

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092

Зайченко Д.М.^{1,3,4}, Пасько А.Ю.¹, Микрюкова А.А.¹, Астафьева Я.Р.¹, Малахо С.Г.⁵, Кубатиев А.А.¹, Московцев А.А.^{1,2,3}

Фрагменты транспортной РНК при клеточном старении, индуцированном стрессом эндоплазматического ретикулума

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

125315, Москва, Россия, Балтийская ул., д. 8;

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия, Баррикадная ул., д. 2/1, стр. 1;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия, Каширское ш., д. 24, корп. 2;

⁴ФГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 10, корп. 2;

⁵Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы, 125284, Москва, Россия, 2-й Боткинский проезд, д. 5

Транспортная РНК играет ключевую роль в жизнедеятельности клетки, обеспечивая процесс декодирования генетической информации в белковом синтезе. Как показывают последние исследования, молекула тРНК может выполнять другие функции благодаря процессингу. Расщепление пре-тРНК и зрелой тРНК приводит к образованию различных некодирующих РНК, среди которых так называемые половинки тРНК (tRNA halves), также известные как индуцированные стрессом РНК (stress-induced tRNA), tRNA-derived или tiRNA. Описаны также меньшие фрагменты тРНК (tRFs). Характерным примером «двойного назначения» тРНК является разрезание активируемой при клеточном стрессе нуклеазой ангиогенин тРНК в антикодонной петле с генерацией половинок, из которых 5'-фрагменты опосредуют временное выключение трансляции при стрессе. Ранее нами было впервые показано увеличение содержания tiRNA при остром стрессе эндоплазматического ретикулума и способность хронического стресса ЭПР приводить к формированию фенотипа клеточного старения. В работе с помощью высокопроизводительного секвенирования впервые анализируется профиль фрагментов тРНК при ЭПР-стресс-индуцируемом старении и сопоставляется с профилем при репликативном старении. Обнаружен ряд общих фрагментов тРНК для этих двух состояний. Они потенциально могут использоваться в качестве маркеров процессов клеточного старения.

Ключевые слова: стресс эндоплазматического ретикулума; стресс-индуцируемое старение; тРНК; процессинг тРНК

Для цитирования: Зайченко Д.М., Пасько А.Ю., Микрюкова А.А., Астафьева Я.Р., Малахо С.Г., Кубатиев А.А., Московцев А.А. Фрагменты транспортной РНК при клеточном старении, индуцированном стрессом эндоплазматического ретикулума.

Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2024; 68(1): 4–14.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.4-14

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Зайченко Д.М., Московцев А.А.; сбор данных – Зайченко Д.М., Пасько А.Ю., Микрюкова А.А., Астафьева Я.Р., Малахо С.Г., Московцев А.А.; анализ и интерпретация данных – Московцев А.А.; подготовка иллюстративного материала – Московцев А.А.; написание статьи – Московцев А.А.; редактирование статьи – Зайченко Д.М., Московцев А.А., Кубатиев А.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Московцев Алексей Александрович, e-mail: bioinf@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №22-25-00820, <https://rscf.ru/project/22-25-00820>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.12.2023

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Zaichenko D.M.^{1,3,4}, Pasko A.Y.¹, Mikryukova A.A.¹, Astafeva I.R.¹, Malakho S.G.⁵, Kubatiev A.A.¹, Moskovtsev A.A.^{1,2,3}

Fragments of transfer RNA during cellular senescence induced by chronic endoplasmic reticulum stress

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,

8 Baltiyskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation;

²Russian Medical Academy of Continuing Professional Education,

2/1 Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation;

³Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation,

24 Kashirskoye shosse, Moscow, 115478, Russian Federation;

⁴Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University),

10 Miklouho-Maklaya st., Moscow, 117198, Russian Federation;

⁵Botkin City Clinical Hospital of the Moscow City Health Department,

bld. 5, 2-Botkinsky proezd, Moscow, 125284, Russian Federation

Transfer RNA plays a key role in the cell, providing the process of decoding genetic information. Recent research shows that the tRNA molecule can perform other functions due to processing. Cleavage of pre-tRNA and mature tRNA leads to the formation of various non-coding RNAs, among which are so-called tRNA halves, also known as stress-induced tRNA, tRNA-derived or tiRNA. Smaller tRNA fragments (tRFs) have also been described. A typical example of «dual purpose» tRNA is the cutting of tRNA in the anticodon loop by cellular stress-activated nuclease angiogenin, generating halves, of which the 5' fragments mediate temporary translation shutdown under stress. Previously, we demonstrated an increase in tiRNAs during acute endoplasmic reticulum stress and the ability of chronic ER stress to lead to the formation of a cellular senescence phenotype. In this work, using high-throughput sequencing, the profile of tRNA fragments during ER stress-induced cellular senescence is analyzed for the first time and compared with the profile during replicative senescence. A number of common tRNA fragments have been found for these two conditions. They can potentially be used as markers of cellular senescence.

Keywords: endoplasmic reticulum stress; stress-induced senescence; tRNA; tRNA processing

For citation: Zaichenko D.M., Pasko A.Y., Mikryukova A.A., Astafeva I.R., Malakho S.G., Kubatiev A.A., Moskovtsev A.A. Fragments of transfer RNA during cellular senescence induced by chronic endoplasmic reticulum stress. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 4–14. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.4-14

Author's contribution: concept and design of the study – Zaichenko D.M., Moskovtsev A.A.; collection of material – Zaichenko D.M., Pasko A.Y., Mikryukova A.A., Astafeva I.R., Malakho S.G., Moskovtsev A.A.; technical preparation of the material – Moskovtsev A.A.; preparation of illustrative material for publication – Moskovtsev A.A.; writing the text – Moskovtsev A.A.; editing the text – Zaichenko D.M., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For corresponding: *Aleksey A. Moskovtsev*, PhD, Institute of General Pathology and Pathophysiology, e-mail: bioinf@mail.ru

Information about the authors:

Zaichenko D.M., <https://orcid.org/0000-0003-0241-0065>Mikryukova A.A., <https://orcid.org/0009-0005-2274-8006>Astafeva I.R., <https://orcid.org/0009-0006-3473-5453>Malakho S.G., <https://orcid.org/0009-0001-6019-8704>Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

Financing. The work was supported by the Russian Science Foundation, Grant № 22-25-00820, <https://rscf.ru/project/22-25-00820>

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

Received 13.12.2023

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

Эволюционно консервативная функция тРНК — участие в синтезе белков путем декодирования триплетов нуклеотидов мРНК в аминокислотную последовательность [1–3]. тРНК обеспечивает ключевой этап реализации генетической информации — конвертацию «мира РНК» клетки в ее протеом в соответствии с правилами генети-

ческого кода — фундаментальной основы всего живого. В связи с таким центральным и древнейшим положением в клетке, неудивительно, что тРНК также оказывается вовлечена в целый ряд других важнейших процессов — метаболизм аминокислот, клеточную сигнализацию, ответ на клеточный стресс, в адаптацию, апоптоз [1, 3, 4].

