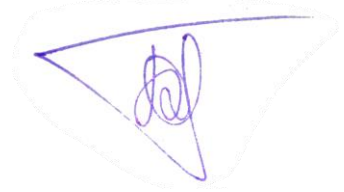


*На правах рукописи*



**БАРЯКИН ДМИТРИЙ НИКОЛАЕВИЧ**

**ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ РНК ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2015

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

Научный руководитель:

к.х.н., доцент **Семенов Дмитрий Владимирович**

Официальные оппоненты:

д.б.н. **Мордвинов Вячеслав Алексеевич**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»,

заместитель директора по научной работе

д.б.н., профессор **Щербаков Дмитрий Юрьевич**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт СО РАН,  
заведующий лабораторией

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Защита состоится « \_\_\_\_ » декабря 2015 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

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

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 г.

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



Коваль В.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Известно, что РНК содержатся во внеклеточных жидкостях высших организмов, например, в плазме крови, в плазме молока и культуральной среде, конденсированной клетками млекопитающих. При исследовании состава циркулирующих в плазме крови РНК показано, что в их наборе содержатся фрагменты всех классов клеточных РНК (Yang et al., 2011; Li et al., 2012). Циркулирующие РНК появляются во внеклеточном пространстве в результате апоптотической и некротической гибели клеток организма, а также в результате активной секреции жизнеспособными клетками (Kosaka et al., 2010). Основными формами транспорта циркулирующих РНК являются экзосомы, микровезикулы, апоптотические тельца, липопroteиды высокой плотности и свободные рибонуклеопroteидные комплексы (Tzimagiorgis et al., 2011).

Исследования биологических функций внеклеточных РНК показали, что РНК плазмы крови могут участвовать в активации процессов врожденного иммунитета и свертывания крови (Fischer et al., 2013), мРНК и микроРНК экзосом и микровезикул способны транспортироваться от одних клеток к другим и индуцировать как процессы дифференцировки клеток в норме, так и процессы метастазирования при развитии онкологических патологий (Yang et al., 2011; Umezu et al., 2013). Была обнаружена диагностическая и прогностическая значимость цРНК при различных состояниях организма: при анализе протекания беременности, при онкологических, аутоиммунных заболеваниях, диабете 1 и 2 типа, а также при нарушениях работы сердечно-сосудистой системы (Weiland et al., 2012; Reid et al., 2011).

Структура всего набора внеклеточных РНК человека и функции отдельных его компонентов в настоящее время исследованы лишь частично. При этом высокая гетерогенность и фрагментированность молекул РНК, циркулирующих в плазме крови, требуют проведения модификации стандартных протоколов подготовки биологических образцов, используемых для анализа препаратов суммарной клеточной РНК и наборов коротких некодирующих РНК. В связи с этим, проведение исчерпывающего исследования набора циркулирующих РНК человека в норме и его изменения при развитии патологических процессов является актуальной задачей современной молекулярной биологии.

### **Цель и задачи исследования:**

Целью данной работы являлось детальное описание состава РНК плазмы крови человека, поиск биологически активных форм РНК, а также характеристика изменений набора циркулирующих РНК при немелкоклеточном раке легкого.

В ходе работы необходимо было решить следующие задачи:

- Адаптировать методику конструирования кДНК-библиотек ABI SOLiD для высокопроизводительного секвенирования наборов коротких РНК ( $n \geq 19$ ) с различными вариантами расположения концевых фосфатных групп;
- Провести высокопроизводительное секвенирование РНК плазмы крови здоровых доноров и охарактеризовать набор циркулирующих РНК по представленности основных классов РНК;
- Провести высокопроизводительное секвенирование РНК плазмы крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого и определить диагностически значимые РНК плазмы крови человека;
- Сконструировать аналоги внеклеточных РНК человека и определить их влияние на биологические процессы в культуре клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

### **Научная новизна работы.**

В настоящей работе впервые проведено усовершенствование метода конструирования кДНК-библиотек, позволяющее анализировать короткие циркулирующие РНК (19-100 н.) с различным расположением концевых фосфатных групп, по технологии высокопроизводительного секвенирования ABI SOLiD. Описан состав РНК плазмы крови в норме и при немелкоклеточном раке легкого, определены наиболее представленные в плазме крови человека формы РНК. Сравнение результатов секвенирования между здоровыми донорами и пациентами с НМРЛ показало, что в наборе цРНК пациентов происходит достоверное увеличение вклада транскриптов геномных повторов, рРНК, тРНК и мРНК и достоверное снижение вклада фрагментов РНК, не аннотированных в базе данных RefSeq. Определен набор форм коротких циркулирующих РНК – потенциальных диагностически значимых маркеров рака легкого. Впервые установлено, что полученные *in vitro* аналоги циркулирующих фрагментов РНК, а также аналоги полноразмерных Alu и 7SL РНК способны снижать жизнеспособность клеток человека в культуре. Впервые проведен полнотранскриптомный анализ изменений в экспрессии генов в клетках человека, трансфицированных аналогами Alu и 7SL РНК. Полученные данные указывают на то, что механизм цитотоксического действия этих РНК связан с активацией ответа на стресс эндоплазматического ретикулума.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В рамках работы получен массив данных секвенирования РНК плазмы крови человека в норме и при раке легкого, который представляет собой основу для поиска диагностических маркеров рака легкого и новых биологически активных форм РНК. Для детекции ряда потенциальных диагностических форм РНК с помощью метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени были разработаны системы праймеров, проведена оценка параметров чувствительности и специфичности разработанных систем. В рамках данной работы проведен анализ биологического действия на культуру клеток человека нескольких форм циркулирующих РНК. Оставшиеся за пределами детального рассмотрения обнаруженные в плазме крови человека потенциальные маркеры рака легкого и биологически активные формы РНК являются перспективным объектом дальнейших научных исследований.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Набор циркулирующих РНК плазмы крови человека включает в себя фрагменты всех классов клеточных РНК. Наборы РНК плазмы крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого различаются по содержанию основных классов клеточных РНК и отдельных форм циркулирующих РНК.

2. В наборе циркулирующих РНК присутствуют формы РНК, способные влиять на жизнеспособность клеток человека. Аналоги AluYa5 и 7SL РНК индуцируют проапоптотические изменения субпопуляции клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, при этом происходит изменение транскрипции генов ответа на стресс эндоплазматического ретикулума.

**Личный вклад автора.** Основные результаты получены автором самостоятельно. Выравнивание экспериментальных последовательностей с референсными последовательностями, определение относительного вклада транскриптов, поиск новых микроРНК-подобных и антисмысловых РНК проводились совместно с научным руководителем работы, к.х.н., доцентом Семеновым Д. В.

**Публикации и апробация работы.** По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах. Результаты работы были представлены на XLVII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, Россия, 2009), II Международной конференции «Физико-химическая биология» (Новосибирск, Россия, 2011), научной конференции "Фундаментальные науки - медицине" (Новосибирск, Россия, 2009), II Международной

научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика» (Новосибирск, Россия, 2011), научной конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, Россия, 2013), а также на Третьей Школе молодых ученых «Биоинформатика и Системная биология» (Новосибирск, Россия, 2011).

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах, включает 17 рисунков и 30 таблиц. Список литературы содержит 333 источника.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе были использованы гено-инженерные методы при конструировании кДНК-библиотек для высокопроизводительного секвенирования на приборном комплексе ABI SOLiD. Для анализа данных секвенирования применили биоинформационный подход, включающий использование программных пакетов Bowtie v.0.9.6-0.12.6, Samtools v.0.1.18, Cufflinks v.2.1.1, mirDeep2, TargetScanHuman Custom и плагина ClueGo 2.1.3 для программы Cytoscape 3.1.1. Для получения аналогов РНК плазмы крови человека и исследования их влияния на клетки MCF-7 в культуре использовали молекулярно-биологические и биохимические методы, такие как обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, транскрипция *in vitro*, трансфекция культуры эукариотических клеток, МТТ-тест, проточная цитофлуориметрия, гибридизация на микрочипах. Полученные данные были обработаны статистически с помощью критериев Стьюдента, Манна-Уитни-Уилкоксона либо ROC-анализа.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **1 Определение последовательностей коротких РНК плазмы крови человека с помощью высокопроизводительного секвенирования по технологии SOLiD**

