

УДК 577.241

4.5SI И 4.5SH РНК: ЭКСПРЕССИЯ В РАЗНЫХ ОРГАНАХ ГРЫЗУНОВ, СОДЕРЖАНИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В КЛЕТКЕ

© 2017 г. К. А. Татосян, А. П. Коваль, И. К. Гоголевская, Д. А. Крамеров*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: kramerov@eimb.ru

Поступила в редакцию 25.02.2016 г.

Принята к печати 31.03.2016 г.

Изучение структуры, функций и клеточной физиологии малых РНК остается крайне актуальным. Малые РНК 4.5SI и 4.5SH, открытые и секвенированные одними из первых, обладают определенным сходством – состоят примерно из 100 н., синтезируются РНК-полимеразой III и встречаются только в клетках грызунов ряда родственных семейств. Гены обеих РНК эволюционно родственны коротким рассеянными по геному повторам (SINE). Однако нуклеотидные последовательности этих РНК не сходны между собой, значительно различаются времена их жизни в клетке и организация генов в геноме. Хотя 4.5SI и 4.5SH РНК известны уже более трех десятилетий, не изученным остается ряд вопросов, касающихся особенностей метаболизма этих РНК в клетке. Нами проведено количественное определение содержания 4.5SI и 4.5SH РНК в разных органах трех видов грызунов (мышь, крыса и хомяк). Установлено, что при высоком уровне обеих РНК в органах этих видов содержание 4.5SI было сходным в разных органах разных видов, тогда как уровень 4.5SH РНК варьировал. Анализ распределения 4.5SI и 4.5SH РНК между ядром и цитоплазмой выявил их преимущественно ядерную локализацию. Число молекул этих РНК в клетке, оцененное нами, составило $0.4\text{--}2.4 \times 10^6$. Подобное количественное исследование, проведенное впервые, позволило разрешить ряд противоречий в результатах, полученных разными авторами.

Ключевые слова: 4.5SH РНК, 4.5SI РНК, малые некодирующие РНК, SINE, грызуны

DOI: 10.7868/S0026898417010177

ВВЕДЕНИЕ

История изучения малых клеточных РНК началась с открытия тРНК и 5S рРНК. Их участие в трансляции мРНК было установлено довольно быстро. В 70-х годах прошлого века в клетках эукариот обнаружили целый ряд новых малых РНК (70–300 н.). Постепенно стало ясно, что они играют важную роль в сплайсинге пре-мРНК (U1, U2, U4, U5, U6, U11 и U12 РНК), процессинге пре-рРНК (U3 и U14 РНК), модификации пре-рРНК (С/D-бокс РНК и H/ACA-бокс РНК), а также в секреции белков (7SL РНК), регуляции транскрипции (7SK РНК) и инициации репликации ДНК (Y РНК) [1–5]. Открытие многочисленных микроРНК длиной около 22 н. вызвало бурное развитие целого направления исследований, показавших, что микроРНК регулируют экспрессию генов путем сайленсинга мРНК [6].

Одними из первых были открыты и секвенированы 4.5SI и 4.5SH РНК [7, 8]. Впервые эти РНК обнаружили в клетках мышей и крыс, но их не находили в клетках человека [9, 10]. Позднее установили, что 4.5SI РНК содержится в клетках только трех родственных семейств грызунов: Mu-

ridae (мыши, крысы, песчанки), Cricetidae (хомяки, полевки) и Spalacidae (слепыши, бамбуковые крысы, цокоры) [11, 12]. 4.5SH РНК представлена в тех же таксонах грызунов, а также у тушканчиков и мышовок (Dipodidae), т.е. у всех представителей клады Myodonta [13].

Длина обеих РНК равна примерно 100 н., но их нуклеотидные последовательности мало сходны между собой. Эти РНК синтезируются РНК-полимеразой III, что и обуславливает наличие небольших сходных последовательностей: (i) внутреннего промотора, состоящего из боксов А и В (каждый из 11 н.), и (ii) трех–четырёх остатков U на 3'-конце РНК, образующихся при транскрипции терминатора (TTTTTT) [14, 15].

Гены, кодирующие эти две РНК, по-разному организованы в геноме. У мышей 4.5SI РНК транскрибируется с трех генов, расположенных на хромосоме 6 на расстоянии 40 т.п.н. друг от друга [12]. Геномы всех исследованных грызунов содержат гораздо больше генов 4.5SH РНК (700–800), и каждый ген входит в состав тандемного повтора длиной 4–5 т.п.н. [13, 16]. Интересно, что обе РНК эволюционно родственны коротким

рассеянным по геному повторам (SINE): гены 4.5SI РНК, видимо, произошли от SINE B2 [17], в то время как гены 4.5SH РНК – от копии древнего SINE pB1 [18, 19]. SINE – это неавтономные мобильные генетические элементы, типичные для большинства многоклеточных эукариот [20]. Их длины варьируют от 100 до 500 п.н., а количество копий одного SINE в геноме может достигать миллиона. Родство между SINE и генами 4.5SI и 4.5SH РНК не уникальное явление: известны и другие примеры эволюционной связи между SINE и генами малых некодирующих РНК [21–23].

