

Очкасова Анастасия Сергеевна

---

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД**  
**об основных результатах выполненной**  
**научно-квалификационной работы**

Неканонические функции рибосомного белка S3 в составе  
рибосом

Направление подготовки

04.06.01 Химические науки

Направленность

02.00.10 Биоорганическая химия

Работа выполнена в лаборатории структуры и функции рибосом Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Научный руководитель:

**Грайфер Дмитрий Маратович**

Доктор химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность.

В настоящее время известно, что многие рибосомные белки (РБ) не только участвуют в трансляции в качестве компонентов рибосомы, но также вовлечены в различные клеточные процессы, помимо синтеза белка (так называемые «внерибосомные», или «нетрансляционные» функции) [1-3], взаимодействуя с нуклеиновыми кислотами и другими белками. Однако такие функции найдены в подавляющем большинстве случаев для изолированных (находящихся вне рибосомы) РБ. Известны только два эукариотических рибосомных белка, RACK1 и L13a, которые обладают внерибосомными функциями, находясь при этом в составе рибосомной субчастицы. Белок RACK1, будучи в составе рибосомы, осуществляет её связывание с другими белками, такими как киназы и рецепторы мембраны, таким образом вовлекая рибосому в сигнальные пути. РБ L13a регулирует синтез белка церулоплазмينا: в ответ на специфический сигнал он фосфорилируется и покидает рибосому, связываясь с 3'-нетранслируемой областью мРНК, кодирующей церулоплазмин, а также с мРНК киназ DAPK и ZIPK и таким образом останавливая трансляцию данного белка [1-3]. РБ uS3 эукариот является одним из ключевых участников процесса трансляции, поскольку он принимает непосредственное участие в формировании мРНК-связывающего центра рибосомы и во взаимодействиях с факторами инициации трансляции; функции этого белка как компонента рибосомы хорошо изучены. Вне рибосомы этот белок проявляет ряд активностей, не связанных с трансляцией, например, он способен регулировать транскрипцию генов, находящихся под контролем транскрипционного фактора NF-κB, а также участвовать в репарации ДНК [4]. Многочисленные неканонические функции рибосомных белков семейства uS3 являются предметом изучения уже более 20 лет [для обзора см. 2-4], и до сих пор появляются работы, открывающие новые, ранее неизвестные функции этих белков, не связанные напрямую с трансляцией [5, 6]. При всем этом, роль РБ uS3 в репарации во многом остается неясной, например, неизвестно, обладает ли белок активностью ферментов репарации, будучи в составе рибосомы; неясно, какие последовательности ДНК или структурные мотивы предпочтительно взаимодействуют с белком uS3, и непонятно, где и когда этот рибосомный белок реально участвует в репарации в клетке. Понимание молекулярных основ участия РБ uS3 в контроле качества нуклеиновых кислот имеет фундаментальное значение, поскольку известно, что нарушения в системах репарации ДНК и контроля качества мРНК являются причиной многих серьезных патологий.

**Целью** данной работы являлось исследование функций рибосомного белка uS3 в составе малой субчастицы рибосом человека и в свободном виде, связанных с его возможным участием в процессах репарации повреждений в ДНК и контроля качества мРНК.

### Задачи:

1. Выяснить, способен ли РБ uS3, находящийся в составе малой субчастицы рибосомы человека, проявлять активность ферментов репарации ДНК, в частности, взаимодействовать с апурин-апиридиновыми (AP-) сайтами и другими поврежденными нуклеотидами, образующимися в результате окислительного стресса;
2. Идентифицировать участки связывания этого белка на геномной ДНК *in vivo* с использованием метода ChIP-Seq на клетках HEK293 и проанализировать данные на предмет выявления консенсусных последовательностей ДНК в участках связывания РБ uS3;
3. Изучить зависимость сродства РБ uS3 к одноцепочечным ДНК (оцДНК) и его способности расщеплять ДНК по AP-сайту от наличия в них последовательностей, выявленных в пункте 2;
4. Выяснить, способен ли РБ uS3 в составе ядерных пре-40S субчастиц

- сшиваться с модельными оцДНК, содержащими AP-сайт;
5. Установить, может ли РБ uS3, находящийся в составе малой субчастицы рибосомы человека, потенциально участвовать в контроле качества мРНК через взаимодействия с AP-сайтами в ее составе.

### **Научная новизна и практическая ценность.**

В представленной работе впервые проведен сравнительный анализ взаимодействия оц- и дц-ДНК, содержащей различные окислительные повреждения, с РБ uS3 в составе 40S субчастиц и изолированным гес-uS3. Показано, что белок может взаимодействовать только с AP-сайтами в ДНК, причем гес-uS3 расщепляет оц- ДНК по AP-сайту намного эффективнее, чем дц-ДНК, а uS3 в составе 40S субчастиц полностью лишен AP-лиазной активности. Показано, что РБ uS3 в обеих формах способен сшиваться с AP-сайтами в оц-ДНК; в случае дц-ДНК в сшивке может участвовать только гес-uS3. Установлен фрагмент рибосомо-связанного РБ uS3, сшивающийся с AP-сайтами в ДНК, и определены участки геномной ДНК человека, взаимодействующие с РБ uS3 *in vivo*. Обнаружено, что в этих взаимодействиях участвует РБ uS3 в свободном состоянии, а не в составе пре-40S субчастицы, и изучено влияние наличия в модельной ДНК последовательностей, характерных для участков связывания белка *in vivo*, на родство гес-uS3 к ДНК и его AP-лиазную активность. Показано, что в комплексе 80S рибосом, где мРНК фиксирована в мРНК-связывающем канале взаимодействием с тРНК в Р-участке, AP-сайт на 3'-конце мРНК, находящемся вне рибосомы, способен сшиваться с экспонированным на поверхности 40S субчастицы пептидом РБ uS3 вблизи участка входа мРНК в рибосому. С учетом того, что комплексы рибосом с «застрявшей» мРНК в клетке деградируют по так называемому механизму «no-go decay», полученные результаты являются первым свидетельством вероятного участия РБ uS3 в составе 40S субчастицы в контроле качества мРНК. В результате клетка может освобождаться от молекул мРНК, содержащих окислительные повреждения, наличие которых сопряжены с многими патологиями.

### **Апробация работы.**

Результаты работы были представлены на VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 12.07-17.07.2015), международной конференции «Химическая биология-2016», посвященная 90-летию юбилею академика Д.Г.Кнорре (Новосибирск, 24.07-29.07.2016), II Всероссийской конференции с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, 18.06-23.06.2017), международной научной конференции «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Москва, 18.09-22.09.2017), XVIII Всероссийском симпозиуме «Структура и функции клеточного ядра» (Санкт-Петербург, 16.10-18.10.2018) и 44-ом международном конгрессе «FEBS-2019» (Краков, 6.07-11.07.2019).

### **Вклад автора.**

Автором самостоятельно выделены 40S субчастицы рибосом из плаценты человека, наработан рекомбинантный рибосомный белок uS3 человека, проведены эксперименты по сшивкам модельных ДНК с рекомбинантным белком uS3 и с белком uS3 в составе 40S субчастиц, по определению способности белка и субчастиц расщеплять ДНК по AP-сайтам, по сшивкам модельных мРНК и оц-ДНК с белком uS3 в составе 40S субчастиц, 80S рибосом и пре-40S субчастиц из ядерного экстракта.

Выделение ядерного экстракта проводил Иванов А.В.

Пробоподготовка образцов для секвенирования библиотек выполнена Гопаненко А.В.

Секвенирование библиотек и анализ результатов секвенирования было проведено сотрудниками ЦПК «Геномика» СО РАН.

### **Публикации.**

По результатам данного исследования опубликовано 8 работ, из них 2 статьи в рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК; 1 статья принята в печать в рецензируемое издание рекомендованного перечня ВАК.

### **Благодарности.**

Автор выражает признательность научному руководителю Грайферу Д.М., зав. лабораторией структуры и функции рибосом (ЛСФР) ИХБФМ СО РАН Карповой Г.Г., всем сотрудникам ЛСФР, а также лично Иванову А.В., Гопаненко А.В., Жаркову Д.О.

Аналоги мРНК были получены Мещаниновой М.И в Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН.

В работе были использованы ресурсы Центра коллективного пользования «Геномика» СО РАН под руководством Кабилова М.Р.

Исследование поддержано грантами РФФИ № 16-04-00241, № 19-04-00098, частично ПФНИ ГАН на 2017-2020 гг. (базовый проект № VI.57.1.2, 0309-2016-0001) и комплексной программой СО РАН (проект № П.2П/VI.57-3 (0309-2015-0024).

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Для анализа модельных ДНК или мРНК, несущих окислительные повреждения, и белков, сшитых с ними, использовали стандартный набор методов молекулярной биологии. Этот набор включает введение радиоактивной метки на 5'-конец ДНК или РНК, гель-электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот и сшитых с ними белков и их последующую детекцию с помощью окрашивания и/или радиоавтографии, либо детекцию белка с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к данному белку.

#### **Выделение рибосомных субчастиц 40S, 60S и пре-40S**

40S субчастицы рибосом выделяли из незамороженной плаценты человека согласно описанной ранее методике [7] и хранили в жидком азоте в растворе в виде небольших аликвот, которые размораживали только один раз. Непосредственно перед использованием субчастицы реактивировали инкубацией в течение 10 мин при 37°C в буфере, содержащем 120 мМ KCl, 13 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.6 мМ ЭДТА, 20 мМ HEPES-KOH, pH 7.5, обычно используемом для связывания рибосом с тРНК и аналогами мРНК (см., например, 8). Пре-40S субчастицы были выделены из ядер клеток НЕК293Т по методике, описанной в работе [9]. Ядерный лизат, содержащий пре-40S субчастицы, центрифугировали в градиенте концентрации; пре-40S субчастицы осаждали из соответствующих фракций высокоскоростным центрифугированием (48000 об/мин, 17 ч, ротор Beckman SW60).

#### **Выделение рекомбинантного РБ uS3**

Для получения рекомбинантного рибосомного белка uS3 человека (rec-uS3), содержащего гексагистидиновый хвост на N-конце, компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) трансформировали вектором pET-15b, содержащим кДНК uS3 человека (получен Малыгиным А.А., ИХБФМ СО РАН). Rec-uS3 выделяли стандартным способом – с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе, и хранили в растворе, содержащем 50% глицерин, при -20°C. Все процедуры проводили согласно ранее описанным методикам [10].

#### **Получение олигонуклеотидов, содержащих AP-сайт и другие модифицированные звенья**

Модельные ДНК – олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие 8-оксогуанин или

другие модифицированные звенья, были синтезированы из коммерчески доступных фосфорамидитов, очищены и охарактеризованы в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН. Очистку олигомеров проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ и последующего электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 8М мочевины. В очищенные модельные ДНК вводили метку  $^{32}\text{P}$  по 5'-концу с помощью T4-полиинуклеотидкиназы и  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ .

Для получения модельных одноцепочечных (оц) AP-ДНК соответствующий меченый олигомер, содержащий остаток дезоксиуридина, обрабатывали урацил-ДНК-гликозилазой *E. coli* непосредственно перед использованием. Для получения модельной двуцепочечной (дц) AP-ДНК меченый олигомер, содержащий остаток дезоксиуридина, отжигали с комплементарным ему олигомером, и затем полученный ДНК-дуплекс обрабатывали урацил-ДНК-гликозилазой (см. выше). Олигорибонуклеотид AAUAAAUC, окисленный перйодатом натрия до диальдегида по 3'-концевой рибозе, получали, как описано ранее [11].