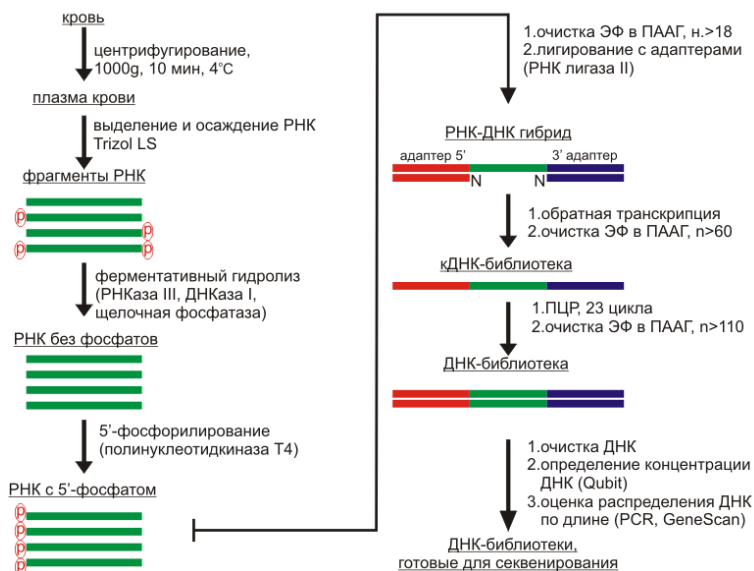
Для анализа набора РНК, циркулирующих в плазме крови человека, нами была подобрана группа доноров без выявленных онкологических, аутоиммунных и острых инфекционных заболеваний, а также группа пациентов с немелкоклеточным раком легкого на ранних стадиях заболевания (Табл. 1). Образцы крови пациентов забирали до начала проведения медикаментозного и оперативного лечения. При взятии образцов крови у здоровых доноров и пациентов с НМРЛ было получено добровольное информированное согласие.

Для конструирования полнотранскриптомных кДНК-библиотек РНК плазмы крови мы использовали набор SOLiD Total RNA-seq (Applied Biosystems, США). В стандартный протокол, рекомендованный производителем для конструирования кДНК-библиотек суммарной клеточной РНК, был внесен ряд модификаций. Для того чтобы полученные кДНК-библиотеки содержали копии РНК с разными вариантами расположения фосфатной и гидроксильной групп на 5'- и 3'-концах, в стандартный протокол конструирования были добавлены стадии дефосфорилирования и 5'-фосфорилирования РНК. Для минимизации вклада побочных продуктов конструирования и снижения вклада коротких РНК ( $n < 19$  н.) в кДНК-библиотеках, к стандартному протоколу добавлены дополнительные стадии очистки РНК ( $n > 19$  н.) и амплифицированных кДНК-библиотек ( $n > 110$  п.н.) с помощью ЭФ в ПААГ и последующей элюции НК из геля (Рис. 1).

**Таблица 1. Характеристика доноров крови.**

Здоровые доноры			Пациенты с НМРЛ				
№	Возраст	Пол	№	Возраст	Пол	Диагноз	TNM* стадия заболевания
Д1	22	М	П9	51	М	Плоскоклеточный рак	T2N0M0
Д2	32	Ж	П10	52	М	Плоскоклеточный рак	T2N1M0
Д3	32	М	П11	59	М	Плоскоклеточный рак	T2NxM0
Д4	53	Ж	П12	64	Ж	Аденокарцинома	T1NxM0
Д5	53	М	П13	56	Ж	Аденокарцинома	T2N0M0
Д6	20	Ж	П14	63	М	Плоскоклеточный рак	T2N0M0
Д7	39	М	П15	62	М	Аденокарцинома	T2N0M0
Д8	41	Ж	П16	49	М	Аденокарцинома	T1N0M0

\*международная классификация стадий злокачественных новообразований (T - распространённость первичной опухоли, N - наличие, отсутствие и распространённость метастазов в регионарных лимфатических узлах, M - наличие или отсутствие отдалённых метастазов).



**Рис. 1.** Схема конструирования кДНК-библиотек РНК плазмы крови для анализа методом высокопроизводительного секвенирования на платформе SOLiD. Для конструирования использовали набор Total RNA-seq (Applied Biosystems, США). К стандартному протоколу конструирования кДНК-библиотек на основе суммарной клеточной РНК были добавлены стадии дефосфорилирования и 5'-фосфорилирования РНК, а также дополнительные стадии очистки НК с помощью ЭФ в ПААГ.

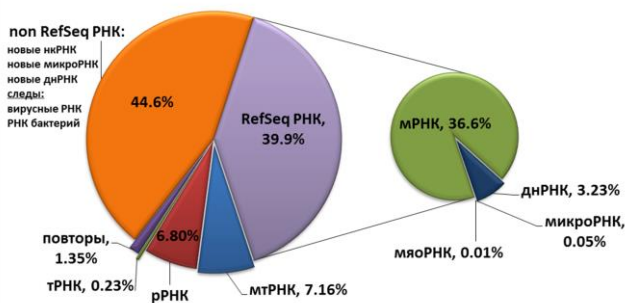
Полученные кДНК-библиотеки амплифицировали в водно-масляной эмульсии на магнитных микрочастицах, проводили обогащение на полистироловых микрочастицах, иммобилизовали целевые конструкции на стеклянные пластины и проводили циклы лигирования и детекции по технологии ABI SOLiD в ЦКП "Геномика"

СО РАН. В результате секвенирования было получено от 32 до 87 млн последовательностей на кДНК-библиотеку.

### 1.1 Относительный вклад основных групп транскриптов в набор РНК плазмы крови человека

Для поиска предшественников циркулирующих фрагментов РНК мы использовали программный пакет Bowtie (Langmead et al., 2009). Выравнивание массива данных высокоэффективного параллельного секвенирования проводили последовательно, с использованием последовательности мтДНК (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/251831106>), базы данных повторяющихся элементов Repbase (Jurka et al., 2005) и human RefSeq RNA ([ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Homo\\_sapiens/RNA/](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Homo_sapiens/RNA/)). Предшественники РНК, не имеющие гомологов среди известных, аннотированных транскриптов человека, определяли с использованием баз данных генома человека (GRCh37/hg19, [ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Homo\\_sapiens](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Homo_sapiens)).

Классификация фрагментов циркулирующих РНК позволила подтвердить, что плазма крови содержит фрагменты основных классов РНК клеток человека (Yang et al., 2011; Li et al., 2012) (Рис. 3). При этом установлено, что набор РНК плазмы крови значительно отличается от ожидаемого набора продуктов частичного гидролиза суммарной РНК клеток человека: вклад фрагментов рРНК в набор циркулирующих РНК (6.8%, Рис. 9) существенно ниже, чем вклад рРНК в суммарную клеточную РНК (> 80%, Moss et al., 1995). Вклад митохондриальных транскриптов (7.2%, Рис. 9) был повышен относительно вклада мтРНК в суммарную клеточную РНК (менее 2%) и сравним с вкладом мтРНК в обогащенную, поли-А-фракцию клеточных РНК (в зависимости от типа ткани значения варьируют от 5% до 30%; Mercer et al., 2011).



**Рис. 2.** Распределение циркулирующих РНК плазмы крови человека по основным классам клеточных РНК. Приведены усредненные значения вклада РНК различных классов по результатам анализа массива данных секвенирования здоровых доноров.

Сравнение представленности циркулирующих РНК между группами здоровых доноров и онкологических пациентов по основным классам клеточных РНК показало, что у пациентов происходит достоверное ( $P < 0.05$ ) изменение вклада основных групп клеточных транскриптов, за исключением митохондриальных транскриптов (Табл. 2). При этом увеличение вклада рРНК и тРНК не было обусловлено изменением уровня одного или нескольких выделенных фрагментов этих РНК, а характеризовало изменения большинства форм рРНК и тРНК (Табл. 2).

**Таблица 2.** Вклад основных классов клеточных РНК в общий набор РНК плазмы крови в группах здоровых доноров и пациентов с НМРЛ.

	<b>Здоровые доноры, %</b>	<b>НМРЛ, %</b>	<b>P**</b>
<b>мтДНК</b>	7.2 ± 8.1	3.1 ± 2.3	0.357
<b>рРНК</b>	6.8 ± 5.2	12 ± 2.4	0.033
<b>тРНК</b>	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.4	0.041
<b>повторы*</b>	1.4 ± 0.5	3.9 ± 1.7	0.001
<b>RefSeq</b>	40 ± 3.8	48 ± 7.6	0.020
<b>Non RefSeq</b>	45 ± 9.1	32 ± 4.7	0.005

\*фрагменты транскриптов геномных повторов человека

\*\*значения вероятности для U-критерия Манна - Уитни – Уилкоксона

## 1.2 Описание форм РНК плазмы крови человека по классам

### 1.2.1 МикроРНК

При анализе данных высокоэффективного секвенирования РНК плазмы крови нами установлено, что вклад микроРНК в массив данных варьирует от 0.03% до 0.11% у здоровых доноров (в среднем 0.05%) и от 0.05% до 0.5% у пациентов с НМРЛ (в среднем 0.12%). В Табл. 3 представлены формы микроРНК в порядке убывания вклада в массив данных секвенирования (в терминах FPKM – фрагментов на тысячу оснований транскрипта, на миллион картированных последовательностей, Trapnell et al., 2010).