Функции 4.5SI и 4.5SH РНК остаются неясными. Однако недавно показали, что 4.5SH РНК может взаимодействовать с антисмысловыми последовательностями SINE B1 в составе молекул мРНК и удерживать такие транскрипты в ядре [24]. Также обнаружено, что уровень 4.5SH РНК в клетке увеличивается в ответ на тепловой шок, причем существенный вклад вносит замедление распада этой РНК [25].

Несмотря на долгую историю исследований 4.5SI и 4.5SH РНК, ряд существенных проблем остается неизученным или полученные данные противоречивы. Мы впервые систематически изучили относительное содержание 4.5SI и 4.5SH РНК в различных органах мыши, крысы и хомяка, а также выяснили как 4.5SI и 4.5SH РНК распределены между ядром и цитоплазмой. Наконец, установлено, что число молекул обеих РНК в клетке исчисляется миллионами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа с биологическим материалом. В работе использовали образцы тканей и органов домашней мыши (*Mus musculus*) линии C57BL/6 (четыре особи), серой крысы (*Rattus norvegicus*) линии Wistar (три особи), сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*) (три особи). Клетки линий Rat1 [26], L929 (ATCC CCL-1), NIH/3T3 (ATCC CRL-1658) и 4T1 (ATCC CRL-2539) культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Для получения клеток асцитной

карциномы Кребса II (АКК) [27] 0.7 мл асцита вводили внутривентриально нелинейным мышам, через 7–10 дней собирали асцитную жидкость, из которой клетки осаждали с помощью центрифугирования (5 мин, 700 g).

Фракционирование клеток. Клетки (4–24 млн) суспендировали в 1 мл буфера НТМ-С (0.1 М NaCl, 50 мМ Трис-НСl рН 8.0, 5 мМ MgCl₂, 0.25 М сахараза), содержащего 1 мМ PMSF; суспензию разбавляли 1 мл буфера НТМ-С, содержащего 1% NP-40, инкубировали в течение 5 мин во льду и центрифугировали (10 мин, 1900 g). Осадок, содержащий ядра клеток, отделяли от цитоплазматической фракции (супернатанта).

Выделение РНК. Образцы суммарной и ядерной РНК получали из культур клеток, образцов тканей и органов животных гуанидинтиоцианатным методом [28]. Из цитоплазматической фракции РНК выделяли путем депротеинизации смесью (1 : 1) фенол, рН 8.0/хлороформ.

Нозерн-блот-гибридизация. Образцы РНК разделяли в 6%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 8 М мочевины. После электрофореза РНК переносили из геля на нейлоновую мембрану Hybond XL с помощью полусухого электроблоттинга (2–2.5 ч, напряжение 3–5 В). После окончания переноса РНК фиксировали на мембране с помощью УФ-облучения (365 нм). Зонды метили [α -³²P]dATP с помощью ПЦР. Гибридизацию проводили согласно [29]. Для визуализации сигнала мембрану экспонировали с экраном, который далее сканировали фосфоимеджером (Cyclone Storage Phosphor System). Мембрану также экспонировали с рентгеновской пленкой в кассете с усиливающим экраном в течение 1–48 ч при –70°C.

Определение количества молекул РНК в клетке. Число клеток перед выделением из них РНК подсчитывали с использованием камеры Горяева. На 8%-ный ПААГ наносили аликвоту РНК, соответствующую 4×10^5 клеток. На тот же гель наносили различные количества дезоксиолигонуклеотидов, соответствующих фрагментам (50 н.) изучаемых РНК:

4.5SI AAAATATAAGAGTTCGGTTCACAGCACCCACGGCTGTCTCTCCAGCCACC;

4.5SH TGGCGCACGCCGGTAGGATTTGCTGAAGGAGGCAGAGGCAGGAGGATCAC;

U1 CTGCGATTTCCCAAATGCGGGAAACTCGACTGCATAATTTGTGGTAGTG.

РНК и ДНК переносили на мембрану Hybond XL и гибридизовали с мечеными дезоксиолигонуклеотидами:

4.5SI GGTGGCTGGAGAGACAGCCGTGGGTGCTGGGAACCGAACT;

4.5SH GTGATCCTCCTGCCTCTGCCTCCTTCAGCAAATCCTACCG;

U1 CCACAATATGTCAGTCGAGTTTCCCGCATTTGGGGAAAT.