тРНК – сравнительно небольшие молекулы, их типичный размер составляет порядка 76 (73–95) нуклеотидов, они характеризуются базовыми консервативными структурами, включающими 3 элемента типа стебель-петля: D-петля (содержащая дигидроуридин), антикодоновая петля и T-петля, или ТΨС-петля (содержащая тимидин, псевдоуридин и цитидин), а также стебель акцептора аминокислот (рис. 1, А), эти петли сворачиваются совместно так, что формируется L-образная трехмерная конформация (рис. 1, Г), одно плечо которой образовано акцепторным стеблем и T-петлей, второе – D- и антикодоновой петлями [5]. Интересно, что расчетные вторичные структуры при минимальной свободной энергии (рис. 1, Б) и центроидной вторичной структуры (рис. 1, В) показывают для молекулы тРНК Asp с антикодоном GUC (tdbR00000662) разрушение стебля в районе D-петли в условиях *in vitro*.

Молекулы тРНК характеризуются обширными посттранскрипционными модификациями, которые способствуют высокой стабильности тРНК в клетке, в том числе устойчивости к нуклеазам, влияют на структуру, фолдинг молекулы тРНК, точность опосредуемой ей трансляции и ее тонкую настройку [2, 3, 5, 8]. Геном человека содержит более 500 генов, кодирующих более 40 различных тРНК, 22 тРНК кодируется митохондриальным геномом [9–12].

тРНК, кодируемые в ядре, образуют 21 семейство изоакцепторных тРНК, каждое из которых включает тРНК с разными антикодонами, но связывающими одну и ту же аминокислоту, включая селеноцисте-

ин, в соответствии с вырожденностью генетического кода [5]. Изодекодерные тРНК, напротив, несут один и тот же антикодон, но имеют отличия в остальной нуклеотидной последовательности – интересно, что наблюдается тенденция к увеличению числа генов-изодекодеров вдоль филогенетического древа [5, 13], что может быть связано с разнообразным контекстом экспрессии – клеточным окружением, типом ткани [5], и это согласуется с увеличением числа типов клеток у высших многоклеточных. Однако, данных по тРНК-транскриптомам единичных клеток, которые помогли бы построить обоснованное представление о специфичности изодекодеров к клеточному контексту и типу, недостаточно.

К настоящему времени идентифицированы некодирующие РНК, происходящие из нуклеотидных последовательностей тРНК и являющиеся, таким образом, их частями. С помощью высокопроизводительного секвенирования в клетках млекопитающих обнаружены различные классы фрагментов тРНК, количество которых варьируется в зависимости от типа клеток и тканей и в большинстве случаев не коррелирует с количеством «родительских» тРНК. Некоторые фрагменты образуются только при специфических условиях, таких, как определенная стадия развития, пролиферативный статус, стресс или вирусная инфекция [14–17]. Несмотря на то, что описанные классы фрагментов тРНК неоднородны по размеру (10–45 нуклеотидов), они, по-видимому, не являются продуктами случайного расщепления или деградации тРНК, поскольку их концы воспроизводимо картируются на

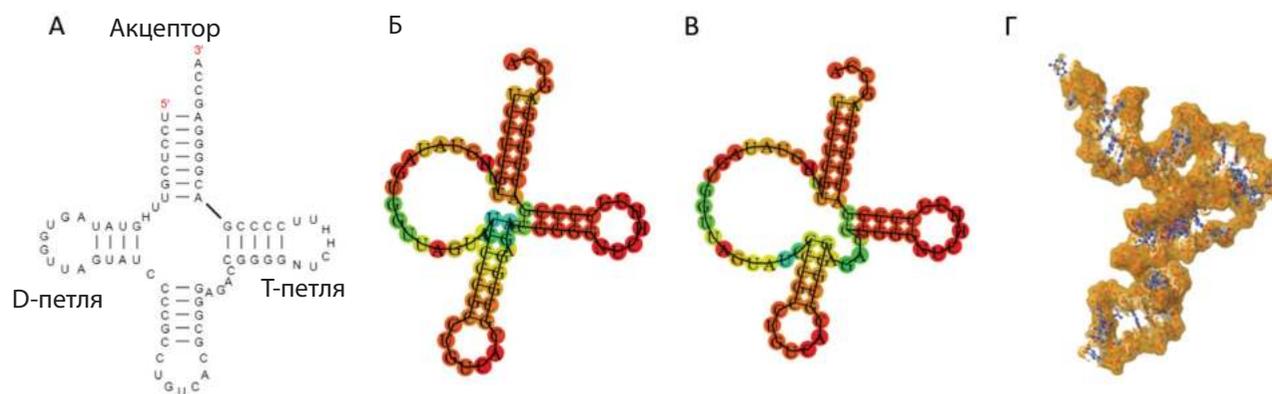


Рис. 1. Структуры молекулы тРНК Asp (А) с антикодоном GUC (tdbR00000662) при минимальной свободной энергии (Б), центроидной вторичной структуры (В) и трехмерной конформации (Г), выборка из базы данных [6], расчет вторичных структур с использованием The Vienna RNA Websuite [7].

Fig. 1. Structures of the Asp tRNA molecule (А) with the GUC anticodon (tdbR00000662) with minimum free energy (Б), centroid secondary structure (В) and three-dimensional conformation (Г), selection from the database [6], the calculation of secondary structures was performed using The Vienna RNA Websuite [7].

геном и определяются специфическими паттернами расщепления РНК.

