

На правах рукописи



ГОПАНЕНКО АЛЕКСАНДР ВИТАЛЬЕВИЧ

**НОВЫЕ ФУНКЦИИ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ eS1, uS19 И eL29
ЧЕЛОВЕКА, ВЫЯВЛЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ,
ОСНОВАННЫХ НА ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОМ
СЕКВЕНИРОВАНИИ РНК**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2020

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

Научный руководитель:

Карпова Галина Георгиевна, д.х.н., профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, заведующая Лабораторией структуры и функции рибосом.

Официальные оппоненты:

Бунева Валентина Николаевна, д.б.н., профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, г.н.с.

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

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

Защита состоится «20» ноября 2020 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент

Коваль В.В.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Рибосомные белки являются неотъемлемой частью рибосом, в составе которых они выполняют структурную функцию, участвуют в формировании их функциональных центров и взаимодействуют с их лигандами. Субчастицы рибосом эукариот в дополнение к белкам, консервативным у всех доменов жизни, включают большой набор эукариот/архей-специфичных белков, которые зачастую содержат протяжённые районы, специфичные для эукариот и архей. Несмотря на то, что структурные мотивы белков, вовлекаемые в формирование функциональных центров рибосом млекопитающих, хорошо известны (Graifer, Karpova, 2013; 2015; 2018), их роль в трансляции у большинства рибосомных белков до конца не выяснена. Среди них оказался компонент декодирующего центра рибосом – uS19, взаимодействие С-концевого эукариот/архей-специфичного хвоста которого с мРНК показано ранее с использованием метода аффинной модификации (Chavatte et al., 2001; Graifer et al., 2004; Khairulina et al., 2010). Присутствие этого участка в декодирующем центре рибосом млекопитающих недавно подтверждено с помощью крио-электронной микроскопии (крио-ЭМ) при исследовании их комплексов с мРНК и тРНК. Тем не менее, на момент начала выполнения данной работы вопрос о роли С-хвоста uS19 в реальной белоксинтезирующей системе оставался открытым.

К настоящему времени накоплено большое количество данных о том, что рибосомные белки вовлекаются в различные клеточные процессы, в том числе те, что ассоциированы с канцерогенезом, где они выполняют так называемые внерибосомные функции (Dai et al., 2008; Sulima et al., 2017). Будучи способными к связыванию с РНК, рибосомные белки оказываются причастными к регуляции разных уровней экспрессии генов, включая транскрипцию, процессинг пре-мРНК и трансляцию (Ivanov et al., 2006). Однако большинство рибосомных белков в этом плане остались практически не изученными. Например, эукариот-специфичный рибосомный белок eS1 вовлекается в формирование участка связывания IRES-элемента РНК вируса гепатита С на 40S субчастице (Laletina et al., 2006) и в её связывание с фактором инициации трансляции eIF3 (de Georges et al., 2015). Кроме этого, eS1 замечен как участник ряда процессов, не относящихся к трансляции, в которых он функционирует вне рибосомы. Рибосомный белок eS1 имеет высокий положительный заряд, что должно способствовать его взаимодействию с РНК, однако данные о контактах этого белка с клеточными РНК (помимо рРНК) на момент начала настоящей работы отсутствовали. Ещё одним интересным примером является эукариот-специфичный рибосомный белок eL29, компонент большой (60S) субчастицы рибосомы, идентифицированный впервые как гепарин-гепаран связывающий

белок на поверхности эпителиальных клеток (Raboudi et al., 1992). Отмечают причастность eL29 к различным клеточным процессам, таким как межклеточные взаимодействия, адгезия, пролиферация и дифференцировка. Кроме того, мыши, нокаутные по гену, кодирующему eL29, хотя и оставались жизнеспособными, имели меньший вес, повышенную ломкость костей и ряд других дефектов (Kirn-Safran et al., 2007). Однако клеточные партнёры eL29 и механизмы, посредством которых выключение гена этого белка приводило к подобным дефектам, остались не установленными.

Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования РНК привело к появлению ряда мощных инструментов, которые дают возможность изучать РНК-белковые взаимодействия в живых клетках на полногеномном уровне. К ним относится такой метод как PAR-CLIP (Hafner et al., 2010) (от англ. photoactivatable ribonucleoside-enhanced cross-linking and immunoprecipitation), позволяющий определять, помимо набора РНК, сшивающихся с целевым белком, участки сшивки в РНК с нуклеотидным разрешением. Для получения более полного представления о функциональной роли соответствующих РНК-белковых взаимодействий могут быть дополнительно привлечены другие методы, основанные на высокопроизводительном секвенировании, – метод полногеномного секвенирования РНК (РНК-сек) и рибосомный профайлинг (Рибо-сек) (Ingolia et al., 2009). Эти методы позволяют изучать соответственно состояния транскриптома и транслятома клеток, например, при снижении уровня изучаемого белка или каком-либо воздействии на клетки.

Таким образом, изучение функциональной активности рибосомных белков вне белоксинтезирующего аппарата клетки и выявление роли их отдельных структурных мотивов в процессе трансляции представляется актуальным. Полученные в ходе такого исследования знания будут иметь фундаментальное значение для понимания структурно-функциональных аспектов молекулярных процессов, протекающих в клетках с участием рибосомных белков, включая трансляцию, нарушение которых приводит к тяжелым последствиям.

Целью настоящей работы являлось выявление функций рибосомных белков eS1 и uS19 человека, опосредованных их взаимодействиями с РНК вне трансляционной машины и в качестве её компонента, с помощью метода PAR-CLIP и роли рибосомного белка eL29 человека в регуляции экспрессии генов на уровне транскриптома с помощью метода РНК-сек.

Для достижения поставленной цели в ходе работы планировалось решить следующие задачи.

1. Создать стабильные клеточные линии на основе линии эмбриональных клеток почек человека HEK293, продуцирующие FLAG-меченые рибосомные белки eS1 и uS19 человека, и охарактеризовать функциональную активность этих белков.

2. Идентифицировать РНК (помимо рРНК), взаимодействующие с eS1 вне рибосомы, выявить структурно-функциональные особенности этих взаимодействий, установить их функциональную роль и определить процессы, в которых эти взаимодействия происходят.
3. Идентифицировать участки клеточных мРНК, с которыми взаимодействует белок uS19 как компонент декодирующего центра рибосомы в процессе трансляции, определить структурно-функциональные особенности этих взаимодействий и выявить их функциональное значение.
4. Получить и охарактеризовать клетки НЕК293 с нокдауном рибосомного белка eL29 и с их использованием установить влияние дефицита eL29 на экспрессию генов на уровне транскриптома; выявить процессы, ассоциированные с генами, экспрессия которых зависит от клеточного уровня eL29.