**Таблица 3.** Зрелые микроРНК, выявленные в массиве данных высокопроизводительного секвенирования РНК плазмы крови здоровых доноров.

<b>Ранг*</b>	<b>микроРНК</b>	<b>FPKM 10<sup>-5</sup>**</b>	<b>SD FPKM 10<sup>-5</sup>***</b>
1	hsa-miR-223-3p	103	114
2	hsa-miR-191-5p	31.7	28.7
3	hsa-miR-24-3p	27.3	28.4
4	hsa-miR-451a	8.79	6.84
5	hsa-miR-103a-3p	8.53	9.02
6	hsa-miR-107	7.38	7.63
7	hsa-miR-26a-5p	6.45	4.75
8	hsa-miR-185-5p	6.35	4.33
9	hsa-miR-126-3p	4.43	3.10
10	hsa-miR-23b-3p	4.33	3.65
11	hsa-miR-23a-3p	3.71	3.80
12	hsa-miR-21-5p	3.62	3.27
14	hsa-miR-320d	3.43	4.84
15	hsa-miR-10b-5p	2.77	1.91
17	hsa-miR-140-3p	2.72	1.59
19	hsa-miR-145-5p	2.18	1.34
20	hsa-miR-320e	2.11	2.72
21	hsa-miR-17-5p	1.80	1.19
24	hsa-miR-409-3p	1.30	0.93
26	hsa-miR-942	1.00	2.63
28	hsa-miR-126-5p	0.80	0.46
29	hsa-miR-146a-5p	0.75	0.60
30	hsa-miR-425-5p	0.73	0.50

\*представлены данные для зрелых форм микроРНК; в таблице не представлены данные по микроРНК hsa-miR-3920, hsa-miR-1281, hsa-miR-4306, hsa-miR-4295, hsa-miR-4291, hsa-miR-3675-3p, hsa-miR-4271, так как анализ их содержания в субфракциях крови в работах (Hunter et al., 2008; Vickers et al., 2011; Argoyo et al., 2011) не проводили.

\*\*FPKM - фрагментов зрелых микроРНК на тысячу оснований транскрипта, на миллион картированных последовательностей  
\*\*\*стандартное отклонение FPKM



Установлено, что наиболее представленные микроРНК плазмы крови человека, микроРНК-223-3р, -191-5р, -26а-5р, -24-3р, -126-3р, -126-5р и -146а-5р (Табл. 3), являются одними из наиболее представленных микроРНК микровезикул крови человека (Hunter et al., 2008). В независимом исследовании показано, что микроРНК-223-3р, -191-5р, -126-3р, -126-5р и -146а-5р также являются одними из наиболее представленных микроРНК экзосом крови человека (Vickers et al., 2011).

МикроРНК-223-3р, -451а, -24-3р, -126-3р, -17-5р и -126-5р также являются одними из наиболее представленных микроРНК ЛВП крови человека (Vickers et al., 2011). Последовательности, совпадающие с микроРНК-135а, а также с микроРНК-936 (наиболее представленные микроРНК ЛВП), также входят в полученный нами набор данных секвенирования, но не на лидирующих позициях (350 и 153, соответственно). Эти данные указывают на то, что РНК, связанные с ЛВП, вносят гораздо меньший вклад в набор суммарных циркулирующих РНК плазмы крови человека, чем экзосомы и микровезикулы.

В противоположность данным (Hunter et al., 2008; Vickers et al., 2011), в работе (Arroyo et al., 2011) показано, что неvesикулярная фракция рибонуклеопротеинов, циркулирующих в плазме крови человека, обогащена по микроРНК-223-3р, -24-3р, -451а, в то время как микроРНК-191-5р, -126-3р и -126-5р обнаружены как в составе экзосом, так и в составе свободных рибонуклеопротеидов.

Можно заключить, что наборы микроРНК плазмы крови представляют собой сложную и вариабельную суперпозицию микроРНК и экзосом, и микровезикул, и липопротеидов, и свободных рибонуклеопротеидов. Однако наиболее близко состав микроРНК плазмы соотносится с набором микроРНК микровезикул и экзосом крови человека (Hunter et al., 2008; Vickers et al., 2011). Поэтому наши данные в совокупности с данными литературы позволяют предположить, что микровезикулы и экзосомы вносят значительный вклад в общий набор не только микроРНК, но и других классов циркулирующих РНК.

### 1.2.2 мРНК

Белок-кодирующие транскрипты в образцах плазмы крови были представлены вариабельным набором фрагментов. Анализ распределения экспериментальных последовательностей по длине мРНК, а также сравнительный анализ вклада фрагментов 5'-НТР (нетранслируемый регион), кодирующей области и 3'-НТР позволил выявить достоверное увеличение вклада ( $P < 10^{-5}$ ) фрагментов 5'-НТР, относительно кодирующей области и 3'-НТР мРНК (Табл. 4). Эти данные указывают на повышенную сохранность 5'-НТР мРНК в системной циркуляции. Отсутствие полного покрытия мРНК фрагментами, циркулирующими в плазме крови, и пониженное покрытие кодирующей области (Табл. 4) не позволяет делать выводы о целостности мРНК в плазме и наличии кодирующего потенциала циркулирующих РНК.

**Таблица 4.** Распределение экспериментальных последовательностей между транслируемым и нетранслируемыми районами мРНК.

	<b>ФПКМ*</b>	<b>SD ФПКМ</b>
5'-НТР	1786**	24368
Кодирующая область	42	238
3'-НТР	381	7563

\*среднее значение ФПКМ для мРНК с покрытием экспериментальными последовательностями больше 0; SD - стандартное отклонение

\*\*показано достоверное различие значений ФПКМ для 5'-НТР, кодирующей области и 3'-НТР при попарном сравнении с помощью t-критерия Стьюдента,  $P < 10^{-5}$

Среди 20 наиболее представленных (ФПКМ) в плазме крови мРНК содержатся мРНК генов рибосомных белков (*RPS7, MRPS15*); мРНК транскрипционных факторов (*HOXC4, HOXC6, TAF9*); регуляторных киназ/фосфатаз (*DUSP, BRSK1*), а также мРНК гормона окситоцина и фрагменты мРНК дефензинов - пептидов иммунной системы (*DEFB128, DEFB131, DEFB108B*). Проведенный с помощью базы данных GNF Atlas 2 (Su et al., 2004) анализ клеточной и тканевой специфичности циркулирующих фрагментов мРНК показал, что среди 20 наиболее представленных мРНК отсутствуют мРНК, экспрессия которых специфична только для форменных элементов крови (эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов). При этом только одна мРНК (*LOH12CR1*) специфично экспрессируется в незрелых эритроцитах. Установлено, что пять наиболее представленных мРНК тромбоцитов человека *B2M, NRGN, PPBP, PF4, OST4*, (Rowley et al., 2011) содержатся в полученном нами наборе наиболее представленных мРНК плазмы крови на позициях с 46 по 328. Поэтому можно заключить, что полученные нами препараты РНК содержат лишь незначительные количества РНК, появляющихся в препаратах плазмы в результате лизиса форменных элементов крови.

С помощью анализа генной онтологии 100 наиболее представленных мРНК плазмы крови здоровых доноров установлено, что набор мРНК плазмы обогащен ( $P < 0.01$ ) фрагментами мРНК генов, продукты которых локализуются преимущественно внутри секреторных альфа-гранул тромбоцитов (Табл. 5). Принимая во внимание отсутствие достоверного обогащения фрагментами мРНК, характерных для тромбоцитов в целом, можно предположить существование избирательных механизмов секреции из тромбоцитов во внеклеточное пространство фрагментов тех мРНК, продукты которых связаны с секреторными альфа-гранулами.

Набор мРНК плазмы также обогащен ( $P < 0.01$ ) фрагментами мРНК секретируемых катионных белков иммунной системы семейства бета-дефензинов (Табл. 5). Бета-дефензины экспрессируются лейкоцитами и эпителиальными клетками в различных органах и тканях при ответе на провоспалительные факторы (Yamaguchi et al., 2012). Обогащение набора циркулирующих мРНК по фрагментам бета-дефензинов можно объяснить тем, что клетки, продуцирующие дефензины, являются источником внеклеточных РНК человека.

**Таблица 5.** Анализ генной онтологии (GeneOntology) 100 мРНК с наибольшим вкладом фрагментов в набор РНК плазмы крови здоровых доноров.

