

УДК 577.217.52

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ В РИБОСОМНОЙ РНК

А.Я. Головина, П.В. Сергиев, О.А. Донцова

(Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского; кафедра химии природных соединений; e-mail: petya@genebee.msu.su)

Модифицированные нуклеотиды встречаются во всех типах РНК, в том числе в рибосомных РНК. Выявление модифицированных нуклеотидов важно для понимания функциональной роли РНК в живых клетках. В настоящем обзоре представлены методы, позволяющие находить модифицированные нуклеотиды в рибосомных РНК.

Ключевые слова: РНК, модифицированные нуклеотиды, рибосома.

Во всех живых организмах молекулы РНК различных типов подвергаются посттранскрипционным модификациям. Только к концу прошлого века количество известных природных модификаций четырех основных рибонуклеотидов превысило сотню [1]. Их можно разделить на четыре основных типа. Первый включает в себя изомеризацию уридина в псевдоуридин, второй – модификации азотистых оснований, такие как метилирование атомов углерода и азота, дезаминирование (к примеру, с образованием инозина), восстановление двойных связей (с образованием дигидроуридина), встраивание атома серы и алкилирование (к примеру, изопентилирование, треонилирование). Третий тип представлен метилированием 2'-гидроксила рибозы (Nm). Четвертый тип, наиболее сложный – это множественные модификации (например, образование 3-(3-амино-3-карбоксыпропил)уридина, аср³U; 1-метил-3-(3-амино-3-карбоксыпропил)псевдоуридина, m¹аср³Ψ) или «гипермодификации», которые формируются путем специфических обменных механизмов (к примеру, кьюозин, который встречается у эубактерий и эукариот).

Среди всех классов РНК транспортные РНК (тРНК) и рибосомные РНК (рРНК) наиболее подвержены различным модификациям. Так, около 11, 14 и 17% всех нуклеотидов тРНК являются модифицированными в *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* и в клетках животных [2]. Известно, что эти модификации обеспечивают химическое и функциональное разнообразие тРНК, а также улучшают их структурную стабильность [3]. Как и тРНК, рРНК также содержит множество модифицированных нуклеотидов, и они сосредоточены преимущественно в функционально значимых областях рибосомы. Полный список всех модификаций рРНК и их особенностей

был подробно составлен для *E. coli* [1] и в некоторой степени для других организмов [4]. Одной из наиболее интересных и распространенных модификаций рибонуклеотидов является метилирование. Большинство метилированных нуклеотидов уже идентифицированы, однако остается вероятность того, что наличие или отсутствие той или иной модификации регулируется в зависимости от внешних для клетки условий. Кроме того, некоторые модифицированные нуклеотиды, которые всегда присутствуют в клетке, могут быть еще не обнаружены.

Существует большое количество различных вариантов метилирования нуклеотидов РНК, которые можно разделить на 2 большие группы: метилирование азотистого основания и 2'-О-метилирование. В свою очередь азотистое основание может иметь метильную группировку на атомах азота (метилированные нуклеотиды: m⁶A, m²G, m⁶₂A, m⁷G, m³U, m³Ψ, m¹G) или углерода (m⁵C, m⁵U, m²A, m⁸A, m²m⁸A). Все перечисленные типы метилированных нуклеотидов РНК представлены на рис. 1.

Положение метильных групп в рибонуклеотидах можно разделить на препятствующие и не препятствующие образованию классических Уотсон-Криковских пар.

На сегодняшний день существует богатое разнообразие методов для определения метильных групп, содержащихся в нуклеотидах РНК.

Фингерпринтный анализ

Один из самых ранних методов установления положения метилированного нуклеотида – разделение двумерным электрофорезом радиоактивно меченных [¹⁴C]-фрагментов РНК, полученных путем ферментативного гидролиза, которые далее секвенировали

[5]. Данный метод имеет ряд недостатков: 1) для получения РНК *in vivo* с радиоактивно мечеными метильными группами выбранным клеткам необходим метионин, причем требуются определенные условия для роста клеток; 2) затруднено секвенирование фрагментов; 3) зачастую сложно определить местонахождение секвенированного фрагмента в исходной РНК. Этими трудностями обусловлен недостаточный объем информации о наличии метилированных оснований.