Процессинг пре-тРНК и зрелой тРНК приводит к образованию различных нкРНК. Фрагменты тРНК, полученные из зрелой тРНК, делятся на два типа. Первый тип – половинки тРНК (tRNA halves), также известные как индуцированные стрессом РНК (stress-induced tRNA), tRNA-derived или tiRNA (рис. 2). Второй тип – мелкие фрагменты тРНК (tRFs) – обрезанные D-шпильки, а также Т-шпильки с акцепторным стержнем, при этом Dicer-зависимое расщепление тРНК в D-петле приводит к образованию 5'-концевых фрагментов 5'-tRFs, а расщепление в Т-петле с помощью Dicer или ангиогенина ANG приводит к образованию tRFs, содержащих мотив ССА на 3'-концах (3'ССА tRFs); 5'-tRFs и 3'ССА tRFs также могут быть образованы из 5'- и 3'-половинок соответственно [1].

Половинки тРНК образуются путем специфического расщепления в антикодоновой петле тРНК. Ранее считалось, что доминирующую роль в этом процессе играет ангиогенин ANG, член суперсемейства РНКаз А – белок, транслоцирующийся в ядро и стимулирующий транскрипцию рибосомальной РНК в благоприятных условиях роста, но накапливающийся в цитоплазме в ответ на клеточный стресс [19], при котором ANG расщепляет цитоплазматическую тРНК на 5'- и 3'-tiRNAs [20]. Некоторые из этих фрагментов (5'-концевые) вызывают независимые от фосфо-

рированного фактора инициации трансляции eIF2 α блок трансляции [21] и сборку стрессорных гранул [22] – адаптивные реакции, необходимые для выживания высших эукариот [23]. Интуитивно кажется, что расщепление тРНК само по себе должно вызывать остановку трансляции, однако оказалось, что расщепляется лишь небольшая часть пула тРНК (менее 5%) [20], и фрагменты тРНК выступают в роли конкурентного ингибитора сборки кеп-связывающего инициаторного комплекса eIF4F, и именно они, причем преимущественно 5'-tiRNAs, ответственны за фосфо-eIF2 α -независимый блок трансляции [21].

Ранее нами было показано, что при остром стрессе эндоплазматического ретикулума, индуцируемого 2.5мМ дитиотреитолом в Т-лимфобластоидной линии Jurkat, наиболее сильно увеличивали свою экспрессию половинки тРНК из пяти тРНК-изотипов, включая глицин Gly-GCC и Gly-CCC, глутамин (Glu-CTC), аспарагин (Asp-GTC) и валин (Val-CAC), т.е. большинство из них являлось 5'-половинками, за исключением 3'-tiRNA^{Asp-GTC} [18].

Сравнительно недавно было показано, что оверэкспрессия ANG приводила к селективному расщеплению определенного набора тРНК, включая тРНК^{Glu}, тРНК^{Gly}, тРНК^{Lys}, тРНК^{Val}, тРНК^{His}, тРНК^{Asp}, and тРНК^{Sec} с генерацией половинок и 5'-tRFs, однако, нокаут ANG, по мнению авторов, показал, что большинство стресс-индуцируемых половинок тРНК, исключая 5'-половинки тРНК

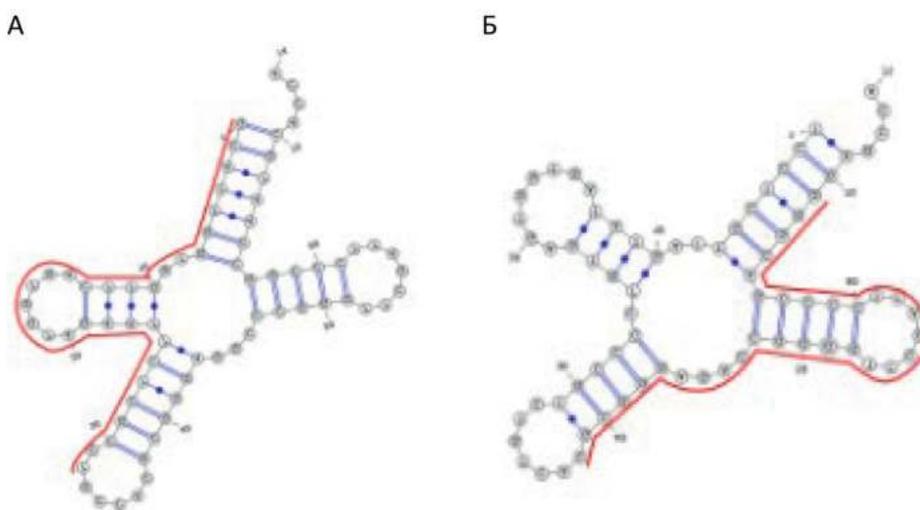


Рис. 2. Процессинг зрелых форм тРНК с образованием фрагментов-половинок тРНК. Красной обгибающей выделены обнаруживаемые фрагменты: А-5'-половинки, Б-3'-половинки. Взято из [18].

Fig. 2. Processing of mature forms of tRNA with the formation of tRNA-half fragments. The red line highlights the detected fragments: A-5'-halves, B-3'-halves. Taken from [18].

His^{GTG} и 3'-половинки тРНК^{Asp^{GTC}}, независимы от ANG [24]. Это позволило авторам предположить активность других рибонуклеаз в продукции половинок тРНК.

Несмотря на большой интерес к новым типам регуляторных некодирующих РНК, происходящих из тРНК, они мало изучены при клеточном старении. В данной работе мы исследовали накопление фрагментов тРНК при хроническом стрессе эндоплазматического ретикулума, который, как мы показали ранее [25], способен индуцировать фенотип клеточного старения. Мы сопоставили профиль этих фрагментов с фрагментами тРНК, накапливающимися при репликативном старении, и обнаружили ряд совпадений и отличий, что может указывать на наличие специфических и общих маркеров из тРНК-фрагмента для этих двух состояний.

Методика

Клеточные культуры. В работе использовали первичную культуру фибробластоподобных клеток FRSN из крайней плоти ребенка 3 лет, полученную из Российской коллекции культур клеток позвоночных (Институт цитологии РАН). Эти клетки имеют фибробластоподобную морфологию, экспрессируют поверхностные антигены, характерные для мезенхимных стволовых клеток (CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC) и не экспрессируют CD34 и HLA-DR. Клетки имеют нормальный кариотип человека (46, XY), количество полиплоидов составляет 13%, модальное число хромосом 46 ($98.5 \pm 1.2\%$).

Клетки культивировали в ростовой среде DMEM с глюкозой (4.5 г/л) с добавлением 10% FBS, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л глутамин при 37°C и 5% CO₂. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего.