Синтетические мРНК, содержащие фотолабильную 2-нитробензильную группу на 3'-концевом остатке рибозы, лишенном гетероциклического основания, были получены в лаборатории химии РНК Мещаниновой М.И. Их мечение  $^{32}\text{P}$  по 5'-концу проводили, как описано выше. Защитную группу с AP-сайта на 3'-конце аналога мРНК удаляли облучением мягким УФ светом ( $\lambda > 290 \text{ nm}$ ) в течение 2 минут.

#### **Получение комплексов рибосом с аналогами мРНК или оц-ДНК**

Сшивку оц-AP-ДНК и дц-AP-ДНК ( $1 \times 10^{-6}$  мкМ) с 40S субчастицами рибосом ( $3 \times 10^{-6}$  М) проводили инкубацией этой смеси в 6 мкл буфера А при 25°C в течение 1 ч с последующим добавлением  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  до конечной концентрации 5 мМ и инкубацией в течение 1 ч при 37°C.

40S субчастицы с uS3, сшитым с 3'-диальдегидным производным нонарибонуклеотида AAUAAAUC, получали путем инкубации субчастиц ( $18 \times 10^{-7}$  М) с производным РНК (18 или  $28 \times 10^{-6}$  М) в буфере А с последующей обработкой  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , как описано выше.

Степень связывания меченых аналогов мРНК с 80S рибосомами определяли с помощью фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах. Радиоактивность фильтров измеряли по Черенкову и рассчитывали степень связывания (моль аналога мРНК на моль рибосом), учитывая удельную радиоактивность меченого аналога мРНК.

#### **Получение комплексов гес-uS3 с оц-ДНК и дц-ДНК определение уровня связывания ДНК**

Сшивку гес-uS3 с оц- и дц-AP-ДНК проводили инкубацией белка ( $12 \times 10^{-7}$  М) с  $1 \times 10^{-7}$  М оц или дц субстрата в 20 мкл буфера, содержащего 25 мМ HEPES-KOH (pH 7.5), 72 мМ KCl, 4.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0.6 мМ ДТТ, 0.6 мМ PMSF и 30% глицерин, в течение 1 ч при 25°C с дальнейшим добавлением  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , как описано выше.

Уровень связывания ДНК-олигомеров с гес-uS3 тестировали независимо двумя методами – с помощью фильтрации на нитроцеллюлозных фильтрах и с помощью метода задержки в геле, проводя электрофорез в нативных условиях при 4°C. В последнем случае анализ проводили с помощью электрофореза в ПААГ в условиях сохранения комплексов с последующей автордиографией гелей. Для количественной обработки проводили денситометрирование автордиограмм с использованием Molecular Imager FX Pro (Bio-Rad).  $K_d$  рассчитывали из данных изотерм связывания олигомеров с белком, полученных методом задержки в геле. Среднее значение  $K_d$  для каждой модельной ДНК рассчитывали на основании данных не менее трех независимых серий экспериментов.

#### **Сшивка белка uS3 в составе 40S субчастиц и гес-uS3 с оц-ДНК, несущими AP-сайты**

Для ковалентного присоединения оц-AP-ДНК или дц-AP-ДНК к остаткам лизина или аргинина белков через образование основания Шиффа модельные ДНК инкубировали с гес-

uS3 или 40S субчастицами рибосом человека с последующей обработкой реакционной смеси цианоборгидридом натрия, который восстанавливает основание Шиффа и делает присоединение модельных ДНК к белкам необратимым. Затем в экспериментах с гес-uS3 белок осаждали ацетоном, а в опытах с 40S или пре-40S субчастицами рибосомный материал осаждали этанолом. Осадки растворяли в стандартном буфере, содержащем SDS, для последующего разделения белков и продуктов их сшивки с ДНК электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS (SDS-ПААГ). Для проявления немодифицированных белков гели окрашивали кумасси, а для детекции полос белков, сшитых с меченой ДНК, высушенные гели радиоавтографировали. Сшивание ДНК с белком uS3 подтверждали с помощью вестерн-блоттинга. Для этого белки после их разделения с помощью SDS-ПААГ переносили с геля на нитроцеллюлозную мембрану с использованием стандартной процедуры электропереноса, и полосы, содержащие белок uS3, проявляли с помощью коммерческих специфических антител против белка uS3 кролика, как описано ранее [11].

Для того чтобы выяснить, препятствует ли сшивка диальдегидного производного олигорибонуклеотида AAUAAAUUC с пептидом 55-64 белка uS3 в составе 40S субчастицы сшивке модельных ДНК, получали соответствующий продукт сшивки, как описано ранее [11]. При этом использовали немеченое производное нонарибонуклеотида. Модифицированные субчастицы осаждали этанолом и сразу же использовали в экспериментах по ковалентному присоединению меченой оц-АР-ДНК, которые проводили, как описано выше. Анализ продуктов присоединения модельной ДНК к uS3 проводили с помощью SDS-ПААГ и последующей радиоавтографии и иммуноблоттинга (см. выше). Параллельно в контрольных экспериментах такие же процедуры проводили с 40S субчастицами, инкубированными с немодифицированным нонамером AAUAAAUUC и без нонамера. Аналогичный набор экспериментов проводили с гес-uS3, взятым вместо 40S субчастицы.

#### **Сшивка белка uS3 в составе 40S субчастиц аналогами мРНК, несущими АР-сайты**

Комплексы аналогов мРНК с рибосомами получали, как описано выше; затем проводили деблокирование АР-сайтов в составе мРНК облучение реакционных смесей мягким УФ-светом с длиной волны >290 нм в течение 2 мин, в условиях, описанных ранее [8]. Затем проводили такие же обработки, как описано выше для комплексов рибосом с АР-сайт-содержащей оц-ДНК.

#### **Анализ расщепления аналогов ДНК по АР-сайтам рекомбинантным белком uS3 и белком uS3 в составе рибосомы**

Для анализа эффективности расщепления модельных 5'-меченых оц АР-ДНК белком гес-uS3 или 40S субчастиц ДНК инкубировали при 37°C с белком или субчастицами при постоянной начальной концентрации АР-ДНК ( $5 \times 10^{-7}$  М) и времени инкубации (1 ч) и переменной концентрации белка или 40S субчастиц. Продукты расщепления модельных АР-ДНК разделяли электрофорезом в ПААГ в присутствии мочевины с последующей радиоавтографией и денситометрической обработкой радиоавтографов для определения степени расщепления АР-ДНК. Из полученных в результате кривых зависимости степени расщепления АР-ДНК от концентрации гес-uS3 (или 40S субчастиц) в качестве характеристики эффективности расщепления определяли концентрацию, при которой расщеплению подвергалось 50% АР-ДНК (С-50). В расчет брали средние значения С-50, определенные для каждой модельной ДНК из трех независимых серий экспериментов.

#### **Определение участков связывания геномной ДНК человека с белком uS3 *in vivo***

Чтобы определить участки связывания рибосомного белка uS3 на геномной ДНК *in vivo*, использовали метод ChIP-seq, примененный к клеткам НЕК293 в соответствии с описанной методикой [12]. Суть метода состоит в обработке клеток формальдегидом для образования сшивок ДНК с белками, последующей фрагментации ДНК ультразвуком и выделении сшитых с белком фрагментов ДНК с помощью иммунопреципитации. Далее ковалентные связи между

белком и ДНК разрушают нагреванием, и на основе выделенных фрагментов получают ДНК-библиотеки для их последующего глубокого секвенирования. Для иммунопреципитации использовали специфические антитела против uS3 кролика, конъюгированные с Protein G Dynabeads (Thermo Fischer Scientific). ДНК-библиотеки получали с использованием 5500 SOLiD Fragment Library Core Kit (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Секвенирование ДНК-библиотек проводили на SOLiD 5500xl platform (Life Technologies) в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН. В результате получали риды длиной 50 bp, и анализировали данные с помощью программного обеспечения CLC GW 9.5 (Qiagen). После удаления адаптеров и контроля качества риды картировали на версию генома hg38. В дальнейшем анализе использовали пики экспериментальных образцов, не перекрывающиеся с пиками, полученными в контрольном эксперименте без антител. Идеограммы хромосом получали с использованием Genome Decoration Page ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp)). Данные о риды ChIP-seq, полученные в настоящей работе, депонированы в GenBank (study accession PRJNA310826, experiment accessions SRX2312326 - SRX2312330).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

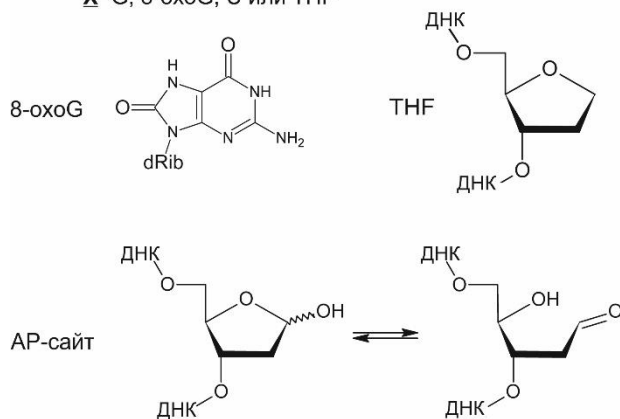
### РБ uS3 в составе 40S субчастицы может ковалентно сшиваться с AP-сайтом оцДНК

На первом этапе работы было исследовано, способен ли РБ uS3 человека в составе рибосомы ковалентно сшиваться с AP-сайтом в ДНК подобно тому, как это было показано ранее в случае изолированного белка [13]. Для этой цели была использована модельная 23-звенная одноцепочечная (оц) ДНК, несущая фрагменты, имитирующие различные окислительные повреждения (*рис. 1*).