Секвенирование РНК путем химического или ферментативного гидролиза

В 1977 г. Максам и Гилберт создали метод секвенирования ДНК путем специфического химического гидролиза [6], который основывается на различиях в химических свойствах нуклеотидов. Следом за этим открытием были предложены методы химического [7] и ферментативного [8] секвенирования РНК, которые позволяли также обнаружить некоторые модифицированные нуклеотиды. В ходе химического секвенирования радиоактивно меченную с одного

конца РНК подвергали модификации, а затем гидролизу в присутствии реагентов, специфичных по отношению к гуанину, аденину или пиримидиновым основаниям. А в результате ферментативного расщепления РНК различными нуклеотид-специфичными РНКазами также получали набор олигорибонуклеотидов. Полученные фрагменты РНК анализировали с помощью электрофореза. Наличие 2'-О-метильной группы в рибозе препятствовало характерному разрыву фосфодиэфирной связи в обоих методах и таким образом могло быть обнаружено.

Для анализа больших РНК использовали олигодезоксирибонуклеотиды, комплементарные различным участкам РНК, и полученные РНК-ДНК-гибриды подвергали гидролизу с помощью РНКазы Н. Таким образом была получена карта 18S рРНК кролика с идентификацией метилированных нуклеотидов (Сm, Am, Um, m⁷G [9]). Однако идентификация метилированных нуклеотидов подобным методом в 18S рРНК – лишь исключение, так как секвенирование больших РНК с его помощью вызывает много затруднений. Кроме