Научная новизна полученных результатов. В данном исследовании выявлены новые неканонические функции рибосомных белков eS1 и eL29 человека в сплайсинге минорного типа и регуляции экспрессии генов соответственно и определены регионы мРНК, взаимодействующие с uS19 – ключевым компонентом рибосомного декодирующего центра в процессе элонгации трансляции. В частности, с помощью метода PAR-CLIP идентифицированы РНК, кодируемые генами *RNU11* и *RNU5A-1*, как клеточные партнёры eS1. Установлено, что в клетках eS1 ассоциирован с U11 пре-мРНК в ядре и цитоплазме и со зрелой U11 мРНК в составе U11/U12 мРНК в ядре. Установлено, что неструктурированный лизин-богатый N-концевой участок 9–29 eS1 взаимодействует с Sm-сайтом U11 пре-мРНК и с апикальной петлей I U5 мРНК. С помощью РНК-сек продемонстрировано, что дефицит eS1 в клетках приводит к увеличению доли незрелой U11 пре-мРНК и снижению эффективности вырезания минорных интронов из пре-мРНК, что указывает на вовлечение этого белка в биогенез U11 мРНК и работу малой сплайсосомы. С использованием модифицированного метода PAR-CLIP, включающего ряд элементов протокола рибосомного профайлинга, определены регионы мРНК, с которыми взаимодействует uS19, находясь в составе транслирующих рибосом. Показано, что данные регионы мРНК представлены последовательностями с высокой встречаемостью кодонов лизина, глутамина и аргинина, являясь теми регионами, на которых паузируют рибосомы в процессе элонгации трансляции. Контакты белка uS19, защищаемого от взаимодействия с мРНК молекулой тРНК в А-участке, с этими G/A-богатыми регионами свидетельствуют о том, что в паузирующих рибосомах А-участок не оккупирован молекулой тРНК, что позволяет кодонам мРНК, оказавшимся в А-участке таких рибосом, взаимодействовать с С-концевым хвостом uS19. Показано, что снижение уровня рибосомного белка eL29 в клетках НЕК293 всего в 2.5 раза приводит к значительной реорганизации профиля транскриптома клеток, что

выражается в изменении экспрессии более 1000 генов. При этом жизнеспособность клеток и глобальный уровень трансляции существенно не изменяются. Выявленные дифференциально экспрессируемые гены участвуют в различных клеточных процессах, включая регуляцию биогенеза рибосом, регуляцию трансляции, клеточные пути, ассоциированные со стрессом эндоплазматического ретикулума и апоптозом, и другие. Кроме того, в этом наборе генов присутствуют гены-мишени транскрипционных факторов p53 и c-Myc, что позволяет предположить, что дисбаланс eL29 ассоциирован с процессом злокачественной трансформации клеток.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты настоящего исследования расширили представление о клеточных процессах у млекопитающих, протекающих с участием рибосомных белков, и внесли весомый вклад в раскрытие структурно-функциональных аспектов молекулярных механизмов, обеспечивающих элонгацию трансляции. Применение современных клеточных технологий, основанных на высокопроизводительном секвенировании РНК, позволило выявить новые неканонические функции рибосомных белков и определить регионы мРНК, где происходит паузирование рибосом во время синтеза белка. Таким образом, полученные в ходе исследования результаты имеют принципиальное значение для понимания функциональной роли рибосомных белков и их конкретных специфических мотивов во многих фундаментальных процессах, включая трансляцию. Эти знания, несомненно, могут оказаться важными для понимания молекулярных механизмов многих патологий, связанных с дисфункцией рибосомных белков у человека, в том числе рибосомопатий, возникающих из-за нарушений в механизмах, обеспечивающих процесс трансляции.

Основные положения, выносимые на защиту

- Созданные стабильные линии клеток на основе HEK293, индуцибельно продуцирующие FLAG-меченые рибосомные белки eS1 и uS19 человека, пригодны для исследования взаимодействий целевых белков с РНК с помощью метода PAR-CLIP.
- Партнёрами рибосомного белка eS1 в клетках являются РНК, кодируемые генами *RNU11* и *RNU5A-1*, которые связываются с eS1 через U-богатые последовательности, соответствующие району Sm-сайта в U11 мяРНК и апикальной петле I в U5 мяРНК.
- В клетках белок eS1 ассоциирован с U11 пре-мяРНК в ядре и цитоплазме и со зрелой U11 мяРНК в составе U11/U12 мяРНК в ядре. Дефицит eS1 приводит к нарушению процессинга U11 пре-мяРНК, что проявляется в повышении её уровня относительно уровня зрелой U11 мяРНК и в снижении эффективности сплайсинга пре-мРНК с редкими интронами.
- Связывание белка eS1 с T7 транскриптом U11 мяРНК приводит к конформационным изменениям сахарофосфатного остова в районе Sm-сайта,

вызванным его взаимодействием с неструктурированным N-концевым участком eS1.

- В остановленных претранслокационных комплексах 80S рибосом белок uS19, контактирующий с мРНК в А-участке при отсутствии в нем лиганда, взаимодействует с регионами мРНК, кодирующими аминокислотные остатки Lys/Glu и Arg.

- Дефицит рибосомного белка eL29 в клетках приводит к существенной реорганизации их транскриптома, что отражается в изменении экспрессии множества генов, среди которых присутствуют гены-мишени транскрипционных факторов p53 и c-Myc.

Публикации и апробация работы. По результатам работы опубликовано 3 научные статьи в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Результаты работы в виде устных и стендовых докладов были представлены автором лично на российских и международных конференциях и конгрессах: Международная конференция «ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ-2016», 24-29 июля 2016 г., Новосибирск; II Всероссийская конференция с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике», 18-23 июня 2017 г., Новосибирск; EMBO Conference: Protein Synthesis and Translational Control, 6-10 сентября 2017 г., Гейдельберг; Объединенный научный форум Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» VIII российский симпозиум «Белки и пептиды», 18-22 сентября 2017 г., Москва. R; V Международная конференция «Постгеном 2018», 29 октября – 2 ноября, 2018 г., Казань.

Личный вклад автора. Результаты в основном получены лично автором. РНК-белковое сшивание в клетках, продуцирующих FLAG-меченый рибосомный белок uS19, выполнено Е.С. Бабайловой с участием А.А. Малыгина. Контрольные опыты по аффинной модификации uS19 в комплексах рибосом с фотоактивируемыми аналогами мРНК выполнены К.Н. Булыгиным и А.А. Малыгиным. Валидация данных РНК-сек клеток НЕК293 с пониженным содержанием рибосомного белка eL29 с помощью ОТ-ПЦР и вестерн-блот анализа выполнена Колобовой А.В. Приготовление ДНК-библиотек с их последующим высокопроизводительным секвенированием и первичной обработкой данных проведено в ЦКП «Геномика» СО РАН на базе ИХБФМ СО РАН (А.Е. Тупикин и М.Р. Кабилов). Биоинформатический анализ данных проведен лично автором.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 178 страницах, содержит 44 рисунка, 4 таблицы и 2 приложения. Список цитируемой литературы состоит из 341 источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Экспериментальная часть