ГО-аннотация	P*	Ассоциированные гены
spinal cord development	0.0021	<i>DNAAF3, DPYSL2, LHX5, SUFU</i>
hindbrain morphogenesis	0.0026	<i>DNAAF3, HES1, LHX5</i>
secretory granule lumen	0.0020	<i>PF4, TGFB1, TMSB4X</i>
platelet alpha granule lumen	0.0031	
platelet alpha granule	0.0031	
small ribosomal subunit	0.0031	<i>MRPS15, RPS26, RPS7</i>
Beta defensins	0.0024	<i>DEFB108B, DEFB128, DEFB131</i>
Defensins	0.0026	

\*значение P скорректировано по Бонферрони

### 1.2.3 Митохондриальные РНК

Глубина покрытия митохондриальной ДНК фрагментами РНК, циркулирующими в плазме крови человека, составляет от 4.2 до 880 прочтений на нуклеотид мтДНК. Такая высокая глубина покрытия мтДНК экспериментальными последовательностями, вероятно, является результатом высокой стабильности мтРНК в

циркуляции. Это позволяет предположить, что препараты плазмы содержали целые или незначительно поврежденные митохондрии, находящиеся вне клеток.

С помощью метода ОТ-ПЦР митохондриальные РНК ранее были обнаружены в плазме крови пациентов с раком и доброкачественной опухолью простаты, при этом наблюдалась корреляция между уровнем мтДНК и мтРНК в плазме крови (Mehra et al., 2007). Известно, что основными формами транспорта цРНК являются апоптотические тельца, микровезикулы и экзосомы, а также ЛВП (Zernecke et al., 2009; Hunter et al., 2008; Vickers et al., 2011). Однако отсутствие митохондриальных липидов и белков в экзосомах (Wubbolts et al., 2003; Mears et al., 2004) указывает на низкую вероятность циркуляции митохондриальной РНК в составе экзосом.

Известно, что при созревании ретикулоцитов млекопитающих происходит выталкивание покрытых мембраной частиц, содержащих митохондрии (Gronowicz et al., 1984). Митохондрии также были обнаружены внутри цитоплазматических микровезикул клеток карциномы почки (Tickoo et al., 2000). Показано, что митохондриальные белки содержатся в микровезикулах и апоптотических тельцах Т-лимфоцитов (Turiak et al., 2011). Эти данные указывают на то, что апоптотические тельца и микровезикулы являются основными формами транспорта внеклеточных митохондрий. Поэтому митохондриальная РНК может служить маркером крупных мембранных частиц крови, таких как микровезикулы и апоптотические тельца.

#### 1.2.4 Длинные некодирующие РНК

В результате секвенирования РНК плазмы крови человека нами обнаружены фрагменты длинных некодирующих РНК (днРНК) человека, аннотированных в базах данных RefSeq и GENECODE (Табл. 6). Набор днРНК, фрагменты которых обнаружены в плазме крови человека, включает в себя межгенные днРНК, псевдогены, антисмысловые транскрипты, нетранслируемые сплайс-варианты мРНК, а также интронные формы днРНК и хост-гены коротких некодирующих РНК. В настоящее время известны биологические функции лишь небольшого количества днРНК (287 днРНК, по данным на 2015 г., <http://www.lncrnadb.org/>), однако функции фрагментов днРНК неизвестны.

**Таблица 6.** Наиболее представленные в плазме крови здоровых доноров днРНК, аннотированные в базах данных human RefSeq RNA и GENECODE.

Обозначение	Идентификатор*	FPKM**	CO, FPKM***	Подкласс
SOX2OT	NR_004053	2291	4621	межгенная днРНК
SMEK3P	NR_002784	1243	2010	псевдоген
SRRM2-AS1	NR_027275	542	779	антисмысловая днРНК
HOXC5	NR_003084	511	1072	нетранслируемый сплайс-вариант мРНК
BCYRN1	NR_001568	243	341	межгенная днРНК
AC097500.2	ENST00000427108.1	5596	14180	межгенная днРНК
EGFLAM-AS2	ENSG00000248572.1	1081	1839	антисмысловая днРНК
AC005682.5	ENST00000432668.1	1000	1844	межгенная днРНК
5S_rRNA	ENSG00000261122.2	891	2193	повтор 5S рРНК
RP11-717A5.2	ENST00000610137.1	678	1101	антисмысловая днРНК

\*идентификатор транскрипта в базе данных human RefSeq RNA либо GENECODE

\*\*среднее значение FPKM для здоровых доноров

\*\*\*стандартное отклонение FPKM

Среди обнаруженных нами в плазме крови РНК, неаннотированных в геномных базах данных (Рис. 2), также могут содержаться фрагменты новых форм днРНК. Для идентификации новых форм протяженных транскриптов, предполагаемых

предшественников РНК плазмы, мы использовали программный пакет Cufflinks. В результате работы программы получен массив данных, в который входят межгенные, интронные, антисмысловые транскрипты, промотор- и терминатор-ассоциированные транскрипты, а также транскрипты геномных повторов человека (всего 79,607 потенциальных новых форм РНК).

Среди них обнаружено 1669 форм РНК, координаты которых перекрываются с координатами известных РНК человека (human RefSeq RNA) - новых антисмысловых РНК. При этом значительную экспрессию (> 100 прочтений) большей части обнаруженных форм наблюдали только в одиночных образцах. 27 транскриптов обнаружены в 50% и более образцов плазмы крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ.

Из Табл. 7 видно, что методом ОТ-ПЦР подтверждено присутствие 6 новых форм антисмысловых РНК в плазме крови и в форменных элементах крови человека. Присутствие еще 4 форм антисмысловых РНК было подтверждено только в форменных элементах крови. Результаты проведенных экспериментов подтверждают показанные ранее в работе (Djebali et al., 2012) высокую вариабельность и низкий уровень экспрессии днРНК человека, а также то, что форменные элементы крови являются вероятным источником циркулирующих днРНК.

**Таблица 7.** Фрагменты антисмысловых транскриптов, выявленные в плазме и форменных элементах крови человека.

Комплементарный ген	Подтвержден независимым анализом РНК методом ОТ-ПЦР*	
	в форменных элементах	в плазме крови
<b>LOC100507217</b> - uncharacterized long non-coding RNA	+	+
<b>GDNF</b> - glial cell derived neurotrophic factor	+	-
<b>P4HA1</b> - prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	+	-
<b>STX7</b> - syntaxin 7	-	-
<b>GTF3C2</b> - general transcription factor IIIc, polypeptide 2, beta	+	+
<b>NOG</b> - noggin	+	+
<b>CENPK</b> - centromere protein K	+	+
<b>TGFBR2</b> - transforming growth factor, beta receptor II	-	-
<b>MIR663AHG</b> - MIR663A host gene, long non-coding RNA **	+	-
<b>FAT3</b> - FAT atypical cadherin 3	+	+
<b>XPRI</b> - xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1	+	-
<b>VHL</b> - von Hippel-Lindau tumor suppressor-like	+	+

\*для подтверждения присутствия РНК использовали критерии, аналогичные (Shen et al., 2010)

\*\*обнаруженная антисмысловая РНК перекрывается с has-miR-mizuguchi-146 (идентификатор GenBank: AB372718)

### 1.2.5 Новые микроРНК-подобные формы

Для поиска новых микроРНК-подобных форм РНК, неаннотированных в базах данных human RefSeq RNA и MirBase, мы использовали программный пакет mirDeep2 (Friedlander et al., 2012).

В результате работы программы mirDeep2 были выявлены 824 новых микроРНК-подобных формы. Для дальнейшего анализа нами были выбраны формы, представленные в библиотеках не менее чем 100 копиями и с параметром EPTP не менее 60%. Для дальнейшего рассмотрения мы отобрали последовательности с характерной для пре-

микроРНК шпилечной вторичной структурой, которые не были выравнены на участки генома человека, содержащие фрагменты повторяющихся последовательностей (Alu, L1, MIR и др.).

Из Табл. 8 видно, что из 10 тестируемых микроРНК-подобных форм присутствие 6 форм было детектировано в препаратах суммарных РНК клеток крови человека и в препаратах плазмы крови человека. Принимая во внимание высокую стабильность микроРНК в системной циркуляции (Chen et al., 2008) и значительный регуляторный потенциал внеклеточных микроРНК, можно предположить, что обнаруженные нами новые микроРНК-подобные формы способны принимать участие в регуляции стабильности и трансляции мРНК-мишеней в клетках-акцепторах.

Потенциальную регуляторную роль обнаруженных микроРНК-подобных форм оценили с помощью программного пакета TargetScanHuman Custom ([http://www.targetscan.org/vert\\_50/seedmatch.html](http://www.targetscan.org/vert_50/seedmatch.html)). Обнаружено, что в набор потенциальных мРНК-мишеней микроРНК-подобных форм входят мРНК протоонкогена *MAF*, фактора сплайсинга пре-мРНК *SFRS3*, а также мРНК транскрипционного фактора *NR2C2*, принимающего участие в регуляции развития нервной, мышечной и костной ткани, рака простаты и метаболических процессов (Lin et al., 2014). Установлено, что все шесть подтвержденных методом ОТ-ПЦР микроРНК-подобных формы потенциально принимают участие в регуляции мРНК гена *TNRC6B*, продукт которого входит в семейство белков GW182. Показано, что белки семейства GW182 способствуют связыванию деаденилазного комплекса с полиА-хвостом мРНК-мишени и необходимы для микроРНК-зависимой репрессии трансляции и миРНК-зависимого гидролиза комплементарных мРНК-мишеней белками семейства AGO (Braun et al., 2011).