Зонды, комплементарные как изучаемым РНК, так и дезоксиолигонуклеотиду на мембране, метили по 5'-концу с помощью полинуклеотидкиназы

T4 и [γ -³²P]АТР. Гибридизацию проводили как описано ранее [29]. Интенсивность радиоактивных сигналов 4.5SI, 4.5SH и U1 РНК и соответствующих

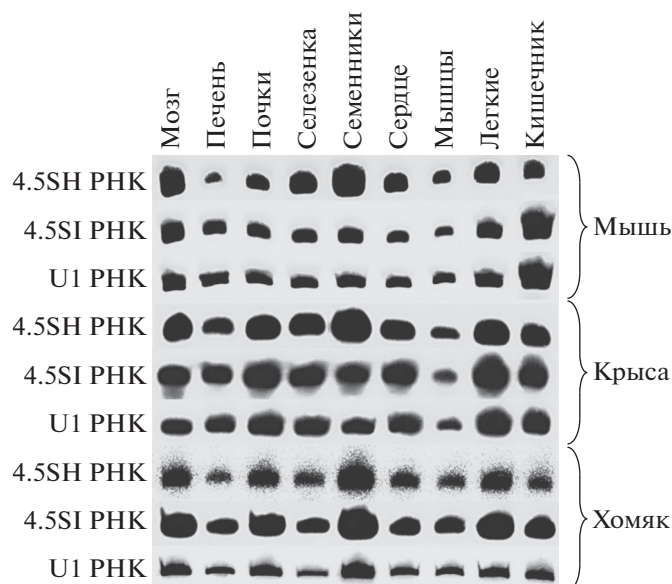


Рис. 1. Определение 4.5SH, 4.5SI и U1 РНК в суммарной РНК, выделенной из девяти органов домашней мыши (*M. musculus*) линии C57BL/6, серой крысы (*R. norvegicus*) линии Wistar, сирийского хомячка (*Mes. auratus*). Приведены результаты Нозерн-блот-гибридизации для одного животного каждого вида.

дезоксиполирибонуклеотидов определяли с помощью фосфоимеджера. Данные, полученные для дезоксиполирибонуклеотидов, использовали при построении калибровочных кривых зависимости радиоактивности полос нанесенных на гель дезоксиполирибонуклеотидов от их количества. Число молекул изучаемой РНК в клетке определяли по формуле:

$$N = \frac{R \times N_A}{K \times M \times 10^{12}},$$

где N – число молекул исследуемой РНК в клетке данного типа; R – радиоактивность полосы этой РНК в клетках данного типа (в условных единицах); N_A – число Авогадро (6×10^{23}); M – число клеток, РНК которых нанесена на гель ($M = 4 \times 10^5$); $K = (Y_2 - Y_1)/(X_2 - X_1)$, где Y_1 и Y_2 – величины радиоактивных гибридационных сигналов (в условных единицах), а X_1 и X_2 – количества дезоксиполирибонуклеотида (в пмоль) для двух разных точек на калибровочной кривой.

Уровень потерь при переносе РНК и дезоксиполирибонуклеотида с полиакриламидного геля на мембрану оценивали по меченому маркеру, для которого разница в потерях составила не более 15% между короткими (50 н.) и длинными (100 н.) фрагментами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Относительное содержание 4.5SI и 4.5SH РНК в различных органах грызунов

Оценка содержания различных видов РНК и белков в органах и тканях может быть важной для

изучения роли исследуемых молекул в организме. С этой целью выделяли суммарную клеточную РНК из девяти органов (мозг, печень, почки, селезенка, сердце, мышцы, легкие, семенники и тонкий кишечник) домашней мыши (*M. musculus*), серой крысы (*R. norvegicus*) и сирийского хомячка (*Mes. auratus*). РНК подвергали электрофорезу в денатурирующем ПААГ, переносили на мембрану и гибридовали с 4.5SI- или 4.5SH-специфичным меченым ^{32}P зондом. В качестве контроля использовали U1 РНК (широко представленная ядерная РНК, участвующая в сплайсинге), которую выявляли с помощью гибридации с соответствующим зондом. Затем мембрану экспонировали на рентгеновской пленке или сканировали с помощью фосфоимеджера. Результаты радиоавтографии представлены на рис. 1. Видно, что 4.5SI и 4.5SH РНК легко детектируются во всех образцах, что свидетельствует о высоком уровне их экспрессии в различных тканях и органах. На рис. 2 показаны результаты количественного анализа интенсивности сигнала, полученного с использованием фосфоимеджера. Гибридационные сигналы 4.5SI и 4.5SH РНК нормировали по сигналу U1 РНК. Для удобства сравнения за единицу принимали уровень 4.5SI или 4.5SH РНК в мышцах. Содержание 4.5SI РНК в органах различалось незначительно, не более чем в 2 раза (печень и селезенка хомячка). Уровень 4.5SH РНК изменялся в более широких пределах: различие между тонким кишечником и семенниками мыши составляло почти 5 раз. Оценка содержания обеих РНК в различных органах показала, что профили их экс-