Исследования выполнены с использованием культур клеток HEK293, продуцирующих FLAG-меченные рибосомные белки eS1 и uS19 человека или трансфицированных специфичными siРНК против мРНК рибосомного белка eL29. Кроме того, использованы рекомбинантный His6-FLAG^{eS1}, полученный в системе *E.coli*, и РНК-транскрипты, соответствующие различным формам U11 мяРНК и синтезированные *in vitro* в ходе реакций T7-транскрипции. В работе применены такие клеточные подходы как PAR-CLIP, RNA-seq и Рибосек, включающие стадии высокопроизводительного секвенирования РНК, которое выполнено на платформах Illumina (MiSeq, HiSeq2500) и SOLiD, а также химический футпринтинг, связывание на нитроцеллюлозных фильтрах, метод задержки в геле, аффинное сшивание рибосом с аналогами мРНК и другие методы *in vitro*. Синтез олигорибонуклеотидов для создания siRNA-дуплексов проведен в Лаборатории химии РНК (ИХБФМ СО РАН). Биоинформатический анализ данных высокопроизводительного секвенирования выполнен с использованием современных программ, в частности с применением пакетов платформы Bioconductor (DESeq2, biomaRt и др). Все эксперименты выполнены в трех биологических повторях.

2 Результаты исследования

2.1 Определение клеточных РНК-партнеров рибосомного белка eS1

Для поиска клеточных РНК, взаимодействующих с eS1, был использован метод PAR-CLIP. Для этого была создана стабильная клеточная линия на основе HEK293, способная продуцировать FLAG-меченый eS1 (FLAG^{eS1}) человека в ответ на добавление DOX (Рис. 1А). Функциональная активность FLAG^{eS1} проверена с помощью вестерн-блот анализа фракций полисомного профиля, полученного центрифугированием соответствующего клеточного лизата в градиенте плотности сахарозы, с использованием антител против FLAG-эпитопа. Из Рис. 1Б видно, что FLAG^{eS1} присутствует во всех фракциях градиента, включая те, что соответствуют активным в трансляции 80S рибосомам.

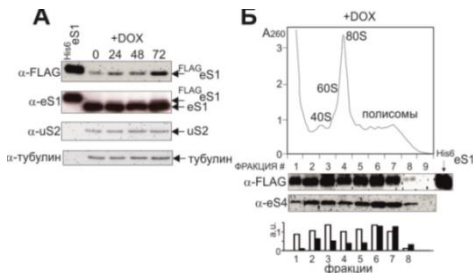


Рис. 1. Продукция FLAG^{eS1} стабильной линией клеток на основе HEK293 и проверка его способности включаться в 40S рибосомные субчастицы и в их составе участвовать в трансляции. (А) Вестерн-блот анализ лизатов клеток до и через 24, 48 и 72 ч после обработки DOX с использованием различных антител: анти-FLAG, анти-eS1, анти-uS2, анти-тубулин (указаны слева). Первая дорожка слева

соответствует рекомбинантному His6-FLAG^{eS1}, используемому в качестве маркера. Стрелками справа указаны положения FLAG^{eS1} и eS1, а также uS2 и тубулина, взятых в качестве референсных белков. (Б) Полисомный профиль клеток после обработки DOX, полученный центрифугированием соответствующего цельноклеточного лизата в градиенте плотности сахарозы, и вестерн-блот анализ градиентных фракций с использованием антител: анти-FLAG и анти-eS4 на содержание FLAG^{eS1} и eS4 (в качестве контроля). Гистограммы ниже панелей вестерн-блота отражают относительные уровни FLAG^{eS1} и eS4. Неокрашенные столбики соответствуют относительному уровню eS1 (или FLAG^{eS1}), чёрные столбики – относительному уровню eS4.

Для образования РНК-белковых сшивок клетки, продуцирующие FLAG^{eS1} и выращенные на среде, содержащей фотоактивируемый аналог нуклеозида, облучали мягким УФ (365 нм). Анализ данных высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек, полученных из фрагментов РНК, сшивающихся с FLAG^{eS1} в присутствии 4-тиоуридина (s⁴U), выявил продукты генов *RNU11* и *RNU5A-1* как основные РНК-партнеры eS1 (Рис. 2), которые связывались с FLAG^{eS1} через U-богатые последовательности в районе Sm-сайта в U11 мяРНК и апикальной петле I в U5 мяРНК.

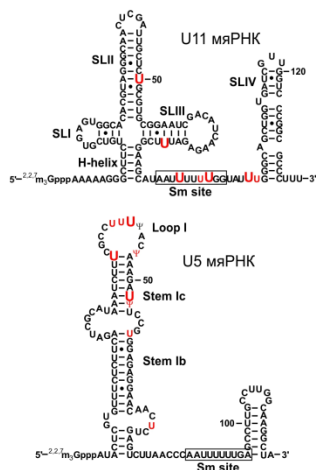


Рис. 2. Идентификация основных мишеней рибосомного белка eS1 с помощью PAR-CLIP. Вторичные структуры U11 мяРНК и U5 мяРНК человека (согласно Turunen et al., 2013) с указанием остатков уридина (выделены красным), соответствующих T/C-транзициям, выявленным с помощью биоинформатического анализа данных секвенирования. Положения с наибольшей частотой встречаемости T/C-транзиций (частота >5%) выделены большими буквами.

Поскольку в зрелых мяРНК Sm-сайт упакован кором Sm-белков, можно предположить, что eS1 взаимодействует с предшественником U11 мяРНК в ядре до момента выхода последнего в цитоплазму. Чтобы проверить это предположение, проведена иммунопреципитация комплексов РНК с eS1 из ядерного и цитоплазматического экстрактов клеток НЕК293 с помощью антител к eS1, иммобилизованных на магнитных частицах, с последующим извлечением РНК, образцы которой использованы в ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к U11 пре-мяРНК. Один из этих праймеров соответствовал участку зрелой U11 мяРНК, а другой – участку 3'-удлиненной части U11 пре-мяРНК, которая удаляется при её процессинге. Результаты этого эксперимента показали, что eS1 связывается с U11 пре-мяРНК в ядре и затем в таком состоянии экспортируется в цитоплазму (Рис. 3А,Б). Чтобы ответить на вопрос, остается ли eS1 связанным со зрелой U11 мяРНК, в ОТ-ПЦР использовали праймеры, специфичные к U12 мяРНК, которая, как известно (Turunen et al., 2013), существует в виде U11/U12

мяРНК, включающего зрелую U11 мяРНК. Оказалось, что U12 мяРНК, как и U11 мяРНК, ко-иммунопреципитируется с eS1 из ядерного экстракта клеток (Рис. 3В), что свидетельствует о том, что eS1 остается связанным со зрелой U11 мяРНК после её импорта в ядро. В то же время ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к U5 мяРНК/U5 пре-мяРНК, не выявила последних среди РНК, которые ко-иммунопреципитируются с eS1 (Рис. 3Г).

