

Способность к формированию дуплексов как фактор внутриклеточного распределения микроРНК

С.А. Кузьмичев^{1,2}, А.В. Комельков¹, Е.М. Чевкина¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; Россия, 127473 Москва, ул. Дедегатская, 20, стр. 1

Контакты: Сергей Александрович Кузьмичев kuzs2005@mail.ru

Введение. Регуляция содержания зрелых микроРНК (миРНК) в различных компартментах клетки – ядре (N) и цитоплазме (C) – позволяет контролировать возможность их участия в процессах РНК-опосредованной интерференции. Различные по структуре миРНК, процессинг которых осуществляется с разных предшественников (пре-миРНК), могут образовывать дуплексы между молекулами при наличии в них комплементарных последовательностей. Формирование таких дуплексов может рассматриваться как один из механизмов регуляции активности миРНК в отношении их целевых матричных РНК (мРНК).

Цель исследования – анализ распределения различных миРНК между ядром и цитоплазмой в зависимости от энергии образования дуплексов.

Материалы и методы. Материалом для исследований послужили данные о содержании различных миРНК в ядре и цитоплазме в клетках 2 линий различного происхождения: 5-8F назофарингеальной карциномы (nasopharyngeal carcinoma, NPC) человека и постмитотических нейронов коры головного мозга серой крысы. Последовательности миРНК, используемые для анализа, были взяты из базы данных miRBase, версия 22. Биоинформатический анализ последовательностей миРНК для выявления молекул, способных образовывать дуплексы миРНК, и определения минимальной свободной энергии (minimum free energy, MFE) их формирования проводили с помощью программ RegRNA, версия 2.0, и RNAup.

Результаты. Впервые проведен сравнительный анализ внутриклеточного распределения (соотношение N/C) различных миРНК в зависимости от энергии образования дуплексов. Результаты биоинформатического анализа данных секвенирования миРНК в клетках линии 5-8F NPC показали, что миРНК, способные образовывать высокоэнергетические, т. е. более стабильные, дуплексы, накапливаются в цитоплазме, в то время как низкоэнергетические дуплексы в клетках данной линии накапливаются в ядре (имеют большее значение N/C). Также показано отсутствие зависимости распределения N/C от ряда коротких мотивов, предположительно ассоциированных с ядерной локализацией для миРНК, способных образовывать высокоэнергетические дуплексы.

Заключение. Выявленное обогащение пула цитоплазматических миРНК молекулами, способными образовывать более энергетически стабильные дуплексы, может представлять дополнительный механизм регуляции активности миРНК в отношении их целевых мРНК (за счет секвестирования миРНК в цитоплазме в составе дуплексов, препятствующих взаимодействию миРНК с мРНК).

Ключевые слова: микроРНК, дуплекс миРНК, минимальная свободная энергия, внутриклеточная локализация

Для цитирования: Кузьмичев С.А., Комельков А.В., Чевкина Е.М. Способность к формированию дуплексов как фактор внутриклеточного распределения микроРНК. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(3):83–91.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-83-91

Ability to form duplexes as a factor of intracellular microRNA distribution

S.A. Kuzmichev^{1,2}, A.V. Komelkov¹, E.M. Tchekina¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Ministry of Health of Russia; 20–1 Delegatskaya St., Moscow 127473, Russia

Background. The regulation of the content of mature microRNAs (miRNAs) in different cell compartments – the nucleus (N) and the cytoplasm (C) – makes it possible to control their availability for participation in RNA-mediated interference processes. Structurally different miRNAs, processed from different precursors (pre-miRNA), can form duplexes between molecules containing complementary sequences. The appearance of such duplexes can be considered as one of the mechanisms of miRNA activity regulation in respect to their target mRNAs.

Objectives. Analysis of the miRNA distribution between nucleus and cytoplasm depending on the energy of duplex formation.

Materials and methods. Data on the content of different miRNAs in the nucleus and cytoplasm in two cell lines of different origin: 5-8F of human nasopharyngeal carcinoma (NPC) and postmitotic neurons of the cerebral cortex of rat – has been used. The miRNA sequences used for analysis were taken from the miRBase database, version 22. Bioinformatic analysis of miRNA sequences for detection of molecules capable of forming miRNA duplexes and determination of their minimal free energy (MFE) of formation was carried out with the help of programs: RegRNA, version 2.0, and RNAup.

Results. For the first time, a comparative analysis of the intracellular distribution N/C of different miRNAs depending on the energy of duplex formation was performed. Results of bioinformatic analysis of miRNA sequencing in 5-8F cells of human nasopharyngeal carcinoma showed that miRNAs capable of forming high-energy, i. e. more stable, duplexes, accumulate in the cytoplasm, while miRNAs forming low-energy duplexes have a larger N/C value, i. e. the level of these miRNAs is higher in the nucleus. In addition, we show that N/C distribution of miRNAs capable of forming high-energy duplexes is independent from the presence of certain short motifs, that are supposedly associated with their nuclear localization.

Conclusion. The revealed enrichment of the pool of cytoplasmic miRNAs by molecules capable of forming more energetically stable duplexes may represent an additional mechanism of regulating miRNA activity in respect to their target mRNAs due to the sequestration of miRNA duplexes in the cytoplasm preventing miRNA interaction with mRNAs.

