

На правах рукописи



ШАРИФУЛИН ДМИТРИЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ

**ПЕПТИДЫ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ eS26, uS7 и uS3,  
УЧАСТВУЮЩИЕ В ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ У  
МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Новосибирск - 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении  
науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины  
СО РАН

Научный руководитель:

**Грайфер Дмитрий Маратович** д.х.н., доцент  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Официальные оппоненты:

**Сергиев Пётр Владимирович**, д.х.н.  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Московский государственный университет имени  
М. В. Ломоносова», профессор кафедры химии природных соединений

**Локтев Валерий Борисович**, д.б.н., профессор  
Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр  
вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, заведующий  
отделом молекулярной вирусологии flavivirusов и вирусных гепатитов

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится 30 июня 2017 года в 12:00  
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Институт химической  
биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу 630090,  
г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Институт химической  
биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте  
[www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан 5 мая 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

к.х.н., доцент



Коваль В. В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Одним из важнейших процессов жизнедеятельности организмов всех царств является процесс трансляции на рибосомах. Первым этапом трансляции является инициация, которая у эукариот начинается на изолированной малой (40S) субчастице рибосомы с участием факторов инициации трансляции, инициаторной Met-тРНК<sub>i</sub> и мРНК, образующими 48S предынициаторный комплекс (PIC, от англ. preinitiation complex). Этот этап заканчивается образованием не содержащего факторов инициации комплекса 80S рибосомы с мРНК и инициаторной Met-тРНК<sub>i</sub>, взаимодействующей со старт-кодоном мРНК в Р-участке. Процесс инициации трансляции у эукариот значительно усложнен по сравнению с таковым у прокариот и вовлекает во много раз большее число факторов инициации. При канонической инициации 40S субчастица в комплексе с факторами инициации и Met-тРНК<sub>i</sub> связывается с 5'-концом мРНК и сканирует её до тех пор, пока старт-кодон AUG не окажется в результате его узнавания Met-тРНК<sub>i</sub> в Р-участке. Геномные РНК некоторых вирусов содержат в 5'-НТО особые структурные элементы, так называемые IRES (от англ. Internal Ribosomal Entry Site), которые направляют старт-кодон в Р-участок либо без сканирования, либо по упрощенному механизму сканирования, вовлекающему меньшее число факторов, чем при канонической инициации трансляции.

К началу выполнения настоящей работы данные о строении участков связывания лигандов на 40S рибосомной субчастице в предынициаторных комплексах высших эукариот были очень ограниченными. Например, практически отсутствовала информация о взаимодействиях рибосом с факторами инициации и 5'-НТО мРНК. Метод крио-электронной микроскопии (крио-ЭМ), с помощью которого преимущественно получали такую информацию, из-за недостаточного разрешения не позволял идентифицировать непосредственные молекулярные контакты между компонентами рибосомы и её лигандами в различных инициаторных комплексах.

Химические подходы, основанные на аффинной модификации рибосом или её лигандов, оказались продуктивными для изучения структурно-функциональной организации рибосом млекопитающих. Так, с помощью аффинной модификации рибосом человека и кролика аналогами мРНК, несущими реакционноспособные группы в определенных положениях, на уровне рибосомных белков и нуклеотидов рРНК была установлена структурная организация их мРНК-связывающего центра (Graifer et al., 2004; Pisarev et al. 2008). Кроме того, были выявлены рибосомные белки, участвующие в формировании участка связывания IRES-элемента геномной РНК вируса гепатита С (HCV, от англ. hepatitis C virus) на 40S субчастице (Laletina et al., 2006; Babaylova et al, 2009). С помощью этого подхода удалось

также определить фрагмент рибосомного белка (рр, от англ. ribosomal protein) uS19 (S15 согласно старой номенклатуре), взаимодействующий с мРНК в декодирующем центре рибосомы (Khairulina et al., 2010), и пептиды фактора терминации eRF1, принимающие участие в распознавании стоп-кодона при завершении трансляции (Bulygin et al., 2010; 2011). Результаты по аффинной модификации рибосом млекопитающих фотоактивируемыми аналогами мРНК показали, что фрагмент мРНК с 5'-стороны от кодона в Е-участке, соответствующий её 5'-НТО при инициации трансляции, соседствует с рр eS26 (Graifer et al., 2004; Pisarev et al. 2008), хотя сам кодон взаимодействует непосредственно с рр uS7 (S5) (Pisarev et al., 2006). Более того, оказалось, что остатки 4-тиоуридина в аналогах мРНК могут из одного и того же положения сшиваться как с рр uS7, так и фактором eIF2 $\alpha$  (Pisarev et al., 2006), на основании чего можно сделать предположение о том, что эти белки соседствуют или даже контактируют в 48S PIC.

В дополнение, было обнаружено, что короткие реакционноспособные аналоги мРНК способны сшиваться с рр uS3 независимо от того, фиксирован ли аналог мРНК на рибосоме кодон-антиконовым взаимодействием с тРНК. Эти наблюдения свидетельствовали о том, что аналоги мРНК сшивались с рр uS3 вне мРНК-связывающего центра, и указывали на повышенное сродство этого белка к неструктурированным РНК. Согласно данным крио-ЭМ рр uS3 расположен в 40S субчастице вблизи участка входа в мРНК-связывающий канал, где ранее наблюдали конформационные перестройки, индуцируемые связыванием с 40S субчастицей HCV IRES (Span et al. 2001) или факторов eIF1 и eIF1A (Passmore et. al., 2007). На основании этих данных было сделано предположение, что благодаря этим перестройкам устанавливается связь между рр uS3 и спиралью h16 18S рРНК, расположенной вблизи участка входа мРНК (Passmore et. al., 2007). Однако эта гипотеза не получила дальнейшего подтверждения, хотя позже появилась крио-ЭМ модель структуры 43S PIC, из которой следовало, что у млекопитающих за образование такой связи может отвечать геликаза DHX29, а не факторы eIF1 и eIF1A (Hashem et al., 2013).

**Цель работы** - установление пептидов рибосомных белков eS26, uS7 и uS3, ответственных за их взаимодействие с ключевыми лигандами рибосомы - мРНК и белковыми факторами в процессе инициации трансляции у млекопитающих, а также выяснение вопроса об участии рр uS3 в конформационных перестройках 40S субчастицы в участке входа в мРНК-связывающий канал.

В ходе работы планировалось решить следующие **задачи**:

- 1) идентифицировать пептиды рр eS26, взаимодействующие с частью мРНК с 5'-стороны от кодона в Е-участке 80S рибосомы, соответствующей её 5'-НТО при инициации трансляции, с использованием подхода, основанного на аффинной модификации рибосом аналогами мРНК, несущими фотоактивируемую группу на определенном нуклеотидном остатке;

2) определить контакты между гр uS7 и факторами инициации трансляции в 48S PIC, собранных на модельных канонических мРНК и на РНК, соответствующей HCV IRES, с помощью метода белок-белковых сшивок, индуцируемых формальдегидом;

3) идентифицировать пептид гр uS3, способный в составе 40S субчастиц и 80S рибосом сшиваться с диальдегидными производными олигорибонуклеотидов, не фиксированными в мРНК-связывающем центре рибосомы;

4) установить, как меняется доступность структурных элементов 40S субчастицы, расположенных вблизи участка входа в мРНК-связывающий канал, – гр uS3 и спирали h16 18S рРНК – для различных химических зондов в процессе трансляции.