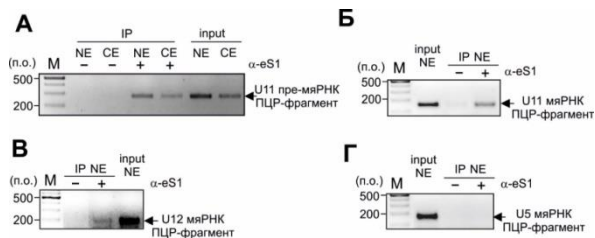


Рис. 3. ОТ-ПЦР-анализ РНК, ко-иммунопреципитированных (IP) с eS1 из ядерного (NE) или цитоплазматического (CE) экстрактов клеток HEK293 с помощью магнитных частиц с иммобилизованными анти-eS1 антителами (+) или без них (–) с последующим разделением продуктов ПЦР в агарозном

геле. Положения ПЦР-продуктов, полученных с использованием праймеров, специфичных для U11 пре-мяРНК (панель А), U11 мяРНК (панель Б), U12 мяРНК (панель В) и U5 мяРНК (панель Г), обозначены стрелками. Input – кДНК, приготовленная на основе препаратов РНК, выделенных из ядерного или цитоплазматического экстрактов.

Чтобы установить функциональную роль взаимодействия eS1 с продуктом гена *RNU11*, получены клетки HEK293, в которых уровень eS1 был понижен в 2–3 раза с помощью РНК-интерференции. Затем проведено сравнение профилей транскриптомов клеток с пониженным и нормальным уровнями eS1 с помощью РНК-сек. Анализ полученных данных показал, что для клеток с пониженным уровнем eS1 увеличивается доля ридов, приходящихся на участок генома, кодирующий непротрансформированный 3'-конец U11 пре-мяРНК, тогда как доля ридов, соответствующих участку генома, кодирующему зрелую U11 мяРНК, снижается по сравнению с клетками с нормальным уровнем eS1. Это означает, что в клетках с пониженным уровнем eS1 повышается количество непротрансформированной U11-пре-мяРНК и снижается уровень зрелой U11 мяРНК. Следовательно, логично было ожидать изменений в уровне сплайсинга минорных интронов. В связи с этим была предпринята попытка выявить эти изменения на примере 9 генов, содержащих минорные интроны, с самым высоким значением RPKM (количеством сиквенсных ридов на тысячу пар оснований). Анализ этих генов показал, что в образцах из клеток HEK293 с пониженным уровнем eS1 соотношение между количеством ридов, относящихся к минорному интрону, и количеством ридов, приходящихся на все интроны, для каждого из этих генов в среднем на 38% выше, чем в образцах из нормальных клеток. Это повышение может быть рассмотрено как свидетельство того, что при снижении клеточного уровня eS1 падает эффективность сплайсинга минорных интронов.

положению данного аддукта, вырезали и делили на несколько частей, и затем каждую часть обрабатывали различными протеолитическими агентами с последующей элюцией продуктов гидролиза и разделением их в SDS-ПААГ. В качестве протеолитических агентов использованы бромциан (CNBr), йодозобензойная кислота (IOBz), и эндопротеаза ArgC, которые специфично расщепляют белок после остатков метионина, триптофана и аргинина соответственно. Сопоставление полученных результатов с соответствующими картами расщепления Рис. 5. привело к заключению, что в His6-FLAG eS1 мишенью для s⁴U-содержащей U11 мРНК являлся пептидный фрагмент 9-LTKGGKKGAKKKVDPFSKKD-29, обогащенный лизином, который расположен в неструктурированном N-концевом хвосте белка.

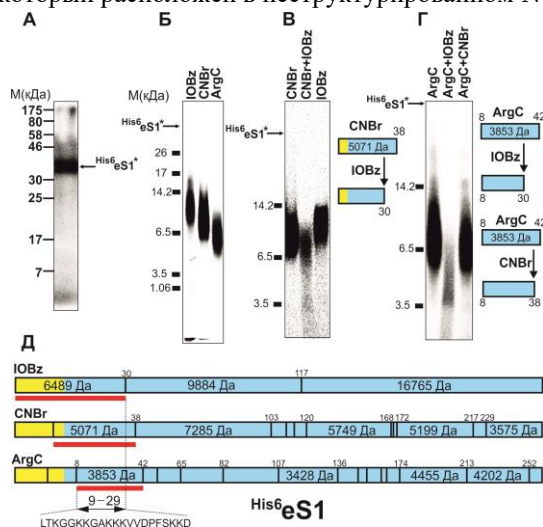


Рис. 5. Идентификация участка в His6-FLAG eS1, сшивающегося с ³²P-меченой s⁴U-содержащей U11 мРНК в составе соответствующего бинарного комплекса при облучении мягким УФ светом. (А) Очистка продукта сшивки (обозначен как His6-FLAG eS1*) после обработки РНКазой T1 электрофорезом в SDS-ПААГ. (Б) Анализ продуктов гидролиза His6-FLAG eS1*, образующихся при его обработке IOBz, CNBr и протеазой ArgC электрофорезом в SDS-ПААГ с использованием трис-тридинового буфера. (В, Г) Последовательная обработка His6-FLAG eS1* различными протеолитическими агентами с последующим

электрофоретическим анализом (см. подпись к панели Б). Справа от соответствующих панелей приведены схемы последовательного гидролиза His6-FLAG eS1* с образованием сшитых пептидов. Для всех панелей положения маркеров молекулярной массы белков указаны слева. (Д) Карты расщепления His6-FLAG eS1 (содержащего одновременно His₆ and FLAG-эпитоп на N-конце) различными протеолитическими агентами с указанием расчетных молекулярных масс наиболее крупных продуктов гидролиза. Участки карт, относящиеся к последовательности нативного eS1, закрашены голубым цветом, а к His₆ and FLAG-эпиту, – желтым; участки, соответствующие сшитым пептидным фрагментам His6-FLAG eS1*, подчеркнуты красной линией. Пунктирными линиями выделен участок, соответствующий результирующей последовательности сшитого фрагмента His6-FLAG eS1, указанной внизу.

Таким образом, с использованием метода PAR-CLIP удалось впервые выявить вне ribосомные РНК-партнёры ribосомного белка eS1 – РНК, кодируемые генами *RNU11* и *RNU5A-1*, и определить в них области, контактирующие с eS1, которыми оказались U-богатые последовательности, соответствующие региону Sm-сайта в U11 мРНК и апикальной петле I в U5

мяРНК. Установлено, что eS1 является связанным с U11 пре-мяРНК как в ядре, так и цитоплазме через N-концевой лизин-богатый участок 9-29, а со зрелой U11 мяРНК в составе U11/U12 РНП в ядре. Связывание eS1 с U11 пре-мяРНК в ядре, по-видимому, сопровождается конформационными перестройками в регионе Sm-сайта, необходимыми для формирования на нем кора Sm-белков при процессинге U11 пре-мяРНК в цитоплазме. Показано, что снижение уровня eS1 в клетках приводит к увеличению доли незрелой U11 пре-мяРНК и снижению эффективности вырезания минорных интронов. Полученные данные свидетельствуют о существовании у eS1 дополнительной неканонической функции, связанной с биогенезом U11 мяРНК и функционированием малой сплайсосомы.