Key words: microRNA, miRNA duplex, minimal free energy, intracellular localization

For citation: Kuzmichev S.A., Komelkov A.V., Tchekina E.M. Ability to form duplexes as a factor of intracellular microRNA distribution. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):83–91.

Введение

Со времени открытия малых регуляторных РНК представления об их роли в регуляции экспрессии генов, внутриклеточной и внеклеточной сигнализации значительно расширены. Так, показано, что кроме участия в ингибировании трансляции и/или деградации матричных РНК (мРНК) в цитоплазме (С), микроРНК (миРНК) могут проникать в ядро (N) клетки и осуществлять сиквенс-специфическую регуляцию процессов транскрипции различных генов и процессинга при-миРНК – продуктов транскрипции миРНК генов [1–3].

В то же время информация, касающаяся особенностей накопления различных миРНК в ядре или цитоплазме в зависимости от их структуры, противоречива и может различаться для разных типов клеток, в том числе опухолевых [2, 4]. Механизмы отбора миРНК, участвующих в эпигенетической регуляции экспрессии генов, включают не только деградацию части зрелых молекул после их процессинга [1], транспорт в ядро [2, 3] или экскрецию из клеток [5], но и селективный подбор комплементарных последовательностей, способных образовывать дуплексы миРНК [6].

В работе использован новый подход, основанный на анализе внутриклеточного распределения миРНК между ядром и цитоплазмой (соотношение N/C) в зависимости от минимальной свободной энергии (minimum free energy, MFE) образования дуплексов. На основе результатов проведенного биоинформатического анализа выявлено различное соотношение значения N/C для миРНК в зависимости от MFE дуплекса. Полученные данные позволяют предположить существование дополнительного механизма, ограничивающего количество близких по структуре миРНК, участвующих в эпигенетической регуляции, с помощью образования высокоэнергетических и низкоэнергетических дуплексов миРНК.

Материалы и методы

Исходным материалом для исследований послужили данные о содержании различных миРНК в ядре и цитоплазме в клетках 2 линий различного происхождения: 5-8F назофарингеальной карциномы (nasopharyngeal

carcinoma, NPC) человека и постмитотических нейронов коры головного мозга серой крысы (*Rattus norvegicus*). Исходные данные ограничены 2 группами [7, 8], поскольку лишь в этих работах необходимая для анализа информация была представлена в полном объеме, включая данные последовательностей миРНК, полученные методом глубокого секвенирования, а также количественное распределение N/C молекул миРНК. Выборки составляли 158 миРНК для клеток 5-8F NPC и 123 миРНК для постмитотических нейронов коры головного мозга крысы. С использованием данных секвенирования миРНК для обоих типов клеток произведен расчет MFE и дальнейший биоинформатический анализ распределения разных миРНК между ядром и цитоплазмой.

Последовательности различных миРНК, используемые для анализа, были взяты из базы данных miRBase (<http://www.mirbase.org>), версия 22. Биоинформатический анализ последовательностей миРНК проводили с помощью программ RegRNA, версия 2.0 (RegRNA 2.0; <http://regna.mbc.nctu.edu.tw>), и RNAup (<http://rna.tbi.univie.ac.at>). Поиск последовательностей миРНК, способных образовывать дуплексы с другими миРНК, в программе RegRNA 2.0 выполняли с учетом следующих параметров: 1) значение MFE, которая может определяться как MFE Гиббса (ккал/моль), высвобождающаяся при формировании вторичной структуры двумя комплементарными последовательностями [9]; 2) коэффициент (Score), который оценивает возможность одновременной гибридизации наибольшего количества нуклеотидов между сравниваемыми молекулами миРНК по правилу Уотсона–Крика [9]. В том случае, когда программа RegRNA 2.0 рассчитывала возможность образования нескольких дуплексов для разных миРНК, были выбраны те пары миРНК, из молекул которых обе присутствовали в одной и той же клетке и формировали дуплексы с максимальным значением MFE (по модулю), что соответствует наибольшей вероятности возникновения дуплекса. Параметр MFE принимали одинаковым для каждой из миРНК, входящих в конкретный дуплекс. При расчете MFE с помощью программы RNAup учитывали, что пары G–U дестабилизируют структуру дуплекса и приводят

к уменьшению MFE [10]. В связи с этим при использовании программы допускалось ограничение, позволяющее избегать изолированных пар G–U при расчете MFE для дуплексов [11]. Данные экспериментальных исследований [12] показывают, что формирование дуплексов между молекулами миРНК может происходить уже при значениях MFE, равных -13 ккал/моль. В связи с этим биоинформатический анализ возможности формирования дуплексов миРНК с помощью программы RegRNA 2.0 проводили при задании значений MFE в широком диапазоне – от -25 до -10 ккал/моль и значения Score – от 80 до 170. В дальнейшем для удобства сравнения отрицательных чисел значения MFE приводятся по модулю.

Соответствие распределения N/C критерию нормальности оценивали с использованием теста Шапиро–Уилка. Различия распределения N/C для высоко- и низкоэнергетических дуплексов в сравниваемых выборках определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Статистическую обработку результатов внутриклеточного распределения миРНК, способных образовывать различающиеся по MFE дуплексы, проводили с применением программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Корреляция данных расчета параметра MFE (в ккал/моль), полученных с использованием указанных выше программ, была высокой (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,9$).