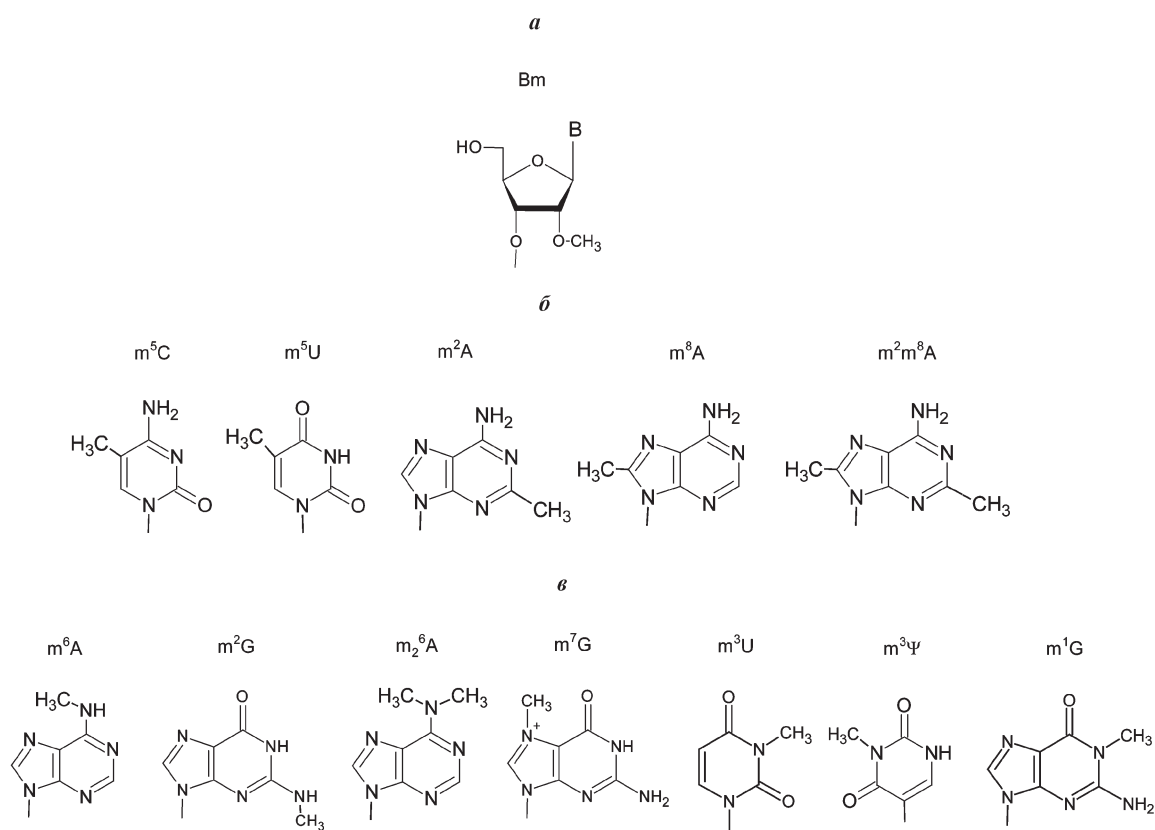


Рис. 1. Метилированные нуклеозиды и азотистые основания, встречающиеся в РНК: *a* – 2'-О-метилированный нуклеозид в общем виде (Bm); *b* – азотистые основания, метилированные по атому углерода: 5-метилцитозин (m⁵C), 5-метилурацил (m⁵U), 2-метиладенин (m²A), 8-метиладенин (m⁸A), 2,8-диметиладенин (m²m⁸A); *в* – азотистые основания, метилированные по атому азота: 6-метиладенин (m⁶A), 2-метилгуанин (m²G), 6,6-диметиладенин (m₂⁶A), 7-метилгуанин (m⁷G), 3-метилурацил (m³U), 3-метилпсевдоурацил (m³Ψ), 1-метилгуанин (m¹G)

того, путем гидролиза РНК далеко не все метилированные нуклеотиды можно было идентифицировать. Поэтому требовалось найти более универсальный подход к данной проблеме. На смену описанным методам пришли новые, которые и по сей день используют для обнаружения метилированных нуклеотидов.

Реакция обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции с целью поиска модифицированных нуклеотидов впервые применила группа Оффенганда, обнаружив таким образом несколько псевдоуридиловых нуклеотидов в прокариотической 23S рРНК [10], а несколько позднее – некоторые псевдоуридиловые нуклеотиды, а также 2'-О-метилированные в эукариотической 28S рРНК [11]. Как известно, реакция обратной транскрипции терминируется при наличии некоторых модифицированных нуклеотидов, в особенности тех, которые мешают правильному формированию Уотсон-Криковских пар. При удлинении олигодезоксирибонуклеотида, имеющего радиоактивную или флуоресцентную метку, можно детектировать характерные остановки обратной транскриптазы на том или ином «неправильном» нуклеотиде. Помимо этого было показано, что в зависимости от контекста в рРНК остановка обратной транскрипции перед 2'-О-метилированными нуклеотидами может существенно зависеть от концентрации дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов, добавленных к реакции [12]. Таким образом, наличие 2'-О-метилирования можно выявлять с помощью обратной транскрипции при недостатке дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов.

Реакция обратной транскрипции широко используется не только для прямого определения модифицированных нуклеотидов. Некоторые модификации,

в обычных условиях не приводящие к остановке обратной транскриптазы, можно обнаружить, используя различия в химических свойствах метилированного и неметилированного нуклеотида. Так, метилированный по эндоциклическому атому азота в положении 7 гуанозин (m^7G) может быть восстановлен тетрагидроборатом натрия с последующим отщеплением азотистого основания в присутствии анилина в кислой среде (рис. 2), в то время как неметилированный гуанозин не вступает в указанные реакции [13]. Очевидно, что такое отличие будет приводить к существенной разнице в эффективности терминации реакции обратной транскрипции в области исследуемого нуклеотида и таким образом указывать на наличие или отсутствие нуклеотида m^7G .

Аналогично нуклеотиду m^7G , нуклеотид m^3C также вступает в реакцию β -элиминирования после активации гидразином, так как метильная группа в положении 3 усиливает электрофильность цитозина (рис. 3).

