACACACCCGCCGTCGCTAC-3'
18S_G1490_inside –	5'-GAGCAATAACAGGTCTGTG-3'
28S_C3820_inside –	5'-GATTCCCACTGTCCCTACC-3'
28S_C4506_inside –	5'-CTGGGTTTAGACCGTCGTG-3'

2.3.3 Олигодезоксирибонуклеотиды, используемые для ген-специфичного ОТ-ПЦР суммарной РНК клеток человека

### Ген *GAPDH*:

GAPDH-1 –	5'-GAAGATGGTGTGATGGGATTTTC-3'
GAPDH-2 –	5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGT-3'

### Ген *IFIT3*:

IFIT3_1.1 –	5'-GGCAGACAGGAAGACTTCTG-3'
IFIT3_1.2 –	5'-TTTCTGCTTGGTCAGCATGT-3'

### Ген *OAS1*:

OAS1_F –	5'-CGATCCCAGGAGGTATCAGA- 3'
OAS1_R –	5'-TCCAGTCCTCTTCTGCCTGT-3'

### Ген *PKR*:

PKR_F –	5'-TCGCTGGTATCACTCGTCTG- 3'
PKR_R –	5'-GATTCTGAAGACCGCCAGAG- 3'

### Ген *IFIT1*:

IFIT1_F –	5'-AAAAGCCCACATTTGAGGTG-3'
IFIT1_R –	5'-GAAATTCCTGAAACCGACCA-3'

### Ген *RIG-I*:

RIG-I_F –	5'-GTTGTCCCCATGCTGTTCTT-3'
RIG-I_R –	5'-GCAAGTCTTACATGGCAGCA-3'

**Ген *IFN-β*:**

IFNB\_F – 5'-CATTACCTGAAGGCCAAGGA-3'

IFNB\_R – 5'-CAGCATCTGCTGGTTGAAGA-3'

**2.3.4 Олигодезоксирибонуклеотиды, используемые для синтеза ДНК-матриц аналогов мяоРНК и мяРНК**

**U25\_Base**

5'-TTCCTATGATGAGGACCTTTTCACAGACCTGTAAGTCCGTGAGGATA-3'

**U25\_T7\_W**

–

5'-

ATGCAGCTAATACGACTCACTATAGGGTTCCTATGATGAGGACCT-3'

**U25\_W** – 5'-TCTCCTCAGAGTTATTTATCCTCACGGAGCTCAG-3'

**U74\_base\_wt**

5'-CTGCCTCTGATGAAGCCTGTGTTGGTAGGGACATCTGAGAGTAATGATG-3'

**U74\_T7** – 5'-ATGCAGCTAATACGACTCACTATAGGGCTGCCTCTGATGAAGCCT-3'

**U74\_R\_wt** – 5'-CCACCATCAGAGCGGTTGGCATTTCATCATTACTCTCAG-3'

**U35a\_base\_wt**

5'-CAGATGATGTCCTTATCTCACGATGGTCTGCGGATGTCCCTGTGGGAATGGCGA-3'

**U35a\_T7** – 5'-ATGCAGCTAATACGACTCACTATAGGCAGATGATGTCCTTA-3'

**U35a\_R\_wt**

–

5'-

CTCCTGGCATCAGCTAAGCCATTGGCATTGTCGCCATTCCCACAG-3'

**Gfp-146-T7**

–

5'-

ATGCAGCTAATACGACTCACTATAGGGCGGGGGCGAGGAGCTGTTC-3'

**Gfp-89-T7**

–

5'-

ATGCAGCTAATACGACTCACTATAGGGACGTGCACGGCCACAAGTT-3'

**Gfp-R** – 5'-GGTGGTGCAGATGAACTTGA-3'

Использованные в работе олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы в  
Лаборатория биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН.

**2.4 Олигорибонуклеотиды**

**28S\_targetU25\_M**

5'-UCAGCCACCCGAGAUUGAGCAAUAACAGmGUCUGUGAUGCCCUUAGAUGUCCG  
GGGUGCACGCGCGCUACACUGACUGGCUCAGC-3'

**28S\_targetU25**

5'-UCAGCCACCCGAGAUUGAGCAAUAACAGGUCUGUGAUGCCCUUAGAUGUCCGG  
GGCUGCACGCGCGCUACACUGACUGGCUCAGC-3'

**28S\_targetU74\_M**

5'-GAUGAACGAGAUUCCCACUGUCmCCUACCUACUAUCCAGCGAAACCACAGCCA  
AGGGAACGGGC-3'

**28S\_targetU74**

5'-GAUGAACGAGAUUCCCACUGUCCCUACCUACUAUCCAGCGAAACCACAGCCA  
AGGGAACGGGC-3'

**28S\_targetU35a**

5'-GGGAACGUGAGCUGGGUUUAGACmCGUCGUGAGACAGGUUAGUUUUACCCUA

CUGAUGAUGUGUUGUUG-3'

**28S\_targetU35a**

5'-GGGAACGUGAGCUGGGUUUAGACCGUCGUGAGACAGGUUAGUUUUACCCUAC  
UGAUGAUGUGUUGUUG-3'

Использованные в работе олигорибонуклеотиды синтезированы в Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН.

## **2.5 Буферные смеси**

ТАЕ – 0.04 М Трис-ацетат, 0.002 М ЭДТА, pH 7.6;

ТВЕ – 0.089 М Трис-борат, 0.002 М ЭДТА, pH 8.3;

PBS (стерильный) – фосфатный буфер, pH 7.4, 1.7 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.2 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 мМ NaCl;

Буфер для нанесения ДНК на гель «Бик» («Биолабмикс», Новосибирск);

Буфер для нанесения образцов РНК на гель «Фрик» («Биолабмикс», Новосибирск);

Буфер А (используемый для разделения ядерной и цитоплазматической фракций клеток человека) – 150 мМ NaCl, 50 мМ Трис-НСl, pH 7.5 и 10 мМ ЭДТА.

## **2.6 Методы**

### **2.6.1 Конструирование и синтез аналогов мяоРНК**

Для конструирования консервативных элементов структуры аналогов мяоРНК использовали последовательности известных малых ядрышковых РНК человека.

Синтез ДНК-матриц проводили с использованием наборов олигодезоксирибонуклеотидов. Амплификацию ДНК-матрицы проводили в реакционной смеси «БиоМастер HS-Тaq ПЦР» («Биолабмикс», Новосибирск), в следующих условиях: 94°C – 3 мин, 28 циклов: 94°C – 10 с, 57°C – 10 с, 72°C – 10 с. Продукты амплификации анализировали электрофорезом в 2,5% агарозном геле по стандартной методике.

Транскрипцию *in vitro* проводили в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 6 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 40 мМ Трис-НСl, pH 7.9 (при 25°C), 10 мМ ДТТ, 10 мМ NaCl, 2 мМ спермидин гидрохлорид, 60 е.а. РНК-полимеразы фага Т7. Глубину модификации варьировали изменением исходных соотношений м6АТР/АТР, м5СТР/СТР, ΨТР/УТР. Синтез проводили при 37°C 2–18 ч. Продукты транскрипции сразу после реакции синтеза анализировали в 2.5% агарозном геле и 10% денатурирующем (7 М мочевины) полиакриламидном геле (ПААГ). Для нанесения проб РНК использовали буфер «Фрик»; в качестве маркера молекулярной массы использовали «RiboRuler Low Range RNA Ladder».

По завершении транскрипции продукты транскрипции осаждали из реакционной смеси этанолом. Для этого к реакционной смеси добавляли этанол до 75%, выдерживали полученную

смесь в течение 10 мин при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  и центрифугировали при  $16000g$  10 мин. Супернатант удаляли, осадки промывали 75% этанолом. Полученные осадки высушивали на воздухе или в вакуумном концентраторе Eppendorf Concentrator 5301 и растворяли в деионизованной воде. Растворы РНК хранили при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Очистку продуктов транскрипции от низкомолекулярных компонентов реакционной смеси (в первую очередь от не включившихся нуклеозидтрифосфатов) проводили с использованием гель-фильтрации на сорбенте Sephadex G25 ( $V=1000$  мкл на 100 мкл реакционной смеси). Затем проводили гидролиз ДНК-матриц с помощью ДНКазы I, при одновременной обработке синтетических РНК щелочной фосфатазой. Для этого к полученным элюатам после гель-фильтрации добавляли ДНКазу I в расчете 5 е.а. на 1 мкг ДНК-матрицы и щелочную фосфатазу в расчете 10 е.а. на 1 мкг РНК. Полученную реакционную смесь инкубировали при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  20 мин в буфере, содержащем 2.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ Трис-НСl, pH 7.5 (при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), 0.1 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Для повышения стабильности РНК к реакционной смеси добавляли ингибитор РНКаз «RiboLock RNase Inhibitor» в соответствии с протоколом производителя. РНК из реакционной смеси выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с применением реагента «ЛиРа» («Биолабмикс», Новосибирск) по протоколу производителя, описанному в п. 2.5.6. Затем очищенные транскрипты обрабатывали полинуклеотид киназой T4 в смеси с 0.1 мМ АТР, 10 мМ ДТТ в буфере, содержащем 2.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ Трис-НСl, pH 7.5 (при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), 0.1 мМ  $\text{CaCl}_2$ . ПНК T4 добавляли в реакцию из расчета 20 е.а на реакцию. Инкубировали 30 минут при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Для очистки транскриптов от АТР, фермента и других компонентов реакционной смеси проводили препаративную офВЭЖХ на приборе Милихром А-02 (ООО ИХ "ЭкоНова", Новосибирск), оснащенный колонкой ProntoSIL-120-5-C18 AQ и многоволновым спектрофотометром. Для элюции использовали линейный градиент в системе растворителей: раствор А – 0.05 М водный раствор тетраэтиламмоний ацетата (pH 7.5); раствор Б – 0.05 М раствор тетраэтиламмоний ацетата в 20% растворе ацетонитрила (pH 7.5). Обработку результатов хроматографии проводили с помощью программного пакета МультиХром версии 1.5х-Е. Осаждение РНК из хроматографических фракций проводили этанолом в присутствии 0.6 М NaAc. Концентрацию синтетических РНК определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение раствора РНК на длине волны 260 нм с учетом коэффициента экстинкции  $\epsilon_{260} = 0,025$  (мкг/мл) $^{-1} \times \text{см}^{-1}$ . Для подтверждения первичной структуры ДНК-матриц для синтеза аналогов малых ядерных и ядрышковых РНК проводили секвенирование по методу Сэнгера с использованием флуоресцентно меченых терминаторов ДНК-полимеразы в составе смеси «BigDye 3.1» («Applied Biosystems»), с последующим разделением ДНК на анализаторе – ABI3100 «Applied Biosystems» (ЦКП «Геномика» СО РАН).



### 2.6.2 Получение FITC-меченных РНК

Для получения FITC-меченных аналогов на этапе транскрипции смесь нуклеозидтрифосфатов содержала 25% 5-аминоалилуридин-5'-трифосфата (AA-UTP)/ 75% UTP. Встраиваемый мономер AA-U содержит в структуре амиолинкер, к которому после синтеза и очистки аналога присоединяется активированный FITC. Для этого водный раствор AA-РНК, полученной в результате транскрипции, растворяется в большем объеме DMSO, и смешивается с раствором FITC в DMSO (конечная концентрации FITC – 0,03 М). Затем к полученной смеси добавляется N(Et)<sub>3</sub> (1/20 реакционной смеси). Полученная смесь инкубируется в течение 1 ч. при комнатной температуре, интенсивно перемешиваясь. Затем полученные FITC-меченные РНК осаждаются 4-х кратным избытком чистого этанола с NaOAc до 0,3 М и несколько раз промываются 80% этанолом.

### 2.6.3 Культуры клеток и вирус

Для анализа влияния аналогов мяоРНК на клетки человека использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231 и клетки аденокарциномы яичников человека SK-OV-3. Для оценки экспрессии мяоРНК в условиях вирусной инфекции использовали клетки аденокарциномы легкого человека A549 (ATCC #CCL-185, США). Клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 культивировали в среде IMDM с 10 мМ L-глутамином и 40 мкг/мл гентамицина в присутствии 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в культуральных флаконах с площадью поверхности дна 25 см<sup>2</sup>. Клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 культивировали в среде L-15 с добавлением 100 ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина сульфата, 0,25 мкг/мл амфотерицина в присутствии 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в культуральных флаконах с площадью поверхности дна 25 см<sup>2</sup>. Клетки SK-OV-3, A549 культивировали в среде DMEM с 10 мМ L-глутамином в присутствии 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в культуральных флаконах с площадью поверхности дна 25 см<sup>2</sup>. Все используемые в работе культуры клеток пассировали в Лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН сотрудники Нуштаева А.А. и Троицкая О.С. под руководством с.н.с., к.б.н. Коваль О.А.

Для оценки уровня мяоРНК в клетках человека в условиях инфекции вирусом гриппа А был использован вирус гриппа А/ PuertoRico/8/1934 (H1N1), полученный из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева». Подготовка препаратов клеток человека, инфицированных вирусом гриппа А, проводилась на базе НИИ гриппа к.б.н. Сергеевой М.В.

#### *2.6.4 Трансфекция клеток MCF-7, MDA-MB-231 и SK-OV-3 аналогами мяоРНК*

Для изучения влияния аналогов мяоРНК на клетки человека клетки MCF-7, MDA-MB-231 и SK-OV-3 рассаживали в культуральные планшеты до плотности  $2 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> и затем инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. Синтезированные аналоги малых ядерных и ядрышковых РНК (0.06 мг/мл) инкубировали с раствором липофектамина в течение 20 мин. Среду, в которой культивировали клетки, удаляли, клетки промывали двумя сменами PBS, добавляли свежую среду, соответствующую культуре клеток (см. пункт 2.6.4), с антибиотиком и сывороткой и РНК с липофектаминам до ее конечной концентрации в среде в диапазоне 10–80 нМ в зависимости от эксперимента. Затем клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течении 24-48 ч. в зависимости от эксперимента.

#### *2.6.5 Выделение суммарной РНК клеток человека*

По завершении инкубации клеток после трансфекции среду удаляли, к клеткам добавляли реагент для лизиса Тризол (Invitrogen, США) или аналогичный «Ли́ра» («Биолабмикс», Новосибирск), и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Лизат собирали, добавляли хлороформ в расчете 1:5 по отношению к объему Тризола/Ли́ра, полученную смесь интенсивно встряхивали и центрифугировали 10 мин при 12000g и 4°C. Водную фазу собирали, добавляли к ней равный объем изопропилового спирта, смесь выдерживали 15 мин при -20°C, и затем проводили центрифугирование в течение 10 мин при 16000g и 4°C. Супернатант удаляли и промывали осадки 80% этиловым спиртом. Полученные осадки клеточной РНК высушивали и растворяли в деионизованной воде, растворы хранили при -70°C. Концентрацию НК в препаратах определяли спектрофотометрически.

#### *2.6.6 Выделение РНК из цитоплазматической и ядерной фракций клеток*

По завершении инкубации клетки охлаждали на льду. Среду отбирали, клетки промывали тремя сменами PBS и лизировали 1% раствором Тритона X-100 в буфере А (150 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5 и 10 мМ ЭДТА) на льду в течение 15 мин. Аликвоту полученного лизата суспендировали, наслаивали на холодный раствор 10% сахарозы в буфере А и проводили центрифугирование в течение 25 мин при 600g и 4°C. Верхнюю часть полученного супернатанта (цитоплазматическую фракцию клеток) отбирали и добавляли к нему 100 мкл буфера А и равный объем Ли́ры. Осадок ядер промывали тремя сменами буфера А. Ядра суспендировали в 100 мкл буфера А и добавляли равный объем Ли́ры. Выделение РНК проводили, как описано выше (пункт 2.6.5).

### *2.6.7 Оценка глубины метилирования сайтов 2'-О-метилирования нуклеотидов в составе рРНК клеток человека методом ОТ-ПЦР*

Для проведения двустадийной ОТ-ПЦР в режиме реального времени использовались праймеры, фланкирующие последовательность, содержащую один или несколько сайтов 2'-О-метилирования. Обратную транскрипцию проводили в буфере, содержащем 50 мМ KCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 8.3, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ ДТТ и 50 е.а. ревертазы M-MLV, при концентрации dNTP от 0.4 нМ до 4.0 мМ каждого, а также 50 нг исследуемой РНК. Последующую амплификацию (90°C -10 с, 65°C – 15 с, 72°C – 15 с.) проводили в реакционной смеси БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2×) («Биолабмикс», Новосибирск) в режиме реального времени на приборе Light Cycler 96 (Roche, Швейцария). Данные анализировали с помощью программного пакета Light Cycler 96 Software 1.1 (Roche). В качестве нормализующего контроля для ОТ-ПЦР использовали праймеры, фланкирующие участок 28S рРНК с 4502 по 4549 н., не содержащий известных 2'-О-метилированных нуклеотидов.

### *2.6.8 Определение содержания неканонических мономеров в составе синтетических и природных РНК*

Исчерпывающий ферментативный гидролиз РНК до нуклеозидов проводили в буфере, содержащем 10 мМ Трис-HCl, pH 8.0 (при 25°C), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 М KCl, 0.02% Тритон X-100, 0,1 мг/мл БСА, 0,65 мг/мл рибонуклеазы А, 4×10<sup>-3</sup> мг/мл нуклеазы Р1, 0,2 мг/мл фосфодиэстеразы I и 2 е.а щелочной фосфатазы на 1 мкг РНК, соответственно. Реакционную смесь инкубировали 2-18 ч. при 37°C. По завершении гидролиза проводили деактивацию ферментов нагреванием (75°C в течение 10 мин). После осаждения нерастворимой фракции (образуется после нагревания реакционной смеси) центрифугированием при 12000g 3 мин, супернатант, содержащий нуклеозиды, переносили в чистые пробирки и доводили объём раствора деионизованной водой до 300 мкл, добавляли хлороформ в расчете 1:5 по отношению к исходному объёму раствора. Затем полученную смесь интенсивно встряхивали и центрифугировали 3 мин при 12000g. Водную фазу, содержащую нуклеозиды, собирали, высушивали в вакуумном концентраторе Eppendorf Concentrator 5301 и полученные осадки растворяли в деионизованной воде.

Для качественной оценки содержания нуклеозидов в смеси проводили высокоэффективную жидкостную хромато-масс-спектрометрию на хроматографе Agilent 1200 Series (Agilent Technologist, USA), оснащённом колонкой ProntoSIL-20-3-C18 AQ, с последующей детекцией на анализаторе Agilent G6410A Triple Quadrupole LC/MS (Agilent Technologist, USA) с электро-спрей ионизатором. Для элюции использовали градиент в системе растворителей: раствор А – вода; раствор Б – 20% раствор ацетонитрила (pH 7.5): 0-20 мин – линейный градиент 0-100% раствор Б (0,15 мл/мин), 20-28 мин – 100% раствора Б (0,15 мл/мин), 28-35 мин – 100%

раствора А (0,3 мл/мин). Масс-спектрометрический детектор работал в режиме положительного иона со следующими параметрами напряжения и источника газа: температура газа - 50°C, скорость потока газа – 10 л/мин, давление газа – 138 кПа, напряжение в капилляре – 3500 В. Первый и третий квадруполь фиксировали заранее заданные молекулярные переходы m/z исходного иона к m/z иона продукта: m5C m/z 258→126, Cm m/z 258→112, Um m/z 259→113, Gm m/z 298→152, I m/z 269→137, Am m/z 282→136, m6A m/z 282→150.2, Ψ m/z 245→125. Первый квадруполь фиксировал молекулярные ионы исходных рибонуклеозидов, третий квадруполь фиксировал ион дегликозилированного продукта. Обработку результатов хромато-масс-спектрометрии проводили с помощью программного пакета Agilent MassHunter Qualitative Analysis.

#### *2.6.9 Анализ накопления флуоресцентно меченой РНК в клетках человека*

Анализ накопления в клетках SK-OV-3 FITC-меченных аналогов проводили с использованием методов флуоресцентной микроскопии на трех приборах: флуоресцентный имиджер ZOE («BIO RAD», США), клеточный анализатор IN Cell Analyzer 2000 («GE», США), флуоресцентный конфокальный микроскоп Axio Observer 1 («Zeiss AG», Германия). Конфокальную микроскопию подготовленных образцов проводил м.н.с. Лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН Матвеев А.Л.

Клетки SK-OV-3 высаживали либо на предметное стекло восьмилучной камеры Culture Slide («BD Falcon», США) ( $3 \times 10^4$  клеток/лунку) для анализа на микроскопе и имиджере, либо на дно 96-луночного планшета в количестве  $3 \times 10^3$  на лунку. Через 24 ч клетки трансфицировали флуоресцентно меченой РНК (10 нМ) в комплексе с липофектамино и инкубировали в течение 24 ч или 48 ч при 37°C. Контрольные клетки инкубировали с гидролизатом флуоресцентно меченого аналога в присутствии липофектамина. После инкубации среду убирали, клетки промывали двумя сменами буфера PBS, окрашивали в течении 2-х ч. красителем Hoechst (окраска ядер), и фиксировали 4% формалином в течение 10 мин. Формалин удаляли и клетки промывали тремя сменами PBS. Фиксированные препараты красили Alexa Fluor® 594 Phalloidin («Thermo fisher scientific», США) (окраска цитоскелета) в течение 10 минут. Краситель удаляли и клетки промывали тремя сменами PBS. В случае работы с предметным стеклом его покрывали покровным стеклом с несколькими каплями Antifade и затем анализировали на имиджере или конфокальном микроскопе. При анализе клеток в 96-луночном планшете, окрашенные клетки заливали буфером PBS и анализировали на клеточном анализаторе.

#### *2.6.10 Анализ стабильности радиоактивно меченых аналогов мяРНК и мяРНК в клетках человека*

Клетки MCF-7 трансфицировали 5'-[<sup>32</sup>P]-мечеными аналогами мяРНК и мяРНК в комплексе с липофектаминоном и анализировали через 24 ч. Суммарную РНК трансфицированных клеток выделяли реагентом Лира, разделяли в 10% денатурирующем ПААГ и проводили автордиографию радиоактивно меченой РНК в геле. Параллельно в геле анализировали 5'-[<sup>32</sup>P]-меченые олигорибонуклеотиды различной длины.

#### *2.6.11 Анализ изменения уровня экспрессии генов в клетках человека, трансфицированных аналогами мяРНК и мяРНК*

Обратную транскрипцию с последующей амплификацией (90°C – 10 с, 65°C – 15 с, 72°C – 15 с.) суммарной РНК клеток MCF-7/MDA-MB-231 со специфическими праймерами проводили в реакционной смеси БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×) («Биолабмикс», Новосибирск) в режиме реального времени на приборе Light Cycler 96 (Roche, Швейцария). Данные анализировали с помощью программного пакета Light Cycler 96 Software 1.1 (Roche). Контрольные клетки инкубировали в среде с липофектаминоном без РНК. Для нормировки количества мРНК использовали уровень мРНК гена *GAPDH*. Для определения специфичности праймеров продукты ОТ-ПЦР анализировали в 2% агарозном геле, либо в 8% ПААГ.

#### *2.6.12 Определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста*

Клетки MCF-7 высаживали в 96-луночный планшет в количестве  $3 \times 10^3$  на лунку. Через 24 ч в культуральную среду с клетками добавляли раствор РНК (в комплексе с липофектаминоном) до концентрации 10–80 нМ, и инкубировали в течение 3 суток при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Контрольные клетки инкубировали в тех же условиях в среде с липофектаминоном. Затем в среду добавляли раствор МТТ в буфере PBS до конечной концентрации 0.5 мг/мл. После инкубации клеток с раствором МТТ в течение 120–180 мин при 37°C среду удаляли и растворяли кристаллы МТТ-формазана в 100 мкл ДМСО. Оптическую плотность раствора определяли на длине волны 570 нм на многоканальном спектрофотометре Apollo 8 LB 912 (Berthold Technologies, Германия). Данные представляли в виде значения ((МТТ-индекс трансфицированных клеток)/(МТТ-индекс контрольных клеток))×100% с указанием стандартного отклонения как минимум трех независимых экспериментов.