Индукция хронического стресса ЭПР. Хронический стресс ЭПР в клетках FRSN индуцировали дитиотрептолом (ДТТ), восстанавливающим дисульфидные связи в белках. ДТТ использовали в субтоксической концентрации (0.75 мМ), которая была подобрана в предварительных экспериментах. Субтоксической считали концентрацию ДТТ, достаточную для остановки клеточной пролиферации, но не вызывающую гибель существенной части клеток. В течение 4 сут индуктор добавлялся 1 раз в свежую ростовую среду после удаления ростовой среды предыдущего дня. Затем следовала постстрессовая фаза, в которой проводилась полная замена среды ежедневно без добавления индуктора стресса, минимальная длительность этой фазы составляла 1 сут, максимальная – 4 сут. В постстрессовой фазе среду заменяли 1 раз в сутки на полную среду.

Выделение суммарной РНК. Суммарную РНК выделяли с использованием набора реагентов RNeasy® Mini Kit («Qiagen GmbH», Германия). Лизис клеток проводили непосредственно в культуральной посуде (чашках Петри, 6-луночных планшетах) после удаления ростовой среды. Концентрацию суммарной РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 («Thermo Fisher Scientific Inc.»).

Высокопроизводительный анализ экспрессии малых РНК и анализ биологических процессов по терминам геной онтологии. Библиотеки малых РНК получены с использованием Illumina TruSeq small RNA library preparation kit («Illumina», США). Процедура подготовки состояла из нескольких последовательных этапов: лигирования фракции малых РНК (0.3–0.5 мкг) на 3'- и 5'-концах с синтетическими РНК-адапторами, обратной транскрипции и амплификации (обогащения) с использованием праймеров для секвенирования Illumina с баркодами для мультиплексирования образцов. Перед проведением ПЦР все библиотеки подвергали процедуре нормирования с использованием дополнительной количественной ПЦР в формате SYBR Green с праймерами, идентичными Illumina TruSeq PCR primer, но без концевых модификаций. Амплифицированные библиотеки очищали при помощи электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле. Для валидации библиотек и количественной их оценки проводили дополнительную количественную ПЦР в соответствии с протоколом Illumina qPCR Library quantification protocol («Illumina»). Нормированные библиотеки малых РНК секвенировали (36 циклов) с использованием генетического анализатора MiSeq Illumina.

Для обработки файлов, полученных в результате секвенирования и прошедших препроцессинг с «обрезанием» индексных последовательностей, использовали локально установленное программное обеспечение MiSeq Reporter v.2.6.3. Прочитанные последовательности малых РНК с обрезанными 3'-адапторами (5'-TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG) подвергали фильтрации по качеству ридов (≥ 30 Phred Score): фильтрацию прошли 96.9%. Затем прочитанные последовательности картировали с использованием приложения Bowtie с установленным требованием полного совпадения с версией hg19 сборки генома человека.

Для анализа генного листа, сформированного по результатам выравнивания фрагмента тРНК tDR-1:31-Gly-CCC-1-M4, использовали веб-базу данных <https://www.pantherdb.org> и термины геной онтологии.

Таблица 1/Table 1

Перечень 88 наиболее представленных фрагментов тРНК, обнаруженных в клетках FRSN при пролонгированном 0.75 мМ ДТТ-индуцированном стрессе

List of the 88 most abundant tRNA fragments found in FRSN cells under prolonged stress induced by 0.75 mM DTT

Наименование фрагмента	Последовательность фрагмента, 5'-3'	Представленность фрагмента, суммарное число прочтений*
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTTCGCCT	1162921
tDR-1:33-Gly-CCC-1-M4	GCATTGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATTCGCGCT	502922
tDR-1:33-Gly-GCC-1	GCATGGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATTCGCGCT	175647
tDR-1:33-Val-CAC-2	GCTTCTGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTTCGCCT	160754
tDR-1:32-Val-AAC-1-M6	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTTCGCC	115919
tDR-1:32-Gly-CCC-1-M4	GCATTGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATTCGCGC	99915
tDR-1:33-Val-AAC-2	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTGTAGAAATTCGCGCT	62887
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-U33A	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTTCGCCA	52228
tDR-1:31-Gly-CCC-1-M4	GCATTGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATTCGCGC	35233
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-G26U	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACTTTCGCCT	27997
tDR-1:33-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCT	23061
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-U33G	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTTCGCCG	18239
tDR-1:32-Gly-GCC-1	GCATGGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATTCGCGC	14214
tDR-1:33-Val-AAC-1-M8-G26A	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACATTCGCGCT	13268
tDR-1:34-Val-AAC-1-M6-A34G	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTTCGCGCTG	10624
tDR-1:34-Lys-CTT-2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTC	10162
tDR-1:33-Lys-CTT-1-M2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACT	9663
tDR-1:34-Gly-GCC-2-M3	GCATTGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATTCGCGCTG	9161
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-G26C	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACCTTCGCGCT	8504
tDR-1:31-His-GTG-1	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCG	8297
tDR-1:34-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTC	7818
tDR-1:30-His-GTG-1	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGC	7420
tDR-1:32-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGC	7383
tDR-1:33-Lys-CTT-2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACT	7089
tDR-1:34-Gly-GCC-1	GCATGGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATTCGCGCTG	6905
tDR-1:33-Gly-GCC-1-U32A	GCATGGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATTCGCCA	6886
tDR-1:34-Val-CAC-1-M3	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTTCGCGCTC	6635
tDR-2:30-His-GTG-1	CCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGC	6495
tDR-1:34-Lys-CTT-1-M2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACTC	5568
tDR-1:33-Val-CAC-2-G26U	GCTTCTGTAGTGTAGTGGTTATCACTTTCGCCT	5323
tDR-1:35-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTCT	5212
tDR-1:33-Val-CAC-3	GTTTCCGTAGTGTAGCGGTTATCACATTCGCGCT	5104
tDR-1:32-Val-CAC-2	GCTTCTGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTTCGCC	4991
tDR-1:32-Lys-TTT-3-M2	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGAC	4912
tDR-16:42-Glu-CTC-1-M2	TGGTTAGGATTCGGCGCTCTCACC GCC	4830
tDR-1:33-Lys-TTT-3-M2	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACT	4665
tDR-3:33-Val-AAC-1-M6	TTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTTCGCCT	4486
tDR-1:31-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCG	4480
tDR-1:31-Gly-GCC-1	GCATGGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATTCGCGC	4390
tDR-1:33-Gly-GCC-1-U16C	GCATGGGTGGTTCAGCGGTGTAGAAATTCGCGCT	3799
tDR-3:33-Gly-GCC-1	ATGGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATTCGCGCT	3710
tDR-1:35-Lys-CTT-1-M2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACTCT	3633
tDR-3:33-Gly-CCC-1-M4	ATTGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATTCGCGCT	3478
tDR-1:36-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTCTC	3393
tDR-1:35-Gly-GCC-2-M3	GCATTGGTGGTTCAGTGGTGTAGAAATTCGCGCTGC	3321

Продолжение таблицы см. на стр. 10.