Стоит отметить также реакционную способность других модифицированных нуклеотидов, которую также можно использовать в их детекции, например, диметилхлорсилан взаимодействует специфически с нуклеотидом m^2G [14].

Отдельно можно выделить нуклеофильные и восстанавливающие агенты, которые специфически взаимодействуют с нуклеотидами. Бисульфит, гидразин, метоксамин и гидроксилламин способны атаковать шестой атом углерода в пиримидиновых основаниях [15–20]. При обработке РНК бисульфитом при строгом контроле условий прохождения реакции нуклеотид m^5C не будет взаимодействовать с ним в связи с пониженной электрофильностью, в то время как немодифицированный цитозин будет дезаминирован

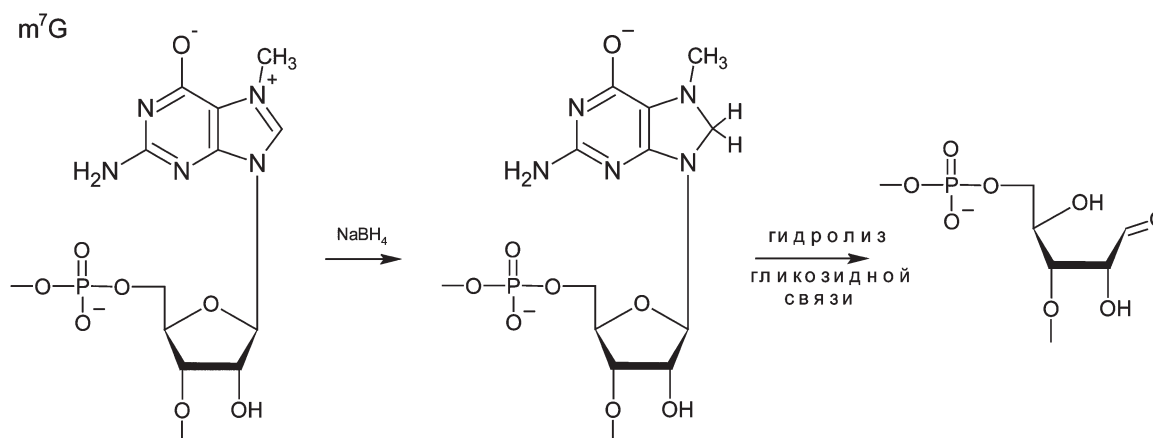
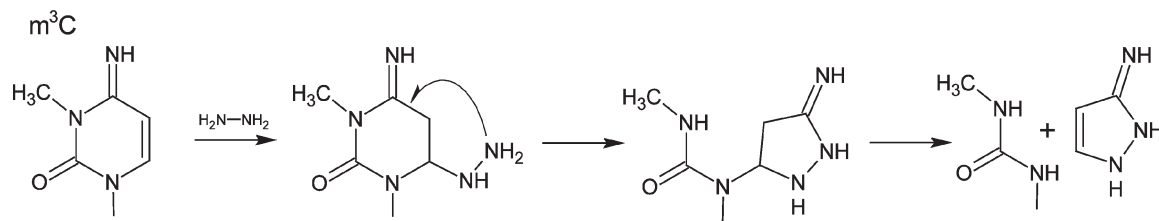
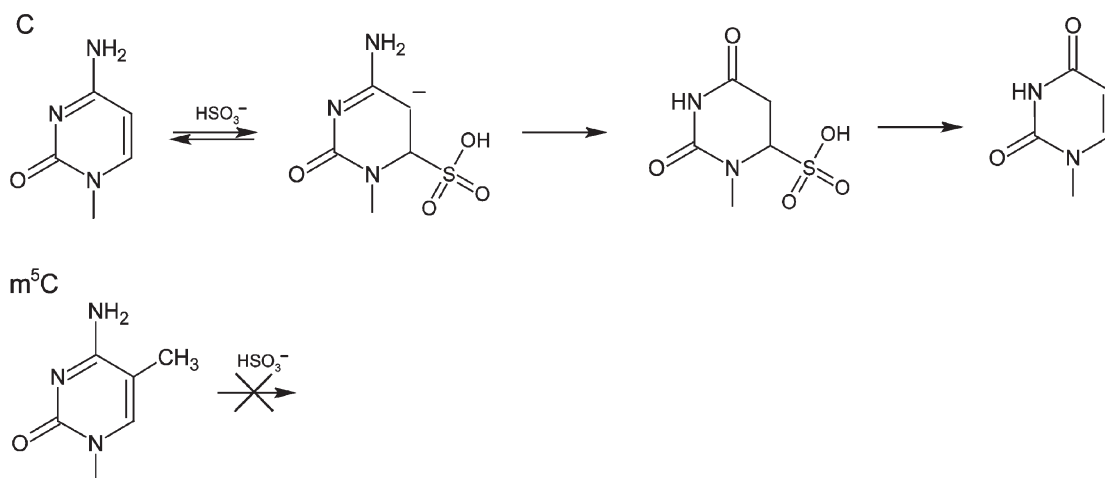