### **Научная новизна и практическая значимость работы.**

В настоящей работе на пептидно-нуклеотидном уровне разрешения установлен ряд структурно-функциональных аспектов молекулярных механизмов, лежащих в основе инициации трансляции у высших эукариот. С помощью аффинной модификации рибосом аналогами мРНК, несущими перфторарилазидогруппу в заданном положении, показано, что эукариот-специфичный мотив 62-YxxPKxYxK-70 гр S26e участвует в поддержании пути мРНК от области кодон-антикодоновых взаимодействий до места её выхода из рибосомы, соседствуя с частью мРНК, соответствующей её 5'-НТО при инициации трансляции. С помощью метода сшивок с использованием формальдегида установлено, что в 48S PIC, образуемом после узнавания старт-кодона мРНК тройным комплексом  $eIF2 \cdot Met-tRNA_i^{Met} \cdot GTP$ , субъединица  $\alpha$  фактора eIF2 взаимодействует с гр uS7 благодаря крупным конформационным перестройкам в eIF2 $\alpha$ , сопровождающим связывание eIF2 с 40S субчастицей. С использованием производных олигорибонуклеотидов с окисленной 3'-концевой рибозой идентифицирован РНК-связывающий пептид 55-TQNVLGEKGR-64 в консервативном домене КН гр uS3, ответственный за способность рибосом взаимодействовать с короткими одноцепочечными РНК вне мРНК-связывающего центра, который оказался экспонированным на поверхности 40S субчастицы вблизи участка входа мРНК. Показано, что в 48S PIC этот пептид теряет способность взаимодействовать с одноцепочечными РНК, когда субъединица j фактора eIF3 связана в мРНК-связывающем центре 40S субчастицы, но после диссоциации eIF3j гр uS3 становится снова доступным. С помощью химического футпринтинга удалось выявить роль eIF3j в реструктурировании региона 40S субчастицы вблизи участка входа в мРНК-связывающий канал. Оказалось, что в присутствии eIF3j резко уменьшается конформационная гибкость спирали h16 18S рРНК, расположенной в этом регионе вместе с гр uS3. После диссоциации eIF3j изменённая конформация спирали h16 поддерживается фактором DHX29, а после его диссоциации эта же конформация h16 сохраняется в 80S рибосомных комплексах, по крайней

мере, до образования пептидной связи на первом цикле элонгации. Результаты по исследованию доступности  $gr\ uS3$  и  $h16\ 18S\ рPHK$  в  $48S\ PIC$  показали, что конформационные изменения  $40S$  субчастицы вблизи участка входа мРНК происходят без участия  $gr\ uS3$ . Установлено, что взаимодействия между  $eIF2\alpha$  и  $gr\ uS7$ , а также  $eIF3j$ -зависимое реструктурирование  $40S$  субчастицы, приводящее к экранированию  $gr\ uS3$ , являются универсальными чертами канонической и HCV IRES-зависимой инициации трансляции у млекопитающих, обеспечивающими правильное расположение кодирующей части мРНК в соответствующих  $48S\ PIC$ . Таким образом, в настоящей работе получена новая информация о конкретных пептидах рибосомных белков  $eS26$ ,  $uS7$  и  $uS3$ , обеспечивающих взаимодействие малой субчастицы рибосомы с мРНК и факторами  $eIF2\alpha$  и  $eIF3j$  при инициации трансляции у высших эукариот. Эта информация является принципиально важной для понимания молекулярных механизмов инициации трансляции у эукариот и тех регуляторных процессов, которые обеспечивают эффективность и точность белкового синтеза.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Фрагмент 60-71 в центральной части белка  $gr\ eS26$  контактирует с частью мРНК с 5'-стороны от кодона в Р-участке, которая соответствует 5'-НТО в процессе инициации трансляции у млекопитающих.
2. N-концевые фрагменты  $gr\ uS7$  и субъединицы  $\alpha$  фактора инициации  $eIF2$  взаимодействуют между собой в  $48S\ PIC$  благодаря крупным перестройкам в  $eIF2\alpha$ , которые сопровождают связывание тройного комплекса  $eIF2 \cdot Met\text{-}tPHK_i^{Met} \cdot GTP$  с  $40S$  рибосомной субчастицей.
3. Пептид 55-64 в КН-домене  $gr\ uS3$ , расположенный вне мРНК-связывающего центра рибосомы, обеспечивает уникальную способность  $gr\ uS3$  взаимодействовать с короткими одноцепочечными РНК.
4. Субъединица  $j$  фактора инициации  $eIF3$  экранирует пептид 55-64  $gr\ uS3$  от взаимодействия с одноцепочечными РНК в  $48S\ PIC$ , а после диссоциации  $eIF3j$ , происходящей в результате фиксации мРНК в мРНК-связывающем канале, этот пептид становится вновь доступным.
5. При формировании  $PIC$ , содержащих факторы  $eIF3j$  или DHX29, рибосомный белок  $uS3$  не образует новых связей со спиралью  $h16\ 18S\ рPHK$ , но присутствие этих факторов приводит к изменению конформации данной спирали, делающему её более жёсткой, что сохраняется и после их диссоциации, по крайней мере, до начала первого цикла элонгации.
6. Канонический и HCV IRES-зависимый механизмы инициации трансляции у млекопитающих имеют общие черты, связанные с взаимодействием  $gr\ uS7$  с  $eIF2\alpha$  и с индуцированным  $eIF3j$  реструктурированием  $40S$  субчастицы, приводящим к экранированию РНК-связывающего пептида  $gr\ uS3$ .

**Публикации и апробация работы.** По материалам диссертации опубликовано 4 печатных работы. Результаты работы были представлены на

следующих международных и российских конференциях: II международной конференции «Физико-химическая биология», посвященной 85-летию академика Д.Г. Кнорре (Новосибирск, 2011), V международной конференции-школе «Фундаментальные вопросы масс-спектрометрии и ее аналитические применения» (Санкт-Петербург, 2013), 38<sup>rd</sup> FEBS Congress Young Scientists Forum (Санкт-Петербург, 2013), Российско-Французском симпозиуме «Белок-нуклеиновые взаимодействия в живых системах» (Новосибирск, 2013), VII Российском симпозиуме «Белки и Пептиды» (Новосибирск, 2015) и международной конференции «Химическая биология-2016», посвященной 90-летию юбилею академика Д.Г. Кнорре (Новосибирск, 2016).

