НАУКА ЮГА РОССИИ (ВЕСТНИК ЮЖНОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА) 2016 Т. 12 № 4 С. 57–64 SCIENCE IN THE SOUTH OF RUSSIA 2016 VOL. 12 No 4 P. 57–64

БИОЛОГИЯ

УДК 272.224.46

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ И ПОСТТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ В АБЕРРАНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ микроРНК ПРИ ОБРАБОТКЕ КЛЕТОК HeLa МИТОМИЦИНОМ С

© 2016 г. А.В. Набока¹, М.А. Махоткин¹, М.Г. Тютякина¹, И.Е. Чикунов¹, В.А. Тарасов¹, чл.-корр. РАН Д.Г. Матишов¹

Аннотация. Изучено влияние транскрипционной и посттранскрипционной регуляции биогенеза микроРНК на их аберрантную экспрессию через 8 клеточных поколений после обработки клеток НеLa митомицином С. При регистрации экспрессии зрелой микроРНК использован метод масштабного параллельного секвенирования на платформе HiSeq (Illumina). В случае первичного транскрипта микроРНК (при-микроРНК) и предшественника микроРНК (пре-микроРНК) экспрессия регистрировалась с использованием метода ПЦР в реальном времени. Оказалось, что обработка клеток митомицином С влияет как на транскрипционную активность исследованных в работе групп микроРНК, так и на процессы их созревания в ядре и цитоплазме. Полученные в работе результаты свидетельствуют в пользу того, что в основе сохранения в клеточных поколениях аберрантной экспрессии микроРНК ижат индуцированные митомицином С эпигенетические изменения генома – метилирование ДНК и/или модификация гистонов. Эти эпигенетические изменения подавляют функцию генов, контролирующих дифференциальное созревание микроРНК на этапе преобразования пре-микроРНК в дуплекс ее зрелых форм, а также влияют на селекцию нитей дуплекса зрелой микроРНК при образовании комплекса RISC.

Ключевые слова: микроРНК, клеточный ответ на повреждение ДНК, митомицин С, мутагены.

TRANSCRIPTIONAL AND POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION IN microRNAs ABERRANT EXPRESSION IN HeLa CELLS AFTER MITOMYCIN C TREATMENT

A.V. Naboka¹, M.A. Makhotkin¹, M.G. Tyutyakina¹, I.E. Chikunov¹, V.A. Tarasov¹, Corresponding Member RAS D.G. Matishov¹

Abstract. The effect of transcriptional and post-transcriptional regulation of microRNAs biogenesis on their aberrant expression in HeLa cells after 8 generations following the mitomycin C treatment was studied. Mature microRNA expression was estimated by large-scale parallel sequencing using the Illumina HiSeq sequencer. Primary microRNA transcripts (pri-microRNAs) and microRNA precursors (pre-microRNAs) expression was detected by real-time PCR. It appeared that mitomycin C treatment affects transcriptional activity of studied microRNAs as well as their maturation processes in cell nucleus and cytoplasm. Our findings suggest that genome epigenetic modifications induced by mitomycin C – DNA methylation and/or histones' modification – are the basis of microRNAs aberrant expression heritability in cell generations. These epigenetic alterations inhibit the function of genes controlling differential microRNAs maturation at the stage of pre-microRNAs transformation in a mature duplex form and influence the selection of mature microRNA duplex strands during RISC complex formation.

Keywords: microRNA, DNA damage cellular response, mitomycin C, mutagens.

¹ Институт аридных зон Южного научного центра РАН (Institute of Arid Zones, Southern Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russian Federation), Российская Федерация, 344006, г. Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41, e-mail: korsunova.anastasia@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Наряду с мутациями возникающие повреждения ДНК индуцируют клеточный ответ, в котором участвуют примерно 700 генов [1]. Ключевую роль в развитии этого ответа играют фосфопротеинкиназы – АТМ, DNA-PKcs и ATR [2; 3]. В настоящее время идентифицирован целый ряд белков, которые распознают различные типы повреждений ДНК. Основным сенсором, распознающим индуцированные радиацией двунитевые разрывы ДНК, является белковый комплекс Mre11/Rad50/ Nbs1 [4], а в случае воздействия ультрафиолета – белок DDb1 [5]. Взаимодействие сенсорных белков с повреждениями ДНК приводит к их активации, и этот сигнал передается протеинкиназами ATM [6], DNA-PKcs [7; 8] или ATR [9].