Рис. 2. Реакция апуринизации метилированного гуанозин монофосфата m^7G

Рис. 3. Реакция β -элиминирования метилированного цитозина m^3C Рис. 4. Бисульфитная реакция с участием азотистых оснований C и m^5C

и превратится в урацил (рис. 4). Данный метод стал классическим при определении цитозина, метилированного по атому C5.

Кроме реакции с бисульфитом, также интересны реагенты, специфически окисляющие m^5C , – оксид осмия (VIII) и перманганат-ион. Они окисляют двойную C5–C6-связь 5-метилцитозина, приводя впоследствии к гидролизу РНК (рис. 5).

2'-О-метилированные нуклеотиды более устойчивы к щелочному гидролизу, чем неметилированные. Это связано с тем, что свободная 2'-ОН-группа рибозы подвергается депротонированию и затем атакует соседний 3'-гидроксил с образованием циклофосфата с одновременным гидролизом цепи РНК. Метильная группировка препятствует щелочному гидролизу и может быть обнаружена путем реакции обратной транскрипции (рис. 6) [12, 21].

Большинство последующих методов определения метилированных нуклеотидов так или иначе являются производными от ранее предложенных. Для приготовления исследуемых образцов РНК чаще всего используют характерные химические свойства метилиро-

ванных нуклеотидов или нуклеотид-специфический гидролиз с помощью РНКаз.

Масс-спектрометрия

При попытке анализировать нуклеиновые кислоты методами масс-спектрометрии исследователи сталкивались с проблемой, связанной с термической нестабильностью этих молекул. Для получения целых неповрежденных фрагментов РНК необходимо было подобрать условия ионизации «мягкие», но достаточные для формирования ионов. Кроме того, большинство масс-спектрометров имеют ограничения по максимальной анализируемой массе фрагментов. Данную проблему позволяет решить масс-спектрометрия с электроспрей-ионизацией (ESI-MS), которая впервые была применена для определения модифицированных нуклеотидов РНК группой Макклоски [22]. При проведении данного метода олигонуклеотиды формируют многозарядные ионы в газовой фазе, и это позволяет анализировать фрагменты, более тяжелые, чем было возможно ранее [23]. Пример сравнительного анализа методом масс-спектрометрии MALDI оли-