**Структура и объём работы.** Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста, состоит из введения, трёх глав, заключения, выводов, списка литературы, и содержит 9 таблиц и 46 рисунков.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**1. Экспериментальная часть.** Исследования выполнены с использованием либо очищенных субчастиц рибосом человека, либо лизата ретикулоцитов кролика (ЛРК). В работе применены такие методы, как аффинная модификация, белок-белковое сшивание формальдегидом и химический футпринтинг. Производные олигорибонуклеотидов, содержащие этилендиаминовый линкер на атоме С5 остатка уридина, и немодифицированные РНК-олигомеры были синтезированы и охарактеризованы в Лаборатории химии РНК (ИХБФМ СО РАН). Масс-спектры MALDI-TOF были сняты в центре масс-спектрометрического анализа Объединенного центра геномных, протеомных и метаболомных исследований ИХБФМ СО РАН.

**2. Результаты исследования.**

**2.1. Определение фрагментов рибосомного белка gr eS26, соседствующих с мРНК на рибосоме человека**

Аналоги мРНК, использованные в настоящей работе для аффинной модификации gr eS26 (табл. 1), содержали сшивающую 2,3,5,6-тетрафторфенилазидобензоильную группу (АТВ), присоединенную к остатку уридина через этилендиамидный спейсер, фенилаланиновый кодон UUU, а также радиоактивную метку на 5'-конце. Сшивку аналогов мРНК с gr eS26 проводили в составе тройных комплексов с 80S рибосомами человека и тРНК<sup>Phe</sup>, которая направляла фенилаланиновый кодон в Р-участок рибосомы, а остаток уридина с АТВ группой – соответственно в положение от +1 до -9 относительно первого нуклеотида кодона в Р-участке. Полученные комплексы моделировали состояние рибосомы после окончания инициации перед началом первого цикла элонгации - 80S инициаторный комплекс с инициаторной тРНК в Р-участке и свободным А-участком.

Для образования ковалентной связи между аналогом мРНК и рибосомой комплексы облучали мягким УФ-светом с длиной волны >290 нм.

**Таблица 1.** Аналоги мРНК, использованные для модификации гр eS26 в составе комплексов 80S рибосом человека. Звёздочкой обозначен модифицированный остаток уридина, несущий АТВ-группу. Обозначения аналогов отражают положение модифицированного остатка уридина.

Аналоги мРНК	Последовательность аналога	Положение модифицированного нуклеотида относительно первого нуклеотида кодона, направляемого в Р-участок
+1U	pU*UU GUU	+1
-3U	pU*CC UUU	-3
-4U	pU* GUG UUU	-4
-6U	pU*CU GUG UUU	-6
-9U	pU*CU CUC GUG UUU	-9

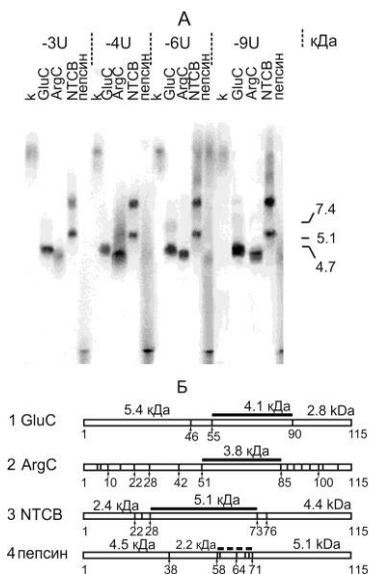


Рис. 1 Электрофоретическое разделение фрагментов гр eS26, образующихся после обработки белка, сшитого с 5'-мечеными аналогами мРНК, РНКазой А и различными протеолитическими агентами, включая протеиназу К. (А) Радиоавтограф. Дорожки «к» - необработанный модифицированный гр eS26. Молекулярные массы белковых маркеров в кДа указаны справа от панели. (Б) карты расщепления гр eS26 человека с помощью ArgC, GluC, NTCB и пепсина. Сверху указаны молекулярные массы образующихся фрагментов, рассчитанные с помощью программы Peptide cutter ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). Жирные линии соответствуют фрагментам гр eS26, сшитым с мРНК, по данным, представленным на панели А.

Участок сшивки в гр eS26 определяли для аналогов -4, -6 и -9, поскольку для них гр eS26 являлся основной мишенью модификации. Модифицированный гр eS26 (гр eS26\*), выделенный из облученных 80S рибосом, в параллельных экспериментах гидролизовали эндопептидазами ArgC, GluC и пепсином, а также 2-нитро-5-тиоцианобензойной кислотой (NTCB), расщепляющей пептиды по остаткам цистеина. Анализ образовавшихся продуктов гель-

электрофорезом в трис-трициновой системе с последующей радиоавтографией показал, что участок сшивки в гр eS26 одинаков у всех аналогов мРНК. Сопоставление электрофоретической подвижности продуктов расщепления с теоретическими массами пептидов, которые могут образоваться при гидролизе гр eS26 каждым из протеолитических агентов (рис. 1Б), позволило установить, что участок сшивки аналогов мРНК находится во фрагменте 59-71 гр eS26. Для более точной локализации участка сшивки полосы, соответствующие модифицированному пептиду, полученному при расщеплении гр eS26\* с помощью эндопептидазы ArgC, обрабатывали эндопептидазой AspN, что дало возможность исключить из рассмотрения фрагмент 52-59 (рис. 2). Таким образом, установлено, что участок сшивки аналогов мРНК находится в положении 60-71 гр eS26.

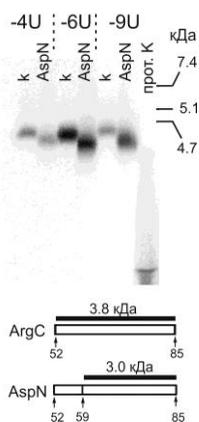


Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов последовательного гидролиза гр eS26\* эндопептидазой ArgC (дорожки k), а затем AspN (дорожки AspN). Радиоавтограф. Обозначения аналогов мРНК, использованных для сшивки, приведены сверху. На дорожке *prot. K* представлен анализ продуктов расщепления немодифицированного гр eS26 протеиназой K. Сбоку указаны положения полос, соответствующих маркерам молекулярной массы пептидов. Снизу приведено схематическое представление фрагмента 52-85 и схема его расщепления эндопептидазой AspN.

Множественное выравнивание последовательностей гр eS26 из разных организмов показало, что фрагмент 60-71 содержит мотив 62-YxxPKxYxK-70, консервативный у эукариот, но не у архей. Следовательно, с 5' НТО мРНК на 80S рибосоме человека соседствует уникальный для эукариот мотив YxxPKxYxK гр eS26.

## 2.2. Определение контактов гр uS7 с факторами инициации трансляции в составе 48S PIC млекопитающих

Для определения контактов между гр uS7 и факторами инициации (eIFs) в 48S PIC соответствующие комплексы были собраны в бесклеточной белоксинтезирующей системе на основе лизата ретикулоцитов кролика (ЛРК) в присутствии негидролиземого аналога GTP, останавливающего процесс трансляции на стадии образования таких PIC, с использованием двух типов мРНК. Одна из них (обозначаемая кмРНК) позволяла моделировать инициацию трансляции по каноническому механизму; она содержала 5'- и 3'-

НТО и часть, кодирующую тетрапептид Met-Phe-Phe-Phe. Другая мРНК была HCV IRES (IRES<sub>FL</sub>); она соответствовала фрагменту 40-372 HCV РНК.