В свою очередь, эти протеинкиназы-трансдукторы осуществляют дальнейшую передачу сигнала белкам-эффекторам, которые непосредственно участвуют в контроле клеточных процессов, включенных в ответ клетки на повреждение ДНК. Таким образом, если при индукции двунитевых разрывов ДНК основными трансдукторами являются АТМ и DNA-PKcs [6; 8], то в случае других повреждений ДНК, таких как однонитевые разрывы, пиримидиновые димеры, аддукты и поперечные сшивки ДНК, в качестве основного трансдуктора выступает протеинкиназа ATR.

Под контролем генов, участвующих в клеточном ответе при повреждении ДНК, находятся процессы, связанные с поддержанием стабильности генома клеток, такие как репарация ДНК [10], клеточное деление [11] и апоптоз [12]. Исследования последних лет показали, что в клеточный ответ на повреждение ДНК включены гены, которые прямо или косвенно влияют на дифференциальную экспрессию микроРНК [13].

МикроРНК являются малыми молекулами размером 19–23 нуклеотида, которые ассоциируются с белком Ago2 (Argonaute 2), образуя комплекс RISC (RNA-induced silencing complex). Взаимодействие этого комплекса с информационной РНК приводит либо к ее деградации, либо к подавлению трансляции. При этом нуклеотидная последовательность микроРНК обеспечивает комплексу RISC способность распознавать информационные РНК-мишени.

Процесс формирования зрелой микроРНК включает ряд этапов, которые протекают как в ядре, так и в цитоплазме клетки (рис. 1). В ядре происходит транскрипция гена микроРНК и образование на базе первичных транскриптов (при-микроРНК) и предшественников микроРНК (пре-микроРНК). При-микроРНК представляют собой фрагмент молекулы РНК размером более тысяч нуклеотидов, содержащие одну или несколько шпилькообразных структур, которые являются основой для формирования пре-микроРНК размером 70–100 пар нуклеотидов. Дальнейшие этапы созревания микроРНК, протекающие уже в цитоплазме, включают в себя образование дуплекса зрелых микроРНК и селекцию нитей этого дуплекса при образовании комплекса RISC [14].

В настоящее время идентифицирован целый ряд генов и, соответственно, белков, включенных в регуляцию транскрипционной активности генов микроРНК, а также ядерного и цитоплазматического этапа созревания микроРНК. Однако эти результаты получены в случаях злокачественного перерождения клеток и в отношении ограниченных по размеру выборок микроРНК. Индукция аберрантной экспрессии микроРНК при действии экзогенных факторов, в том числе при действии мутагенов, гораздо менее изучена. В целом имеющиеся в литературе результаты свидетельствуют в пользу того, что при действии мутагенов в основе сохранения в ряду клеточных поколений аберрантной экспрессии микроРНК лежат индуцированные эпигенетические изменения генома, которые влияют либо на транскрипционную активность генов микроРНК, либо на активность генов, прямо или косвенно участвующих в контроле их дифференциального созревания.

В связи с вышеизложенным целью данной работы является анализ роли транскрипционной регуляции генов микроРНК и последовательных этапов созревания в ядре и цитоплазме для микроРНК, сохранивших аберрантную экспрессию в клеточных поколениях при обработке клеток HeLa митомицином C.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток HeLa. В работе использовали культивируемые *in vitro* клетки HeLa. Клетки культивировали при температуре 37 °C в среде Eagles МЕМ с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки в присутствии 5 % CO₂. Каждые 3 дня выполняли субкультивирование клеток в культуральных флаконах площадью 75 см².

Обработка митомицином С. В качестве индуктора повреждения ДНК использовали митомицин С в концентрации 0,3 мкг/мл среды. Время обработки митомицином С составляло 2 ч. Мутагенное воздействие осуществляли через 24 ч после внесения 5 × 10⁶ клеток на флакон. Выделение и анализ РНК. Для выделения РНК использовалось не менее 2×10^7 клеток. Тотальную РНК выделяли трехкратной экстракцией фенолом и хлороформом [15]. Качество выделенной РНК оценивали по интенсивности свечения фракций РНК, соответствующих рибосомальной РНК 18S и 28S после ее электрофореза в агарозном геле и окрашивания этидиум бромидом [16]. Для выделения малых РНК (размером менее 200 нуклеотидов) использовался набор mirVana miRNA Isolation Kit

(Ambion, Life Science Technologies, США). Количество РНК определяли на приборе Qubit (Life Science Technologies, США).