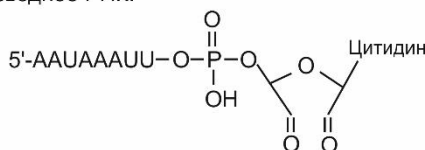
оцДНК: 5'-CTCTCCCTTCXCTCCTTTCTCT-3'

кДНК: 5'-AGAGGAAAGGAGCGAAGGGAGAG-3'

X=G, 8-охоG, U или THF



Окисленное производное РНК:

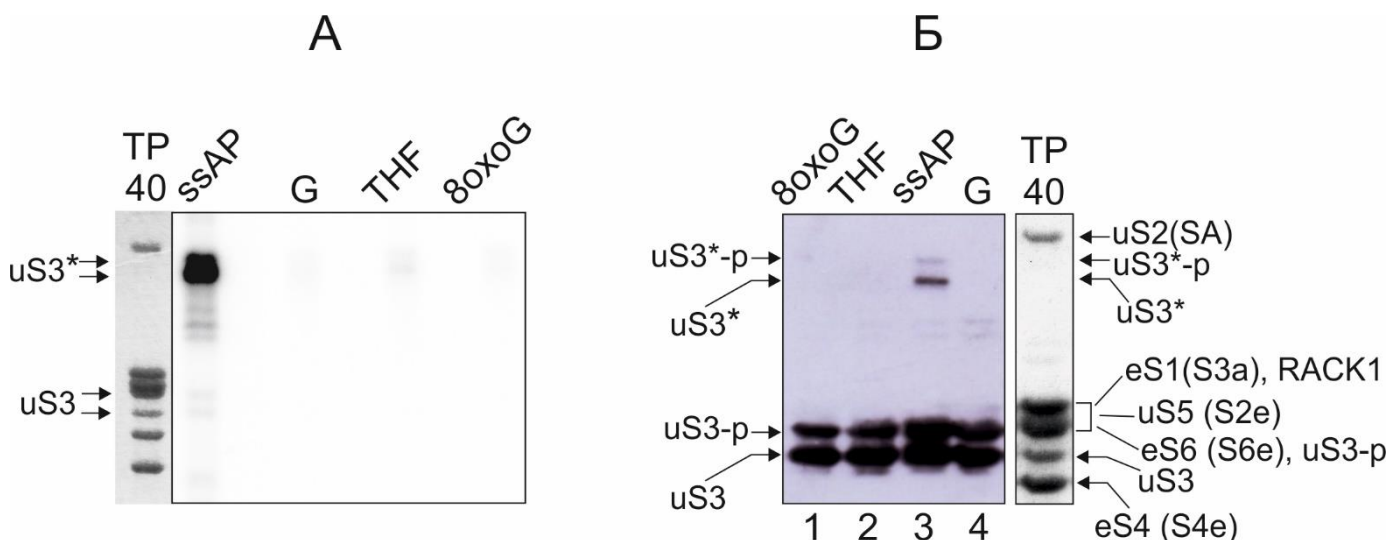


**Рис. 1.** Нуклеиновые кислоты и их производные, используемые в этой части работы. оцДНК, одноцепочечный олигодезоксирибонуклеотид (23 нуклеотидных основания); кДНК, олигодезоксинуклеотид длиной 23 нт, комплементарный оцДНК. THF, тетрагидрофуран; 8-охоG, 8-оксогуанин; AP-сайт представлен в равновесии между гидроксильной и альдегидной формами (в природе равновесие преимущественно сминуто в сторону гидроксильной формы).

Радиоавтограф геля, представленный на *рис. 2А*, отображает результаты сшивки 40S субчастиц с мечеными 23-мерными оцДНК, несущими различные повреждения. Видно, что сшивка РБ происходит только с оцДНК, содержащей AP-сайт (*рис. 2А*). Иммуноблоттинг с использованием антител против белка uS3 (*рис. 2Б*) выявил двойную полосу на дорожке 3, чье

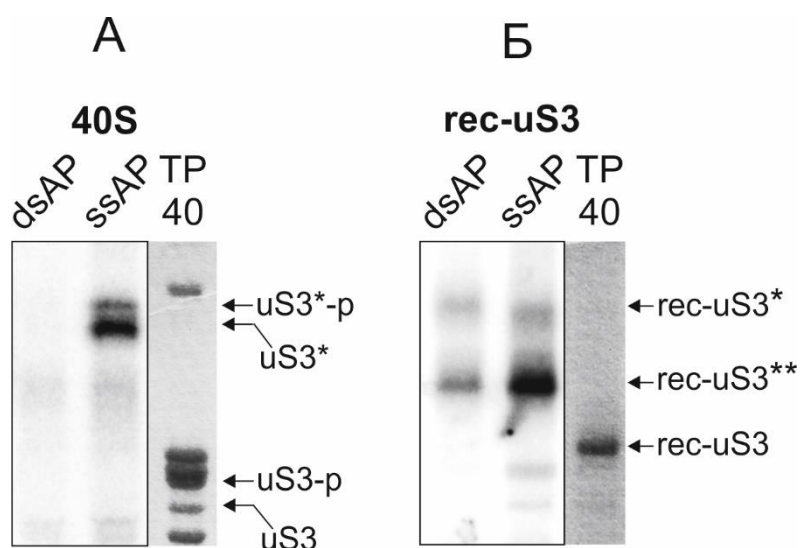


положение соответствует положению полосы на радиоавтографе (рис. 2А), следовательно, сшивка оцДНК происходит именно с РБ uS3 через AP-сайт. Белок проявляется в виде двойной полосы потому, что в составе 40S субчастицы он существует в двух формах – фосфорилированной и дефосфорилированной, которые имеют разную электрофоретическую подвижность [11]. Оказалось, что в сшивке предпочтительно участвует белок в дефосфорилированной форме (рис. 2Б, дорожка 3), поскольку нижняя полоса, соответствующая белку в этой форме, более яркая по сравнению с верхней, соответствующей фосфорилированной форме белка. Модельные ДНК с другими вставками, моделирующими окислительные повреждения – 8-оксогуанин или остаток тетрагидрофурана, сшивки с белком uS3 не образуют, поскольку на радиоавтографе не наблюдается никаких полос, кроме полос, соответствующих сигналам сшитого uS3, выявленных с помощью иммуноблотинга (рис. 2А).



**Рис. 2.** Идентификация сшивок модельных оц-ДНК с рибосомным белком uS3 в составе 40S субчастицы. (А) Анализ рибосомных белков 40S субчастиц, инкубированных с 5'-<sup>32</sup>Р-мечеными производными ДНК с помощью SDS-ПААГ. Радиоавтограф геля. (Б) Анализ рибосомных белков 40S субчастиц, инкубированных с производными ДНК, иммуноблотингом с использованием специфических антител против uS3 кролика. Дорожки «ТР40» соответствуют белкам 40S субчастицы, разделенных в SDS-ПААГ и окрашенных Coomassie R250. Полосы, соответствующие рибосомным белкам, подписаны на рисунке; полосы, соответствующие фосфорилированному белку uS3, обозначены uS3-p; полосы, соответствующие сшитому белку uS3, обозначены звездочками. Обозначения 8oxoG, THF, ssAP and G соответствуют опытам с 40S субчастицами, инкубированными с оц-ДНК, содержащими остатки, соответственно, с 8-оксогуанина, тетрагидрофурана, AP-сайт или немодифицированный G.

## Рибосомо-связанный uS3 и свободный uS3 взаимодействуют с AP-сайтом по-разному



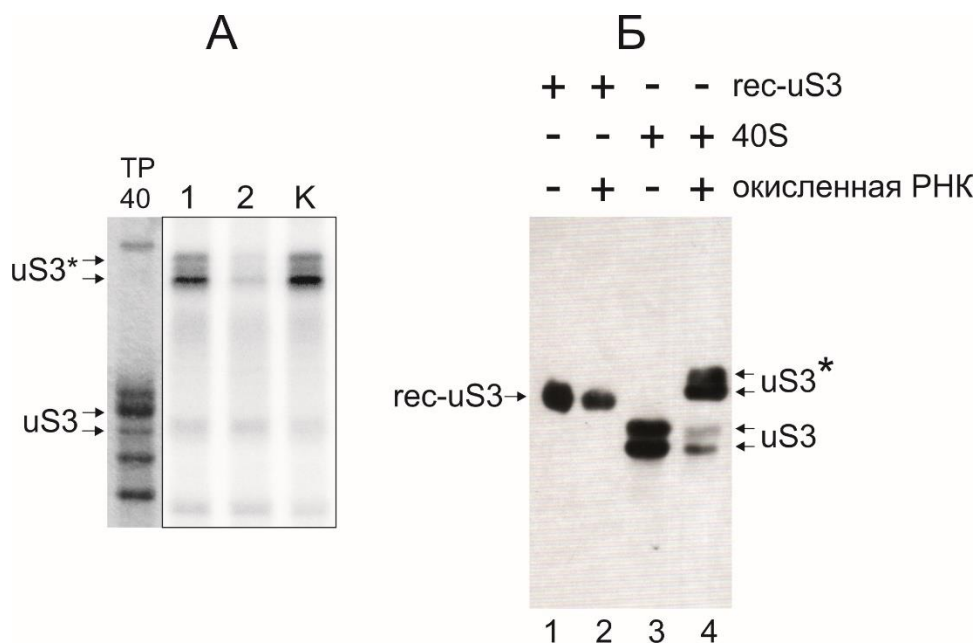
**Рис. 3.** Анализ сшивки 5'-<sup>32</sup>P-меченых дц-АР-ДНК и оц-АР-ДНК (dsAP и ssAP, соответственно), с белком uS3 в составе 40S субчастицы рибосом человека (А) и с rec-uS3 (Б). Радиоавтограф геля. rec-uS3\*\* – рекомбинантный РБ uS3, сшитый с фрагментом ДНК, оставшимся после ее расщепления по АР-сайту, rec-uS3\* – рекомбинантный РБ uS3, сшитый с полноразмерной 23-мерной ДНК. Полосы, соответствующие фосфорилированному белку uS3, обозначены uS3-p; полосы, соответствующие сшитому белку uS3, обозначены звездочками. Слабые полосы, наблюдаемые ниже полос сшитого белка uS3, не воспроизводимы и не обсуждаются.

Сравнительный анализ способности рекомбинантного рибосомного белка uS3 человека (rec-uS3) и белка uS3 в составе 40S субчастиц рибосом человека сшиваться с АР-сайтом оц- и дцДНК был проведен с использованием <sup>32</sup>P-меченых модельных ДНК и последующего разделения сшитых белков гель-электрофорезом в присутствии SDS. Оказалось, что, в отличие от белка в составе субчастицы (рис. 3А), rec-uS3 способен сшиваться как с оц-АР-ДНК, так и с дц-АР-ДНК, хотя сшивки с последней происходят намного менее эффективно (рис. 3Б). Кроме того, в результате сшивки rec-uS3 с АР-ДНК образуются два продукта, один из которых соответствует белку, сшитому с полноразмерной АР-ДНК (как и в случае сшивки с белком uS3 в составе 40S субчастицы на рис. 3А), а второй – белку, сшитому с 5'-концевым 10-звенным фрагментом АР-ДНК, образующимся после ее расщепления по АР-сайту (рис. 3Б). При этом второй продукт сшивки является основным, поскольку количественная обработка результатов, приведенных на рис. 3Б показала, что на его долю приходится более 75% сшивок белка с АР-ДНК. Таким образом, rec-uS3 и uS3 в составе 40S субчастиц сшиваются с АР-ДНК по-разному. Результаты также указывают на то, что РБ uS3 в составе рибосомы не расщепляет ДНК по АР-сайту.

### uS3 в составе рибосомы сшивается с АР-сайтом оцДНК через КН-домен

Для того чтобы понять, через какой участок рибосомо-связанного белка uS3 происходит его сшивка с АР-сайтом ДНК, использовали производное олигорибонуклеотида с 3'-концевой рибозой, окисленной до диальдегида, которое, согласно результатам наших предыдущих работ [11], сшивается с пептидом 55-64 в КН-доме (англ. *K homology domain*) белка uS3, экспонированным на поверхности субчастицы. КН-домен – структурный мотив, присутствующий во многих нерибосомных белках, который, как полагают, отвечает за взаимодействия белков с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами. Оказалось, что блокирование пептида 55-64 uS3 с помощью его сшивки с производным олигорибонуклеотида лишает 40S субчастицу способности сшиваться с АР-ДНК (рис. 4А, дорожка 2). На основании этих результатов сделан вывод о том, что участок сшивки АР-ДНК находится во фрагменте 55-64 или прилегает к нему.