#### *2.6.13 Подготовка препаратов суммарной РНК клеток человека для дифференциального анализа экспрессии генов массовым параллельным секвенированием*

Клетки человека MCF-7 и SK-OV-3 трансфицировали аналогами мяРНК и мяРНК (10 нМ), а также синтетическим фрагментом мРНК гена GFP в комплексе с липидными трансфицирующими агентами: липофектаминоном 3000 в случае MCF-7 и липофектаминоном

RNAiMAX в случае SK-OV-3. Контрольные клетки инкубировали в среде с трансфицирующими агентами без РНК. После 48 ч. инкубации среду удаляли, клетки дважды промывали PBS буфером, контролируя наличие клеток на матрасике при помощи имиджера ZOE, и лизировали реагентом Тризол в расчете 1 мл на 1,5 млн клеток. Полученные лизаты хранили при -70°C. Выделение суммарной РНК клеток, конструирование ДНК-библиотек и массовое параллельное секвенирование было проведено на базе ЗАО «Геноаналитика» (г. Москва) из препаратов клеток линии MCF-7 и на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета (г. Казань) из препаратов клеток линии SK-OV-3.

Для дальнейшего биоинформационного анализа были получены первичные данные результатов секвенирования ДНК-библиотек.

#### *2.6.14 Биоинформационный и функциональный анализ данных, полученных в результате секвенирования*

Первичный биоинформационный анализ данных высокопроизводительного секвенирования поли(А)-фракции РНК клеток MCF-7 и SK-OV-3 на платформе Illumina HiSeq был проведен совместно с с.н.с. лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН, к.х.н. Семеновым Д.В.

Массивы экспериментальных нуклеотидных последовательностей/качества «прочтений» отдельных нуклеотидов (FASTQ-файлы) были выравнены на геном человека сборки hg19 с использованием программного пакета TopHat2 на основе программы bowtie2. Полученные выравнивания (SAM-файлы) сортировали и конвертировали в BAM-файлы, применяя программный пакет Samtools v.1.0. Оценку относительного вклада отдельных форм РНК в общий набор всех РНК проводили с использованием программного пакета Cufflinks v.2.1.1, применяя GTF-таблицы генов в геноме человека RefSeq (NCBI). Полученные количественные данные, выраженные в единицах FPKM (от англ. “Fragments per Kilobase per Million”) объединяли в таблицы в программе CuffMerge. Для сравнительного анализа результатов, полученных на клетках, обработанных модифицированными аналогами и на контрольных клетках, использовали программу Cuffdiff из программного пакета Cufflinks.

Вторичный анализ данных гибридизации включал в себя функциональный анализ генов с использованием базы данных GO (The Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>)) и онлайн сервиса REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>), позволяющего кластеризовать и визуализировать массивы GO-аннотаций. Для вторичного анализа генов с изменившейся экспрессией в полном массиве данных, полученных по результатам высокопроизводительных секвенирований, были отобраны группы генов с повышенной и пониженной экспрессией. Группы генов формировали с

использованием параметра Diff pValue < 0,05 для каждого опытного образца (эксперимент на культуре клеток MCF-7) и Diff pValue < 0,01 (эксперимент на SK-OV-3).

Качество картирования при проведении биоинформационного анализа данных секвенирования экспериментальных образцов клеток SK-OV-3 составило в среднем 30 млн. ридов на образец, среди которых 86% уникально мапированных (см. Приложение 1). Для эксперимента с культурой клеток MCF-7 в результате секвенирования было получено в среднем 12 млн. ридов на образец, с уникальностью картирования 84%.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### РАЗДЕЛ 3.1 Исследование влияния неканонических нуклеотидов на функционирование аналогов малых ядрышковых РНК в клетках человека

#### 3.1.1 Синтез набора аналогов малых ядрышковых РНК со статистическим включением в структуру неканонических мономеров

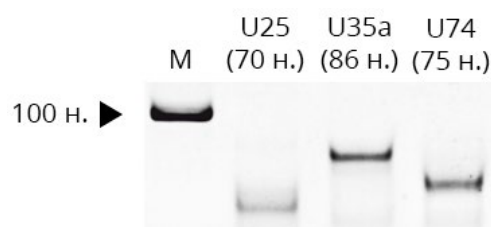
На основе обзора литературы из известных на сегодняшний день мяоРНК в качестве структурной основы для синтеза аналогов были выбраны несколько природных форм: SNORD25 (ранее с использованием аналогов данной мяоРНК получен пул данных), SNORD35a (показана возможность цитоплазматической локализации в условиях стресса [68]) и SNORD74 (выявлены формы процессинга, характерные развитию онкологических процессов [69]) (Таблица 1).

**Таблица 1.** Последовательности аналогов мяоРНК. В последовательностях РНК подчеркиванием выделены области комплементарности к каноническим рРНК-мишеням, указанным в таблице; С- и D-боксы выделены жирным шрифтом.

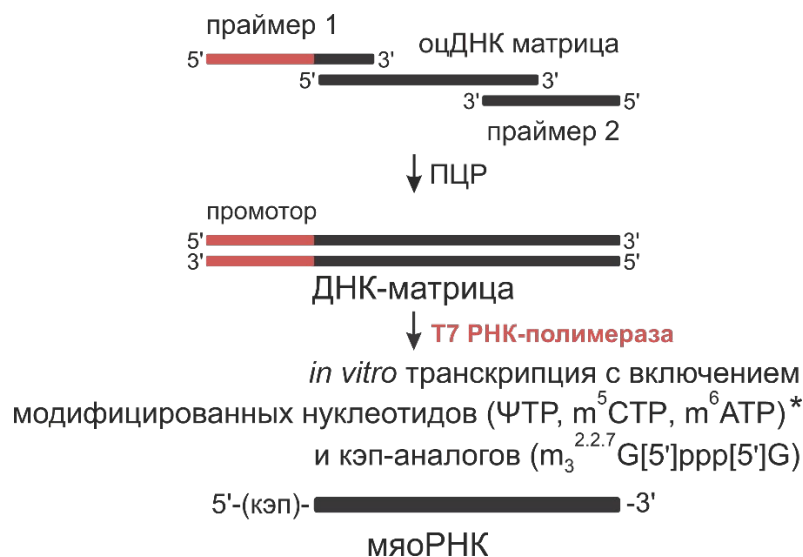
Обозначение	Последовательность 5'→3'	Длина, н	Мишень
U25	GGGUUCCTAUGAUGAGGACCUUUUCACAGACCUGUACUGAGCU CCGUGAGGAUAAUAACUCUGAGGAGA	70	18S рРНК Gm1490
U35a	GGCAGAUGAUGUCCUUAUCUCACGAUGGUCUGCGGAUGUCCCU GUGGGAAUGGCGACAAUGCCAAUGGCUUAGCUGAUGCCAGGAG	86	28S рРНК Cm4506
U74	GGGCGCCUCUGAUGAAGCCUGUGUUGGUAGGGACAUCUGAG AGUAAUGAUGAAUGCCAACCGCUCUGAUGGUGG	75	28S рРНК Cm3820

Для анализа влияния неканонических нуклеотидов на функционирование аналогов мяоРНК были сконструированы серии олигодезоксирибонуклеотидных матриц и праймеров, содержащих промотор РНК-полимеразы фага T7, и получены аналоги ряда малых ядрышковых РНК человека (U25 (SNORD25), U35a (SNORD35A), U74 (SNORD74)) (Рисунок 5). Схема синтеза аналогов мяоРНК включала в себя стадии получения двуцепочечных ДНК-матриц методом ПЦР и транскрипцию РНК *in vitro* (Рисунок 6). Статистическое включение неканонических мономеров: m<sup>6</sup>A, m<sup>5</sup>C и Ψ в структуру аналогов мяоРНК проводили на стадии транскрипции *in vitro*.





**Рисунок 5.** Электрофоретическое разделение продуктов второй стадии синтеза аналогов мяоРНК – транскрипции РНК *in vitro*. U25, U35a, U74 – обозначение аналога мяоРНК. В скобках указаны длины аналогов. М – маркер молекулярной массы РНК.



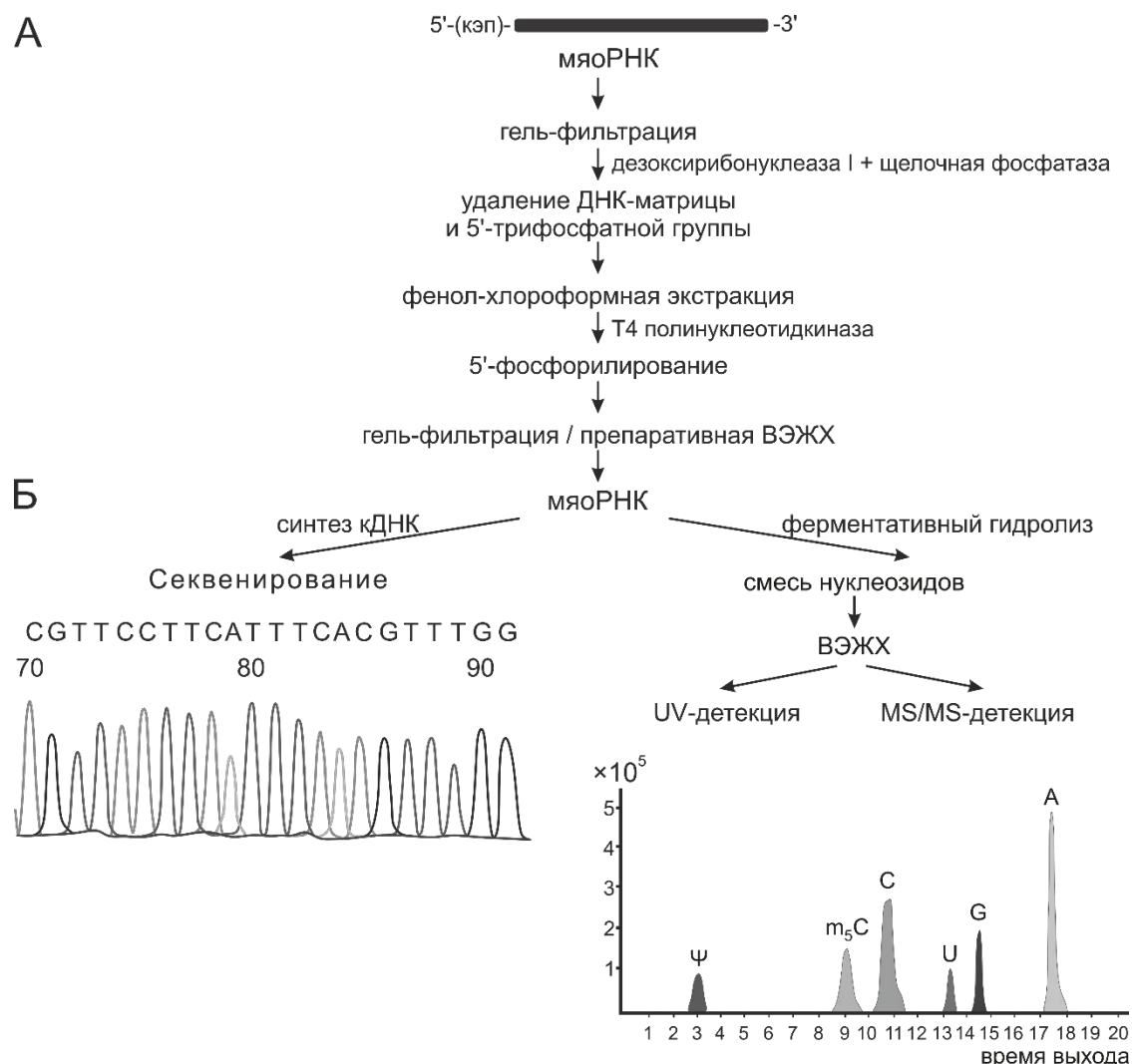
**Рисунок 6.** Схема синтеза аналогов мяоРНК, содержащих m<sup>6</sup>А, m<sup>5</sup>С, Ψ, а также структуру кэпа на 5'-конце. \* – глубину модификации варьировали изменением соотношений m<sup>6</sup>АТР/АТР, m<sup>5</sup>СТР/СТР, ΨТР/УТР в транскрипционной смеси.

В составе природных форм нкРНК на 5'-конце, как правило, находится остаток монофосфата или структура кэпа [70]. Для формирования остатка монофосфата на 5'-конце синтезированные аналоги малых нкРНК обрабатывали последовательно щелочной фосфатазой и полинуклеотид киназой фага Т4. Для очистки продуктов транскрипции от компонентов реакционных смесей была предложена схема, минимизирующая неспецифическую деградацию РНК (**Рисунок 7, А**).

Для оценки содержания неканонических мономеров в составе синтетических РНК был выбран подход исчерпывающего ферментативного гидролиза РНК до нуклеозидов с последующим анализом продуктов ВЭЖХ с двумя вариантами детекции (**Рисунок 7, Б**):

- 1) качественное выявление неканонических мономеров в составе РНК с помощью ВЭЖХ, сопряженной с тандемным масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС);
- 2) количественная оценка содержания неканонических мономеров в составе РНК с помощью ВЭЖХ с многоволновой УФ-детекцией.

Первый подход позволяет выявить неканонические мономеры в составе синтетических РНК даже при их низком содержании. Второй метод дает возможность оценить степень включения неканонических мономеров при неполном замещении одного или нескольких канонических нуклеотидов (Таблица 2).



**Рисунок 7.** Схема ферментативной обработки, очистки и анализа синтезированных аналогов мяоРНК.

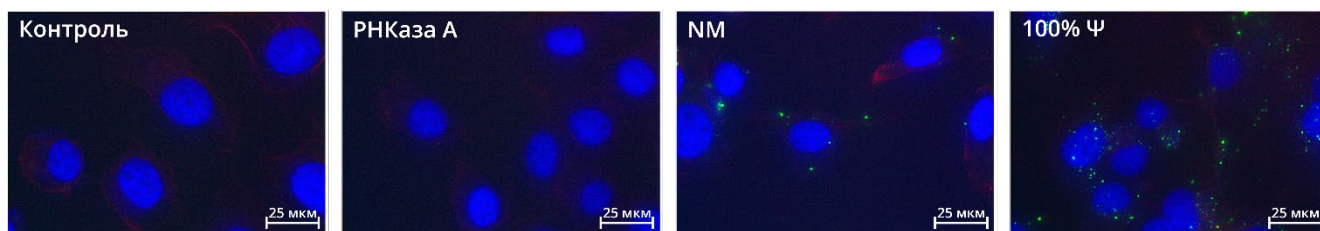
**Таблица 2.** Степень включения неканонических мономеров. Теоретический % ( $\text{modif.NTP/NTP} \times 100\%$ ) модификации соответствует процентному содержанию неканонического нуклеотида в транскрипционной смеси; реальный % – содержанию в структуре аналога.

Теоретический % модификации	0%	10%	25%	50%	70%	85%	100%
Реальный % модификации $\Psi$	0%	7%	17%	38%	-	-	100%
Реальный % модификации $m^5C$	0%	0%	25%	48%	-	-	100%
Реальный % модификации $m^6A$	0%	4%	11%	26%	56%	77%	100%

### 3.1.2 Влияние неканонических нуклеотидов на накопление и локализацию аналогов мяоРНК в клетках человека

Для оценки влияния неканонических нуклеотидов на эффективность накопления и локализацию аналогов мяоРНК в клетках человека были синтезированы флуоресцентные FITC-меченные аналоги мяоРНК, которые позволили визуализировать положение исследуемых немодифицированных и модифицированных РНК внутри клетки. Дополнительно ядра клеток были окрашены с помощью красителя Hoechst, а F-актин цитоскелета с помощью красителя Alexa Fluor 594 phalloidin.

В результате серии экспериментов на клеточном анализаторе IN Cell Analyzer 2000 было установлено, что FITC-меченные аналоги мяоРНК в комплексе с трансфицирующим агентом липофектаминоном RNAiMAX накапливаются в цитоплазме, а также в области ядер клеток карциномы яичников человека SK-OV-3 через 24 ч и 48 ч после трансфекции. Интересно, что трансфекция аналогов, содержащих в своей структуре псевдоуридин, приводила к увеличению интенсивности сигнала в зеленом спектре, что указывает на более эффективное накопление таких аналогов в клетках (**Рисунок 8**).

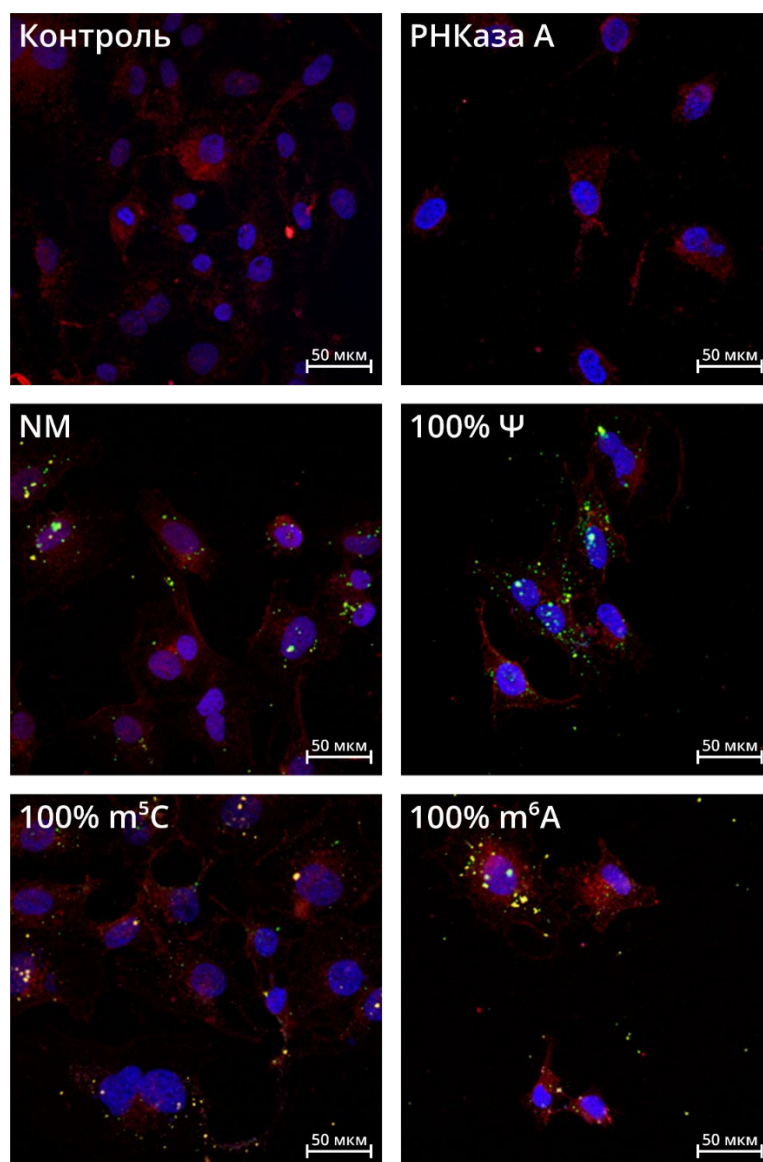


**Рисунок 8.** Локализация аналогов U35a мяоРНК в клетках SK-OV-3 через 48 ч инкубации после трансфекции. Изображения трансфицированных аналогами и контрольных клеток, полученные на клеточном анализаторе IN Cell Analyzer 2000, являются наложением трех каналов: зеленого (флуоресценция окраска аналогов мяоРНК с помощью FITC), синего (флуоресцентная окраска ядер с помощью Hoechst) и красного (флуоресцентная окраска F-актина с помощью Alexa Fluor 594 phalloidin). "Контроль" – клетки, обработанные только трансфицирующим агентом, отрицательный контроль; "РНКаза А" – аналоги перед трансфекцией были обработаны РНКазой А, положительный контроль; "NM" – немодифицированный аналог; "100% Ψ", "100% m<sub>5</sub>C", "100% m<sub>6</sub>A" – аналоги, синтезированные в транскрипционных смесях с полной заменой УТР на ΨТР, СТР на m<sub>5</sub>СТР, АТР на m<sub>6</sub>АТР, соответственно.

В результате серии экспериментов на клеточном анализаторе IN Cell Analyzer 2000 было установлено, что FITC-меченные аналоги мяоРНК в комплексе с трансфицирующим агентом липофектаминоном RNAiMAX накапливаются в цитоплазме, а также в области ядер клеток карциномы яичников человека SK-OV-3 через 24 ч и 48 ч после трансфекции. Интересно, что трансфекция аналогов, содержащих в своей структуре псевдоуридин, приводила к увеличению

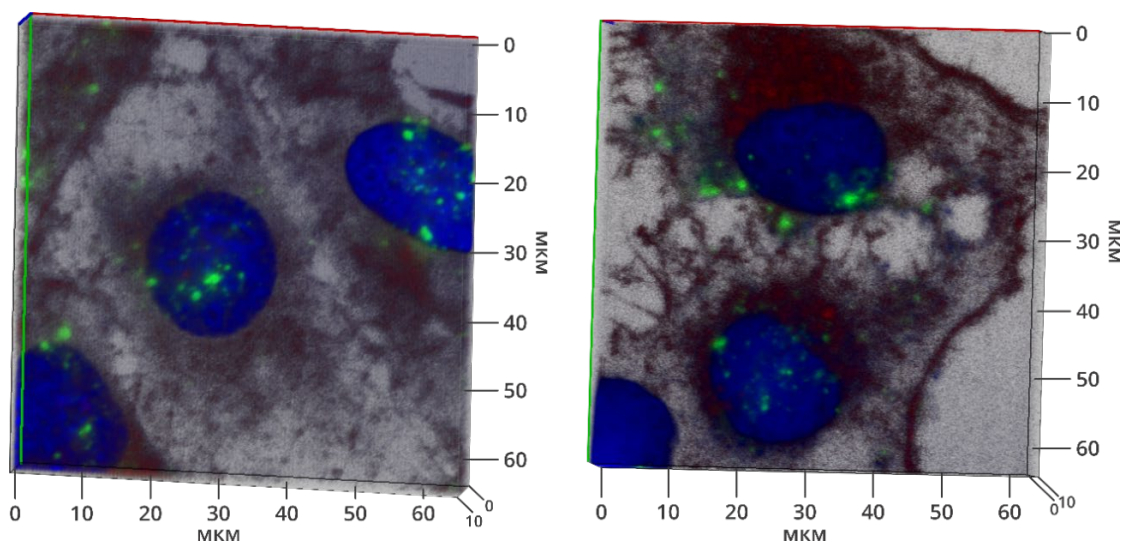
интенсивности сигнала в зеленом спектре, что указывает на более эффективное накопление таких аналогов в клетках (**Рисунок 8**).

Серия изображений в плоскости клеточных ядер, полученных с помощью конфокального микроскопа Axio Observer 1 ("Zeiss AG", Германия), позволила заключить, что аналоги мяоРНК, в том числе несущие в своей структуре модифицированные нуклеотиды, несмотря на преимущественное накопление в цитоплазматической части клеток, проникают и детектируются внутри ядер (**Рисунок 9**). На **Рисунок 10** приведено более детальное трехмерное изображение слоя микрофотографии толщиной 10 мкм в фокусе ядра, демонстрирующее наличие сигнала FITC-меченного аналога U25 мяоРНК, содержащего 100% Ψ, внутри клеточных ядер через 24 ч инкубации после трансфекции.