Создание библиотеки кДНК-копий малых РНК и определение их нуклеотидной последовательности. Создание и очистку библиотеки кДНК-копий малых РНК осуществляли с помощью TruSeq Small RNASample Preparation Kit (Illumina, США). К исходной фракции малых РНК (2,5 мкг) последовательно пришивали 3'- и 5'-адаптеры,



Рис. 1. Схема биогенеза микроРНК при действии мутагенов **Fig. 1.** MicroRNA biogenesis under mutagens action

проводили их обратную транскрипцию и амплифицировали полученные кДНК-копии. Для очистки кДНК-копий использовали электрофорез в 6 % полиакриламидном геле. Из фрагмента геля, содержащего кДНК-копии размером 146-160 п.н., экстрагировали водный раствор ДНК, осаждали гликогеном и 100 % этанолом. Количественный анализ кДНК осуществляли на приборе Oubit (Life Science Technologies, США). Множественное параллельное секвенирование кДНК-библиотек проводили на приборе HiSeq (Illumina, США). Анализ зрелых микроРНК и их предшественников осуществляли путем сравнения секвенированных последовательностей малых РНК с известными нуклеотидными последовательностями, представленными в базе данных miRBase (http://www.mirbase.org/).

Статистический анализ. При проведении расчетов использовали программный пакет edgeR [17]. Анализировали содержание микроРНК, представленных в выборках, включающих не менее десяти копий, для каждого из исследованных вариантов. При оценке статистически значимых различий в уровнях экспрессии микроРНК использовали тест Фишера с модификациями, предложенными М.Д. Робинсоном и Г.К. Смитом [18]. Для учета влияния интегральной экспрессии микроРНК на экспрессию сравниваемых микроРНК проводилась нормализация сопоставимых библиотек методом усеченного среднего М-значения (ТММ), где М является логарифмом отношения частот встречаемости микроРНК в сравниваемых вариантах [19]. При расчете случайной вариации наблюдаемых значений частот учитывали два фактора, один из которых зависел, тогла как другой не зависел от размера регистрируемой выборки микроРНК. Относительная ошибка измерения, связанная с не зависимым от размера выборки фактором, принималась равной 10 % [20]. Для учета множественности сравнений использовали метод оценки вероятности появления ложно-позитивных результатов (FDR), предложенный Й. Бенджамини и Й. Хохбергом [21]. В анализ включены микроРНК, зрелые формы которых представлены в анализируемой выборке не менее чем 25 копиями в контрольном либо опытном варианте и показали изменение экспрессии не менее чем в полтора раза при FDR < 0.01.

Анализ экспрессии при-микроРНК и пре-микроРНК. Оценку экспрессии пре-микроРНК и при-микроРНК проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием амплификатора CFX 96 Real-Time PCR Machine (Bio-Rad, CША). Подбор последовательностей праймеров, представленных в таблице 1, осуществляли в программе Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров пре-микроРНК и при-микроРНК