Для фиксации контактов между рибосомными белками и eIFs соответствующие реакционные смеси обрабатывали формальдегидом, образующим обратимые белок-белковые сшивки. После этого 48S PIC выделяли центрифугированием в градиенте плотности сахарозы и разрушали; сшитые белки анализировали с помощью гель-электрофореза в присутствии SDS и последующего иммуноблотинга с использованием специфических антител против гр uS7. В параллельных экспериментах анализировали белки, выделенные из свободных 40S субчастиц человека, обработанных формальдегидом, а также белки из необработанных 48S PIC. В результате этого анализа выявлена сшивка гр uS7 с одним из eIFs в составе 48S PIC для обеих модельных мРНК (Рис. 3). Масс-спектрометрический анализ пептидов, полученных в результате трипсинолиза вырезанной из окрашенного геля полосы, соответствующей продукту сшивки гр uS7, показал, что этот белок сшивается с  $\alpha$ -субъединицей фактора инициации eIF2. Для идентификации сшитых пептидов, образующихся в результате трипсинолиза сшитых гр uS7 и eIF2 $\alpha$ , связь между ними разрушали нагреванием и сравнивали масс-спектры до и после разрушения этой связи. В результате в масс-спектрах пептидов, полученных до разрушения связи между сшитыми белками, как для кмРНК, так и с IRES<sub>FL</sub> были выявлены два пика с массами (m/z) 2400.06 и 2873.37 Да, которые отсутствовали в масс-спектрах пептидов после разрушения этой связи. Для того, чтобы отнести эти пики к сшитым пептидам гр uS7 и eIF2 $\alpha$ , m/z пиков сравнивали с массами, полученными при сложении масс всех возможных триптических пептидов белков eIF2 $\alpha$  и гр uS7, с добавлением массы метиленовой группы (14 Да). В результате были идентифицированы две пары контактирующих пептидов в N-концевых участках гр uS7 и eIF2 $\alpha$ : продукту с m/z около 2400 Да соответствовала сшивка между пептидами 72-85 гр uS7 и 81-87 eIF2 $\alpha$ , а продукту с m/z около 2873 Да - сшивка ацетилированного по остатку треонина во втором положении пептида 2-18 гр uS7 с фрагментом 68-75 eIF2 $\alpha$ .

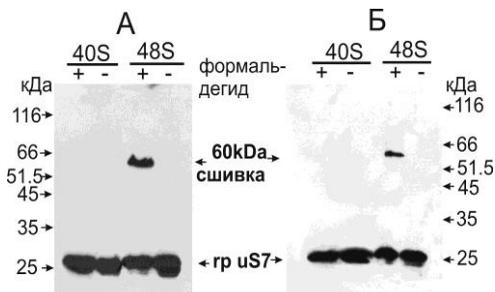


Рис. 3. Анализ сшивки гр uS7 с eIFs иммуноблотингом с использованием антител против гр uS7. Разделение белков из 48S PIC, собранных на кмРНК (А), либо на IRES<sub>FL</sub> (Б) после обработки формальдегидом (+), или без обработки (-). Стрелками указаны положения гр uS7 и его продукта сшивки. Сбоку указаны положения полос, соответствующих маркерам молекулярных масс белков.

### 2.3. Определение участка гр uS3, ответственного за его взаимодействие с короткими одноцепочечными РНК

Следующим этапом работы было определение пептида гр uS3, взаимодействующего с короткими неструктурированными РНК в различных модельных комплексах рибосом. Для этого использовали производные олигорибонуклеотидов с 3'-концевым остатком рибозы, окисленным до диальдегида. Такие производные способны сшиваться с белками посредством образования оснований Шиффа с остатками лизина или аргинина. Их последовательности (табл. 2) были выбраны так, чтобы они могли служить также аналогами мРНК, положение которых на рибосоме можно фиксировать с помощью тРНК<sup>Phe</sup>, узнающей фенилаланиновый кодон. Аналоги мРНК брали в избытке по отношению к рибосомам, что позволяло им связываться в мРНК-связывающем центре, и взаимодействовать с гр uS3 вне этого центра. Полученные таким образом рибосомные комплексы обрабатывали цианоборгидридом для восстановления оснований Шиффа, образованными данными производными, и образования необратимых РНК-белковых сшивок.

Обозначение	Последовательность производного
+7A	AAAA <u>UUC</u> GACA*
+9A	AAA <u>UUC</u> GACAAA*
+12A	<u>UUC</u> GACAAAAA*
+3C	AAUAAA <u>UUC</u> *
+4A	AUAAA <u>UUC</u> A*
+5A	UAAA <u>UUC</u> AA*

**Таблица 2.** Диальдегидные производные олигорибонуклеотидов, использованные в настоящей работе. Фенилаланиновый кодон подчеркнут, 3'-концевой нуклеотид, содержащий окисленный до диальдегида остаток рибозы, отмечен звёздочкой. Обозначения соответствуют положению 3'-концевого нуклеотида аналога мРНК относительно первого нуклеотида фенилаланинового кодона.

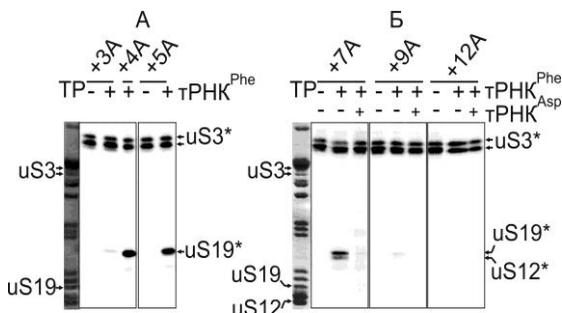


Рис. 4. Анализ белков, сшитых в комплексах 80S рибосом с 5'-[<sup>32</sup>P]-мечеными производными олигорибонуклеотидов +3A, +4A, +5A (А) и +7A, +9A, +12A (Б) (радиоавтографы). Дорожки TP – окрашенный кумасси гель после разделения белков 40S субчастиц. Полосы сшитых белков отмечены звёздочкой.

Результаты электрофоретического анализа белков, сшитых с мечеными производными РНК (рис. 4), показали, что независимо от присутствия тРНК во всех дорожках проявляется двойная полоса, положение которой соответствует ожидаемому положению сшитого гр uS3. Наблюдаемое раздвоение полос гр uS3 вызвано тем, что в 40S субчастице рибосом человека

этот белок присутствует в двух формах - фосфорилированной и нефосфорилированной. В дорожках, соответствующих комплексам, образованным с участием тРНК, где остаток окисленной рибозы находился в положениях от +4 до +7, присутствует также полоса, которую можно отнести к сшитому гр uS19 (S15) в соответствии с полученными ранее данными (Graifer et al., 2004; Molotkov et al., 2006). Идентификация сшитых рибосомных белков uS3 (Рис. 5) и uS19 подтверждена с помощью иммуноблотинга с использованием специфичных антител против соответствующих белков.