**Рисунок 9.** Локализация аналогов U25 мяоРНК в клетках SK-OV-3 через 24 ч инкубации после трансфекции. Изображения трансфицированных аналогами и контрольных клеток, полученные в результате конфокальной микроскопии, являются наложением трех каналов: зеленого

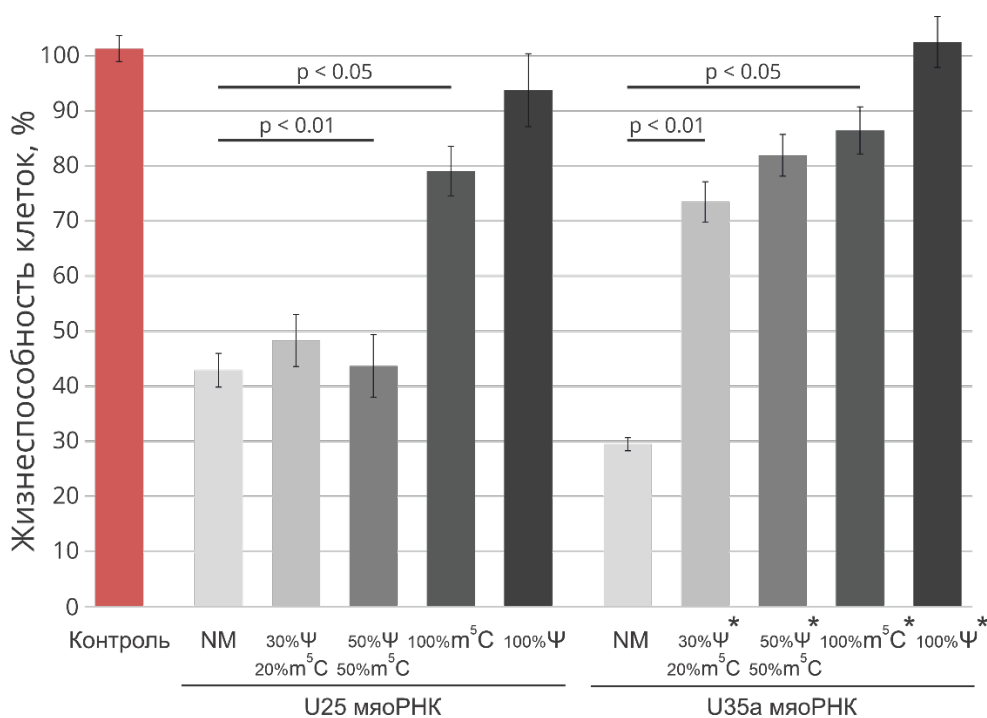
(флуоресценция окраска аналогов мяоРНК с помощью FITC), синего (флуоресцентная окраска ядер с помощью Hoechst) и красного (флуоресцентная окраска F-актина с помощью Alexa Fluor 594 phalloidin). "Контроль" – клетки, обработанные только трансфицирующим агентом, отрицательный контроль; "РНКза А" – аналоги перед трансфекцией были обработаны РНКазой А, положительный контроль; "NM" – немодифицированный аналог; "100% Ψ", "100% m<sub>5</sub>C", "100% m<sub>6</sub>A" – аналоги, синтезированные в транскрипционных смесях с полной заменой УТР на ΨТР, СТР на m<sub>5</sub>СТР, АТР на m<sub>6</sub>АТР, соответственно.



**Рисунок 10.** Увеличенное трехмерное изображение двух полей слоя конфокального микрофотографирования в фокусе ядра (толщина слоя – 10 мкм). Локализация аналога U25 мяоРНК, содержащего 100% Ψ, в клетках SK-OV-3 через 24 ч инкубации после трансфекции. Изображения трансфицированных аналогами и контрольных клеток, полученные в результате конфокальной микрофотографии, являются наложением трех каналов: зеленого (флуоресценция окраска аналогов мяоРНК с помощью FITC), синего (флуоресцентная окраска ядер с помощью Hoechst) и красного (флуоресцентная окраска F-актина с помощью Alexa Fluor 594 phalloidin).

### 3.1.3 Влияние неканонических нуклеотидов на цитотоксическое и антипролиферативное действие аналогов мяоРНК в клетках человека

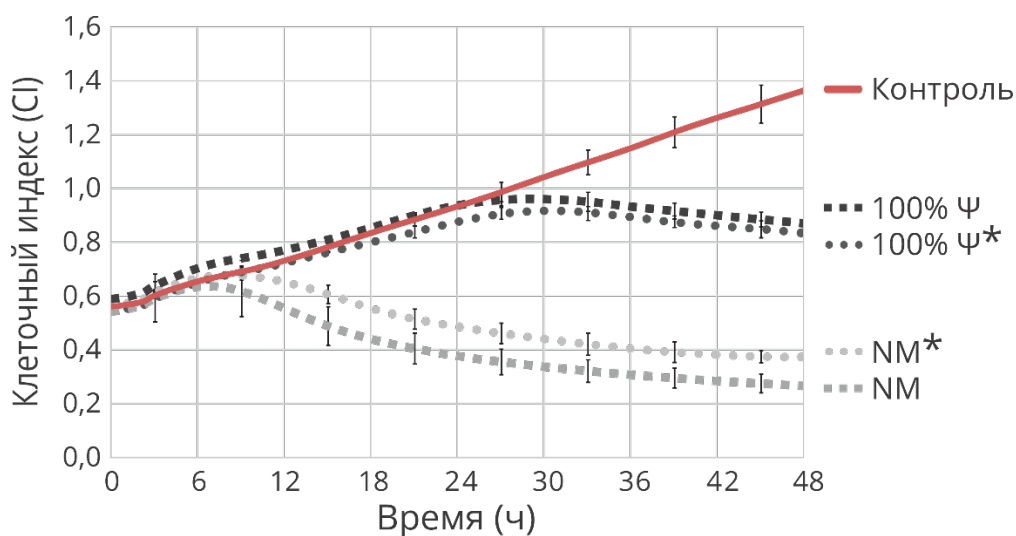
При анализе действия модифицированных аналогов мяоРНК на клетки человека (на модели клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7) было выявлено, что введение модификаций  $\Psi$  и  $m^5C$  существенно снижает уровень цитотоксического действия синтетических РНК. В частности, было установлено, что аналоги мяоРНК с частичной заменой канонических нуклеотидов на модифицированные 30%  $\Psi$  / 20%  $m^5C$ , 50%  $\Psi$  / 50%  $m^5C$  вызывают снижение жизнеспособности клеток на 50-60 %, аналоги с полной заменой  $C$  на  $m^5C$  – на 20%, а полная замена  $U$  на  $\Psi$  практически полностью отменяет цитотоксический эффект РНК на клетки при трансфекции в течение 48 часов (**Рисунок 11**). Введение в структуру аналогов кэпа на 5'-конец мяоРНК обеспечивает дополнительное снижение уровня цитотоксического действия. Влияние  $m^6A$ -модифицированных аналогов нкРНК на жизнеспособность клеток зависело от глубины модификации (данные не приведены); так, при дальнейшем увеличении глубины модификации после достижения 50 % наблюдался обратный эффект: усиление цитотоксического действия РНК.



**Рисунок 11.** Жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 под действием немодифицированных (NM) аналогов U25, U35a мяоРНК и аналогов с различной степенью модификации  $\Psi$  и  $m^5C$  (30%  $\Psi$ /20%  $m^5C$ ; 50%  $\Psi$ /50%  $m^5C$ ; 100%  $m^5C$ ; 100%  $\Psi$ ) через 48 ч после трансфекции. Аналоги, содержащие в своей структуре кэп на 5'-конце, обозначены "\*". "Контроль" – клетки, обработанные только трансфицирующим агентом. Отмечена статистически значимая разница между контрольной и трансфицированными группами клеток ("p < 0.05"; "p < 0.01"). Представлены средние значения с указанием стандартного отклонения, рассчитанного по данным трех независимых экспериментов.



Дополнительно было проведено сравнение действия модифицированных аналогов мяоРНК на пролиферацию клеток человека линии А549 с использованием многопараметрического анализатора клеточного роста RTCA iCELLigence ("Roche", Швейцария), измеряющего в реальном времени адгезионные свойства клеток. Было подтверждено, что полная замена U на  $\Psi$  обеспечивает наиболее существенное снижение цитотоксического действия аналогов мяоРНК на клетки человека, при этом уровень пролиферации трансфицированных клеток практически совпадал с контрольными в первые 24 часа (Рисунок 12).

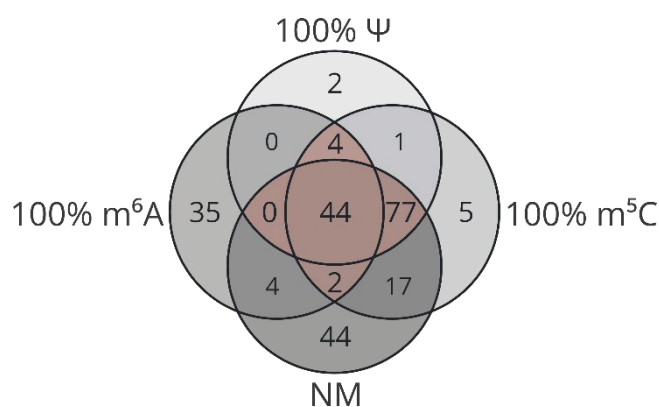


**Рисунок 12.** Пролиферация клеток А549 после трансфекции немодифицированными (NM) и  $\Psi$ -модифицированными (100% $\Psi$ ) аналогами U35a мяоРНК. Аналоги, содержащие в своей структуре кэп на 5'-конце, обозначены "\*". "Контроль" – клетки, обработанные только трансфицирующим агентом. Представлены кривые средних значений клеточного индекса, с указанием стандартного отклонения, рассчитанные по данным трех независимых экспериментов, полученные с помощью технологии iCELLigence.

### 3.1.4 Функциональный анализ изменений экспрессии генов в клетках человека, трансфицированных модифицированными аналогами мяоРНК

Для изучения механизмов действия аналогов мяоРНК и выявления эффектов присутствия модифицированных мономеров в их структуре проводили анализ дифференциальной экспрессии с применением метода массового параллельного секвенирования на платформе Illumina. Для этого клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7 трансфицировали немодифицированным аналогом U25 мяоРНК ("NM"), а также аналогами U25 мяоРНК, имеющими в структуре полную замену С на  $m^5C$  ("100%  $m^5C$ ") либо U на  $\Psi$  ("100%  $\Psi$ "), а также замену А на  $m^6A$  с глубиной 50 % ("50%  $m^6A$ "). В качестве контроля использовали клетки, инкубированные с трансфектантом – липофектамино. Через 24 часа после трансфекции выделяли суммарную РНК клеток, обогащали поли(А)+ фракцию, конструировали кДНК-библиотеки и проводили секвенирование на платформе Illumina (одностороннее прочтение 75 н.).

Дифференциальный анализ данных показал, что при трансфекции клеток MCF-7 немодифицированным аналогом U25 мяоРНК происходит достоверное повышение уровня 188 транскриптов, аналогом с полной заменой U на  $\Psi$  – 128 транскриптов, аналогом с полной заменой С на  $m^5C$  – 150 транскриптов и аналогом с частичной заменой А на  $m^6A$  – 89 транскриптов (FDR-adjusted p-value < 0.05, абсолютная величина  $\log_2(FC) > 2.0$ ) (Рисунок 13).



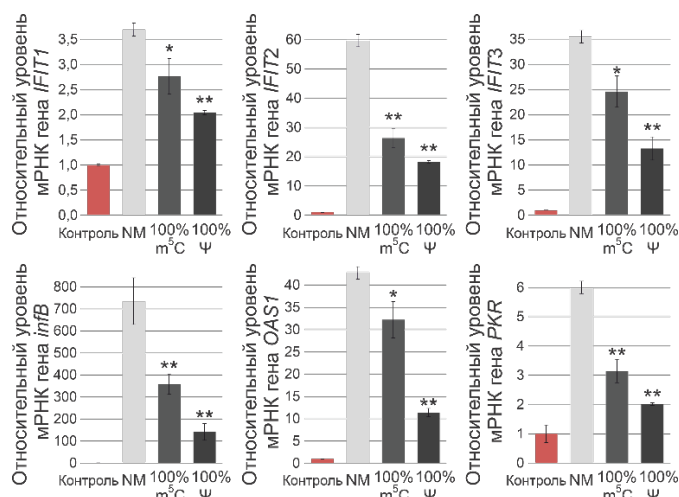
**Рисунок 13.** Сравнение наборов генов с повышенной экспрессией через 24 ч после трансфекции аналогов U25 мяоРНК в клетки MCF-7. Представлены диаграммы сравнения (диаграммы Венна) наборов генов, уровень мРНК которых достоверно отличается в контрольных и трансфицированных аналогами клетках (FDR-adjusted p-value < 0.05, абсолютная величина  $\log_2(FC) > 2.0$ ) по результатам анализа данных дифференциальной экспрессии.

Для определения общих процессов, которые активируются в клетках человека под действием аналогов C/D-боксов-РНК, мы провели функциональный анализ группы из 121 гена с повышенной экспрессией, попадающих в пересечение, как минимум, трех анализируемых образцов. Анализ проводили с использованием базы данных Gene Ontology. Список GO-терминов,



обогащенных генами с повышенной экспрессией включал: регуляцию продукции цитокинов, ответ на действие интерферонов I и II типов, негативную регуляцию репликации вирусов, пути паттерн-распознающих рецепторов, пути системы врожденного иммунного ответа, ответ клеток на стресс, активация путей поверхностных рецепторов клеток.

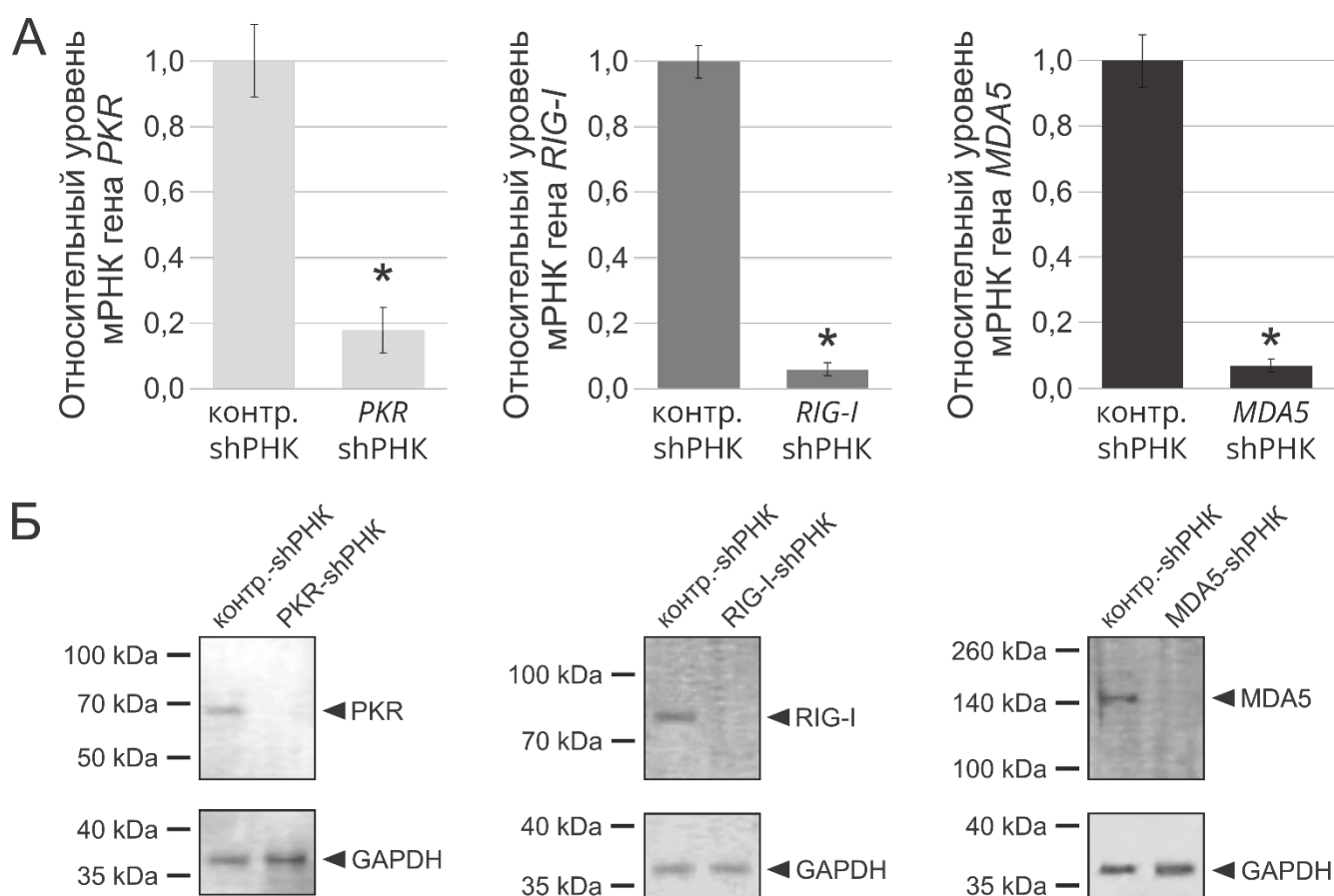
Методом ОТ-ПЦР была проведена верификация данных секвенирования (**Рисунок 14**). Было показано, что в клетках, трансфицированных как модифицированными, так и немодифицированным аналогами U25 мяоРНК, происходит увеличение уровня мРНК центральных генов РНК-зависимой активации системы врожденного иммунного ответа: *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *INFB*, *OAS1*, *PKR*. Введение модификаций m<sup>5</sup>C и Ψ снижает эффект активации интерферон-зависимых генов, что согласуется с количественными данными секвенирования. Наиболее значительные изменения в экспрессии после трансфекции клеток аналогами U25 РНК были выявлены для гена *INFB*. При этом введение модифицированных нуклеотидов снижало уровень активации в 2 и 5 раз в случае m<sup>5</sup>C и Ψ, соответственно. Аналогичные снижения в уровне активации наблюдали для других анализируемых генов (**Рисунок 14**).



**Рисунок 14.** Уровень мРНК генов врожденного иммунного ответа (*FIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *infB*, *OAS1*, *PKR*) в клетках MCF-7, трансфицированных немодифицированным (NM) аналогом U25 мяоРНК и аналогами, содержащими в структуре m<sup>5</sup>C и Ψ (100% m<sup>5</sup>C; 100% Ψ). "Контроль" – клетки, обработанные только трансфицирующим агентом. Отмечена статистически значимая разница между клетками, трансфицированными немодифицированным и модифицированными аналогами, ("\*" – p < 0.05; "\*\*" – p < 0.01). Представлены средние значения с указанием стандартного отклонения, рассчитанного по данным трех независимых экспериментов.

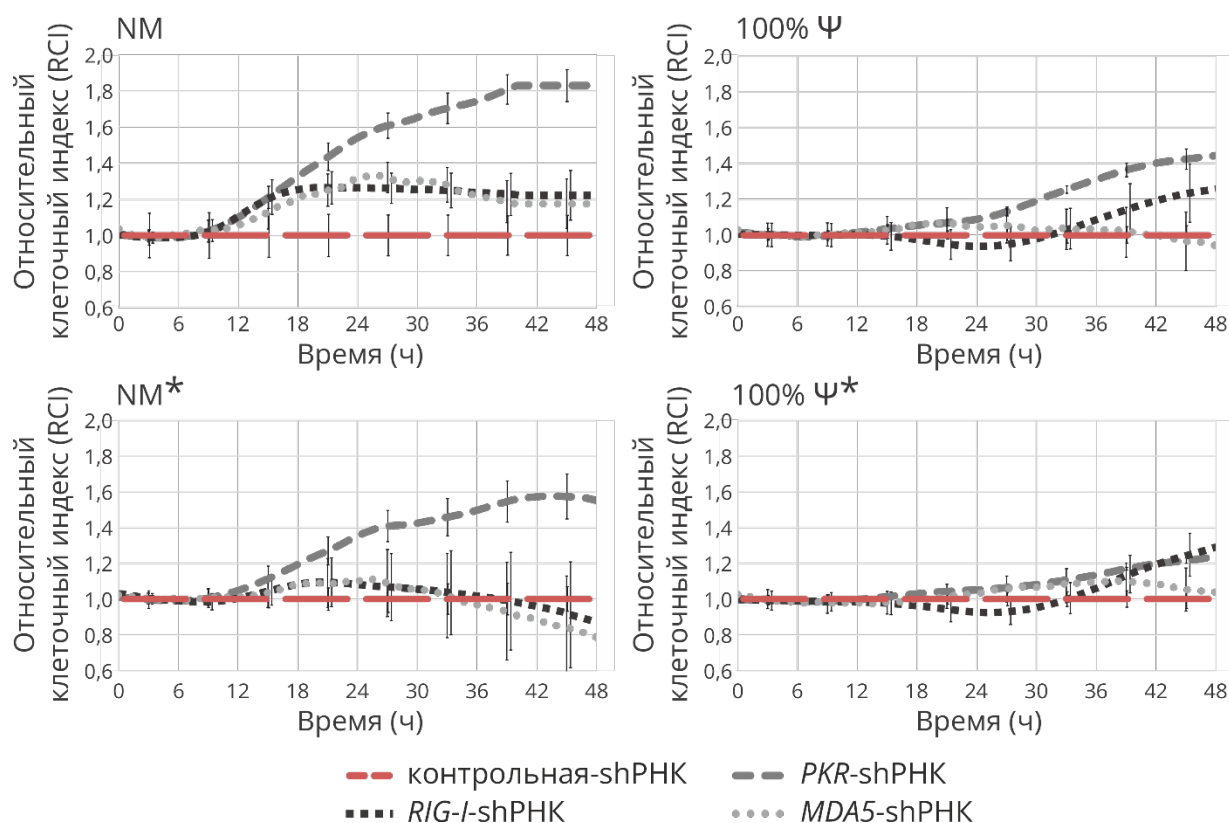
### 3.1.5 Влияние неканонических нуклеотидов на взаимодействие аналогов мяоРНК с РНК-рецепторами в клетках человека

Известно, что ключевыми участниками процессов активации врожденного иммунного ответа клеток под действием РНК являются внутриклеточные рецепторы PKR, RIG-I и MDA5. Для того, чтобы оценить вклад РНК-рецепторов в процесс активации интерферонового ответа в клетках под действием аналогов мяоРНК, использовали клеточные линии с селективным shРНК-нокаутом отдельных генов (**Рисунок 15**). Так как уровень иммуностимулирующей активности аналогов коррелировал с уровнем их цитотоксического действия на клетки человека, мы оценивали эффекты, связанные с подавлением каждого из рецепторов, по изменению пролиферации клеток с нокаутом после трансфекции исследуемых РНК.



**Рисунок 15.** Подавление экспрессии генов внутриклеточных рецепторов PKR, RIG-I и MDA5 в клетках A549. А. Уровень мРНК генов PKR, RIG-I и MDA5 в клетках A549, экспрессирующих контрольную и селективные shРНК, измеренный методом ОТ-ПЦР. Представлены средние значения с указанием стандартного отклонения, рассчитанного по данным трех независимых экспериментов. Отмечена статистически значимая разница ("\*" –  $p < 0.01$ ). Б. Уровень белков PKR, RIG-I, MDA5 и GAPDH в клетках A549, экспрессирующих контрольную и селективные shРНК, определённый методом Вестерн блот гибридизации.

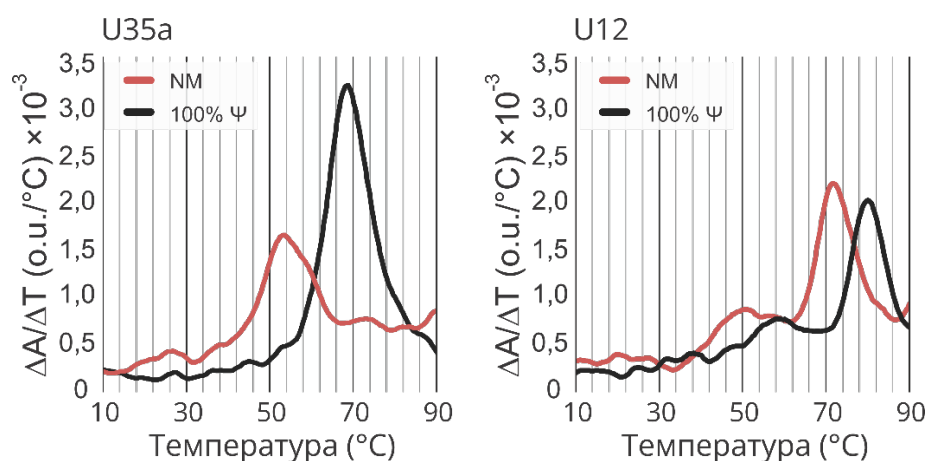
Было показано, что, во-первых, ключевым рецептором аналогов мяоРНК является PKR; во-вторых, модифицированные нуклеотиды ( $\Psi$ ) ингибируют взаимодействие синтетических РНК с внутриклеточными рецепторами, что прямо согласуется с литературными данными; в-третьих, дополнительное наличие кэпа в структуре аналогов мяоРНК обеспечивает усиление эффекта подавления иммуностимулирующей активности (**Рисунок 16**).



