

УДК 577.2

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРОДСТВА ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ РНК-ХЕЛИКАЗЫ DDX3 К ХАРАКТЕРНЫМ ЭЛЕМЕНТАМ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ мРНК

© 2021 г. А. Б. Шикалов<sup>1</sup>, О. В. Сергеева<sup>1</sup> \*, Т. С. Зацепин<sup>1,2</sup>

Предоставлено академиком РАН О.А. Донцовой

Поступило 15.04.2021 г.

После доработки 02.05.2021 г.

Принято к публикации 03.05.2021 г.

РНК-хеликаза DDX3 участвует во многих процессах, обеспечивающих метаболизм РНК в клетках эукариот. Было показано, что DDX3 также участвует в процессе инициации трансляции, как кэп-зависимой, так и IRES-зависимой. Однако до сих пор не были определены параметры вторичной структуры 5'-нетранслируемых областей (НТО) мРНК, для эффективной трансляции которых необходима РНК-хеликаза DDX3. Мы произвели биоинформатический анализ данных вторичных структур 5'-НТО в DDX3-зависимых мРНК *in silico* и предсказали, что длина 5'-НТО для таких мРНК меньше среднестатистической, а также необходимость наличия шпилечных структур в области первых 50 нуклеотидов от 5'-конца мРНК.

*Ключевые слова:* РНК-хеликаза, структура РНК, мРНК

DOI: 10.31857/S2686738921050280

РНК-хеликазы используют энергию гидролиза нуклеозид-5'-трифосфатов для расплетания вторичной структуры РНК, что необходимо для функционирования РНК и РНК-белковых комплексов в клетке. РНК-хеликаза DDX3 играет важную роль в различных клеточных процессах, включая транскрипцию, сплайсинг, синтез белка, клеточный цикл, апоптоз, врожденный иммунный ответ, а также репликацию вирусов [1, 2]. Количество DDX3 меняется при трансформации клеток, поэтому хеликаза является потенциальной мишенью для лечения онкологических заболеваний [3]. Одним из открытых вопросов для этой хеликазы является вклад в процесс инициации трансляции в клетках эукариот [4, 5]. Предполагается, что РНК-хеликаза DDX3 участвует в расплетании стабильных вторичных структур в непосредственной близости от 5'-конца мРНК [4]. Однако для гомолога DDX3 в дрожжах — хеликазы Ded1p — показано участие в расплетании шпилечных структур на расстоянии больше 50 нуклеотидов от 5'-конца мРНК [6]. Таким образом, необходимы дополнительные исследования, посвященные особенностям вторичной структуры

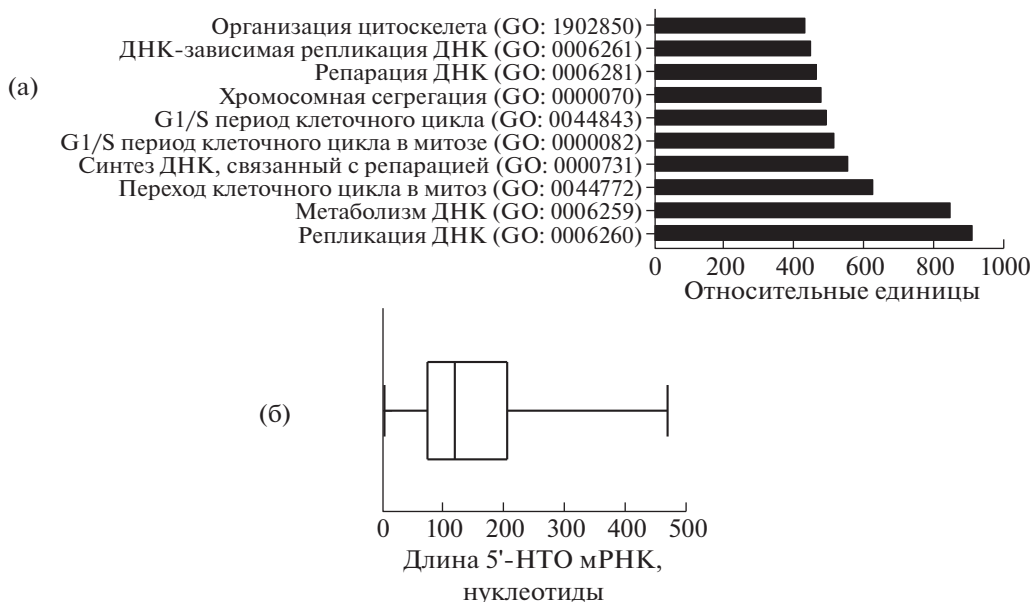
мРНК, для трансляции которых привлекается РНК-хеликаза DDX3. Чтобы определить типы вторичных структур в мРНК, в расплетании которых участвует РНК-хеликаза DDX3, мы проанализировали данные транскриптома для линии клеток MCF7 после ингибирования хеликазы DDX3 [7]. Отсортировав данные по степени изменения уровня экспрессии генов и доверительно-му интервалу ( $p < 0.05$ ), мы определили 932 гена, на экспрессию мРНК которых влияет снижение уровня DDX3. Для полученного списка был выполнен анализ обогащения по функциональной принадлежности с использованием онлайн сервера Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>), чтобы определить биологические процессы, на которые в первую очередь влияет снижение DDX3 [8] (рис. 1а). Полученные данные были первично отсортированы по доверительному интервалу ( $p < 0.05$ ), а затем по относительным единицам Enrichr, которые представляют собой значения после дополнительной поправки на тест Фишера.