Участок сшивки в гр uS3 определен на примере производного +7A (см. табл. 2) в составе бинарной смеси с рибосомами и в составе комплекса рибосом, образованного с участием тРНК. Путем сопоставления масс-спектров триптических пептидов сшитого белка до и после гидролиза РНКазой А остатков пришитого к ним олигорибонуклеотида выявлен единственный пик с  $m/z$  около 1335 Да, появляющийся в результате обработки пептидов РНКазой А, для обоих типов комплексов. С помощью анализа всех возможных комбинаций масс триптических пептидов гр uS3 с учетом массы сшитого с ними модифицированного остатка аденозина, оставшегося после гидролиза РНКазой А пришитого олигорибонуклеотида, установлен пептид 55-TQNVLGEKGR-64 гр uS3, по которому происходила сшивка. Этот пептид удалён от мРНК-связывающего центра и входит в состав консервативного КН-домена гр uS3, представляющего собой структурный мотив, характерный для белков, взаимодействующих с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами (Garcia-Mayoral et al., 2007; Yadavilli et al., 2009).

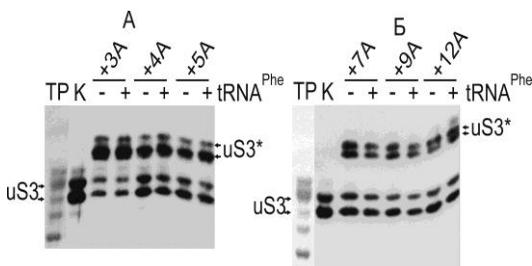


Рис. 5. Идентификация белков, сшитых с производными РНК +3А, +4А, +5А (А) и +7А, +9А, +12А (Б) в составе 80S комплексов, иммуноблотингом с использованием антител против гр uS3. Дорожка К – суммарный белок 40S субчастицы. Сшитые белки отмечены звездочкой. Дорожка TP – окрашенный гель после разделения белков 40S субчастицы.

#### 2.4. Определение степени экспонированности гр uS3 на различных стадиях трансляции

Степень экспонированности гр uS3 исследовали в составе 48S PIC и 80S комплексов, полученных в ЛРК с использованием, соответственно, негидролиземого аналога GTP и антибиотика анизомицина, блокирующего образование пептидной связи. В качестве зондов использовали  $^{32}$ P-меченые диальдегидные производные РНК, взятые в избытке по отношению к

рибосомам, и выполняющие одновременно роль модельных мРНК для сборки 48S PIC. Трансляционные комплексы, образующиеся при участии канонического набора факторов инициации (Рис. 6), получали с использованием производных 43-49-звенных РНК (табл. 3), содержащих в 3'-концевой части триплет AUG. Для моделирования 48S PIC, образующихся по HCV IRES-зависимому пути (Рис. 6), использовали фрагмент HCV IRES, ограниченный с 3'-конца старт-кодоном AUG (IRES<sub>AUG</sub>). В комплексах с мРНК MI-МIII окисленный остаток рибозы оказывался в положении от +4 до +9 относительно первого нуклеотида старт-кодона в Р-участке.

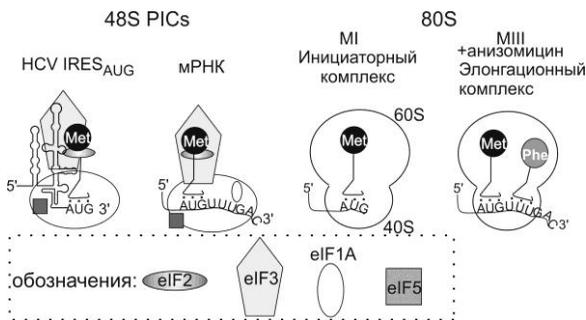


Рис. 6. Схематическое изображение 48S PIC и 80S комплексов, полученных с использованием ЛРК. Комплексы с мРНК МII не показаны, поскольку они точно соответствует комплексам с мРНК МIII.

Анализ сшитых белков с помощью гель-электрофореза выявил ожидаемую двойную полосу, соответствующую сшитому гр uS3, в контрольной дорожке с бинарной смесью мРНК MI с 40S субчастицами (Рис. 7А); аналогичная полоса присутствует также в дорожках, соответствующих 48S PIC и 80S EC, собранных в ЛРК на мРНК МIII (Рис. 7А). После гидролиза сшитого с белком остатка РНК положение двоящейся радиоактивной полосы в соответствующих дорожках практически совпадает с положением полос не модифицированного гр uS3 в окрашенном геле (Рис. 7Б, левая дорожка).

Кроме полос сшитого гр uS3, со всеми производными РНК для 48S PIC выявлена полоса в нижней части геля, соответствующая сшитому гр uS19. Модификация гр uS19 характерна для аналогов мРНК, в которых нуклеотид со сшивающей группой расположен в декодирующем центре или в кодоне, прилегающем к нему с 3'-стороны (см. выше). Сшивка с этим же белком происходит и в 48S PIC, собранном на производном IRES<sub>AUG</sub> (Рис. 7Б, правая дорожка), что подтверждает правильное позиционирование старт-кодона производного IRES<sub>AUG</sub> в Р-участке. Полученные результаты показали, что в 48S PIC экспонированный на поверхности 40S субчастицы РНК-связывающий пептид 55-64 гр uS3 оказывается недоступным для сшивки с производными РНК, когда мРНК, на которой собран комплекс, содержит после старт-кодона менее 4 нуклеотидов, при этом в 80S комплексах его доступность не зависит от длины кодирующей части модельной мРНК (Рис. 7А и Б, дорожки 80S).

**Таблица 3.** Последовательности РНК, использованных в качестве мРНК для сборки модельных комплексов, образующихся в результате инициации трансляции по каноническому механизму. Старт-кодон выделен и подчеркнут.

РНК	Последовательность
М I	5'- GCCUAAGCUUACAAAUACUCCCCACAACAGCUUGUCGAC <u>CAUG</u> -3'
М II	5'- GCCUAAGCUUACAACGACGGACAACAACAGCUUGUCGAC <u>CAUGUUC</u> -3'
М III	5'- CCUAAGCUUACAACGACGGACAACAACAGCUUGUCGACC <u>AUGUUCGAC</u> -3'

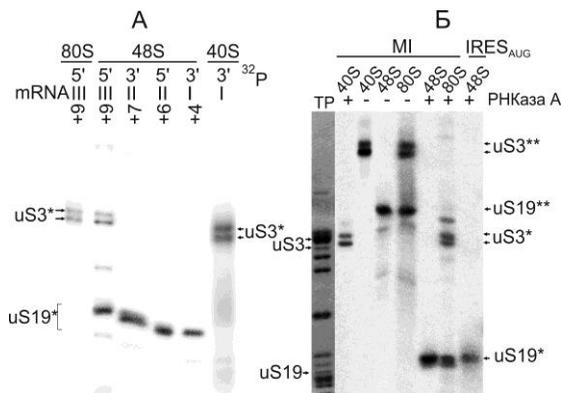


Рис. 7. Электрофоретическое разделение белков, синтезированных с производными РНК МI-МIII, содержащими окисленную рибозу на 3'-конце, в модельных комплексах (радиоавтографы). А, сшивка с производными РНК МI-МIII, мечеными либо по 3'-концу с помощью [<sup>32</sup>P]С (обозначены 3'), либо по 5'-концу (обозначены 5'). Положение нуклеотида с окисленной рибозой относительно первого нуклеотида старт-кодона обозначено цифрами вверху геля. Обозначения I-III соответствуют РНК МI-МIII. Б, сшивка с производными IRES<sub>AUG</sub> и МI, мечеными [<sup>32</sup>P]С, после исчерпывающего гидролиза РНКазой А (+) или без гидролиза (-). Дорожка TP - окрашенный гель после разделения белков 40S субчастицы. Положения синтезированных белков указаны стрелками. Обозначение \*\* соответствует синтезированным белкам без гидролиза РНКазой А, а \* - с гидролизом.