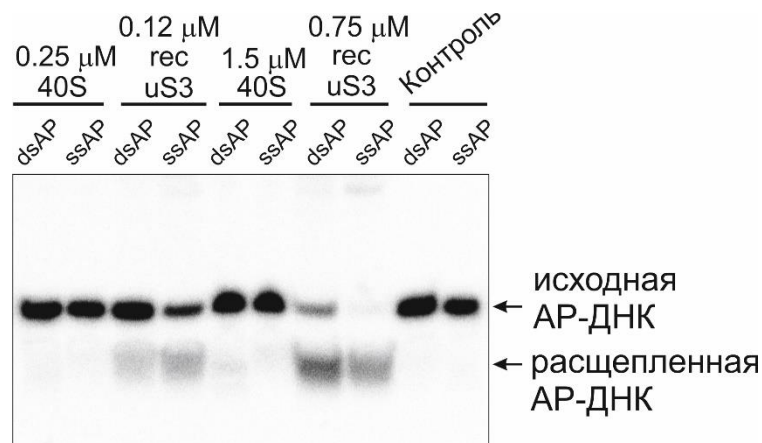
Наконец, по результатам иммуноблотинга на *рис. 4Б* с использованием антител против белка uS3, установлено, что *rec-uS3*, в отличие от белка в составе 40S субчастицы, не сшивается своим КН-доменом с производным олигорибонуклеотида с окисленной 3'-концевой рибозой, поскольку в результате инкубации *rec-uS3* с производным на мембране не наблюдается никаких полос, которые можно было бы отнести к модифицированному белку (*рис. 4Б, дорожка 2*).



**Рис. 4.** Сшивка 3'-диальдегидного производного AAUAAAUUC («окисленная РНК») с белком uS3 в составе 40S субчастицы (А) и с *rec-uS3* (Б), и влияние производного, сшитого с белком uS3 в составе 40S субчастицы, на его способность сшиваться с оц-АР-ДНК. Панель А, радиоавтограф геля после SDS-ПААГ-разделения белков, выделенных из 40S субчастиц, инкубированных с 5'-<sup>32</sup>P-меченой оц-АР-ДНК в отсутствие производного гептарибонуклеотида (1), из субчастиц, предварительно инкубированных с этим производным (2) и из субчастиц, предварительно инкубированных с немодифицированным рибонуклеотидом (3). Панель Б, анализ иммуноблотингом *rec-uS3* (дорожки 1 и 2) и белков, выделенных из 40S рибосом, инкубированных с производным AAUAAAUUC (дорожки 2 и 4). Дорожки 1 и 3 соответствуют контрольным *rec-uS3* и 40S рибосомам, инкубированным в отсутствие производного гептарибонуклеотида соответственно. Звездочкой обозначены полосы, соответствующие сшитому РБ uS3. Видно, что АР-ДНК сшивается только с белком uS3 в составе 40S субчастицы.

#### **РБ uS3 в составе рибосомы не обладает АР-лиазной активностью в отличие от изолированного белка**

Проведен сравнительный анализ способности *rec-uS3* и белка uS3 в составе 40S субчастиц рибосом человека расщеплять короткие оц- и дц-ДНК, содержащие АР-сайт. Обнаружено, что *rec-uS3* расщепляет оц-АР-ДНК намного эффективнее, чем дц-ДНК; более того, можно подобрать условия, в которых расщепление оц-АР-ДНК происходит количественно (*рис. 5*). При этом *rec-uS3* не оказывает воздействия на модельные ДНК с остатками гуанина, 8-оксогуанина или тетрагидрофурана вместо АР-сайта (соответствующий радиоавтограф геля не приведен). Что касается белка uS3 в составе 40S субчастиц, то оказалось, что он неспособен расщеплять ни одно- ни двуцепочечную АР-ДНК (*рис. 5*), причем расщепление не удавалось наблюдать даже при максимально достижимых концентрациях 40S субчастиц (5 мкМ).

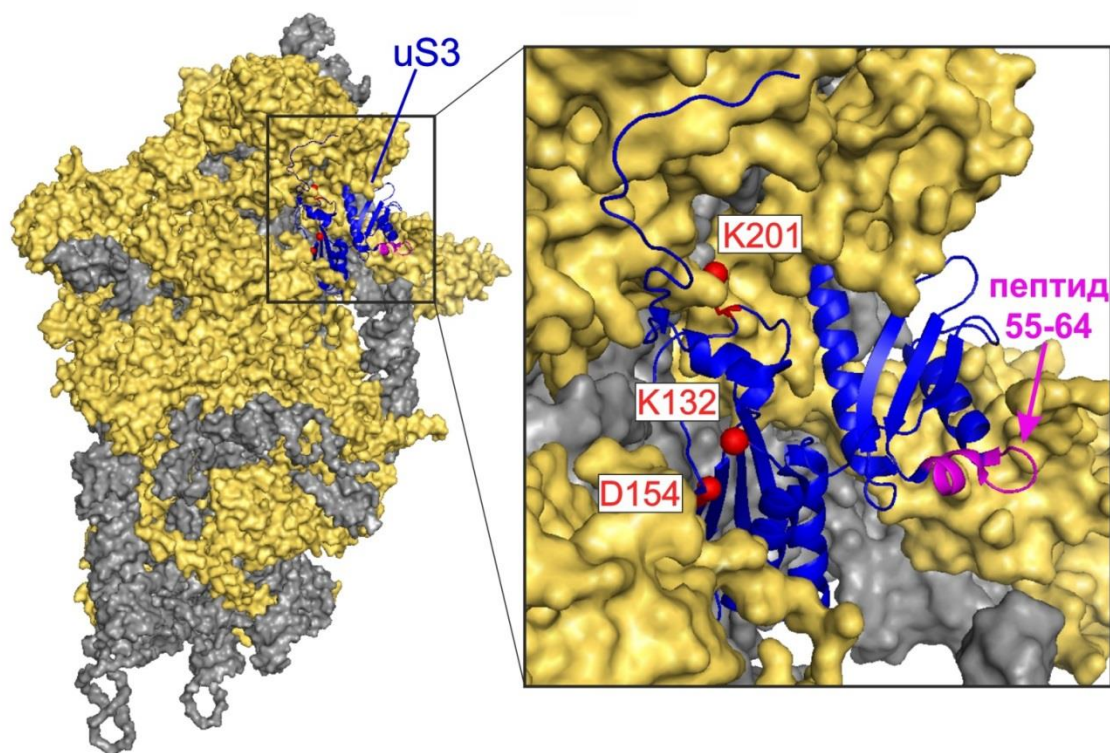


**Рис. 5.** Анализ расщепления  $5'$ - $^{32}$ P-меченых оц-АР-ДНК (ssAP) и дц-АР-ДНК (dsAP), инкубированными с rec-uS3 или 40S субчастицами, взятыми в разных концентрациях (обозначены сверху). Радиоавтограф геля после разделения в ПААГ в присутствии 8 М мочевины. Дорожки «Контроль» соответствуют контрольным экспериментам с модельным ДНК, инкубированных в отсутствие rec-uS3 и 40S субчастиц.

Результаты по расщеплению АР-ДНК хорошо коррелируют с приведенными выше данными по сшивкам этого белка с АР-ДНК, показывающими преимущественное сшивание rec-uS3 с продуктом расщепления модельной ДНК, то есть с 10-мером (рис. 3Б), и данными о том, что uS3 в составе 40S субчастицы сшивается только с полноразмерной модельной ДНК (рис. 3А).

Анализ пространственных структур 40S субчастиц показал, что аминокислотные остатки uS3, которые, как предполагали ранее на основании экспериментов с изолированным белком, отвечают за его АР-лиазную активность, экранированы в субчастице и участвуют во внутри-рибосомных взаимодействиях, на рис. 6 они показаны красными сферами. Это, очевидно, и является причиной того, что белок uS3 в составе 40S субчастицы полностью теряет АР-лиазную активность, присущую изолированному белку. Кроме того, этот анализ показал, что участок сшивки АР-сайта КН-домеи белка uS3 в составе 40S субчастицы, который выделен сиреневым цветом, находится на значительном удалении от предполагаемого каталитического центра белка (рис. 6).

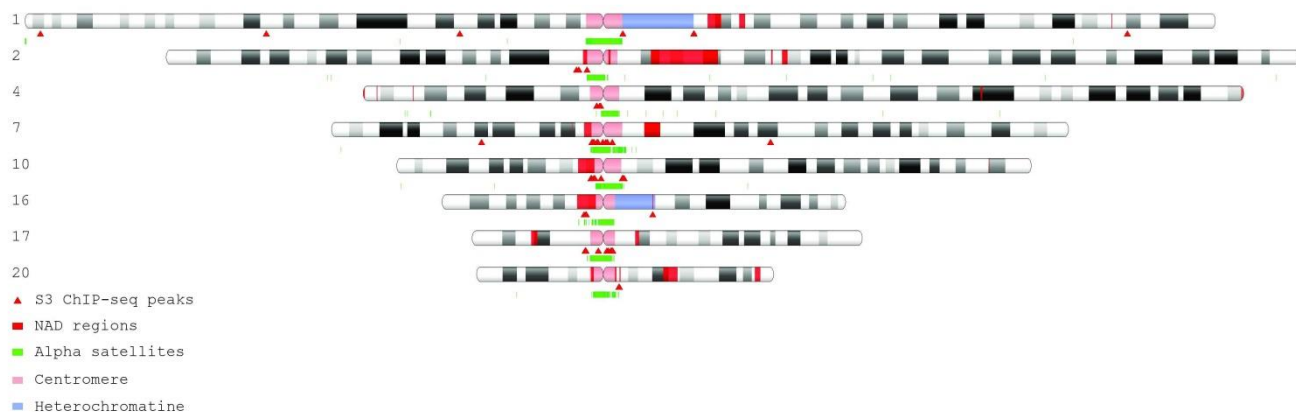
Полученные результаты показали, что скорее всего структура КН-домеи в изолированном белке uS3 и белке uS3, входящем в состав 40S субчастицы, различна. Структура этого домеи белка в составе 40S субчастицы, очевидно, намного более предпочтительна для взаимодействия с альдегидными группами в составе одноцепочечных нуклеиновых кислот, чем в изолированном белке, что, по-видимому, отражает разные способы взаимодействия этих форм белка с нуклеиновыми кислотами. Свободный uS3, по-видимому, взаимодействует с АР-сайтами своим каталитическим центром, отвечающим за АР-лиазную активность, а белок в составе 40S субчастицы – посредством фрагмента в КН-домеи, который расположен вдали от каталитического центра. Таким образом, полученные данные могут указывать на разные нетрансляционные функции свободного и связанного в составе рибосомы белка uS3 в клетке.



**Рис. 6.** Расположение белка uS3 на 40S субчастице рибосомы млекопитающих (Lomakin and Steitz, 2013; PDB 4KZX). Слева – общий вид с внешней стороны субчастицы, справа – увеличенная структура области 40S субчастицы, содержащей белок uS3, выделенный синим цветом. Фрагмент 55-64 белка uS3, сшивающийся с AP-ДНК, выделен сиреневым цветом; аминокислотные остатки, принадлежащие к предполагаемому каталитическому центру, представлены красными сферами.

**uS3 *in vivo* связывается преимущественно с NAD участками и с прицентромерными областями хромосом**

Для получения информации о функциональной роли белка uS3 в клетке была проведена идентификация участков связывания этого белка на геномной ДНК человека *in vivo* с использованием метода ChIP-Seq на клетках HEK293 путем трёхкратного воспроизведения эксперимента. Белок uS3, сшитый с фрагментами клеточной ДНК, был выделен из клеток, обработанных формальдегидом, с помощью иммуноблотинга с использованием специфических антител против uS3, иммобилизованных на Protein G Dynabeads, после фрагментации сшитой ДНК ультразвуком. Одновременно был проведен контрольный эксперимент, где аналогичные операции были проведены с использованием Protein G Dynabeads без антител против uS3, а также эксперимент без использования сорбента для выделения сшивок ДНК-uS3 для получения образца «input» (полного набора возможных «ридов» на геномной ДНК). Глубокое секвенирование и обработка результатов ChIP-Seq с помощью коммерческого программного обеспечения CLC GW позволило получить около 15 миллионов уникальных ридов. В результате картирования этих ридов на геномной ДНК (версия генома человека hg38) получили 229 пиков, локализованных преимущественно в прицентромерных районах хромосом (в частности, хромосом 1, 2, 4, 7, 10, 16, 17 и 20, см. рис. 7). В хромосомах 7, 10, 16 и 20 пики ChIP-Seq совпадали с так называемыми NAD (англ. *nucleolus-associated chromatin regions*) или примыкали к ним (рис. 7).