Согласно проведенному с помощью плагина ClueGo для программы Cytoscape анализу геномной онтологии продукты потенциальных мРНК-мишеней новых микроРНК-подобных форм принимают участие в регуляции множества ключевых клеточных процессов, таких как метилирование и убиквитинирование белков, транспорт и разрушение мРНК, а также в развитии и дифференцировке нервной, мышечной и легочной тканей организма.

**Таблица 8.** Новые микроРНК-подобные формы, выявленные в плазме и форменных элементах крови человека

Геномные координаты зрелой формы РНК	Подтвержден независимым анализом РНК методом ОТ-ПЦР*	
	в форменных элементах	в плазме крови
chr16:49,975,771-49,975,793 (-)	+	+
chr14:47,706,338-47,706,360 (-)	-	-
chr8:70,015,239-70,015,261 (+)	-	-
chr12:29,171,592-29,171,614 (+)	+	+
chr9:80,136,453-80,136,475 (+)	-	-
chr2:84,977,939-84,977,961 (-)	+	+
chr7:51,918,067-51,918,089 (+)	+	+
chr4:146,901,775-146,901,797 (+)	+	+
chr12:5,148,529-5,148,551 (-)	+	+
chr6:71,771,107-71,771,129 (-)	-	-

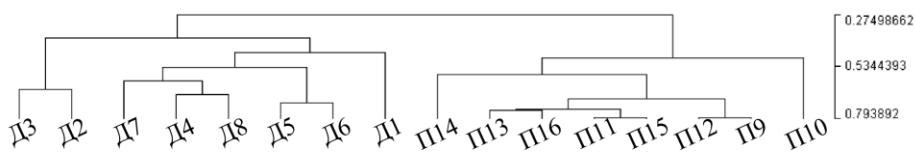
\*для подтверждения присутствия РНК использовали критерии, аналогичные (Shen et al., 2010)

### 1.3 Сравнение вклада отдельных форм РНК плазмы крови здоровых

#### доноров и пациентов с НМРЛ

Сравнительный кластерный анализ представленности индивидуальных микроРНК показал, что наборы микроРНК плазмы крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ образуют два отдельных кластера с коэффициентом корреляции Спирмена  $\sim 0.275$  (Рис. 3). При этом корреляционный анализ не выявил сходства наборов РНК внутри группы здоровых доноров по возрасту и полу, а также сходства по гистологическому типу опухоли внутри группы пациентов с НМРЛ.

Аналогичные данные по кластеризации наборов транскриптов получены также для других классов циркулирующих РНК – фрагментов мРНК и днРНК. Эти данные указывают на то, что в наборе циркулирующих РНК, обнаруженных нами в плазме крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, присутствуют потенциальные диагностические формы РНК, различие в представленности которых может быть определено молекулярно-биологическими методами.



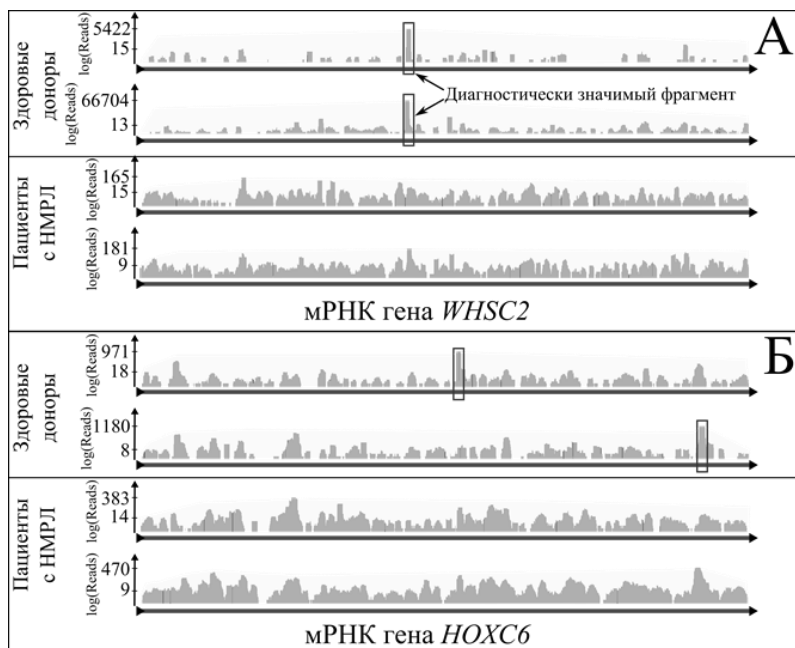
**Рис. 3.** Сравнительный кластерный анализ представленности индивидуальных микроРНК (пре-микроРНК) в массивах данных высокопроизводительного секвенирования, проведенный с помощью программного пакета MEV v.4.7.4. Для анализа использованы данные о представленности (FPKM) всего набора пре-микроРНК в массиве данных Human RefSeq RNA. Кластеризация проведена по методу ранговой корреляции Спирмена.

Для того чтобы выявить и охарактеризовать наиболее значимые различия в наборах РНК плазмы крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ, нами был проведен анализ вклада отдельных форм РНК (FPKM) в массивах данных высокопроизводительного секвенирования. Было обнаружено, что представленность 567 транскриптов (319 RefSeq РНК, 233 зрелых формы микроРНК и 15 новых РНК, не аннотированных в базе данных RefSeq) в плазме крови достоверно различается между группами здоровых доноров и пациентов с мелкоклеточным раком легкого ( $P < 0.01$ , критерий Манна-Уитни-Уилкоксона).

Выявленные транскрипты, потенциальные маркеры рака легкого, подвергли дополнительному анализу с использованием следующих критериев: отличие в представленности транскриптов обусловлено разницей количества прочтений одного и того же фрагмента транскрипта (принцип использования критерия иллюстрирован на Рис. 4); индивидуальный фрагмент РНК представлен не менее чем 100 экспериментальными последовательностями в кДНК-библиотеках РНК здоровых доноров либо пациентов с НМРЛ (допускается исключение для одной кДНК-библиотеки); фрагменты не содержат одно и динуклеотидные повторы с  $n > 4$ .

Для анализа изменения относительного содержания выбранных РНК в препаратах плазмы был проведен подбор систем праймеров и условий проведения ОТ-ПЦР с использованием суммарной РНК плазмы крови здоровых доноров. Определен набор фрагментов РНК плазмы крови с наибольшим диагностическим потенциалом, включающий фрагменты мРНК генов *WHSC2* (NELFA, компонент фактора негативной регуляции элонгации РНК полимеразой II) и *MRPS17* (белок малой субъединицы митохондриальных рибосом), а также микроРНК miR-29a, участвующая в регуляции

ключевых клеточных процессов, таких как дифференцировка, апоптоз, иммунные процессы и клеточный цикл (Fiserova et al., 2014) и микроРНК-451, принимающая участие в дифференцировке эритроцитов в норме (Masaki et al., 2007). В качестве контроля был выбран фрагмент мРНК гена *CENPB* (высококонсервативный ДНК-связывающий белок, участвующий в формировании центромера).



**Рис. 4.** Анализ распределения экспериментальных последовательностей по мРНК гена *WHSC2* (NM\_005663) (А) и *HOXC6* (NM\_153693) (Б), направленный на поиск диагностически значимых фрагментов РНК. Построение распределения экспериментальных данных проводили с помощью программы IGV v.2.1.20. "Reads" – количество экспериментальных последовательностей. Прямоугольной рамкой выделены максимумы распределения экспериментальных последовательностей. Стрелками указан диагностически значимый фрагмент мРНК *WHSC2*. Диагностически значимых фрагментов мРНК *HOXC6* не обнаружено.

Для анализа диагностической значимости обнаруженных в плазме крови РНК-маркеров НМРЛ мы проводили ОТ-ПЦР РНК плазмы крови здоровых доноров и пациентов с НМРЛ (Табл. 9). Нормализацию данных проводили по методу  $\Delta\Delta Ct$  (Livak et al., 2001), с помощью внутреннего контроля – фрагмента мРНК *CENPB* ( $\Delta Ct_x = Ct_x - Ct_{CENPB}$ ). Сравнительный анализ результатов ОТ-ПЦР показал достоверную разницу между группами здоровых доноров и пациентов с НМРЛ по индивидуальным маркерам микроРНК-451, *WHSC2* и микроРНК-29а ( $P < 0.01$ , критерий Манна-Уитни-Уилкоксона) (Табл. 9). Диагностическую значимость разработанных систем оценили с помощью ROC-анализа (receiver operating characteristic, операционная характеристика приёмника) (Zweig et al., 1993; Florkowski et al., 2008). В результате проведения ROC-анализа были получены значения AUC (Area under the curve, площадь под кривой) для индивидуальных маркеров микроРНК-451, *WHSC2*, микроРНК-29а, *MRPS17* (Табл. 9). Известно, что чем ближе

значение AUC к 1, тем более точным является маркер (Florkowski et al., 2008). Из Табл. 9 видно, что наибольшее значение AUC (0.97) соответствует РНК-маркеру *WHSC2*.