Далее мы проанализировали последовательности 5'-нетранслируемых областей (НТО) из 550 мРНК (включая изоформы), соответствующие списку генов, полученных нами на предыдущем этапе, с помощью ENSEMBL biomaRt (база данных ENSEMBL Genes 100, сборка генома человека GRCh38.p13), определили их длины и оценили распределение длин 5'-НТО для мРНК, экспрессия которых менялась при снижении количества DDX3 (рис. 1б). Мы определили, что

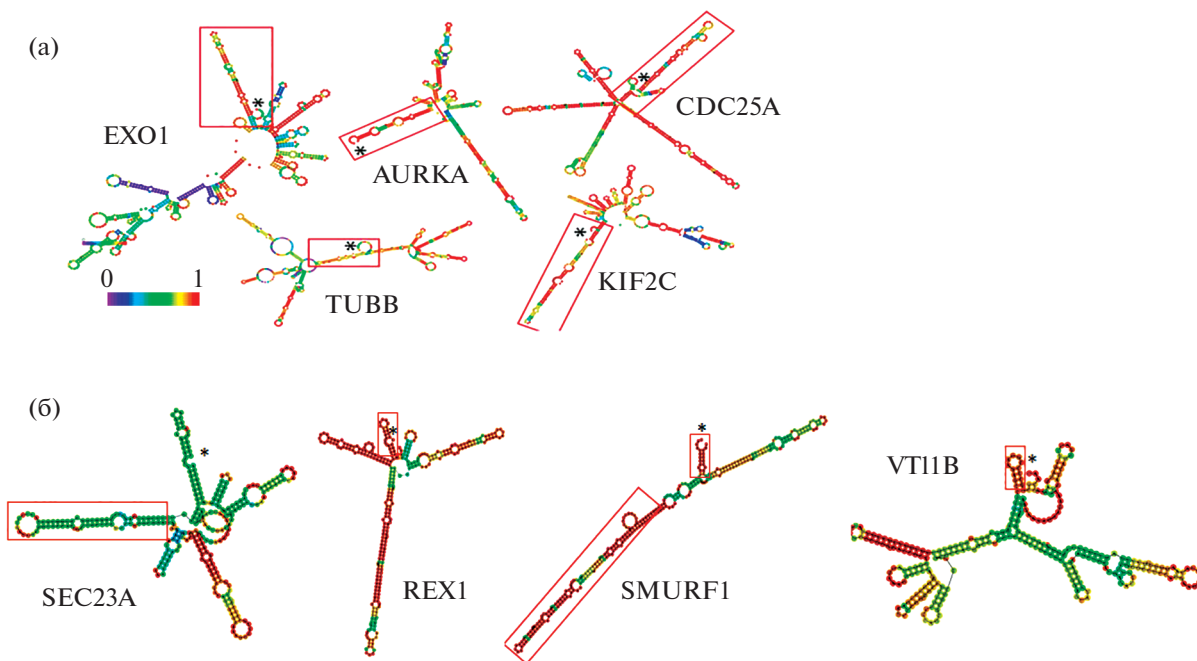
<sup>1</sup> Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

<sup>2</sup> Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: O.Sergeeva@skoltech.ru



**Рис. 1.** (а) Список биологических процессов с наиболее значимыми изменениями после подавления экспрессии DDX3, отсортированные по доверительному интервалу (<math><0.05</math>) и относительным единицам Enrichr. (б) Распределение длин 5'-НТО для 550 мРНК, экспрессия которых была снижена при подавлении DDX3 в клетках MCF7.



**Рис. 2.** (а) Примеры предсказания вторичных структур участков 5'-НТО для DDX3-зависимых мРНК из клеток MCF7. Цветовой код показывает вероятность образования комплементарной пары от 0 (фиолетовый) до 1 (красный). (б) Примеры предсказания вторичных структур 5'-НТО для DDX3-зависимых мРНК, для которых наблюдалось снижение эффективности трансляции. Красными прямоугольниками выделены 5'-концевые участки мРНК, а \* отмечен 5'-конец.