Таким образом, в случае аналогов мРНК, содержащих не более 4-х нуклеотидов после старт-кодона, экранирование РНК-связывающего пептида

55-64 гр uS3 происходит на стадии образования 48S PIC, а после присоединения к нему 60S субчастицы белок становится вновь доступным.

Очевидно, что экранирование вышеупомянутого пептида гр uS3 обусловлено связыванием факторов инициации с 40S субчастицей, а не сканированием мРНК, поскольку оно проявляется в 48S PIC, собранных как на модельных канонических мРНК, так и на IRES<sub>AUG</sub>, образующем 48S PIC без сканирования. Известно, что вблизи участка входа в мРНК-связывающийся канал, где расположен гр uS3, могут связываться два фактора - субъединица j фактора eIF3 (eIF3j) и так называемый фактор сканирования DHX29, необходимый для эффективной трансляции структурированных мРНК у высших эукариот. Присутствие eIF3j и DHX29 в 48S PIC и 80S комплексах, собранных на модельных канонических мРНК, а также на IRES<sub>FI</sub> и IRES<sub>AUG</sub>, проверено с помощью иммуноблотинга с использованием соответствующих специфических антител (Рис. 8). Фактор eIF3j детектировался практически только в 48S PIC, собранных на мРНК MI и на IRES<sub>AUG</sub>, не содержащих триплетов после старт-кодона (Рис. 8А). Геликазы DHX29 обнаружена также только в 48S PIC, но уровень его связывания находился в обратной зависимости от уровня связывания eIF3j (Рис. 8Б). В случае IRES<sub>FI</sub> и IRES<sub>AUG</sub> те же закономерности проявлялись при более низких уровнях связывания DHX29 (полоса которого практически не видна в дорожке, соответствующей 48S PIC с IRES<sub>AUG</sub>). Таким образом, результаты иммуноблотинга, представленные на Рис. 8А, позволяют заключить, что экранирование РНК-связывающего фрагмента КН-домена гр uS3, наблюдаемое в 48S PIC, собранных на мРНК MI (Рис. 7А и Б), MII (Рис. 7А) и на IRES<sub>AUG</sub> (Рис. 7Б), вызвано связыванием eIF3j в непосредственной близости от участка входа мРНК в рибосому.

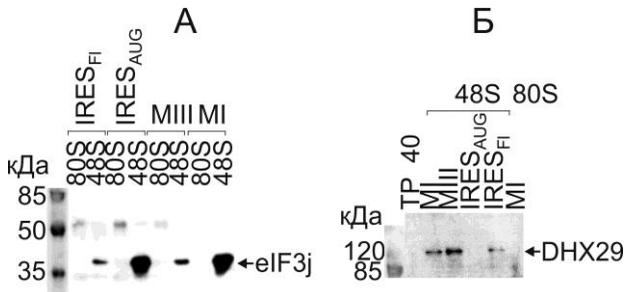


Рис. 8. Определение содержания eIF3j (А) или DHX29 (Б) в комплексах, полученных в присутствии ЛРК, с помощью иммуноблотинга. Производные РНК, использованные для получения комплексов, обозначены вверху над линиями. Комплексы 80S рибосом с мРНК MIII и IRES<sub>FI</sub> получены в присутствии анизомицина. Положения маркеров молекулярной массы указаны слева. Полосы, соответствующие eIF3j и DHX29, указаны стрелками. Дорожка TP – анализ белков 40S субчастицы.

## 2.5. Химический пробинг структуры 18S рРНК вблизи участка входа мРНК

Для проверки гипотезы об установлении связи между гр uS3 и спиралью h16 18S рРНК, в процессе инициации трансляции (см. выше) изучали изменения в доступности соответствующего района 18S рРНК в процессе трансляции. Для этой цели сравнивали эффективность модификации нуклеотидов в h16 бензоилцианидом (BzCN) в свободных 40S субчастицах, 48S PIC и в 80S комплексах. Этот реагент предпочтительно атакует конформационно-подвижные нуклеотиды, образуя ковалентные аддукты с 2'-ОН-группами остатков рибозы (Weeks, 2010). Уровень модификации нуклеотидов рРНК определяли с помощью обратной транскрипции с использованием AMV-ревертазы, делающей паузы на модифицированных нуклеотидах, с последующим разделением продуктов удлинения праймера на модифицированной рРНК гель-электрофорезом.

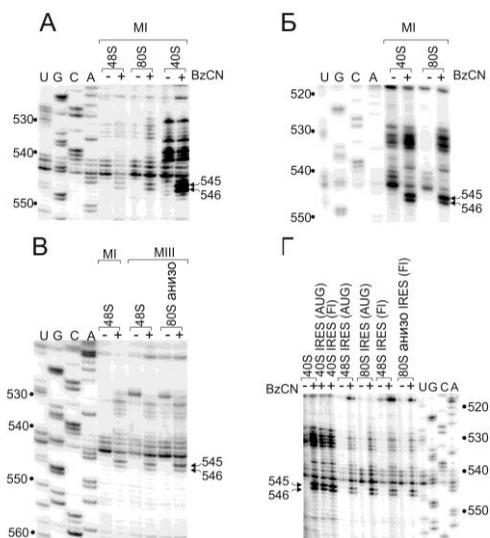


Рис. 9. Анализ доступности участка 18S рРНК, включающего h16, для модификации BzCN в 48S PIC и 80S пост-инициаторных комплексах, собранных в ЛРК на мРНК MI (А и В) и MIII (В) и на IRES<sub>AUG</sub> и IRES<sub>FI</sub> (Г). Радиоавтографы гелей, показывающие результаты разделения продуктов обратной транскрипции на рРНК, выделенной из рибосомных комплексов, обработанных (+), либо необработанных (-) BzCN, с использованием <sup>32</sup>P- меченого праймера, комплементарного участку 655-674 18S рРНК. Панель Б, то же самое на 18S рРНК, выделенной из бинарных смесей 40S субчастиц или 80S рибосом человека с соответствующими мРНК в отсутствие факторов инициации. Дорожки “40S” в панелях А и Г, - удлинение праймера на 18S рРНК, выделенной из бинарных смесей 40S субчастиц с соответствующими матрицами. А, С, Г и U - сиквенсные дорожки, номера нуклеотидов 18S рРНК указаны сбоку. Положения нуклеотидов, на которых фермент делал паузы, указаны стрелками.