Результаты и обсуждение

Неравномерность внутриклеточного распределения миРНК, способных образовывать дуплексы. Для кор-

ректного сопоставления данных об уровне миРНК в ядре и цитоплазме в зависимости от их нуклеотидных последовательностей исследованные миРНК были разделены на 2 группы, различающиеся максимальными значениями MFE. Распределение значений параметра MFE для миРНК из клеток линии 5-8F NPC показало, что большинство миРНК имеют значения MFE в диапазоне от 10 до 19 ккал/моль, что позволяет обозначить их как молекулы, способные образовывать низкоэнергетические дуплексы, и от 24 до 37 ккал/моль, что соответствует миРНК, способным образовывать высокоэнергетические дуплексы (рис. 1). При анализе соотношения N/C для этих 2 групп выявлены статистически значимые различия ($p < 0,01$), что говорит о наличии зависимости распределения миРНК между ядром и цитоплазмой от величины MFE образования дуплексов в данных клетках (рис. 2). Группы миРНК, способные образовывать низкоэнергетические дуплексы в клетках линии 5-8F NPC, имеют большее значение N/C, т. е. уровень содержания этих миРНК в ядрах выше. Более того, для данного типа клеток обнаружена слабая, но достоверная корреляция ($r = -0,35$; $p < 0,01$) MFE с соотношением N/C во всем диапазоне значений MFE, что подтверждает наличие внутриклеточного распределения миРНК в зависимости от вероятности формирования дуплексов.

Распределение значений параметра MFE для миРНК из постмитотических нейронов коры головного мозга крысы показало, что большинство миРНК имеют значения MFE образования дуплексов в диапазоне от 12 до 16 ккал/моль, что позволяет их обозначить как

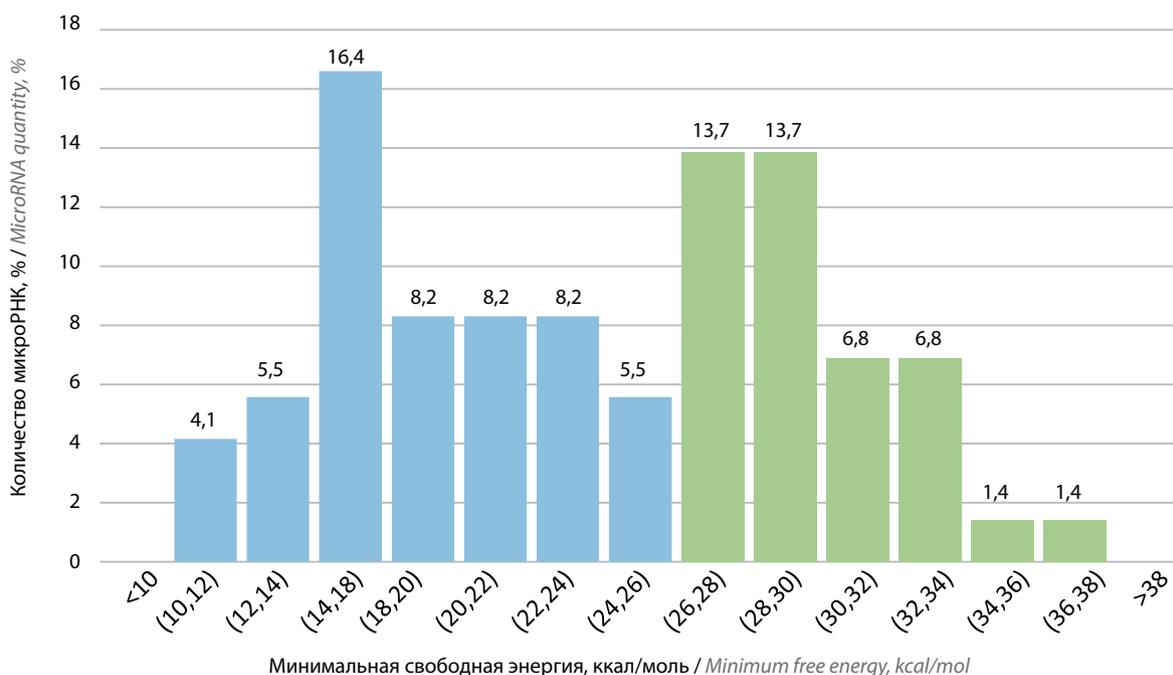


Рис. 1. Распределение значений минимальной свободной энергии образования дуплексов относительно количества микроРНК в клетках линии 5-8F назофарингеальной карциномы человека

Fig. 1. Distribution of minimum free energy values of duplex formation relative to microRNA quantity in human nasopharyngeal carcinoma cell line 5-8F