2.2 Взаимодействие рибосомного белка uS19 как компонента декодирующего центра рибосомы с клеточными мРНК

Для того чтобы проверить, действительно ли uS19 взаимодействует только с кодоном мРНК в А-участке, и не нарушается ли это взаимодействие, когда в А-участке присутствует молекула тРНК, проведены эксперименты по аффинной модификации рибосом человека в составе комплексов с аналогами мРНК I-IV, несущими остатки s^4U в определенных положениях. В этих комплексах остаток s^4U находился в положениях +2 или +3 (комплекс 1), либо в положениях +5 или +6 (комплексы 2–6) относительно первого нуклеотида кодона в Р-участке. В комплексах 1–3 и 6 А-участок свободен, а в комплексах 4 и 5 он занят молекулой тРНК, соответствующей находящемуся в нем кодону. В ходе этих экспериментов показано, что uS19 специфически сшивается с остатком s^4U в триplete аналога мРНК, расположенном в А-участке рибосомы, только тогда, когда этот участок свободен, и что молекула тРНК в А-участке защищает uS19 от этого сшивания. Примечательно, что паттерны сшивок, полученные для комплексов 2 и 3 с пурин-богатыми аналогами мРНК II и III, идентичны паттернам для комплекса 6 с пиримидин-богатым аналогом мРНК IV, из чего следует, что нуклеотидный контекст вокруг кодона в А-участке не влияет на его контакт с uS19.

Для исследования с помощью метода PAR-CLIP взаимодействий транскрибируемых мРНК с uS19 как компонентом рибосомного декодирующего центра создана стабильная клеточная линия на основе клеток НЕК293, которая индуцибельно продуцировала ^{FLAG}uS19. Функциональная активность ^{FLAG}uS19 проверена с помощью вестерн-блот анализа фракций полисомного профиля, полученного центрифугированием в градиенте плотности сахарозы лизата клеток, продуцирующих ^{FLAG}uS19, с использованием антител, специфичных к FLAG-пептиду. Этот анализ выявил присутствие ^{FLAG}uS19 во всех градиентных фракциях, включая те, что соответствуют полисомам, что даёт основания полагать, что N-концевой FLAG-эпитоп не оказывает существенного влияния на функциональную активность uS19 в сборке 40S

субчастицы и последующих стадиях трансляции в качестве её компонента. Эксперименты по выявлению сшивок транслируемых мРНК с ^{FLAG}uS19 в составе рибосом с помощью метода PAR-CLIP проведены согласно описанному ранее протоколу (Hafner et al., 2010) с включением определенных стадий из протокола Рибо-сек (Ingolia et al., 2009). В частности, в ^{FLAG}uS19-продуцирующих клетках, выращенных в присутствии ^s4U, перед их облучением мягким УФ светом, индуцирующим образование РНК-белковых сшивок, трансляция была остановлена циклогексимидом, блокирующим транслокацию тРНК из Р-участка в Е-участок.

Биоинформатический анализ данных высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек, полученных на основе фрагментов мРНК, сшивающихся с uS19 в составе циклогексимид-арестованных рибосомных комплексов, показал, что кластеры ридов с Т/С-транзитами соответствуют 580 уникальным белок-кодирующим генам. Примечательно, что эти кластеры ридов практически полностью пересекались с регионами генов, соответствующими кодирующим частям мРНК, которые могли сшиваться с ^{FLAG}uS19 только тогда, когда они находились в мРНК-связывающем канале рибосомы. В контрольных экспериментах, выполненных с использованием Рибо-сек, показано, что присутствие в рибосомах FLAG-эпитопа на белке uS19, как и добавление к клеткам ^s4U, не оказывает существенного влияния на профили распределения плотности ридов в регионах генов, соответствующих мРНК.

Анализ последовательностей, фланкирующих положения Т/С-транзиций в идентифицированных кластерах ридов, выявил высокое содержание в них остатков G и A (Рис. 6А), из чего следовало, что ^{FLAG}uS19 сшивался с G/A-богатыми регионами в кодирующих частях мРНК. Кодоны, состоящие из остатков G и A, могут кодировать Lys (AA^A/G), Arg (AG^A/G), Glu (GA^A/G) или Gly (GG^A/G). Однако анализ регионов, фланкирующих сайты сшивки мРНК, показал, что они кодируют аминокислотные последовательности, содержащие преимущественно остатки Lys и Glu и реже остатки Arg, в которых практически не встречаются остатки Gly (Рис. 6Б).

Таким образом, с использованием метода PAR-CLIP впервые установлено, что в клетках, где трансляция остановлена циклогексимидом, блокирующим транслокацию пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок, uS19 напрямую взаимодействует с кодоном в рибосомном А-участке в G/A-богатых регионах мРНК, кодирующих преимущественно остатки Lys/Glu и реже Arg. Это означает, что состояние рибосом, в которых происходит это взаимодействие, отличается от такового в претранслокационных комплексах, где uS19 защищен от контакта с кодоном мРНК в А-участке молекулой пептидил-тРНК.

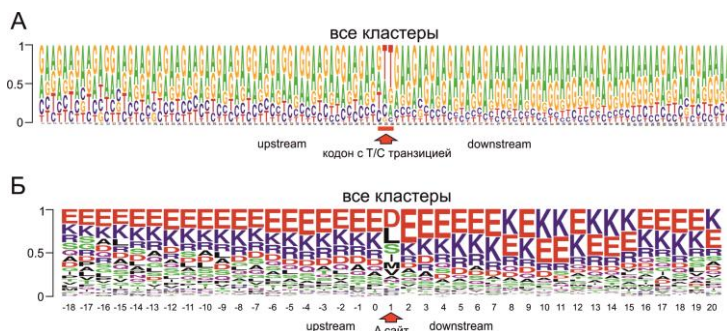


Рис. 6. LOGO нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, соответствующих кластерам ридов, содержащих Т/С-транзиции. (А) Представлены последовательности кодона, содержащего Т/С-транзицию (указаны красной стрелкой), а также 19-ти кодонов с 5'-и 3'-сторон по отношению к этому кодону. (Б) LOGO аминокислотных последовательностей, кодируемых нуклеотидными последовательностями, представленными на панели (А). Позиция аминокислотного остатка, соответствующего кодону в Р-участке рибосомы обозначена как 0, а в А-участке как +1.