Ранее было показано, что концентрация микроРНК-451 снижена в плазме крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого (Boeri et al., 2011). Известно также, что микроРНК-451 является онкосупрессором и гиперэкспрессия этой микроРНК вызывает снижение пролиферации клеток аденокарциномы легкого A549 (Wang et al., 2011). Использование микроРНК-451 в качестве диагностического маркера также было предложено для пациентов с раком желудка (Konishi et al., 2012).

Таким образом, в данной работе была подобрана ОТ-ПЦР система для анализа микроРНК-451, фрагмента мРНК *WHSC2*, микроРНК-29а и контрольной РНК – фрагмента мРНК *CENPB*, в плазме крови человека. Использование этой системы при анализе РНК плазмы крови группы пациентов с НМРЛ и группы здоровых доноров позволяет выявлять НМРЛ с чувствительностью и специфичностью более 80%. Наши данные показывают, что микроРНК-451, микроРНК-29а, а также фрагменты мРНК *WHSC* и *CENP* могут быть использованы для дальнейшей разработки ОТ-ПЦР систем диагностики злокачественных новообразований легкого.

**Таблица 9.** Тестирование РНК плазмы крови здоровых доноров и группы пациентов с НМРЛ с помощью разработанного прототипа диагностической тест-системы.

Маркер	Здоровые доноры*	Пациенты НМРЛ*	p**	AUC ***	Чувствительность****	Специфичность
<b>mir451</b>	8.0±2.2	14.7±4.6	0.0086	0.91	80%	82%
<b>WHSC2</b>	10.4±0.8	13.3±1.2	0.0014	0.97	100%	82%
<b>mir29-a</b>	17.7±2.0	22.5±3.9	0.0034	0.85	80%	82%
<b>MRPS17</b>	6.2±1.8	6.4±0.9	0.4869	0.51	---	---

\*представлены средние нормализованные значения  $\Delta Ct \pm$  стандартное отклонение среднего  $\Delta Ct$ , рассчитанные по формуле  $\Delta Ct_X = Ct_X - Ct_{CENP}$ , где X-маркер.

\*\*значения вероятности для U-критерия Манна-Уитни–Уилкоксона.

\*\*\*площадь под кривой, вычисляемая при проведении ROC-анализа (Florkowski et al., 2008).

\*\*\*\*указаны значения чувствительности и специфичности, получаемые при решении задачи нахождения максимума суммы (чувствительность + специфичность).

## 2 Биологические свойства РНК плазмы крови человека

Известно, что внеклеточные короткие РНК могут влиять на экспрессию генов по рецептор-опосредованному механизму и механизму РНК-интерференции. Так, например, вирусные РНК способны индуцировать пути врожденного иммунного ответа при взаимодействии с рецепторами TLR3 и TLR7 (Takeda et al., 2005), а инкубация культуры клеток с комплексами ЛВП-микроРНК-223 приводит к снижению экспрессии репортерного гена люциферазы (Vickers et al., 2011). Известно также, что протяженные кодирующие РНК (мРНК) могут транспортироваться по кровяному руслу, проникать в клетки-реципиенты и транслироваться с образованием чужеродных для клетки-реципиента белковых молекул (Valadi et al., 2007; Yuan et al., 2009). Вместе с тем, влияние некодирующих внеклеточных РНК на жизненно важные процессы в клетках человека исследовано лишь частично.

Ранее нами определены последовательности нескольких форм РНК плазмы крови человека, среди которых обнаружены фрагменты рРНК, тРНК, мяоРНК, пре-мРНК, а также микроРНК-подобные малые РНК. Чтобы определить влияние внеклеточных РНК на клетки человека, мы синтезировали серии аналогов таких РНК и оценили их действие на жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 в культуре.



## 2.1 Снижение жизнеспособности клеток MCF-7 под действием аналогов

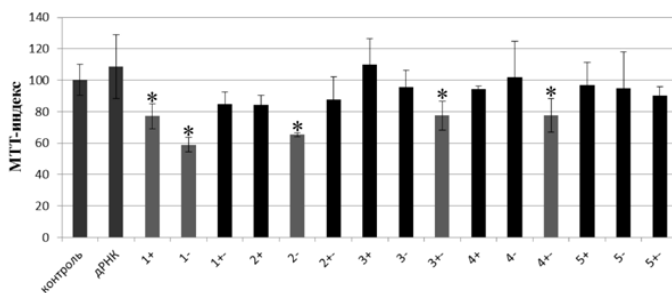
### РНК плазмы крови человека

Аналоги обнаруженных ранее в плазме крови фрагментов клеточных РНК (Табл. 10) синтезировали с помощью транскрипции нуклеотидных конструкций, содержащих последовательности ДНК, комплементарные циркулирующим РНК, в системе *in vitro*. Анализ влияния аналогов РНК плазмы на изменение жизнеспособности клеток MCF-7 проводили с помощью МТТ-теста.

Из Рис. 5 видно, что наибольшее понижение жизнеспособности клеток MCF-7 (40%) вызывал комплементарный аналог Alu РНК ("1-"). Комплементарный аналог фрагмента экзона гена эпиплакина ("2-") вызывал снижение жизнеспособности клеток MCF-7 на 35%, а РНК/РНК дуплекс L1-повтора ("3±"), двуцепочечный фрагмент днРНК RP11-19P22.5 ("4±") и прямой аналог Alu РНК ("1+") - на 20% (Рис. 5).

**Таблица 10.** Предполагаемые геномные предшественники внеклеточных РНК плазмы крови человека.

№	Позиция в геноме (hg19)	Описание
1.	Хромосома 10 (126,702,871 - 126,702,980)	Alu-повтор в интроне пре-мРНК белка 2, связывающего С-конец ( <i>CTBP2</i> )
2.	Хромосома 8 (144,944,466 - 144,944,488)	фрагмент мРНК гена эпиплакина 1 ( <i>EPPK1</i> )
3.	Хромосома 13 (58,561,232 - 58,561,341)	фрагмент второй рамки считывания повтора L1MA5
4.	Хромосома 17 (25,988,756 - 25,988,773)	фрагмент межгенной днРНК ENST00000583179.1 (RP11-19P22.5) (GENECODE)
5.	Хромосома 5 (88,129,890 - 88,129,909)	фрагмент интрона пре-мРНК энхансер-фактора миоцитов 2С ( <i>MEF2C</i> )



**Рис. 5.** Влияние аналогов внеклеточных РНК плазмы крови человека на жизнеспособность клеток MCF-7 в культуре. Жизнеспособность клеток MCF-7 (МТТ-индекс), инкубированных:

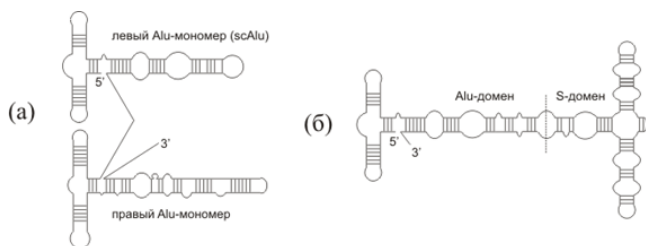
без РНК - контроль; с суммарной РНК *Saccharomyces cerevisiae* - дРНК; числовые обозначения соответствуют аналогам циркулирующих РНК №1-5, представленным в Табл. 10. Обозначение "+" соответствует прямым аналогам РНК, обозначение "-" соответствует РНК, комплементарным РНК плазмы крови человека, обозначение "±" соответствует РНК-РНК дуплексам. "\*" - для указанных образцов при сравнении с контролем  $P < 0.05$  (t-критерий Стьюдента).

Использованная в качестве контроля суммарная РНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, также как и ряд аналогов РНК плазмы крови человека не оказывали

существенного влияния на жизнеспособность клеток MCF-7 (Рис. 5). Следовательно, можно заключить, что РНК плазмы крови человека, содержащие и прямой, и комплементарный аналог Alu РНК, РНК-РНК - фрагменты ORF2 L1-транскрипта и днРНК RP11-19P22.5, а также РНК, комплементарную фрагменту гена *EPPK1*, способны подавлять жизненно важные процессы в культивируемых клетках человека.