Наименование фрагмента	Последовательность фрагмента, 5'-3'	Представленность фрагмента, суммарное число прочтений*
tDR-1:33-His-GTG-1	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCGTT	3084
tDR-14:50-Glu-CTC-1-M2	AGTGGTTAGGATTCGGCGCTCTCACCGCCGCGGCC	2972
tDR-1:33-Val-AAC-2-U33A	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTCATCACGTTGCGCA	2864
tDR-1:33-Glu-TTC-3-M4	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCGCT	2728
tDR-1:33-Glu-TTC-2	TCCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTT	2721
tDR-1:32-Val-AAC-2	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTCATCACGTTGCGC	2687
tDR-1:32-Val-AAC-1-M6-G26U	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACTTTCGCC	2647
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-G7A	GTTTCCATAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCT	2298
tDR-1:31-Val-AAC-1-M6	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGC	2274
tDR-1:32-Lys-CTT-2-M2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGAC	2214
tDR-1:32-Lys-CTT-1-M2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGAC	2172
tDR-1:34-Val-AAC-2-A34G	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTCATCACGTTGCGCTG	2051
tDR-34:54-Gln-CTG-1-M5	CTGAATCCAGCGATCCGAGT	1981
tDR-1:36-Gly-GCC-2-M3	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTGCC	1897
tDR-1:33-Val-CAC-2-G26A	GCTTCTGTAGTGTAGTGGTTATCACATTCGCT	1843
tDR-1:33-Val-AAC-2-G26U	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTCATCACTTTCGCT	1717
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-U33C	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCC	1682
tDR-4:33-Lys-CTT-1-M2	CGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACT	1668
tDR-2:31-His-GTG-1	CCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCG	1643
tDR-1:35-Lys-CTT-2	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTCT	1640
tDR-1:34-His-GTG-1	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCGTTG	1584
tDR-13:49-Glu-CTC-1-M2	TAGTGGTTAGGATTCGGCGCTCTCACCGCCGCGGCC	1491
tDR-1:33-Gly-GCC-1-U32G	GCATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCG	1485
tDR-1:30-Glu-CTC-1-M2	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGC	1480
tDR-1:34-Val-AAC-1-M6-A34U	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCTT	1453
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-G7C	GTTTCCCTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCT	1446
tDR-1:35-Val-AAC-1-M6-A34U-A35G	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCTTG	1386
tDR-2:33-Val-AAC-1-M6	TTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCT	1322
tDR-1:37-Gly-GCC-2-M3	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTGCCA	1289
tDR-1:32-iMet-CAT-1-M2	AGCAGAGTGGCGCAGCGGAAGCGTGCTGGGC	1233
tDR-1:33-Glu-CTC-1-M2-U5C-G6U	TCCCCTGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCT	1193
tDR-36:72-Asp-GTC-2-M2	CACGCGGGAGACCGGGGTTGATTCCCCGACGGGA	1180
tDR-1:33-Val-CAC-2-G26C	GCTTCTGTAGTGTAGTGGTTATCACCTTCGCT	1177
tDR-3:36-Gly-GCC-1	ATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTGCC	1172
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-G26U-U33A	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACTTTCGCCA	1156
tDR-1:36-Glu-TTC-2	TCCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTTTC	1100
tDR-1:36-Val-AAC-1-M6-A34G	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCTGAC	1056
tDR-1:33-Val-AAC-1-M6-U4G	GTTGCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCT	1037
tDR-4:33-Val-AAC-1-M6	TCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCT	1032
tDR-13:42-Lys-CTT-1-M2	CAGTCGGTAGAGCATGGGACTCTTAATCCC	1031

Примечание. * Представлено общее число прочтений в пулированной библиотеке из 24 образцов.

Note. * Represents the total number of reads in a pooled library of 24 samples.

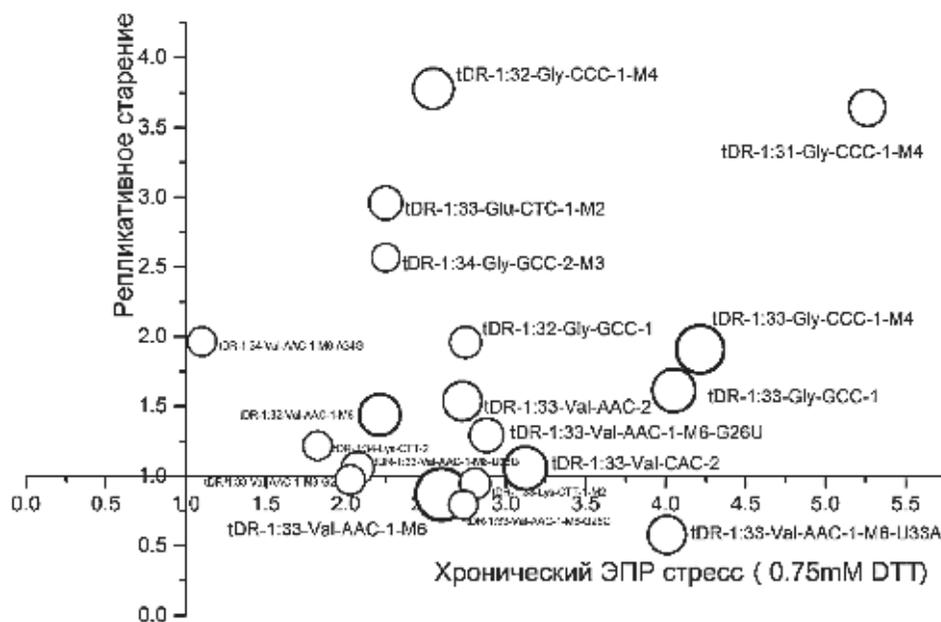


Рис. 3. Сопоставление фрагментов тРНК в клетках FRSN, подвергнутых хроническому стрессу ЭПР, и репликативно старых FRSN на диаграмме рассеивания, по оси абсцисс и ординат – кратность изменения экспрессии, диаметр точек – логарифм представленности по основанию 2.