2.3 Влияние снижения уровня рибосомного белка eL29 в клетках НЕК293 на профиль их транскриптома

Для снижения клеточного уровня eL29 использован метод РНК-интерференции. Для этого клетки НЕК293 трансфицировали специфическими siРНК против мРНК eL29. Как видно из данных на Рис. 7А, через один и два дня после трансфекции уровень eL29 снижался соответственно примерно в 1.5 и 2.5 раза по сравнению с его уровнем в клетках, обработанных неспецифической siРНК, тогда как уровень uS2 (оцененный в качестве контроля с использованием соответствующих поликлональных антител) практически не изменялся. Тест МТТ показал, что трансфекция клеток данными siРНК не влияла заметно на их жизнеспособность (Рис. 7Б). Кроме того, сравнение результатов электрофоретического анализа образцов тотальной РНК из клеток, обработанных siРНК против мРНК eL29 и контрольной siРНК, не выявило существенных различий в паттерне рРНК между этими образцами (Рис. 7В). Анализ полисомных профилей трансфицированных клеток, полученных центрифугированием их лизатов в градиенте плотности сахарозы, с последующим вестерн-блот анализом фракций градиента на содержание eL29, показал, что нокдаун eL29 не оказывает существенного влияния на глобальный уровень трансляции в клетках НЕК293 (Рис. 7Г). Это означает, что рибосомы, лишенные eL29, которые, наряду с рибосомами с нормальным содержанием eL29, присутствовали в клетках с пониженным уровнем этого белка, активны в трансляции.

Чтобы выяснить влияние дефицита eL29 на профиль транскриптома, из клеток НЕК293 через 2 дня после их трансфекции были выделены

[illegible]

теста для трансфицированных клеток. (В) Электрофоретический анализ препаратов totalной РНК, выделенных из трансфицированных клеток. Окраска бромистым этидием. (Г) Полисомные профили клеток, трансфицированных с помощью siРНК против mРНК eL29 (пунктирная линия) и неспецифической siРНК (сплошная линия), полученные центрифугированием их лизатов в градиенте плотности сахарозы. Отмечены пики, соответствующие 60S субчастицам, 80S рибосомам и полисомам. Панели снизу – вестерн-блот анализ фракций градиента на наличие eL29 и uL18 (в качестве референсного белка). Дорожки 1, 2 и 3 соответствуют фракциям сахарозного градиента, содержащим «тяжелые» полисомы (>5 рибосом на mРНК), «лёгкие» полисомы (<5 рибосом на mРНК) и 80S рибосомы (с небольшой долей 60S субчастиц).

14

ответу на стресс эндоплазматического ретикулума, организации митохондрий, регуляции активностей ГТФаз и митотического цикла. Даун-регулируемые DEGs ассоциированы с процессингом РНК (в частности рРНК), биогенезом рибонуклеопротеиновых комплексов (в частности, рибосом) и функционированием аппарата трансляции. Кроме того, даун-регулируемые DEGs вовлекаются в процессы, связанные с метаболизмом малых молекул, содержащих нуклеиновое основание, и с актиновыми филаментами.

Следует отметить, что в наборе DEGs, помимо гена *RPL29*, обнаружены гены ещё нескольких рибосомных белков. Ими оказались ап-регулируемые гены *RPL23A*, *RPS5* и *RPS21*, кодирующие белки uL23 (L23A), uS7 (S5) и eS21 (S21), и даун-регулируемые гены *RPL34*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL12* и *RPL22*, кодирующие белки eL34 (L34), uL18 (L5), uL5 (L11), uL11 (L12) и eL22 (L22) соответственно. Известно, что нарушения в биогенезе рибосом, вызванные дисбалансом рибосомных белков, зачастую приводят к активации супрессора опухолей – p53 вследствие снижения активности убиквитин-лигазы MDM2 или какими-то другими путями. Логично ожидать, что в ответ на снижение уровня eL29 может измениться экспрессия генов *TP53* и *MDM2*. Однако эти гены отсутствуют в выявленном наборе DEGs, означая, что уровень их мРНК не изменился. В то же время в этом наборе оказались гены, которые рассматриваются как гены-мишени белка p53. Среди них 23 ап-регулируемых генов (*BAX*, *CES2*, *XPC* и др.) и 6 даун-регулируемых генов (*NLRP1*, *GNAI1*, *CCNG1* и др.). Можно предположить, что дефицит eL29 в клетках вызвал нарушения работы системы p53-MDM2, вследствие чего были запущены клеточные каскады, приводящие к изменениям в активностях генов, регулируемых p53. Ещё одним сигнальным каскадом, на функционирование которого влияют нарушения в биогенезе рибосом, является каскад, регулируемый протоонкогенным белком c-Myc. Как и в случае с геном p53, экспрессия гена *MYC* не изменилась на уровне транскриптома при снижении уровня eL29 в клетках. Соответствующий клеточный путь также не был обнаружен среди тех, что оказались ассоциированными с DEGs. Тем не менее, в наборе DEGs присутствуют гены, рассматриваемые как гены-мишени c-Myc. Среди них оказалось 57 ап-регулируемых и 55 даун-регулируемых генов. Реорганизация экспрессии этих генов в eL29-дефицитных клетках может быть обусловлена нарушением взаимодействия c-Myc с его клеточными партнерами. В целом, факт того, что при дефиците рибосомного белка eL29 в клетках среди DEGs оказались гены, являющиеся мишенями p53 и c-Myc, позволяет полагать, что дисбаланс eL29 может запускать процессы, ассоциированные с онкогенезом.

Таким образом, определение изменений в профиле транскриптома клеток млекопитающих, вызванных дефицитом рибосомного белка eL29,

позволило установить взаимосвязь между балансом eL29 и активностями определенных генов и выявить процессы, ассоциированные с этими генами.

Обсуждение результатов

3.1 Роль рибосомного белка eS1 в процессинге U11 пре-мРНК и функционировании минорной сплайсосомы

На основании полученных данных предложен возможный путь вовлечения белка eS1 в биогенез U11 мРНК и работу минорной сплайсосомы, схематически представленный на Рис. 8. Согласно данной схеме eS1 связывается с U11 пре-мРНК в ядре в основном за счёт взаимодействий со шпильками SLI и SLIII и петлей H. При этом его N-концевой лизин-богатый неструктурированный участок контактирует с U-богатой одноцепочечной последовательностью, содержащей Sm-сайт, способствуя конформационным перестройкам её сахарофосфатного остова. U11 пре-мРНК, связанная с eS1, экспортируется в цитоплазму, где SMN-комплекс промотирует связывание Sm-белков с претерпевшим структурные перестройки Sm-сайтом, что сопровождается процессингом 3'-конца U11 пре-мРНК и высвобождением N-концевого участка eS1. После процессинга eS1 в комплексе с U11 мРНК импортируется обратно в ядро, где он может вовлекаться в сборку минорной сплайсосомы и взаимодействовать N-концевым участком с U5 мРНК в районе 5'-сайта сплайсинга пре-мРНК в пре-каталитическом комплексе минорной сплайсосомы.

