

УДК 575.1:596

МАЛЫЕ ЯДРЫШКОВЫЕ РНК И ИХ ГЕНЫ У ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2010 г. Ю. А. Макарова, Д. А. Крамеров

Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва 119991;
e-mail: kramerov@eimb.ru

Поступила в редакцию 28.01.2010 г.

Проведен поиск генов малых ядрышковых РНК C/D-семейства в геномах представителей всех классов позвоночных, не относящихся к плацентарным млекопитающим. Показано, что у позвоночных, не относящихся к плацентарным млекопитающим, наблюдается тенденция к повышению числа копий генов мякРНК. Наиболее выраженной эта тенденция оказалась у представителей анамний (амфибий и рыб). Обнаружено, что 14 мякРНК содержат мутации в боксе С во всех копиях генов среди всех исследованных видов. Обсуждается возможная роль описанных явлений.

Малые ядрышковые РНК (мякРНК) – это одна из наиболее крупных групп некодирующих белок РНК. В комплексе с белками они осуществляют две самые распространенные модификации рРНК: псевдоуридилирование и 2'-О-метилирование рибозы (рРНК человека содержит примерно по 100 нуклеотидов, модифицированных таким образом [1]). МякРНК благодаря комплементарному взаимодействию с рРНК определяют сайт модификации, а связанные с ними белки осуществляют ее. В соответствии с видом осуществляемой модификации мякРНК делят на два класса: H/ACA мякРНК, которые направляют псевдоуридилирование, и C/D мякРНК, направляющие 2'-О-метилирование рибозы. Большинство известных мякРНК обоих семейств вовлечено в модификацию рРНК. Например, в метилировании рРНК человека принимают участие 93 из 121 мякРНК C/D-семейства. РНК этого семейства содержат консервативные последовательности С (UGAUGA), D' (CUGA) и D (CUGA), с чем связано их название. Последовательности С и D сближены друг с другом за счет комплементарных взаимодействий между концами мякРНК. В направлении 5'-конца от D и/или D' находятся так называемые антисенс-элементы – участки длиной 9–20 н, комплементарные соответствующим последовательностям рРНК и способные взаимодействовать с ними. Модификации подвергается остаток, входящий в такую РНК/РНК спираль и отделенный четырьмя нуклеотидами от последовательности D и/или D'. Модификации способны стабилизировать пространственную структуру рРНК и необходимы для нормального функционирования рибосомы [2, 3].

Почти все мякРНК позвоночных кодируются необычным способом: их гены локализованы в интронах других генов, так называемых “генах-хозяев” [4]. Настоящая работа продолжает наше

исследование [5] числа и локализации генов мякРНК C/D-семейства в геномах позвоночных.

Гены 93 мякРНК C/D-семейства, вовлеченных в модификацию рРНК, искали с помощью алгоритма WU-BLAST 2.0 (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>) в геномах следующих видов: опоссум (*Monodelphis domestica*), утконос (*Ornithorhynchus anatinus*), курица (*Gallus gallus*), ящерица (*Anolis carolinensis*), лягушка (*Xenopus tropicalis*) и данио (*Danio rerio*). На первом этапе для поиска использовали нуклеотидные последовательности генов мякРНК человека из базы данных snoRNA database [6]. Затем, используя найденные нуклеотидные последовательности генов мякРНК позвоночных, с помощью того же алгоритма искали их возможные гомологи в геномах соответствующих видов. Найденные последовательности-кандидаты с сохраненными боксами С, D/D' и антисенс-элементом выравнивали с геномами позвоночных с помощью алгоритма BLAT (<http://genome.ucsc.edu>). Чтобы определить, расположены ли последовательности-кандидаты в интронах генов-хозяев, использовали базы данных мРНК и EST. В случае, если найденные последовательности содержали боксы С, D/D' и антисенс-элемент, а также были фланкированы короткими инвертированными повторами и оказывались расположенными в интронах другого гена, их считали генами мякРНК и дополнительно вручную проводили поиск других копий в интронах гена-хозяина.

У плацентарных млекопитающих большинство (~70%) генов мякРНК C/D-семейства представлено одной копией, а остальные кодируются двух-трехкопийными генами. У представителей ряда других классов позвоночных происходит увеличение числа многокопийных генов мякРНК этого семейства [5]. В данной работе мы провели поиск 93 генов мякРНК C/D-семейства в геномах

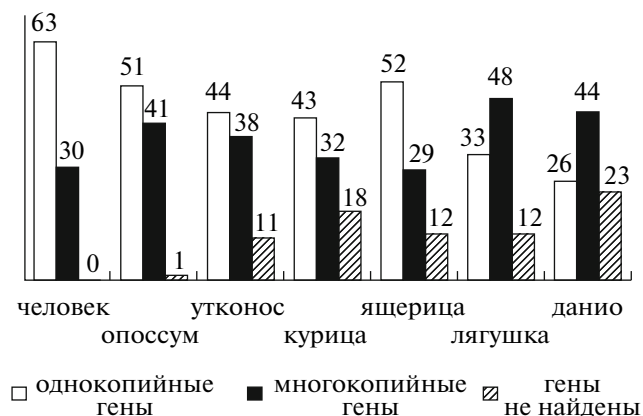


Рис. 1. Количество однокопийных и многокопийных генов мьяРНК C/D-семейства у представителей разных классов позвоночных.

представителей всех классов позвоночных, не относящихся к плацентарным млекопитающим.

Количество многокопийных генов мьяРНК возрастает уже у принадлежащих к примитивным млекопитающим опоссума и утконоса (рис. 1). Для курицы и ящерицы, вероятно, сохраняется та же тенденция, однако нехватка данных не позволяет сделать однозначного вывода. У представителей анамний — лягушки и данио — число многокопийных генов возрастает настолько, что превышает число однокопийных генов. При этом увеличивается не только количество многокопийных генов, но и число копий данного гена. Например, у плацентарных млекопитающих почти все “многокопийные” гены представлены двумя-тремя копиями, а у анамний число копий нередко составляет четыре и более (до 13) (рис. 2).