Анализ результатов обратной транскрипции на 18S рРНК, выделенной из соответствующих комплексов, показал, что VzCN модифицирует лишь два нуклеотида A544 и A545 в центральной части спирали h16 (Рис. 9). Эти нуклеотиды сильно модифицировались в свободных 40S субчастицах рибосом человека и в 80S рибосомных комплексах, полученных без участия факторов инициации (Рис. 9Б и А, Г, дорожки *40S*, *40S IRES (AUG)* и *40S IRES (Fl)*). Во всех комплексах, собранных в присутствии ЛПК (Рис. 9А, дорожки 48SS и 80S, 9В и Г, дорожки *48S* и *80S анизо*), независимо от типа аналога мРНК эти нуклеотиды оказались значительно экранированными от модификации VzCN (Рис. 9А и Г). Видно, что подобные изменения не происходили в бинарных комплексах 40S субчастиц с IRES<sub>Fl</sub>, чья кодирующая часть находилась в мРНК-связывающем центре (Рис. 9Г).

Следовательно, в соответствии с данными иммуоблотинга, представленными на Рис. 8, можно заключить, что перестройки h16 18S рРНК, наблюдаемые в ЛПК-зависимых комплексах (Рис. 9А, В, Г), были индуцированы связыванием 40S субчастиц с eIF3j на начальных этапах инициации трансляции. Видно, что изменённая конформация h16 сохраняется в 48S PIC после диссоциации eIF3j от рибосомы (Рис. 9В, Г дорожки *48S MIII* и *IRES<sub>FL</sub>*), с которой вместо него оказывается связанным ДНХ29 (см. Рис. 8). Более того, конформация, которую приобретает h16 при инициации трансляции, поддерживается и в 80S комплексах, образующихся на начальной стадии элонгации трансляции (Рис. 9В, Г, дорожки *80S анизо*).

### 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

#### 3.1. Роль эукариот-специфичного фрагмента гр eS26 в процессе трансляции

Согласно крио-ЭМ модели 40S субчастицы рибосом человека (Khatteer et al., 2015), эукариот-специфичный мотив 62-УххРКхУхК-70 гр eS26 расположен на внешней поверхности субчастицы вблизи места выхода мРНК из мРНК-связывающего канала. Экспонированные остатки лизина в пептиде 62-УххРКхУхК-70, не принимающие участия во внутририбосомных взаимодействиях, по-видимому, вовлекаются в связывание части мРНК с 5'-стороны от кодона в Е-участке. Кроме 5'-НТО мРНК, во взаимодействии с мотивом УххРКхУхК гр eS26 может участвовать также фактор инициации eIF3, поскольку аналоги мРНК с остатками тиюридина в положениях от -6 до -12 в 48S PIC сшиваются как с гр eS26, так и с одной из субъединиц eIF3 (Pisarev et al., 2008). Полученная недавно крио-ЭМ модель пространственной структуры 43S PIC рибосом кролика (desGeorges et al., 2015) показала, что субъединица *a* фактора eIF3 контактирует с фрагментом гр eS26, непосредственно примыкающим к его мотиву 62-70. Известно, что мультифункциональный фактор eIF3 принимает участие в рекрутировании мРНК в 43S PIC. Таким образом, взаимодействие эукариот-специфичного мотива в центральной части белка eS26 с 5'-нетранслируемой областью мРНК



Схожесть результатов, полученных в настоящей работе для 48S PIC, собранных по каноническому и HCV IRES-зависимому пути, позволяет сделать вывод, что конформационные перестройки, обеспечивающие взаимодействия между N-концевыми фрагментами eIF2 $\alpha$  и гр uS7 при связывании ТС с 40S субчастицей, не зависят от того, по какому пути происходит инициации трансляция. Очевидно, что эти конформационные перестройки необходимы для правильного позиционирования D1 eIF2 $\alpha$  на 40S субчастице, в результате чего eIF2 $\alpha$  сближается с нуклеотидом в положении -3 относительно первого нуклеотида в Р-участке, что обеспечивает точное распознавание старт-кодона.

### **3.3. Взаимодействие одноцепочечных РНК с гр uS3 в участке входа в мРНК-связывающий канал**

Оказалось, что пептид 55-64 гр uS3 в его РНК-связывающем КН-доме, сшивающийся с аналогами мРНК с окисленной 3'-концевой рибозой, экспонирован на поверхности 40S субчастицы вблизи участка входа в мРНК-связывающий канал. Этот пептид гр uS3 не принимает участия в формировании мРНК связывающего канала и не вовлечен во внутририбосомные взаимодействия (Budkevich et al., 2014). Очевидно, что диальдегидные производные олигорибонуклеотидов и неструктурированный 3'-концевой фрагмент IRES<sub>AUG</sub> с окисленной 3'-концевой рибозой взаимодействовали с РНК-связывающим пептидом гр uS3 аналогичным образом, поскольку гр uS3 не относится к участку связывания HCV IRES на 40S субчастице (Quade et al., 2015). Пока неизвестно, какую роль в жизни клеток играет ярко выраженная способность экспонированного на поверхности 40S субчастицы пептида 55-64 гр uS3 связывать неструктурированные РНК. Можно полагать, что этот пептид вовлекается в регуляцию трансляции через его распознавание специальными малыми одноцепочечными РНК, которые взаимодействуя с ним, могли бы влиять на трансляционные свойства рибосом и тем самым контролировать синтез белков.

### **3.4. Участок входа мРНК в рибосому и факторы инициации**

О расположении eIF3j на модели 40S субчастицы можно приблизительно судить по данным крио-ЭМ 43S PIC дрожжей (Рис. 11). Согласно этим данным, непосредственное взаимодействие eIF3j с гр uS3 представляется весьма вероятным (Рис. 11), однако это взаимодействие, по-видимому, вовлекает не сам РНК-связывающий пептид, а соседствующий с ним  $\alpha$ -спиральный фрагмент гр uS3 вблизи участка входа в мРНК-связывающий канал, что и делает этот пептид недоступным для связывания неструктурированных РНК.

Тот факт, что eIF3j содержится практически только в 48S PIC, собранных на мРНК, чья кодирующая последовательность после старт-

кодона не длиннее 4 нуклеотидов, свидетельствует о физическом перекрытии участка связывания eIF3j с участком связывания кодирующей последовательности мРНК, начиная с её седьмого нуклеотида. Следовательно, фиксация в мРНК-связывающем канале кодирующей части мРНК, начиная с её третьего триплета, приводит к диссоциации eIF3j от 40S субчастицы, что делает РНК-связывающий пептид rp uS3 снова доступным.