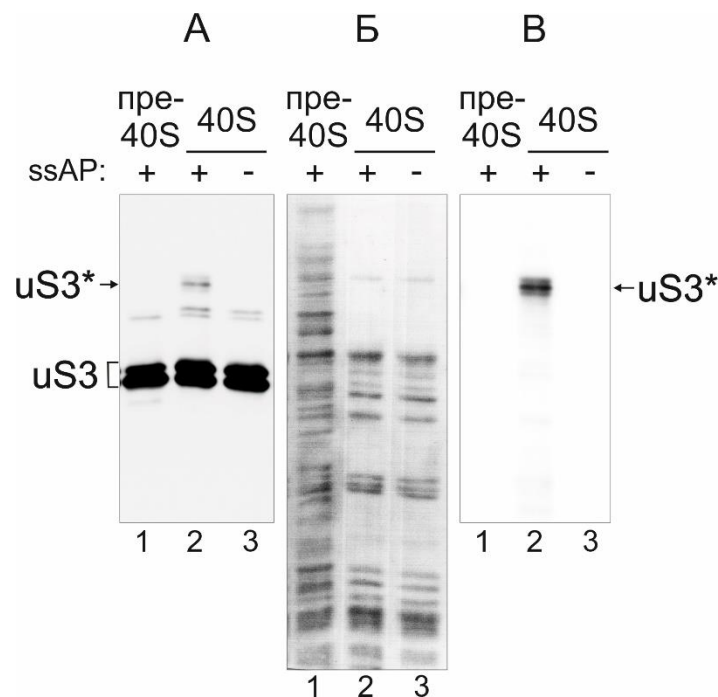


**Рис. 7.** Распределение пиков ChIP-seq для белка uS3 на идеограммах хромосом версии генома hg38. Приведены только те хромосомы, в которых найдено более 5 пиков. Положения пиков показаны красными стрелками. Районы хромосом отмечены разными цветами в соответствии с обозначениями, приведенными внизу слева.

Дальнейший анализ участков связывания РБ uS3 показал, что большинство пиков находится в районах, гиперчувствительных к ДНКазе I, где хроматин находится в менее конденсированном состоянии и доступен для расщепления ДНКазой и для связывания ДНК-связывающих белков, таких, как факторы транскрипции [14-17]. Эти районы рассматривают как потенциальные регуляторные участки [16, 17], которые могут служить маркерами многих типов цис-регуляторных элементов – промоторов, энхансеров, сайленсеров и пр. Кроме того, центромерные и прицентромерные районы хромосом содержат много альфа-сателлитных повторов, склонных в значительной степени к формированию петель с одноцепочечными участками ДНК, где содержание AP-сайтов резко повышено [18-20]. Картирование воспроизводимых ридов ChIP-Seq на геноме человека показало, что частота их попадания в районы альфа-сателлитной ДНК на 30% выше, чем в контрольном эксперименте без антител против белка uS3. При этом метод ChIP-Seq не позволяет узнать, в каком состоянии (изолированном или в составе пре-40S субчастиц, которые собираются в ядре) РБ uS3 взаимодействует с тем или иным участком ДНК.

#### **ДНК, содержащая AP-сайт, не взаимодействует с пре-40S субчастицами в ядре**

В клетке ДНК может встретиться с РБ uS3 только в ядре, где белок может быть либо в изолированном виде, либо в виде пре-40S субчастиц, но не может встретиться со зрелыми субчастицами, которые могут находиться только в цитоплазме. Для выяснения вопроса о том, может ли uS3 в составе пре-40S субчастиц сшиваться с AP-сайтами в оцДНК, брали ту же модельную оц AP-ДНК (рис. 1.), которую использовали для изучения сшивок с uS3 в составе зрелых 40S субчастиц из плаценты человека, и пре-40S субчастицы из ядер клеток НЕК293 человека. Результаты, представленные на рис. 8B, показывают, что белок uS3 неспособен сшиваться с AP-сайтами в оц-ДНК. Присутствие РБ uS3 в пре-40S субчастицах подтверждали с помощью иммуноблотинга (рис. 8A). Отсутствие сшивки между белком uS3 в составе пре-40S субчастиц и аналогом ДНК, содержащей AP-сайт (рис. 8A и 8B, дорожка 1), по-видимому, связано с тем, что в незрелой субчастице N-концевой домен uS3, который содержит пептид 55-64, связан с фактором сборки Ltv1; кроме того, РБ uS3 в пре-40S субчастице расположен совсем не так, как в зрелой субчастице [21-23]. Следовательно, способность uS3 в составе зрелых 40S субчастиц сшиваться с AP-сайтами, обнаруженная в настоящей работе, может иметь функциональную роль только во взаимодействиях зрелых субчастиц с нуклеиновыми кислотами в цитоплазме, а в ядре РБ uS3 может взаимодействовать с хроматином только в свободном состоянии.

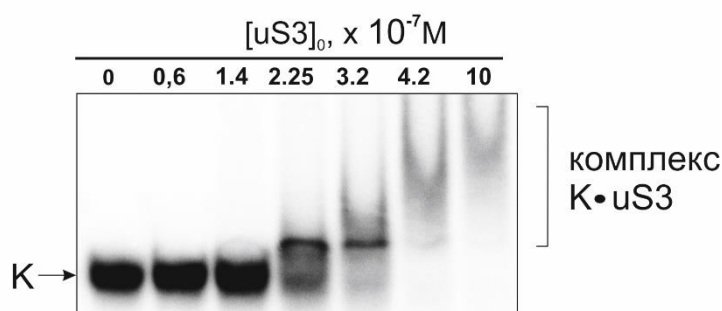
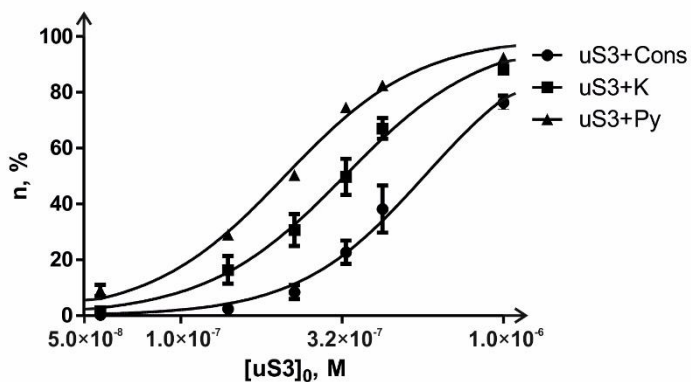


**Рис. 8.** Анализ сшивок  $5'$ - $^{32}\text{P}$ -меченого оц-АР-ДНК (ssAP) с белком uS3 в составе 40S субчастиц из плаценты человека (40S) или пре-40S частиц из ядерного экстракта клеток HEK293 (пре-40S). Иммуноблоттинг рибосомных белков, разделенных в ПААГ в присутствии SDS, с использованием антител против РБ uS3 (А); нитроцеллюлозная мембрана, окрашенная Ponceau С, перед ее использованием в иммуноблоттинге (Б); радиоавтограф мембраны (В). Стрелками показаны полосы, соответствующие белку uS3, сшитому (uS3\*) и не сшитому (uS3) с аналогом ДНК.

### **Повторы TGGAA, преобладающие в участках хроматина, взаимодействующих с белком, не придают оцДНК повышенного сродства к РБ uS3**

Анализ последовательностей ДНК хроматина в участках связывания РБ uS3 человека, идентифицированных методом ChIP-Seq, выявил консенсусные последовательности, выравнивание которых показало наличие в их структуре повторов TGGAA. Найденный пентануклеотид относится к III типу сателлитов человека, который встречается в большинстве хромосом и, в частности в прицентромерных районах, в которых преимущественно находятся найденные нами участки связывания РБ uS3. Результаты анализа данных ChIP-Seq указывают на то, что белок uS3 может иметь повышенное сродство к пентамерам TGGAA. Поэтому было проведено исследование зависимости сродства uS3 к оцДНК от ее последовательности и, в частности, от наличия в ней повторов пентамера TGGAA. В качестве модельных ДНК использовали 25-мер (TGGAA) $\times$ 5 (далее - «Cons»), 25-мер (AAGGT) $\times$ 5 такого же нуклеотидного состава, но не содержащий пентамеров TGGAA (далее - «К»). Поскольку геномная ДНК двуцепочечна, найденные с помощью метода ChIP-Seq участки связывания РБ uS3 на геномной ДНК в составе хроматина могли отражать взаимодействия белка и с цепью, комплементарной той, которая содержит пентамеры TGGAA. Используемый нами на первом этапе данной работы пиримидин-богатый 23-мер CTCTCCCTTCGCTCCTTTCCTCT (далее - «Py») содержит мотивы TTC и TCC, комплементарные соответствующим триплетам пентамера TGGAA, поэтому на данном этапе он был использован в качестве третьей модельной ДНК (рис. 1, ssAP). На рис. 9 приведены данные, полученные методом задержки в геле; этот метод позволяет детектировать как связанный, так и свободный олигомер, поэтому он дает более точные результаты по сравнению с данными, полученными с помощью метода фильтрации на нитроцеллюлозных фильтрах. Расчет констант диссоциации из данных по связыванию, представленных на рис. 9, показал, что, против ожидания, олигомер «Cons» имеет наименьшее из трех модельных ДНК сродство к РБ uS3 ( $K_d = (6.10 \pm 0.60) \times 10^{-7}$  М). Сродство к этому белку у ДНК «К» заметно выше ( $K_d = (3.36 \pm 0.20) \times 10^{-7}$  М), а у пиримидин-богатого олигомера «Py» немного больше, чем у контрольной ДНК «К». ( $K_d = (2.10 \pm 0.07) \times 10^{-7}$

М). Качественно сходные результаты были получены с применением метода фильтрации (данные не приведены).