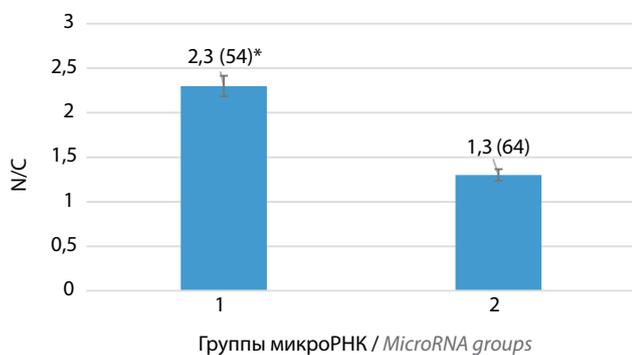


Рис. 2. Соотношение N/C для различных микроРНК клеток линии 5-8F назофарингеальной карциномы человека в зависимости от способности образовывать дуплексы микроРНК. 1 – группа микроРНК, способная образовывать дуплексы в диапазоне минимальной свободной энергии 10–19 ккал/моль; 2 – группа микроРНК, способная образовывать дуплексы в диапазоне минимальной свободной энергии 24–37 ккал/моль. *Различия соотношения N/C между группами микроРНК достоверны ($p < 0,01$). В скобках указано количество молекул микроРНК в группах Fig. 2. N/C ratio for various microRNAs of human nasopharyngeal carcinoma cell line 5-8F according to their ability to form microRNA duplexes. 1 – microRNA group capable of forming duplexes in 10–19 kcal/mol range of minimum free energy; 2 – microRNA group capable of forming duplexes in 24–37 kcal/mol range of minimum free energy. *Differences in N/C ratios between the groups are significant ($p < 0.01$). The number of microRNA molecules in the group is indicated in brackets

миРНК, способные образовывать низкоэнергетические дуплексы, и от 24 до 37 ккал/моль, что позволяет их обозначить как миРНК, способные образовывать высокоэнергетические дуплексы. Соотношения N/C для этих 2 групп миРНК не имели значимых различий ($p > 0,05$). Тем не менее имеется тенденция к снижению соотношения N/C при увеличении MFE формирования дуплексов миРНК (рис. 3).

Таким образом, полученные нами результаты показали, что 2 разных типа клеток характеризуются различным внутриклеточным распределением миРНК, способным формировать низко- и высокоэнергетические дуплексы. Для клеток линии 5-8 NPC, в отличие от постмитотических нейронов коры мозга крысы, установлена зависимость соотношения N/C для миРНК от энергии образования дуплексов миРНК.

Анализ состава миРНК с разной MFE показал, что миРНК, способные образовывать высокоэнергетические дуплексы, относятся к различным группам, в том числе к консервативному семейству let-7, семействам miR-548 и miR-17 (табл. 1, 2). Наибольшее количество дуплексов в обоих типах клеток может возникать между миРНК из семейства let-7 (см. табл. 1, 2). Объяснением этому может служить тот факт, что различные миРНК семейства let-7, образующиеся в ходе процессинга либо с 5'-, либо с 3'-конца их пре-миРНК (предшественника миРНК), имеют близкие по структуре последовательности. Они различаются на 1–4 нуклеотида и обозначаются в miRBase как let-7a, -7b, -7c, -7d, -7e, -7f, -7g, -7i. Следовательно, можно предположить, что различие в 1–4 нуклеотида между молекулами не оказывает значительного влияния на MFE

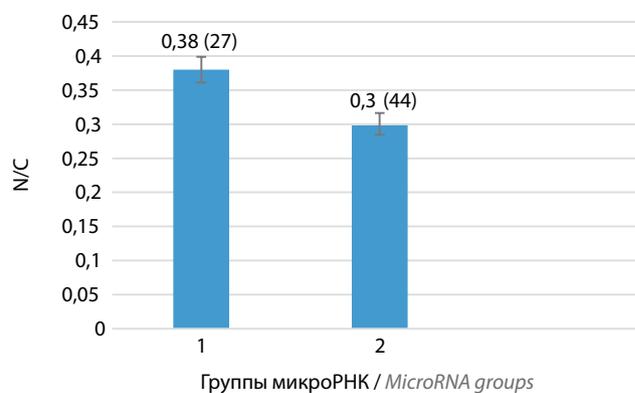


Рис. 3. Соотношение N/C для различных микроРНК постмитотических нейронов коры головного мозга серой крысы в зависимости от способности образовывать дуплексы микроРНК. 1 – группа микроРНК, способная образовывать дуплексы в диапазоне минимальной свободной энергии 12–16 ккал/моль; 2 – группа микроРНК, способная образовывать дуплексы в диапазоне MFE минимальной свободной энергии 24–37 ккал/моль Fig. 3. N/C ratio for various microRNAs of rat postmitotic cortical neurons according to their ability to form microRNA duplexes. 1 – microRNA group capable of forming duplexes in 12–16 kcal/mol range of minimum free energy; 2 – microRNA group capable of forming duplexes in 24–37 kcal/mol range of minimum free energy

образования дуплексов миРНК. Важно отметить, что дуплексы могут образовывать миРНК, процессинг которых осуществляется с предшественников, кодируемых различными геномными последовательностями.

Значительное количество дуплексов миРНК между молекулами из семейства let-7 указывает на необходимость клеточного контроля уровней этих близких по структуре молекул, что связано с их вовлечением в регуляцию многих сигнальных путей. МиРНК семейства let-7 не только участвуют в регуляции процессов пролиферации стволовых клеток, дифференцировке клеток крови при гомеопозе, но и в зависимости от клеточного окружения могут проявлять свойства онкосупрессоров или онкогенов [13, 14]. Дегградация миРНК семейства let-7 в клетках рака молочной железы может привести к прогрессии опухолевого роста [12]. МиРНК семейства let-7 осуществляют зависимую от их концентрации регуляцию уровня РНКазы Dicer, подавляя ее трансляцию, и этот механизм обратной связи может оказывать влияние на процессинг многих миРНК в разных клетках [15].