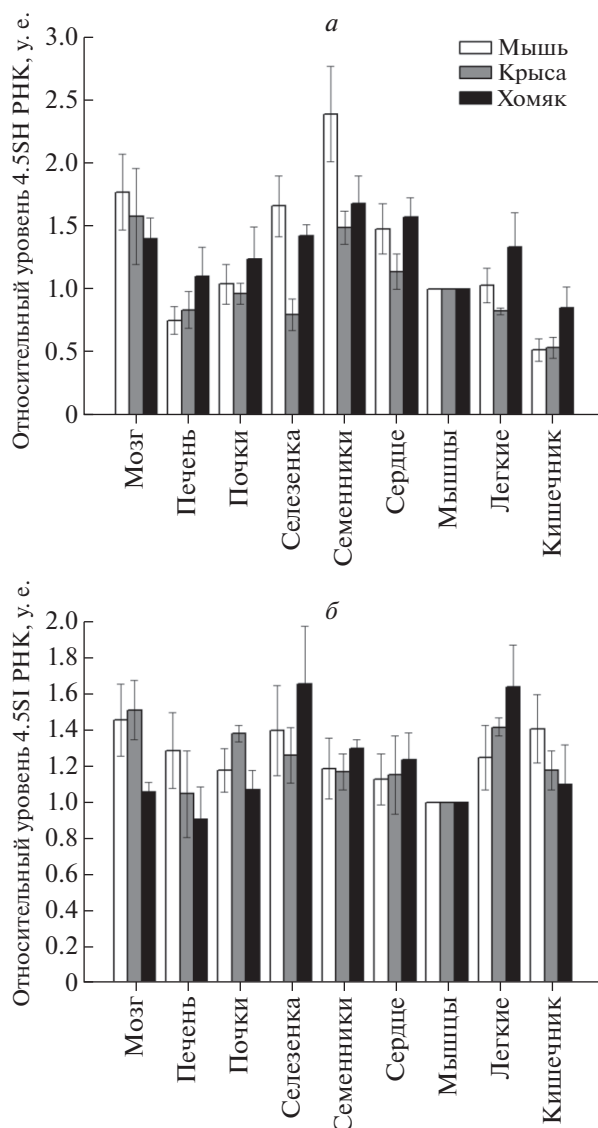


Рис. 2. Гистограммы, отражающие относительные уровни 4.5SH РНК (а) и 4.5SI РНК (б) в девяти органах мыши (четыре особи), крысы (три особи) и хомяка (три особи). Гибридизационные сигналы 4.5SI и 4.5SH РНК нормировали по сигналу U1 РНК; за единицу сравнения принят уровень гибридного сигнала данной РНК в мышцах (у. е.). Показано стандартное отклонение.

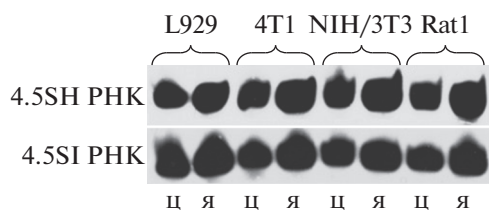


Рис. 3. Нозерн-блот-гибридизация 4.5SH и 4.5SI РНК в ядерной (я) и цитоплазматической (ц) РНК, выделенной из клеточных линий мыши (L929, 4T1 и NIH/3T3) и крысы (Rat1).

прессии у разных видов грызунов довольно сходны (рис. 2).

Внутриклеточная локализация 4.5SH и 4.5SI РНК

Чтобы оценить распределение РНК между ядром и цитоплазмой клетки различных линий разделяли на соответствующие фракции, из которых затем выделяли РНК. РНК анализировали с помощью Нозерн-блот-гибридизации с последующим измерением гибридных сигналов с помощью фосфоимеджера (рис. 3).

Показано, что в четырех клеточных линиях 75–79% 4.5SH и 66–77.5% 4.5SI РНК находится в ядре (табл. 1). Эти данные указывают на преимущественно ядерную локализацию обеих РНК.

Определение количества молекул 4.5SH и 4.5SI РНК в клетке

Для изучения метаболизма и функций РНК важно знать ее количество в клетке. Нами предложен простой метод оценки количества молекул РНК в клетке. На одном ПЛАГ разделяли суммарную РНК из известного количества клеток и ряд стандартных разведений дезоксиолигонуклеотида, соответствующего фрагменту (50 н.) изучаемой РНК. РНК и ДНК переносили на мембрану и гибридовали с меченым по 5'-концу дезоксиолигонуклеотидом (40 н.), комплементарным как изучаемой РНК, так и дезоксиолигонуклеотиду на мембране. Интенсивность радиоактивного сигнала, пропорциональную количеству нанесенной РНК и дезоксиолигонуклеотида, определяли путем сканирования мембраны фосфоимеджером (рис. 4). На основе полученных данных были построены калибровочные кривые зависимости радиоактивности полосы нанесенного на гель олигонуклеотида от его количества (рис. 5). Число молекул изучаемой РНК в клетке определяли по формуле (см. раздел “Экспериментальная часть”).