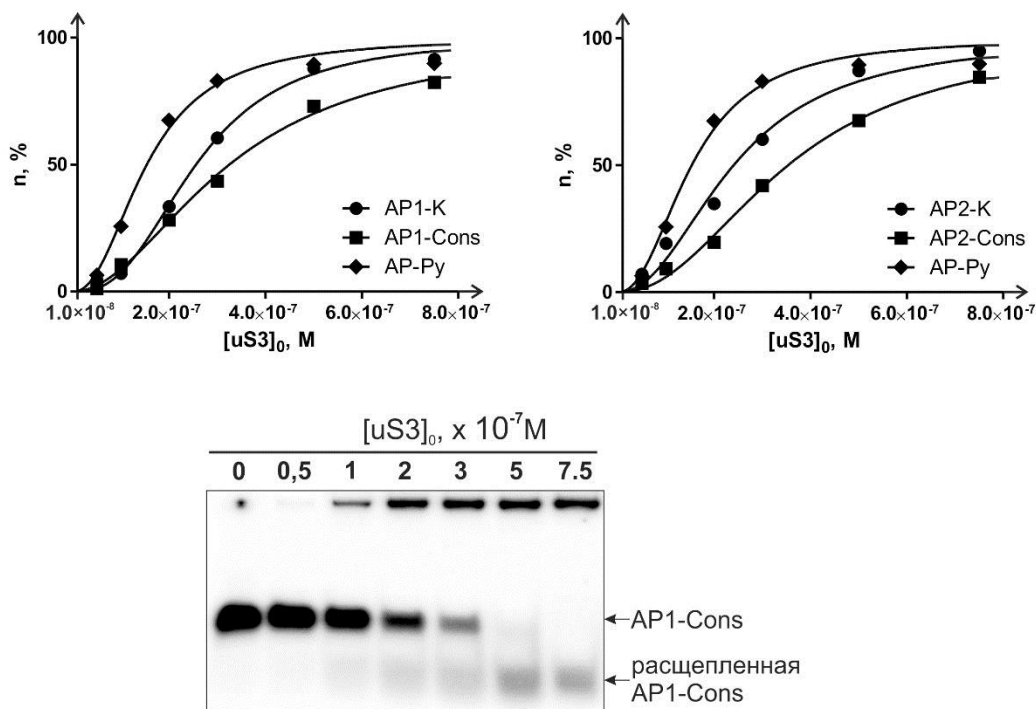
**Рис. 9.** Изотермы связывания 5'-<sup>32</sup>P-меченых модельных ДНК «Py», «K» и «Cons» с рекомбинантным РБ uS3 человека, рассчитанные из радиоавтографов электрофореграмм, полученных при анализе связывания ДНК с белком с помощью метода задержки в геле. Внизу – типичный радиоавтограф, приведенный для электрофореграммы с модельной ДНК «K» в качестве примера (n – доля связанного с белком олигомера в %).

Данные по связыванию вышеуказанных модельных ДНК с РБ uS3 свидетельствуют о том, что повторы TGGAA, преобладающие в участках хроматина, взаимодействующих с белком, не придают одноцепочечной ДНК повышенного сродства к белку uS3 по сравнению со сродством, проявляемым последовательностями, не содержащими таких повторов. Мотивы TTC и TCC, комплементарные соответствующим триплетам пентамера TGGAA усиливают это сродство лишь в незначительной степени. Очевидно, высокое содержание данных пентамеров в участках связывания РБ uS3 на хроматине связано не с повышенным сродством белка к последовательностям (TGGAA)<sub>n</sub>, а с большим количеством повторов данного пентамера в открытых участках хроматина, доступных для связывания с данным белком.

#### **Влияние положения AP-сайта в ДНК и ее последовательности на эффективность расщепления**

Для изучения влияния последовательности ДНК и положения AP-сайта на ней на эффективность расщепления белком uS3 были использованы те же модельные ДНК, но содержащие AP-сайт в центральной части. Этот набор включал AP-Cons1 и AP-Cons2 (ДНК «Cons», содержащие AP-сайт, соответственно в положениях 12 и 13), AP-K1 и AP-K2 (ДНК «K» с AP-сайтом, соответственно, в положениях 12 и 13) и AP-Py (оцДНК «Py» с AP-сайтом в положении 11 или ssAP, которая была ранее использована на первом этапе работы, рис. 1.). Для сравнительного анализа эффективности расщепления модельных AP-ДНК, несущих метку <sup>32</sup>P на 5'-конце, проводили эксперименты при постоянных начальной концентрации AP-ДНК ( $5 \times 10^{-7}$  М) и времени инкубации (1 ч) и варьируемой концентрации белка. Продукты расщепления 5'-меченых модельных AP-ДНК белком uS3 разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 7.6 М мочевины, с последующей радиоавтографией (рис. 10) и денситометрической обработкой радиоавтографов для определения степени расщепления AP-ДНК. Из полученных кривых зависимости степени расщепления AP-ДНК от концентрации РБ uS3 (рис. 10) в качестве характеристики эффективности расщепления определяли концентрацию, при которой расщеплению подвергалось 50% AP-ДНК (C-50).





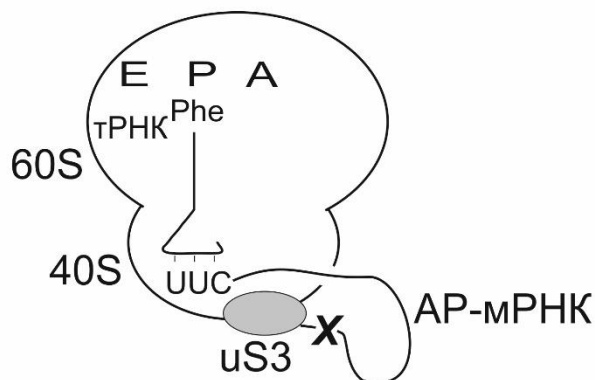
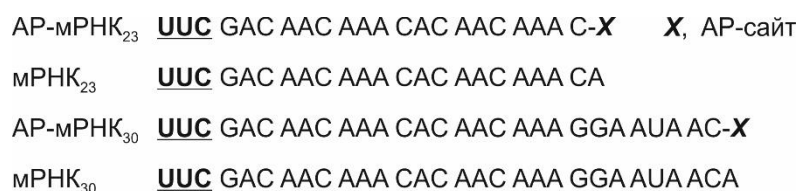
**Рис. 10.** Кривые зависимости степени расщепления меченых модельных ДНК с AP-сайтом (взяты в концентрации  $5 \times 10^{-7}$  М) hsc-uS3 от его концентрации, рассчитанные из соответствующих радиоавтографов электрофореграмм после разделения продуктов расщепления электрофорезом в ПААГ в денатурирующих условиях. Обозначения модельных ДНК даны в тексте. Внизу в качестве примера приведен радиоавтограф с модельной ДНК AP1-Cons. Радиоактивные полосы в самой верхней части геля в районе карманов детектируются вследствие того, что часть модельной ДНК образует сшивки с белком после расщепления, а также нерастворимые ДНК-белковые агрегаты.

Результаты экспериментов, приведенных на *рис. 10*, показывают, что положение AP-сайта в ДНК практически не влияет на эффективность расщепления, а влияние последовательности ДНК на эту эффективность хорошо коррелирует с зависимостью сродства РБ uS3 к ДНК от ее последовательности (см. *рис. 9*). С несколько повышенной эффективностью происходило расщепление AP-Py ( $C-50 = (1.62 \pm 0.08) \times 10^{-7}$  М), с наименьшей – AP-Cons ( $C-50 = (3.20 \pm 0.30) \times 10^{-7}$  М), а для AP-K было получено промежуточное значение ( $C-50 = (2.50 \pm 0.30) \times 10^{-7}$  М). Это указывает на то, что сама по себе AP-лиазная активность РБ uS3 не зависит от последовательности ДНК, содержащей AP-сайт, и положения AP-сайта в ней; некоторые различия в эффективности его расщепления в различных участках ДНК связаны только с зависимостью сродства белка к ДНК от ее последовательности. Полученные результаты находятся в согласии с нашим предположением, что преимущественное связывание РБ uS3 в участках хроматина, содержащих повторы пентамера TGGAA или комплементарные ему мотивы, обусловлено тем, что соответствующие последовательности расположены в наиболее доступных для связывания белка участках геномной ДНК. Вероятно, благодаря повышенному содержанию AP-сайтов в таких участках, изолированный РБ uS3 может предпочтительно принимать участие в репарации ДНК именно в этих участках.

**мРНК, находящаяся в мРНК-связывающем канале, способна через AP-сайт сшиваться с РБ uS3, экспонированным на поверхности рибосомы**

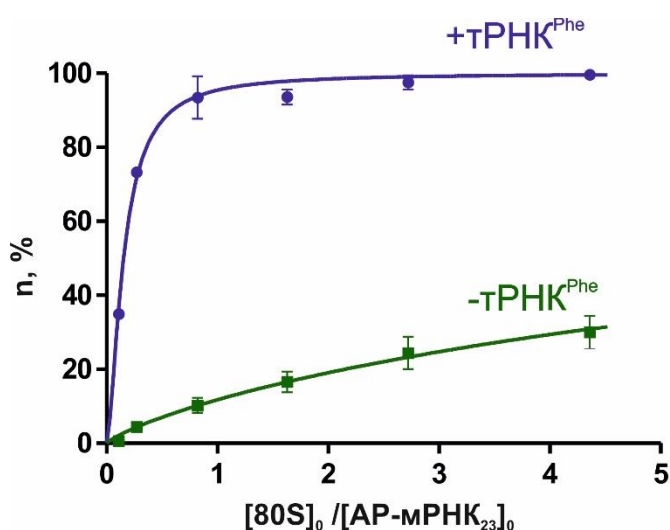
Известно, что 40S субчастицы рибосом человека способны эффективно сшиваться посредством пептида 55-64 uS3 с диальдегидными производными неструктурированных РНК [11, 24]. Поэтому можно полагать, что этот пептид, расположенный на поверхности субчастицы вблизи входа мРНК в канал, способен взаимодействовать с AP-сайтами в мРНК, поскольку они могут существовать в открытой альдегидной форме [25]. Мы проверили, может ли AP-сайт в мРНК, связанной с 40S субчастицами, взаимодействовать с пептидом 55-64 белка uS3. Для этой цели были синтезированы два аналога мРНК (длиной 23 и 30 нуклеотидов),

содержащие на 5'-конце триплет UUC, позволяющий фиксировать мРНК в канале рибосоме с помощью взаимодействия с тРНК<sup>Phe</sup> в Р-участке, и защищенный AP-сайт на 3'-конце (рис. 11).



**Рис. 11.** Аналоги мРНК, содержащие AP-сайт, их немодифицированные аналоги и схематическое изображение рибосомного комплекса, где 5'-концевой триплет UUC аналога мРНК связан с тРНК<sup>Phe</sup> в пептидилном (P) участке рибосомы, а 3'-конец сшит с экспонированным фрагментом белка uS3 через AP-сайт, который обозначен как «X». А, Р и Е – участки связывания тРНК на рибосоме (соответственно, аминацильный, пептидилный и участок выхода).