Различия в значениях параметра N/C, полученные для сравниваемых групп миРНК, могут быть обусловлены биологическими процессами, в которых участвуют эти молекулы. Так, низкоэнергетические дуплексы менее стабильны, поэтому миРНК, способные их образовывать, могут подвергаться более быстрой дегградации эндонуклеазами, как это было показано для ряда миРНК семейства let-7 в случае образования дуплексов с miR-107-5p [12]. Однако дегградация миРНК – процесс не одномоментный, и часть молекул успевает транспортироваться в ядро с помощью белков-аргонавтов [16] с участием импортина 8 [3]. В ядре миРНК могут сохраняться в течение некоторого времени, свя-

Таблица 1. Пары молекул микроРНК (миРНК), способные образовывать дуплексы с минимальной свободной энергией (MFE) 124–37 ккал/моль в клетках линии 5-8F назофарингеальной карциномы человека

Table 1. MicroRNA (miRNA) molecule pairs capable of forming duplexes with minimum free energy (MFE) 124–37 kcal/mol in human nasopharyngeal carcinoma cell line 5-8F

миРНК (1-я и 2-я) miRNA (1 st and 2 nd)	MFE*, ккал/моль MFE*, kcal/mol	MFE**, ккал/моль MFE**, kcal/mol	миРНК (1-я и 2-я) miRNA (1 st and 2 nd)	MFE*, ккал/моль MFE*, kcal/mol	MFE**, ккал/моль MFE**, kcal/mol
hsa-miR-1226-5p hsa-miR-675-3p	27	28	hsa-miR-125b-2-3p hsa-miR-125b-5p	27	24
hsa-miR-193b-3p hsa-miR-365b-5p	28	27	hsa-let-7g-5p hsa-let-7i-3p	25	24
hsa-let-7f-1-3p hsa-let-7a-5p	27	26	hsa-let-7b-3p hsa-let-7d-5p	27	27
hsa-let-7b-3p hsa-let-7e-5p	27	27	hsa-let-7c-5p hsa-let-7f-1-3p	26	26
hsa-let-7f-5p hsa-let-7b-3p	25	24	hsa-let-7f-5p hsa-let-7d-3p	24	24
hsa-let-7b-5p hsa-let-7i-3p	27	27	hsa-let-7b-5p hsa-let-7f-1-3p	26	26
hsa-let-7e-5p hsa-let-7c-3p	28	26	hsa-miR-29a-3p hsa-miR-29c-5p	27	24
hsa-miR-193a-5p hsa-miR-193b-3p	25	25	hsa-miR-106a-5p hsa-miR-106b-3p	25	25
hsa-miR-548h-3p hsa-miR-548d-5p	27	25	hsa-miR-548b-5p hsa-miR-548o-3p	25	24
hsa-miR-548o-5p hsa-miR-548h-3p	29	27	hsa-miR-548n-5p hsa-miR-548h-3p	26	23
hsa-miR-548o-5p hsa-miR-548p-3p	28	27	hsa-miR-193b-3p hsa-miR-365a-5p	27	27
hsa-miR-345-5p hsa-miR-378a-3p	30	29	hsa-let-7a-5p hsa-let-7b-3p	32	31
hsa-let-7c-5p hsa-let-7d-3p	30	30	hsa-let-7e-5p hsa-let-7d-3p	29	29
hsa-let-7a-2-3p hsa-let-7e-5p	31	29	hsa-let-7a-5p hsa-let-7d-3p	33	31
hsa-let-7b-5p hsa-let-7d-3p	32	30	hsa-miR-195-5p hsa-miR-16-3p	30	28
hsa-miR-28-3p hsa-miR-151a-5p	37	35	hsa-miR-30a-5p hsa-miR-30e-3p	29	27
hsa-miR-30e-3p hsa-miR-30d-5p	29	27	hsa-miR-30d-5p hsa-miR-30a-3p	29	27
hsa-miR-339-5p hsa-miR-23a-5p	32	31	hsa-miR-27a-5p hsa-miR-27b-3p	25	25
hsa-miR-17-5p hsa-miR-106b-3p	26	25	hsa-miR-29a-3p hsa-miR-29c-5p	27	24

*Данные MFE, полученные с помощью биоинформатического анализа с использованием программы RegRNA 2.0.

*MFE data obtained by bioinformatics analysis using the RegRNA 2.0 software.

**Данные MFE, полученные с помощью биоинформатического анализа с использованием программы RNAup.

**MFE data obtained by bioinformatics analysis using the RNAup software.

Таблица 2. Пары молекул микроРНК (миРНК), способные образовывать дуплексы с минимальной свободной энергией (MFE) |24–37 ккал/моль в постмитотических нейронах коры головного мозга серой крысы

Table 2. MicroRNA (miRNA) molecule pairs capable of forming duplexes with minimum free energy (MFE) |24–37 kcal/mol in rat postmitotic cortical neurons