Среди прямых аналогов РНК плазмы крови человека наибольшее снижение жизнеспособности вызывала Alu-содержащая РНК. Alu повторы являются наиболее многочисленными мобильными элементами генома человека, представлены  $\sim 1.1 \cdot 10^6$  копий и занимают 10.6% ядерной ДНК человека (Deininger et al., 2002). Alu-повтор человека состоит из двух мономеров (Рис. 6), разделенных олигоА-последовательностью и гомологичных Alu-домену гена 7SL РНК (Finnegan et al., 2012). 7SL РНК входит в состав Signal Recognition Particle (SRP) - частицы, распознающей сигнальный пептид.

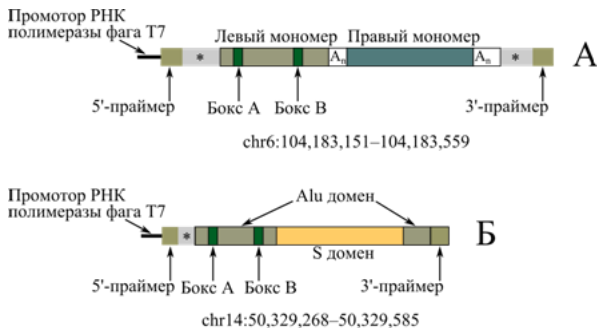
Постоянное присутствие полноразмерных Alu-транскриптов в цитоплазме, а также увеличение экспрессии этих РНК при стрессе, с одной стороны, указывает на Alu-РНК как на строго контролируемый эндогенный фактор мутагенеза, а с другой, позволяет предположить, что Alu-РНК являются регуляторами жизненно важных клеточных процессов (Hasler et al., 2006). Для анализа влияния Alu и 7SL РНК на жизнеспособность и активацию проапоптотических процессов в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 мы синтезировали полноразмерные аналоги этих РНК.



**Рис. 6.** Вторичная структура Alu РНК (а) и 7SL РНК (б) в соответствии с данными (Hasler et al., 2006).

## 2.2 Влияние аналогов Alu и 7SL РНК на проапоптотические процессы в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7

Аналоги Alu и 7SL РНК получали методом транскрипции *in vitro* ДНК-конструкций, полученных при амплификации геномной ДНК клеток MCF-7. Полученные аналоги отличаются от природных РНК добавлением с 5' и 3' (Alu) или только с 5'-конца (7SL) последовательностей, фланкирующих Alu и 7SL в геноме человека (Рис. 7).



**Рис. 7.** ДНК-конструкции, кодирующие аналоги Alu (А) и 7SL РНК (Б). Бокс А, Бокс В – внутренний промотор РНК полимеразы III. A<sub>n</sub> – олиго-А-последовательность. Рамкой выделены участки, кодирующие природные Alu (А) и 7SL РНК (Б).

\* - Последовательности, фланкирующие Alu и 7SL в геноме человека.

Из данных Табл. 11 видно, что аналоги Alu РНК и 7SL РНК, также как и циркулирующий фрагмент Alu повтора (Рис. 5), вызывают достоверное снижение жизнеспособности клеток MCF-7 в условиях трансфекции с липофектаминосом ( $P < 0.05$ ). Снижение жизнеспособности клеток MCF-7 под действием аналогов Alu и 7SL РНК также сопровождается снижением трансмембранного потенциала  $\delta\Psi_m$  на 14,4% и 16,6% соответственно (Табл. 11). Таким образом, данные об изменении потенциала митохондрий  $\delta\Psi_m$  согласуются с результатами анализа жизнеспособности с использованием МТТ-теста.

Показано, что трансфекция клеток аналогами Alu и 7SL РНК приводит к появлению постклеточных структур, экспонирующих на внешней поверхности фосфатидилсерин, а также структур, мембрана которых проницаема для пропидий-йодида – апоптотических и вторичных некротических телец. Суммарный вклад апоптотических и вторичных некротических телец в общую популяцию клеток, трансфицированных аналогами Alu и 7SL РНК, составил ~ 31% (Табл. 11).

В целом, полученные результаты позволяют заключить, что и аналоги Alu РНК, и аналоги 7SL РНК снижают жизнеспособность и индуцируют проапоптотические изменения субпопуляции клеток MCF-7. При этом действие аналогов Alu РНК не существенно отличается от действия 7SL РНК на уровне изменения активности цитоплазматических и митохондриальных дегидрогеназ (МТТ-тест) и диссипации трансмембранного потенциала митохондрий  $\delta\Psi_m$ .

**Таблица 11.** Влияние аналогов Alu РНК и 7SL РНК на жизнеспособность, асимметрию и проницаемость цитоплазматической мембраны и трансмембранный потенциал митохондрий клеток MCF-7.

	Снижение жизнеспособности $\pm$ SD, %**	Проапоптотические изменения мембраны***			Трансмембранный потенциал митохондрий $\delta\Psi$ ****	
		AnnV-/PI- %	AnnV+/PI- %	AnnV+/PI+ %	без диссипации	с диссипацией
<b>7SL РНК</b>	19.0 $\pm$ 4.8	69.2	19.3	11.5	83.4	16.6
<b>Alu РНК</b>	15.3 $\pm$ 6.5	68.7	13.8	17.5	85.6	14.4
<b>РНК MCF-7</b>	-2.8 $\pm$ 8.2	85.2	7.4	7.3	97.9	2.1
<b>Липофектамин</b>	0 $\pm$ 2.5	89.9	6.8	3.3	99.7	0.3

\*трансфекцию клеток проводили 1 мкг/мл РНК в комплексе с липофектаминосом.

\*\*за 100% принимали жизнеспособность (МТТ-индекс) клеток, инкубированных в среде с липофектаминосом без РНК.

\*\*\*изменения мембраны клеток анализировали с использованием ФИТЦ-меченого аннексина V и пропидий йодида методом проточной цитофлуориметрии.

\*\*\*\*диссипацию трансмембранного потенциала митохондрий оценивали окраской клеток митохондриальным красителем JC-1, с последующим анализом препаратов проточной цитофлуориметрией.

### 2.3 Анализ изменения экспрессии генов в клетках MCF-7 под действием аналогов Alu и 7SL РНК

Для того чтобы выявить гены, экспрессия которых изменяется под действием аналогов Alu и 7SL РНК, мы провели полнотранскриптомный анализ РНК клеток MCF-7 на микрочипах Illumina HT-12. В качестве контроля использовали клетки, инкубированные в среде с липофектаминосом без РНК.

Было установлено, что трансфекция Alu РНК в клетки MCF-7 приводит к повышению экспрессии в три и более раза 68 транскриптов, и к понижению экспрессии 87 транскриптов. Трансфекция клеток 7SL РНК повышала в три и более раза уровень 45 генов и понижала – 74 генов. В группах транскриптов с повышенной экспрессией для Alu и 7SL РНК выявлено 13 общих транскриптов, и 25 общих транскриптов выявлено в группах с пониженной экспрессией.

Среди генов, экспрессия которых повышается под действием и Alu РНК, и 7SL РНК, присутствуют *NUPR1*, *DDIT3*, *FOXRED2* и *ASNS*. Известно, что повышение уровня мРНК *NUPR1* приводит к апоптотическим изменениям клеток астроцитомы U87MG (Carracedo et al., 2006). Продукт гена *DDIT3* – транскрипционный фактор CHOP является ключевым медиатором клеточной гибели в ответ на стресс эндоплазматического ретикула. Повышение экспрессии этого гена или микроинъекции белка CHOP вызывают диссипацию трансмембранного потенциала митохондрий ( $\delta\Psi_m$ ), генерацию активных форм кислорода и апоптотическую гибель клетки (Tabas et al., 2011). Таким образом, наблюдаемое повышение экспрессии гена *DDIT3* в клетках MCF-7 под действием аналогов Alu и 7SL РНК является существенным проапоптотическим стимулом. Повышение экспрессии *DDIT3* (CHOP) и индукция апоптоза в ответ на стресс эндоплазматического ретикула могут быть вызваны непосредственно активацией гена *NUPR1* (p8), как это было показано для канабиноид-индуцируемого апоптоза клеток астроцитомы U87MG (Carracedo et al., 2006).

Продукт гена *FOXRED2*, флавопротеин ERFAD, участвует в дислокации белков из эндоплазматического ретикула в цитоплазму. Снижение экспрессии этого гена связывают с активацией протеотоксического стресса эндоплазматического ретикула (Riemer et al., 2009). Еще одним признаком активации ответа на стресс эндоплазматического ретикула является повышение экспрессии гена аспарагин синтетазы *ASNS*, транскрипция которого активируется ССААТ/энхансер-связывающим белком CHOP (Siu et al., 2001).