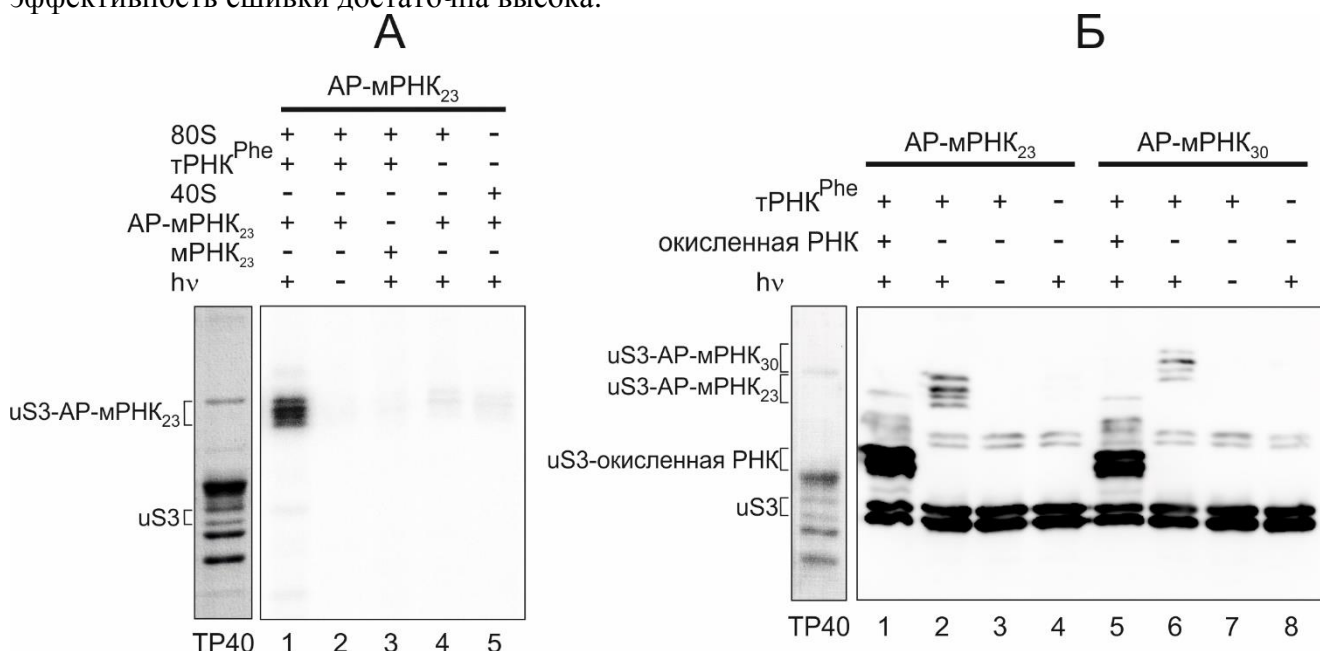
Связывание 5'-<sup>32</sup>P-меченых аналогов мРНК и тРНК<sup>Phe</sup> с 80S рибосомными субчастицами проверяли, используя стандартный метод фильтрации через нитроцеллюлозную бумагу. Данные аналоги, взятые в стехиометрическом соотношении с рибосомами, количественно связывались с ними в присутствии тРНК<sup>Phe</sup>; в отсутствие тРНК связывание практически не детектировалось фильтрацией на нитроцеллюлозных фильтрах (рис. 12). Таким образом, значительного вклада свободного аналога мРНК (который не расположен в мРНК-связывающем канале) в сшивку с пептидом 55-64 РБ uS3, экспонированным на поверхности рибосомы, не ожидалось.



**Рис. 12.** Изотерма связывания AP-мРНК с 80S рибосомами человека. Верхняя кривая соответствует тройной смеси 80S рибосом с тРНК<sup>Phe</sup> и меченым аналогом AP-мРНК<sub>23</sub>, а нижняя кривая соответствует бинарной смеси рибосом с меченой AP-мРНК<sub>23</sub>. n – доля связанного меченого лиганда с 80S рибосомами в %.

Мы исследовали, может ли аналог мРНК, закрепленный в мРНК-связывающем канале посредством кодон-антикодонного взаимодействия с тРНК в Р-сайте, сшиваться с экспонированным пептидом белка uS3 через AP-сайт на 3'-конце мРНК, который расположен

вне рибосомы (рис. 11). Результаты, полученные с помощью 5'-<sup>32</sup>P-меченной AP-мРНК<sub>23</sub> и приведенные на рис. 13А, выявил сильные радиоактивные полосы только в дорожке 1, соответствующей комплексу 80S рибосомы с AP-мРНК<sub>23</sub> и тРНК<sup>Phe</sup>, который был облучен после своего формирования для снятия защитной группы с AP-сайта. Этих полос не наблюдали в отсутствие облучения, тРНК или AP-сайта в мРНК, что свидетельствует о том, что сшивка происходила именно с AP-сайтом и только в случае, когда мРНК была фиксирована в мРНК-связывающем канале. Результаты иммуноблоттинга, представленные на рис. 13Б, показывают те же самые закономерности, что наблюдали на радиоавтографе, для обеих аналогов AP-мРНК<sub>23</sub> и AP-мРНК<sub>30</sub>. Следовательно, AP-сайт на 3'-конце мРНК, закрепленной в мРНК-связывающем канале, действительно может сшиваться с РБ uS3, причем эффективность сшивки достаточно высока.



**Рис. 13.** Сшивка аналогов мРНК, содержащих AP-сайт, с РБ uS3 в преобразованных рибосомных комплексах, в которых аналоги мРНК были фиксированы в РНК-связывающем канале. Радиоавтограф геля после SDS-ПААГ-разделения белков, выделенных из соответствующих комплексов, инкубированных с 5'-<sup>32</sup>P-меченым мРНК<sub>23</sub> (А). Иммуноблоттинг рибосомных белков из комплексов, инкубированных с немеченым AP-мРНК<sub>23</sub> или AP-мРНК<sub>30</sub>, где AP-сайт остается заблокированным («hν-») или становится деблокированным («hν+») после УФ-облучения, разделенных в ПААГ в присутствии SDS, с использованием антител против РБ uS3 (Б). В отдельных экспериментах 40S субчастицы перед добавлением мРНК и тРНК сшивали с 3'-диальдегидным производным нонамера AAUAAU (обозначенным как «окисленная РНК»), взятым в 25-кратном молярном избытке относительно рибосом. TP40 – суммарный белок рибосомных 40S субчастиц, разделенных в SDS-ПААГ и окрашенных Coomassie R250 (А) или Ponceau C (Б).

Количественная обработка результатов, представленных на рис. 13Б (дорожки 2 и 6) показала, что доля uS3, сшитого с AP-мРНК<sub>23</sub> и AP-мРНК<sub>30</sub>, фиксированных в мРНК-связывающем канале рибосомы, составляла, соответственно, (26.1 ± 2.2) % и (15.0 ± 1.3) %. В бинарных смесях 40S субчастиц с аналогами мРНК сшивки практически не наблюдали (рис. 13Б, дорожки 4 и 8), очевидно, вследствие низкого сродства мРНК к 40S субчастице в отсутствие факторов инициации и тРНК. Эти данные указывают на то, что на ранних стадиях инициации трансляции, которые имитирует бинарная смесь 40S субчастиц с аналогом мРНК, вероятность ковалентного присоединения AP сайта мРНК к белку uS3 очень мала.

Для доказательства того, что сшивка AP-сайтов аналогов мРНК происходила именно с пептидом 55-64 белка uS3, проводили эксперименты, в которых этот пептид был предварительно блокирован сшивкой с 3'-диальдегидным производным олигорибонуклеотида согласно [11] (рис. 13Б, дорожки 1 и 5). Результаты, представленные на соответствующих дорожках, показали, что в 40S субчастицах с заблокированным пептидом 55-64 РБ uS3

ковалентного присоединения аналогов мРНК практически не наблюдали, следовательно, их сшивка происходила именно с этим участком.

Таким образом, мы показали, что AP-сайты, которые могут возникать в мРНК при окислительном стрессе и при старении [26], способны непосредственно взаимодействовать в процессе трансляции с фрагментом РБ uS3, экспонированным на поверхности 40S субчастицы вблизи входа мРНК в канал. Почти наверняка рибосома со сшитой мРНК не может нормально продолжать трансляцию и поэтому должна стать потенциальной мишенью клеточного пути «no-go decay» [27-29], предназначенного для разборки рибосомных комплексов с «застрявшей» мРНК и ее последующей деградации. Таким образом, получены первые данные о том, что 40S субчастица может быть участником контроля качества мРНК посредством белка uS3, способного непосредственно взаимодействовать с AP-сайтом в мРНК.

## ВЫВОДЫ

1. РБ uS3 в составе 40S субчастицы, в отличие от изолированного белка, не имеет AP-лиазной активности, однако способен сшиваться с AP-сайтом в оц- (но не дц-) ДНК через пептид 55-64, экспонированный на поверхности субчастицы.
2. Изолированный uS3 расщепляет по AP-сайту более эффективно оц-ДНК по сравнению с дц-ДНК. Кроме того, белок сшивается с продуктом расщепления ДНК и, в меньшей степени, с нерасщепленной ДНК, причем участок сшивки в изолированном белке не совпадает с участком сшивки в uS3 в составе 40S субчастицы.
3. В клеточном ядре uS3 взаимодействует преимущественно с прицентромерными областями хромосом и с нуклеолус-ассоциированными доменами (NAD). Взаимодействует с геномной ДНК только белок в свободном состоянии, поскольку пре-40S субчастицы ядра неспособны сшиваться с AP-сайтами в ДНК.
4. Повторы (TGGAA)<sub>n</sub>, преобладающие в участках хроматина, взаимодействующих с РБ uS3, не придают модельным ДНК повышенного сродства к uS3 *in vitro* и не усиливают AP-лиазную активность белка. Высокое содержание повторов TGGAA в участках связывания uS3 на хроматине связано, скорее всего, с большим количеством данных повторов в открытых участках хроматина, доступных для связывания белка uS3.
5. мРНК, фиксированная в мРНК-связывающем канале взаимодействием с молекулой тРНК в Р-участке, способна сшиваться посредством AP-сайта в 3'-концевой части мРНК, находящейся вне рибосомы, с пептидом 55-64 РБ uS3, экспонированным на поверхности 40S субчастицы вблизи участка входа мРНК. Следовательно, субчастица может непосредственно участвовать в контроле качества мРНК в клетке, сшиваясь с AP-сайтом посредством РБ uS3, что должно приводить к удалению поврежденной мРНК через механизм «no-go decay».