миРНК (1-я и 2-я) miRNA (1 st and 2 nd)	MFE*, ккал/моль MFE*, kcal/mol	MFE**, ккал/моль MFE**, kcal/mol	миРНК (1-я и 2-я) miRNA (1 st and 2 nd)	MFE*, ккал/моль MFE*, kcal/mol	MFE**, ккал/моль MFE**, kcal/mol
rno-let-7a-5p rno-let-7b-3p	33	31	rno-let-7a-5p rno-let-7c-2-3p	28	27
rno-let-7a-5p rno-let-7f-2-3p	27	27	rno-let-7a-5p rno-let-7d-3p	33	31
rno-let-7b-5p rno-let-7d-3p	32	30	rno-let-7b-5p rno-let-7a-1-3p	27	26
rno-let-7b-5p rno-let-7c-2-3p	27	26	rno-let-7b-5p rno-let-7f-2-3p	27	25
rno-let-7b-5p rno-let-7i-3p	27	25	rno-let-7e-5p rno-let-7d-3p	30	29
rno-let-7e-5p rno-let-7c-1-3p	28	27	rno-let-7f-5p rno-let-7c-2-3p	28	27
rno-let-7e-5p rno-let-7a-2-3p	31	29	rno-let-7a-3p rno-let-7c-5p	26	27
rno-let-7a-3p rno-let-7f-5p	27	28	rno-let-7b-3p rno-let-7c-5p	31	32
rno-let-7b-3p rno-let-7d-5p	27	29	rno-let-7b-3p rno-let-7e-5p	27	28
rno-let-7d-3p rno-let-7c-5p	30	32	rno-let-7c-5p rno-let-7f-2-3p	27	26
rno-miR-9-3 rno-miR-3597-5p	30	30	rno-miR-92a-3p rno-miR-92b-5p	31	27
rno-miR-298-3p rno-miR-185-5p	27	28	rno-miR-139-5p rno-miR-128-2-5p	28	27
rno-miR-20b-5p rno-miR-106b-3p	26	27	rno-miR-17-5p rno-miR-106b-3p	26	26
rno-miR-17-2-3p rno-miR-106b-5p	26	25	rno-miR-151-5p rno-miR-28-3p	36	37
rno-miR-151-5p rno-miR-708-3p	33	33	rno-miR-28-3p rno-miR-708-5p	31	30
rno-miR-28-5p rno-miR-708-3p	29	33	rno-miR-345-5p rno-miR-378-3p	27	26
rno-miR-30a-5p rno-miR-30e-3p	29	29	rno-miR-30e-3p rno-miR-30d-5p	29	30
rno-miR-30d-5p rno-miR-30a-3p	30	29	rno-miR-30a-3p rno-miR-30e-5p	28	29
rno-miR-30e-5p rno-miR-30d-3p	26	24	rno-miR-195-5p rno-miR-16-3p	28	26

*Данные MFE, полученные с помощью биоинформатического анализа с использованием программы RegRNA 2.0.

*MFE data obtained by bioinformatics analysis using the RegRNA 2.0 software.

**Данные MFE, полученные с помощью биоинформатического анализа с использованием программы RNAup.

**MFE data obtained by bioinformatics analysis using the RNAup software.

завываясь с комплементарными им последовательностями промоторов разных генов, длинными некодирующими РНК и при-миРНК [13, 17, 18]. Результаты

исследований по введению в клетку антисмысловых коротких олигонуклеотидов к разным миРНК с последующей их визуализацией *in vivo* подтверждают, что

высокоэнергетические дуплексы могут быть более устойчивы к деградации [16].

Выявленные различия между клетками линии 5-8F NPC человека и постмитотическими нейронами коры мозга крысы в особенностях накопления миРНК в ядре могут быть обусловлены несколькими причинами. Так, в зависимости от стадии развития нейронов количество комплементарных последовательностей-мишеней в цитоплазме может изменяться, что сопровождается перераспределением некоторых миРНК между ядром и цитоплазмой [2, 8]. Также показано селективное накопление ряда миРНК в отростках нейронов, что может приводить к уменьшению количества малых РНК, доступных для транспорта в ядро [19]. Более детальные исследования с разделением внутриклеточных миРНК на цитоплазматический, ядерный и ядрышковый пулы могут расширить наше представление о механизмах селективного внутриклеточного отбора миРНК, способных образовывать низко- и высокоэнергетические дуплексы.

Выявленное нами обогащение пула цитоплазматических миРНК молекулами, способными образовывать более энергетически стабильные дуплексы в опухолевых клетках линии 5-8 NPC, может представлять дополнительный механизм регуляции активности миРНК в отношении их таргетных мРНК за счет секвестирования миРНК в цитоплазме в составе дуплексов.

Маркерные мотивы и их влияние на локализацию миРНК. Согласно некоторым данным литературы определенные мотивы в последовательности молекул миРНК могут влиять на их дальнейшую компартиментализацию, определяя внутриклеточную локализацию и секрецию. Например, были найдены последовательности из 4 нуклеотидов GGAG, способствующие селективному отбору миРНК млекопитающих в экзосомы [5]. Имеются данные, согласно которым накопление в ядре различных миРНК может быть ассоциировано с наличием на их 3'-концах определенных мотивов [2, 18]. Такие нуклеотидные мотивы (например, AGUGUU и AGAGUU) обнаружены на 3'-концах миРНК hsa-mir-29b-3p и hsa-mir-373-3p, что, по мнению авторов, привело к преобладанию этих миРНК в клеточных ядрах [2, 18]. В то же время в другой работе анализ данных глубокого секвенирования нескольких сотен миРНК не выявил корреляции наличия мотивов AGUGUU, а также более коротких (AGUG, AGUGU) или длинных (AGUGUUU) вариантов последовательностей в последних 9 нуклеотидах на 3'-конце миРНК, с их преобладанием в ядре, за исключением hsa-mir-29b-3p [7].