Следует отметить, что полученные нами данные о количестве многокопийных генов у позвоночных, не относящихся к плацентарным млекопитающим, на самом деле еще выше, чем мы оцениваем в настоящее время. Это связано с тем, что более половины генов-хозяев мьяРНК позвоночных этой группы (192 из 370) содержат несеквенированные участки, тогда как гены-хозяева плацентарных млекопитающих (человека и мыши) таких дефектов не имеют. За редчайшими исключениями все копии гена мьяРНК локализованы в интронах одного и того же гена-хозяина. Поэтому почти в половине случаев вероятно нахождение дополнительных копий генов мьяРНК в несеквенированных участках. Для ряда мьяРНК C/D-семейства не было найдено ни одного гена (рис. 1). Отчасти это связано с различиями паттерна метилирования рРНК у разных классов позвоночных, но главным образом вызвано тем, что геномы позвоночных содержат еще не секвенированные участки.

Увеличение числа копий генов мьяРНК C/D-семейства у позвоночных, не относящихся к плацен-

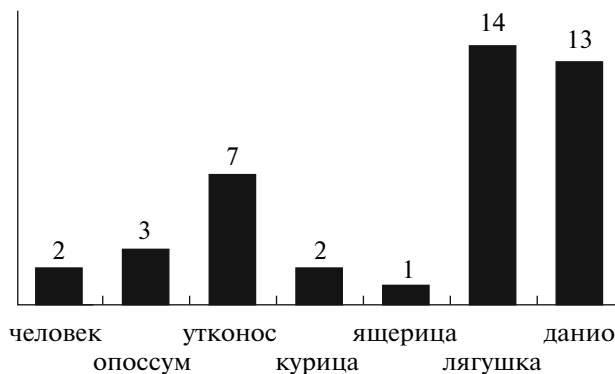


Рис. 2. Число генов мьяРНК C/D-семейства, представленных четырьмя и более копиями.

тарным млекопитающим, не связано с изменением размера генома: среди всех исследованных видов геномы наибольших размеров имеют человек, мышь и опоссум [7]. Наиболее ярко тенденция к увеличению числа копий генов мьяРНК проявляется у представителей анамний (лягушки и данио). Пока наблюдаемое явление трудно интерпретировать с определенностью. Однако вполне вероятно, что тенденция к уменьшению числа копий генов C/D мьяРНК у плацентарных млекопитающих (или к увеличению их числа у прочих позвоночных) может объясняться тем, что яйцеклетки у плацентарных млекопитающих имеют меньшие размеры и соответственно содержат меньшее число рибосом.

Нуклеотидная последовательность бокса С (UGAUGA) важна для нормального функционирования мьяРНК. Около 30% найденных нами генов мьяРНК позвоночных (618 из 922) содержат в этом боксе одну нуклеотидную замену. В большинстве случаев имеются другие копии того же гена, которые содержат интактный бокс С. Мутации в боксе С ухудшают связывание специфических белков C/D-РНП и соответственно нарушают функционирование C/D-РНП [8]. Мы обнаружили, что у 14 мьяРНК мутации в боксе С присутствуют во всех копиях генов среди всех исследованных видов. Очевидно, эта особенность строения бокса С поддерживается отбором. Видимо, таким образом может достигаться разная степень метилирования разных сайтов рРНК. Вероятно, метилированное состояние одних сайтов модификации может быть важнее других. Свидетельства в пользу существования таких различий получены в ряде работ (см., например, [9]). Полученные нами данные указывают на то, каким образом могло бы осуществляться дифференциальное метилирование разных сайтов рРНК: изменением числа копий генов и изменением нуклеотидной последовательности участков связывания белков C/D мьяРНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (08-04-00350) и Программы РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maden B.E. The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 1990. V. 39. P. 241–303.
2. Kiss-Laszlo Z., Henry Y., Bachellerie J.P. et al. Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs // *Cell.* 1996. V. 85. P. 1077–1088.
3. Decatur W.A., Fournier M.J. rRNA modifications and ribosome function // *Trends Biochem. Sci.* 2002. V. 27. P. 344–351.
4. Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. Гены малых ядрышковых РНК // *Генетика.* 2007. V. 43. № 2. P. 149–158.
5. Makarova J.A., Kramerov D.A. Analysis of C/D box snoRNA genes in vertebrates: The number of copies decreases in placental mammals // *Genomics.* 2009. V. 94. P. 11–19.
6. Lestrade L., Weber M.J. snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/D box snoRNAs // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 158–162.
7. Gregory T.R., Nicol J.A., Tamm H. et al. Eukaryotic genome size databases // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 332–338.
8. Watkins N.J., Dickmanns A., Luhrmann R. Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. P. 8342–8352.
9. Esguerra J., Warringer J., Blomberg A. Functional importance of individual rRNA 2'-O-ribose methylations revealed by high-resolution phenotyping // *RNA.* 2008. V. 14. P. 649–656.

Small Nucleolar RNAs and Their Genes in Vertebrates

J. A. Makarova and D. A. Kramerov

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia;

e-mail: kramerov@imb.ru

Genes of box C/D small nucleolar RNAs (snoRNAs) were searched for in the genomes of members of all classes of vertebrates that do not belong to placental mammals. A tendency for an increase in the number of copies of snoRNA genes was observed in such vertebrates. This trend was most pronounced in anamnia (amphibians and fish). Box C mutations were found in 14 snoRNAs in all gene copies among all species studied. The role of the described events is discussed.