 Table 1. Nucleotide sequences of pre-miRNA and pri-miRNA primers

Наименова- ние	Сиквенс (5'→3')	Длина, п.н.
pre-mir_let7c	F: TCCGGGTTGAGGTAGTAGGT	20
pre-mir_let7c	R: GCTCCAAGGAAAGCTAGAAGGT	22
pre-mir_100	F: TGCCACAAACCCGTAGATCC	20
pre-mir_100	R: CAAGCTTGTGCGGACTAATACC	22
pre-mir_17	F: AGTGCTTACAGTGCAGGTAGTG	22
pre-mir_17	R: ACCATAATGCTACAAGTGCCTTC	23
pre-mir_99b	F: ACCCACCCGTAGAACCGAC	19
pre-mir_99b	R: CACGAGCTTGTGTGCGG	17
pre-mir_let7e	F: AGGAGGTTGTATAGTTGAGGAGGA	24
pre-mir_let7e	R: GAAAGCTAGGAGGCCGTATAGTG	23
pre-mir_21	F: TCAGACTGATGTTGACTGTTGAATC	25
pre-mir_21	R: AGCCCATCGACTGGTGTTG	19
pre-mir_31	F: GGAGAGGAGGCAAGATGCTG	20
pre-mir_31	R: TTGGCATAGCAGGTTCCCAG	20
pre-mir_30a	F: CCTCGACTGGAAGCTGTGAA	20
pre-mir_30a	R: CAGCTGCAAACATCCGACTG	20
pre-mir_30e	F: GGGCAGTCTTTGCTACTGTAAAC	23
pre-mir_30e	R: GCCGCTGTAAACATCCGACT	20
pre-mir_18a	F: CTGAAGAGCTCAAGGTGGCTG	20
pre-mir_18a	R: TCCATGGCAGAGGGAGTAAACA	22
pri-mir_21	F: GTTCATTTTGTTTTGCTTGGGAGGA	25
pri-mir_21	R: AAGCTACCCGACAAGGTGGT	20
pri-mir_31	F: GGTGTGTCCAAGGAATAGCCA	21
pri-mir_31	R: TGTTGAACTGGGAACCTGCT	20
pri-mir_30e	F: GCCTTTGGATTAGCAAGCCC	20
pri-mir_30e	R: TACAGCTTCCAGTCAAGGATGTT	23
pri-mir_30a	F: AGATCAGACTGCAGCAACCC	20
pri-mir_30a	R: GAAAGCTGGGAGAAGGCTGT	20
pri-mir_17-18a	F: GGTTGGGATCGGTTGCAATG	20
pri-mir_17-18a	R: CTGACACGCAACCCCAAAAG	20
pri-mir_7e-99b	F: GCCTATCTCCATCTCTGACCC	21
pri-mir_7e-99b	R: GGTGGTCAAATGTCATGCTCTG	22
pri-mir_7c	F: GAATTCTACCGCATCAAACCAGAC	24
pri-mir_7c	R: GGATGGGTCATGGTGAAAACG	21
pri-mir_100	F: GACTGAGAGGAGCGCAACAA	20
pri-mir_100	R: GCGTGATTGTATATGCGCCC	20
18S	F: CGGACACGGACAGGATTGA	19
18S	R: ACCACCCACGGAATCGAGA	19
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA	17
U6	R: AACGCTTCACGAATTTGCGT	20

Primer-BLAST (NCBI). Для создания кДНК копий РНК применяли комплект реагентов КІТ iSCRIPT ADVANCED cDNA (Bio-Rad, США). При проведении амплификации использовали набор ПЦР-РВ в присутствии EVA Green (Синтол, Россия). В качестве референсного гена для при-микроРНК применяли 18S, для пре-микроРНК – U6. Для оценки уровня изменения экспрессии микроРНК в опытных вариантах по отношению к таковому в контроле применяли метод 2(-Delta Delta C(T)) [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе мы использовали цитостатический препарат из группы противоопухолевых антибиотиков митомицин С, который является классическим индуктором поперечных сшивок ДНК [23]. Объектом исследования служила перевиваемая клеточная культура HeLa. Экспрессию микроР-НК анализировали через 8 суток после обработки клеток митомицином С. За это время клетки HeLa прошли порядка 8 клеточных поколений. Оказалось, что 61 микроРНК показали изменения экспрессии, индуцированные митомицином С. При этом в 16 случаях наблюдалось статистически значимое изменение соотношений 5р- и 3р-форм зрелой микроРНК [24].

Изменение селекции 5р- и 3р-нитей дуплекса микроРНК. Известно, что формирование комплекса RISC связано с селекцией нитей дуплекса зрелых микроРНК, одна из которых, нить-«пассажир», деградирует, тогда как другая, нить-«гид», «загружается» в белок-«аргонавт» (Ago), представляя собой ядро комплекса RISC (рис. 2). В качестве функциональной активной нити с разной вероятностью



Рис. 2. Механизмы дифференциальной трансформации премикроРНК в зрелые формы микроРНК

Fig. 2. Mechanisms of differential transformation of pre-miRNAs into mature miRNAs forms

могут выступать как 5р-, так и 3р-нити их дуплекса. В процессе распознавания мишеней участвует не вся последовательность микроРНК, а лишь ее участок со второго по восьмой нуклеотид. Нуклеотидная последовательность этого участка форм 5р и 3р отдельных микроРНК не совпадает и, соответственно, не совпадают спектры их генов-мишеней [25].