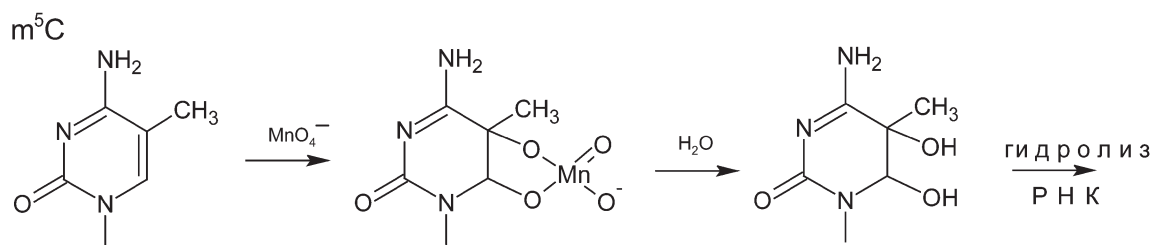


Рис. 5. Окисление метилированного цитозина m^5C перманганат-ионом

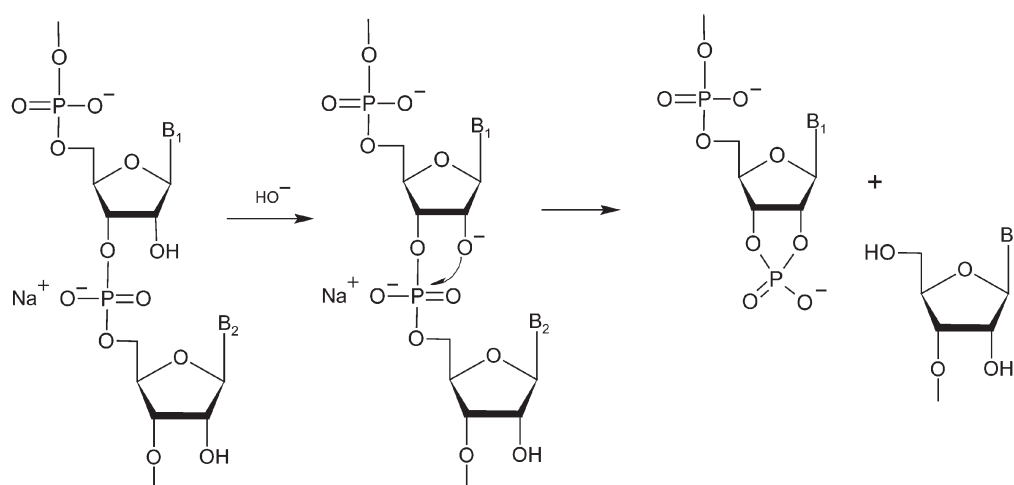


Рис. 6. Гидролиз РНК через образование 2',3'-циклофосфата

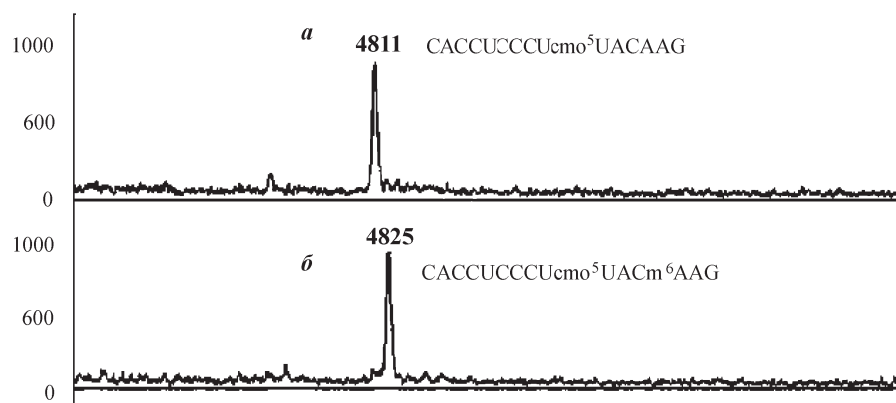


Рис. 7. MALDI MS-анализ фрагментов тРНК₁^{Val} из штамма: *a* – *Dyf1C* (нуклеотид A37 не метилирован), *б* – *Dyf1C*, несущего плазмиду с геном метилтрансферазы *YfiC* (нуклеотид A37 метилирован в шестом положении) [24]

горибонуклеотидов, содержащих и не содержащих метилированный аденин, представлен на рис. 7 [24]. На рис. 7 представлена область тяжелых ионов. Фрагменты тРНК получены путем расщепления РНКазой T1. Соответствующие пику олигонуклеотидные последовательности и их массы отмечены на спектре.