Проведенный нами анализ выборок миРНК, способных образовывать высокоэнергетические дуплексы, из 2 типов клеток показал наличие молекул, как обладающих, так и не обладающих мотивами AGUGU, AGUG, ассоциированными с локализацией в ядре [2, 7], и мотивом GGAG, способствующим выведению миРНК в составе экзосом. В то же время доля этих молекул по отношению ко всем миРНК, способным



Рис. 4. Группы микроРНК (миРНК), отличающиеся короткими мотивами, в пуле миРНК, способных образовывать высокоэнергетические дуплексы. Ряд 1 обозначает миРНК из клеток линии 5-8F назофарингеальной карциномы человека, ряд 2 – миРНК из постмитотических нейронов коры мозга крысы. 1 – группа миРНК, не содержащих мотивы ядерной локализации; 2 – группа миРНК, имеющая мотив AGUG; 3 – группа миРНК, имеющая мотив AGUGU; 4 – группа миРНК, имеющая мотив GGAG; 5 – группа миРНК, имеющая мотивы UGUGUU, ACUGUU, AGAGUU, AGUCUU, AGUGAU, AGUGUA, AGUGUU, UCAGUG, GUGUUU, AGUGUUU. В скобках – соотношение N/C

Fig. 4. MicroRNA (miRNA) groups with different short motifs in the miRNA pool capable of forming high-energy duplexes. Row 1 shows miRNA from human nasopharyngeal carcinoma cell line 5-8F, row 2 – miRNA from rat postmitotic cortical neurons. 1 – miRNA group without nuclear localization motifs; 2 – miRNA group with AGUG motif; 3 – miRNA group with AGUGU motif; 4 – miRNA group with GGAG motif; 5 – miRNA group with UGUGUU, ACUGUU, AGAGUU, AGUCUU, AGUGAU, AGUGUA, AGUGUU, UCAGUG, GUGUUU, AGUGUUU motifs. N/C ratio is presented in brackets

образовывать высокоэнергетические дуплексы, составляет не более 8–22 % (рис. 4). Анализ соотношения N/C между группами миРНК в зависимости от наличия мотивов AGUGU, AGUG, GGAG в последних 9 нуклеотидах на 3'-конце не выявил значимых различий. Другие мотивы – UGUGUU, ACUGUU, AGAGUU, AGUCUU, AGUGAU, AGUGUA, AGUGUU, UCAGUG, GUGUUU, AGUGUUU, предположительно ассоциированные с ядерной локализацией [2, 7, 18], – не обнаружены нами в составе миРНК, способных образовывать высокоэнергетические дуплексы (см. рис. 4). Эти результаты согласуются с данными некоторых работ. Так, для стволовых клеток нейроглии и клеток рака толстой кишки линии HCT116 показано распределение ряда различных миРНК между ядром и цитоплазмой, независимое от наличия мотива AGUGUU или других коротких последовательностей [2, 4].

Таким образом, соотношение N/C для миРНК, способных образовывать высокоэнергетические дуплексы, в клетках линии 5-8 NPC человека и постмитотических нейронах коры мозга крысы не зависит от наличия или отсутствия на их 3'-конце различных коротких мотивов. Результаты нашего исследования свидетельствуют о более сложном механизме внутриклеточного

отбора ряда разных миРНК, которое может наряду с другими факторами определяться энергией возникновения дуплексов миРНК.

Заключение

Селективный отбор миРНК, влияющий на их концентрацию в ядре и цитоплазме, может осуществляться различными путями. Одним из механизмов, позволяющих ограничить доступ миРНК к их мРНК-мишеням, служит образование дуплексов из комплементарных друг другу молекул. Проведенный в работе биоинформатический анализ впервые обнаружил взаимосвязь между внутриклеточной компартиментализацией миРНК (распределение между ядром и цитоплазмой)