**Рисунок 16.** Относительная пролиферация клеток A549 с shРНК-опосредованным нокаутом генов *PKR*, *RIG-I* и *MDA5* после трансфекции немодифицированными (NM) и  $\Psi$ -модифицированными (100%  $\Psi$ ) аналогами U25 мяоРНК. Аналоги, содержащие в своей структуре кэп на 5'-конце, обозначены "\*". "Контроль" – клетки, обработанные только трансфицирующим агентом. Представлены кривые средних значений относительного клеточного индекса, с указанием стандартного отклонения, рассчитанного по данным трех независимых экспериментов, полученные с помощью технологии iCELLigence. Относительное значение рассчитано по отношению к данным, полученным для линии клеток, экспрессирующей контрольную shRNA.

Для объяснения наблюдаемого эффекта, связанного с модифицированными нуклеотидами, были проанализированы термодинамические характеристики структуры синтетических аналогов нкРНК: мяоРНК U35a, мяРНК U12 (малая ядерная РНК, дополнительный контроль влияния класса нкРНК). Были получены профили плавления вторичной структуры интактных и модифицированных РНК с использованием метода термической денатурации с оптической детекцией. Было установлено, что  $\Psi$  значительно

стабилизирует пространственную структуру аналогов нкРНК (**Рисунок 17**). Полученный результат согласуется с литературными данными о вкладе псевдоуридина в термодинамическую стабильность элементов вторичной структуры РНК [71]. На основании описанных данных был сделан вывод о том, что внутримолекулярные модифицированные мономеры изменяют термодинамическую стабильность элементов вторичной структуры РНК, что нарушает взаимодействие с РНК-рецепторами и обеспечивает снижение иммуностимулирующей активности анализируемых РНК. Представленный вывод согласуется с литературными данными [72].



**Рисунок 17.** Профили денатурации ("плавления") вторичной структуры аналогов U35a мяоРНК и U12 мяРНК, содержащих только канонические мономеры (NM), и аналогов с полностью замещенным уридином на псевдоуридин (100%  $\Psi$ ) в буфере PBS.

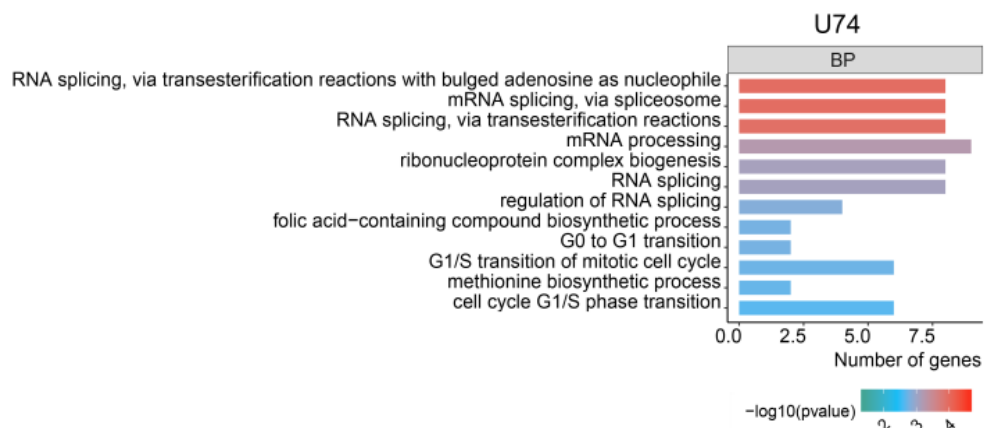
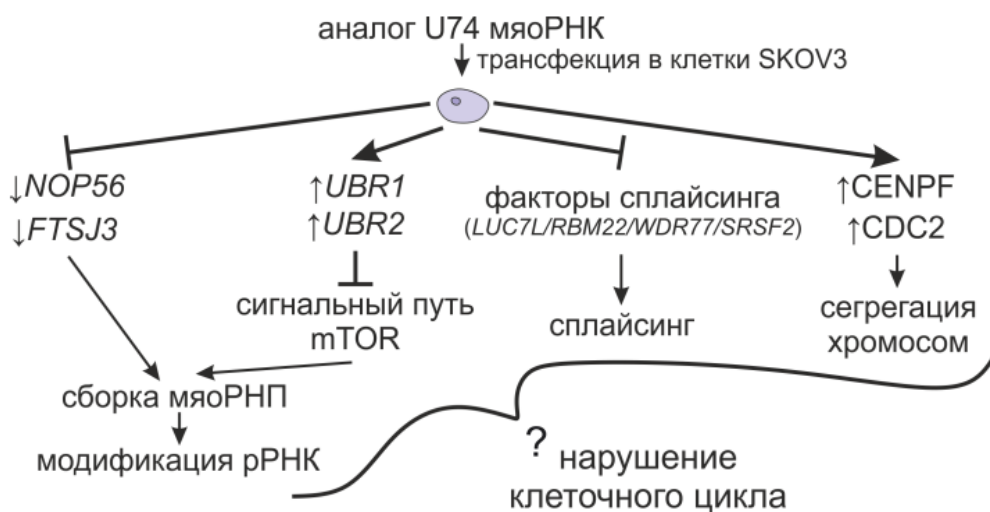
Таким образом, в качестве основного механизма действия аналогов мяоРНК на выбранных клеточных моделях был выявлен механизм активации врожденного иммунного ответа. При этом ключевым фактором, обеспечивающим значительный уровень активации и сопутствующее цитотоксическое воздействие, является РНК-активируемый внутриклеточный рецептор PKR. Введение модифицированных нуклеотидов, таких как  $\Psi$  и  $m^5\text{C}$ , позволяет значительно снизить уровень активации неспецифического иммунного ответа за счет изменения термодинамической стабильности структуры РНК и, как следствие, нарушения взаимодействия с внутриклеточными РНК-активируемыми рецепторами.

### ***3.1.6 Функциональный анализ данных секвенирования поли(А)-фракции клеток человека SK-OV-3, трансфицированных аналогами U74 и U35a мяоРНК***

Нами было произведено высокопроизводительное секвенирование поли(А)-фракции суммарной РНК из клеток аденокарциномы яичника SK-OV-3 через 48 ч. после трансфекции аналогами U74 и U35a мяоРНК в трех биологических повторах. В качестве контроля использовались клетки, трансфицированные фрагментом мРНК гена GFP (89 н.), а также клетки SK-OV-3, трансфицированные липофектаминам RNAiMAX без добавления какой-либо РНК.

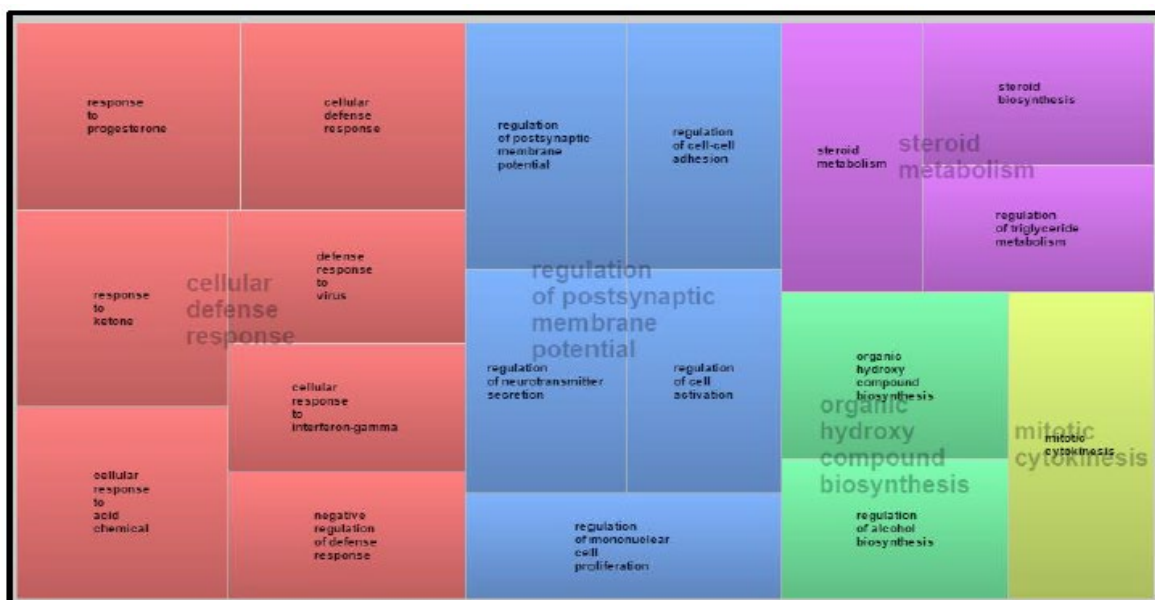
Для функциональной аннотации дифференциально экспрессирующихся генов были использованы базы данных Gene Ontology, KEGG, Reactome. Первым существенным результатом функционального анализа является отсутствие активации интерферон-чувствительных сигнальных путей. Активация неспецифической системы врожденного иммунного ответа клеток человека является нежелательным, но характерным признаком трансфекции синтетических РНК в клетки человека. Полученные данные секвенирования РНК указывают на корректность выбора модификаций в структуре РНК-конструкций на предыдущих этапах исследования. Отсутствие активации интерферон-чувствительных сигнальных путей даёт возможность выявлять специфичные пути функционирования каждого типа РНК.

В наборе генов со сниженной экспрессией после трансфекции аналогом U74 мяоРНК были выявлены обогащения по группам генов с аннотацией "сплайсинг РНК" и "РНК-процессинг" (**Рисунок 18, А**). По результатам анализа данных секвенирования можно предположить, что U74 имеет пути воздействия на аппарат сплайсинга пре-мРНК клеток человека. Общими путями регуляции 14 генов из групп, связанных с процессингом РНК, найдены контроль транскрипции эстроген-зависимыми факторами ER1 и ER2 (6 из 14 генов) и контроль стабильности и трансляции посредством микроРНК16-5p (6 из 14). В группу регуляции процессинга нкРНК и сборки рибонуклеопротеидных комплексов входит ген NOP56. Регуляция уровня этого гена выявляет специфичное узнавание представителя класса мяоРНК и глобальную регуляцию уровня C/D-бокс-РНК в клетках. Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что уровень отдельных мяоРНК может влиять на активность факторов сплайсинга и сборку мяоРНК-зависимых РНП [73]. Нарушения в процессах созревания пре-мРНК и пре-рРНК могут привести к нарушению клеточного цикла. Совокупная предполагаемая схема воздействия аналога U74 мяоРНК на раковые клетки SK-OV-3 представлена на **Рисунок 18, Б**.

**А****Б**

**Рисунок 18.** (А) Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) кластеры генов, дифференциально пониженные в клетках SK-OV-3, трансфицированных аналогом U74 мяоРНК, относительно контрольных клеток. Данные обогащения получены с использованием базы данных Gene Ontology Biological Processes (BP). (Б) Гипотетическая схема действия аналога U74 мяоРНК на клетки SK-OV-3 по результатам функционального анализа дифференциальной экспрессии генов.

После трансфекции аналога U35a в клетки SK-OV-3 наблюдаются снижение уровня экспрессии в группах, связанных с реакцией клеточной защиты, биосинтезом органических гидрокси-соединений, митотическим цитокинезом и метаболизмом липидов (**Рисунок 19**). Ранее было показано участие U35a, как одной из мяоРНК, кодируемой в локусе *gpL13a*, в процессах липотоксического и окислительного стресса клеток млекопитающих [68]. Интересно, что при стрессовом воздействии U35a РНК меняет локализацию и, по-видимому, участвует в регуляции клеточных процессов в цитоплазме.



**Рисунок 19.** Иерархическое отображение функциональных кластеров, объединяющих GO-группы, обогащенные генами с пониженной экспрессией в клетках SK-OV-3 под действием аналога U35a мяоРНК (получены с помощью сервиса REVIGO) по данным транскриптомного анализа дифференциальной экспрессии генов.

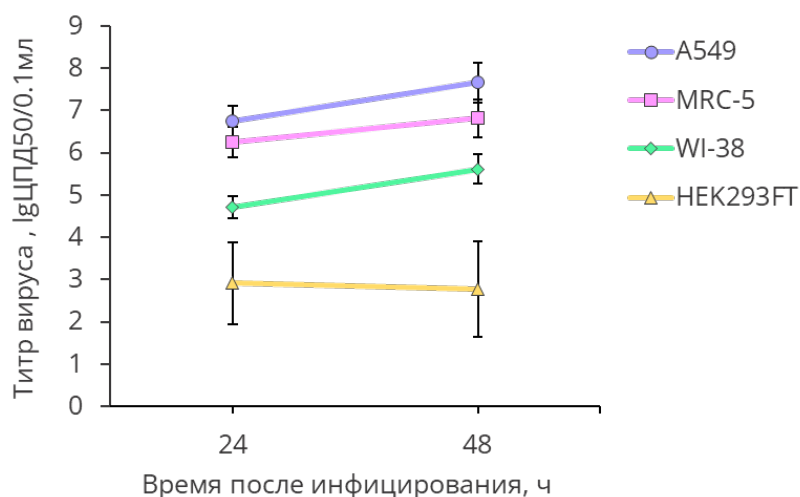
Таким образом, применение модифицированных нуклеотидов, с одной стороны, позволяет корректировать свойства коротких регуляторных РНК и, с другой стороны, дает возможность получать новую информацию о их функционировании.

## РАЗДЕЛ 3.2. Анализ паттерна экспрессии мРНК в клетках человека A549 в условиях инфекции вирусом гриппа А

### 3.2.1 Выбор модельного штамма вируса гриппа и модельной клеточной линии

На основе литературных данных и ранее полученных экспериментальных данных, для изучения роли малых ядрышковых РНК в регуляции инфекции клеток человека вирусом гриппа А в качестве модельного вируса был выбран лабораторный штамм вируса гриппа *A/PuertoRico/8/1934 serotina H1N1* (коллекция вирусов ФГБУ "НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева"). Выбранный штамм обладает высокой скоростью роста и высокой множественностью инфекции [74]. Более того, лабораторный штамм A/PuertoRico/8/1934 экспрессирует гены гемагглютинаина подтипа H1 и нейраминидазы подтипа N1, характерные вирусам испанского гриппа и свиного гриппа, ассоциированным с глобальными пандемиями 1918 г. и 2009 г., соответственно [75,76].

С целью выбора модельной клеточной линии, на базе ФГБУ "НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева" были подготовлены препараты клеток A549, MRC-5, WI-38, HEK293FT, зараженных вирусом гриппа A/PuertoRico/8/1934 (H1N1) в дозе 1 ТИД<sub>50</sub>/клетку, время инкубации – 24 ч и 48 ч; а также препараты контрольных неинфицированных клеток. По результатам кинетики накопления вируса гриппа было показано, что клеточные линии A549 и MRC-5 обладают наибольшей чувствительностью к заражению выбранным штаммом (Рисунок 20). Препараты клеток были использованы для выделения фракции поли(А)<sup>+</sup> РНК, последующего конструирования кДНК-библиотек и высокопроизводительного секвенирования.



**Рисунок 20.** Кинетика накопления вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) в клеточных линиях A549, MRC-5, WI-38, и HEK293FT. В указанные моменты времени после инфицирования титр вируса определяли методом титрования вирусов по 50% инфекционному действию в клетках MDCK. Приведены средние значения ( $\pm$  стандартное отклонение), рассчитанные на



основе трех независимых экспериментов. (1 ЦПД50 – доза вируса, вызывающая цитопатический эффект в 50% пробирок с зараженной культурой клеток).

На основе полученных данных высокопроизводительного секвенирования был проведен анализ дифференциальной экспрессии генов в четырех кандидатных линиях: A549, MRC-5, WI-38, HEK293FT – в условиях заражения вирусом гриппа A/PuertoRico/8/1934. Первичный биоинформационный анализ включал контроль качества; удаление адаптеров, прочтений низкого качества и прочтений, комплементарных рРНК; картирование прочтений на комбинированный эталонный геном, объединяющий геном человека hg38 и геном вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934; а также подсчет прочтений для каждого гена (Таблица 3). Процент уникально картированных прочтений для всего пула библиотек варьировался от 88 до 93 %. Увеличение времени инкубации инфицированных клеток коррелировало с ростом числа прочтений, картированных на геном вируса гриппа.

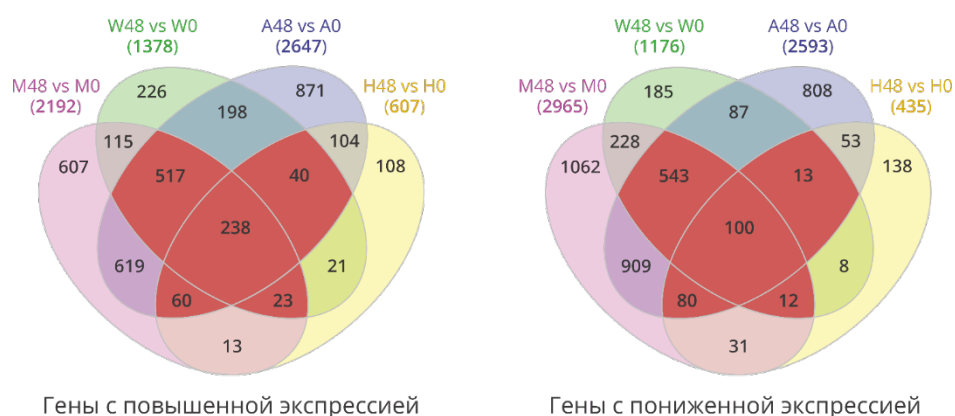
**Таблица 3.** Статистика результатов секвенирования и первичного биоинформационного анализа. Образцы pA\_A549\_0h, pA\_A549\_24h, pA\_A549\_48h; pA\_MRC5\_0h, pA\_MRC5\_24h, pA\_MRC5\_48h; pA\_WI38\_0h, pA\_WI38\_24h, pA\_WI38\_48h; pA\_HEK293\_0h, pA\_HEK293\_48h включают два биологических повтора (две библиотеки поли(A)+ РНК) для каждой временной точки (неинфицированные (0h) и инфицированные вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/1934 после инкубации в течении 24 ч (24h) и 48 ч (48h)) для клеток A549, MRC-5, WI-38, HEK293FT. В таблице представлено количество исходных прочтений; прочтений после фильтрации (обрезка адаптеров, удаление прочтений низкого качества, удаление фрагментов рРНК); прочтений, уникально картированных на геном человека (hg38) и геном вируса гриппа A/PuertoRico/8/1934.

Секвенирование фракции поли(A)+ РНК

Образец	Биологический повтор	Количество прочтений		Количество уникально картированных прочтений на геном:	
		исходное	после фильтрации	человека (hg38)	вируса гриппа A/PuertoRico/8/1934
pA_A549_0h	pA_A549_0h_1	12 693 199	12 469 797	11 500 381	35
	pA_A549_0h_2	10 610 878	10 411 687	9 598 270	323
pA_A549_24h	pA_A549_24h_1	11 457 333	11 015 053	9 102 079	994 175
	pA_A549_24h_2	11 097 112	10 621 125	8 547 535	1 139 113
pA_A549_48h	pA_A549_48h_1	11 413 406	10 928 105	7 701 098	2 443 654
	pA_A549_48h_2	11 604 763	11 135 881	7 732 196	2 597 907
pA_MRC5_0h	pA_MRC5_0h_1	11 280 839	11 227 760	10 453 283	36
	pA_MRC5_0h_2	11 576 120	11 528 175	10 709 067	1 098
pA_MRC5_24h	pA_MRC5_24h_1	11 345 800	11 263 642	9 268 065	855 670
	pA_MRC5_24h_2	12 050 509	11 962 345	9 857 356	905 815
pA_MRC5_48h	pA_MRC5_48h_1	11 365 373	11 239 300	8 696 358	1 331 111

	pA_MRC5_48h_2	11 502 684	11 371 362	9 008 729	1 349 452
pA_WI38_0h	pA_WI38_0h_1	13 763 402	13 705 962	12 630 515	40
	pA_WI38_0h_2	13 894 694	13 835 843	12 746 525	11
pA_WI38_24h	pA_WI38_24h_1	13 578 991	13 513 180	11 671 289	720 057
	pA_WI38_24h_2	13 085 346	13 027 186	11 395 905	621 152
pA_WI38_48h	pA_WI38_48h_1	13 888 078	13 819 890	11 526 366	1 304 546
	pA_WI38_48h_2	14 138 005	14 019 688	11 221 177	1 721 069
pA_HEK_0h	pA_HEK_0h_1	13 025 201	12 962 633	11 753 292	0
	pA_HEK_0h_2	13 631 515	13 571 750	12 326 854	301
pA_HEK_48h	pA_HEK_48h_1	14 097 052	14 029 857	12 319 834	342 609
	pA_HEK_48h_2	13 472 661	13 392 617	11 150 695	768 135

Для каждой клеточной линии были выявлены дифференциально экспрессируемые гены, уровень мРНК которых значимо изменялся (FDR-adjusted p-value < 0.001; абсолютная величина  $\log_2(FC) > 1$ ) в клетках, зараженных вирусом гриппа А в сравнении с контрольными неинфицированными клетками. С увеличением времени инкубации после инфекции вирусом для всех кандидатных линий наблюдалось увеличение генов с изменившейся экспрессией. Так, через 48 ч после заражения было выявлено 2192, 1378, 2647, 607 генов с повышенной экспрессией и 2965, 1176, 2593, 435 генов с пониженной экспрессией в клеточных линиях A549, MRC-5, WI-38 и HEK293FT, соответственно. По результатам сравнения списков генов с повышенной и пониженной экспрессией между 4-мя клеточными линиями, были выявлены как общие, так и индивидуальные группы генов (**Рисунок 21**).



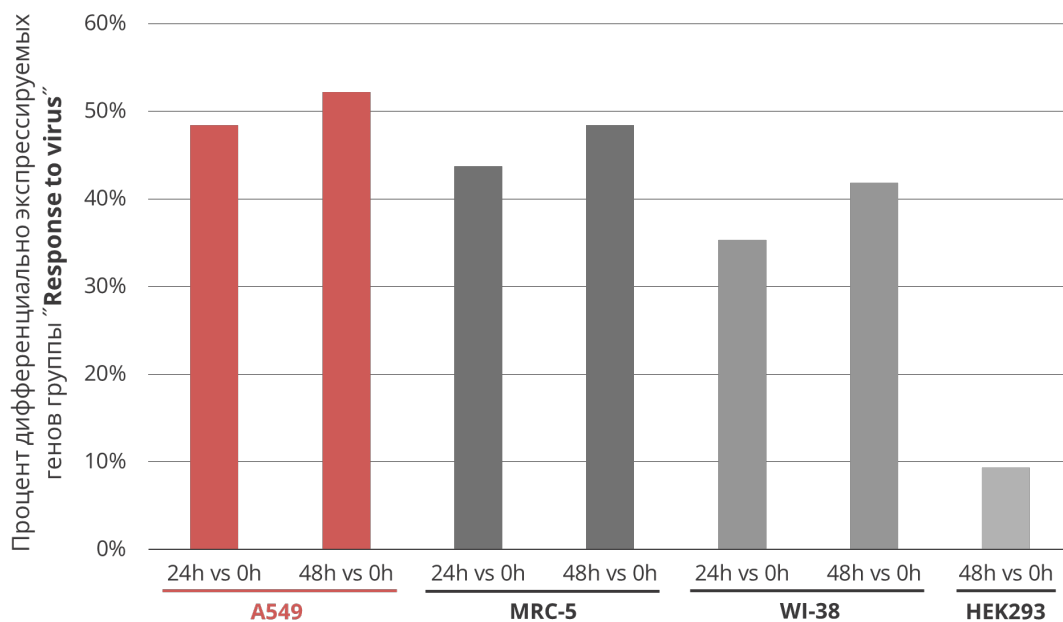
**Рисунок 21.** Сравнение наборов генов с повышенной и пониженной экспрессией (FDR-adjusted p-value < 0.001; абсолютная величина  $\log_2(FC) > 1$ ) через 48 ч после заражения вирусом гриппа А в клеточных линиях MRC-5 (M48vsM0), WI-38 VA-13 (W48vsW0), A549 (A48vsA0) и HEK293FT (H48vsH0). Красным обозначены группы генов, значения которых имеют пересечения минимум для 3-х клеточных линий.