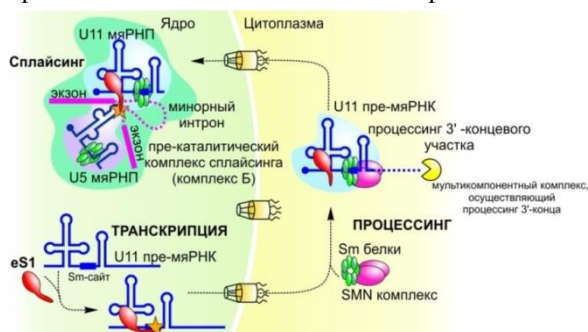


Рис. 8. Схематическое представление возможного пути участия eS1 в клеточных процессах, связанных с процессингом U11 пре-мРНК и работой минорной сплайсосомы. Малые ядерные РНК изображены как остовы их вторичных структур синим цветом. Справа жёлтым цветом обозначен белковый комплекс, ответственный, за процессинг 3'-конца малых ядерных РНК.

3.2 Паузирование рибосом в процессе элонгации трансляции и функциональная роль рибосомного белка uS19 в А-участке

Сшивание ^{FLAG}uS19 с мРНК в клетках с циклогексимид-арестованной трансляцией свидетельствует о том, что в момент обработки клеток данным антибиотиком в них уже присутствовали рибосомные комплексы, в которых s⁴U-содержащий кодон в А-участке не был вовлечен во взаимодействие с антикодоном соответствующей тРНК. Их наличие в клетках, вероятно, обусловлено тем, что в процессе элонгации трансляции рибосомы приостанавливаются на соответствующих регионах мРНК, т.е. делают паузы,

приводя к образованию комплексов, отличных от тех, что образуются при блокировании транслокации тРНК циклогексимидом, в которых А-участок оказывается оккупированным пептидил-тРНК. Вовлечение в сшивание с ^{FLAG} uS19 G/A-богатых регионов мРНК, кодирующих заряженные остатки Glu/Lys и Arg, позволило предположить, что паузирование рибосом происходит из-за торможения соответствующих растущих полипептидов, содержащих такие остатки, при прохождении через рибосомный туннель, начинающийся в пептидилтрансферазном центре (Рис. 9).

В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что С-концевой эукариот/архей-специфичный хвост uS19 напрямую взаимодействует с клеточными мРНК в рибосомном А-участке. Поскольку эти взаимодействия возможны только тогда, когда кодон в А-участке не участвует в формировании дуплекса мРНК-тРНК, последовательности в мРНК, с которыми взаимодействует uS19, – это те регионы, на которых рибосомы делают паузы в ходе элонгации трансляции.

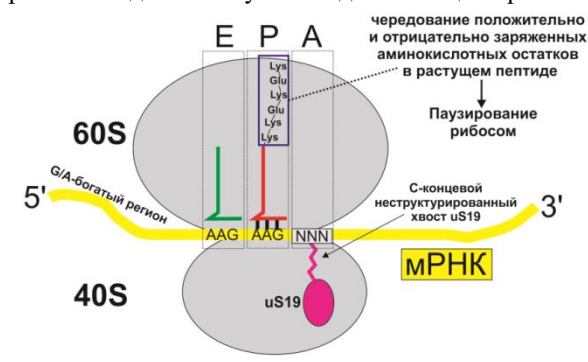


Рис. 9. Возможная модель паузирования 80S рибосом на G/A-богатых регионах мРНК и взаимодействия С-концевого участка uS19 с кодоном мРНК в А-участке. Молекулы тРНК в Р- и Е- участках показаны соответственно красным и зелёным цветом. Взаимодействия между кодоном мРНК и антикодоном тРНК в Р-участке обозначены тремя вертикальными черточками. Кодон мРНК, находящийся в А-участке и

содержащий остаток s⁴U в любом из положений, обозначен как NNN. Рибосомный белок uS19 обозначен розовым кружком, его С-концевой неструктурированный хвост, контактирующий с кодоном мРНК в А-участке, обозначен в виде розовой изломанной линии.

3.3 Рибосомный белок eL29 как возможный регулятор экспрессии генов

Анализ данных РНК-сек, полученных для клеток HEK293, дефицитных по эукариот-специфичному рибосомному белку eL29, показал, что снижение уровня eL29 в 2.5 раза существенно не влияет на жизнеспособность клеток, но приводит к значимым изменениям экспрессии 1308 белок-кодирующих генов. Эти изменения отражают реорганизацию регуляции активностей этих генов в ответ на дефицит eL29 и проявляются в повышении или понижении уровней их мРНК. Следует отметить, что, несмотря на то, что данные, полученные на иммортализованной клеточной культуре HEK293, могут не полностью отражать эффекты, опосредованные дефицитом eL29 в различных специализированных тканях организмов, они указывает на важность этого белка для поддержания баланса генных

продуктов, участвующих в определенных клеточных процессах. Хотя дефицит eL29 приводит к снижению экспрессии ряда генов, ассоциированных с процессингом рРНК и биогенезом рибосом, уровни клеточных мРНК большинства рибосомных белков не изменились. В то же время уменьшился уровень мРНК рибосомных белков uL5, uL11, uL18, eL22 и eL34, являющихся компонентами 60S субчастицы, что может означать, что экспрессия генов, кодирующих данные белки, на уровне транскрипции не синхронизирована с экспрессией генов, кодирующих другие рибосомные белки. Дефицит eL29 привел к изменениям экспрессии генов, которые являются генами-мишенями транскрипционных факторов p53 и c-Myc, не затрагивая при этом экспрессию самих генов *TP53* и *MYC*, по крайней мере, на уровне баланса их мРНК. Эти данные свидетельствуют о том, что дисбаланс eL29 может быть ассоциирован с процессом онкогенеза и злокачественной трансформации клеток. Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что дефицит рибосомного белка eL29 приводит к значительной реорганизации транскриптома клеток. Согласно гипотетической схеме, представленной на Рис. 10, недостаток eL29 приводит к дисбалансу некоторых рибосомных белков и дисрегуляции систем p53 и c-Myc, что может сказываться на биогенезе рибосом и регуляции трансляции.

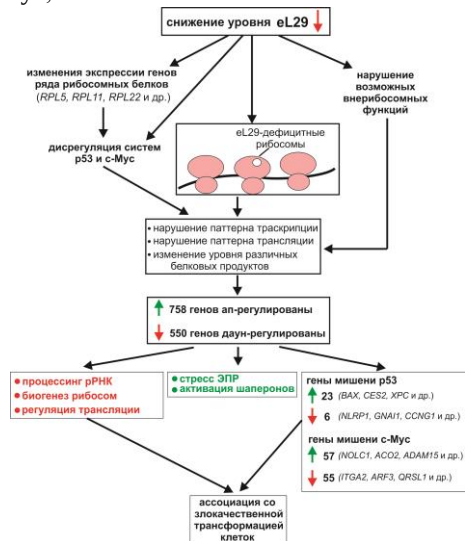


Рис. 10. Схематическое представление результатов анализа данных РНК-сек, полученных для eL29-дефицитных клеток HEK293. Красным и зелёным шрифтом обозначены клеточные процессы, ассоциированные с генами, чьи уровни экспрессии снизились или повысились в ответ на понижение уровня eL29. Красные и зелёные стрелки показывают даун-регулируемые и ап-регулируемые гены соответственно. ЭПР-эндоплазматический ретикулум.