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ochkasova A., Zharkov D.O., Stahl J., Gopanenkov A.V., Tupikin A.E., Kabilov M.R., Graifer D.M., Karpova G.G. Recognition but no repair of abasic site in single-stranded DNA by human ribosomal S3 protein residing within intact 40S subunit // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – P. 3833–3843.
2. Ochkasova A., Meshchaninova M.I., Venyaminova A.G., Ivanov A.V., Graifer D.M., Karpova G.G. The human ribosome can interact with the abasic site in mRNA via a specific peptide of the uS3 protein located near the mRNA entry channel // *Biochemie.* – 2019. – V.158. – P. 117-125.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Warner J.R., McIntosh K.B. How common are extra-ribosomal functions of ribosomal proteins? // *Mol. Cell.* – 2009. – V. 34. – P. 3-11.
2. Hui L., Yi-fei Z., Juan X., Rong W., Zhengping J. Potential extra-ribosomal functions of ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol. Res.* – 2015. – V. 177. – P. 28-33.
3. Franklin D.A., Zhang Y. Extra-ribosome functions of ribosomal proteins // *Biomed. Sciences.* – 2016. – V. 3. – P. 281-287.
4. Graifer D., Malygin A., Zharkov D.O., Karpova G. Eukaryotic ribosomal protein S3: A constituent of translational machinery and an extraribosomal player in various cellular processes // *Biochimie.* – 2014. – V. 99. – P. 8-18.
5. Han S.H., Chung J.H., Kim J., Kim K.S., Han Y.S. New role of human ribosomal protein S3: Regulation of cell cycle via phosphorylation by cyclin-dependent kinase 2 // *Oncol. Lett.* – 2017. – V. 13. – P. 3681-3687.
6. Kim J., Kim Y.S. Effect of HIV-1 Tat on the formation of the mitotic spindle by interaction with ribosomal protein S3 // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8 – P. 1-14.
7. Matasova N.B., Myltseva S.V., Zenkova M.A., Graifer D.M., Vladimirov S.N., Karpova G.G. Isolation of ribosomal subunits containing intact rRNA from human placenta. Estimation of functional activity of 80S ribosomes // *Analyt. Biochem.* – 1991. – V. 198. – P.219-223.
8. Graifer D., Molotkov M., Styazhkina V., Demeshkina N., Bulygin K., Eremina A., Ivanov A., Laletina E., Ven'yaminova A., Karpova G. Variable and conserved elements of human ribosomes surrounding the mRNA at the decoding and upstream sites // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – P. 3282-3293.
9. Strezoska Z., Pestov D.G., Lau L.F. Bop1 is a mouse WD40 repeat nucleolar protein involved in 28S and 5.8S rRNA processing and 60S ribosome biogenesis // *Mol. Cell Biol.* – 2000. – V. 20. – P. 5516-5528.
10. Malygin A., Baranovskaya O., Ivanov A., Karpova G. Expression and purification of human ribosomal proteins S3, S5, S10, S19, and S26 // *Protein Expr. Purif.* – 2003. – V. 28. – P. 57-62.
11. Sharifulin D.E., Grosheva A.S., Bartuli Y.S., Malygin A.A., Meschaninova M.I., Ven'yaminova A.G., Stahl J., Graifer D.M., Karpova G.G. Molecular contacts of ribose-phosphate backbone of mRNA with human ribosome // *Biochim. Biophys. Acta* – 2015. – V. 1849. – P. 930-939.
12. Schmidt D., Wilson M.D., Spyrou C., Brown G.D., Hadfield J., Odom D.T. ChIP-seq: Using high-throughput sequencing to discover protein–DNA interactions // *Methods.* – 2009. – V. 48. – P. 240–248.
13. Балуева К.Э., Малыгин А.А., Карпова Г.Г., Невинский Г.А., Жарков Д.О. Взаимодействие рибосомного белка S3 человека с неповрежденной и поврежденной ДНК // *Мол. Биол.* – 2008. – Т. 42. – С. 314-322.
14. Boyle A.P., Davis S., Shulha H.P., Meltzer P., Margulies E.H., Weng Z., Furey T.S., Crawford G.E. High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome // *Cell.* – 2008. – V. 132. – P. 311-322.
15. Cockerill P.N. Structure and function of active chromatin and DNase I hypersensitive sites // *FEBS J.* – 2011. V. 278. – P. 2182-2210.
16. Wang Y.-M., Zhou P., Wang L.-Y., Li Z.-H., Zhang Y.-N., Zhang Y.-X. Correlation between DNase I hypersensitive site distribution and gene expression in HeLa S3 cells // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – P. e42414.

17. He Y., Carrillo J.A., Luo J., Ding Y., Tian F., Davidson I., Song J. Genome-widemapping of DNase I hypersensitive sites and association analysis with gene expression in MSB1 cells // *Front. Genet.* – 2014. V. 5. P. 1-9.
18. Fernández J.L., Vázquez-Gundín F., Rivero M.T., Goyanes V., Gosálvez J. Evidence of abundant constitutive alkali-labile sites in human 5 bp classical satellite DNA loci by DBD-FISH // *Mutat. Res.* – 2001. – V. 473. – P. 163-168.
19. Cortés A., Huertas D., Marsellach F.X., Ferrer-Miralles N., Ortiz-Lombardia M., Fanti L., Pimpinelli S., Pina B., Azorin F. Analysing the contribution of nucleic acids to the structure and properties of centric heterochromatin // *Genetica.* – 2003. – V. 117. – P. 117-125.
20. Aze A., Sannino V., Soffientini P., Bachi A., Costanzo V. Centromeric DNA replication reconstitution reveals DNA loops and ATR checkpoint suppression // *Nat. Cell Biol.* – 2016. – V. 18. – P. 684-691.
21. Mitterer V., Murat G., Réty S., Blaud M., Delbos L., Stanborough T., Bergler H., Leulliot N., Kressler D., Pertschy B. Sequential domain assembly of ribosomal protein S3 drives 40S subunit maturation // *Nat. Commun.* – 2016.- V. 7. – P. 10336.
22. Ameismeier M., Cheng J., Berninghausen O., Beckmann R., Visualizing late states of human 40S ribosomal subunit maturation // *Nature.* – 2018. – V. 558. – P. 249-253.
23. Scaiola A., Peca C., Weisser M., Böhringer D., Leibundgut M., Klingauf-Nerurkar P., Gerhardy S., Panse V.G., Ban N. Structure of a eukaryotic cytoplasmic pre-40S ribosomal subunit // *EMBO J.* – 2018. – V. 37. – P. e98499.
24. Sharifulin D.E., Bartuli Y.S., Meschaninova M.I., Ven'yaminova A.G., Graifer D.M., Karpova G.G. Exploring accessibility of structural elements of the mammalian 40S ribosomal mRNA entry channel at various steps of translation initiation // *Biochim. Biophys. Acta* – 2016. – V. 1864. – P. 1328-1338.
25. Wilde J.A., Bolton P.H. Characterization of the equilibrating forms of the aldehydic abasic site in duplex DNA by oxygen-17 NMR // *J. Am. Chem. Soc.* – 1989. V. 111. – P. 1894-1896.
26. Tanaka M., Chock P.B., Stadtman E.R. Oxidized messenger RNA induces translation errors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2007. – V. 104. – P. 66-71.
27. Graille M., Seraphin B. Surveillance pathways rescuing eukaryotic ribosomes lost in translation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2012. V. 13. – P. 727-735.
28. Kervestin S., Jacobson A. NMD: a multifaceted response to premature translational termination // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2012. – V. 13 – P. 700-712.
29. Shoemaker C.J., Green R. Translation drives mRNA quality control // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2015. – V. 19. – P. 594-601.

# Отчет о проверке на заимствования №1



**Автор:** Новопашина Дарья Сергеевна [danov@niboch.nsc.ru](mailto:danov@niboch.nsc.ru) / ID: 7007712  
**Проверяющий:** Новопашина Дарья Сергеевна ([danov@niboch.nsc.ru](mailto:danov@niboch.nsc.ru) / ID: 7007712)  
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <https://users.antiplagiat.ru>

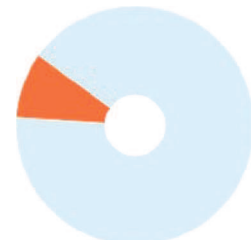
## ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 4  
 Начало загрузки: 06.09.2019 05:47:03  
 Длительность загрузки: 00:00:06  
 Имя исходного файла:  
 Очкасова\_научный\_доклад  
 Размер текста: 1308 кБ  
 Символов в тексте: 56420  
 Слов в тексте: 7640  
 Число предложений: 607

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)  
 Начало проверки: 06.09.2019 05:47:10  
 Длительность проверки: 00:00:05  
 Комментарии: не указано  
 Модуль поиска: Цитирование, Модуль поиска Интернет

**ЗАИМСТВОВАНИЯ** 8,59%  **ЦИТИРОВАНИЯ** 0%  **ОРИГИНАЛЬНОСТЬ** 91,41% 



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.  
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.  
 Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.  
 Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.  
 Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.  
 Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.  
 Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

| №    | Доля в отчете | Источник  | Ссылка  | Актуален на | Модуль поиска          |
|------|---------------|---|---|-------------|------------------------|
| [01] | 1,01%         | не указано  | <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>                                 | 15 Дек 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [02] | 1,13%         | Пептиды рибосомных белков eS26, uS7 и uS3, участвующие в инициации трансляции.  | <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>                                 | 02 Окт 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [03] | 1,07%         | Взаимодействие многофункциональных белков человека – Ки-антигена и глицера...   | <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>                                 | 02 Окт 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [04] | 0,42%         | Exploring contacts of eRF1 with the 3'-terminus of the P site tRNA and mRNA stop signa...   | <a href="https://hal.sorbonne-universite.fr">https://hal.sorbonne-universite.fr</a>     | 09 Июл 2019 | Модуль поиска Интернет |
| [05] | 0,44%         | <a href="http://mgavm.ru/laboratoriya/nauchnaya-deyatelnost/nauchnye-meropriyatiya/doc/%...">http://mgavm.ru/laboratoriya/nauchnaya-deyatelnost/nauchnye-meropriyatiya/doc/%...</a> | <a href="http://mgavm.ru">http://mgavm.ru</a>   | 15 Сен 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [06] | 0,41%         | Arrangement of the Template 3' of the A-Site Codon on the Human 80S Ribosome  | <a href="https://doi.org">https://doi.org</a>   | 19 Авг 2019 | Модуль поиска Интернет |
| [07] | 0,46%         | Электронные версии научных журналов   | <a href="http://maikonline.com">http://maikonline.com</a>                               | 20 Окт 2014 | Модуль поиска Интернет |
| [08] | 0,43%         | PDF   | <a href="http://microbialcell.com">http://microbialcell.com</a>                         | 05 Окт 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [09] | 0,02%         | Download PDF  | <a href="http://msphere.asm.org">http://msphere.asm.org</a>                             | 08 Мая 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [10] | 0,49%         | Genome-wide mapping of DNase I hypersensitive sites and association analysis with gen...  | <a href="https://doi.org">https://doi.org</a>   | 12 Июл 2019 | Модуль поиска Интернет |
| [11] | 0%            | An Active Role for the Ribosome in Determining the Fate of Oxidized mRNA  | <a href="https://doi.org">https://doi.org</a>   | 24 Июл 2019 | Модуль поиска Интернет |
| [12] | 0,59%         | NMD: At the crossroads between translation termination and ribosome recycling   | <a href="https://doi.org">https://doi.org</a>   | 22 Авг 2019 | Модуль поиска Интернет |
| [13] | 0,57%         | Loke17PhD.pdf   | <a href="http://theses.bham.ac.uk">http://theses.bham.ac.uk</a>                         | 31 Мар 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [14] | 0,37%         | PDF   | <a href="https://mcb.nsc.ru">https://mcb.nsc.ru</a>                                     | 11 Дек 2016 | Модуль поиска Интернет |
| [15] | 0%            | <a href="https://istina.msu.ru/download/92217367/1fXyrC:r3NphmjooLM4Nf-m2q6_7bs3kIM/">https://istina.msu.ru/download/92217367/1fXyrC:r3NphmjooLM4Nf-m2q6_7bs3kIM/</a>               | <a href="https://istina.msu.ru">https://istina.msu.ru</a>                               | 15 Сен 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [16] | 0,13%         | не указано  | <a href="https://tel.archives-ouvertes.fr">https://tel.archives-ouvertes.fr</a>         | 08 Мая 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [17] | 0,3%          | DEAD-box helicase DDX27 regulates 3' end formation of ribosomal 47S RNA and stably a...   | <a href="https://doi.org">https://doi.org</a>   | 23 Авг 2019 | Модуль поиска Интернет |
| [18] | 0,29%         | Multi-species, multi-transcription factor binding highlights conserved control of tissue-sp.  | <a href="https://hal-amu.archives-ouvertes.fr">https://hal-amu.archives-ouvertes.fr</a> | 29 Июн 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [19] | 0,26%         | Автореферат   | <a href="https://istina.msu.ru">https://istina.msu.ru</a>                               | 25 Июл 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [20] | 0,2%          | Transcriptional mutagenesis: causes and involvement in tumour development   | <a href="https://doi.org">https://doi.org</a>   | 19 Авг 2019 | Модуль поиска Интернет |

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчет о проверке текста научно-квалификационной работы на  
объем заимствования

Очкасова Анастасия Сергеевна

«Неканонические функции рибосомного белка S3 в составе рибосом»

Оригинальность работы составляет \_\_\_91.41\_\_\_ %, что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.х.н. Д.С. Новопашина