Fig. 3. Comparison of tRNA fragments in FRSN cells subjected to chronic ER stress and replicatively old FRSN on the scatter diagram, the x and y axis is the fold change in expression, the diameter of the points is the logarithm of enrichment in base 2.

Результаты и обсуждение

Для выполнения данного исследования нами использовалась 4-х дневная модель хронического стресса ЭПР с 4-х дневной постстрессорной фазой, в ходе которого клетки FRSN приобретали фенотип стресс-индуцированного старения, как нами было показано ранее [25]. Для сравнительного анализа представленности фрагментов тРНК при стрессиндуцированном старении мы использовали культуру клеток FRSN, прошедшую более 45 удвоений и демонстрировавшую как морфологические, так и экспрессионные маркеры клеточного старения [25].

Для анализа исходно выровненных на гены тРНК прочтений использовали базу данных «The Mitochondrial and Nuclear tRNA database (MINTbase)», создатели которой предложили унифицированную систему именования тРНК фрагментов [26]. Элементом предложенного наименования является точный диапазон позиций нуклеотидов (Sprinzl tRNA position) фрагмента в молекуле тРНК согласно [27].

Согласно полученным данным, в библиотеках малых РНК образцов клеток FRSN, подвергнутых хроническому стрессу ЭПР, острому стрессу ЭПР и ста-

рению, а также контрольных образцах обнаружился ряд фрагментов тРНК, большая часть из которых принадлежала к множеству 5'-половинок тРНК (табл. 1). Известно, что секвенирование фрагментов тРНК чувствительно как к концевым, так и к внутренним модификациям молекул РНК, и ряд авторов предпочитает проводить сравнение относительных уровней одного и того же фрагмента тРНК в разных условиях, а не уровней разных фрагментов тРНК в одном состоянии [24]. Наблюдаемая в наших данных сравнительно низкая представленность 3'-половинок тРНК может быть связана с тем, что молекула тРНК сильнее модифицирована в своей 3'-части.

Сопоставление совокупностей фрагментов тРНК (фрагментов) репликативно старых и хронически стрессированных клеток показало наличие фрагментов, похожим образом дифференциально регулируемых по сравнению с контрольными, экспоненциально растущими клетками (рис. 3).

Общими для этих двух клеточных состояний являются фрагменты тРНК Gly. Среди них – сильно повысивший свою экспрессию фрагмент tDR-1:31-Gly-CCC-1-M4. Поиск похожих на этот фрагмент последовательностей показал наличие различных гомо-

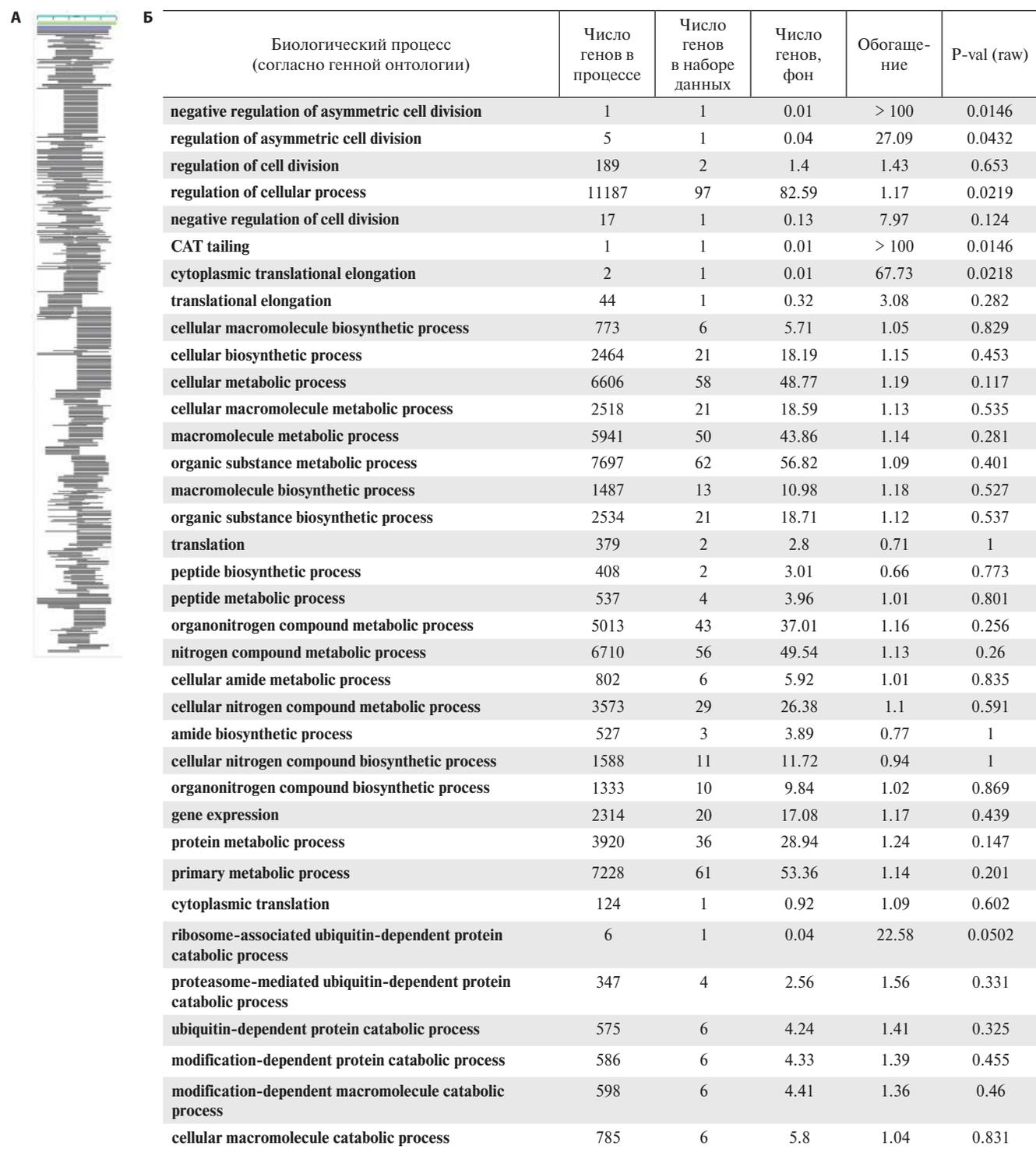


Рис. 4. А – поиск похожих последовательностей для фрагмента тРНК tDR-1:31-Gly-CCC-1-M4 с помощью BLASTN в базе данных refsec RNA, показано графическое выравнивание, Б – обогащенные термины геной онтологии из категории «биологический процесс» для перечня генов с похожими последовательностями на tDR-1:31-Gly-CCC-1-M4.