Метод проверен на U1 РНК, число молекул которой в клетке исчисляется несколькими миллионами [9]. Результаты нашей оценки, выполненной описанным методом, соответствуют этим величинам (табл. 2). Далее мы определили число молекул 4.5SH и 4.5SI РНК в четырех клеточных линиях грызунов. Количество молекул 4.5SH РНК составило 0.4–2.1 млн, 4.5SI – 0.9–2.4 млн в зависимости от типа клеток. Иными словами, обе эти РНК весьма обильно представлены в клетке, причем их количество не более чем на порядок (3–11 раз) уступает числу молекул U1 РНК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы показали, что как 4.5SI, так и 4.5SH РНК присутствуют во всех проанализированных органах домашней мыши, серой кры-

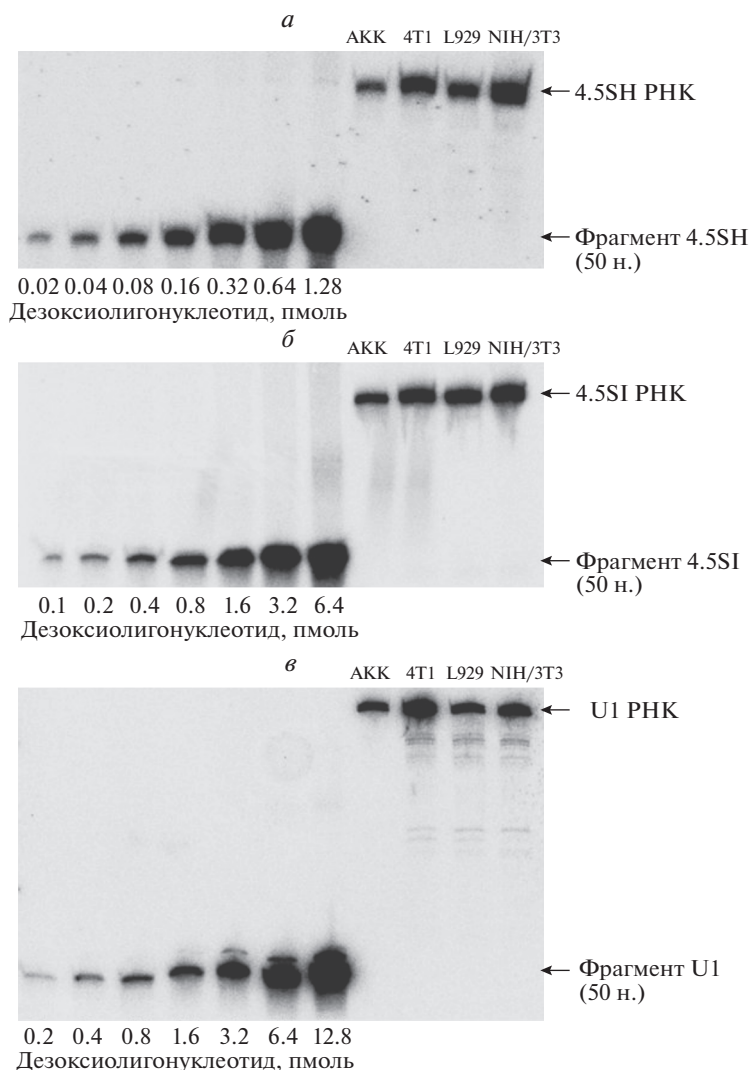


Рис. 4. Нозерн-блот-гибридизация 4.5SH (а), 4.5SI (б) и U1 (в) РНК в препаратах суммарной РНК, выделенной из 4×10^5 клеток четырех линий, и дезоксиолигонуклеотидов, соответствующих фрагментам 50 н. РНК 4.5SH (а), 4.5SI (б) и U1 (в), и нанесенных в указанных количествах на гель.

сы (сем. Muridae) и сирийского хомячка (сем. Cricetidae). Уровень 4.5SI РНК в органах разных животных был весьма сходным. 4.5SH РНК особенно обильно представлена в семенниках и мозге трех видов, несколько ниже — в почках, селезенке, сердце, мышцах, легких. Самым низким

уровень этой РНК был в тонком кишечнике и печени (в 2–5 раз ниже, чем в семенниках).