Группа из 1626 "общих" генов, имеющих пересечения минимум для 3-х клеточных линий (на **Рисунок 21** обозначена красным), была использована для поиска обогащенных функциональных кластеров в базах данных "GO Biological Process 2021" и "Reactome 2016" с помощью онлайн-сервиса Enrichr. Выявленные функциональные кластеры: "Сигнальный путь интерферона I типа" (GO:0060337); "Передача сигнала интерферона альфа/бета" (R-HSA-909733); "Защитный ответ на вирус" (GO:0051607); "Негативная регуляция репликации вирусного генома" (GO:0045071); "Метаболизм глюкозы" (R-HSA-70326) – характерны при клеточном ответе на заражение РНК-содержащим вирусом (**Рисунок 22**) [77–79].



**Рисунок 22.** Функциональный анализ общей группы генов с дифференциальной экспрессией через 48 ч после заражения вирусом гриппа А. Базы данных "GO Biological Process 2021" и "Reactome 2016". Длина горизонтального отрезка отражает степень обогащения отдельной функциональной группы, цвет – степень достоверности.

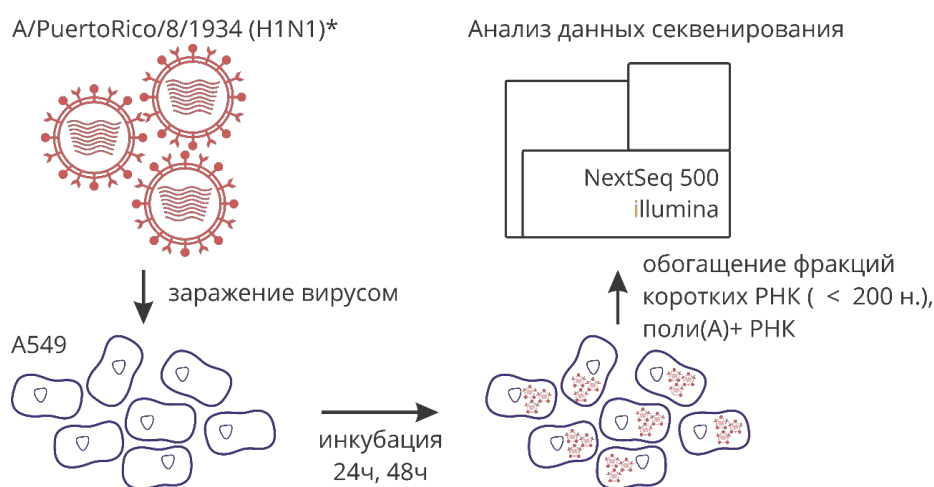
Таким образом, по результатам функционального анализа генов с дифференциальной экспрессией все четыре кандидатные клеточные линии демонстрировали признаки развития вирусной инфекции. Основываясь на том, что наибольшая чувствительность к заражению штаммом A/PuertoRico/8/1934 (H1N1), максимальное количество генов с дифференциальной экспрессией, а также наибольший уровень обогащения функциональной группы "Ответ на вирус" (GO:0009615) (**Рисунок 23**) были характерны для клеток A549, *клеточная линия аденокарциномы легкого человека A549 была выбрана в качестве модельной* для проведения дальнейших исследований. Более того, данная линия широко встречается в научной литературе, посвященной инфекциям вирусами гриппа. Например, на аналогичной модели (A549; A/PuertoRico/8/1934) ранее были исследованы механизмы микроРНК-опосредованной интерференции, регуляции альтернативного сплайсинга, процесса отключения хозяина в условиях заражения [77,80–82].



**Рисунок 23.** Сравнение уровня обогащения функциональной группы "Response to virus" базы данных Gene Ontology дифференциально экспрессируемыми генами внутри пар сравнения (24 часа и 48 ч после заражения вирусом гриппа А против неинфицированных контрольных клеток (24h vs 0h, 48h vs 0h) для клеточных линий A549, MRC-5, WI-38, HEK293FT.

### 3.2.2 Анализ дифференциальной экспрессии мяоРНК в условиях инфекции вирусом гриппа А

Для выявления паттерна экспрессии малых ядершковых РНК в условиях инфекции вирусом гриппа А, используя ранее подготовленные препараты клеток А549, зараженных штаммом А/PuertoRico/8/1934, была выделена фракция коротких РНК (менее 200 н.). На её основе были сконструированы 6 кДНК-библиотек для высокопроизводительного секвенирования (два биологических повтора каждой временной точки: неинфицированные клетки (0 ч) и клетки, зараженные вирусом гриппа (инкубация 24 ч и 48 ч)). Полученная информация об уровне коротких форм РНК позволила дополнить данные об уровне поли(А)+ РНК и более систематически исследовать изменения экспрессии мяоРНК в клетках, инфицированных вирусом гриппа А (**Рисунок 24**).



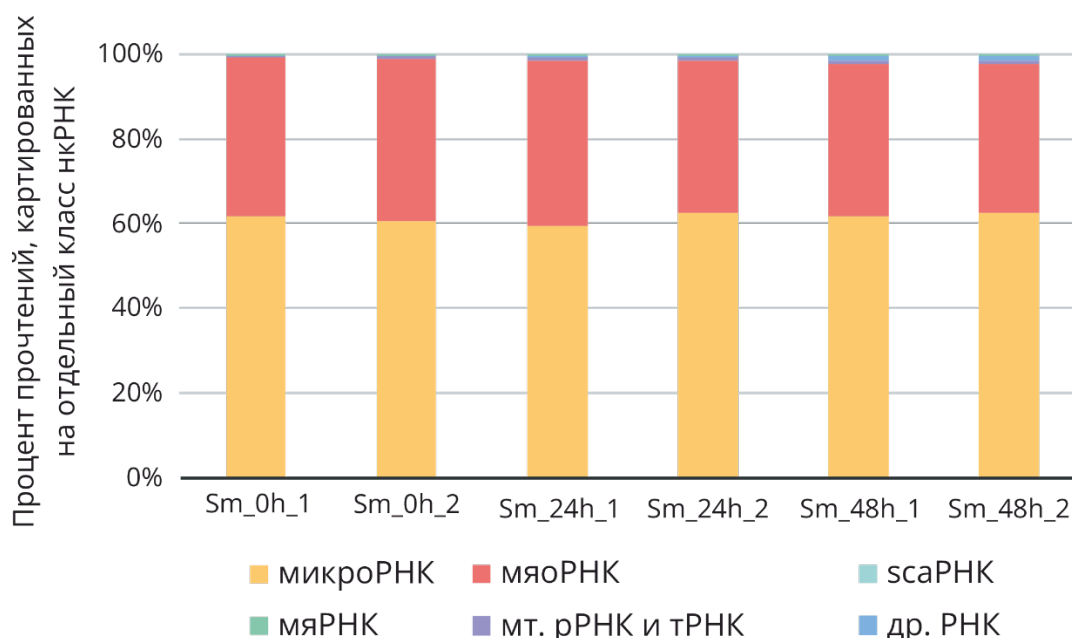
**Рисунок 24.** Обобщающая схема ключевого эксперимента по анализу паттерна экспрессии мяоРНК в клетках человека А549 в условиях инфекции вирусом гриппа А

В результате секвенирования кДНК-библиотек фракции коротких РНК было получено в среднем около 6 млн прочтений на каждый биологический повтор. Процессинг “сырых” данных включал стандартную последовательность этапов оценки качества, фильтрации, картирования прочтений на комбинированный референсный геном (геном человека (hg38) и геном вируса гриппа (А/Puerto Rico/8/1934)) и подсчета прочтений для каждой нкРНК (**Таблица 4**). Процент уникально картированных прочтений для всего пула библиотек фракции коротких РНК варьировался от 50 до 68 %. Увеличение времени инкубации инфицированных клеток коррелировало с ростом числа прочтений, картированных на геном вируса гриппа А, аналогично данным секвенирования фракции поли(А)+ РНК. Большая часть прочтений была сопоставлена с генами микроРНК (от 59,6 до 62,5 % всех картированных прочтений) и мяоРНК (от 35,5 до 39,2 % всех картированных прочтений) (**Рисунок 25**).

**Таблица 4.** Статистика результатов секвенирования и первичного биоинформационного анализа. Образцы Sm\_A549\_0h, Sm\_A549\_24h, Sm\_A549\_48h включают два биологических повтора (две библиотеки фракции коротких РНК) для каждой временной точки (неинфицированные (0h) и инфицированные вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/1934 после инкубации в течение 24 ч (24h) и 48 ч (48h)) для клеток A549. В таблице представлено количество исходных прочтений; прочтений после фильтрации (обрезка адаптеров, удаление прочтений низкого качества, удаление фрагментов рРНК); прочтений, уникально картированных на геном человека (hg38) и геном вируса гриппа A/PuertoRico/8/1934.

Секвенирование фракции коротких РНК

Образец	Биологический повтор	Количество прочтений		Количество уникально картированных прочтений на геном:	
		исходное	после фильтрации	человека (hg38)	вируса гриппа A/PuertoRico/8/1934
Sm_A549_0h	Sm_0h_1	5 876 508	4 545 646	3 772 700	0
	Sm_0h_2	6 455 310	5 254 025	4 371 753	0
Sm_A549_24h	Sm_24h_1	6 875 150	5 463 196	4 355 639	59 786
	Sm_24h_2	6 405 753	5 092 667	3 943 561	57 272
Sm_A549_48h	Sm_48h_1	6 551 298	4 956 558	3 246 757	69 033
	Sm_48h_2	6 095 045	4 509 835	2 957 440	63 165

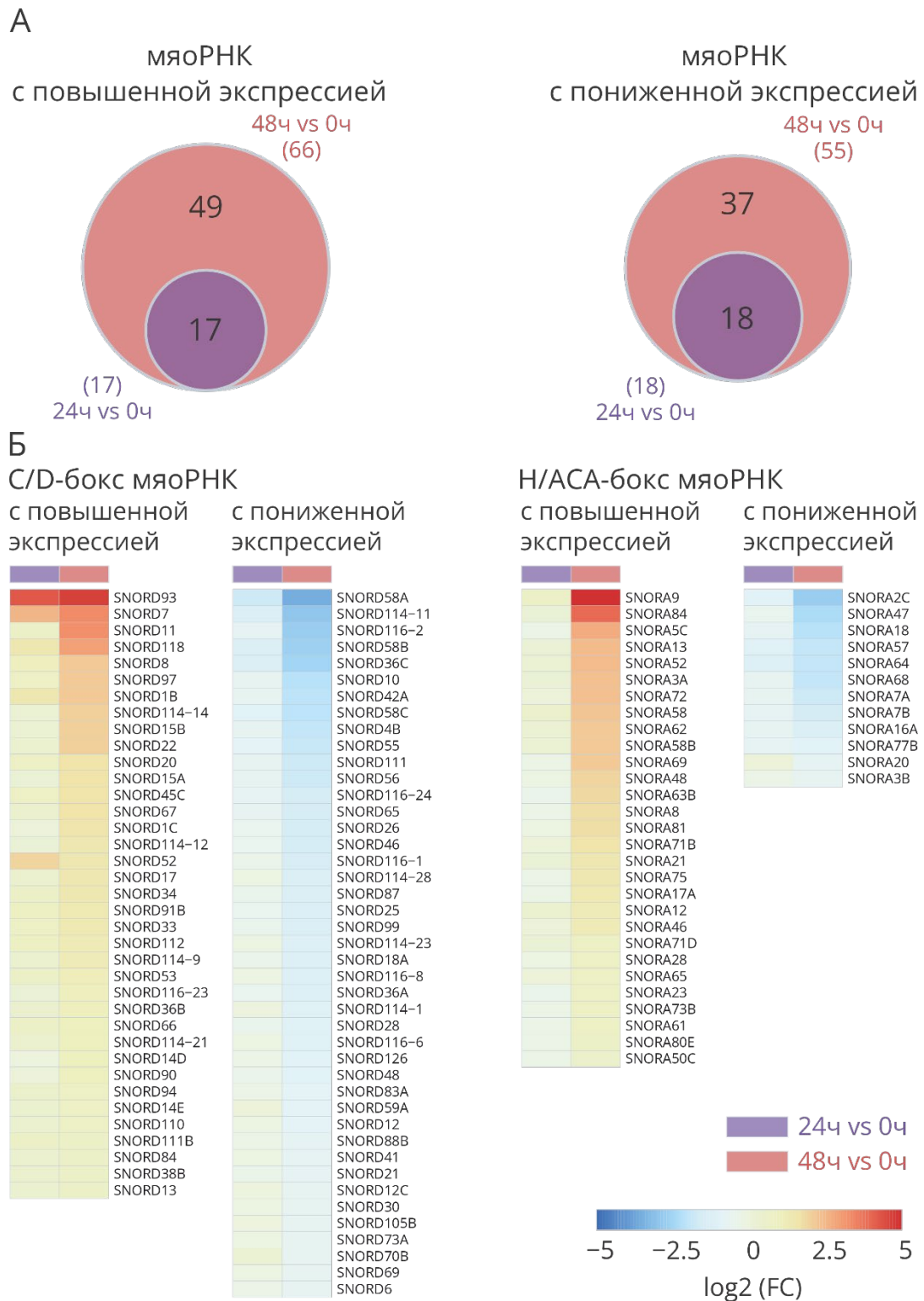


**Рисунок 25.** Процент прочтений, картированных на гены отдельных классов малых некодирующих РНК (микроРНК, мяоРНК, scaРНК, мяРНК, мт. рРНК и тРНК, др. РНК), для кДНК-библиотек фракции коротких РНК.

Дифференциальный анализ экспрессии малых некодирующих РНК выявил значительное количество мяоРНК, уровень которых значимо повышался или снижался в ответ на инфекцию вирусом гриппа А (FDR-adjusted p-value < 0.05, абсолютная величина  $\log_2(\text{FC}) > 0.58$ ). Было установлено, что с увеличением продолжительности инкубации после заражения в клетках происходит повышение как *уровня* изменений, так и *количества* уникальных дифференциально экспрессируемых C/D-боксов и H/ACA-боксов РНК (SNORD и SNORA) (**Рисунок 26**). Так, через 48 ч уровень 38 C/D-боксов и 29 H/ACA-боксов РНК повышался, уровень 43 C/D-боксов и 13 H/ACA-боксов РНК понижался.

В настоящее время известно, что экспрессия большинства нкРНК нарушается в ответ на инфекцию вирусом гриппа [83,84]. Тем не менее количество исследований, посвященных регуляции экспрессии мяоРНК в инфицированных клетках, очень ограничено. Ранее анализ данных высокопроизводительного секвенирования транскриптома ткани легких мышей выявил около 30 малых РНК, перекрывающихся с аннотированными мяоРНК, экспрессия которых значимо изменялась при заражении мышей вирусами гриппа А и SARS-CoV [85]. В другом недавнем исследовании с применением метода генной ловушки инсерционного мутагенеза для случайной инактивации клеточных генов было показано, что 83 гена мяоРНК потенциально важны для репликации вируса гриппа. Независимое подавление мяоРНК, кодируемых внутри генов *RPS11* (SNORD35B), *SNHG3* (SNORA73A, SNORA73B) и *SNHG1* (SNORD22, SNORD25, SNORD26, SNORD27, SNORD28, SNORD29, SNORD30, SNORD31), ингибировало развитие инфекции, вызванной вирусом гриппа А [86]. Интересно, что по результатам нашего эксперимента относительный уровень экспрессии SNORD22 увеличивался в 4 раза, в то время как уровни SNORD26 и SNORD28 снижались в 2-3 раза в клетках, инфицированных вирусом гриппа, по сравнению с неинфицированными клетками. Наблюдаемые изменения экспрессии мяоРНК указывают на то, что некоторые мяоРНК, необходимые для репликации вируса, могут быть частично подавлены в ответ на инфекцию. Такая регуляция может быть компонентом противовирусного ответа. Кроме того, известно, что вирус гриппа обладает способностью захватывать и использовать короткие фрагменты клеточных РНК, в частности мяоРНК, содержащие структуру кэпа, для инициации транскрипции вирусных мРНК [87,88]. Исходя из наших данных, независимо транскрибируемые SNORD13 и SNORD118, имеющие 5'-кэп структуру, характеризовались повышенным уровнем после заражения вирусом гриппа А. Что может напротив способствовать развитию вирусной инфекции.





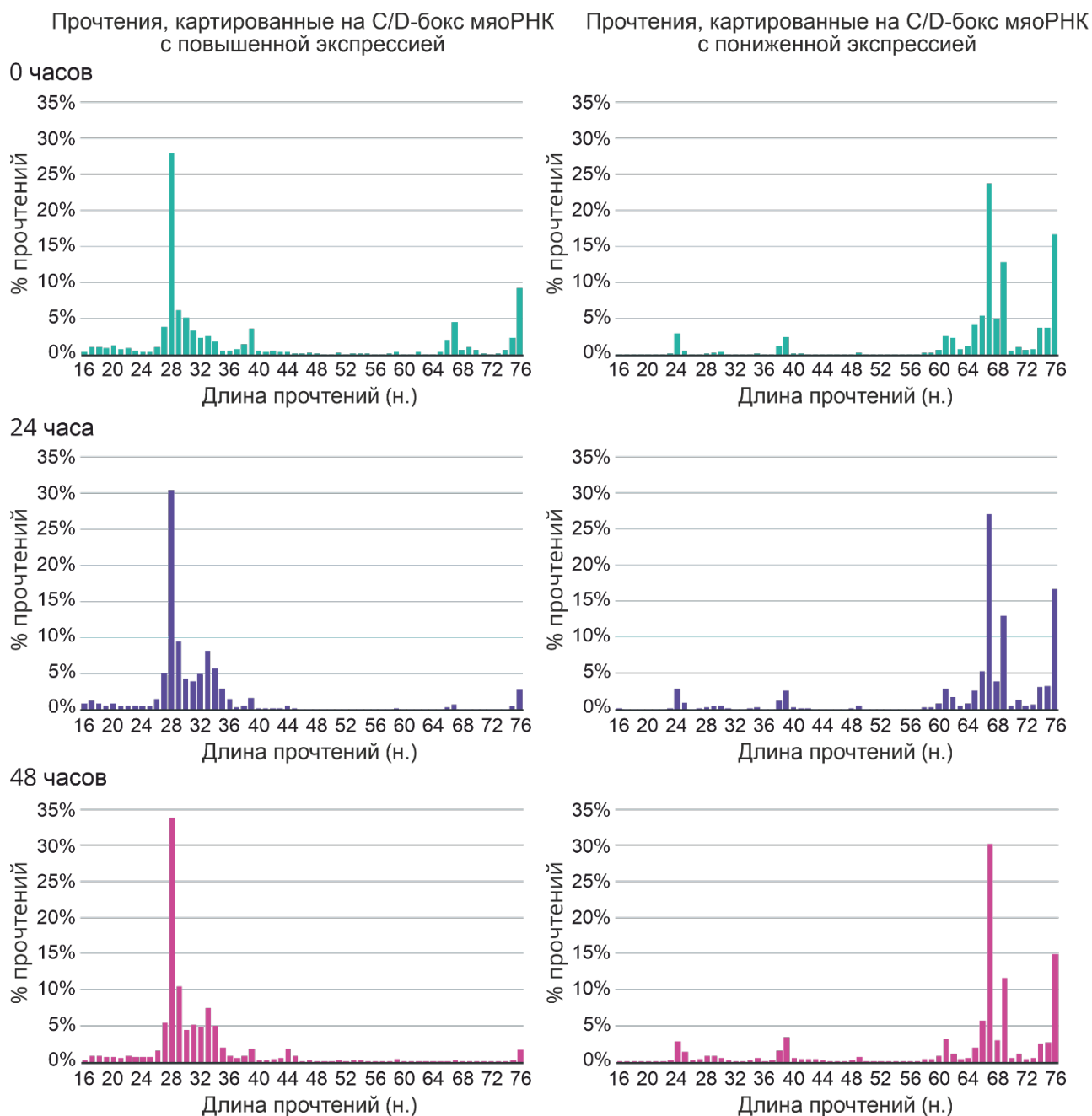
**Рисунок 26.** Дифференциально экспрессируемые мяоРНК в клетках человека в условиях инфекции вирусом гриппа А. **А.** Сравнение наборов мяоРНК с повышенным и пониженным уровнем (FDR-adjusted p-value < 0.05, абсолютная величина log<sub>2</sub> (FC) > 0.58) в клетках A549 через 24 часа (24ч vs 0ч) и 48 ч (48ч vs 0ч) после заражения по сравнению с неинфицированными клетками. **Б.** Списки дифференциально экспрессируемых С/D-бокс и Н/АСА-бокс РНК. Цвета на тепловой карте отражают значения log<sub>2</sub> отношения экспрессии мяоРНК (представляющее нормализованное количество прочтений) в инфицированных вирусом клетках к экспрессии в контрольных клетках через 24 часа (24ч vs 0ч) и 48 ч (48ч vs 0ч) после заражения. Красная область шкалы – повышенная экспрессия; синяя область – пониженная.



### **3.2.3 Исследование форм C/D-боксов РНК в условиях инфекции вирусом гриппа А**

Распределение форм отдельных C/D-боксов РНК в условиях развития инфекции вирусом гриппа А было исследовано более детально. Пристальное внимание именно к подклассу C/D-боксов РНК объясняется следующими факторами. Во-первых, 99% всех прочтений, картированных на мяоРНК, были сопоставлены непосредственно с генами C/D-боксов РНК (в среднем 1,2 млн прочтений, картированных на C/D-боксов РНК, против 8 тыс. прочтений, картированных на Н/АСА-боксов РНК, для каждого биологического повтора). Во-вторых, использованный протокол секвенирования (76-нуклеотидные односторонние прочтения) более корректен в рамках анализа распределения форм C/D-боксов РНК (средняя длина составляет 60-90 н.), чем при анализе форм Н/АСА-боксов РНК (средняя длина – около 150 н.). В-третьих, представители подкласса C/D-боксов РНК характеризуются бóльшим структурным и функциональным разнообразием по сравнению с Н/АСА-боксов РНК [89]. В частности, в недавних публикациях представлен ряд примеров взаимодействия между C/D-боксов РНК и РНК-содержащими вирусами [90].

В результате анализа распределения длин прочтений, картированных на C/D-боксов РНК, уровень которых изменялся в условиях инфекции вирусом гриппа А, было установлено, что в то время, как основная часть прочтений, сопоставленных с мяоРНК, уровень которых был повышен, имела распределение по размеру 26-35 н., прочтения, сопоставленные с мяоРНК, уровень которых был понижен, имели максимум распределения в области 65-76 н., более характерный для длин полноразмерных C/D-боксов РНК (**Рисунок 27**). Инфицированные клетки после 48 ч инкубации обладали наиболее выраженным эффектом. Кроме того, с увеличением времени инкубации для C/D-боксов РНК, уровень которых повышался в ответ на инфекцию вирусом гриппа, наблюдалось постепенное перераспределение в уровне форм от полноразмерных РНК (65-76 н.) к процессированным фрагментам РНК (26-35 н.).