Новые методы анализа фрагментов РНК продолжают совершенствоваться, но их основные подходы, описанные в данной статье, сохраняются [25]. Наиболее часто для получения масс-спектров молекулы РНК предварительно гидролизуют специфическими РНКазами с образованием коротких фрагментов и затем сравнивают их теоретические и экспериментально определяемые массы. Отдельное достоинство метода заключается в том, что с его помощью можно детектировать разницу в массах фрагментов, составляющую менее 1 Да, поэтому обнаружение и идентификация любых модификаций нуклеотидов не составляет труда.

Существенным недостатком метода является сложность в анализе высокомолекулярных олигорибонуклеотидов. Зачастую это накладывает ограничения на возможность точного определения локализации метилированного нуклеотида в больших молекулах РНК, таких, как рРНК. Данная проблема может быть решена в некоторых случаях путем гидролиза макромолекулы с образованием более мелких фрагментов. Другой недостаток анализа метилированных моно- и олигонуклеотидов заключается в том, что метод не дает информации о положении метильной группы в нуклеотиде. Поэтому результаты масс-спектрометрического анализа необходимо дополнять другими методами.

Анализ метилированных нуклеотидов методом ВЭЖХ

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволяет сравнивать даже небольшие изменения в подвижности различных модифицированных нуклеотидов. Использование стандартов – синтетических метилированных нуклеотидов – дает однозначный ответ на вопрос о том, каков характер модификации. Для предварительного установления предполагаемого характера модификации нуклеотида метод ВЭЖХ комбинируют с методом ESI-MS [22, 26–29] и получают точ-

ную информацию о молекулярной массе и подвижности исследуемого нуклеотида. Путем такого подхода был идентифицирован единственный известный в природе 8-метиладенозин 2503 в 23S рРНК *E. coli* [27].

Несмотря на достоинства описанных методов, даже совмещение ВЭЖХ – ESI-MS не дает ответ на вопрос, где именно локализована модификация. Как правило, исследуемую область устанавливают предварительно путем реакции обратной транскрипции различных областей РНК или анализируют небольшие фрагменты РНК методом масс-спектрометрии MALDI. Метод ВЭЖХ применяют для исследования индивидуальных нуклеозидов, полученных исчерпывающим гидролизом небольшого фрагмента РНК РНКазой P1, фосфодиэстеразой I и щелочной фосфатазой, согласно работе Крейна [30]. Метод ВЭЖХ – ESI-MS применим по отношению к фрагментам РНК, имеющим только одну исследуемую модификацию, и это является существенным ограничением метода.

Новые методы определения 2'-О-метилованных нуклеотидов

Сравнительно недавно был предложен новый метод, который представляет собой совмещение масс-спектрометрического анализа, метода переноса электронов (ET) и метода диссоциации, активированной соударениями (CAD), инфракрасной мультифотонной диссоциации (IRMPD) или ультрафиолетовой фотодиссоциации (UVPD) [31]. С помощью данного метода получают различные типы ионов, образованных разрушением различных связей в нуклеиновых кислотах: N-гликозидных; связей между атомами фосфора и кислорода, между атомами кислорода и углерода в межнуклеотидных связях. При этом наблюдаются предпочтительные разрывы связей в области определенных нуклеотидов, причем продукты разрыва в результате применения IRMPD и UVPD различаются и дополняют друг друга. Наличие 2'-О-метильной группы предотвращает образование характерных типов ионов, и в результате сравнительного анализа методом масс-спектрометрии полученного фрагмента РНК устанавливают искомое положение метилированного нуклеотида в нем.