Недавно Ishida и соавт. [24] также выявили 4.5SH РНК во всех восьми исследованных ими органах мыши. Хотя они не проводили количественную оценку, их данные свидетельствуют об

Таблица 1. Распределение 4.5SH и 4.5SI РНК между ядром и цитоплазмой в четырех клеточных линиях грызунов

Клеточная линия	4.5 SH РНК, %		4.5 SI РНК, %	
	ядро	цитоплазма	ядро	цитоплазма
L929	75.1	24.9	77.5	22.5
4T1	77.6	22.4	70.5	29.5
NIH/3T3	76.0	24.0	66.4	33.6
Rat1	74.9	25.1	66.8	33.2

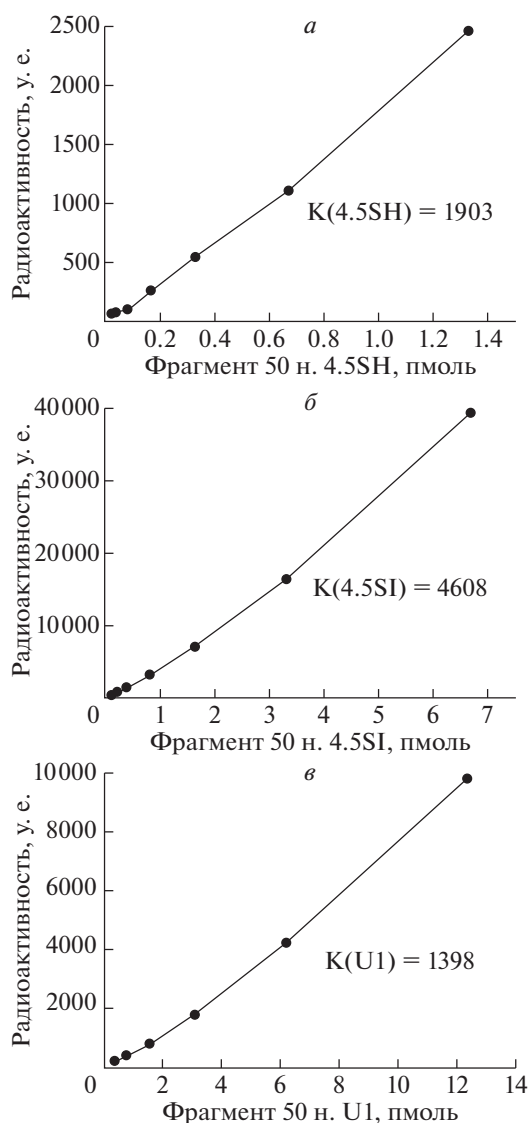


Рис. 5. Калибровочные кривые зависимости радиоактивности электрофоретических полос дезоксиолигонуклеотидов, соответствующих фрагментам 4.5SH (а), 4.5SI (б) и U1 (в) РНК, от их количества. Приведены величины К, установленные при анализе калибровочных кривых (см. раздел “Экспериментальная часть”).

очень высоком уровне 4.5SH РНК в эмбриональном мозге. Необходимо упомянуть раннюю работу Vachvarova [30], в которой сообщалось о при-

Таблица 2. Число молекул 4.5SH, 4.5SI и U1 РНК в одной клетке

Клеточная линия	Число молекул в одной клетке		
	4.5SH РНК	4.5SI РНК	U1 РНК
АКК	0.4×10^6	0.9×10^6	3.0×10^6
4Т1	1.2×10^6	2.0×10^6	13.6×10^6
L929	0.8×10^6	1.8×10^6	4.9×10^6
НН/ЗТЗ	2.1×10^6	2.4×10^6	7.9×10^6

сутствии небольших количеств этой РНК и в зрелых ооцитах мышей.

В нашей работе особое внимание уделено количественному анализу содержания РНК. С этой целью использовали образцы тканей нескольких животных, количественную оценку гибридизационного сигнала с помощью фосфоимеджера, а данные для 4.5SI и 4.5SH РНК нормировали по отношению к U1 РНК, широко представленной преимущественно ядерной РНК, которая входит в состав сплайсосом. Такое нормирование позволяет учесть различия между клетками разных тканей по соотношению объема ядра и цитоплазмы.

Данные о распределении 4.5SH РНК внутри клетки противоречивы. В одной работе пришли к заключению о преимущественно цитоплазматической локализации 4.5SH РНК [16], тогда как в другой ее обнаруживали практически только в ядре [24] (табл. 3).

Полученные в 1986 г. данные [16] представляются нам менее достоверными, поскольку в этой работе использован косвенный метод оценки и проанализирована одна клеточная линия. Согласно нашим данным, полученным на четырех линиях клеток, 4.5SH РНК присутствует как в ядре, так и в цитоплазме в соотношении от 3 : 1 до 4 : 1 (табл. 1).

Противоречия в результатах оценки внутриклеточной локализации этой малой РНК могут быть связаны с анализом различных клеточных линий, нюансами в методах разделения ядерной и цитоплазматической фракций клеток, а также с различиями методов количественной оценки 4.5SH РНК (табл. 3).

Мы выявили преимущественно ядерную локализацию 4.5SI РНК: в разных клеточных линиях 66.4–77.5% этой РНК обнаружено в ядре (табл. 1).