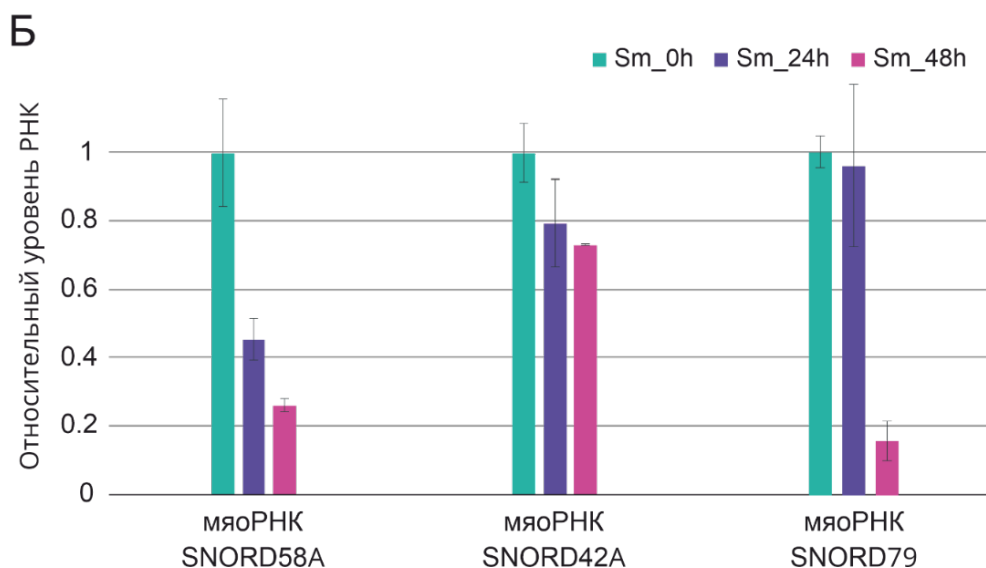
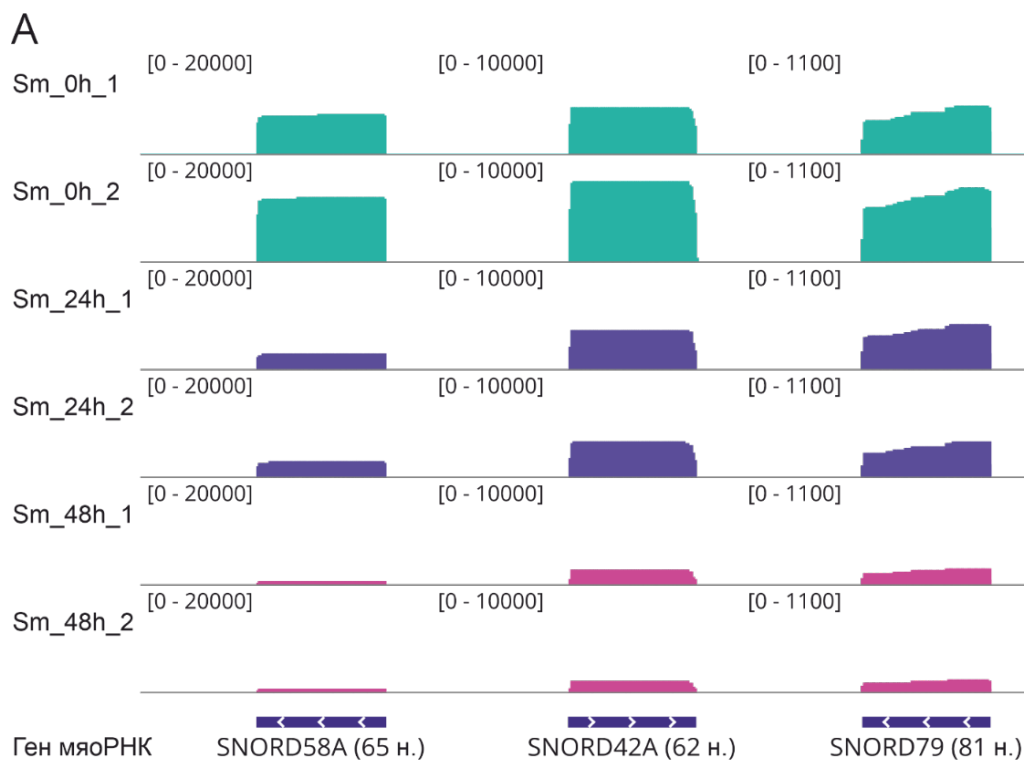
**Рисунок 27.** Распределение длин прочтений, картированных на дифференциально экспрессируемые С/Д-боксы РНК, в неинфицированных клетках (0 ч) и в клетках в условиях инфекции вирусом гриппа А после 24 ч и 48 ч инкубации.

Прочтения, картированные на С/Д-боксы РНК, дополнительно визуализировали с помощью инструмента Integrative Genomics Viewer (IGV) [91]. Визуальный анализ прочтений также показал, что, в то время как, снижение уровня полноразмерных форм характерно для С/Д-боксов РНК с пониженной экспрессией (**Рисунок 28, А**), увеличение уровня 5'- и 3'-фрагментов РНК, полученных из полноразмерных мРНК, характерно для С/Д-боксов РНК с повышенной экспрессией (**Рисунок 29, А**). Стоит отметить, что наблюдаемые фрагменты С/Д-боксов РНК имеют четкие концевые паттерны, что косвенно указывает на механизм специфического процессинга.

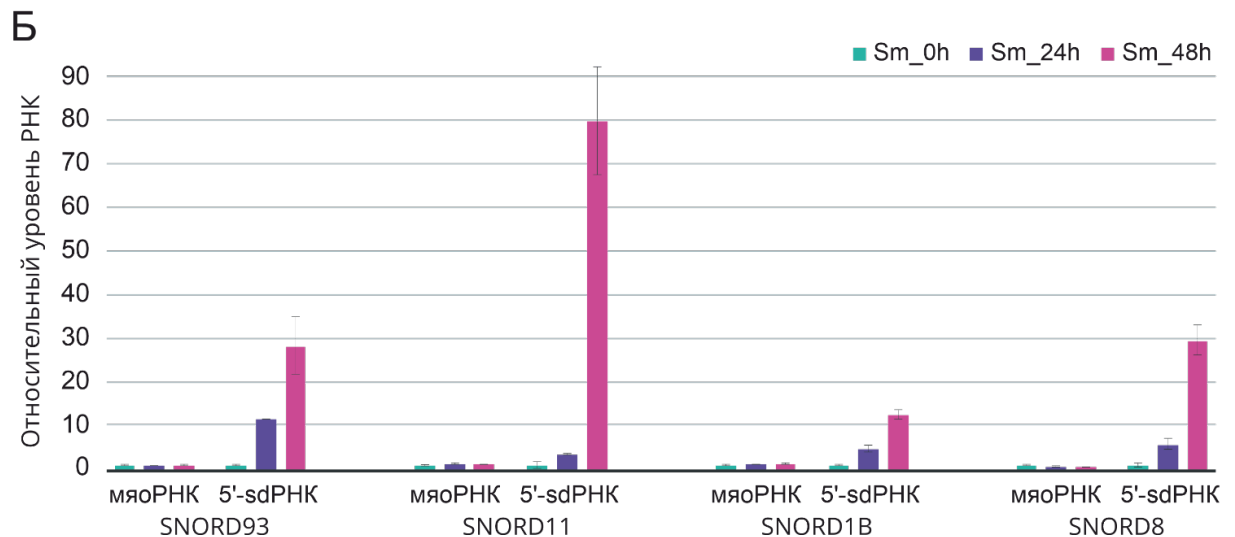
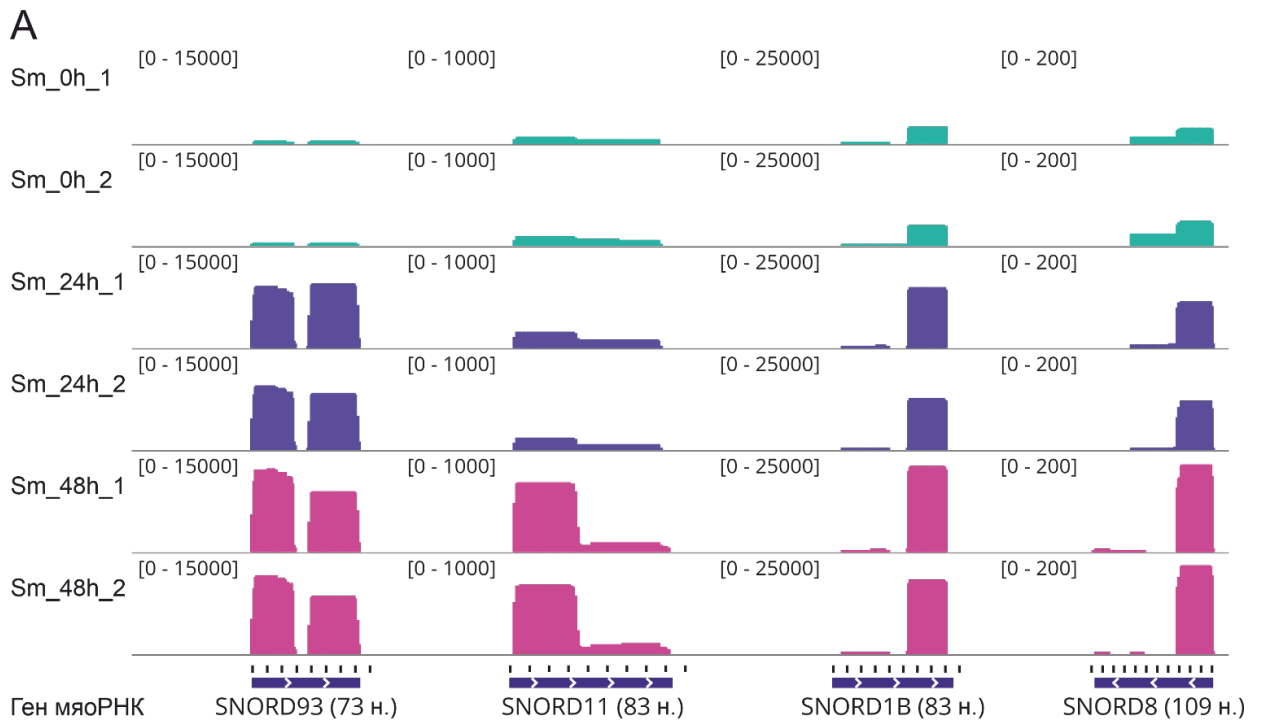
Результаты секвенирования были верифицированы независимым методом ОТ-ПЦР. С помощью одностадийной ОТ-ПЦР было подтверждено снижение уровня для ряда полноразмерных форм C/D-боксов РНК: SNORD58A, SNORD42A, SNORD79 (**Рисунок 28, Б**). Используя системы праймеров, сконструированные по stem-loop-технологии, было подтверждено повышение уровня 5'-фрагментов процессинга полноразмерных C/D-боксов РНК: SNORD93, SNORD11, SNORD1b, SNORD8 (**Рисунок 29, БРисунок 29**). Изменения в уровне таких коротких форм C/D-боксов РНК достигали одного-двух порядков в инфицированных клетках после 48 ч инкубации.

Полученные результаты указывают на то, что в условиях развития в клетках человека инфекции вирусом гриппа А специфично регулируется уровень отдельных малых ядрышковых РНК. Более того, для ряда C/D-боксов РНК наблюдается перераспределение и накопление коротких форм процессинга полноразмерных РНК. Подобные фрагменты были впервые обнаружены и описаны около десяти лет назад, получив аббревиатуру sdРНК (от англ. snoRNA derived RNAs – РНК, полученные из мяоРНК) [92,93]. На сегодняшний день подобные фрагменты процессинга мяоРНК нередко выявляют при изучении различных патологических клеточных процессов [94].

Несмотря на то, что большая часть фрагментов РНК, полученных из полноразмерных C/D-боксов РНК, отличается по размеру от микроРНК (17–19 н. или > 27 н. для sdРНК против 21–22 н. для микроРНК), а также неэффективно включается в комплекс с белком Ago2, небольшое количество sdРНК могут выполнять функции, подобные микроРНК [95,96]. Так, sdРНК-93, полученная из SNORD93, может регулировать экспрессию гена *PIPOX* по микроРНК-подобному механизму, способствуя формированию злокачественного фенотипа рака молочной железы [82]. sdРНК-28, полученная из SNORD28, может выполнять роль микроРНК, регулируя стабильность белка p53 за счет взаимодействия с мРНК гена *TAF9B* [97]. Интересно, что инфицированные вирусом гриппа А клетки также характеризовались повышенным уровнем фрагментов мяоРНК SNORD93 (одна из наиболее активируемых мяоРНК) и SNORD28 (уровень полноразмерной SNORD28 снижался).



**Рисунок 28. А.** Визуализация прочтений, выровненных на C/D-бокс РНК SNORD58A, SNORD42A и SNORD79, уровень которых понижался в ответ на инфекцию вирусом гриппа, в инфицированных (Sm\_24h, Sm\_48h – точки 24, 48 ч после заражения) и контрольных (Sm\_0h) клетках. **Б.** Верификация данных изменения уровня полноразмерной формы мяоРНК (мяоРНК) после заражения вирусом гриппа А методом ОТ-ПЦР. Приведены средние значения ( $\pm$  стандартное отклонение), рассчитанные на основе трех независимых экспериментов. Значения приведены относительно значений контрольных неинфицированных клеток (Sm\_0h).

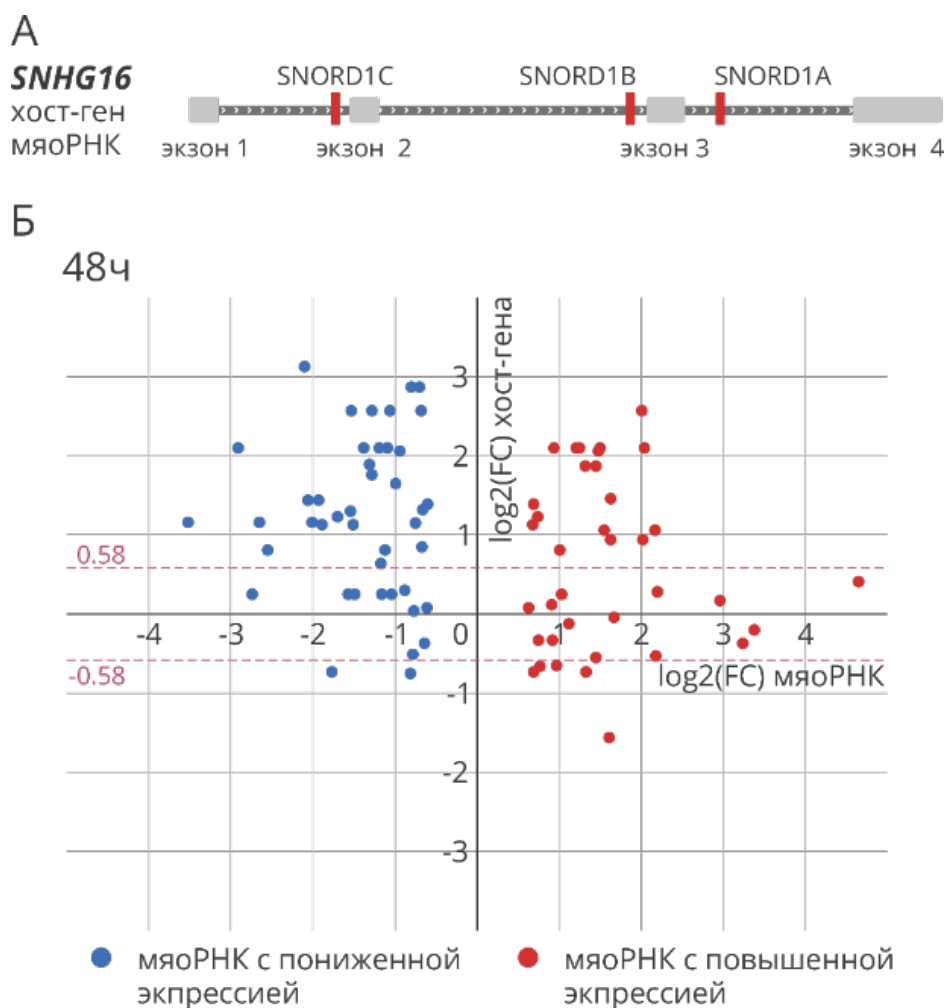


**Рисунок 29. А.** Визуализация прочтений, выровненных на C/D-бокс РНК SNORD93, SNORD11, SNORD1B, SNORD8, уровень которых повышался в ответ на инфекцию вирусом гриппа, в инфицированных (Sm\_24h, Sm\_48h – точки 24, 48 ч после заражения) и контрольных (Sm\_0h) клетках. **Б.** Верификация данных изменения уровня полноразмерной формы мяоРНК (мяоРНК) и уровня 5'-фрагмента мяоРНК (5'-sdРНК) после заражения вирусом гриппа А методом ОТ-ПЦР. Приведены средние значения ( $\pm$  стандартное отклонение), рассчитанные на основе трех независимых экспериментов. Значения приведены относительно значений контрольных неинфицированных клеток (Sm\_0h).

### 3.2.4 Анализ экспрессии генов, участвующих в биогенезе C/D-боксов РНК в условиях инфекции вирусом гриппа А

В геноме человека большинство генов C/D-боксов РНК расположены в интронах других генов, кодирующих мРНК или длинные некодирующие РНК. Такие "гены-носители" принято называть хост-генами мяоРНК (**Рисунок 30, А**). Биогенез таких интронных мяоРНК и сборка рибонуклеопротеидных комплексов, содержащих мяоРНК, (мяоРНП) непосредственно связаны с механизмом сплайсинга и требуют участия определенных транс-действующих факторов. Исходя из этого, используя данные анализа дифференциальной экспрессии фракции поли(А)+РНК, представленные в первой главе второго раздела, была исследована возможная корреляция между экспрессией интронных мяоРНК и экспрессией соответствующих хост-генов. Кроме того, были проанализированы изменения в экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие в биогенезе C/D-боксов РНК и сборке C/D-боксов мяоРНП, в условиях развития инфекции вирусом гриппа А.

Полученные результаты указывают на то, что экспрессия большинства дифференциально экспрессируемых мяоРНК не коррелирует с экспрессией соответствующих хост-генов. Лишь 25% всех C/D-боксов РНК, уровень которых изменялся в условиях инфекции вирусом гриппа А (18 мяоРНК с повышенной и 2 мяоРНК с пониженной экспрессией), характеризовались однонаправленными значимыми изменениями экспрессии со своими хост-генами через 48 ч инкубации после заражения (**Рисунок 30, Б**). Стоит отметить, что ряд хост-генов (*MIG8*, *RPL7A*, *SNHG1*, *SNHG14*, *SNHG32*) одновременно содержали внутри разных интронов как мяоРНК, уровень которых повышался, так и мяоРНК, уровень которых понижался. Недавние исследования показали, что уровень мяоРНК и уровень соответствующих сплайсированных мРНК хост-гена может быть разобщен за счет альтернативного сплайсинга и нонсенс-опосредованного распада [98].



**Рисунок 30. А.** Интронная локализация генов мяоРНК на примере хост-гена мяоРНК *SNHG16* (RefSeq: NR\_038108.1), содержащего внутри интронов три гена мяоРНК: SNORD1A, SNORD1B и SNORD1C. **Б.** Относительные уровни экспрессии мяоРНК и соответствующих хост-генов. Каждая точка несет информацию об одной интронной мяоРНК. Положение на оси абсцисс соответствует относительной экспрессии мяоРНК в инфицированных вирусом клетках (через 48 ч инкубации после заражения) по сравнению с неинфицированными клетками (секвенирование фракции коротких РНК); положение на оси ординат соответствует относительной экспрессии хост-гена (секвенирование фракции поли(А)+ РНК). Наборы точек с одинаковыми значениями по оси ординат соответствуют мяоРНК, гены которых расположены в одном и том же хост-гене.

Анализ дифференциальной экспрессии генов, необходимых для биогенеза *C/D*-бокс РНК, выявил дисбаланс в уровне мРНК генов, участвующих в основных этапах созревания мяоРНК в условиях развития инфекции вирусом гриппа А (**Таблица 5**). В то время как уровни мРНК коровых белков SNU13 и NOP56 были повышены, уровни мРНК факторов сборки мяоРНК RPA3, RUVBL1, RUVBL2 были понижены в инфицированных клетках. Кроме того, для транскрипционного фактора MYC, участвующего в регуляции биогенеза мяоРНК, и фактора сплайсинга AQR, связывающего механизмы сплайсинга и сборки мяоРНК, также характерны изменения в экспрессии в клетках после заражения вирусом по сравнению с неинфицированными клетками.

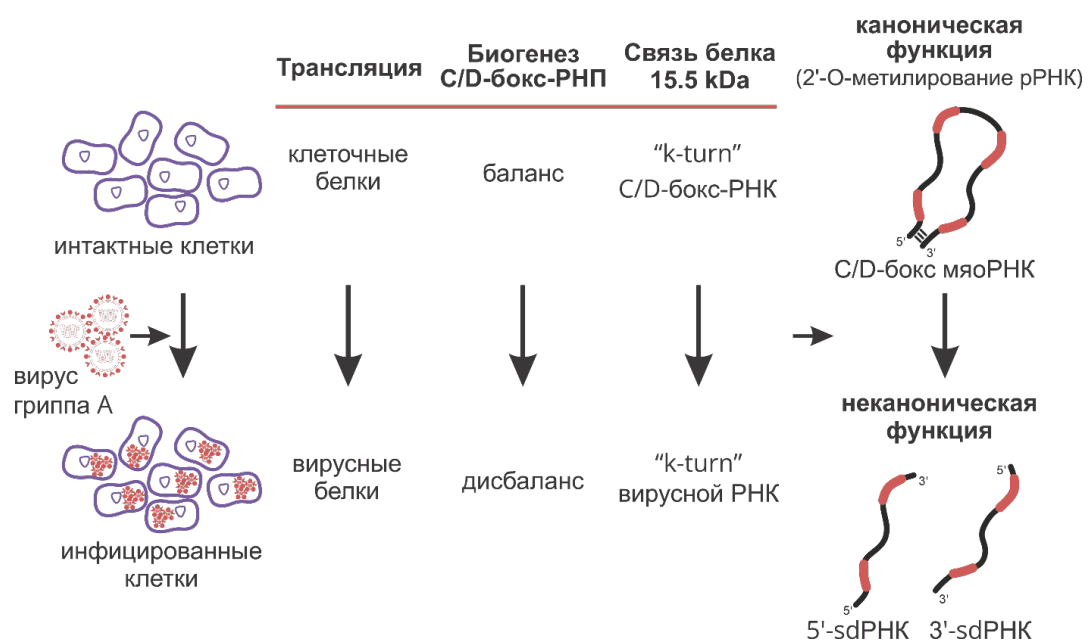
**Таблица 5.** Дифференциальная экспрессия генов, кодирующих белки, участвующие в биогенезе эукариотических C/D-боксов РНК [89]. Красным выделены гены с повышенной экспрессией, синим – с пониженной (FDR-adjusted p-value < 0.05, абсолютная величина log<sub>2</sub> (FC) > 0.58).