В таблице 2 представлены микроРНК, показавшие статистически значимые изменения экспрессии микроРНК в клетках через 8 суток после их обработки митомицином С (FDR < 0,01) [24; 26]. Видно, что для пяти микроРНК значимо изменяется экспрессия лишь одной из ее форм, это 5р-нить. Однако более наглядно влияние митомицина С на селекцию нитей дуплекса микроРНК показано для четырех микро-РНК (miR-18a, miR-17, miR-31, miR-30a), у которых значимо изменялась экспрессия обеих нитей, но в противоположном направлении. Оставалось неясным, связаны ли изменения селекции нитей дуплекса микроРНК с более ранними этапами биогенеза микроРНК – транскрипцией гена микроРНК, образованием пре-микроРНК в ядре и дуплекса зрелых микроРНК в цитоплазме.

Изменение экспрессии при- и пре-микроРНК. С использованием метода ПЦР в реальном времени для восьми микроРНК проведена оценка индуцированных митомицином С изменений экспрессии при- и пре-микроРНК (табл. 3). Известно, что в образовании комплекса RISC участвует лишь одна из нитей дуплекса зрелых микроРНК. В этой связи для оценки эффективности формирования дуплекса микроРНК мы использовали суммарную экспрессию 5р- и 3р-форм зрелых микроРНК. В большинстве случаев экспрессия при- и пре-микроРНК увеличивается в результате обработки митомицином С. Однако копийность дуплексов микроРНК уменьшается (табл. 3). Это означает, что в сохранение в клеточных поколениях аберрантной экспрессии микроРНК вносит вклад как транскрипционная регуляция генов микроРНК, так и созревание первичного транскрипта микроРНК, включая его преобразование в предшественник микроРНК (пре-микроРНК) в ядре и в дуплекс зрелых микро-РНК в цитоплазме, а также селекцию нитей дуплекса микроРНК при формировании комплекса RISC.

Этапы биогенеза и механизмы регуляции экспрессии микроРНК. В основе сохранения в клеточных поколениях аберрантной экспрессии микроРНК лежат индуцированные, в данном случае митомицином С, эпигенетические изменения в генах микроРНК либо в генах, контролирующих их дифференциальное созревание. Показано, что основным регулятором транскрипционной активности генов микроРНК является известный супрессор опухоли р53. Наряду с белком р53 транскрипционными регуляторами генов микроРНК выступают его паралоги р63 и р73, а также белки с-Мус и E2F. Процесс преобразования при-микроРНК в пре-микроРНК связан с функционированием полибелкового комплекса Drosha/DGCR8 [27]. Кроме этих белков микропроцессор Drosha/DGCR8 содержит и другие кофакторы, как правило, РНК-связующие белки, определяющие дифференциальное взаимодействие комплекса с определенным набором при-микроРНК [28; 29]. В процессе трансформации пре-микроРНК в дуплекс зрелых микроРНК в цитоплазме основную роль играет другой полибелковый комплекс – Dicer/TPBP, который также ассоциируется с РНК-связующими белками, например белком KSRP [30]. Роль белка p53 в дифференциальной экспрессии микроРНК не ограничивается регуляцией транскрипционной активности их генов. Показано, что белок р53 взаимодействует с хеликазами р68 и р72, которые связываются с двунитевой РНК в стебле шпилькообразной структуры в составе при-микроРНК и, таким образом, увеличивает эффективность взаимодействия микропроцессорного комплекса с определенным набором при-микроРНК, что приводит к увеличению эффективности их созревания. Еще одним РНК-связующим белком является KSRP, который ассоциируется как с полибелковым комплексом Drosha, так и с Dicer (рис. 1) [30; 31]. Влияние KSRP на дифференциальное созревание при-микроРНК и премикроРНК связано со способностью распознавать и связываться с короткими нуклеотидными последовательностями в петле шпилькообразных структур при- и пре-микроРНК. Показано, что хеликазы р68/ p72 и белок KSRP играют ключевую роль в дифференциальном созревании микроРНК. Их активация обусловливается увеличением экспрессии микро-РНК, однако, по нашим данным (табл. 3), большая часть микроРНК сохранила свою аберрантную экспрессию в восьмом клеточном поколении после действия митомицина С и показала уменьшение экспрессии как зрелых микроРНК, так и их дуплексов.