Анализ моделей свободных 40S субчастиц, 48S PIC, а также свободных 80S рибосом и их элонгационных комплексов, полученных к настоящему времени, показал, что конформация h16 18S рРНК практически не зависит от функционального состояния 40S субчастицы. Это значит, что характерная особенность обнаруженного в настоящей работе «защищённого» состояния h16 заключается в снижении подвижности фрагмента этой спирали без видимых изменений её устройства на рибосоме.

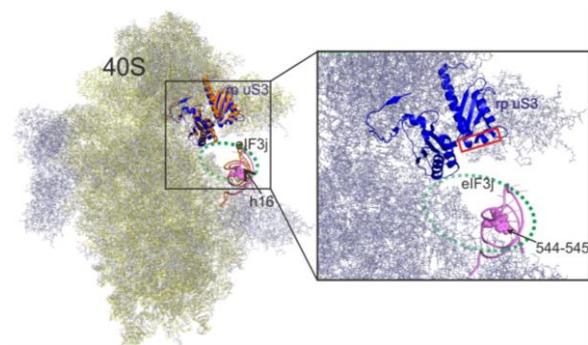


Рис. 11. Расположение rp uS3 и h16 18S рРНК в 40S субчастице рибосомы человека (PDB номер 4UG0). Слева - общий вид субчастицы, справа - увеличенное изображение участка входа мРНК. Предполагаемое расположение eIF3j показано на основании данных крио-ЭМ (Aylett et al., 2015) пунктирным овалом, бледная часть которого соответствует части фактора, расположенного с обратной стороны субчастицы. Rp uS3 выделен синим цветом, а его РНК-связывающий пептид в КН-домеине отмечен красным прямоугольником.

Таким образом, применение химического футпринтинга 18S рРНК с использованием зонда, чувствительного к конформационной подвижности нуклеотидов РНК, позволило обнаружить свойство h16, которое не удалось выявить ранее в структурных исследованиях, проведенных с помощью крио-ЭМ и рентгеноструктурного анализа рибосомных комплексов. Функциональное назначение обнаруженного конформационного перехода в h16 может быть связано с тем, что он «уплотняет» контакты мРНК с рибосомой в участке входа и тем самым придает этому участку свойства, оптимальные для связывания мРНК и её последующего движения по мРНК-связывающему каналу в процессе элонгации.

### **Заключение**

Таким образом, в настоящей работе показано, что в 80S рибосомных комплексах фрагмент мРНК с 5'-стороны от кодона в Е-участке, соответствующий её 5'-НТО при инициации трансляции, соседствует с консервативным у эукариот мотивом YxxPKxYxK гр S26. Обнаружено, что в 48S PIC гр uS7 и eIF2 $\alpha$  контактируют между собой своими N-концевыми фрагментами. Установлено, что экспонированный на поверхности 40S субчастицы пептид 55-64 гр uS3, находящийся вне мРНК-связывающего центра, способен взаимодействовать с короткими неструктурированными РНК, причём это взаимодействие характерно как для свободных 80S рибосом, так и для их комплексов с тРНК и мРНК. Показано, что в 48S PIC, образованных с участием мРНК, несущих не более одного триплета после старт кодона, данный пептид экранирован от взаимодействий с неструктурированными РНК субъединицей j фактора eIF3. Выявлено, что при инициации трансляции участок h16 18S рРНК, включающий нуклеотиды A544 и A545, подвергается конформационным изменениям, проявляющимся в уменьшении доступности этих нуклеотидов для модификации бензоилцианидом в 48S PIC, содержащих eIF3j или DHX29. Обнаружено, что эти изменения сохраняются в пост-инициаторных 80S комплексах, соответствующих состоянию после связывания аминоацил-тРНК в А-участке перед образованием первой пептидной связи. Выявлены универсальные черты канонической и HCV IRES-зависимой инициации трансляции у млекопитающих.

## ВЫВОДЫ

1. Рибосомный белок eS26 соседствует своим эукариот-специфичным мотивом YxxPKxYxK с частью мРНК с 5'-стороны от кодона в E-участке, соответствующей её 5'-нетранслируемой области при инициации трансляции, что указывает на роль этого мотива в поддержании правильной рамки считывания и во взаимодействии 40S субчастицы рибосомы с одним из ключевых факторов инициации, eIF3.

2. Фрагменты 2-18 и 72-85 рибосомного белка uS7 контактируют соответственно с фрагментами 68-75 и 81-87 субъединицы  $\alpha$  фактора инициации eIF2 в 48S предынициаторном комплексе, что требует крупных конформационных перестроек в eIF2 $\alpha$ , которые должны сопровождать связывание тройного комплекса eIF2•Met-тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>•GTP с 40S субчастицей рибосомы.

3. Рибосомный белок uS3 обладает ярко выраженной способностью взаимодействовать с короткими одноцепочечными РНК посредством пептида 55-TQNVLGEKGR-64 в его КН-домене, экспонированного на поверхности 40S субчастицы рибосомы вблизи участка входа мРНК, что указывает на возможное участие этого пептида в регуляции трансляции.

4. РНК-связывающий пептид рибосомного белка uS3 экранирован от взаимодействий с РНК в 48S предынициаторном комплексе, когда субъединица j фактора eIF3 связана с 40S субчастицей, и становится доступным после её диссоциации, которая происходит в результате фиксации мРНК в мРНК-связывающем канале, что указывает на возможную роль eIF3j в регуляции РНК-связывающей способности белка uS3.

5. Рибосомный белок uS3 не образует связи со спиралью h16 18S рРНК в 48S предынициаторных комплексах, содержащих eIF3j или геликазу DHX29, тогда как конформация h16 в этих комплексах оказывается более жёсткой, чем в комплексах, полученных в отсутствие факторов трансляции, что должно способствовать оптимальной аккомодации мРНК в мРНК-связывающем канале в ходе трансляции.

6. Взаимодействие рибосомного белка uS7 с eIF2 $\alpha$  и eIF3j-зависимое реструктурирование 40S субчастицы в участке входа мРНК, сопровождающееся экранированием рибосомного белка uS3, являются универсальными чертами канонического и HCV IRES-зависимого механизмов инициации трансляции у млекопитающих.

**Результаты диссертации опубликованы в следующих работах:**

1. Sharifulin D., Khairulina Y., Ivanov A., Meschaninova M., Ven'yaminova A., Graifer D., Karpova G. A central fragment of ribosomal protein S26 containing the eukaryote-specific motif YxxPKxYxK is a key component of the ribosomal binding site of mRNA region 5' of the E site codon // *Nucleic Acids Res.* –2012. –V. 40. –P. 3056-3065.
2. Sharifulin D. E., Babaylova E.S., Kossinova O. A., Bartuli Y. S., Graifer D. M., Karpova G. G. Ribosomal protein S5e is implicated in translation initiation through its interaction with the N-terminal domain of initiation factor eIF2 $\alpha$ . // *ChemBioChem.* –2013. –V. 4. –P. 2136-2143.
3. 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 (Gene regulatory mechanisms).* –2015. –V. 1849. –P. 930-939.
4. 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 (Protein and proteomics).* –2016. –V. 1864. –P. 1328-1338.