Работа была поддержана грантами РФФИ 10-04-01345-а, 11-04-01314-а, 11-04-01018-а, ФЦП Научные и научно-педагогические кадры инновационной России НК-29П П800, грантом Human Frontiers Science Program RGY0088/2008 и ГК № 16.512.11.2108.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rozenski J., Crain P.F., McCloskey J.A.* // *Nucleic Acids Res.* 1999. **27**. N 1. P. 196.
2. *Sprinzi M., et al.* // *Nucleic Acids Res.* 1998. **26**. N 1. P. 148.
3. *Bjork G.R., et al.* // *Annu Rev Biochem.* 1987. **56**. P. 263.
4. *Dunin-Horkawicz S., et al.* // *Nucleic Acids Res.* 2006. **34**. P. D145.
5. *Sanger F., Brownlee G.G., Barrell B.G.* // *J Mol Biol.* 1965. **13**. N 2. P. 373.
6. *Maxam A.M. and Gilbert W.* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977. **74**. N 2. P. 560.
7. *Peattie D.A.* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979. **76**. N. 4. P. 1760
8. *Donis-Keller H., Maxam A.M., Gilbert W.* // *Nucleic Acids Res.* 1977. **4**. N 8. P. 2527.
9. *Connaughton, J.F., et al.* // *Nucleic Acids Res.* 1984. **12**. N 11. P. 4731.
10. *Bakin A., Ofengand J.* // *Biochemistry.* 1993. **32**. N 37. P. 9754.
11. *Lane B.G., Ofengand J., Gray M.W.* // *Biochimie.* 1995. **77**. N 1–2. P. 7.
12. *Maden B.E., et al.* // *Biochimie.* 1995. **77**. N 1–2. P. 22.
13. *Wintermeyer W., Zachau H.G.* // *FEBS Lett.* 1970. **11**. N 3. P. 160.
14. *Mortimer S.A., Johnson J.S., Weeks K.M.* // *Biochemistry.* 2009. **48**. N 10. P. 2109.
15. *Rhodes D.* // *J Mol Biol.* 1975. **94**. N 3. P. 449.
16. *Negishi K., et al.* // *Nucleic Acids Res.* 1977. **4**. N 7. P. 2283.
17. *Munzel M., et al.* // *Nucleic Acids Res.* 2010. **38**. N 21. P. e192.
18. *Clark S.J., et al.* // *Nucleic Acids Res.* 1994. **22**. N 15. P. 2990.
19. *Gu W., et al.* // *Mol Cell Biol.* 2005. **25**. N. 18. P. 8191.
20. *Schaefer M., et al.* // *Nucleic Acids Res.* 2009. **37**. N 2. P. e12.
21. *Maden B.E.* // *Methods.* 2001. **25**. N 3. P. 374.
22. *Kowalak J.A., et al.* // *Nucleic Acids Res.* 1993. **21**. N 19. P. 4577.
23. *Polo L.M., Limbach P.A.* // *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.* 2001. **10**. P. 10.
24. *Golovina A.Y., et al.* // *RNA.* 2009. **15**. P. 1134.
25. *Smith M.* // *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2011. **25**. N 4. P. 511.
26. *Andersen T.E., Porse B.T., Kirpekar F.* // *RNA.* 2004. **10**. N 6. P. 907.
27. *Giessing A.M., et al.* // *RNA.* 2009. **15**. N 2. P. 327.
28. *Yan F., et al.* // *J Am Chem Soc.* 2010. **132**. N 11. P. 3953.
29. *Benitez-Paez A., et al.* // *RNA.* 2010. **16**. N 11. P. 2131.
30. *Crain P.F.* // *Methods Enzymol.* 1990. **193**. P. 782.
31. *Smith S.I., Brodbelt J.S.* // *Anal Chem.* 2011. **83**. N 1. P. 303.

Поступила в редакцию 10.10.11

METHODS FOR MODIFIED NUCLEOTIDE IDENTIFICATION IN RIBOSOMAL RNA

A.Y. Golovina, P.V. Sergiev, O.A. Dontsova

(Belozersky Institute for Physico-Chemical Biology and Department of Chemistry, Moscow State University)

Modified nucleotides are ubiquitous in all functional RNA, such as ribosomal RNA. Identification of modified nucleotides is essential for understanding of RNA functional role in living cells. This review is devoted to methods which are used to reveal modified nucleotides in the ribosomal RNA.

Key words: *RNA, modified nucleotides, ribosome.*

Сведения об авторах: Головина Анна Янковна – науч. сотр. Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, канд. хим. наук; Сергиев Петр Владимирович – доцент кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ, докт. хим. наук (*petya@genebee.msu.su*); Донцова Ольга Анатольевна – профессор кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ, чл.-корр. РАН.