большинство значений длин 5'-НТО мРНК составляют от 72 до 208 нуклеотидов. Также мы проанализировали области мРНК, содержащие 5'-НТО и первые 200 нуклеотидов из кодирующей после-

довательности белка (извлеченной с помощью инструмента ENSEMBL biomaRt, база данных ENSEMBL Genes 100, сборка генома человека GRCh38.p13).

Мы использовали программу Vienna RNAfold [9], которая позволяет строить модели вторичной структуры РНК на основе минимизации свободной энергии и предсказывает относительную стабильность вторичных структур. Результаты анализа для нескольких мРНК приведены на рис. 2 в качестве примера.

На основании этих данных нами был сделан вывод о том, что мРНК, уровень которых зависит от количества хеликазы DDX3 в клетке, чаще всего имеют стабильную шпильчатую структуру в области первых 50 нуклеотидов от 5'-конца мРНК (рис. 2а). Для проверки полученных результатов мы провели аналогичный анализ данных рибосомного профайлинга в условиях ингибирования хеликазы DDX3, которые также подтвердили наличие стабильных вторичных структур в начале 5'-концевого НТО мРНК (рис. 2б) [10].

Таким образом, в ходе данной работы мы выявили особенности вторичной структуры 5'-НТО мРНК, уровень экспрессии и эффективность трансляции которых зависят от количества РНК-хеликазы DDX3. мРНК, уровень экспрессии которых в клетке зависит от РНК-хеликазы DDX3, имеют укороченные 5'-НТО (не более 208 нуклеотидов, с медианой 129 нуклеотидов), по сравнению со средней длиной 5'-НТО мРНК человека [10]. Также мы предсказали наличие стабильных элементов вторичной структуры РНК (шпилек) на участке первых 50 нуклеотидов от 5'-конца мРНК, эффективность трансляции которых зависит от уровня РНК-хеликазы DDX3. Можно предположить, аппарат трансляции в эукариотической клетке привлекает дополнительные РНК-

хеликазы, например DDX3, для расплетания вторичных структур мРНК, расположенных близко к 5'-концу из-за стерических затруднений для работы канонической хеликазы в составе трансляционной машины [4].

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-74-00119.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kukhanova M.K., Karpenko I.L., Ivanov A.V.* // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 1015–1031.
2. *Bol G.M., Xie M., Raman V.* // *Mol Cancer*. 2015. V. 14. P. 188–204.
3. *Fuller-Pace F.V.* // *RNA Biol*. 2013. V. 10. P. 121–132.
4. *Soto-Rifo R., Rubilar P., Limousin T., et al.* // *EMBO J*. 2012. V. 31. P. 3745–3756.
5. *Hilliker A., Gao Z., Jankowsky E., Parker R.* // *Mol Cell*. 2011. V. 43. P. 962–972.
6. *Sen N.D., Zhou F., Ingolia N.T., et al.* // *Genome Res*. 2015. V. 25. P. 1196–1205.
7. *Cannizzaro E., Bannister A., Han N., et al.* // *FEBS Lett*. 2018. V. 592. P. 1873–3468.
8. *Kuleshov M., Jones M., Rouillard A., et al.* // *Nucleic Acids Res*. 2016. V. 44. P. W90–W97.
9. *Lorenz R., Bernhart S.H., Höner Zu Siederdisen C., et al.* // *Algorithms Mol Biol*. 2011. V. 6. P. 26–40.
10. *Calviello L., Venkataramanan S., Rogowski K., et al.* // *BioRxiv*. 2019. P. 1–22.
11. *Pesole G., Mignone F., Gissi C., et al.* // *Gene*. 2001. V. 276. P. 73–81.

## DETERMINATION OF THE AFFINITY OF EUKARYOTIC DDX3 RNA HELICASE TO THE CHARACTERISTIC ELEMENTS OF mRNA SECONDARY STRUCTURE

A. B. Shikalov<sup>a</sup>, O. V. Sergeeva<sup>a, #</sup>, and T. S. Zatsepin<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Center for Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: O.Sergeeva@skoltech.ru

Presented by academician of the RAS O.A. Dontsova

DDX3 RNA helicase is involved in many processes of RNA metabolism in eukaryotic cells. Many studies of DDX3 have shown that it is also involved in the translation initiation process, both cap-dependent and IRES-dependent. However, the specificity of the 5'-UTR secondary structure of mRNA, which require DDX3 RNA helicase for the effective translation, has not yet been determined. We performed a bioinformatic analysis of the 5'-UTR secondary structures in the pool of DDX3-dependent mRNAs *in silico* and found that the length of 5'-UTR is less than the average for the genome, and there are also characteristic hairpin structures in the region of the first 50 nucleotides from the 5'-end of the mRNA.

**Keywords:** RNA helicase, RNA structure, mRNA