Функция	Ensembl ID	Символ гена	log <sub>2</sub> (FC)	padj
Коровые белки	ENSG00000105202	FBL	0.03	1.0E+00
	ENSG00000101361	NOP56	1.23	5.4E-46
	ENSG00000055044	NOP58	-0.37	3.8E-04
	ENSG00000100138	SNU13 (15.5 kDa)	0.96	3.4E-18
Фактор транскрипции	ENSG00000136997	MYC	1.01	6.1E-27
Фактор сплайсинга	ENSG00000021776	AQR (IBP160)	-0.99	5.3E-19
Формирование третичного комплекса с белком 15.5 kDa	ENSG00000083635	NUFIP1	0.43	1.1E-01
	ENSG00000273611	ZNHIT3	0.59	1.1E-04
Формирование комплекса R2TP, участвующего в стабилизации и рекрутинге NOP58	ENSG00000096384	HSP90AB1	-0.29	2.0E-05
	ENSG00000104872	PIH1D1	1.01	3.1E-16
	ENSG00000005175	RPAP3	-1.01	2.4E-12
	ENSG00000175792	RUVBL1	-1.37	1.1E-27
	ENSG00000183207	RUVBL2	-1.91	1.7E-65
Контроль ядрышковой локализации	ENSG00000166197	NOLC1 (NOPP140)	0.07	4.4E-01
	ENSG00000164902	PHAX	-0.04	8.1E-01
	ENSG00000082898	XPO1 (CRM1)	-0.16	4.6E-02
Формирование микроРНК-подобных фрагментов	ENSG00000100697	DICER1	0.62	1.9E-09
	ENSG00000113360	DROSHA	-1.45	1.7E-24

Интересно, что по результатам нашего и аналогичных исследований, неинфицированные клетки также содержат короткие фрагменты процессинга мРНК. Следовательно, инфекция вирусом гриппа А влияет лишь на активность процесса формирования sdРНК. Известно, что при заражении вирусы запускают процессы отключения хозяина, когда инфицированные клетки начинают интенсивно синтезировать вирусные белки за счет подавления синтеза собственных [99]. Так, во время инфекции вирусом гриппа А доминирует механизм избирательной деградации клеточных мРНК вирусной эндонуклеазой PA-X [100]. Ранее на аналогичной модели (A549 / A/Puerto Rico/8/1934) по результатам анализа секвенирования РНК и профилирования рибосом было показано относительное снижение уровня мРНК (в 2-4 раза) и уровня трансляции (в 2 раза) основных генов, участвующих в биогенезе C/D-боксов РНК: *FBL*, *NOP56*, *NOP58*, *SNU13 (15.5 kDa)* – через 12 ч после заражения [77]. По результатам нашего эксперимента через 48 ч инкубации после заражения наблюдался дисбаланс в уровне мРНК генов, необходимых для созревания мРНК (Таблица 5). В частности, уровни *NOP56* и *SNU13 (15.5 kDa)* были повышены относительно неинфицированных клеток, что может быть частью компенсаторного механизма по восстановлению уровня белков, участвующих в биогенезе C/D-боксов РНК. Кроме того, биоинформатически и экспериментально было показано, что среди элементов вторичной структуры РНК у вирусов гриппа А встречается элемент “kink-turn/k-turn” [101,102]. Подобный элемент специфичен для C/D-боксов РНК и необходим для



взаимодействия с центральным белком, ответственным за созревание мяоРНК – 15.5 kDa [103]. Как следствие, часть белков 15.5 kDa может быть связана с вирусными РНК. Перечисленные факторы указывают на вероятное истощение пула белков биогенеза C/D-бокс РНК, что, в свою очередь, может способствовать смещению равновесия в сторону формирования sdРНК. Четкие профили процессинга мяоРНК говорят о наличии неканонических белковых партнеров sdРНК, защищающих 5'- и 3'-концы формирующихся фрагментов от дальнейшего неспецифического расщепления рибонуклеазами. Таким образом, наблюдаемый паттерн экспрессии отдельных форм C/D-бокс РНК отражает активируемое инфекцией вирусом гриппа А переключение между канонической функцией полноразмерных мяоРНК (2'-О-метилирование рРНК) и неизвестными функциями sdРНК (**Рисунок 31**).



**Рисунок 31.** Факторы формирования sdРНК в условиях заражения клеток вирусом гриппа А

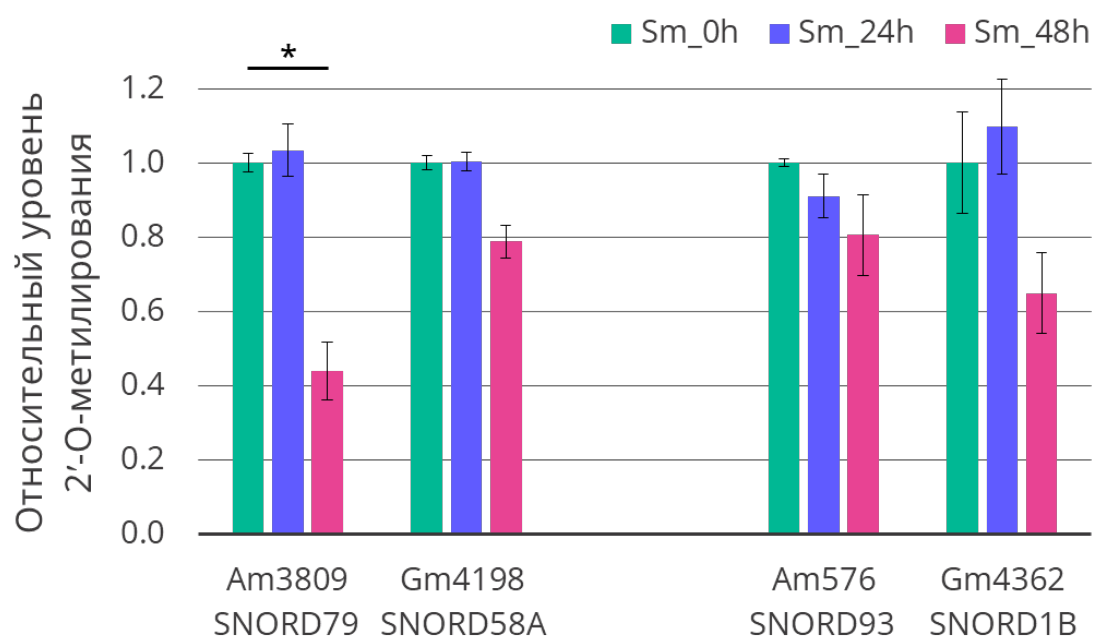
### **3.2.5 Оценка уровня 2'-О-метилования нуклеотидов рРНК в условиях инфекции вирусом гриппа А**

Основная функция мяоРНК заключается в пост-транскрипционной модификации нуклеотидов рРНК [104,105]. В недавних исследованиях было показано, что за счет изменений в профиле модификаций рРНК может происходить регуляция и адаптация рибосом, связанные как с изменениями внешней среды, так и с развитием различных заболеваний [106]. Синтез вирусных белков и эффективная вирусная репликация также всецело зависят от трансляционного аппарата клетки хозяина [107]. В соответствии с интерактивной базой данных мяоРНК человека "snoDB", около 80% всех выявленных дифференциально экспрессируемых C/D-боксов РНК содержат в своей структуре области узнавания, комплементарные рРНК-мишеням [108,109]. Кроме того, в случае большинства мяоРНК, уровень которых повышался в условиях развития инфекции вирусом гриппа А, наблюдалось повышение уровня коротких sdРНК и одновременное снижение уровня полноразмерной формы, необходимой для выполнения канонической функции – направления 2'-О-метилования нуклеотидов рРНК.

Для ряда C/D-боксов РНК, уровень которых повышался или понижался после инфекции вирусом гриппа А, была проанализирована степень изменения уровня 2'-О-метилования нуклеотидов-мишеней рРНК (**Таблица 6**). Для всех выбранных нуклеотидов наблюдалась тенденция к снижению уровня модификации через 48 ч инкубации после заражения вирусом, но только для нуклеотида Am3809 28S рРНК, являющегося мишенью C/D-боксов РНК SNORD79, изменения были статистически значимы ( $p\text{-value} < 0.05$ ) (**Рисунок 32**). Таким образом, можно предположить, что регуляция экспрессии мяоРНК, в частности подавление уровня полноразмерных форм C/D-боксов РНК, в ответ на инфекцию вирусом гриппа частично направлена на изменение паттерна модификаций рРНК и, как следствие, адаптацию трансляционного аппарата к эффективной трансляции вирусных мРНК и ингибированию трансляции клеточных мРНК [77].

**Таблица 6.** Дифференциально экспрессируемые C/D-боксы-рРНК и их нуклеотиды-мишени рРНК, выбранные для оценки уровня 2'-О-метилирования в условиях инфекции вирусом гриппа А.

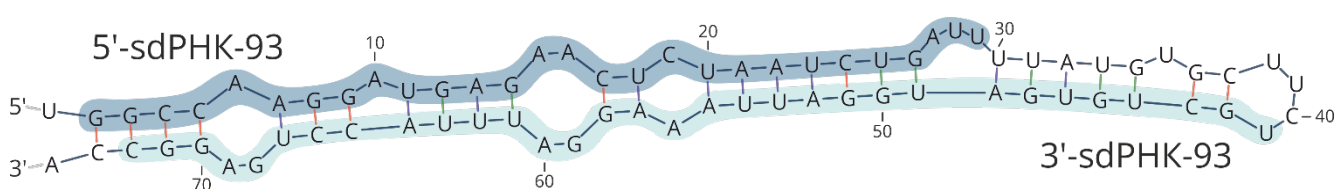
C/D-бокс-рРНК с пониженным уровнем после заражения вирусом гриппа А				
Обозначение	Длина, н	Ген-хозяин	Тип гена хозяина	Мишень
SNORD58A	65	RPL17	белок-кодирующий ген	рРНК (28S:Gm4198)
SNORD42A	64	RPL23A	белок-кодирующий ген	рРНК (18S:Um116)
SNORD79	81	GAS5	некодирующая рРНК	рРНК (28S:Am3809)
C/D-бокс-рРНК с повышенным уровнем после заражения вирусом гриппа А				
Обозначение	Длина, н	Ген-хозяин	Тип гена хозяина	Мишень
SNORD93	74	SNHG26	некодирующая рРНК	рРНК (18S:Am576)
SNORD11	84	NOP58	белок-кодирующий ген	рРНК (18S:Gm509)
SNORD1B	86	SNHG16	некодирующая рРНК	рРНК (28S:Gm4362)



**Рисунок 32.** Оценка изменений в профиле 2'-О-метилирования нуклеотидов рРНК, мишеней C/D-боксы рРНК: 28S:Am3809 (SNORD79), 28S:Gm4198 (SNORD58a), 18S:Am576 (SNORD93), 28S:Gm4362 (SNORD1b), в инфицированных (Sm\_24h, Sm\_48h – точки 24, 48 ч после заражения) и контрольных (Sm\_0h) клетках. \* – статистически значимая разница (p-value < 0.05).

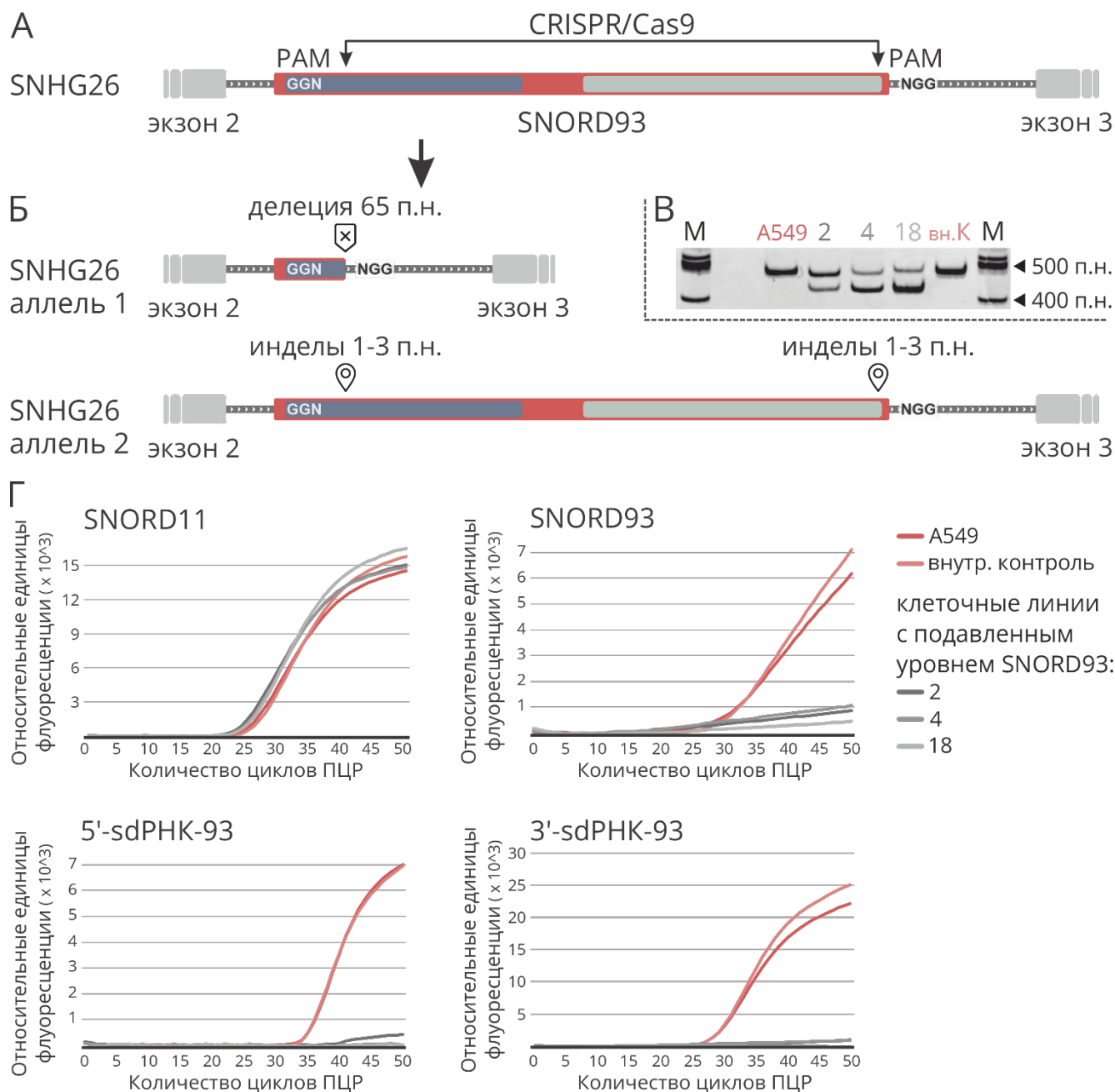
### 3.2.6 Анализ инфекции вирусом гриппа А клеток А549 с подавленным уровнем SNORD93

С целью изучения влияния отдельной С/D-бокс РНК на развитие инфекции вирусом гриппа А, в качестве объекта для последующих экспериментов была выбрана мяоРНК SNORD93 (**Рисунок 33**). Выбор был основан на следующих фактах. Во-первых, уровень экспрессии мяоРНК SNORD93 и, в частности, форм её процессинга: 5'-sdРНК-93, 3'-sdРНК-93 – был подвержен наиболее сильным изменениям, по результатам анализа данных секвенирования фракции коротких РНК в инфицированных клетках после 48 ч инкубации по сравнению с контрольными клетками (**Рисунок 26, Б; Рисунок 29**). Во-вторых, в недавних работах было показано, что короткие формы РНК, полученные из мяоРНК SNORD93, участвуют в прогрессии рака молочной железы, осуществляя регуляцию экспрессии белка Рiрoх по микроРНК-подобному механизму [44,110].



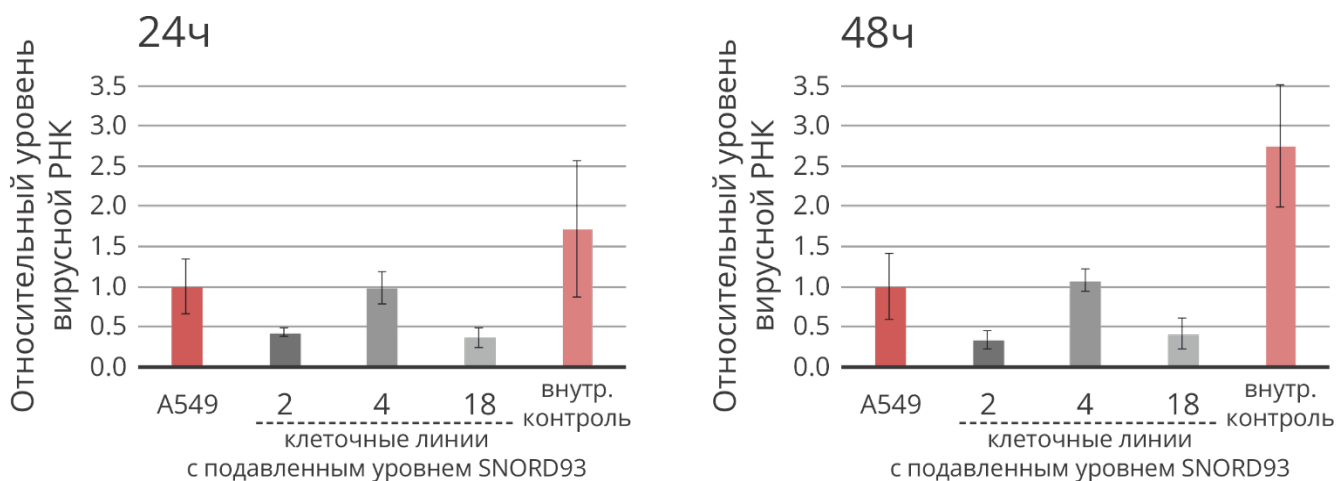
**Рисунок 33.** Наиболее термодинамически стабильная вторичная структура мяоРНК SNORD93 (RefSeq: NR\_003075.1), предсказанная с помощью веб-сервера "mfold" [111]. Цветом выделены последовательности 5'-sdРНК-93 и 3'-sdРНК-93, имеющие наибольшее количество строго выровненных прочтений.

На первом этапе с применением технологии CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования генома была разработана схема удаления основной части гена мяоРНК SNORD93, предполагающая одновременное воздействие на целевую область двумя направляющими РНК (**Рисунок 34, А**). На основе клеточной линии А549 были получены модифицированные линии, содержащие целевую делецию гена SNORD93 (65 п.н.) (**Рисунок 34, В**). Анализ целевой области генома методом секвенирования по Сэнгеру показал, что во всех полученных линиях наблюдается два отличающихся аллельных варианта: один содержит целевую делецию 65 п.н., второй – различные для отдельных линий инделы 1-3 п.н., расположенные в местах внесения двуцепочечных разрывов нуклеазой Cas9 (**Рисунок 34, Б**). Несмотря на наличие гетерозиготности по локусу гена SNORD93, для модифицированных линий было характерно специфическое подавление уровня полноразмерной С/D-бокс РНК SNORD93, а также подавление уровней sdРНК-93 (**Рисунок 34, Г**).



**Рисунок 34.** А. Схема CRISPR/Cas9-опосредованного удаления гена мяоПНК SNORD93, расположенного в интроне гена *SNHG26* (RefSeq: NR\_146320.1). На схеме обозначены CRISPR/Cas9 PAM (от англ. protospacer adjacent motive – мотив, прилегающий к протоспейсеру) – “NGG” Б. Гетерозиготность аллелей гена SNORD93, в модифицированных клетках A549. В. Электрофорез в агарозном геле ампликонов, полученных с пары праймеров, фланкирующих область гена SNORD93. A549 – исходная клеточная линия A549; модифицированные клеточные линии: 2, 4, 18 – содержат целевую делецию гена SNORD93, вн.к. – внутренний контроль, не содержит целевую мутацию. Г. Кривые амплификации, отражающие относительные уровни полноразмерной формы мяоПНК SNORD11 (нецелевая мяоПНК, взятая в качестве контроля) и мяоПНК SNORD93, а также уровни 5'-sdPHK-93 и 3'-sdPHK-93 в исходной клеточной линии A549 и в модифицированных линиях: 2, 4, 18 – содержат делецию гена SNORD93; внутр. контроль – не содержит целевую мутацию.

На втором этапе модифицированные клеточные линии, а также исходная линия A549 были заражены вирусом гриппа A/PuertoRico/8/1934. Для двух линий со сниженным уровнем полноразмерной мяоРНК SNORD93 и коротких sdРНК-93 было показано снижение относительного уровня вирусной РНК в клетках через 24 ч и 48 ч инкубации после заражения в сравнении с исходной неинфицированной линией (**Рисунок 35**).



**Рисунок 35.** Относительный уровень РНК вируса гриппа А в исходной клеточной линии A549 и в модифицированных линиях: 2, 4, 18 – подавленный уровень C/D-бокс-РНК SNORD93; внутр. контроль – уровень SNORD93 соответствует уровню в контрольных клетках – через 24 ч и 48 ч инкубации после заражения. Представлены данные о средних значениях изменения уровня фрагмента вирусной РНК относительно референсного гена RP с указанием стандартного отклонения, рассчитанного по данным трех независимых экспериментов.

Полученные результаты указывают на возможное участие мяоРНК SNORD93 и коротких sdРНК-93 в регуляции инфекции вирусом гриппа А в клетках человека. Исходя из того, что основные изменения происходят на уровне коротких 5'-sdРНК-93 и 3'-sdРНК-93, предполагаемый функциональный механизм может заключаться в подавлении экспрессии противовирусных генов на посттранскрипционном уровне по микроРНК-подобному пути. Анализ возможных мишеней микроРНК-подобных фрагментов SNORD93 выявил в качестве мишени мРНК гена IFIT1, являющегося одним из первичных активаторов системы врожденного иммунного ответа клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Малые ядрышковые РНК являются одной из наиболее многочисленных и широко представленных групп некодирующих РНК в клетках человека. В рамках своей канонической функции, мяоРНК в составе рибонуклеопротеидных комплексов регулируют созревание предшественников рибосомных РНК, осуществляя две наиболее распространенные модификации нуклеотидов: 2'-О-метирирование и псевдоуридилирование. На сегодняшний день, за счет развития высокопроизводительных методов исследования, были открыты как новые представители данного семейства, так и большое число различных путей функционирования мяоРНК.

В данной работе были синтезированы аналоги мяоРНК, с включением в их структуру модифицированных нуклеотидов N6-метиладенозина ( $m^6A$ ), псевдоуридина ( $\Psi$ ) и 5-метилцитидина ( $m^5C$ ), а также триметилгуанозина ( $m^7G$  и  $m^3^{2,2,7}G$ ) в структуре кэпа. С применением микроскопии было продемонстрировано, что включение таких неканонических мономеров в структуру мяоРНК не оказывает существенного влияния на их стабильность и локализацию при трансфекции в клетки человека с липидными трансфицирующими агентами. Более того, с применением технологии высокопроизводительного секвенирования было установлено, что модифицированные аналоги обладают пониженным цитотоксическим и антипролиферативным воздействием на клетки человека.

Эксперименты с клеточными линиями с нокаутом ключевых внутриклеточных рецепторов PKR, RIG-I и MDA5 выявили, что ключевым внутриклеточным рецептором мяоРНК, обеспечивающим значительный уровень активации сигнальных путей, является PKR. Более того, в результате анализа термодинамических характеристик структуры модифицированных аналогов было установлено, что вероятнее всего внутримолекулярное включение модифицированных мономеров изменяет термодинамическую стабильность элементов вторичной структуры аналогов мяоРНК, что нарушает взаимодействие с РНК-рецепторами и обеспечивает снижение иммуностимулирующей активности анализируемых РНК.

Применение модифицированных нуклеотидов для получения аналогов со сниженным цитотоксическим уровнем позволило уточнить детали функционирования одной из C/D-боксов РНК. С помощью подхода высокопроизводительного секвенирования было установлено, что U74 мяоРНК участвует в формировании стрессового состояния клеток за счет нарушений в процессах созревания пре-мРНК и рРНК.

Также в рамках второго раздела данной работы было широко исследовано поведение класса мяоРНК в условиях развития в клетках человека инфекции вирусом гриппа А.

Полнотранскриптомный анализ изменения экспрессии генов в инфицированных клетках выявил специфичную регуляцию уровня и форм-процессинга большого количества мяоРНК. Одной из причин которого может выступать дисбаланс уровня основных генов биогенеза мяоРНК, а следствием являться снижение уровня 2'-О-метилирования нуклеотидов-мишеней рРНК.

Применение технологии геномного редактирования для получения клеточных линий с подавленным уровнем мяоРНК SNORD93 и коротких sdРНК-93 и последующие эксперименты с инфекцией полученных линий вирусом гриппа позволили установить участие данной мяоРНК в регуляции инфекции вирусом гриппа А в клетках человека.

Таким образом, в данной работе были исследованы новые пути функционирования мяоРНК в клетках человека, в том числе и в условиях развития патологических процессов.