Fig. 4. А – search for similar sequences for the tRNA fragment tDR-1:31-Gly-CCC-1-M4 using BLASTN in the refsec RNA database, graphical alignment is shown, Б – enriched gene ontology terms from the «biological process» category for list of genes with similar sequences to tDR-1:31-Gly-CCC-1-M4.

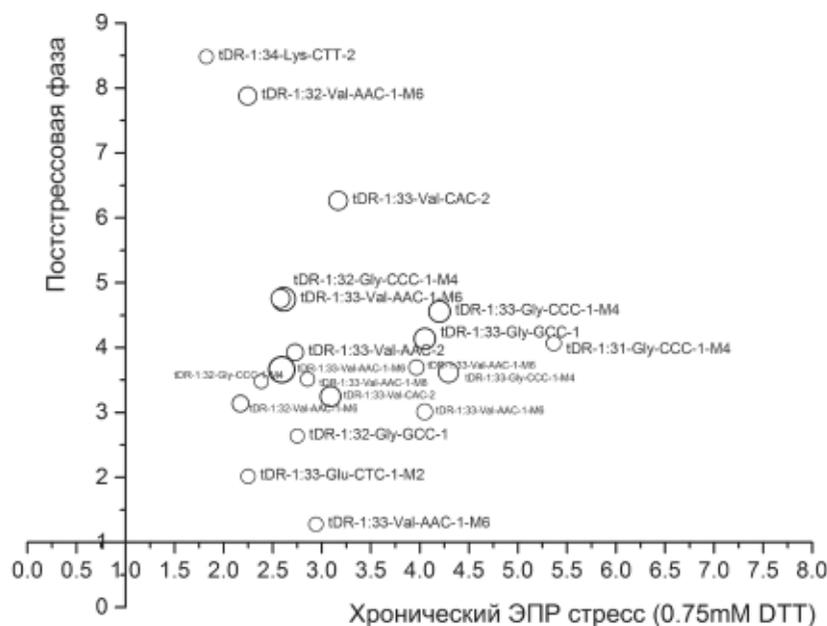


Рис. 5. Сопоставление фрагментов тРНК в клетках FRSN, подвергнутых хроническому стрессу ЭПР и в постстрессорной фазе на диаграмме рассеивания, по оси абсцисс и ординат – кратность изменения экспрессии, диаметр точек – логарифм представленности по основанию 2.

Fig. 5. Comparison of tRNA fragments in FRSN cells subjected to chronic ER stress and in the post-stress phase on the scatter diagram, the x and y axis are the fold change in expression, the diameter of the points is the logarithm of enrichment in base 2.

логичных участков как плюс, так и минус цепи ДНК для транскриптов базы refseq RNA (рис. 4, А). Это может свидетельствовать о возможности комплементарных взаимодействий со смысловыми или антисмысловыми транскриптами. В частности, в ряде работ показана ассоциация фрагментов тРНК с комплексом RISC, т.е. возможность опосредования ими РНК-интерференции, например, tRF-фрагментами [24, 28]. Анализ терминов геномной онтологии для перечня установленных гомологичных транскриптов показал ряд обогащенных процессов, таких, как negative regulation of asymmetric cell division, cytoplasmic translational elongation (рис. 4, Б). Эти процессы могут быть рассмотрены при поиске возможной функциональной роли данного фрагмента.

Нами было проведено сопоставление хронически стрессированных клеток с клетками в постстрессорной фазе. Была обнаружена близость их тРНК-фрагментов за исключением фрагментов изотипов Val, Lys (рис. 5).

Таким образом, в данной работе нами были впервые охарактеризованы тРНК фрагменты при стрессиндуцированном и репликативном старении, которые показали наличие общих дифференциально регулируемых фрагментов тРНК. Это делает их возможными

кандидатами на универсальные маркеры клеточного старения для данного типа клеток, что может в перспективе использоваться как подход для оценки динамики процессов клеточного старения.

Литература

(п.п. 1–22; 24; 26–28 см. References)

23. Кухарский М.С., Эверетт М.В., Лыткина О.А., Распопова М.А., Ковражкина Е.А., Овчинников Р.К. и др. Нарушение регуляции белкового гомеостаза в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. *Мол. биология*. 2022; 56(6): 1044–56. <https://doi.org/10.31857/S0026898422060143>
25. Зайченко Д.М., Микрюкова А.А., Астафьева И.Р., Малахов С.Г., Кубатиев А.А., Московцев А.А. Биогенез микроРНК при старении клеток, индуцированном хроническим стрессом эндоплазматического ретикулума. *Мол. биол.* 2023; 57(4): 670–83. <https://doi.org/10.1134/S0026893323040192>

References

1. Anderson P., Ivanov P. TRNA Fragments in Human Health and Disease. *FEBS Lett.* 2014; 588(23): 4297–304.
2. Giegé R. Toward a More Complete View of TRNA Biology. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008; 15(10): 1007–14. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1498>
3. Phizicky E.M., Hopper A.K. TRNA Biology Charges to the Front. *Genes Dev.* 2010; 24(17): 1832–60. <https://doi.org/10.1101/gad.1956510>