В литературе описаны пути регуляции дифференциальной экспрессии микроРНК, приводящие к ее снижению. К ним, в частности, относятся Lin28-TUT-зависимое полиуридинилирование 3'-конца пре-микроРНК [32] и метилирование 5'-конца пре-микроРНК [33]. Это в обоих случаях приводит к деградации молекулы пре-микроРНК. Однако эти процессы не включены в ответ клетки на индукцию повреждений ДНК. Полученные в Таблица 2. МикроРНК с разнонаправленными изменениями экспрессии 5р- и 3р-форм

 Table 2. MicroRNAs with different directions of expression of 5pand 3p-forms

łK	5р микроРНК				3р микроРНК				
PoPF	RPM		FC	R	RP	M	Ę	К	
МИК]	К	0	\log_2	FD	К	0	\log_2	FD	
5р и 3р микроРНК в противоположных направлениях									
mir-18a	668	270	-1,2	0,0000	29	67	1,4	0,0146	
mir-17	5593	3285	-0,6	0,0091	130	246	1,1	0,0015	
mir-31	718	1436	1,1	0,0000	68	21	-1,6	0,0160	
mir-30a	2531	5949	1,4	0,0000	2887	1199	-1,1	0,0000	
5р микроРНК									
let-7e	8091	1158	-2,7	0,0000	48	64	0,5	0,3815	
let-7c	10947	1597	-2,6	0,0000	57	70	0,4	0,4746	
mir-100	17327	2594	-2,6	0,0000	627	571	0,0	1,0000	
mir-99b	39247	2989	-3,6	0,0000	96	82	-0,1	0,9477	
mir-30e	312	1122	2,0	0,0000	1061	876	-0,1	0,6943	

Примечания. RPM – число молекул микроPHK на миллион; К – контроль; О – опыт; log₂FC – двоичный логарифм отношения RPM в опытных и контрольных вариантах с учетом нормировочных коэффициентов, которые равны 1,049 и 0,953 для опытной и контрольной выборок микроPHK соответственно; FDR – оценка вероятности появления ложнопозитивных результатов по Й. Бенджамини и Й. Хохбергу [26]. Полужирным шрифтом выделены значения статистически значимых изменений экспрессии микроPHK

Notes. RPM – the number of miRNA molecules per million; K – control; O – mutagenic treatment; log2FC – the binary logarithm of RPM in the experimental and control variants with allowance for the normalization coefficients, which are equal to 1.049 and 0.953 for the experimental and control miRNA samples, respectively; FDR – Benjamini and Hochberg false discovery rate control procedure [26]. The statistically significant changes in miRNA expression are shown in bold

работе результаты свидетельствуют в пользу того, что в основе сохранения в клеточных поколениях аберрантной экспрессии микроРНК лежат индуцированные митомицином С эпигенетические изменения генома - метилирование ДНК и/или модификация гистонов. Эти эпигенетические изменения подавляют функцию генов, контролирующих дифференциальное созревание микроРНК на этапе преобразования пре-микроРНК в дуплекс ее зрелых форм, а также влияют на селекцию нитей дуплекса зрелой микроРНК при образовании комплекса RISC. В последние 10-12 лет получены убедительные доказательства ключевой роли микро-РНК в развитии злокачественных опухолей. В этой связи способность мутагенов индуцировать аберрантную экспрессию микроРНК, сохраняющуюся в ряду клеточных поколений, представляет особый интерес.

