

Секвенирование и анализ РНК изолированных ядрышек клеток HeLa

Научный руководитель – Шеваль Евгений Валерьевич

Коновалова Евгения Владимировна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: konzhenya@mail.ru

Ядрышко – немембранный компартмент ядра, главными функциями которого является синтез и процессинг прерибосомных РНК и сборка прерибосом. Ядрышко формируется ядрышковыми организаторами – участками ДНК, содержащими кластеры рРНК генов [1, 2]. Помимо своей основной функции, ядрышко играет важную роль в поддержании архитектуры генома и его стабильности, а также участвует в регуляции многих клеточных процессов, таких как, например, дифференцировка и ответы на стресс различной природы [1, 3]. В связи многообразием функций ядрышка его транскриптом представляет интерес: он может отражать структурные или функциональные аспекты ядрышковой организации.

Целью данной работы является анализ RNA-seq данных фракции изолированных ядрышек клеток HeLa в сравнении с тотальной фракцией. Задачами работы были анализ уникально картированных прочтений с точки зрения их различных характеристик, сборку новых транскриптов, а также оценку экспрессии с повторяющихся последовательностей как множественно картированных прочтений.

Для анализа была собрана тотальная РНК с рРНК деплецией из ядрышковой и тотальной фракций клеточной линии HeLa и проведен RNA-seq по протоколу Illumina TrueSeq с получением одноконцевых цепь-специфических прочтений. Для каждой фракции было отсеквенировано 2 биологические реплики. При помощи BBDuk из BBTools были проведены фильтрация чтений по качеству ($q \geq 30$) и триммирование адаптеров. После этого прочтения были картированы на референсный геном Homo sapiens (T2T-CHM13v2.0) при помощи HISAT2.

Экспрессии генов были подсчитаны при помощи HTSeq с использованием аннотации RefSeq. Анализ дифференциальной экспрессии генов проводился при помощи DESeq2. Гены признавались дифференциально экспрессируемыми в случае, если их поправленный p-value (поправка на множественное тестирование Беньямини-Хохберга) был меньше, чем 0.05, и кратное изменение экспрессии между ядрышковой и тотальной фракциями составляло не менее 2.

Характер картирования на референсный геном отличается между РНК тотальной и ядрышковой фракций: доля прочтений, выравниваемых на непроаннотированные участки генома, значительно выше для ядрышковой фракции.

Анализ дифференциально экспрессируемых генов показал, что среди генов, продуктами которых обогащено ядрышко, широко представлены гены длинных некодирующих РНК. Также эти гены отличаются более высокими GC-содержанием и долей интронных прочтений по сравнению со всеми остальными генами. Анализ перепредставленности, проводимый при помощи одностороннего теста Фишера, показал ассоциацию рассматриваемых генов с доменами, ассоциированными с ядрышком и ламиной. Также на основе рассмотрения R/G-бэндов, A/B-компарментов и состояний ChromHMM была показана ассоциация рассматриваемых генов с гетерохроматином.

Таким образом, на основе анализа уникально картированных прочтений можно выделить характеристики, отличающие категорию РНК, обогащенных в ядрышке, от всех

РНК клетки. Необычный характер картирования прочтений, полученных из изолированных ядрышек, на референсный геном показывает необходимость дальнейшего анализа множественно картированных прочтений и новых транскриптов.

Источники и литература

- 1) Bersaglieri, C., & Santoro, R. (2019). Genome Organization in and around the Nucleolus. *Cells*, 8(6), 579.
- 2) Henras, A. K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M. F., Chakraborty, A., & Gleizes, P. E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 6(2), 225–242.
- 3) Lee, T.A., Han, H., Polash, A. et al. The nucleolus is the site for inflammatory RNA decay during infection. *Nat Commun* 13, 5203 (2022).