и вероятностью образования дуплексов (величиной МФЕ). Обогащение пула цитоплазматических миРНК молекулами, формирующими более стабильные дуплексы, — дополнительное подтверждение регуляторной функции этих структур, ограничивающих взаимодействие миРНК с целевыми мРНК. Обнаруженный феномен может являться важным механизмом эпигенетической регуляции экспрессии генов и активно использоваться трансформированными клетками в процессе малигнизации. Дальнейшие исследования процессов, ведущих к селективному отбору миРНК между различными компартаментами, могут иметь практическое значение при разработке целевых препаратов на основе миРНК.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Катохин А.В., Кузнецова Т.Н., Омелянчук Н.А. МиРНК — новые регуляторы активности генов у эукариот. Вестник ВОГиС 2006;10(2):241–72. [Katochin A.V., Kuznetsova T.N., Omel'yanchuk N.A. MiRNA — new regulators of gene activity in eukaryotes. *Vesytik VOGiS = Bulletin VOGiS* 2006;10(2):241–72. (In Russ.)].
2. Jeffries C.D., Fried H.M., Perkins D.O. Nuclear and cytoplasmic localization of neural stem cell microRNAs. *RNA* 2011;17(4):657–86. DOI: 10.1261/rna.2006511. PMID: 21363885.
3. Liang H., Zhang J., Zen K. et al. Nuclear microRNAs and their unconventional role in regulating non-coding RNAs. *Protein Cell* 2013;4(5):325–30. DOI: 10.1007/s13238-013-3001-5. PMID: 23584808.
4. Park C.W., Zeng Y., Zhang X. et al. Mature microRNAs identified in highly purified nuclei from HCT116 colon cancer cells. *RNA Biol* 2010;7(5):606–14. PMID: 20864815.
5. Villarroya-Beltri C., Gutiérrez-Vázquez C., Sánchez-Cabo F. et al. Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications* 2013;4(2980):1–10. DOI: 10.1038/ncomms3980. PMID: 24356509.
6. Lai E.C., Wiel C., Rubin G.M. Complementary miRNA pairs suggest a regulatory role for miRNA: miRNA duplexes. *RNA* 2004;10(2):171–5. PMID: 14730015.
7. Liao J.-Y., Ma L.-M., Guo Y.-H. et al. Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers. *PLoS One* 2010;5(5):1–14. DOI: 10.1371/journal.pone.0010563. PMID: 20498841.
8. Khudayberdiev S.A., Zampa F., Rajman M., Schrat G. A comprehensive characterization of the nuclear microRNA repertoire of post-mitotic neurons. *Front Mol Neurosci* 2013;6(43):1–19. DOI: 10.3389/fnmol.2013.00043. PMID: 24324399.
9. Huang H.Y., Chien C.H., Jen K.H., Huang H.D. RegRNA: an integrated web server for identifying regulatory RNA motifs and elements. *Nucl Aci Res* 2006;34. DOI: 10.1093/nar/gkl333. PMID: 16845041.
10. Gu X., Mooers B.H., Thomas L.M. et al. Structures and energetics of four adjacent G-U pairs that stabilize an RNA helix. *J Phys Chem B* 2015;119(42):13252–61. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b06970. PMID: 26425937.
11. Mathews D.H., Disney M.D., Childs J.L. et al. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(19):7287–92. DOI: 10.1073/pnas.0401799101. PMID: 15123812.
12. Chen P.S., Su J.L., Cha S.T. et al. miR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans. *J Clin Invest* 2011;121(9):3442–55. DOI: 10.1172/JCI45390. PMID: 21841313.
13. Wong J.J., Ritchie W., Gao D. et al. Identification of nuclear-enriched miRNAs during mouse granulopoiesis. *J Hematol Oncol* 2014;7(42):1–15. DOI: 10.1186/1756-8722-7-42. PMID: 24886830.
14. Кушлинский Н.Е., Фридман М.В., Брага Э.А. Молекулярные механизмы и микроРНК в патогенезе остеосаркомы. *Биохимия* 2016;81(4):448–64. [Kushlinskiy N.E., Friedman M.V., Braga E.A. Molecular mechanisms and microRNAs in the pathogenesis of osteosarcoma. *Biokhimiya = Biochemistry* 2016;81(4):448–64. (In Russ.)].
15. Shu J., Xia Z., Li L. et al. Dose-dependent differential mRNA target selection and regulation by let-7a-7f and miR-17-92 cluster microRNAs. *RNA Biol* 2012;9(10):1275–87. DOI: 10.4161/rna.21998. PMID: 22995834.
16. Pitchiaya S., Heinicke L.A., Park J.I. et al. Resolving subcellular miRNA trafficking and turnover at single-molecule resolution. *Cell Report* 2017;19:630–42. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.03.075. PMID: 28423324.
17. Korla K., Arrigo P., Mitra C.K. Promoters, toll like receptors and microRNAs: A strange association. *Indian J Biochem Biophys* 2013;50(3):169–76. PMID: 23898479.
18. Hwang H.W., Wentzel E.A., Mendell J.T. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* 2007;315(5808):97–100. DOI: 10.1126/science.1136235. PMID: 17204650.
19. Wang B., Bao L. Axonal microRNAs: localization, function and regulatory mechanism during axon development. *J Mol Cell Biol* 2017;9(2):82–90. DOI: 10.1093/jmcb/mjw050. PMID: 27932485.

Благодарность. Авторы выражают благодарность J.-Y. Liao и соавт., а также Sharof A. Khudayberdiev и соавт. за публикацию в приложениях к их статьям данных секвенирования.

Acknowledgment. Authors express gratitude to J.-Y. Liao with co-authors and Sharof A. Khudayberdiev with co-authors for the publication as supporting information to their articles of sequencing data.

Вклад авторов

С.А. Кузьмичев: биоинформатический анализ, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи;

А.В. Комельков: статистический анализ результатов исследования;

Е.М. Чевкина: разработка дизайна исследований, редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

S.A. Kuzmichev: bioinformatic analysis, article writing, reviewing of publications of the article's theme;

A.V. Komelkov: statistical analysis;

E.M. Tchekina: developing the research design, article editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

С.А. Кузьмичев/S.A. Kuzmichev: <https://orcid.org/0000-0003-1660-0898>

А.В. Комельков/A.V. Komelkov: <https://orcid.org/0000-0003-0766-163X>

Е.М. Чевкина/E.M. Tchekina: <https://orcid.org/0000-0001-8837-7969>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 26.06.2018. **Принята к публикации:** 10.08.2018.

Article received: 26.06.2018. **Accepted for publication:** 10.08.2018.