При-микроРНК		Пре-микроРНК		микроРНК			Дуплекс miR** (mir/mir*)
Царранию	Экспрессия	Название	Экспрессия (log ₂)	Название	Экспрессия (\log_2)		Drannaaug (lag.)
название	(\log_2)				5p	3p	Экспрессия (\log_2)
pri-mir-100	2,6	pre-miR-100	0,97	miR-100	-2,6	H3	-2,3
pri-let-7c	0,84	pre-let-7c	1,4	let-7c	-2,6	H3	-2,6
pri-let-7e-99b	2,6	pre-let-7e	1,8	let-7e	-2,7	H3	-2,6
		pre-miR-99b	_	miR-99b	-3,6	H3	-3,5
pri-miR-17-18a	1,2	pre-miR-17	1,2	miR-17	-0,6	1,1	-0,5
		pre-miR-18a	НЗ	miR-18a	-1,2	1,4	-0,9
pri-miR-30a	НЗ	pre-miR-30a	НЗ	miR-30a	1,4	-1,1	0,6
pri-miR-30e	-0,81	pre-miR-30e	НЗ	miR-30e	2	H3	H3
pri-miR-21	НЗ	pre-miR-21	0,71	miR-21	1,7	1,0	1,4
pri-miR-31	0,82	pre-miR-31	—	miR-31	1,1	-1,6	1,1

Таблица 3. Влияние этапов биогенеза микроРНК на ее аберрантную экспрессию **Table 3.** Influence of microRNA biogenesis steps on its aberrant expression

Примечания. * – дуплекс зрелых микроРНК – miR 5p- / miR 3p-; ** – двоичный логарифм отношения суммы нормированного числа 3p- и 5p-форм микроРНК в опытных вариантах по отношению к таковой в контрольном варианте; нз – нет статистически значимых различий; «-» – данные отсутствуют.

Notes. * – mature miRNA duplex – miR 5p- / miR 3p-; ** – the binary logarithm of the ratio between normalized total numbers of 5p and 3p miRNA forms in the experimental and control variants; "H3" – no statistically significant changes; "–" – no data.

Работа выполнена в соответствии с Планом НИР ИАЗ ЮНЦ РАН в рамках темы «Идентификация и анализ генетических и эпигенетических детерми-

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (REFERENCES)

- Matsuoka S., Ballif B.A., Smogorzewska A., McDonald III E.R., Hurov K.E., Luo J., Bakalarski C.E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S.P., Elledge S.J. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 316(5828): 1160–1166. doi: 10.1126/science.1140321
- Uziel T., Lerenthal Y., Moyal L., Andegeko Y., Mittelman L., Shiloh Y. 2003. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.* 22(20): 5612–5621. doi: 10.1093/emboj/cdg541
- Falck J., Coates J., Jackson S.P. 2005. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*. 434(7033): 605–611. doi: 10.1038/ nature03442
- Petrini J.H., Stracker T.H. 2003. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell. Biol.* 13(9): 458–462. doi: 10.1016/S0962– 8924(03)00170-3
- Ghodke H., Wang H., Hsieh C.L., Woldemeskel S., Watkins S.C., Rapić-Otrin V., Van Houten B. 2014. Single-molecule analysis reveals human UV-damaged DNA-binding protein (UV-DDB) dimerizes on DNA via multiple kinetic intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 111(18): E1862–E1871. doi: 10.1073/ pnas.1323856111
- Zhang X., Wan G., Berger F.G., He X., Lu X. 2011. The ATM kinase induces microRNA biogenesis in the DNA

нант, участвующих в контроле развития злокачественных опухолей и ответе клеток на стрессовые воздействия» (0259-2014-0007).

damage response. Mol. Cell. 41(4): 371-383. doi: 10.1016/j. molcel.2011.01.020

- Weterings E., Chen D.J. 2007. DNA-dependent protein kinase in nonhomologous end joining: a lock with multiple keys. *J. Cell. Biol.* 179(2): 183–186. doi: 10.1083/jcb.200705106
- Mahaney B.L., Meek K., Lees-Miller S.P. 2009. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by nonhomologous end-joining. *Biochem. J.* 417(3): 639–650. doi: 10.1042/bj20080413
- Cang Y., Zhang J., Nicholas S.A., Kim A.L., Zhou P., Goff S.P. 2007. DDB1 is essential for genomic stability in developing epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104(8): 2733–2737. doi: 10.1073/pnas.0611311104
- Landau D.A., Slack F.J. 2011. MicroRNAs in Mutagenesis, Genomic Instability and DNA Repair. *Seminars in Oncology*. 38(6): 743–751. doi: 10.1053/j.seminoncol.2011.08.003
- Bueno M.J., Perez de Castro I., Malumbres M. 2008. Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle*. 7(20): 3143–3148. doi: 10.4161/cc.7.20.6833
- Lima R.T., Busacca S., Almeida G.M., Gaudino G., Fennell D.A., Vasconcelos M.H. 2011. MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. *Eur. J. Cancer.* 47(2): 163–174. doi: 10.1016/j.ejca.2010.11.005
- Hu H., Gatti R.A. 2011. MicroRNAs: new players in the DNA damage response. J. Mol. Cell Biol. 3(3): 151–158. doi: 10.1093/jmcb/mjq042
- Ha M., Kim V.N. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15(8): 509–524. doi: 10.1038/nrm3838

- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162(1): 156–159. doi: 10.1016/0003-2697(87)90021-2
- Wood E.J. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual by T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook. New York, Cold Spring Harbor Laboratory: 545 p. doi: 10.1016/0307-4412(83)90068-7
- Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 26(1): 139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
- Robinson M.D., Smyth G.K. 2008. Small sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics*. 9(2): 321–332. doi: 10.1093/biostatistics/kxm030
- Robinson M.D., Oshlack A. 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 11(3): R25. doi: 10.1186/gb-2010-11-3-r25
- McCarthy D.J., Chen Y., Smyth G.K. 2012. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucl. Acids Res.* 40: 4288–4297. doi: 10.1093/nar/gks042
- Benjamini Y., Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J. Royal Stat. Soc. B. 57(1): 289–300. doi: 10.2307/2346101
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Li H., Yu G., Shi R. 2014. Cisplatin-induced epigenetic activation of miR-34a sensitizes bladder cancer cells to chemotherapy. *Molecular Cancer*. 13(8): 183. doi: 10.1186/1476-4598-13-8
- 24. Тарасов В.А., Махоткин М.А., Шин Е.Ф., Бойко Н.В., Тютякина М.Г., Чикунов И.Е., Набока А.В., Машкарина А.Н., Кирпий А.А., Матишов Д.Г. 2016. Изменение селекции нитей микроРНК при индукции повреждений ДНК. Доклады АН. 467(2): 226–228.

Tarasov V.A., Makhotkin M.A., Shin E.F., Boiko N.V., Tyutyakina M.G., Chikunov I.E., Naboka A.V., Mashkarina A.N., Kirpii A.A., Matishov D.G. 2016. Change in the Selection of microRNA Strands during DNA Damage Induction. *Dokl. Biochem. Biophys.* 467(1): 1–3. doi: 10.1134/ s160767291602006x

- Marco A., Macpherson J.I., Ronshaugen M., Griffiths-Jones S. 2012. MicroRNAs from the same precursor have different targeting properties. *Silence*. 3(1): 8. doi: 10.1186/1758-907x-3-8
- Benjamini Y., Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Royal Stat. Soc. B.* 57(1): 289–300. doi: 10.2307/2346101
- 27. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V.N. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 425(6956): 415–419. doi: 10.1038/nature01957
- Connerty P., Ahadi A., Hutvagner G. 2015. RNA binding proteins in the miRNA pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 17(1): 31. doi: 10.3390/ijms17010031
- Choudhury N.R., Michlewski G. 2012. Terminal loop-mediated control of microRNA biogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 40(4): 789–793. doi: 10.1042/bst20120053
- 30. Trabucchi M., Briata P., Garcia-Mayoral M., Haase A.D., Filipowicz W., Ramos A., Gherzi R., Rosenfeld M.G. 2009. The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature*. 459(7249): 1010–1014. doi: 10.1038/nature08025
- Fukuda T., Yamagata K., Fujiyama S., Matsumoto T., Koshida I., Yoshimura K., Mihara M., Naitou M., Endoh H., Nakamura T., Akimoto C., Yamamoto Y., Katagiri T., Foulds C., Takezawa S., Kitagawa H., Takeyama K., O'Malley B.W., Kato S. 2007. DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat. Cell Biol.* 9(5): 604–611. doi: 10.1038/ncb1577
- 32. Heo I., Joo C., Kim Y.K., Ha M., Yoon M.J., Cho J., Yeom K., Han J., Kim V.N. 2009. TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell*. 138(4): 696–708. doi: 10.1016/j.cell.2009.08.002
- Xhemalce B., Robson S.C., Kouzarides T. 2012. Human RNA methyltransferase BCDIN3D regulates microRNA processing. *Cell*. 151(2): 278–288. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.041

Поступила 30.08.2016