## ВЫВОДЫ

### *Раздел 1.*

1. Получен набор аналогов малых ядрышковых РНК U25 (SNORD25), U35a (SNORD35A), U74 (SNORD74) со статистическим включением в структуру неканонических мономеров: N6-метиладенозина ( $m^6A$ ), псевдоуридина ( $\Psi$ ) и 5-метилцитидина ( $m^5C$ ), а также триметилгуанозина ( $m^7G$  и  $m_3^{2,2,7}G$ ) в структуре кэпа, и с помощью трансфекции клеток человека этими аналогами выявлены характеристические особенности влияния модифицированных мономеров на свойства аналогов C/D-боксов РНК. Установлено, что
  - наличие модифицированных нуклеотидов в структуре аналогов мяоРНК не оказывает существенного влияния на их стабильность и локализацию при трансфекции в клетки человека с липидными трансфицирующими агентами;
  - включение модифицированных нуклеотидов в структуру аналогов мяоРНК снижает уровень активации системы врожденного иммунного ответа в трансфицированных клетках человека, а также позволяет снизить цитотоксическое и антипролиферативное воздействие аналогов мяоРНК на клетки человека;
  - PKR является ключевым внутриклеточным рецептором мяоРНК, обеспечивающим значительный уровень активации и сопутствующее цитотоксическое воздействие.
2. Совокупная функциональная аннотация генов с дифференциальной экспрессией в клетках аденокарциномы яичников человека SK-OV-3, трансфицированных аналогом U74 мяоРНК, позволила установить участие данной мяоРНК в формировании стрессового состояния клеток за счет нарушений в процессах созревания пре-мРНК и рРНК.

### *Раздел 2.*

3. В условиях развития в клетках человека инфекции вирусом гриппа А установлено, что:
  - уровень отдельных малых ядрышковых РНК подвергается специфичной регуляции, при этом в инфицированных клетках происходит изменение в структуре C/D-боксов РНК и их процессинге до более коротких форм;
  - происходит дисбаланс в экспрессии генов, участвующих в основных этапах биогенеза мяоРНК;
  - для нуклеотидов рРНК, являющихся мишенями дифференциально экспрессируемых C/D-боксов РНК, характерна тенденция к снижению уровня 2'-О-метилирования.
4. Для клеточных линий A549 с подавленным уровнем мяоРНК SNORD93 выявлено снижение относительного уровня вирусной РНК в клетках через 24 ч и 48 ч инкубации после заражения.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Филиппова Ю.А., Семенов Д.В., **Журавлев Е.С.**, Комиссаров А.Б., Рихтер В.А., Степанов Г.А. Современные методы выявления модифицированных нуклеотидов в РНК // Биохимия, 2017, 11, 1557 – 1576.
2. Grigory Stepanov, **Evgenii Zhuravlev**, Victoria Shender, Anna Nushtaeva, Evgenia Balakhonova, Elena Mozhaeva, Marat Kasakin, Vladimir Koval, Alexander Lomzov, Marat Pavlyukov, Irina Malianc, Mikhail Zhorov, Tatyana Kabilova, Elena Chernolovskaya, Vadim Govorun, Elena Kuligina, Dmitry Semenov, Vladimir Richter. Nucleotide modifications decrease innate immune response induced by synthetic analogs of snRNAs and snoRNAs // Genes, 2018, 9(11), 531.
3. Anna Nushtaeva, Grigory Stepanov, Dmitry Semenov, **Evgeny Juravlev**, Evgenia Balahonova, Alexey Gerasimov, Sergey Sidorov, Eugeny Savelyev, Elena Kuligina, Vladimir Richter, Olga Koval. Characterization of primary normal and malignant breast cancer cell and their response to chemotherapy and immunostimulatory agents // BMC Cancer, 2018, 18, 728 – 739.
4. **E. Zhuravlev**, M. Sergeeva, S. Malanin, R. Amirkhanov, D. Semenov, T. Grigoryeva, A. Komissarov, G. Stepanov. RNA-Seq transcriptome data of human cells infected with influenza A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) virus // Data in Brief, 2020, V. 33, P. 106604, DOI 10.1016/j.dib.2020.106604
5. **Evgenii Zhuravlev**, Mariia Sergeeva, Sergey Malanin, Rinat Amirkhanov, Dmitriy Semenov, Tatiana Grigoryeva, Andrey Komissarov, Grigory Stepanov. Analysis of expression pattern of snoRNAs in human cells A549 infected by influenza A virus // International Journal of Molecular Sciences (under review).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crick F. Central dogma of molecular biology // Nature. Nature Publishing Group, 1970. Vol. 227, № 5258. P. 561–563.
2. CRICK FH. On protein synthesis. // Symp Soc Exp Biol., 1958. № 12, P. 138-63.
3. Kruger K. et al. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena // Cell. Cell Press, 1982. Vol. 31, № 1. P. 147–157.
4. Guerrier-Takada C. et al. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme // Cell. Cell Press, 1983. Vol. 35, № 3 PART 2. P. 849–857.
5. Busch H. et al. SnRNAs, SnRNPs, and RNA Processing // Annu. Rev. Biochem. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA , 1982. Vol. 51, № 1. P. 617–654.
6. Cavaille J., Nicoloso M., Bachellerie J.P. Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides // Nature. Nature, 1996. Vol. 383, № 6602. P. 732–735.
7. Ganot P., Bortolin M.L., Kiss T. Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs // Cell. Cell Press, 1997. Vol. 89, № 5. P. 799–809.
8. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* // Cell. Cell Press, 1993. Vol. 75, № 5. P. 843–854.
9. Reinhart B.J. et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* // Nature. 2000. Vol. 403, № 6772. P. 901–906.
10. Almeida M.I., Reis R.M., Calin G.A. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers // Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Elsevier, 2011. Vol. 717, № 1–2. P. 1–8.
11. Cech T.R., Steitz J.A. The noncoding RNA revolution - Trashing old rules to forge new ones // Cell. Elsevier Inc., 2014. Vol. 157, № 1. P. 77–94.
12. Yamamura S. et al. Interaction and cross-talk between non-coding RNAs // Cellular and Molecular Life Sciences. Birkhauser Verlag AG, 2018. Vol. 75, № 3. P. 467–484.
13. Anastasiadou E., Jacob L.S., Slack F.J. Non-coding RNA networks in cancer // Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 18, № 1. P. 5–18.
14. Tollervey D., Kiss T. Function and synthesis of small nucleolar RNAs // Curr. Opin. Cell Biol. 1997. Vol. 9, № 3. P. 337–342.

15. Szewczak L.B.W. et al. Exclusive interaction of the 15.5 kD protein with the terminal box C/D motif of a methylation guide snoRNP // *Chem. Biol.* 2002. Vol. 9, № 10. P. 1095–1107.
16. Kiss A.M. et al. Human Box H/ACA Pseudouridylation Guide RNA Machinery † // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24, № 13. P. 5797–5807.
17. Sloan K.E. et al. RNA Biology Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. 2016.
18. Bratkovič T., Božič J., Rogelj B. Functional diversity of small nucleolar RNAs // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, № 4. P. 1627–1651.
19. Danny Bergeron, Fafard-Couture É., Scott M.S. Small nucleolar RNAs: Continuing identification of novel members and increasing diversity of their molecular mechanisms of action // *Biochem. Soc. Trans.* 2020. Vol. 48, № 2. P. 645–656.
20. Designed Research; M S.S.F. Dual function of C/D box small nucleolar RNAs in rRNA modification and alternative pre-mRNA splicing. 2016.
21. Soeno Y. et al. Identification of novel ribonucleo-protein complexes from the brain-specific snoRNA MBII-52.
22. Penzo M. et al. Separated Siamese Twins: Intronic Small Nucleolar RNAs and Matched Host Genes May be Altered in Conjunction or Separately in Multiple Cancer Types.
23. Stamm S., Lodmell J.S. C/D box snoRNAs in viral infections: RNA viruses use old dogs for new tricks // *Non-coding RNA Res.* Elsevier, 2019. Vol. 4, № 2. P. 46–53.
24. Bratkovič T., Rogelj B. Biology and applications of small nucleolar RNAs // *Cell. Mol. Life Sci. Cell Mol Life Sci*, 2011. Vol. 68, № 23. P. 3843–3851.
25. Cavaille J., Nicoloso M., Bachellerie J.P. Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides // *Nature. Nature*, 1996. Vol. 383, № 6602. P. 732–735.
26. Kiss-László Z. et al. Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs // *Cell. Cell*, 1996. Vol. 85, № 7. P. 1077–1088.
27. Ganot P., Bortolin M.L., Kiss T. Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs // *Cell. Cell*, 1997. Vol. 89, № 5. P. 799–809.
28. Borovjagin A. V., Gerbi S.A. U3 small nucleolar RNA is essential for cleavage at sites 1, 2 and 3 in pre-rRNA and determines which rRNA processing pathway is taken in *Xenopus* oocytes // *J. Mol. Biol. J Mol Biol*, 1999. Vol. 286, № 5. P. 1347–1363.
29. Dunbar D.A., Baserga S.J. The U14 snoRNA is required for 2'-O-methylation of the pre-18S

- rRNA in *Xenopus* oocytes. // RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. Vol. 4, № 2. P. 195.
30. Bachellerie J.P., Cavallé J., Hüttenhofer A. The expanding snoRNA world // *Biochimie. Biochimie*, 2002. Vol. 84, № 8. P. 775–790.
  31. Kiss-László Z., Henry Y., Kiss T. Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA. // *EMBO J. European Molecular Biology Organization*, 1998. Vol. 17, № 3. P. 797.
  32. Babski J. et al. Small regulatory RNAs in Archaea // *RNA Biol. Taylor & Francis*, 2014. Vol. 11, № 5. P. 484.
  33. Stepanov G.A. et al. Regulatory role of small nucleolar RNAs in human diseases // *Biomed Res. Int. Biomed Res Int*, 2015. Vol. 2015.
  34. Newman D.R. et al. Box C/D snoRNA-associated proteins: two pairs of evolutionarily ancient proteins and possible links to replication and transcription // *RNA. RNA*, 2000. Vol. 6, № 6. P. 861–879.
  35. Hirose T., Shu M. Di, Steitz J.A. Splicing-dependent and -independent modes of assembly for intron-encoded box C/D snoRNPs in mammalian cells // *Mol. Cell. Mol Cell*, 2003. Vol. 12, № 1. P. 113–123.
  36. Darzacq X. et al. Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs // *EMBO J. EMBO J*, 2002. Vol. 21, № 11. P. 2746–2756.
  37. Kishore S., Stamm S. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C // *Science (80-. )*. American Association for the Advancement of Science, 2006. Vol. 311, № 5758. P. 230–232.
  38. Kishore S. et al. The snoRNA MBII-52 (SNORD 115) is processed into smaller RNAs and regulates alternative splicing // *Hum. Mol. Genet. Hum Mol Genet*, 2010. Vol. 19, № 7. P. 1153–1164.
  39. Ge J., Liu H., Yu Y.T. Regulation of pre-mRNA splicing in *Xenopus* oocytes by targeted 2'-O-methylation // *RNA. RNA*, 2010. Vol. 16, № 5. P. 1078–1085.
  40. Kawaji H. et al. Hidden layers of human small RNAs // *BMC Genomics. BioMed Central*, 2008. Vol. 9, № 1.
  41. Taft R.J. et al. Small RNAs derived from snoRNAs // *RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2009. Vol. 15, № 7. P. 1233–1240.

42. Langenberger D. et al. Identification and classification of small RNAs in transcriptome sequence data // *Pac. Symp. Biocomput. Pac Symp Biocomput*, 2010. P. 80–87.
43. Ender C. et al. A human snoRNA with microRNA-like functions // *Mol. Cell. Mol Cell*, 2008. Vol. 32, № 4. P. 519–528.
44. Brameier M. et al. Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: expanding the range of regulatory RNAs.
45. Michel C.I. et al. Small nucleolar RNAs U32a, U33, and U35a are critical mediators of metabolic stress // *Cell Metab. Cell Metab*, 2011. Vol. 14, № 1. P. 33–44.
46. Holley C.L. et al. Cytosolic Accumulation of Small Nucleolar RNAs (snoRNAs) Is Dynamically Regulated by NADPH Oxidase // *J. Biol. Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 2015. Vol. 290, № 18. P. 11741.
47. Linder B. et al. Single-nucleotide resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome // *Nat. Methods. NIH Public Access*, 2015. Vol. 12, № 8. P. 767.
48. Liu N. et al. N6-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions // *Nature. NIH Public Access*, 2015. Vol. 518, № 7540. P. 560.
49. Wang X. et al. m6A-dependent regulation of messenger RNA stability // *Nature. NIH Public Access*, 2014. Vol. 505, № 7481. P. 117.
50. Baxter-Roshek J.L., Petrov A.N., Dinman J.D. Optimization of Ribosome Structure and Function by rRNA Base Modification // *PLoS One. Public Library of Science*, 2007. Vol. 2, № 1.
51. Liang X.H., Liu Q., Fournier M.J. Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing // *RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2009. Vol. 15, № 9. P. 1716.
52. Zinshteyn B., Nishikura K. Adenosine-to-inosine RNA editing // *Inc. WIREs Syst Biol Med. John Wiley & Sons*, 2009. Vol. 1. P. 202–209.
53. Decatur W.A., Fournier M.J. rRNA modifications and ribosome function // *Trends Biochem. Sci. Elsevier Current Trends*, 2002. Vol. 27, № 7. P. 344–351.
54. Williams D.J., Boots J.L., Hall K.B. Thermodynamics of 2'-ribose substitutions in UUCG tetraloops. // *RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2001. Vol. 7, № 1. P. 44.
55. Karijolich J., Yu Y.T. Spliceosomal snRNA modifications and their function // *RNA Biol. RNA Biol*, 2010. Vol. 7, № 2. P. 192–204.
56. Ma X., Zhao X., Yu Y.T. Pseudouridylation (Psi) of U2 snRNA in *S. cerevisiae* is catalyzed by

- an RNA-independent mechanism // EMBO J. EMBO J, 2003. Vol. 22, № 8. P. 1889–1897.
57. Ma X. et al. Pseudouridylation of yeast U2 snRNA is catalyzed by either an RNA-guided or RNA-independent mechanism // EMBO J. European Molecular Biology Organization, 2005. Vol. 24, № 13. P. 2403.
  58. Dönmez G., Hartmuth K., Lührmann R. Modified nucleotides at the 5' end of human U2 snRNA are required for spliceosomal E-complex formation // RNA. RNA, 2004. Vol. 10, № 12. P. 1925–1933.
  59. Lin Y., Kielkopf C.L. X-ray structures of U2 snRNA-branchpoint duplexes containing conserved pseudouridines // Biochemistry. Biochemistry, 2008. Vol. 47, № 20. P. 5503–5514.
  60. Massenet S., Branlant C. A limited number of pseudouridine residues in the human atac spliceosomal UsnRNAs as compared to human major spliceosomal UsnRNAs // RNA. RNA, 1999. Vol. 5, № 11. P. 1495–1503.
  61. Ofengand J., Del Campo M., Kaya Y. Mapping pseudouridines in RNA molecules // Methods. Methods, 2001. Vol. 25, № 3. P. 365–373.
  62. Schwartz S. et al. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA // Cell. Cell, 2014. Vol. 159, № 1. P. 148–162.
  63. Макарова Ю.А. Гены малых ядрышковых РНК // Генетика. 2007. Vol. 43, № 2. P. 149–158.
  64. Helm M., Alfonzo J.D. Posttranscriptional RNA Modifications: playing metabolic games in a cell's chemical Legoland // Chem. Biol. Chem Biol, 2014. Vol. 21, № 2. P. 174–185.
  65. Yi C., Pan T. Cellular dynamics of RNA modification // Acc. Chem. Res. Acc Chem Res, 2011. Vol. 44, № 12. P. 1380–1388.
  66. Singh M. Dysregulated A to I RNA editing and non-coding RNAs in neurodegeneration // Front. Genet. Front Genet, 2013. Vol. 3, № JAN.
  67. Belin S. et al. Dysregulation of Ribosome Biogenesis and Translational Capacity Is Associated with Tumor Progression of Human Breast Cancer Cells // PLoS One. Public Library of Science, 2009. Vol. 4, № 9.
  68. Michel C.I. et al. Small nucleolar RNAs U32a, U33, and U35a are critical mediators of metabolic stress. // Cell Metab. 2011. Vol. 14, № 1. P. 33–44.
  69. Martens-Uzunova E.S. et al. C/D-box snoRNA-derived RNA production is associated with malignant transformation and metastatic progression in prostate cancer // Oncotarget. Impact Journals LLC, 2015. Vol. 6, № 19. P. 17430–17444.

70. Matera A.G., Terns R.M., Terns M.P. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. // *Nature reviews. Molecular cell biology*. England, 2007. Vol. 8, № 3. P. 209–220.
71. Kierzek E. et al. The contribution of pseudouridine to stabilities and structure of RNAs.
72. Durbin A.F. et al. RNAs Containing Modified Nucleotides Fail To Trigger RIG-I Conformational Changes for Innate Immune Signaling. 2016.
73. Lykke-Andersen S. et al. Human nonsense-mediated RNA decay initiates widely by endonucleolysis and targets snoRNA host genes.
74. Abedon S.T., Bartom E. Multiplicity of Infection // *Brenner's Encycl. Genet. Second Ed.* Academic Press, 2013. P. 509–510.
75. Reid A.H., Taubenberger J.K., Fanning T.G. The 1918 Spanish influenza: Integrating history and biology // *Microbes Infect.* 2001. Vol. 3, № 1. P. 81–87.
76. Smith G.J.D. et al. LETTERS Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. 2009.
77. Bercovich-Kinori A. et al. A systematic view on influenza induced host shutoff // *Elife. eLife Sciences Publications Ltd*, 2016. Vol. 5, № AUGUST.
78. Wang W. et al. Transcriptional Regulation of Antiviral Interferon-Stimulated Genes // *Trends Microbiol. Elsevier Current Trends*, 2017. Vol. 25, № 7. P. 573–584.
79. Ren L. et al. Influenza A Virus (H1N1) Infection Induces Glycolysis to Facilitate Viral Replication // *Virol. Sin. Science Press*, 2021. Vol. 36, № 6. P. 1532–1542.
80. Thompson M.G. et al. Viral-induced alternative splicing of host genes promotes influenza replication // *Elife. eLife Sciences Publications Ltd*, 2020. Vol. 9. P. 1–20.
81. Bamunuarachchi G. et al. MicroRNA-206 inhibits influenza A virus replication by targeting tankyrase 2 // *Cell. Microbiol. NIH Public Access*, 2021. Vol. 23, № 2. P. e13281.
82. Patterson D.G. et al. Human snoRNA-93 is processed into a microRNA-like RNA that promotes breast cancer cell invasion // *NPJ Breast Cancer. Nature Publishing Group*, 2017. Vol. 3, № 1. P. 25.
83. Liao Y. et al. Host Non-Coding RNA Regulates Influenza A Virus Replication // *Viruses. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, 2022. Vol. 14, № 1.
84. Zheng B., Zhou J., Wang H. Host microRNAs and exosomes that modulate influenza virus infection // *Virus Res. Elsevier B.V.*, 2020. Vol. 279.



85. Peng X. et al. Integrative deep sequencing of the mouse lung transcriptome reveals differential expression of diverse classes of small RNAs in response to respiratory virus infection // *MBio*. American Society for Microbiology, 2011. Vol. 2, № 6.
86. Murray J.L., Sheng J., Rubin D.H. A Role for H/ACA and C/D Small Nucleolar RNAs in Viral Replication.
87. Gu W. et al. Influenza A virus preferentially snatches noncoding RNA caps // *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. Vol. 21, № 12. P. 2067–2075.
88. Koppstein D., Ashour J., Bartel D.P. Sequencing the cap-snatching repertoire of H1N1 influenza provides insight into the mechanism of viral transcription initiation // *Nucleic Acids Res*. Oxford Academic, 2015. Vol. 43, № 10. P. 5052–5064.
89. Baldini L., Charpentier B., Labialle S. Emerging data on the diversity of molecular mechanisms involving c/d snornas // *Non-coding RNA*. MDPI AG, 2021. Vol. 7, № 2.
90. Stamm S., Lodmell J.S. C/D box snoRNAs in viral infections: RNA viruses use old dogs for new tricks // *Non-coding RNA Res*. Elsevier, 2019. Vol. 4, № 2. P. 46–53.
91. Robinson J.T. et al. Integrative genomics viewer // Nature Publishing Group. 2011.
92. Taft R.J. et al. Small RNAs derived from snoRNAs // *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Vol. 15, № 7. P. 1233–1240.
93. Kawaji H. et al. Hidden layers of human small RNAs // *BMC Genomics*. BioMed Central, 2008. Vol. 9. P. 157.
94. Taft, Ryan J et al. Small RNAs derived from snoRNAs // *RNA* vol. 2009. Vol 15, №7, P. 1233-40
95. Kishore S. et al. Insights into snoRNA biogenesis and processing from PAR-CLIP of snoRNA core proteins and small RNA sequencing // *Genome Biol*. BioMed Central, 2013. Vol. 14, № 5. P. R45.
96. Falaleeva M., Stamm S. Processing of snoRNAs as a new source of regulatory non-coding RNAs: SnoRNA fragments form a new class of functional RNAs // *BioEssays*. 2013. Vol. 35, № 1. P. 46–54.
97. Yu F. et al. p53 Represses the Oncogenic Sno-MiR-28 Derived from a SnoRNA // *PLoS One*. Public Library of Science, 2015. Vol. 10, № 6.
98. Lykke-Andersen S. et al. Human nonsense-mediated RNA decay initiates widely by endonucleolysis and targets snoRNA host genes // *Genes Dev*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014. Vol. 28, № 22. P. 2498–2517.

99. Levene R.E., Gaglia M.M. Host Shutoff in Influenza A Virus: Many Means to an End // *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2018. Vol. 10, № 9.
100. Khapersky D.A. et al. Selective Degradation of Host RNA Polymerase II Transcripts by Influenza A Virus PA-X Host Shutoff Protein // *PLoS Pathog.* Public Library of Science, 2016. Vol. 12, № 2.
101. Lim C.S., Brown C.M. Know Your Enemy: Successful Bioinformatic Approaches to Predict Functional RNA Structures in Viral RNAs // *Front. Microbiol.* Frontiers Media SA, 2017. Vol. 8, № JAN. P. 2582.
102. Lee M.K. et al. Structural features of influenza A virus panhandle RNA enabling the activation of RIG-I independently of 5'-triphosphate // *Nucleic Acids Res.* Oxford Academic, 2016. Vol. 44, № 17. P. 8407–8416.
103. Szewczak L.B.W. et al. Molecular basis for RNA kink-turn recognition by the h15.5K small RNP protein // *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005. Vol. 11, № 9. P. 1407.
104. Esguerra J., Warringer J., Blomberg A. Functional importance of individual rRNA 2'-O-ribose methylations revealed by high-resolution phenotyping // *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008. Vol. 14, № 4. P. 649.
105. Watkins N.J., Bohnsack M.T. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012. Vol. 3, № 3. P. 397–414.
106. Sloan K.E. et al. Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function // *RNA Biol.* Taylor & Francis, 2017. Vol. 14, № 9. P. 1138.
107. Dong H.J. et al. Selective regulation in ribosome biogenesis and protein production for efficient viral translation // *Arch. Microbiol.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021. Vol. 203, № 3. P. 1021–1032.
108. Bouchard-Bourelle P. et al. snoDB: an interactive database of human snoRNA sequences, abundance and interactions // *Nucleic Acids Res.* Oxford Academic, 2020. Vol. 48, № D1. P. D220–D225.
109. Taoka M. et al. Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2018. Vol. 46, № 18. P. 9289.
110. Patterson D.G. et al. Human snoRNA-93 is processed into a microRNA-like RNA that promotes breast cancer cell invasion // *npj Breast Cancer*. 2017. Vol. 3. P. 25.
111. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucleic Acids Res.* Oxford Academic, 2003. Vol. 31, № 13. P. 3406–3415.