4. Raina M., Ibba M. TRNAs as Regulators of Biological Processes. *Front. Genet.* 2014; (5): 171. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00171>
5. Orellana E.A., Siegal E., Gregory R.I. TRNA Dysregulation and Disease. *Nat. Rev. Genet.* 2022; 23(11): 651–64. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00501-9>
6. Sajek M.P., Woźniak T., Sprinzl M., Jaruzelska J., Barciszewski J. T-Psi-C: User Friendly Database of TRNA Sequences and Structures. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(D1): D256–D260. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz922>
7. Gruber A.R., Lorenz R., Bernhart S.H., Neuböck R., Hofacker I. L. The Vienna RNA Website. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36 (Web Server issue): W70–4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
8. Torres A.G., Batlle E., Ribas de Pouplana L. Role of TRNA Modifications in Human Diseases. *Trends Mol. Med.* 2014; 20 (6): 306–14. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.01.008>
9. Abe T., Inokuchi H., Yamada Y., Muto A., Iwasaki Y., Ikemura T. TRNADB-CE: TRNA Gene Database Well-Timed in the Era of Big Sequence Data. *Front. Genet.* 2014; 5: 114. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00114>
10. Chan P.P., Lowe T.M. GtRNADB: A Database of Transfer RNA Genes Detected in Genomic Sequence. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (Database issue): D93–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn787>
11. Chan P.P., Lowe T.M. GtRNADB 2.0: An Expanded Database of Transfer RNA Genes Identified in Complete and Draft Genomes. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44 (D1): D184–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1309>
12. Parisien M., Wang X., Pan T. Diversity of Human TRNA Genes from the 1000-Genomes Project. *RNA Biol.* 2013; 10(12): 1853–67. <https://doi.org/10.4161/rna.27361>
13. Goodenbour J.M., Pan T. Diversity of TRNA Genes in Eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(21): 6137–46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl725>
14. Gebetsberger J., Polacek N. Slicing TRNAs to Boost Functional NcRNA Diversity. *RNA Biol.* 2013; 10(12): 1798–806. <https://doi.org/10.4161/rna.27177>
15. Sobala A., Hutvagner G. Transfer RNA-Derived Fragments: Origins, Processing, and Functions. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2011; 2(6): 853–62. <https://doi.org/10.1002/wrna.96>
16. Thompson D. M., Parker R. Stressing out over TRNA Cleavage. *Cell* 2009; 138(2): 215–9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.001>
17. Tuck A.C., Tollervey D. RNA in Pieces. *Trends Genet.* 2011; 27(10): 422–32. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.06.001>
18. Mesitov M.V., Soldatov R.A., Zaichenko D.M., Malakho S.G., Klementyeva T.S., Sokolovskaya A.A., et al. Differential Processing of Small RNAs during Endoplasmic Reticulum Stress. *Sci. Rep.* 2017; (7): 46080. <https://doi.org/10.1038/srep46080>
19. Li S., Hu G.-F. Emerging Role of Angiogenin in Stress Response and Cell Survival under Adverse Conditions. *J. Cell. Physiol.* 2012; 227(7): 2822–6. <https://doi.org/10.1002/jcp.23051>
20. Yamasaki S., Ivanov P., Hu G. F., Anderson P. Angiogenin Cleaves TRNA and Promotes Stress-Induced Translational Repression. *J. Cell Biol.* 2009; 185(1):. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811106>
21. Ivanov P., Emara M.M., Villen J., Gygi S.P., Anderson P. Angiogenin-Induced TRNA Fragments Inhibit Translation Initiation. *Mol. Cell* 2011; 43(4): 613–23. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.022>
22. Emara M.M., Ivanov P., Hickman T., Dawra N., Tisdale S., Keder-sha N., et al. Angiogenin-Induced TRNA-Derived Stress-Induced RNAs Promote Stress-Induced Stress Granule Assembly. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(14): 10959–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077560>
23. Kukharsky M.S., Everett M.W., Lytkina O.A., Raspopova M.A., Kovrazhkina E.A., Ovchinnikov R.K., et al. Protein Homeostasis Dysregulation in Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Mol. Biol.* 2022; 56(6): 1044–56. <https://doi.org/10.31857/S0026898422060143> (in Russian)
24. Su Z., Kuscu C., Malik A., Shibata E., Dutta A. Angiogenin Generates Specific Stress-Induced TRNA Halves and Is Not Involved in TRF-3-Mediated Gene Silencing. *J. Biol. Chem.* 2019; 294(45): 16930–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009272>
25. Zaichenko D.M., Mikryukova A.A., Astafeva I.R., Malakho S.G., Kubatiev A.A., Moskovtsev A.A. MicroRNA Biogenesis in Cell Senescence Induced by Chronic Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Biol.* 2023; 57(4): 670–83. <https://doi.org/10.1134/S0026893323040192> (in Russian)
26. Pliatsika V., Lohrer P., Magee R., Telonis A. G., Lordin E., Shigematsu M., et al. MINTbase v2.0: A Comprehensive Database for TRNA-Derived Fragments That Includes Nuclear and Mitochondrial Fragments from All The Cancer Genome Atlas Projects. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1): D152–D159. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1075>
27. Steinberg S., Misch A., Sprinzl M. Compilation of TRNA Sequences and Sequences of TRNA Genes. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(13): 3011–5. <https://doi.org/10.1093/nar/21.13.3011>
28. Venkatesh T., Suresh P. S., Tsutsumi R. TRFs: MiRNAs in Disguise. *Gene* 2016; 579(2): 133–8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.058>

Сведения об авторах:

Зайченко Данила Михайлович, мл. науч. сотр. группы клеточного стресса ФГБНУ НИИОПП; мл. науч. сотр. группы медицинской биотехнологии лаб. биоресурсной коллекции клеточных линий и первичных опухолей ФГБНУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; ассистент каф. биологии и общей генетики медицинского института РУДН, e-mail: danilamihailovich@mail.ru;

Пасько Алексей Юрьевич, мл. науч. сотр. группы клеточного стресса ФГБНУ НИИОПП, e-mail: alexihox@gmail.com; **Микрюкова Анна Алексеевна**, мл. науч. сотр. группы клеточного стресса ФГБНУ НИИОПП, e-mail: mikri-anya@yandex.ru;

Астафьева Яна Романовна, лаборант группы клеточного стресса ФГБНУ НИИОПП, e-mail: yanasterr@yandex.ru; **Малахо Софья Гарифовна**, канд. биол. наук, биолог, ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» ДЗМ, e-mail: malakhosophie@gmail.com;

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор мед. наук, акад. РАН, руководитель отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП; зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., руководитель группы клеточного стресса ФГБНУ НИИОПП; доцент каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; вед. науч. сотр. группы медицинской биотехнологии лаб. биоресурсной коллекции клеточных линий и первичных опухолей ФГБНУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, e-mail: bioinf@mail.ru