Соответственно, у рибосом, дефицитных по eL29, может быть отличный от рибосом с нормальным содержанием eL29 паттерн трансляции, что должно приводить к дисбалансу

продуктов множества генов и как следствие к нарушению клеточных процессов, ассоциированных с этими генами. Помимо этого могут быть нарушены клеточные процессы, в которых участвует eL29, выполняя свои вне ribosomal функции. Череду вышеописанных событий может способствовать реорганизации транскриптома клеток при дефиците рибосомного белка eL29.

Заключение

Настоящая работа представляет собой первое исследование *in vivo* структурно-функциональных аспектов взаимодействий рибосомных белков человека с РНК, помимо рРНК, обеспечивающих их участие в различных клеточных событиях, происходящих в рибосоме или вне её, и влияния нарушения баланса отдельного рибосомного белка на экспрессию генов. Применение современных клеточных технологий, включающих секвенирование нового поколения РНК, дало возможность выявить РНК-связывающие партнеры белка eS1 вместе с участками, формирующими соответствующие контакты, идентифицировать регионы мРНК, взаимодействующие с белком uS19 в рибосомном декодирующем центре, и определить гены, чья экспрессия изменяется в ответ на дефицит белка eL29. Эти данные существенно расширили имевшиеся на момент начала настоящей работы знания о функциональном предназначении рибосомных белков млекопитающих, представив информацию о неизвестных ранее взаимодействиях белков uS19 и eS1, реализуемых в составе рибосомы или вне её, и о значительном изменении экспрессии генов при нарушении баланса белка eL29.

Результаты, полученные в данной работе, которая, по сути, является пионерской, с использованием метода PAR-CLIP, позволили установить участие eS1 в процессинге U11 пре-мРНК и сплайсинге пре-мРНК в составе минорной сплайсосомы, где он взаимодействует со зрелыми U11 и U5 мРНК. Модифицируя метод PAR-CLIP внесением элементов протокола рибосомного профайлинга, удалось обнаружить, что белок uS19, защищаемый от контактов с мРНК молекулой тРНК в рибосомном А-участке, взаимодействует с регионами мРНК, кодирующими чередующиеся заряженные аминокислотные остатки Lys/Glu и Arg, когда трансляция остановлена циклогексимином. Поскольку А-участок в арестованных таким способом рибосомах должен быть занят молекулой пептидил-тРНК, есть все основания полагать, что рибосомы паузируют на этих регионах мРНК в ходе элонгации трансляции из-за замедления в продвижении соответствующих растущих пептидов по туннелю, приводя к образованию комплексов со свободным А-участком. Наконец, с помощью РНК-сек продемонстрирована реорганизация регуляции экспрессии 1308 белок-кодирующих генов, вызванная снижением клеточного содержания eL29 и проявляющаяся в изменении уровней их мРНК, более одной десятой части которых представляют мРНК генов, являющихся мишенями белков, связанных с онкогенезом.

Выводы

- Созданы стабильные линии клеток на основе НЕК293, продуцирующие FLAG-меченые рибосомные белки eS1 и uS19 человека. Показано, что FLAG-эпитоп практически не влияет на функциональные свойства eS1 и uS19 в сборке 40S субчастиц и трансляции в качестве их компонентов, что свидетельствует о пригодности этих линий для исследования взаимодействий целевых белков с мРНК с помощью метода PAR-CLIP.
- Партнёрами рибосомного белка eS1 в клетках являются мРНК, кодируемые генами *RNU11* и *RNU5A-1*, которые связываются с eS1 через U-богатые последовательности, соответствующие району Sm-сайта в U11 мРНК и апикальной петле I в U5 мРНК, что указывает на участие eS1 вне рибосомы в процессах, имеющих отношение к сплайсингу пре-мРНК.
- В клетках белок eS1 ассоциирован с U11 пре-мРНК в ядре и цитоплазме и со зрелой U11 мРНК в составе U11/U12 мРНК в ядре, что указывает на причастность eS1 к функционированию минорной сплайсосомы. Дефицит eS1 приводит к нарушению процессинга U11 пре-мРНК, что проявляется в повышении её уровня относительно уровня зрелой U11 мРНК и в снижении эффективности сплайсинга пре-мРНК с редкими интронами, свидетельствуя о роли eS1 в биогенезе U11 пре-мРНК.
- Связывание белка eS1 с T7 транскриптом U11 мРНК приводит к конформационным изменениям сахарофосфатного остова в районе Sm-сайта, вызванным его взаимодействием с неструктурированным N-концевым участком eS1. Эти изменения, по-видимому, отражают перестройки в соответствующем районе U11 пре-мРНК, происходящие при взаимодействии с eS1 в ядре, которые необходимы для связывания Sm-белков при её созревании в цитоплазме.
- В остановленных претранслокационных комплексах 80S рибосом белок uS19, контактирующий с мРНК в А-участке при отсутствии в нем лиганда, взаимодействует с регионами мРНК, кодирующими аминокислотные остатки Lys/Glu и Arg, указывая на присутствие комплексов со свободным А-участком, где uS19 не защищен от контактов с мРНК молекулой пептидил-ТФК. Появление таких комплексов свидетельствует о паузировании рибосом на этих регионах мРНК при элонгации трансляции вследствие замедления в прохождении соответствующих растущих пептидов по рибосомному туннелю.
- Дефицит рибосомного белка eL29 в клетках приводит к существенной реорганизации их транскриптома, что отражается в изменении экспрессии множества генов, свидетельствуя о том, что дисбаланс данного белка запускает каскад событий, приводящих к повышению или понижению активностей определенных генов. В наборе генов, чья экспрессия изменяется в ответ на дефицит eL29, присутствуют гены-мишени транскрипционных факторов p53 и c-Myc, что указывает на возможную связь между дисбалансом eL29 и онкогенезом.

Публикации по теме диссертации

1. Gopanenko A. V., Malygin A. A., Tupikin A. E., Laktionov P. P., Kabilov M. R., Karpova G. G. Human ribosomal protein eS1 is engaged in cellular events related to processing and functioning of U11 snRNA // Nucleic Acids Res. – 2017. – V. 45, № 15. – P. 9121-9137, IF = 11.501
 2. Babaylova E. S.*, Gopanenko A. V.*, Bulygin K. N., Tupikin A. E., Kabilov M. R., Malygin A. A., Karpova G. G. mRNA regions where 80S ribosomes pause during translation elongation in vivo interact with protein uS19, a component of the decoding site // Nucleic Acids Res. – 2020. – V. 48, № 2. – P. 912-923, IF = 11.501
- * – авторы, которые внесли эквивалентный вклад
3. Gopanenko A. V., Kolobova A. V., Meschaninova M. I., Venyaminova A. G., Tupikin A. E., Kabilov M. R., Malygin A. A., Karpova G. G. Knockdown of the Ribosomal Protein eL29 in Mammalian Cells Leads to Significant Changes in Gene Expression at the Transcription Level // Cells. – 2020. – V. 9, № 5., IF = 4.829