Таким образом, полученные данные о снижении экспрессии *FOXRED2*, совместно с повышением уровня *NUPR1* (p8), *DDIT3* (CHOP) и *ASNS*, позволяют заключить, что индукция проапоптотических процессов в клетках MCF-7 под действием Alu и 7SL РНК связана с модуляцией транскрипции ключевых клеточных факторов ответа на стресс эндоплазматического ретикула.

## **2.4 Предполагаемый механизм снижения жизнеспособности клеток MCF-7 под действием Alu и 7SL РНК**

Ранее Sakamoto K. с соавт. показали, что трансфекция клеток HeLa ДНК-конструкциями, содержащими транскрипционно-активные Alu повторы, а также трансфекция конструкциями, кодирующими 7SL РНК, вызывает подавление репликации ДНК, ингибирует трансляцию и оказывает антипролиферативное действие на клетки человека (Sakamoto et al., 1991). Однако при этом не было предложено молекулярного механизма влияния Alu РНК на инициацию трансляции новосинтезированных мРНК.

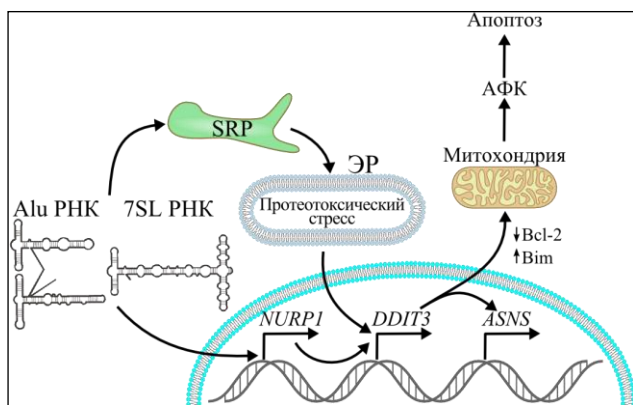
Полученные нами данные показывают, что и Alu, и 7SL РНК вызывают сравнимые изменения трансмембранного потенциала митохондрий клеток MCF-7 (Табл. 11). Участие митохондрий в гибели клеток под действием Alu РНК также установлено при исследовании молекулярных и клеточных механизмов географической атрофии сетчатки. При этом показано, что гибель клеток пигментированного эпителия сетчатки сопровождается снижением экспрессии гена *DICER1* и накоплением в них Pol III AluSc-транскрипта (Kaneko et al., 2011). Предложен молекулярный механизм цитотоксического действия Alu РНК в клетках пигментированного эпителия, который включает в себя генерацию активных форм кислорода митохондриями, активацию NLRP3-инфламмасом,

а также активацию MyD88-сигнального каскада (Tarallo et al., 2012). Однако нерешенным оставался вопрос о причинах, по которым Alu РНК вызывает генерацию активных форм кислорода.

Данные об изменении экспрессии генов показывают, что трансфекция клеток аналогами Alu РНК или 7SL РНК сопровождается появлением проапоптотических стимулов: *NUPR1* (р8); *DDIT3* (CHOP), *FOXRED2* (ERFAD). При этом *NUPR1* является фактором, индуцируемым в ответ на широкий спектр стрессовых воздействий, а *DDIT3* и *FOXRED2* связаны с ответом на стресс эндоплазматического ретикулума.

Предполагают, что участие Alu транскриптов в клеточных процессах обусловлено их структурным сходством с 7SL РНК (Hasler et al., 2006). Показано, что Alu РНК, также как и 7SL РНК, взаимодействует с белками сигнал-распознающей частицы – SRP (signal recognition particle) (Bovia et al., 1997; Chang et al., 1996). Способность Alu РНК модулировать трансляцию авторы объясняли взаимодействием с белками SRP9/14: показано, что Alu РНК активирует трансляцию, а Alu РНК в комплексе с SRP9/14 ингибирует трансляцию мРНК *in vitro* (Hasler et al., 2006). В связи с этим можно предположить, что активация аналогами Alu и 7SL РНК ответа на стресс эндоплазматического ретикулума обусловлена нарушением функционирования SRP.

Полученные нами результаты в совокупности с данными литературы позволяют предложить механизм проапоптотического действия Alu и 7SL РНК в клетках MCF-7 (Рис. 8).



**Рис. 8.** Схема предполагаемого механизма индукции проапоптотических процессов в клетках MCF-7, трансфицированных аналогами Alu и 7SL РНК. Трансфекция клеток аналогами Alu и 7SL РНК сопровождается увеличением экспрессии гена транскрипционного регулятора *NURP1* (р8), который активирует транскрипцию *DDIT3*

(CHOP) (Carracedo et al., 2006). Увеличение экспрессии транскрипционного фактора *DDIT3* вызывает апоптотические изменения внешней мембраны митохондрий по механизму, включающему снижение уровня транскрипции *Bcl-2* и активацию транскрипции *Bim*. Апоптоз, индуцируемый CHOP (*DDIT3*), сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК) (Tabas et al., 2011). Увеличение экспрессии *DDIT3* может происходить в ответ на стресс эндоплазматического ретикулума, вызванного взаимодействием аналогов Alu и 7SL РНК с белками SRP – нарушением транспорта белков через мембрану ЭР. Стресс эндоплазматического ретикулума сопровождается повышением экспрессии гена аспарагин синтетазы *ASNS*, транскрипция которого активируется CHOP (Tabas et al., 2011).

## ВЫВОДЫ

1. Проведено усовершенствование метода конструирования кДНК-библиотек, позволяющее анализировать короткие циркулирующие РНК (19-100 н.) с различным расположением концевых фосфатных групп, по технологии высокопроизводительного секвенирования ABI SOLiD. С использованием этой технологии проведен анализ РНК, циркулирующих в плазме крови доноров без выявленных онкологических, аутоиммунных и острых инфекционных заболеваний. Определен вклад в общий набор РНК плазмы крови человека фрагментов РНК по классам: рРНК, мРНК, митоРНК, тРНК, днРНК, мяоРНК, транскрибируемые геномные повторы человека и микроРНК. Определены наиболее представленные в плазме крови индивидуальные формы микроРНК, мРНК и днРНК. Наличие в плазме крови набора новых микроРНК-подобных РНК и антисмысловых РНК подтверждено независимым методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

2. Сравнительный анализ данных высокопроизводительного секвенирования на платформе ABI SOLiD РНК плазмы крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) показал, что в наборе циркулирующих РНК пациентов с НМРЛ по сравнению с набором циркулирующих РНК здоровых доноров происходит изменение вклада фрагментов основных классов клеточных РНК, таких как транскрипты геномных повторов и формы РНК, не аннотированные в базе human RefSeq RNA ( $P < 0.01$ ), а также рРНК, тРНК и мРНК ( $P < 0.05$ ). Обнаружен ряд потенциально диагностически значимых циркулирующих РНК: микроРНК-451, фрагмент мРНК WHSC2 и микроРНК29-а.

3. Трансфекция клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 аналогами циркулирующих РНК, содержащими последовательность Alu-повтора человека, двуцепочечный фрагмент L1-транскрипта, а также РНК, комплементарную фрагменту гена эпиплакина 1, приводит к снижению жизнеспособности клеток MCF-7 в культуре.

4. Установлено, что аналоги AluYa5 и 7SL РНК снижают жизнеспособность и индуцируют проапоптотические изменения субпопуляции клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Предложен механизм индукции проапоптотических процессов в клетках MCF-7 под действием Alu и 7SL РНК, основанный на изменении транскрипции генов NUPR1, DDIT3, FOXRED2 и ASNS, участвующих в комплексном ответе клетки на стресс эндоплазматического ретикула.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ В РАБОТАХ

1) Semenov, D.V., Baryakin, D.N., Kamynina, T.P., Kuligina, E.V., Richter, V.A. Fragments of noncoding RNA in plasma of human blood // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2008. – V. 1137. – P. 130-134.

2) Semenov, D.V., Stepanov, G.A., Baryakin, D.N., Koval, O.A., Kuligina, E.V., Richter V.A. Extracellular RNA as Regulators of Cellular Processes // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum / Ed. P.B. Gahan. - Springer Science+Business Media B.V. - 2011. – P. 233-237.

3) Semenov D.V., Baryakin D.N., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Vasiliev G.V., Bryzgalov L.A., Chikova E.D., Filippova J.A., Kuligina E.V., Richter V.A. Unbiased approach to profile the variety of small non-coding RNA of human blood plasma with massively parallel sequencing technology // Expert Opin. Biol. Ther. – 2012. – Suppl. 1 – S. 43-51.

4) Барякин Д. Н., Семенов Д. В., Савельева А. В., Коваль О. А., Рабинов И. В., Кулигина Е. В., Рихтер В. А. Аналоги Alu и 7SL РНК подавляют жизнеспособность клеток MCF-7, модулируя транскрипцию генов ответа на стресс эндоплазматического ретикула // Acta Naturae – 2013. - Т. 5. - № 4. - С. 83-93.