Shoeniger и Jelinek оценили количество 4.5SH РНК в 1.3×10^4 молекул на клетку [16]. Используя четыре линии клеток, мы проверили эти данные, применив более прямой и точный подход. К нашему удивлению оказалось, что число молекул 4.5SH РНК на два порядка превышает оценку этих авторов [16] (табл. 2). Причины таких различий нам не вполне понятны. Это может быть связано как с методом исследования, так и с особенностью клеток MEL, с которыми работали Shoeniger и Jelinek, хотя последнее кажется нам менее вероятным [16].

Нам не удалось обнаружить опубликованных результатов экспериментальной оценки числа молекул 4.5SI РНК в клетке, однако упоминается, что в клеточном ядре ее количество составляет приблизительно миллион молекул [31]. Наши данные согласуются с этой цифрой по порядку величины (табл. 2).

Таким образом, 4.5SI и 4.5SH РНК должны быть отнесены к обильно представленным неко-

Таблица 3. Сравнение методов и результатов трех исследований, в которых изучали распределение 4.5SH РНК между ядром и цитоплазмой в клетках грызунов

Исследование	Клеточная линия	Метод	Распределение в клетке
Schoeniger и Jelinek, 1986	MEL (эритролейкоз мыши)	Меченую ядерную и цитоплазматическую РНК гибридизовали с избытком иммобилизованной ДНК гена 4.5SH РНК, измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика	Ядро 30% Цитоплазма 70%
Ishida и соавт., 2015	Neuro2A (нейробластома мыши)	Нозерн-блот-гибридизация РНК, выделенной из цитоплазмы и ядер, визуальная оценка	Ядро (около 100%)
Данное исследование	<ul style="list-style-type: none"> • 4Т1 (рак молочной железы мыши) • L929 (иммортиализованные фибробласты соединительной ткани мыши) • 3Т3/NIH и Rat1 (иммортиализованные эмбриональные фибробласты мыши и крысы соответственно) 	Нозерн-блот-гибридизация РНК, выделенной из цитоплазмы и ядер, измерение на фосфоимеджере	Ядро 75–78% Цитоплазма 22–25%

дирующим РНК, количество которых сопоставимо с количеством U1 РНК — одной из наиболее многочисленных малых некодирующих РНК в клетке, если не учитывать 5S рРНК и тРНК. Эти данные важны для дальнейшего изучения 4.5SI и 4.5SH РНК.

Если недавно были опубликованы результаты изучения возможной функции 4.5SH РНК (регуляция экспорта мРНК из ядра благодаря взаимодействию с антисмысловыми последовательностями SINE B1) [24], то какие-либо данные о роли 4.5SI РНК в клетке отсутствуют. Однако надо отметить, что, поскольку эти две РНК свойственны только нескольким семействам грызунов (правда, по числу видов составляющим 65% этого отряда), они, скорее всего, вовлечены в работу каких-то молекулярных механизмов, представляющих собой “надстройку” над стандартной системой регуляции в клетках млекопитающих.

Авторы благодарны Н.И. Сесиной, принявшей участие в проведении первых этапов данного исследования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и Российского фонда фундаментальных исследований 14-04-00616.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cooper T.A., Wan L., Dreyfuss G. (2009) RNA and disease. *Cell*. **136**, 777.
- Diribarne G., Bensaude O. (2009) 7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor. *RNA Biol.* **6**, 122.
- Krude T. (2010) Non-coding RNAs: new players in the field of eukaryotic DNA replication. *Sub-Cell. Biochem.* **50**, 105.
- Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. (2007) Малые ядрышковые РНК. *Молекуляр. биология*. **41**, 246–259.
- Moazed D. (2009) Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*. **457**, 413.
- Bartel D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. **116**, 281.
- Harada F., Kato N. (1980) Nucleotide sequences of 4.5S RNAs associated with poly(A)-containing RNAs of mouse and hamster cells. *Nucl. Acids Res.* **8**, 1273.
- Ro-Choi T.S., Redy R., Henning D., Takano T., Taylor C.W., Busch H. (1972) Nucleotide sequence of 4.5S ribonucleic acid of Novikoff hepatoma cell nuclei. *J. Biol. Chemistry*. **247**, 3205.
- Busch H., Reddy R., Rothblum L., Choi Y.C. (1982) SnRNAs, SnRNPs, and RNA processing. *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 617.
- Harada F., Kato N., Hoshino H. (1979) Series of 4.5S RNAs associated with poly(A)-containing RNAs of rodent cells. *Nucl. Acids Res.* **7**, 909.
- Gogolevskaya I.K., Kramerov D.A. (2002) Evolutionary history of 4.5SI RNA and indication that it is functional. *J. Mol. Evol.* **54**, 354.
- Gogolevskaya I.K., Kramerov D.A. (2010) 4.5SI RNA genes and the role of their 5'-flanking sequences in the gene transcription. *Gene*. **451**, 32.
- Gogolevskaya I.K., Koval A.P., Kramerov D.A. (2005). Evolutionary history of 4.5SH RNA. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 1546.

14. Leinwand L.A., Wydro R.M., Nadal-Ginard B. (1982) Small RNA molecules related to the Alu family of repetitive DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1320.
15. Reddy R., Henning D., Tan E., Busch H. (1983). Identification of a La protein binding site in a RNA polymerase III transcript (4.5I RNA). *J. Biol. Chem.* **258**, 8352.
16. Schoeniger L.O., Jelinek W.R. (1986) 4.5S RNA is encoded by hundreds of tandemly linked genes, has a short half-life, and is hydrogen bonded *in vivo* to poly(A)-terminated RNAs in the cytoplasm of cultured mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1508.
17. Serdobova I.M., Kramerov D.A. (1998) Short retroposons of the B2 superfamily: evolution and application for the study of rodent phylogeny. *J. Mol. Evol.* **46**, 202.
18. Krayev A.S., Markusheva T.V., Kramerov D.A., Ryskov A.P., Skryabin K.G., Bayev A.A., Georgiev G.P. (1982) Ubiquitous transposon-like repeats B1 and B2 of the mouse genome: B2 sequencing. *Nucl. Acids Res.* **10**, 7461.
19. Quentin Y. (1994) Emergence of master sequences in families of retroposons derived from 7sl RNA. *Genetica.* **93**, 203.
20. Vassetzky N.S., Kramerov D.A. (2013) SINEBase: a database and tool for SINE analysis. *Nucl. Acids Res.* **41**, D83.
21. Kim J., Martignetti J.A., Shen M.R., Brosius J., Deininger P. (1994) Rodent BC1 RNA gene as a master gene for ID element amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 3607.
22. Martignetti J.A., Brosius J. (1993) BC200 RNA: a neural RNA polymerase III product encoded by a monomeric Alu element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 11563.
23. Parrott A.M., Tsai M., Batchu P., Ryan K., Ozer H.L., Tian B., Mathews M.B. (2011) The evolution and expression of the snaR family of small non-coding RNAs. *Nucl. Acids Res.* **39**, 1485.
24. Ishida K., Miyauchi K., Kimura Y., Mito M., Okada S., Suzuki T., Nakagawa S. (2015) Regulation of gene expression via retrotransposon insertions and the non-coding RNA 4.5S RNA H. *Genes Cells.* **20**, 887.
25. Tatosyan K.A., Kramerov D.A. (2016). Heat shock increases lifetime of a small RNA and induces its accumulation in cells. *Gene.* **587**, 33.
26. Reynolds V.L., DiPietro M., Lebovitz R.M., Lieberman M.W. (1987). Inherent tumorigenic and metastatic properties of rat-1 and rat-2 cells. *Cancer Res.* **47**, 6384.
27. Yushok W.D., Mallalieu L.J., Batt W.G. (1956) Properties of Krebs 2 ascites carcinoma cells: weight, size, specific gravity, and protein content. *J. Franklin Inst.* **262**, 507.
28. Chomczynski P., Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156.
29. Koval A.P., Gogolevskaya I.K., Tatosyan K.A., Kramerov D.A. (2012) Complementarity of end regions increases the lifetime of small RNAs in mammalian cells. *PLoS One.* **7**, e44157.
30. Bachvarova R. (1988) Small B2 RNAs in mouse oocytes, embryos, and somatic tissues. *Dev. Biol.* **130**, 513.
31. Ro-Choi T.S., Moriyama Y., Choi Y.C., Busch H. (1970) Isolation and purification of a nuclear 4.4S ribonucleic acid of the Novikoff hepatoma. *J. Biol. Chem.* **245**, 1970.

4.5SI and 4.5SH RNAs: Expression in Various Organs of Rodents, Abundance and Distribution in Cell

K. A. Tatosyan, A. P. Koval, I. K. Gogolevskaya, D. A. Kramerov*

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

*e-mail: kramerov@eimb.ru

Here we present the study of structure, function and cellular physiology of small RNAs 4.5SH and 4.5SI which were among the first discovered and sequenced small RNAs. The genes encoding these RNAs are evolutionary related to the short interspersed elements (SINEs). Each of these molecules is about 100 nt in length, both of them are synthesized by the RNA-polymerase III and are present in cells of the rodents. However, the nucleotide sequences of these two RNAs differ. The structures of genes encoding these RNAs and their half-life times within the cell significantly differ as well. Here we show that the levels of 4.5SI RNA in different organs of various animals (mouse, rat and hamster) are quite similar, while the abundance of 4.5SH RNA varies. Both 4.5SH and 4.5SI RNAs demonstrate predominantly nuclear localization that is accompanied by detectable presence in cytoplasm. Determination of amounts of RNA molecules per cell showed that the levels of 4.5SH and 4.5SI RNAs are comparable to that of U1 RNA. This quantitative study of 4.5SH and 4.5SI RNAs levels allowed us to sort out a number of previously noted contradictions in the data concerning these RNA species.

Keywords: 4.5SH RNA, 4.5SI RNA, small non-coding RNA, SINE, rodents